



**HAL**  
open science

# Activation différentielle des sous-populations de macrophages par les Neutrophil Extracellular Traps dans un contexte physiologique et dans la polyarthrite rhumatoïde

Dyhia Melbouci

► **To cite this version:**

Dyhia Melbouci. Activation différentielle des sous-populations de macrophages par les Neutrophil Extracellular Traps dans un contexte physiologique et dans la polyarthrite rhumatoïde. Immunologie. Université Paris-Nord - Paris XIII, 2021. Français. NNT : 2021PA131040 . tel-04213481

**HAL Id: tel-04213481**

**<https://theses.hal.science/tel-04213481>**

Submitted on 21 Sep 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 PARIS XIII - SORBONNE PARIS NORD

École Doctorale Sciences, Technologies, Santé Galilée

---

**Activation différentielle des sous-populations de  
macrophages par les Neutrophil Extracellular Traps dans  
un contexte physiologique et dans la polyarthrite  
rhumatoïde**

---

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée par

**Dyhia MELBOUCI**

INSERM UMR 1125

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Soutenue le 27 septembre 2021 devant le jury d'examen composé de :

<b>Dr BALANDRAUD Nathalie</b> , Hôpital Sainte-Marguerite.	Rapporteuse.
<b>Dr APPARAILLY Florence</b> , Hôpital Saint Eloi.	Rapporteuse.
<b>Pr BONCOEUR Émilie</b> , Université Sorbonne Paris Nord.	Examinatrice.
<b>Dr GLATIGNY Simon</b> , Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines.	Examinateur.
<b>Pr DECKER Patrice</b> , Université Sorbonne Paris Nord.	Directeur de thèse.
<b>Dr ASSIER Éric</b> , Université Sorbonne Paris Nord.	Co-encadrant de thèse.

# REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier les membres de mon jury, les rapportrices, le Dr Nathalie Balandraud et le Dr Florence Apparailly. Ainsi que les examinateurs, le Dr Emilie Boncoeur et le Dr Simon Glatigny, d'accepter d'évaluer le travail de mes trois années de thèse.

Je remercie ensuite le directeur de mon laboratoire d'accueil, le Pr Marie-Christophe Boissier de m'avoir accueillie en tant que stagiaire en Master II et de m'avoir permis de continuer en thèse dans les meilleures conditions. Vous avez été pour nous un excellent chef d'équipe qui a su nous motiver et créer une cohésion dans le laboratoire.

Je remercie mon directeur de thèse le Pr Patrice Decker. Vous êtes sans doute l'un des meilleurs chercheurs que j'ai connus. Vous avez été un très bon formateur et un excellent encadrant. J'ai appris beaucoup de choses à vos côtés, notamment la rigueur scientifique. Vous êtes aussi novateur et vous avez un recul impressionnant sur les résultats de notre laboratoire.

Je remercie mon co-encadrant le Dr Eric Assier, qui m'a également encadrée durant mon stage en Master II. En plus d'avoir été un bon encadrant, il a toujours été compréhensif et gentil et il a toujours su prendre les bonnes décisions au bon moment, dans mon unique intérêt.

Je remercie Elodie Segura de m'avoir permis de faire mes expériences RNAseq au sein de leur laboratoire et pour toute son aide et sa disponibilité.

Je remercie le Dr Jérôme Biton, en plus d'être toujours très agréable, notamment avec ses petites blagues, il fait beaucoup avancer la recherche dans notre laboratoire avec ses suggestions et ses questions pertinentes. De plus, Je le remercie de m'avoir aidée à mettre au point les marquages de mes macrophages en cytométrie et d'avoir toujours répondu à mes interrogations.

Je remercie Johana Signaux de m'avoir corrigé une partie de mon manuscrit, de nous donner un regard clinique sur nos résultats fondamentaux. Je te remercie aussi d'être toujours aussi agréable.

Je remercie également les autres chercheurs du laboratoire : le Pr Natacha Bessis pour son implication dans la vie du laboratoire, le Pr Luca Semerano pour ses conseils lors de nos réunions, notamment son expertise en statistiques, mais aussi pour sa simplicité, sa modestie et sa gentillesse, enfin, le Dr Gaëlle Clavel, pour son implication dans les travaux de recherche du laboratoire et pour la lecture des scores histologiques d'arthrite.

Je remercie Antonin Oudar de m'avoir formée pour faire des qPCR et d'en avoir fait pour moi.

Je remercie très chaleureusement nos ingénieuses ingénieurs qui sont sans aucun doute les murs porteurs de notre laboratoire. Elles m'ont beaucoup apporté pendant mes années de thèse. En plus d'être intelligentes et belles, elles sont gentilles, impliquées et agréables avec toutefois chacune sa particularité qui forme un lot certifié qui se complète.

Je commence par Magali Breckler, qui m'a formée en biologie moléculaire et en expérimentation animale et qui m'a beaucoup aidée dans mes manips. Elle est de plus, une formidable amie, que j'ai la chance d'avoir. Elle est extrêmement gentille, compréhensive, toujours présente quand nous avons besoin d'elle. Elle a toujours le bon mot réconfortant. Elle est toujours souriante et de bonne humeur. C'est une fille passionnante qui me surprend avec son énergie positive et toutes les activités qu'elle entreprend en plus de sa grande implication dans le laboratoire.

Je remercie aussi Delphine Lemeiter de m'avoir formée à la cytométrie en flux et de m'avoir beaucoup aidée dans mes manips d'ELISA. Delphine est la petite maman du laboratoire, et même si elle nous gronde tout le temps comme ses enfants, elle prend toujours notre défense. Elle est gentille et extrêmement bienveillante.

Je remercie Roxane Hervé qui m'a formée en microscopie et en expérimentation animale et qui m'a beaucoup aidée lors de mes manips. Elle est également gentille, très disponible et impliquée dans le travail de plusieurs étudiants. Elle est rigoureuse et c'est une véritable encyclopédie, on apprend beaucoup à ses côtés.

Je remercie Mylène Petit, notre intermédiaire entre l'hôpital et le laboratoire. Je salue son grand sens de l'organisation et son amabilité.

Je remercie les étudiants du laboratoire. Je commence par mes copines trop mignonnes, Lyna Mebreck et Megane Lacaud, avec qui on a partagé toute notre vie de laboratoire et même en dehors. Vous êtes des amies formidables.

Mégane, le petit rayon de soleil du laboratoire, avec son rire contagieux, son sens de l'écoute et du partage, sa générosité et son expertise du Japon et tous ces bons plans. Ta bonne humeur et nos conversations en voiture me sont d'un grand réconfort.

Lyna, la plus jolie fille de notre laboratoire. Elle a été ma copine et ma confidente pendant toutes ces années. Elle est extrêmement gentille, agréable, rigolote, généreuse et toujours de bonne écoute et de très bon conseil. De plus, c'est une fille intelligente, investie dans ce qu'elle fait et j'espère sincèrement qu'elle réalisera toutes ses ambitions.

Je remercie aussi Ahmad Haidar-Ahmad d'être toujours souriant mais aussi pour sa gentillesse et sa disponibilité et je remercie Tessnim, le nouveau petit bébé du laboratoire.

Je remercie aussi les autres étudiants qui sont passés dans notre laboratoire.

Je commence par Maxime Batignes, un ami formidable que j'aime beaucoup. Il a su faciliter mon intégration dans le laboratoire. C'est une très belle personne. Il est gentil, très intelligent, rigolo et très agréable. De plus, il m'a accompagnée durant tout mon parcours, de mes débuts en manips à la rédaction de ma thèse.

Je remercie aussi Kerari qui est l'une des plus belles personnes que j'ai rencontrées. Une fille douce, gentille et impliquée dans tout ce qu'elle fait. Nous avons partagé beaucoup de manips ensemble quand j'étais stagiaire et beaucoup de jolis moments en dehors du laboratoire.

Je remercie aussi Meriem Matouk, une bouffée de fraîcheur qui a fait son passage dans notre laboratoire. Elle est très gentille, pleine d'énergie positive et d'ambitions. En peu de temps, elle a su être d'un grand réconfort et s'est révélée être une véritable amie.

Je remercie aussi les autres étudiants, Mari de m'avoir fait mes ELISA pendant son stage, Sarra Seninet, François Santinon, Elyes Ré, Emma André et Gerome Bohelet pour leur participation à la vie du laboratoire.

Je remercie les deux premières personnes avec qui j'ai partagé toutes mes années à bobigny, Nessrine Mouhoubi et Liasmine Haine.

Nessrine a été une amie très généreuse, gentille et disponible.

Yasmine, c'est ma meilleure rencontre en France. C'est une amie formidable que j'ai beaucoup de chance d'avoir. Nous avons partagé ensemble les bons et les mauvais moments. Elle est douce, gentille, d'une bonté incroyable. Elle a toujours été présente pour moi et m'a toujours soutenue. PS : nos pauses café interminables me manqueront énormément.

Je remercie aussi mon adorable petit frère, Anis, ma sœur Kamelia, ma grand-mère, mes belles sœurs Lilia et Hassiba, mes tantes et mes copines, Manel, Sissi et Tafsouth pour leur soutien.

*Je dédie ma thèse à mon cher PAPA, mon petit papouné d'amour, mon ange gardien. Tu as été pour moi le meilleur père qu'on puisse avoir. Tu m'as toujours soutenue, aimée et chérie. Tu m'as toujours offert toutes les conditions affectueuses et matérielles pour que je puisse m'épanouir. J'ai été la fille la plus chanceuse à tes côtés. Tu as toujours su me redonner le sourire avec tes blagues pas du tout drôles. J'espère que tu es fier de moi de là où tu es. Et sache que même si tu n'es plus toutes mes pensées te reviennent. Je t'aime.*

*Je dédie cette thèse aussi à ma maman. La femme la plus forte au monde. Je la remercie pour son amour inconditionnel et son soutien infailible pendant toutes ces années. J'espère que j'aurais l'occasion de te rendre un millième de ce que tu as pu faire pour moi.*

*Je dédie également ma thèse à la meilleure sœur de l'histoire des sœurs, Kathia. Tu es ma sœur, ma meilleure amie, ma confidente, ma deuxième maman. Tu m'as toujours soutenue, réconfortée, tu m'as accompagnée durant toute ma vie sur absolument tous les plans et je ne te remercierai jamais assez pour ça.*

*Enfin, je dédie ma thèse à l'amour de ma vie sans qui toutes ces années n'auraient pas de sens. Je te remercie pour ta patience et la joie que tu mets dans ma vie. Je te remercie d'être mon mari, mon amour et mon confident. Tu es la meilleure chose qui me soit arrivée. Que Dieu te préserve pour moi.*





# SOMMAIRE

REMERCIEMENTS .....	1
SOMMAIRE .....	7
LISTE DES ABREVIATIONS.....	13
LISTE DES FIGURES .....	21
TABLEAU .....	25
RÉSUMÉ .....	27
INTRODUCTION.....	29
I. Cellules myéloïdes.....	30
I.1 Génération de cellules myéloïdes .....	30
I.2 Activation de la myélopoïèse .....	32
II. Les polynucléaires neutrophiles .....	34
II.1 Origine, développement et élimination des polynucléaires neutrophiles.....	34
II.2 Recrutement et activation des neutrophiles sur les sites inflammatoires.....	37
II.3 Fonctions des neutrophiles .....	41
II.3.1 Production d'espèces réactives de l'oxygène et d'espèces réactives de l'azote .	41
II.3.2 Dégranulation.....	42
II.3.3 Production de cytokines et de chimiokines .....	45
II.3.4 Phagocytose .....	45
II.3.5 Production de neutrophil extracellular traps.....	47
II.3.5.1 Voies de production des NETs .....	48
II.3.5.1.1 Production des NETs par NETose suicidaire.....	48
II.3.5.1.2 Formation des NETs sans mort cellulaire.....	52
II.3.5.2 Expulsion de l'ADN par d'autres mécanismes confondus avec la production de NETs.....	55
II.3.5.2.1 L'hypercitrullination leucotoxique.....	55
II.3.5.2.2 La mitophagie défectueuse .....	56
II.3.5.2.3 Les autres processus de libération d'ADN confondus avec la production de NETs.....	57
II.3.5.3 Rôle physiologique des NETs.....	59
II.3.5.4 Élimination des NETs .....	61
II.3.5.5 Rôle pathologique des NETs dans les maladies auto-immunes autres que la polyarthrite rhumatoïde.....	61
II.3.5.5.1 Lupus érythémateux systémique .....	61
II.3.5.5.2 Vascularites des petits vaisseaux associées aux ANCA.....	63

II.3.5.5.3	Autres pathologies auto-immunes .....	64
II.3.5.6	Détection et quantification des NETs.....	65
II.4	Hétérogénéité phénotypiques et fonctionnelles des neutrophiles .....	68
III.	Les macrophages.....	69
III.1	Origine et développement des macrophages. ....	69
III.2	La polarisation macrophagique.....	73
III.2.1	Les macrophages pro-inflammatoires (M1-like) .....	75
III.2.2	Les macrophages anti-inflammatoires (M2-like).....	77
III.2.2.1	Les macrophages M2a-like.....	77
III.2.2.2	Les macrophages M2b-like.....	78
III.2.2.3	Les macrophages M2c-like.....	78
III.2.3	Les macrophages M-CSF et GM-CSF .....	79
III.2.3.1	La polarisation macrophagique avec le GM-CSF.....	80
III.2.3.2	La polarisation macrophagique avec le M-CSF.....	80
III.3	Activation et fonctions des macrophages.....	82
III.3.1	La phagocytose .....	83
III.3.1.1	Reconnaissance de l'agent pathogène .....	83
III.3.1.1.1	Récepteurs opsoniques .....	83
III.3.1.1.2	Récepteurs non-opsoniques .....	87
III.3.1.1.3	Toll like receptors .....	87
III.3.1.2	Phagocytose .....	89
III.3.2	Présentation antigénique.....	91
III.3.3	Résolution de l'inflammation et la cicatrisation .....	93
IV.	Polyarthrite rhumatoïde.....	94
IV.1	Introduction et étiologie de la polyarthrite rhumatoïde (PR) .....	94
IV.1.1	Prédispositions génétiques et épigénétiques .....	95
IV.1.2	Les risques environnementaux.....	98
IV.2	Physiopathologie de la PR.....	101
IV.2.1	Les lymphocytes B et la production d'auto-anticorps dans la PR .....	102
IV.2.2	Les neutrophiles et les NETs dans la PR.....	104
IV.2.3	Les macrophages dans la PR .....	109
IV.2.4	Impact des autres cellules dans la PR.....	113
IV.2.5	Cytokines emblématiques de la PR.....	114

IV.3	Les modèles expérimentaux de la PR .....	116
IV.4	Diagnostic et thérapies de la PR .....	119
IV.4.1	Les PR ACPA-positives et ACPA-négatives.....	119
IV.4.2	Les manifestations cliniques .....	119
IV.4.3	Stratégies de traitement de fond dans la PR .....	121
	HYPOTHESE ET OBJECTIFS DE LA THESE .....	125
	RESULTATS .....	127
I.	Article .....	128
I.1	Abstract .....	130
I.2	Introduction .....	131
I.3	Methods.....	134
I.4	Results .....	140
I.4.1	NETs induce a pro-inflammatory profile in macrophage subpopulations .....	140
I.4.2	The pro-inflammatory effect of NETs on macrophage-subpopulation is more prominent in RA patients than in healthy subjects .....	145
I.4.3	The anti-inflammatory effect of NETs cytokine-dependent and may be compensated by their pro-inflammatory effects.....	149
I.4.4	RA macrophages are resistant to the anti-inflammatory effect of NETs .....	155
I.4.5	NETs activate macrophages in a TLR9-independent manner and C1q inside NETs is not crucial for macrophage activation .....	159
I.4.6	NETs trigger the aryl hydrocarbon receptor pathway in macrophages.....	161
I.5	Discussion .....	163
I.6	References .....	168
I.7	Supplementary data.....	174
II.	Revue scientifique .....	177
II.1	Summary.....	179
II.2	Introduction .....	180
II.3	PMN: more sophisticated than believed.....	180
II.4	Understanding properly NET formation and NETosis .....	183
II.5	Involvement of NET formation in diseases.....	187
II.6	Impact of NET formation on the regulation of immune and inflammatory responses.....	190
II.7	What have we learned from in vitro studies? .....	196
II.8	Conclusions .....	198

II.9	References .....	201
DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....		223
I.	Caractérisation des macrophages et préparation de NETs .....	226
II.	L'activation par les NETs induit un profil hautement inflammatoire des sous-populations de macrophages. ....	228
III.	Le profil pro-inflammatoire induit par les NETs est plus important dans les cultures de patients atteints de PR.....	231
IV.	Mécanisme d'activation des macrophages par les NETs.....	235
V.	Voies induites par l'activation des macrophages par les NETs .....	238
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		243
CONGRÈS et COLLOQUES .....		295



# **LISTE DES ABREVIATIONS**

AAV : anca associated vasculitis

ACR : american college of rheumatology

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNdb : ADN double brin

ADNsb : ADN simple brin

AEC : arthrite expérimentale au collagène

AMPA : anti-modified protein antibody

ANCA : antineutrophil cytoplasmic antibodies

ANETA : anti-net antibody

Anti-CarP : anti-carbamylated protein

AP-1 : activator Protein-1

APS : antiphospholipid syndrome

Atg5 : autophagy related 5

ATP : adenosine triphosphate

C : candida

C/EBP : CCAAT/enhancer-binding protein

C1q : complement component 1q

C5a : complement component 5a

Ca : calcium

CAIA : collagen antibody-induced arthritis

cC1q : N-terminale collagen C1q

gC1q : C-terminal globular C1q

CC : CC chemokine

CCR : CC chemokine receptors

CCL : CC chemokine ligan

CD : cluster of differentiation

CDAI : clinical disease activity index

CDK : cyclin-dependent kinase

cDMARD : conventional disease-modifying anti-rheumatic drugs

CEACAM : ccarcino-eembryonic aantigen-related cell aadhesis mmolecule



CFA : complete freund's adjuvant

CG : cathepsine G

CGD : chronic granulomatous disease

CGP : common granulocyte precursors

CII : collagène de type II

CIITA : class II major histocompatibility complex transactivator

CLP : common lymphoid progenitor

CLR : C-type lectin receptor

CMH II : complexe majeur d'histocompatibilité

cMoP : common monocyte progenitor

CMP : common myeloid progenitor

CR3 : complement receptor 3

CTLA-4 : protéine t-lymphocyte-associée cytotoxique 4

CXC : chemokine C-X-C motif

CXCL : chemokine C-X-C motif ligand

CXCR : CXC chemokine receptors

DC : dendritic cell

DNase : désoxyribonucléase

DPI : diphenyleneiodonium chloride

DTHA : delayed-type hypersensitivity arthritis

E : embryonnaire

EBP : enhancer-binding protein

EDTA : éthylènediamine tétraacétique.

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

EMP : erythro-myeloid progenitors

EULAR : european league against rheumatism

F-actine : actine fibrillaire

FLS : fibroblast-like synoviocyte

FPR : formyl peptide receptor

GC : glucocorticoid

gC1q : C-terminal globular C1q

G-CSF : granulocyte colony-stimulating factor

GM-CSF : granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

GPCR : G-protein-coupled receptor

GPI : glucose-6-phosphate isomérase

Grx1 : glutaredoxin 1

H : hydrogène

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : hydrogen peroxide

HLA : human leukocyte antigen

HOCl : hypochlorous acid

HSC : hematopoietic stem cells

HSPG : heparan sulfate proteoglycan

ICAM : intercellular adhesion molecule

IFN : interferon

IgG : immunoglobulin

iNOS : inducible nitric oxide synthase

IPP : arthrose digitale interphalangienne proximale

IRF : interferon regulatory factors

JAK : janus kinase

LDG : low density granulocytes

LDN : low-density neutrophil

LES : lupus érythémateux systémique

LFA1 : lymphocyte function-associated antigen 1

LPS : lipopolysaccharide

LTH : leukotoxic hypercitrullination

LY6G : lymphocyte antigen 6 complex, locus g

MAC-1 : macrophage-1 antigen

MafB : maf bzip transcription factor b

mBSA : methylated bovine serum albumin

MCP : métacarpophalangiennes

MCP-1 : monocyte chemoattractant protein 1

M-CSF : macrophage colony-stimulating factor

MDP : macrophage and dendritic cell precursor

MEB : microscopie electronique à balayage

MEC : matrice extracellulaire

MET : microscopie electronique à transmission

MIF : macrophage migration-inhibitory factor

miR : microRNA

MLKL: mixed lineage kinase domain-like protein

MLR : mixed lymphocyte reaction

MMP : matrix metallopeptidase

MoP : common monocyte progenitor

MPO: myéloperoxydase

MPP : multipotent progenitors

MPS : mononuclear phagocytic system

MS : multiple sclerosis

MT : mito-tampo

MTX : méthotrexate

MYD88 : myeloid differentiation primary response 88

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NBH : B cell helper neutrophil

NE : neutrophil elastase

NETs : neutrophil extracellular traps

NF-κB : nuclear factor kappaB

NK : natural killer

NLR : nod-like receptor

NO : nitric oxide

NOX : NADPH oxydase

O2 : peroxydes

OPA1 : optic atrophy 1

PAD : peptidyl-arginine deiminase

PAMP : pathogen associated molecular patterns

PBMC : peripheral blood mononuclear cell

PI3K : phosphoinositide 3-kinase

PKC : protéine-kinase C

PLC : peptide-loading complex

PMA : phorbol mystrate acetate

PMN-MDSC : polymorphonucleaires-myeloid-derived suppressor cells

PR : polyarthrite rhumatoïde

PR3 : protéinase 3

PRR : pattern-recognition receptors

PS : phosphatidylsérine

PSGL-1 : P-selectin glycoprotein ligand 1

PTPN22 : protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22

RAC2 : ras-related c3 botulinum toxin substrate 2

RAGE : receptor for advanced glycation endproducts

RANKL : nuclear factor kappa b ligand

RF : rheumatoid factor

RIPK3 : receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3

RLR : retinoid acid-inducible gene I-28 like receptor

RNP-IC : ribonucleoprotein immune complexes

RNS : reactive nitrogen species

ROS : reactive oxygen species

Runx1 : runt-related transcription factor 1

S : streptococcus

SDAI : simplified disease activity index

SE : shared epitope

SERPINA1 : serpin family a member

SIRP $\alpha$ : signal regulatory protein  $\alpha$

SNAREs : soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor

STAT : signal transducer and activator of transcription

TAP : transporter associated with antigen processing

TFAM : mitochondrial transcription factor A

TGF : transforming growth factor

Th : T helper

TLR : toll-like receptors

Tregs : regulatory T cells

TREX1 : three-prime repair exonuclease 1

TRIF : TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$

VEGFR1 : vascular endothelial growth factor receptor 1

VIH-1 : virus d'immunodéficience humaine 1

VS : vésicule sécrétoire



# **LISTE DES FIGURES**

Figure 1. La myelopoïèse.....	32
Figure 2. Production des neutrophiles et leur mobilisation dans le sang. ....	35
Figure 3. Cascade de recrutement des neutrophiles dans les tissus. ....	38
Figure 4. Élimination des pathogènes par la coopération entre la phagocytose, la dégranulation et la production de ROS.....	41
Figure 5. Étapes de NETose induite par le PMA. ....	50
Figure 6. Étapes de production de NETs mitochondriaux.....	54
Figure 7. Nombre de publications incluant le terme "neutrophil extracellular trap" par an.....	65
Figure 8. Développement des macrophages. ....	72
Figure 9. Polarisation des macrophages. ....	75
Figure 10. Structure du C1q.....	86
Figure 11. La phagocytose.....	90
Figure 12. Étape de présentation antigénique par le CMH I et le CMH II.....	93
Figure 13. Structure d'une articulation normale et d'une articulation arthritique. ....	101
Figure 14. Phases de la PR.....	102
Figure 15. Neutrophiles et macrophages dans la PR.....	112
Figure 16. Secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-8 by macrophage subpopulations stimulated with NETs. ....	142
Figure 17. Secretion of the anti-inflammatory cytokine IL-10 by macrophage subpopulations stimulated with NETs. ....	144
Figure 18. Secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-8 by macrophage subpopulations of healthy donors and rheumatoid arthritis patients stimulated with NETs.....	146
Figure 19. Comparison of IL-8 induction levels by macrophages from healthy donors and rheumatoid arthritis patients stimulated with NETs.....	147
Figure 20. Secretion of the anti-inflammatory IL-10 by macrophage subpopulations of healthy donors and rheumatoid arthritis patients stimulated with NETs.....	148
Figure 21. Modulation of IL-6 secretion by NETs on LPS-stimulated macrophage subpopulations.....	150
Figure 22. Modulation of IL-10 secretion by NETs on LPS-stimulated macrophage subpopulations.....	152
Figure 23. Additive effect of NETs and LPS on IL-8 secretion by macrophage subpopulations. .....	154



Figure 24. Modulation of IL-6 secretion by NETs on LPS-stimulated macrophages of healthy donors and rheumatoid arthritis patients.....	156
Figure 25. Modulation of IL-10 secretion by NETs on LPS-stimulated macrophages of healthy donors and rheumatoid arthritis patients. ....	157
Figure 26. Additive effect of NETs and LPS on IL-8 secretion on macrophages subpopulations of healthy donors and rheumatoid arthritis patients. ....	158
Figure 27. Evaluation of the activation process of macrophages by NETs.....	160
Figure 28. NETs-regulated genes on macrophages.....	162
Figure 29. Phenotypic characterization of macrophage subpopulations. ....	174
Figure 30. Determination of the secretory profile of macrophage subpopulations in response to NETs. ....	175
Figure 31. NETs production and characterization. ....	176
Figure 32. Direct effects of NET on myeloid cells. ....	221



# TABLEAU

Table 1. Involvement of NET formation in inflammatory and autoimmune diseases. ....220

# RÉSUMÉ

Les neutrophil extracellular traps (NETs) sont des filaments d'ADN décondensés chargés avec des protéines neutrophilaires. Ils sont produits et sécrétés par les neutrophiles dans le milieu extra-cellulaire. Les NETs ont plusieurs fonctions. Celle que nous avons examinée est leur capacité à activer les cellules myéloïdes. En effet, ils peuvent être pro- ou anti-inflammatoires sur les macrophages non polarisés au repos ou activés, respectivement. Dans cette étude, nous avons examiné l'impact des NETs sur différentes sous-populations de macrophages chez des individus sains et des patients atteints de la maladie auto-immune, polyarthrite rhumatoïde (PR). Nous avons également étudié le mécanisme d'activation des macrophages par les NETs et les voies déclenchées par les NETs dans les macrophages.

Pour ce faire, des macrophages non polarisés, pro- et anti-inflammatoires ont été induits à partir de monocytes sanguins purifiés de sujets sains ou de patients atteints de PR. Des NETs ont également été préparés à partir de neutrophiles sanguins autologues. Ces macrophages ont ensuite été caractérisés et mis en culture avec des NETs en présence ou en l'absence de LPS. Plusieurs médiateurs pro- et anti-inflammatoires ont été analysés en présence ou en l'absence de LPS. Le transcriptome des macrophages pro-inflammatoires cultivés avec des NETs provenant de patients atteints de PR a également été examiné. Enfin, l'implication du récepteur Toll-like 9 (TLR9) dans les macrophages et de la protéine du complément C1q dans les NETs a été déterminée, en cultivant des macrophages de type sauvage/déficient en TLR9 avec des NETs préparées à partir de souris de type sauvage/déficient en C1q.

Nos résultats ont montré que les NETs induisent un profil de cytokines pro-inflammatoires sur les sous-populations de macrophages au repos, y compris celles décrites comme anti-inflammatoires, plus particulièrement chez les patients atteints de PR. En réponse au LPS, les macrophages de la PR sont résistants à l'activité anti-inflammatoire des NETs. L'activation des macrophages par les NETs n'est pas médiée par TLR9 dans les macrophages et ne dépend pas du C1q chargé sur les NETs. Les analyses RNAseq ont confirmé que les NETs activent les médiateurs pro-inflammatoires sur les macrophages mais diminuent l'activation des médiateurs anti-inflammatoires et indiquent qu'ils induisent également les gènes de la voie du récepteur d'aryl hydrocarbure.

Nous avons alors conclu que dans la PR, les NETs déstabilisent l'équilibre pro-/anti-inflammatoire vers une activation pro-inflammatoire des sous-populations de macrophages. De plus les NETs induisent l'activation de la voie de l'Ahr par les macrophages, dont le rôle reste à déterminer.

# INTRODUCTION

# I. Cellules myéloïdes

## I.1 Génération de cellules myéloïdes

Le système immunitaire désigne l'ensemble des mécanismes de défense de l'organisme contre les agents pathogènes et contre les altérations du soi. Deux types d'immunité coexistent. En premier lieu, l'immunité innée, qui représente la première ligne de défense de l'organisme contre les pathogènes. Elle est non spécifique et fera l'objet de ma thèse. En second lieu, l'immunité adaptative ou acquise, qui désigne la deuxième ligne de défense spécifique d'antigène.

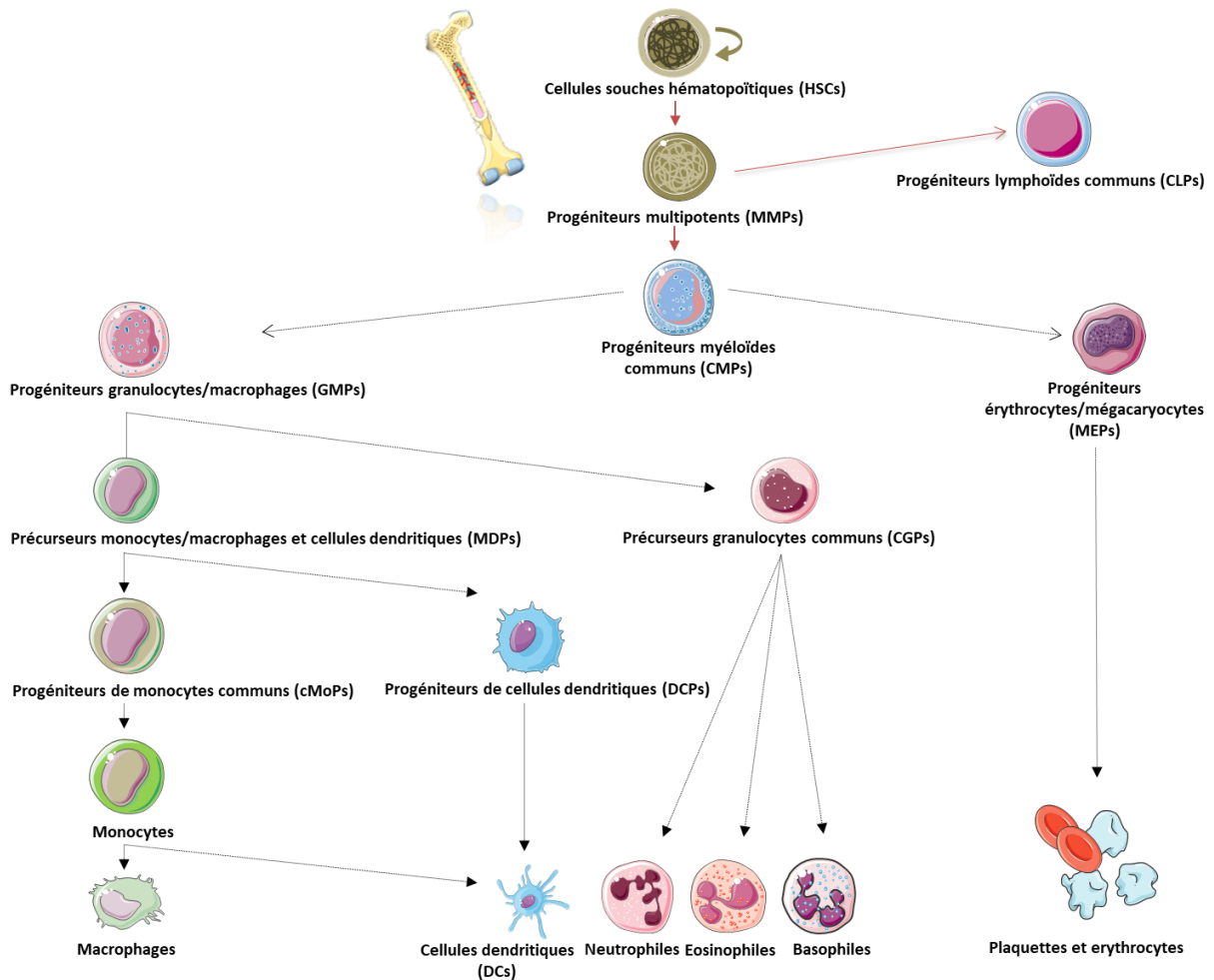
Le fonctionnement du système immunitaire est orchestré par les cellules immunitaires qui sont dotées de fonctions distinctes. La majorité est générée à partir de cellules quiescentes multipotentes qui s'auto-renouvellent, les cellules souches hématopoïétiques (hematopoietic stem cells ; HSCs) *via* un processus appelé hématopoïèse (Becker, McCULLOCH, and Till, 1963; Wu et al., 1968).

Les HSCs résident dans la moelle osseuse, au niveau périvasculaire (Spangrude, Heimfeld, and Weissman, 1988; Kiel et al., 2005). Elles sont regroupées et maintenues sous forme de niches dans un microenvironnement spécifique. Ce microenvironnement est formé principalement de cellules stromales mésenchymateuses, de cellules endothéliales et d'ostéoblastes (Visnjic et al., 2004; Kiel et al., 2005; Sugiyama et al., 2006) qui sont responsables du maintien des niches par des interactions cellulaires, faisant intervenir par exemple les intégrines (Papayannopoulou et al., 1995), ou *via* la sécrétion de facteurs solubles tels que le ligand de la chimiokine de type CXC (chemokine (C-X-C motif) ligand ; CXCL) 12 ou le facteur de croissance transformant (transforming growth factor ; TGF)  $\beta$  (Christopher et al., 2009).

En présence de facteurs inflammatoires, les HSCs sortent de leur état de quiescence et s'activent (Christopher et al., 2009; King and Goodell, 2011). Une fois activées, les HSCs se différencient en progéniteurs multipotents (multipotent progenitors ; MPPs) (Morrison and Weissman, 1994). Les MPPs prolifèrent et donnent naissance, soit à des progéniteurs myéloïdes communs (common myeloid progenitors ; CMPs), qui produiront des cellules myéloïdes par le processus de myélopoïèse (Akashi et al., 2000), soit à des progéniteurs lymphoïdes communs



(common lymphoid progenitor ; CLPs), qui donneront naissance aux lymphocytes, *via* le processus de lymphopoïèse. Les CMPs se différencient ensuite en progéniteurs de mégacaryocytes et d'érythrocytes (megakaryocyte–erythroid progenitor cell ; MEPs) et en progéniteurs de granulocytes et de macrophages (granulocyte-macrophage progenitors ; GMPs) (Manz et al., 2002; Pronk et al., 2007). Les MEPs produisent des plaquettes ou des érythrocytes. Les GMPs, pour leur part, se différencient en précurseurs de monocytes/macrophages et de cellules dendritiques (macrophage and dendritic cell precursors MDPs) et en précurseurs de granulocytes communs (common granulocyte precursors ; CGP) (Fogg et al., 2006; Auffray et al., 2009). Les MDPs donneront naissance, soit aux progéniteurs de cellules dendritiques (dendritic cells progenitors ; DCPs) qui se différencient en cellules dendritiques (dendritic cells ; DCs) classiques ou DCs plasmacytoïdes (Naik et al., 2007), soit aux progéniteurs de monocytes communs (common monocyte progenitors ; cMoPs) (Hettinger et al., 2013; Kawamura et al., 2017a). Les cMoP produisent par la suite des monocytes, qui à leur tour se différencient en macrophages ou en DCs. Les CGPs quant à eux induisent la production de neutrophiles, de basophiles ou d'éosinophiles (Yáñez et al., 2015). Il a également été montré que les DCs peuvent se former à partir de précurseurs lymphoïdes (Manz et al., 2001) (Figure 1).



**Figure 1. La myélopoïèse.**

*À l'état d'équilibre les HSCs sont quiescentes et forment des niches dans la moelle osseuse.*

*Lors de stimuli pro-inflammatoires, les HSC se différencient en MMPs. Les MMPs prolifèrent et donnent naissance à des CMPs ou des CLPs. Les CMPs produisent à leur tour des MEPs et GMPs. Les MEPs se différencient en plaquettes ou en érythrocytes et les GMP produisent les MDPs et les CGPs. Par la suite les MDPs se différencient soit en DCs ou en cMoPs. Les cMoPs produisent à leur tour des précurseurs de monocytes, qui se différencieront en monocytes. Les monocytes donnent naissance soit à des macrophages ou des DCs. Les CGPs quant à eux induisent la production de neutrophiles, de basophiles ou d'éosinophiles.*

## I.2 Activation de la myélopoïèse

La myélopoïèse, qui à l'origine est appelée «granulopoïèse d'urgence» (Manz and Boettcher, 2014), représente le processus de production de cellules myéloïdes, comme décrit précédemment. Elle est la conséquence de plusieurs stimuli. En effet, en cas d'inflammation, la production accrue de facteurs de croissances, de cytokines ainsi que la présence de produits

d'agents pathogènes activent les HSCs qui stimulent le processus de myélopoïèse (Hérault et al., 2017; Mitroulis et al., 2018).

Parmi les nombreux facteurs de croissance impliqués dans l'activation de la myélopoïèse, le facteur stimulant les colonies de granulocytes (granulocyte colony-stimulating factor ; G-CSF) active la production de précurseurs de granulocytaires et il est important pour la mobilisation des neutrophiles (Lieschke et al., 1994). Le facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ; GM-CSF) et le facteur stimulant les colonies de macrophages (macrophage colony-stimulating factor ; M-CSF) sont aussi essentiels pour l'induction de la myélopoïèse. En effet, les souris injectées avec le GM-CSF multiplient leurs neutrophiles sanguins et augmentent le taux de macrophages, d'éosinophiles et de neutrophiles dans la cavité péritonéale (Metcalf et al., 1987). De plus, le facteur M-CSF active directement le facteur de transcription PU.1 responsable de l'induction de la myélopoïèse (Mossadegh-Keller et al., 2013).

Les interleukine (interleukin ; IL) également sont responsables de la génération de cellules myéloïdes. C'est le cas de l'IL-1 qui augmente la division cellulaire et la différenciation des HSCs en lignée myéloïde. L'IL-1 induirait directement le facteur de transcription PU.1 (Pietras et al., 2016).

Les motifs moléculaires associés aux pathogènes (pathogen associated molecular patterns ; PAMPs) stimulent également la myélopoïèse. En effet, les HSCs expriment de nombreux récepteurs aux PAMPs, notamment les récepteurs de type toll (toll-like receptors ; TLRs). La stimulation des HSC, *via* TLR2 et TLR4 induit la prolifération et la différenciation des HSCs en cellules myéloïdes, de façon dépendante de la voie du myeloid differentiation primary response 88 (MYD88) (Nagai et al., 2006; Boettcher et al., 2012).

Une fois activées par ces différents stimuli, les HSCs produisent des cellules myéloïdes différant par leur origine, leurs phénotypes et leurs fonctions en situation physiologique et pathologique. Cette hétérogénéité est élucidée notamment grâce aux avancées technologiques de ces dernières années, particulièrement, les analyses « Single Cell » du transcriptome, du génome et de l'épigénome (Bassler et al., 2019).

Durant nos travaux de recherche, nous nous sommes intéressés aux rôles de ces cellules myéloïdes, particulièrement les polynucléaires neutrophiles et les macrophages, afin de

comprendre leurs fonctions en homéostasie et lors d'une pathologie inflammatoire et auto-immune, la polyarthrite rhumatoïde (PR).

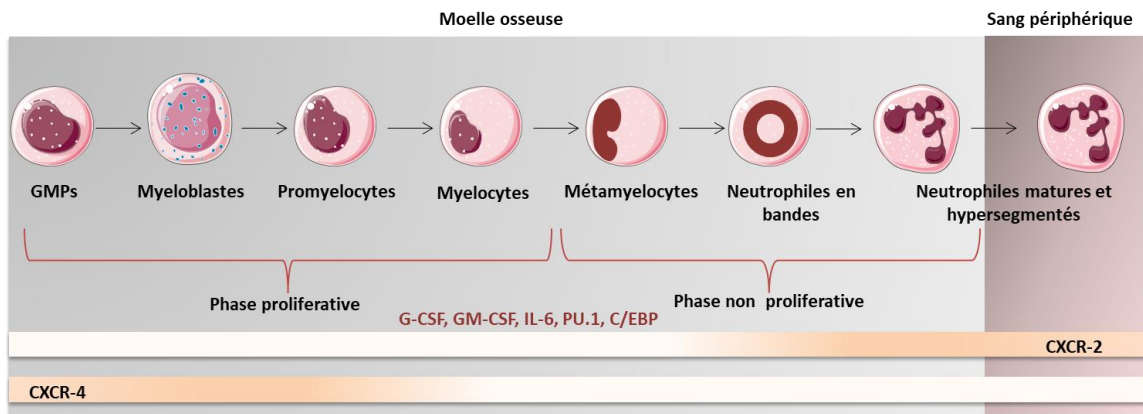
## **II. Les polynucléaires neutrophiles**

### **II.1 Origine, développement et élimination des polynucléaires neutrophiles**

Les polynucléaires neutrophiles sont une première ligne de défense immunitaire contre les microorganismes pathogènes. Ils sont également responsables de l'induction et la progression de plusieurs pathologies, notamment pro-inflammatoires et auto-immunes, d'où l'intérêt porté à cette population immunitaire durant mes travaux de thèse. Les neutrophiles sont des cellules avec un noyau multilobé (Boll and Fuchs, 1970). Ils sont caractérisés par l'expression du marqueur cluster de différenciation (cluster of différenciation ; CD)-11b chez l'humain (H et al., 2011) et le locus G6D du complexe de l'antigène lymphocytaire 6 (lymphocyte antigen 6 complex, locus G ; LY6G) chez la souris (Bao and Cao, 2011; Rose, Misharin, and Perlman, 2012). Ils ont la particularité d'être riches en granules, d'où leur appellation «granulocytes» (Borregaard, Sørensen, and Theilgaard-Mönch, 2007). Avec plus de  $10^{11}$  neutrophiles produits par jour, ils représentent les leucocytes les plus abondants (50 à 70%) chez l'humain dans le sang à l'état d'équilibre (Fliedner et al., 1964). Le maintien de leur taux dans la circulation sanguine à l'état homéostatique et pathologique est régulé par la balance entre la production, la libération de la moelle et l'élimination des neutrophiles.

La génération des neutrophiles, également appelée granulopoïèse, se fait dans la moelle osseuse, à partir des GMPs. Le cycle de production des neutrophiles inclut deux phases. La première est dite proliférative. Elle se caractérise par l'évolution des GMPs en progéniteurs myéloblastes. Puis, la maturation des myéloblastes en promyélocytes qui sont marqués par l'apparition des premiers granules qui les engagent dans la différenciation en neutrophiles uniquement (Bainton, Ulliyot, and Farquhar, 1971). Par la suite, les promyélocytes évoluent et se transforment en myélocytes. À ce stade, les cellules peuvent se diviser et constituer un réservoir. La deuxième phase est dite non proliférative. Elle commence lorsque les myélocytes deviennent des métamyélocytes qui ne peuvent plus se diviser (Bainton, Ulliyot, and Farquhar, 1971). Après ce stade, les cellules se transforment en neutrophiles en bande, puis leurs noyaux

se segmentent et génèrent des neutrophiles matures. Enfin, les neutrophiles matures deviennent des neutrophiles hypersegmentés (Boll and Fuchs, 1970) (Figure 2).



**Figure 2. Production des neutrophiles et leur mobilisation dans le sang.**

*En présence des facteurs G-CSF, GM-CSF, IL-6 et certains facteurs de transcription, des neutrophiles matures sont produits après plusieurs stades de différenciation. La balance d'expression des récepteurs aux chimiokines CXC, CXCR-2 et CXCR-4 à la surface des neutrophiles va ensuite réguler leur libération dans le sang ou leur rétention dans la moelle osseuse.*

Une fois leur maturation achevée, la majorité des neutrophiles restent dans la moelle osseuse constituant un réservoir de neutrophiles matures prêts à répondre en cas de stress (Semerad et al., 2002). Une faible quantité de neutrophiles matures migrent à travers la paroi sinusoïdale de la moelle osseuse pour rejoindre la circulation sanguine et maintenir des taux physiologiques de neutrophiles dans le sang (Burdon, Martin, and Rankin, 2008). La production, la libération et le maintien du nombre de neutrophiles dans le sang périphérique sont largement contrôlés.

Le facteur principal responsable du contrôle de la production de neutrophiles, de leur mobilisation dans le sang à l'état d'équilibre et la mobilisation rapide lors d'infections est le G-CSF (Lieschke et al., 1994). Son récepteur (G-CSFR) est exprimé par les cellules myéloïdes à tous les stades de différenciation et sa stimulation conduit à la production de neutrophiles via la voie de signalisation transducteur de signal et activateur de la transcription (signal transducer and activator of transcription ; STAT)-3 (Panopoulos et al., 2006). Le G-CSF est également important pour la survie des neutrophiles (Basu et al., 2002; Liu et al., 2013). D'autres facteurs jouent un rôle redondant, mais moins important. C'est le cas, par exemple du GM-CSF qui intervient dans l'induction de la granulopoïèse d'urgence suite à une infection (Zhan et al.,

1998). Pour terminer, l'engagement de progéniteurs myéloïdes dans la voie de la granulopoïèse est régulé par la coopération de plusieurs facteurs de transcriptions. Deux facteurs de transcriptions sont cependant cruciaux dans l'induction de la granulopoïèse : les isoformes du CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) et le facteur de transcription PU.1. En effet, le G-CSF stimule l'expression de C/EBP $\alpha$  dans les premiers stades de différenciation de la myélopoïèse pour favoriser l'engagement de la voie de granulopoïèse (Ford et al., 1996). Il disparaît ensuite progressivement pour laisser place à l'expression du facteur C/EBP $\epsilon$  qui intervient dans les derniers stades de différenciation des neutrophiles (Lekstrom-Himes et al., 1999). Enfin, C/EBP $\beta$ ,  $\zeta$ ,  $\delta$  et PU.1 sont exprimés à la fin du processus de granulopoïèse pour permettre la maturation finale des neutrophiles (Rosmarin, Yang, and Resendes, 2005).

Après leur production, 1 à 2 % des neutrophiles matures sortent de la moelle osseuse pour maintenir leurs taux homéostatiques dans le sang (Semerad et al., 2002). Ce mécanisme de libération des neutrophiles est coordonné par la balance de l'expression de deux récepteurs aux chimiokines qui ont des actions opposées. Le récepteur CXCR-2 a pour ligands CXCL-1 et -2 (CXCL-8 chez l'humain) et le récepteur CXCR-4 a pour ligand CXCL-12 (Martin et al., 2003). CXCL-1 et -2 sont de puissants chimioattractants (Jagels and Hugli, 1994). Ils sont sécrétés par le système vasculaire de la moelle osseuse. Lorsque les neutrophiles expriment CXCR-2, ils sont attirés vers la circulation sanguine (Eash et al., 2010). Le CXCL-12 quant à lui, est exprimé constitutivement par les ostéoblastes de la moelle osseuse qui vont retenir les neutrophiles exprimant CXCR-4 et empêcher leur migration dans le sang (Martin et al., 2003; Eash et al., 2009; Delano et al., 2011; Tzeng et al., 2011). C'est la rupture de l'équilibre entre l'expression de CXCR-2 et CXCR-4 qui serait à l'origine du maintien ou de la sortie des neutrophiles de la moelle osseuse vers le sang périphérique (Eash et al., 2010). Dans des conditions basales, l'équilibre favorise la rétention des neutrophiles dans la moelle osseuse. En revanche, dans les conditions pro-inflammatoires, l'augmentation des taux du G-CSF, entre autres, induit l'augmentation de l'expression du ligand de CXCR-2 par les neutrophiles (Köhler et al., 2011) et leur mobilisation dans la circulation sanguine (Semerad et al., 2005; Day and Link, 2012). De plus, l'expression de CXCR-4 est diminuée sur les neutrophiles matures et activés, ce qui favorise la libération des neutrophiles matures dans le sang (Suratt et al., 2004).

Dans le sang périphérique, les neutrophiles ont été considérés depuis longtemps comme des cellules à courte durée de vie, avec une demi-vie de moins d'une journée (Dancey et al., 1976). Ce paradigme a été remis en cause par Pillay et al, qui démontrent en utilisant une nouvelle technique de détection, que la longévité des neutrophiles peut aller jusqu'à 5 jours *in*

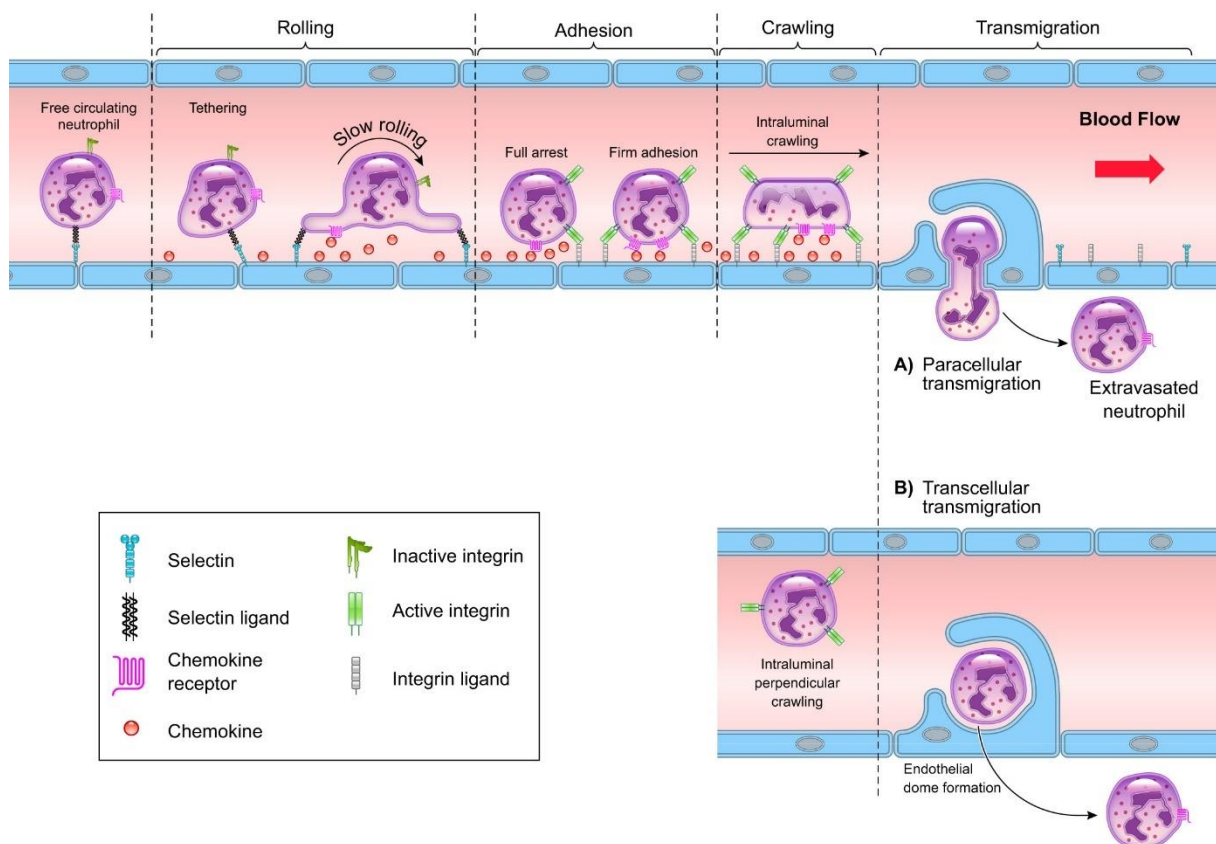
*vivo* (Pillay et al., 2010). De plus, en présence de facteurs inflammatoires, que je détaillerai dans les prochains paragraphes, la longévité des neutrophiles est augmentée (Kim et al., 2011) afin de maintenir des neutrophiles sur le site inflammatoire.

Une fois l'inflammation résolue et leurs missions accomplies, les neutrophiles sont éliminés rapidement pour éviter d'endommager les tissus avec leurs propriétés cytotoxiques. La clairance des neutrophiles se fait principalement au niveau du foie et de la rate (Saverymuttu et al., 1985). Les neutrophiles sénescents retournent aussi dans la moelle osseuse pour y être éliminés (Suratt et al., 2001; Martin et al., 2003). Ils sont tués par l'apoptose dépendante des caspases (Watson et al., 1996; Fadeel et al., 1998) et éliminés ensuite par les macrophages (Savill et al., 1989; Shi et al., 2001) pour aboutir à la résolution de l'inflammation. Ce mécanisme est finement régulé (Serhan, Chiang, and Van Dyke, 2008).

## **II.2 Recrutement et activation des neutrophiles sur les sites inflammatoires**

À l'état physiologique, la libération des neutrophiles dans le sang et leur recrutement dans les tissus sont contrôlés par le rythme circadien (Ella, Csépanyi-Kömi, and Káldi, 2016; Adrover et al., 2019). En cas d'inflammation due à une blessure stérile ou à l'intrusion de microbes dans les tissus, des chimioattractants comme les composants du complément (Haas and van Strijp, 2007), les chimiokines de la famille CXCL, des médiateurs lipidiques et protéiques sont libérés sur le site inflammatoire. Certains se lient à l'endothélium vasculaire et constituent des signaux qui sont reconnus par des récepteurs couplés aux protéines G (G-protein-coupled receptors ; GPCRs) des neutrophiles. Leurs gradients guident la migration des neutrophiles afin de rejoindre les tissus lésés ou infectés, et rétablir l'homéostasie (Nourshargh and Alon, 2014). Pour y parvenir, les neutrophiles libres du sang roulent lentement le long de l'endothélium vasculaire, dans le sens du flux sanguin. Ce roulement est possible grâce à des mouvements successifs de formation et de rupture de liaisons entre les ligands 1 de la glycoprotéine P-sélectine «P-selectin glycoprotein ligand 1 ; PSGL-1» des neutrophiles et des sélectines surexprimées sur les cellules endothéliales activées (Ramachandran et al., 2004). L'arrêt définitif des neutrophiles opère sur le lieu d'interaction des chimiokines chargées négativement avec des protéoglycanes à héparanes sulfates (heparan sulfate proteoglycan ; HSPG) présents sur les cellules endothéliales chargées positivement (Massena et al., 2010). L'expression et l'activation des intégrines neutrophilaires «antigène 1 associé à la fonction

lymphocytaire (lymphocyte function-associated antigen 1 ; LFA1) et antigène macrophage-1 (macrophage-1 antigen ; MAC-1)» et leur liaison aux ligands de type immunoglobuline, qui sont les molécules d'adhésion intercellulaire (intercellular adhesion molecule ; ICAM) des cellules endothéliales (Phillipson et al., 2006) entraîne un attachement fort des neutrophiles à l'endothélium (Shattil, Kim, and Ginsberg, 2010). Les neutrophiles adhérents commencent alors à ramper le long du côté luminal de l'endothélium (Phillipson et al., 2009) et transmigrent vers le tissu par la voie transcellulaire (Carman and Springer, 2004) ou paracellulaire (Liew and Kubes, 2019) (Figure 3).



**Figure 3. Cascade de recrutement des neutrophiles dans les tissus.**

Les étapes séquentielles du recrutement des neutrophiles depuis le système vasculaire jusqu'au tissu sont représentées. Deux voies possibles : (A) Voie paracellulaire entre les cellules endothéliales ; (B) Voie transcellulaire à travers les cellules endothéliales. D'après Liew and Kubes, 2019.

Le chimioattractant majeur des neutrophiles sur les sites de lésions stériles est le CXCL-8 (IL-8) (Cacalano et al., 1994). Il est sécrété par les cellules immunitaires et non immunitaires en réponse à une blessure ou une infection. Ses récepteurs sont le CXCR-1 et le CXCR-2 (Russo et al., 2014). L'IL-8 crée des gradients immobiles qui vont médier, à la fois le recrutement, mais aussi la rétention des neutrophiles sur les sites tissulaires endommagés (Sarris et al., 2012).



L'infiltration rapide des neutrophiles sur le site d'une plaie se produit également suite à l'augmentation du taux de peroxyde d'hydrogène (hydrogen peroxide ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) qui envoie des signaux de la blessure aux neutrophiles (Niethammer et al., 2009). La production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est stimulée par l'ATP. Ce dernier active une voie de signalisation qui mène à la stimulation de l'enzyme oxydase double 1 (dual oxidase 1 ; Duox1) afin de produire du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De plus, l'ATP extra-cellulaire constitue lui-même un signal de danger afin de recruter rapidement les neutrophiles (de Oliveira et al., 2014).

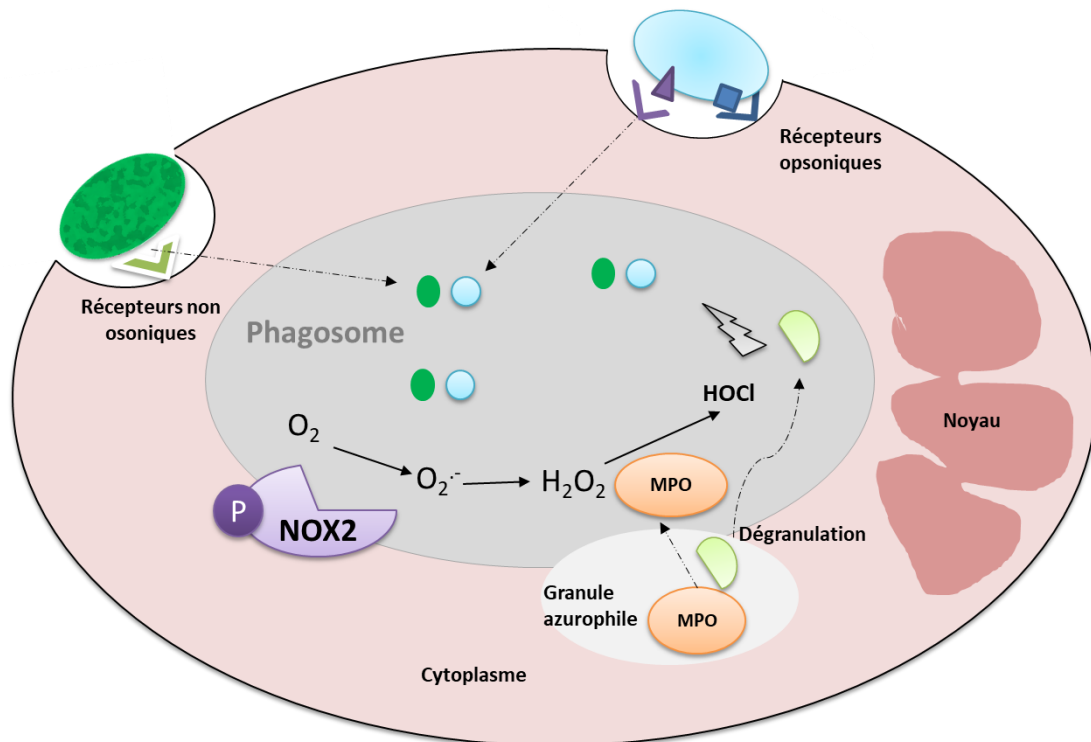
L'amplification du recrutement des neutrophiles est induite par la production de chimioattractants secondaires afin de répondre efficacement au stress. Le facteur majeur responsable de l'attraction de nouveaux neutrophiles est le leucotriène B<sub>4</sub> ; LTB<sub>4</sub>. C'est un médiateur lipidique pro-inflammatoire généré à partir de l'acide arachidonique. Il est induit rapidement par les neutrophiles eux-mêmes, en réponse aux chimioattractants primaires (Pv et al., 2012; Subramanian, Majumdar, and Parent, 2017). Il se lie ensuite sur les récepteurs GCPRs présents à la surface des neutrophiles et stimule la production de l'IL-1 $\beta$  responsable de l'activation des neutrophiles et d'autres cellules présentes sur le site inflammatoire (Pv et al., 2012; Lämmermann et al., 2013). L'IL-1 $\beta$  induit la sécrétion de chimioattractants par d'autres cellules qui vont amplifier davantage et maintenir le recrutement de neutrophiles pendant de plus longues périodes (Chou et al., 2010). Les neutrophiles sécrètent aussi la métalloprotéinase 9 (Matrix Metalloproteinase 9 ; MMP9) qui potentialise la chimiotaxie en clivant l'IL-8 qui devient plus active (Van den Steen et al., 2000). Ils libèrent également de l'ATP extracellulaire qui amplifie le signal et assure une boucle autocrine positive de migration de nouveaux neutrophiles sur les tissus lésés (Chen et al., 2006). Enfin, les premiers neutrophiles présents sur les régions inflammatoires, recrutent des monocytes et des macrophages qui à leur tour activent le recrutement de neutrophiles (Soehnlein and Lindbom, 2010).

Pour faire face à l'invasion des microbes, l'infiltration des neutrophiles dans les tissus inflammatoires est potentialisée davantage. Des PAMPs exprimés par les agents pathogènes agissent comme chimioattractants des neutrophiles. C'est le cas par exemple des peptides formyliques bactériens (bacteria-derived N-formyl-methionyl-leucyl phenylalanine ; fMLP) (Sengeløv et al., 1994a), qui en plus d'être des chimioattractants induisent la sécrétion d'IL-8 (Cassatella et al., 1992). Les PAMPs sont reconnus par les cellules immunitaires, principalement les macrophages et les cellules dendritiques présentes sur le site d'infection. Ils induisent la sécrétion de cytokines ou chimiokines, comme le TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  qui vont stimuler la sécrétion du CXCL-2 et du CXCL-1 pour attirer les neutrophiles vers le site infecté (Miller

et al., 2007; Abtin et al., 2014; Schiwon et al., 2014). Pour terminer, les lymphocytes recrutés lors d'infections sécrètent de L'IL-17 entre-autres, laquelle stimule la production des chimiokines de la famille CXCL-8 et favorise l'attraction de neutrophiles (Miyamoto et al., 2003; Kabir, 2011).

Dès leur arrivée sur le site inflammatoire, les neutrophiles détectent les agents pathogènes via leurs récepteurs (pattern-recognition receptors ; PRRs). Les PRRs sont une famille de plusieurs récepteurs: les récepteurs cytoplasmiques de type nod (nod-Like receptors ; NLRs) (Ekman and Cardell, 2010) et les retinoid acid-inducible gene I-28 like receptors ; RLR, les récepteurs membranaires lectine de type-c (c-type lectin receptor ; CLR). Mais ceux qui sont le plus connus et qui ont fait l'objet de nombreuses études, sont les récepteurs membranaires TLRs. En effet, les neutrophiles expriment les TLR1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10 et leur stimulation induit l'activation des neutrophiles (Hayashi, Means, and Luster, 2003), lesquels éliminent les microbes grâce à leurs cinq fonctions biologiques: la dégranulation, la phagocytose, la production de neutrophil extracellular traps (NETs), la synthèse de cytokines et la production d'espèces réactives de l'oxygène (reactive oxygen species ; ROS) et d'espèces réactives de l'azote (reactive nitrogen species ; RNS) (Kolaczowska and Kubes, 2013).

## II.3 Fonctions des neutrophiles



**Figure 4. Élimination des pathogènes par la coopération entre la phagocytose, la dégranulation et la production de ROS.**

*Les agents pathogènes sont phagocytés par un mécanisme opsonique ou non opsonique dans des phagolysosomes. À l'intérieur du phagolysosome, la NOX2 phosphorylée et la MPO libérée des granules produisent des radicaux libres qui modifient les peptides pathogènes et les inactivent. D'autres peptides anti-microbiens libérés après dégranulation des granules azurophiles dégradent les agents pathogènes dans le phagosome. Inspiré de Allen and Criss, 2019.*

### II.3.1 Production d'espèces réactives de l'oxygène et d'espèces réactives de l'azote

La désintégration des micro-organismes pathogènes par les neutrophiles, soit par dégranulation, phagocytose ou formation de NETs, nécessite souvent des mécanismes oxydatifs, lesquels reposent sur la production d'un grand nombre ROS par les neutrophiles, induisant, ce que nous appelons une explosion ou un burst oxydatif.

Les neutrophiles activés consomment une grande quantité d'oxygène qu'ils convertissent par des réactions d'oxydo-réduction en ROS. Plusieurs mécanismes d'induction de ROS sont connus, les principaux sont leur production par les enzymes: le complexe nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase et la myéloperoxydase (MPO)

(Burton et al., 2014). La NADPH oxydase (NOX) est composée de sous-unités catalytiques membranaires et de sous-unités régulatrices cytoplasmiques. Lorsque les neutrophiles sont stimulés, les sous-unités régulatrices sont phosphorylées et se transloquent dans la membrane plasmique (Groemping et al., 2003). Ensuite, la NOX2, qui est la sous-unité catalytique, s'active au niveau de la membrane phagosomal et forme des radicaux superoxydes ( $O_2^{\cdot-}$ ) à partir de l'oxygène  $O_2$ , qui vont à leur tour servir de précurseurs pour former de  $H_2O_2$  (Yu et al., 1998; Li et al., 2009; El-Benna et al., 2016). La MPO est aussi libérée par dégranulation dans le phagosome (Leffell and Spitznagel, 1974), ou dans le milieu extra-cellulaire (Fuchs et al., 2007). Elle catalyse la formation de ROS, principalement l'acide hypochloreux (hypochlorous acid ; HOCl) à partir du précurseur  $H_2O_2$ . Le HOCl se retrouvant dans le phagosome (Chapman et al., 2002) suffit à lui seul pour tuer plusieurs types de bactéries (Rosen et al., 2009; Green, Kettle, and Winterbourn, 2014). En plus du HOCl, la MPO élabore un large éventail d'autres radicaux (Kettle and Winterbourn, 1997) (Figure 4).

Les ROS produits sont ensuite capables de modifier chimiquement toutes les molécules organiques (protéines, lipides et acides nucléiques). Ceci perturbe leurs propriétés biologiques (Vissers and Thomas, 1997), induit la perte de leurs fonctions (Shao et al., 2010), leur reconnaissance comme corps étrangers par les phagocytes (Malle et al., 2006) et leur destruction (Rosen et al., 2009).

En plus des ROS, des RNS, comme l'oxyde nitrique (nitric oxyde ; NO) sont produits par les neutrophiles. Ils ont un rôle similaire aux ROS et ils sont induits par l'enzyme (inducible Nitric Oxyde Synthase ; iNOS) dans les phagosomes (Wheeler et al., 1997).

### **II.3.2 Dégranulation**

Les neutrophiles renferment un nombre important de vésicules cytoplasmiques appelées granules. Ces derniers sont chargés de nombreuses protéines (Rørvig et al., 2013), qui lorsqu'elles sont libérées par le mécanisme de dégranulation, sont impliquées dans les nombreuses fonctions de neutrophiles.

Les granules des neutrophiles sont produits progressivement au cours de la granulopoïèse dans la moelle osseuse (H et al., 2011). Suivant leurs compositions en protéines et le stade de granulopoïèse auquel ils sont formés, trois familles de granules sont décrites: les

granules azurophiles ou primaires, les granules spécifiques ou secondaires, et les granules de gélatinase ou tertiaires (Kjeldsen et al., 1993; Cowland and Borregaard, 1999).

Les premiers granules élaborés sont les granules azurophiles, connus sous l'appellation (granules positifs à la peroxydase). Ils sont formés au cours du stade promyélocytes. Ils contiennent un nombre important de protéines microbicides (Reeves et al., 2002), dont les protéines antimicrobiennes produisant des oxydants comme la MPO, des protéases comme l'élastase, la protéinase 3, la cathepsine G, l'azurocidine et des protéines perméabilisantes comme le lysozyme (Lominadze et al., 2005; Rørvig et al., 2013). La production de ces protéines est notamment contrôlée par des facteurs de transcription de la famille GATA, le facteur C/EBP et le facteur de transcription lié à la protéine Runx1 ((Runt-related transcription factor 1 ; ; Runx1) (Ford et al., 1996; Chumakov et al., 2000). Leur sécrétion est généralement intra-cellulaire, à l'intérieur du phagosome (Leffell and Spitznagel, 1974) (Figure 4). Mais, malgré leur rôle avéré dans la destruction des pathogènes vu leurs compositions protéiniques, les granules primaires peuvent avoir un contenu différent qui serait dû à une synthèse de différentes protéines pendant le début et la fin du stade promyélocytes, qui nuance leurs fonctions (Rice, Kinkade, and Parmley, 1986; Cowland and Borregaard, 1999).

Les granules secondaires et tertiaires sont quant à eux connus sous l'appellation de (granules négatifs à la peroxydase) vu qu'ils ne contiennent pas de MPO. Ils sont composés de plusieurs protéines impliquées dans les différentes fonctions des neutrophiles, comme la chimiotaxie, en exprimant des récepteurs aux cytokines et aux chimiokines, dans l'extravasation à partir de l'endothélium en exposant des intégrines, dans la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) en synthétisant la gélatinase, ou encore comme agent antimicrobien en renfermant la lactoferrine ou le lysozyme (Rørvig et al., 2013). Leur synthèse est contrôlée principalement par les facteurs de transcriptions C/EBP- $\alpha$  et C/EBP- $\epsilon$  (Khanna-Gupta et al., 2003; Numata et al., 2005). Leur sécrétion permet d'assurer le transport des neutrophiles au site de lésion et elle se fait principalement à la surface cellulaire et non dans le phagosome (Bainton, Ulliyot, and Farquhar, 1971; Leffell and Spitznagel, 1974). Malgré des similitudes fonctionnelles, les deux types de granules sont distincts. En effet, les granules secondaires sont formés aux phases métamyélocytes, ils ont la particularité de renfermer de la lactoferrine et pas de la gélatinase (Kjeldsen et al., 1994). Les granules tertiaires quant à eux sont produits lors des phases terminales de production de neutrophiles. Ils ont la caractéristique de renfermer de la gélatinase mais pas de lactoferrine (Kjeldsen et al., 1994).

Les neutrophiles renferment un dernier type de granules qui n'est pas produit au cours de la granulopoïèse (Borregaard, Miller, and Springer, 1987). Il s'agit des vésicules sécrétoires (VS). Elles sont le résultat d'endocytose de protéines membranaires principalement. Mais contrairement à l'endocytose classique, les protéines qu'elles renferment ne sont pas recyclées ou dégradées (Borregaard, Miller, and Springer, 1987; Borregaard et al., 1992). La dégranulation des protéines contenues dans ces vésicules se fait à la surface de la membrane plasmique, suite à des stimuli inflammatoires faibles (Borregaard et al., 1992; Sengeløv, Kjeldsen, and Borregaard, 1993). Les VS sont importantes surtout dans les premières phases de l'inflammation, puisqu'elles interviennent dans le recrutement des neutrophiles en produisant des récepteurs aux chimiokines (Sengeløv et al., 1994a), dans l'adhérence à l'endothélium et l'extravasation en renfermant des intégrines (Sengeløv et al., 1993) et dans la phagocytose en sécrétant des récepteurs phagocytaires à la surface des neutrophiles (Sengeløv et al., 1994b). La régulation de la sécrétion de ces protéines des VS n'est à ce jour pas encore élucidée.

La libération du contenu des granules est largement contrôlée. En effet, une dégranulation inappropriée ou excessive cause de nombreux dommages, tels que la septicémie (Sahoo et al., 2014). C'est pour cela que la sécrétion des populations de granules est sélective. Les neutrophiles sont d'abord activés via leurs récepteurs par de nombreux stimuli. Plusieurs voies de signalisation sont alors induites et convergent vers l'activation du substrat 2 de la toxine botulique C3 liée à Ras (ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 ; RAC2), critique dans le processus de dégranulation (Abdel-Latif et al., 2004). Elle a pour rôle de remodeler le cytosquelette (Eitzen et al., 2011), qui à son tour achemine les granules vers le phagosome ou la membrane plasmique. Ensuite, selon les besoins du neutrophile, des concentrations de calcium ( $Ca^{+2}$ ) cytosoliques différentes sont produites. En effet, des concentrations distinctes de  $Ca^{+2}$  sont nécessaires à l'activation de différents types de vésicules. Ainsi, Les SV sont sensibles aux faibles doses de  $Ca^{+2}$ , suivie par les granules gélatinases, les granules spécifiques et enfin azurophiles (Lew et al., 1986; Sengeløv, Kjeldsen, and Borregaard, 1993). Le calcium a pour fonction d'activer la fusion des membranes des granules et des membranes cibles grâce aux récepteurs de la famille des SNAREs (soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor ; SNAREs) (Quetglas et al., 2000; Zhou et al., 2015), pour induire au final la dégranulation (Mollinedo et al., 2006).

### **II.3.3 Production de cytokines et de chimiokines**

En plus des protéines produites et libérées par les granules, afin d'orchestrer la réponse immune, les neutrophiles synthétisent de novo différentes familles de cytokines à la demande (Bazzoni et al., 1991; Arruda-Silva et al., 2017; J et al., 2017; Tamassia et al., 2019). Ils sécrètent notamment des cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 (Bazzoni et al., 1991; Palma et al., 1992) ou encore l'IL-17 (Cai et al., 2016). Ils extrudent des médiateurs anti-inflammatoires comme l'IL-1ra afin de résorber la réponse immune (Re et al., 1993) mais aussi d'IL-10 (Puga et al., 2011). Ils produisent de l'IL-8 ou du TGF- $\beta$  pour amplifier leur propre recrutement (Fava et al., 1991; Cassatella et al., 1992) et des chimiokines comme le CCL-23 pour recruter d'autres types cellulaires au site inflammatoire (Arruda-Silva et al., 2017). Les neutrophiles synthétisent aussi des cytokines comme l'IL-23 pour moduler la réponse immune (Tamassia et al., 2019), des facteurs angiogéniques comme le VEGF (Scapini, Calzetti, and Cassatella, 1999) et beaucoup d'autres cytokines et chimiokines avec des rôles distincts, les impliquant dans divers processus physiologiques et pathologiques selon le contexte biologique.

### **II.3.4 Phagocytose**

La production des ROS et la dégranulation sont importantes pour tuer des cellules du soi, infectées ou cancérigènes. Elles sont également essentielles pour l'élimination des microbes par le processus de phagocytose (Segal et al., 1981; Tapper, Furuya, and Grinstein, 2002). La phagocytose est une sorte d'endocytose spécialisée, où des neutrophiles reconnaissent des agents pathogènes et les ingèrent afin de les détruire.

Les microbes à phagocyter sont d'abord reconnus par les récepteurs phagocytaires des neutrophiles. Ils sont exprimés à la membrane des neutrophiles suite à la dégranulation des granules tertiaires et des vésicules sécrétoires (Rørvig et al., 2013). Ces récepteurs reconnaissent les agents pathogènes de manière directe ou indirecte. La reconnaissance directe est plutôt rare et se fait par l'intermédiaire de certains récepteurs, comme la molécule d'adhésion cellulaire liée à l'antigène carcino embryonnaire (carcino-embryonic antigen-related cell adhesion molecule ; CEACAM)-3 qui se lie à plusieurs bactéries (Schmitter et al., 2004; Heinrich et al., 2016; Adrian et al., 2019), le récepteur 3 du complément (complement receptor 3 ; CR3) qui reconnaît plusieurs pathogènes, y compris les champignons (Gazendam et al.,

2014) et les récepteurs du peptide formylique (formyl peptide receptor ; FPR), principalement décrits dans la chimiotaxie des neutrophiles, mais, qui sont aussi responsables de l'absorption des bactéries lors de la phagocytose (Wen et al., 2019). La reconnaissance indirecte des agents infectieux par les neutrophiles est majoritaire lors de la phagocytose. Des marqueurs appelés opsonines vont d'abord entourer des microbes. Deux types d'opsonines sont décrits. Les premières sont les immunoglobulines (Ig) de type IgG et IgM présentes en grande quantité dans le sang périphérique à l'état d'équilibre (Colque-Navarro et al., 2010). Elles reconnaissent des produits exprimés à la surface des agents pathogènes (Sun et al., 2012), tels que les peptidoglycanes, composés clés des parois bactériennes (Peterson et al., 1978; Verbrugh et al., 1981). Les fragments du complément sont le deuxième type d'opsonine. Ils reconnaissent notamment les lectines qui se lient à plusieurs pathogènes (Neth et al., 2000) et se déposent le long des microbes afin d'initier la phagocytose (Neth et al., 2002). Les opsonines fixées sur les pathogènes sont ensuite reconnues par les récepteurs Fc pour les IgGs (Sun et al., 2012) ou les récepteurs du complément pour les fragments du complément, (Mollnes et al., 2002) (Figure 4).

La liaison des opsonines à leurs récepteurs déclenche l'internalisation des pathogènes (Tian et al., 2008). Les neutrophiles réarrangent leur cytosquelette et forment des pseudopodes qui entourent et séquestrent les microbes dans des vacuoles phagocytaires appelées (phagosomes). L'étape suivante est la fusion des granules azurophiles avec le phagosome en formation (Segal, Dorling, and Coade, 1980) et la libération de leurs contenus. Ce phénomène est associé à une explosion respiratoire et une production accrue de ROS, essentielle à la désintégration des microbes (Segal et al., 1981). La production de ROS est primordiale lors de la phagocytose. Dans la granulomatose septique chronique (chronic granulomatous disease ; CGD), un défaut génétique de la NADPH oxydase entraîne un défaut de phagocytose et une activité microbicide défailante, ce qui rend les patients vulnérables à des infections souvent mortelles (Holmes, Page, and Good, 1967) (Figure 4).

Dans le phagosome, un arsenal de produits anti-microbiens est déployé pour éliminer les micro-organismes pathogènes. À titre d'exemple, la MPO produit de l' $\text{HOCl}$  qui détruit les bactéries (Rosen et al., 2009); la protéase à sérine «neutrophile élastase (NE)» clive les facteurs virulents des bactéries (Weinrauch et al., 2002) et dégrade leurs membranes (Belaouaj, Kim, and Shapiro, 2000); la lipocaline limite la croissance bactérienne en séquestrant le fer (Goetz et al., 2002); les peptides cationiques antimicrobiens tels que les défensines et les peptides de la



famille des cathelicidine (LL37) se fixent à la membrane bactérienne, provoquant leur perméabilisation (Lehrer et al., 1989; Turner et al., 1998).

### **II.3.5 Production de neutrophil extracellular traps**

Il existe un mécanisme supplémentaire permettant aux neutrophiles d'éliminer les microbes, découvert plus récemment. c'est la production de NETs, des fibres d'acide désoxyribonucléique (ADN) associées à des protéines dont la fonction est d'immobiliser et de détruire des microorganismes envahisseurs dans le milieu extracellulaire (Brinkmann et al., 2004; Fuchs et al., 2007).

Les NETs ont été découverts et décrits la première fois en 2004 par Volker Brinkmann et al (Brinkmann et al., 2004). Ils ont montré que la stimulation des neutrophiles avec l'acétate et myristate de phorbol (phorbol mystrate acetate ; PMA), le lipopolysaccharide (LPS) ou l'IL-8 induit la libération dans le milieu extracellulaire des structures particulières qu'ils ont appelées NETs. Dans cette étude, ils ont montré que ces structures sont d'un diamètre de 50nm. Elles sont composées de filaments d'ADN décondensés chargés avec des histones et des protéines granulaires. Ils ont également montré que les NETs sont capables de se lier aux bactéries Gram positives et Gram négatives et de les éliminer. Ce phénomène est suivi de la mort des neutrophiles par un processus qui n'est catégorisé ni comme de l'apoptose, ni comme de la nécrose (Brinkmann et al., 2004). Depuis ces travaux, la formation des NETs et la voie de la mort cellulaire associée aux NETs, appelée NETose (Fuchs et al., 2007; Steinberg and Grinstein, 2007) sont mieux caractérisées et suscitent beaucoup d'intérêt. De plus, les découvertes ne cessent de croître sur leurs rôles essentiels dans l'immunité ainsi que sur leur implication dans les pathologies, notamment auto-immunes.

D'abord, la composition exacte des NETs a été mieux comprise. L'ADN occupe une majeure partie des NETs, mais de nombreuses protéines neutrophilaires dont le rôle est essentiel dans l'élimination des pathogènes se lient à ces fibres. Urban et al ont identifié vingt-quatre protéines. Elles sont principalement des histones et des enzymes granulaires, comme la NE, la MPO, la cathepsine G (CG), la protéinase 3 (PR3), la lactoferrine, la gélatinase, le lysozyme C, les défensines et les LL37. Il y a également des protéines cytoplasmiques, des protéines du cytosquelette, des protéines glycolytiques et une protéine du péroxysome (catalase) (Brinkmann et al., 2004; Urban et al., 2009). Un autre point important est que, dans le modèle de Brinkmann

et al; la production de NETs est suivie de la mort des neutrophiles, mais nous savons actuellement que la formation de NETs peut être induite par de nombreux stimulants qui activent des voies de production de NETs différentes (Parker et al., 2012b; Kenny et al., 2017). Certaines voies libèrent les NETs des neutrophiles sans qu'il y ait lyse cellulaire. D'autres les produisent après une série d'événements, qui conduit à la rupture de la membrane plasmique et à la mort des neutrophiles.

### **II.3.5.1 Voies de production des NETs**

#### ***II.3.5.1.1 Production des NETs par NETose suicidaire***

La NETose suicidaire est la mort cellulaire liée à la production de NETs, par les neutrophiles. Elle est différente de l'apoptose, parce qu'il n'y a pas de fragmentation de l'ADN, mais elle est aussi distincte de la nécrose car elle ne conserve pas sa membrane nucléaire (Fuchs et al., 2007). Elle se produit généralement après une longue stimulation des neutrophiles (entre 2 et 4 heures).

Le PMA est la molécule activatrice la plus utilisée pour élucider la succession d'événements qui mène à la NETose. Il se lie directement à la protéine-kinase C (PKC), il agit comme un agoniste et induit l'activation de la voie de signalisation Raf-MEK-ERK (proto-oncogene serine/threonine-protein kinase - mitogen-activated protein kinase - extracellular signal-regulated kinases) (Hakkim et al., 2011). Plus tard, les PKCs phosphorylent les composants p40phox et p47phox de la NOX (Chessa et al., 2010). Le complexe multimérique de la NOX s'assemble au niveau de la membrane du phagosome et produit des ROS (Fuchs et al., 2007). Il est important de noter que cette NETose est dépendante de la production de ROS par la NOX, puisque l'utilisation d'un inhibiteur de la NOX «Diphenyleneiodonium (DPI)» empêche la formation des NETs. De plus, les patients atteints d'une maladie granulomateuse chronique, qui sont porteurs de mutations de la NOX, ne peuvent pas activer la NETose en réponse au PMA (Fuchs et al., 2007) (Figure 5).

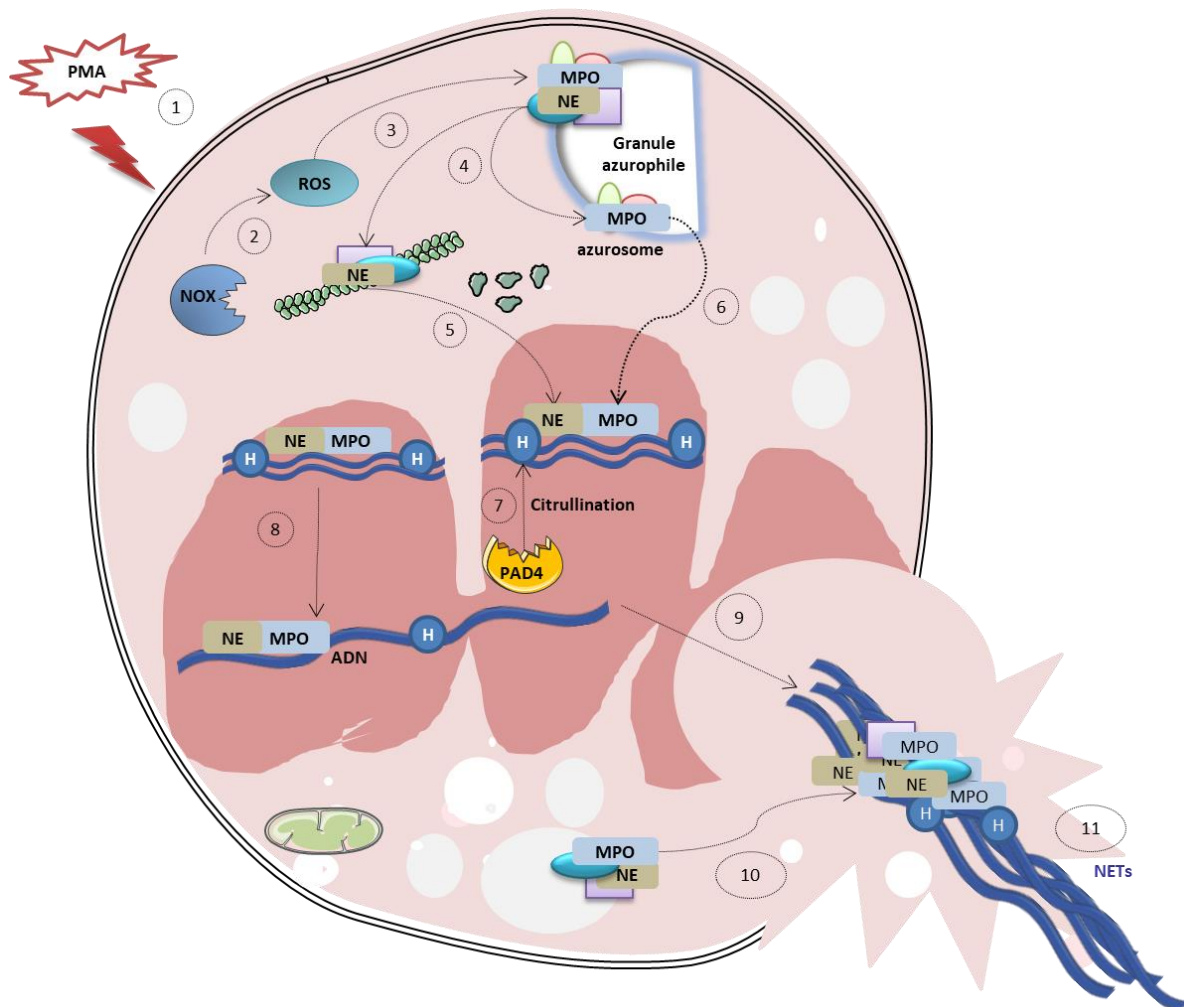
Une fois induits, les ROS déclenchent en premier lieu la dissociation et l'activation de la NE, de la CG et de l'azurocidine d'un complexe qui se trouve dans les granules azurophiles, dont le nom est l'azurososome. À ce stade, ce complexe est encore constitué de MPO, de

lactoferrine, de PR3 et de lysozyme. Une fois dans le cytoplasme, la NE se lie au cytosquelette d'actine et en présence de l' $H_2O_2$  et de la MPO elle segmente l'actine fibrillaire (F-actine). Ainsi, elle se libère et se transloque dans le noyau où elle dégrade partiellement les histones, favorisant la décondensation partielle de la chromatine (Metzler et al., 2014). En deuxième lieu, la MPO pénètre dans le noyau. Elle agit en synergie avec la NE déjà présente pour entraîner la décondensation complète de la chromatine indépendamment de son activité enzymatique (Papayannopoulos et al., 2010) (Figure 5).

D'autre part, l'augmentation des niveaux de calcium intracellulaire active la peptidyl-arginine déaminase 4 (PAD4). La PAD4 à son tour citrulline les histones entourant l'ADN (Hosseinzadeh et al., 2016). La citrullination réduit la charge positive des histones, induisant leur déstabilisation et une décondensation plus importante de l'ADN (Wang et al., 2009) (Figure 5).

Plus récemment, Brinkmann et son équipe indiquent que les neutrophiles qui entrent en NETose activent aussi certains aspects de la signalisation du cycle cellulaire. Ils révèlent que la stimulation des neutrophiles avec le PMA, induit une phosphorylation de la protéine rétinoblastome et de la lamine A/C, par exemple. Elle provoque aussi la duplication des centrosomes. Ils montrent également que l'inhibition des kinases dépendantes des cyclines 4 et 6 (cyclin-dependent kinase ; CDK4/6), qui sont exprimées par les neutrophiles et importantes dans la régulation du cycle cellulaire, induit le blocage de la NETose. Néanmoins, l'activation des neutrophiles par le PMA n'entraîne pas la synthèse de l'ADN, la condensation des chromosomes ou la cytokinésie, ce qui indique qu'il n'y a pas de réentrée dans le cycle cellulaire (Amulic et al., 2017).

L'ensemble de ces événements moléculaires entraîne la décondensation de la chromatine et l'homogénéisation des euchromatines et des hétérochromatines. Ce qui conduit à la dilatation du noyau et à la perte de sa forme. Enfin, la membrane nucléaire se désintègre. Par conséquent, le cytoplasme et le caryoplasme s'entremêlent et finalement la membrane plasmique se rompt et libère les NETs dans le milieu extracellulaire (Fuchs et al., 2007) (Figure 5).



**Figure 5. Etapes de NETose induite par le PMA.**

(1) Stimulation avec le PMA, (2) Activation de l'enzyme NOX pour produire des ROS, (3) Activation de la NE par les ROS, (4) Séparation de la NE de l'azurosome et sa liaison à l'actine, (5) Dégradation de l'actine et sa translocation de la NE dans le noyau où elle induit la décondensation partielle de l'ADN génomique, (6) Séparation de la MPO des granules et translocation dans le noyau où elle décondense la chromatine en synergie avec la NE, (7) Citrullination des histones (H), (8) Décondensation complète de la chromatine, (9) Rupture de la membrane nucléaire et échappement de l'ADN du noyau, (10) Association de protéines granulaires avec l'ADN dans le cytoplasme, (11) Rupture de la membrane plasmique et sécrétion de NETs.

En plus du PMA, plusieurs autres stimuli, avec des cinétiques différentes induisent la NETose *in vivo* et *in vitro*. Les mécanismes moléculaires sous-jacents et les signaux induits sont contrastés, voire différents (Kenny et al., 2017).

Lorsque Brinkmann a décrit la NETose, il a utilisé du LPS et de l'IL-8 en plus du PMA pour produire les NETs (Brinkmann et al., 2004). Certes ces stimuli extrudent aussi des NETs, mais Fuchs et al montrent que cette induction est moins efficace que la stimulation avec le PMA (Fuchs et al., 2007). Au cours de cette étude, ils ont utilisé aussi un autre activateur de la NETose, cette fois-ci plus physiologique, c'est une toxine dérivée de *staphylococcus (S) aureus*. Cette toxine a stimulé les neutrophiles pour produire des NETs de manière efficace, mais avec une cinétique rapide en comparaison au PMA (Fuchs et al., 2007). Un autre activateur de la NETose moins artificiel avec une efficacité importante, est l'utilisation des levures, telles que *candida (C) albicans* (Kenno et al., 2016).

Bien d'autres stimulants de la NETose ont été révélés, ce qui a conduit une équipe à investiguer et à comparer les différentes voies de signalisation induites par quelques activateurs (Kenny et al., 2017). Les données présentées montrent que les NETs induits par le PMA nécessitent des PKC, du Ca<sup>+2</sup>, des ROS, de la MPO et de la NE. En revanche, les histones ne sont pas citrullinées. Ils montrent aussi que l'activation des neutrophiles par *C. albicans* et les *staphylococcus* nécessitent comme pour le PMA, les PKC, la MPO et la NE. Cependant, contrairement à la stimulation précédente, les deux microbes induisent la citrullination de l'histone sur les NETs. D'autres travaux montrent que dans le cas de l'activation par les leishmanias amazoniennes, les neutrophiles peuvent induire de la NETose par une voie alternative qui nécessite le calcium et la phosphoinositide 3-kinase delta (PI3K $\delta$ ), mais qui est indépendante des ROS (DeSouza-Vieira et al., 2016). Un autre activateur utilisé pour induire la NETose mais qui est énormément discuté, pour des raisons que j'évoquerai ultérieurement, est le calcium ionophore (Parker et al., 2012b). Ce dernier induit des fibres de chromatine par un mécanisme indépendant de la NOX (Parker et al., 2012b). Il induit une hypercitrullination des histones (Wang et al., 2009) et ne nécessite pas de PKC, de MPO ou de NE (Kenny et al., 2017). Cependant, le prétraitement avec des inhibiteurs de la PAD n'affecte pas la capacité des neutrophiles à fabriquer les NETs (Kenny et al., 2017), suggérant que la citrullination des histones serait une conséquence de la NETose et que la PAD4 n'est pas nécessaire pour la formation des NETs, contrairement à ce que d'autres études proposent (Lewis et al., 2015).

La fonction de la PAD4 est l'un des aspects les plus controversés dans l'étude des NETs. En effet, selon le stimulus utilisé, certaines études montrent la nécessité de la PAD4 pour induire la NETose (Wang et al., 2009; Lewis et al., 2015; Tatsiy and McDonald, 2018) et d'autres rapports soulignent que les NETs sont formés normalement en l'absence de PAD4 (Kenny et al., 2017), mais aussi que la citrullination des histones par la PAD4 diminuerait son

activité bactéricide (Li et al., 2010). Ceci démontre d'abord, que tous les activateurs de NETs ne sont pas dépendants de la PAD4 et suggère que la citrullination peut se produire lors de la production de NETs, mais que la présence de PAD ou la citrullination n'est pas nécessaire à l'induction de NETs. De plus, la présence des histones citrullinées dans les NETs peut être le résultat d'une citrullination extracellulaire, par l'enzyme PAD2, libérée du cytoplasme lorsque les neutrophiles sont activés (Spengler et al., 2015). Enfin, le rôle de la PAD4 dans la physiologie des neutrophiles ne se limite pas uniquement à la citrullination et à la NETose et PAD4 peut être impliquée dans la NETose indépendamment de la citrullination des histones. En effet, une étude montre que la PAD4 s'associe physiquement à des sous-unités de la NOX et l'active. Or, l'activation de la PAD4 entraîne sa séparation des composants de NOX, empêchant ainsi l'association du complexe NOX et son activation par certains stimuli de la NETose, tels que la PMA (Zhou et al., 2018).

#### ***II.3.5.1.2 Formation des NETs sans mort cellulaire***

En plus de la NETose, les neutrophiles peuvent libérer des NETs *via* un processus qui ne nécessite pas de lyse cellulaire. Dans ce cas, les neutrophiles expulsent de l'ADN d'origine mitochondriale portant des protéines granulaires (Yousefi et al., 2009; McIlroy et al., 2014; Wang et al., 2015).

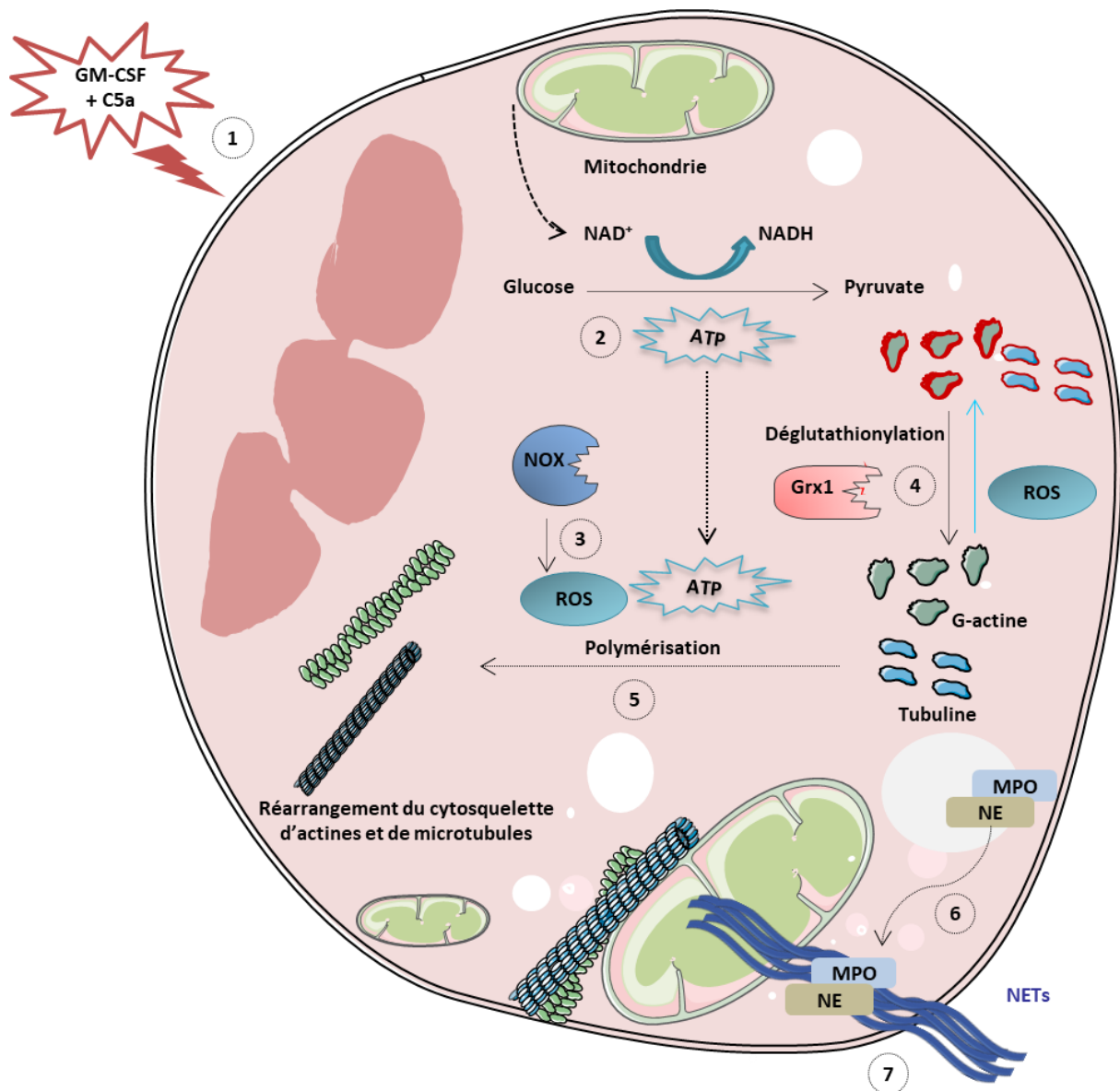
Il est important de noter que d'autres cellules immunitaires telles que les éosinophiles et les basophiles (Yousefi et al., 2008; Morshed et al., 2014), mais aussi les monocytes et les lymphocytes (Ingelsson et al., 2018) sont capables de libérer cet ADN mitochondrial indépendamment de la mort cellulaire. Les filaments expulsés dans le milieu extracellulaire, comme pour les NETs, sont capables de se lier et d'éliminer les bactéries. Néanmoins, certains types cellulaires, comme les lymphocytes, éjectent de l'ADN dépourvu de protéines antimicrobiennes dans le milieu extracellulaire (Ingelsson et al., 2018). De ce fait, l'effet bactéricide pourrait être moins efficace.

Les NETs mitochondriaux sont produits par plusieurs stimuli. Le plus utilisé *in vitro* est l'amorçage des neutrophiles avec le GM-CSF, suivi de la stimulation par le ligand TLR4 ou le facteur 5a du complément (complement component 5a ; C5a) (Yousefi et al., 2009). Une fois activés, les neutrophiles réarrangent le cytosquelette d'actine et de microtubules (Stojkov et al., 2017; Amini et al., 2018). Ce phénomène est essentiel à l'expulsion de l'ADN et à la formation

de NETs. Il a été montré que la stimulation des neutrophiles par le GM-CSF et C5a induit l'accumulation d'actine F dans un pôle de la cellule et la sécrétion de NETs. Cette même équipe a démontré également que l'inhibition du cytosquelette d'actine par des agents pharmacologiques ou par manipulation génétique, empêche la libération de l'ADN mitochondrial nécessaire à la formation des NETs (Stojkov et al., 2017).

Le réarrangement du cytosquelette lors de la production de NETs est dépendant de la production de ROS (Stojkov et al., 2017). En effet, les neutrophiles présentant un défaut génétique de la NADPH oxydase ne parviennent pas à induire la polymérisation de l'actine et de la tubuline ainsi que la production de NETs. De plus, la stimulation avec les produits de la NOX, comme le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, parvient à induire la polymérisation de l'actine et la formation de NETs, en dépit de l'absence de la NOX elle-même (Stojkov et al., 2017). Cependant, les ROS activent aussi la glutathionylation réversible de l'actine, une modification post-traductionnelle des résidus cystéines par ajout de glutathion (Stojkov et al., 2017). Il a aussi été décrit que cette modification post-traductionnelle régule négativement la polymérisation du cytosquelette (Sakai et al., 2012), ce qui par conséquent, pourrait nuire à la formation de NETs. De plus, les neutrophiles déficients en glutaredoxine 1 (Grx1), une enzyme nécessaire à la déglutathionylation de l'actine et de la tubuline, sont incapables de polymériser le réseau du cytosquelette et ne parviennent pas à libérer l'ADN mitochondrial pour produire des NETs (Stojkov et al., 2017). Stojkov et son équipe proposent alors une théorie, selon laquelle la dynamique du cytosquelette est obtenue d'une part, *via* l'équilibre entre les effets de la régulation des ROS sur la polymérisation et la glutathionylation et d'autre part, *via* la déglutathionylation médiée par Grx1 (Stojkov et al., 2017; Yousefi et al., 2019).

La production d'ATP d'origine glycolytique est également nécessaire à l'assemblage du cytosquelette et à la formation de NETs. En effet, l'absence de la protéine mitochondriale, l'atrophie optique de type 1 (Optic atrophy type 1 ; OPA1), une protéine importante pour maintenir l'intégrité membranaire de la mitochondrie, réduit l'activité du complexe I de transport des électrons mitochondriaux dans les neutrophiles, entraînant une baisse de la synthèse d'ATP par glycolyse. Ceci empêche les réseaux de microtubules de s'assembler et bloque la formation de NETs (Amini et al., 2018) (Figure 6).



**Figure 6. Étapes de production de NETs mitochondriaux.**

(1) Stimulation du neutrophile avec le GM-CSF suivi de C5a, (2) Synthèse de l'ATP glycolytique, (3) Activation de la NOX qui produit des ROS, (4) Déglutathionylation de l'actine et de la tubuline glutathionylées par les ROS grâce à l'enzyme Grx1, (5) Polymérisation de l'actine et des microtubules et réorganisation du cytosquelette, (6) Mélange de l'ADN mitochondrial avec les protéines granulaires, (7) Expulsion des NETs par les mitochondries sans mort cellulaire. Inspirée de (Yousefi et al., 2019)

Une autre voie de formation de NETs qui n'implique pas la mort des neutrophiles a été décrite. La particularité de cette voie est que l'ADN qui constitue les NETs est d'origine génomique et non mitochondriale mais que les fonctions des neutrophiles sont toujours assurées. C'est par exemple le cas de l'activation par *S aureus* avec une cinétique rapide. Après stimulation, le noyau multilobulaire se condense, les membranes internes et externes du noyau



se séparent, des vésicules remplies d'ADN nucléaire se forment et bourgeonnent à travers la membrane plasmique dans l'espace extracellulaire. Une fois dans le milieu extérieur, les vésicules se rompent et l'ADN se libère. Ces NETs sont capables de tuer les bactéries mais ont une activité moindre et tout ce processus se déroule selon un mécanisme unique très rapide et indépendant des ROS. Cependant, cette même stimulation induit avec le temps la rupture de l'enveloppe nucléaire et la propagation de l'ADN dans tout le cytoplasme probablement pour induire des NETs par voie lytique (Pilszczek et al., 2010). Une autre étude, cette fois-ci *in vivo* montre qu'après infections cutanées par cette même bactérie Gram positive, des neutrophiles libèrent rapidement des NETs *in vivo* à partir du noyau. Ces NETs contiennent notamment des histones et de la NE et semblent être libérés par des vésicules de la même manière que cela a été montré dans l'étude *in vitro*. De façon très intéressante, les NETs produits par cette voie ont empêché la dissémination systémique des bactéries (Yipp et al., 2012).

Toutes ces divergences sur les modes d'induction des NETs (vitaux ou par NETose) et les voies de signalisation qui en découlent ont conduit plusieurs équipes à lier la production de NETs à d'autres types d'induction d'ADN extracellulaire, notamment à confondre la NETose avec la mitophagie défectueuse et l'hypercitrullination leucotoxique (leukotoxic hypercitrullination ; LTH) (Boeltz et al., 2019; Yousefi et al., 2019).

### **II.3.5.2 Expulsion de l'ADN par d'autres mécanismes confondus avec la production de NETs**

#### **II.3.5.2.1 L'hypercitrullination leucotoxique**

La LTH est une stratégie mise en place par les agents pathogènes afin d'éliminer les cellules cibles. Elle est à tort souvent confondue avec la NETose, qui est à l'inverse, une stratégie mise en place par les cellules, afin de se débarrasser des agents pathogènes (Brinkmann et al., 2004). Pour distinguer les deux morts cellulaires qui peuvent avoir des similitudes morphologiques, plusieurs aspects propres à chacune peuvent être soulignés.

La LTH est induite par des toxines bactériennes qui, pour lyser les cellules, forment des pores transmembranaires, provoquant un influx important et durable d'ions dans le cytosol des cellules cibles (Staali, Monteil, and Colin, 1998). L'augmentation du calcium intra cellulaire

induit une activation anormalement élevée des PADs, et une hypercitrullination des histones (Romero et al., 2013). L'hypercitrullination provoque l'inactivation des propriétés antimicrobiennes des protéines neutrophilaires (Li et al., 2010). En effet, il a été montré que les histones non citrullinées tuent les bactéries (Miller et al., 1942) et que leur citrullination diminue leurs activités bactéricides (Li et al., 2010). L'ensemble de ces événements induit la dégradation des cellules cibles et l'extrusion du contenu cellulaire, dont la chromatine (Wang et al., 2009; Malachowa et al., 2013). Ce phénomène est induit de façon rapide et n'est pas dépendant de la NADPH oxydase (Parker et al., 2012b).

La LTH peut être induite *in vitro*, en stimulant les neutrophiles avec des toxines bactériennes ou des inophores de calcium (Wang et al., 2009; Parker et al., 2012b; Douda et al., 2015). La NETose est induite par des cytokines inflammatoires agissant en synergie, des produits bactériens, des champignons comme décrit précédemment, qui ne provoquent pas forcément un influx de calcium intracellulaire comme expliqué précédemment. De plus, c'est une forme de mort cellulaire antimicrobienne (Brinkmann et al., 2004). Elle est dépendante des ROS produits par la NADPH oxydase (Fuchs et al., 2007), mais n'est pas forcément associée à la présence de PAD ou à une hypercitrullination (Neeli and Radic, 2013; Kenny et al., 2017). De plus, la citrullination des histones est connue pour diminuer leurs activités bactéricides (Li et al., 2010), alors que les NETs éliminent les pathogènes en grande partie grâce à l'effet bactéricide des histones (Brinkmann et al., 2004; Cutrona et al., 2015).

#### ***II.3.5.2.2 La mitophagie défectueuse***

La mitophagie défectueuse est aussi souvent classée de façon erronée comme un mécanisme de production de NETs mitochondriaux. La mitophagie est un mécanisme de contrôle pour éliminer les composants mitochondriaux endommagés (Ashrafi and Schwarz, 2013). Néanmoins, les neutrophiles présentent un défaut dans ce processus. Pour compenser ce problème, ils utilisent deux voies complémentaires pour obtenir la clairance des mitochondries. D'abord, le contenu mitochondrial dépourvu de résidus oxydés, y compris l'ADN mitochondrial en complexe avec le facteur de transcription A de la mitochondrie (mitochondrial transcription factor A ; TFAM) est expulsé du neutrophile. Lorsque l'ADN mitochondrial subit une oxydation, il se dissocie de ce facteur de transcription et il est acheminé vers les lysosomes pour y être dégradé (Caielli et al., 2016). Cependant, les neutrophiles des patients atteints de lupus

érythémateux systémique (LES), ou lors de l'exposition des neutrophiles sains amorcés par l'IFN de type I, à des complexes immuns contenant des ribonucléoprotéines (ribonucleoprotein immune complexes ; RNP-IC) de patients lupiques, la phosphorylation du TFAM se bloque. Cette étape est nécessaire à la dissociation de l'ADN. Par conséquent, l'ADN oxydé s'accumule dans les mitochondries et il est finalement extrudé dans le milieu extérieur sous forme de complexe ADN mitochondrial oxydé-TFAM (Caielli et al., 2016).

La mitophagie est différente de la NETose, et ce pour deux raisons. La première, est que l'ADN excrété est d'origine mitochondriale et non génomique. La deuxième, est que les neutrophiles restent viables après extrusion de l'ADN au milieu extracellulaire contrairement à la NETose (Brinkmann et al., 2004; Caielli et al., 2016). La mitophagie est également distincte de la production de NETs mitochondriaux décrite par Yousefi et al. En effet, l'extrusion de l'ADN mitochondrial par le processus de mitophagie n'est pas dépendante des ROS de la NOX, puisque ni le DPI ni la mito-TEMPO (mt) n'ont bloqué la sécrétion de l'ADN mitochondrial oxydé (Caielli et al., 2016), alors que l'expulsion de NETs mitochondriaux suite à la stimulation au LPS ou le C5a après amorçage avec le GM-CSF est dépendante des ROS de la NOX (Yousefi et al., 2009). Cependant, une étude utilisant cette fois-ci la stimulation des neutrophiles de patients lupiques avec les RNP-IC sans amorçage avec IFN $\alpha$  montre que certes, les ROS provenant de la NOX n'interviennent pas dans la sécrétion de l'ADN mitochondrial oxydé, mais les ROS mitochondriaux sont nécessaires à ce phénomène (Lood et al., 2016).

Pour résumer nous pouvons dire que la production de NETs est le mécanisme qui vise à éliminer les micro-organismes pathogènes *via* la libération extracellulaire d'ADN couplé avec des protéines neutrophilaires. Cette sécrétion se fait soit par des cellules viables ou après NETose. En revanche, la LTH est une stratégie des agents pathogènes afin d'éliminer les neutrophiles. Concernant la mitophagie défectueuse, c'est une fonction biologique des neutrophiles qui vise à éliminer l'ADN mitochondrial endommagé, mais qui peut générer de l'ADN mitochondrial oxydé dans le microenvironnement des patients lupiques.

#### ***II.3.5.2.3 Les autres processus de libération d'ADN confondus avec la production de NETs***

L'autophagie est un système de dégradation intracellulaire des cellules eucaryotes. Elle vise à maintenir l'homéostasie cellulaire en réponse au stress, notamment à l'hypoxie, à la

poussée oxydative, aux lésions d'ADN et aux infections. Au cours de l'autophagie, les constituants cytosoliques endommagés, sont enfermés dans des vésicules à double membrane, appelées autophagosomes. Ils sont ensuite délivrés aux autolysosomes pour y être dégradés (Deretic and Levine, 2018). Plusieurs rapports indiquent que l'autophagie est nécessaire dans la formation de NETs (Mitroulis et al., 2011; Remijnsen et al., 2011). Remijnsen et al par exemple expliquent que les neutrophiles stimulés avec le PMA induisent une décondensation de la chromatine et une formation de NETs uniquement suite au phénomène d'autophagie (Remijnsen et al., 2011). Ce qu'il faut interpréter avec prudence. En effet, plusieurs de ces études ont utilisé des approches pharmacologiques pour démontrer que l'inhibition de la signalisation de la PI3K de type III, nécessaire à la formation d'autophagosomes empêcherait la formation de NETs (Mitroulis et al., 2011). Mais, certains de ces inhibiteurs bloquent également la production de ROS et donc la NETose. C'est le cas de la wortmannin (Dreiem, Myhre, and Fonnum, 2003). De plus, le traitement avec les inhibiteurs dits d'autophagie tardive, comme la bafilomycine A1 et la chloroquine n'ont eu aucun effet sur la formation de NETs. Aussi, la délétion génétique du gène autophagy related 5 (Atg5), qui est généralement corrélée à une autophagie défectueuse n'a provoqué aucun défaut dans la formation des NETs. Ceci suggère alors que l'autophagie ne serait pas nécessaire à la formation des NETs (Germic et al., 2017).

La NETose est aussi assimilée à la nécrose programmée (nécroptose), une voie de mort cellulaire programmée qui a lieu pour donner suite à un stress intra- ou extra-cellulaire. Cette mort nécessite un récepteur d'interaction à la protéine kinase 3 (receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3 ; RIPK3) et le domaine de kinase de lignée mixte (mixed lineage kinase domain-like protein ; MLKL) (Linkermann and Green, 2014). Cependant, beaucoup de confusions animent l'association de la nécroptose à la NETose. Certaines études affirment que la NETose est un processus secondaire à la rupture de la membrane par la nécroptose. En effet, la formation de NETs après une stimulation de deux heures avec le PMA ou des cristaux implique la voie de nécroptose dépendante de RIPK3/MLKL. De plus, la déficience génétique de MLKL chez la souris empêche la formation de NETs induits par des particules (Desai et al., 2016, 2017). Mais d'autres rapports qui ont choisi des conditions expérimentales différentes montrent que les neutrophiles issus de souris RIPK3-KO, qui sont donc incapables de réaliser une nécroptose, mais aussi les neutrophiles humains dans lesquels MLKL avait été pharmacologiquement inactivé, pourraient parfaitement former des NETs lors de l'activation physiologique ou de l'exposition à de faibles concentrations de PMA (Amini et al., 2016). Ces données indiquent alors, que la formation de NETs est un processus indépendant

de la nécroptose. De plus, d'autres données renforcent l'argument selon lequel la nécroptose induit une cascade de signalisation bien distincte de celle qui induit la NETose (Kenny et al., 2017).

Il convient également de mentionner que de nouvelles études ont démontré que la rupture de la membrane plasmique lors de la formation de NETs dépendante des ROS est médiée par la gasdermine D, reliant ainsi la formation de NETs à une autre mort cellulaire programmée, la pyroptose (Chen et al., 2018; Sollberger et al., 2018).

### **II.3.5.3 Rôle physiologique des NETs**

Le rôle des NETs dans le maintien de l'homéostasie et la défense immunitaire n'est pas complètement élucidé, néanmoins, de nombreuses avancées soulignent leur implication.

Au départ, Les NETs ont été décrits comme des filaments qui forment une sorte de maillage extracellulaire qui piègent et qui tuent les bactéries Gram positives et Gram négatives (Brinkmann et al., 2004). Faisant de ce processus une nouvelle approche d'élimination des bactéries par les neutrophiles. Mais outre les bactéries, les NETs éliminent également les inducteurs d'infections fongiques. C'est le cas de l'infection induite par *C. albicans* via la protéine calprotectine (Urban et al., 2006, 2009) ou encore de l'aspergillose, où il a été montré que la reconstitution de la capacité à former des NETs par thérapie génique (par transfert du gène codant une sous-unité de la NOX) chez les patients atteints de CGD entraîne une guérison de cette infection fongique (Bianchi et al., 2009). Les NETs répondent également aux parasites tels que *Toxoplasma gondii*. Ils limitent leur nombre et leur capacité à envahir les cellules-hôtes (Abi Abdallah et al., 2012). Ils ont aussi des propriétés antivirales. Ils inactivent par exemple les virions du virus d'immunodéficience humaine 1 (VIH-1) par le biais de la MPO et des  $\alpha$ -défensines (Saitoh et al., 2012). C'est pourquoi Branzk et al; proposent la théorie selon laquelle, la production de NETs constitue un moyen alternatif à la phagocytose utilisé par les neutrophiles pour dégrader des microbes ayant un diamètre trop large pour y être phagocyté (Branzk et al., 2014).

Dans les faits, les NETs se lient aux agents pathogènes par des interactions électrostatiques entre les histones ou bien l'ADN présent sur les NETs et la membrane ou l'enveloppe des microbes, empêchant ainsi leur dissémination. Une fois les agents pathogènes

capturés, les NETs inactivent leurs facteurs virulents et les éliminent. Pour ce faire, de nombreuses protéines microbicides sont associées aux NETs (Urban et al., 2009). Ces facteurs comprennent des enzymes, des peptides antimicrobiens, des chélateurs d'ions et des histones. Ils agissent seuls (Urban et al., 2009; Parker et al., 2012a) ou en combinaison. L'effet antimicrobien médié par les NETs passe principalement par les histones (Brinkmann et al., 2004), la cathelicidine (Lauth et al., 2009) ainsi que la calprotectine (Urban et al., 2009). Certaines de ces protéines tuent les microbes en formant des pores membranaires. De même, une activité antimicrobienne de l'ADN a été observée (Halverson et al., 2015).

Réciproquement, en tant que mécanisme de défense, les bactéries ont développé des stratégies d'évasion contre les NETs, par exemple, *via* la synthèse et la sécrétion de nucléases (Beiter et al., 2006; Berends et al., 2010; Derré-Bobillot et al., 2013). Mais en retour, LL-37 présent sur les NETs confère une résistance des NETs contre ces nucléases bactériennes (Neumann et al., 2014). Il faut néanmoins noter que malgré ce dispositif robuste, beaucoup de microbes échappent aux NETs par différents autres mécanismes (Lappann et al., 2013). Certains, comme les *Meningococcus* modifient les lipides du LPS (Lappann et al., 2013). Les *S. pneumoniae* modifient leur charge de surface et créent des capsules qui les masquent (Wartha et al., 2007) ce qui réduit considérablement leur piégeage et leur destruction par les NETs.

Les NETs renforcent plutôt une réaction pro-inflammatoire. Celle-ci permet de limiter l'invasion microbienne. Néanmoins, ils peuvent avoir aussi des propriétés immunorégulatrices bénéfiques qui sont nécessaires pour prévenir les réactions inflammatoires excessives. C'est le cas dans la goutte : les NETs sont recrutés au niveau de l'articulation où ils s'agrègent et dégradent les cytokines et les chimiokines pro-inflammatoires grâce à leurs protéases. Ils perturbent ainsi le recrutement et l'activation des neutrophiles limitant l'inflammation (Schauer et al., 2014). Les NETs induisent aussi des réponses anti-inflammatoires sur les macrophages hyperactivés avec le LPS en diminuant le taux d'IL-6 pro-inflammatoire et en augmentant la sécrétion d'IL-10 immunorégulatrice (Ribon et al., 2019). Le même phénomène est observé sur les DCs. En effet, il a été montré que les DCs stimulées au LPS diminuent l'expression des molécules d'activation HLA-DR, CD80, CD83 et CD86, des cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-23 et favorisent une réponse Th2, en présence de NETs (Barrientos et al., 2014).

#### **II.3.5.4 Élimination des NETs**

Une fois que les NETs ont accompli leur fonction comme décrit précédemment, ils doivent être éliminés. Les endonucléases, comme la désoxyribonucléase (DNase)I sont essentielles pour dégrader les NETs (Hakim et al., 2010). Néanmoins, leurs concentrations physiologiques sont faibles. De ce fait, elles sont insuffisantes à elles seules pour éliminer les NETs complètement (Farrera and Fadeel, 2013). D'autres mécanismes de clairance des NETs entrent alors en jeu. Les NETs sont opsonisés par le C1q qui se lierait aux macrophages (Farrera and Fadeel, 2013). Ces derniers ingèrent les NETs par phagocytose active (Farrera and Fadeel, 2013) et dégradent les NETs *via* la DNase cytosolique: l'exonucléase 1 de réparation principale (Three prime repair exonuclease 1 ; Three-prime repair exonuclease 1 ; TREX1) ou DNaseIII (Lazzaretto and Fadeel, 2019). La clairance des NETs par les macrophages est un phénomène qui n'induit pas de facteurs pro-inflammatoires en conditions physiologiques et qui est facilité par la DNaseI qui sectionne d'abord les NETs avant qu'ils fussent ingérés par les macrophages (Farrera and Fadeel, 2013). Les DCs participent aussi à l'élimination des NETs en sécrétant la DNaseIL3, qui est capable de dégrader les NETs en extracellulaire (Lazzaretto and Fadeel, 2019). Plus récemment, un mécanisme de dégradation de protéines des NETs a été mis en évidence. En effet, les protéases des neutrophiles dégradent plusieurs protéines présentes sur les NETs (de Bont et al., 2020a).

Dans certains cas les NETs ne sont pas éliminés, ce qui induit l'exposition des peptides présents sur les NETs à des auto-anticorps, l'activation du système immunitaire et le déclenchement de réponses auto-immunes. Ce phénomène serait la cause ou le résultat de nombreuses pathologies auto-immunes entre autres et il est développé dans les paragraphes suivants ainsi que dans la partie dédiée à la PR.

#### **II.3.5.5 Rôle pathologique des NETs dans les maladies auto-immunes autres que la polyarthrite rhumatoïde**

##### ***II.3.5.5.1 Lupus érythémateux systémique***

Le LES est une maladie auto-immune multifactorielle qui touche plusieurs organes. Elle est caractérisée par la formation d'auto-anticorps, généralement, des anticorps anti-nucléaires

mais aussi anti-cytoplasme des neutrophiles, l'activation chronique des cellules dendritiques plasmacytoïdes et la surexpression des gènes régulés par l'interféron de type I (Tsokos, 2011). Les neutrophiles jouent aussi un rôle important dans cette maladie notamment par l'intermédiaire de la sécrétion des NETs comme le démontrent plusieurs études.

En effet, il a été connu depuis longtemps, bien avant la découverte des NETs, que les patients lupiques présentent une augmentation d'auto-anticorps contre l'ADN double brin qui est un marqueur de LES, mais des protéines qui sont actuellement reconnues pour composer les NETs. C'est le cas des anti-histones (Fritzler and Tan, 1978), des anti-élastases (Nässberger et al., 1989) mais aussi des anti-lactoferrines, des anti-MPO, des anti-protéinases 3 et des anti-CG (Spronk et al., 1996). Par la suite, l'implication des NETs a été affirmée dans cette maladie et ce pour plusieurs raisons.

D'abord, les NETs sont retrouvés de façon massive dans les tissus de patients lupiques notamment dans la peau et les reins (Villanueva et al., 2011). Ensuite, les neutrophiles de ces patients synthétisent des NETs spontanément *via* les granulocytes de faible densité (low density granulocytes ; LDGs) (Villanueva et al., 2011), une population de neutrophiles pro-inflammatoires. De plus, les LDGs de patients lupiques produisent plus de NETs que les sujets sains (Lande et al., 2011).

Les NETs sont également source d'auto-antigènes dans le lupus. En effet, les NETs exposent des antigènes tels que l'ADN double brin (ADNdb) et les protéines antimicrobiennes (Villanueva et al., 2011) et les patients atteints de lupus développent des auto-anticorps anti-NETs (de Bont et al., 2020b) ou des auto-anticorps contre ces antigènes présents sur les NETs, par exemple anti-LL37 (Lande et al., 2011). Aussi, la sécrétion de NETs est corrélée à une augmentation de l'anti-ADNdb dans les sérums des patients lupiques (Villanueva et al., 2011; van der Linden et al., 2018).

La présence de ces NETs et de ces anticorps anti-NETs a un rôle majeur dans l'activation et l'aggravation de la maladie. Car, la sécrétion de NETs est associée à une signature IFN élevée chez les patients lupiques (van der Linden et al., 2018), l'IFN- $\alpha$  étant une cytokine clé dans le LES. Ensuite, les complexes immuns produits avec les NETs déclenchent efficacement l'activation des cellules dendritiques plasmacytoïdes *via* le TLR9 (Garcia-Romo et al., 2011; Lande et al., 2011). De plus, les NETs présents chez les patients lupiques sont



capables d'éliminer les cellules endothéliales et de stimuler la synthèse de l'IFN- $\alpha$  par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (Villanueva et al., 2011).

Pour finir, chez les patients atteints de lupus, la clairance des NETs est très faible comparée à celle des sujets sains et elle est corrélée avec la sévérité de la maladie et des atteintes rénales (Hakkim et al., 2010; Leffler et al., 2012). Nous savons maintenant que la DNase1 est essentielle pour le désassemblage des NETs. Chez les patients lupiques, les anticorps anti-NETs empêchent l'accès de la DNase1 aux NETs et donc à sa dégradation (Hakkim et al., 2010). Aussi, les anticorps anti-nucléaires sont associés à un niveau élevé d'inhibiteurs de DNase chez les patients lupiques (Frost and Lachmann, 1968). De plus, l'activité de la DNase1 sérique est faible dans le LES et présente une corrélation négative avec l'activité de la maladie et la concentration des marqueurs sériques, tels que les anticorps antinucléaires, les anticorps anti-ADNdb et les anticorps anti-nucléosomes dans le lupus (Hakkim et al., 2010; Skiljevic et al., 2013). Une autre conséquence de la non-dégradation des NETs est l'activation du système du complément qui entraîne à son tour une inflammation (Leffler et al., 2012).

Pour toutes ses raisons nous pouvons dire que la présence de NETs qui persiste contribue à cette maladie, en exposant des auto-antigènes sources d'auto-anticorps qui sont fortement immunogènes et qui augmentent la sévérité de la maladie.

#### ***II.3.5.5.2 Vascularites des petits vaisseaux associées aux ANCA***

La vascularite des petits vaisseaux est une maladie auto-immune chronique caractérisée par des lésions des petits vaisseaux sanguins. Une partie des patients atteints de cette maladie produisent des auto-anticorps anti-protéines présentes dans le cytoplasme des neutrophiles (antineutrophil cytoplasmic antibodies ; ANCA), notamment des anti-protéinases 3 et anti-MPO. Le nom de la pathologie de ce groupe de patients est «la vascularite associée aux ANCA (ANCA-associated vasculitis ; AAV)» (Söderberg and Segelmark, 2016).

Les NETs prennent part à cette pathologie de façon importante. D'abord, ils sont présents dans des biopsies de glomérules rénaux (Kessenbrock et al., 2009), des biopsies de la peau (Abreu-Velez, Smith, and Howard, 2009) et dans la circulation sanguine (Söderberg et al., 2015) de patients atteints de AAV. De plus, les neutrophiles isolés de patients AAV produisent des NETs spontanément (Grayson et al., 2015) et la stimulation des neutrophiles de sujets sains

par les ANCA de patients atteints de AAV conduit à la production de NETs (Kessenbrock et al., 2009).

Du point de vue fonctionnel, les NETs sont la source de plusieurs dommages lors de l'AAV. En effet, l'injection de cellules dendritiques myéloïdes chargées de NETs à des souris naïves entraîne le développement dans la circulation sanguine d'ANCA et des vascularites dans le tissu rénal et pulmonaire (Sangaletti et al., 2012). Enfin, les NETs favorisent la thrombose et l'inflammation observées dans les phases actives d'AAV (Kambas et al., 2014). Ces atteintes vasculaires pourraient être la conséquence d'une déficience de la dégradation de NETs. En effet, les occlusions vasculaires chez les patients atteints d'infections bactériennes graves ont été associées à un défaut de dégradation des NETs (Jiménez-Alcázar et al., 2017).

Pour résumer, la formation de NETs dans l'AAV est induite par les ANCA. Une fois sécrétés, les NETs déclenchent à leur tour la production d'ANCA suivie de nombreuses atteintes.

#### ***II.3.5.5.3 Autres pathologies auto-immunes***

D'autres maladies auto-immunes impliquent les NETs mais à moindre mesure ou bien il existe peu d'investigations sur leur effet pour en couler leur rôle. C'est le cas du syndrome des anti-phospholipides (antiphospholipid syndrome ; APS), une maladie caractérisée par la présence d'auto-anticorps contre les phospholipides ou les protéines liées aux phospholipides (Radic and Pattanaik, 2018). Les neutrophiles des patients atteints d'APS présentent une sécrétion spontanée de NETs. De plus, les neutrophiles de donneurs sains stimulés avec des IgGs purifiés de ces patients induisent la libération de NETs. Néanmoins, il n'y a pas de corrélation entre la sévérité de la maladie et la sécrétion de NETs (Yalavarthi et al., 2015; van der Linden et al., 2018) donc pas encore d'évidence sur leur rôle dans cette pathologie.

La sclérose en plaques (multiple sclerosis ; MS) est une autre maladie auto-immune, du système nerveux central. Dans cette maladie les complexes MPO-ADN sont détectés dans le sérum des patients (Tillack et al., 2013). De plus, les LDGs responsables dans le lupus de la sécrétion spontanée de NETs sont retrouvés dans le sang de ces malades avec des niveaux similaires aux patients lupiques (Ostendorf et al., 2019).

Les NETs jouent également un rôle important dans le diabète auto-immun (de type 1). En effet, il a été montré que les neutrophiles sont plus sensibles à la NETose dans le diabète de type I et que les NETs produits nuisent à la cicatrisation des plaies. En effet, l'inhibition de la NETose ou le clivage des NETs peut améliorer la cicatrisation des plaies et réduire l'inflammation chronique induite par les NETs (Emery et al., 2015).

Enfin, des auto-anticorps anti-NETs sont retrouvés aussi dans des maladies auto-immunes rares telles que le syndrome de Gougerot Sjögren, une maladie qui touche les glandes salivaires ou encore la sclérodémie systémique, une pathologie induisant essentiellement la fibrose et une sclérose de la peau et des vaisseaux (de Bont et al., 2020b). Les NETs ont également un impact majeur dans la pathogenèse et la progression de la polyarthrite rhumatoïde (PR), que je détaillerai dans le chapitre «polyarthrite rhumatoïde».

### II.3.5.6 Détection et quantification des NETs

Le rôle physiologique et pathologique des NETs a conduit la communauté scientifique à les étudier davantage (Figure 7). Pour se faire plusieurs méthodes de détection et de quantification des NETs ont été développées durant ces dernières années.

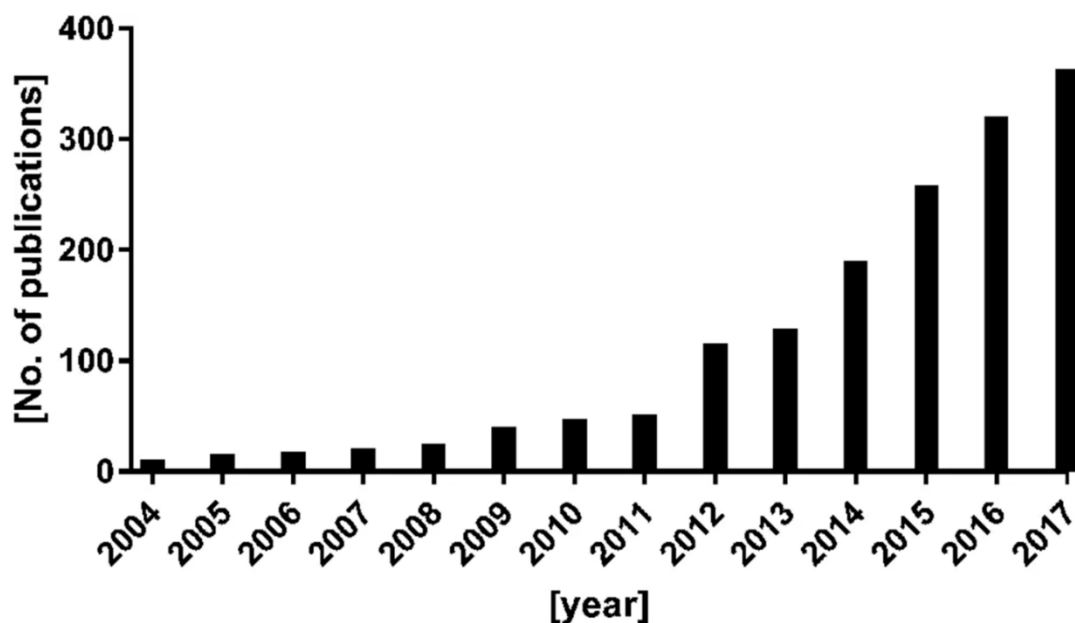


Figure 7. Nombre de publications incluant le terme "neutrophil extracellular trap" par an. D'après (Boeltz et al., 2019).

Le premier outil utilisé pour observer et décrire le phénomène de production de NETs par les neutrophiles est la microscopie électronique à balayage (MEB) et la microscopie électronique à transmission (MET) (Brinkmann et al., 2004). La MET a également été utilisée en combinaison avec la microscopie confocale pour illustrer les différences entre l'apoptose, la nécrose et la NETose (Fuchs et al., 2007). Mais, pour valider ces différentes observations, souvent, des marquages spécifiques de NETs sont ajoutés. En effet, les NETs sont composés d'ADN décondensé décoré avec des histones ou/et des protéines neutrophilaires et en particulier des protéines granulaires sécrétées dans le milieu extracellulaire par les neutrophiles. De ce fait, la méthode de détection des NETs la plus utilisée *in vitro* est le marquage des neutrophiles avec des intercalants de l'ADN fluorescents en combinaison avec le marquage des protéines neutrophilaires et la visualisation de la colocalisation des deux marqueurs, par microscopie à fluorescence qui définit les NETs. Cette technique permet également d'estimer la production de NETs en quantifiant les surfaces de superposition des deux marqueurs sur les images du microscope à fluorescence (Brinkmann et al., 2013). Néanmoins, l'évaluation de la production de NETs peut être biaisée en fonction du champ de vision choisi par l'utilisateur. Cette limite peut être corrigée par une autre technique de détection de NETs qui est la cytométrie en flux. Elle permet de garder le même principe, à savoir, le marquage de la chromatine en combinaison avec des histones ou des protéines granulaires (MPO et NE) présentes sur les NETs. Cette méthode permet non seulement de quantifier les NETs *in vitro* mais aussi *ex-vivo* directement dans la circulation sanguine (Gavillet et al., 2015). Mais, le point à prendre en compte dans ces deux cas de figure est que l'ADN détecté peut être également sécrété pour donner suite à types de morts des neutrophiles. Une autre méthode a alors été mise au point en excluant la détection de l'ADN. C'est la révélation de l'histone 3 citrullinée, la considérant comme marqueur de production de NETs dans les plasmas par ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (Thålin et al., 2017). Mais, cette citrullination n'est pas spécifique des NETs et elle n'est pas retrouvée dans tous les types de production de NETs. Donc, cette technique seule pourrait ne pas être adaptée pour détecter les NETs. Il existe également des ELISA qui mesurent les complexes ADN-MPO ou ADN-NE. Ce dernier serait plus spécifique mais il pourrait potentiellement révéler du matériel libéré par nécrose (Lood et al., 2016). De ce fait, une autre méthode de quantification des NETs combinant la microscopie et la cytométrie en flux a été développée. Elle est appelée « high-speed multispectral imaging flow cytometry ». Cette méthode analyse la taille et la structure de la chromatine tout en introduisant des marqueurs qui

ciblent des molécules caractéristiques des NETs comme la MPO. Elle permet d'observer et de quantifier la production de NETs *in vitro* et *ex-vivo* et de différencier entre la production de NETs vitaux et la NETose ou d'autres morts cellulaires (Zhao, Fogg, and Kaplan, 2015).

Toutes ces méthodes permettent la détection des NETs et leur semi-quantification. Toutefois, elles sont effectuées à un moment précis, qui est défini par l'expérimentateur. Pour définir le rôle, les caractéristiques et le mode de production de NETs, il est important d'observer la production de NETs sur des cellules qui ne sont pas fixées et d'analyser cette production dans le temps et dans l'espace. Pour ça deux méthodes de détection de NETs sont largement utilisées. La première est une analyse qui se fait sur des cultures *in vitro* (Fuchs et al., 2007; Yousefi et al., 2009) ou directement sur les tissus (Schauer et al., 2014). Elle est appelée «live cell imaging». Elle consiste à suivre par microscopie dans le temps des cellules en cours de production de NETs, grâce au marquage des composants de NETs ainsi que d'autres paramètres qui y sont étudiés. C'est par cette technique que Fuchs et al ont décrit la production de NETs après la mort des neutrophiles par NETose (Fuchs et al., 2007). C'est par live cell imaging aussi que la sécrétion rapide des NETs par les mitochondries a été mise en évidence après le marquage de l'ADN et des composants de la mitochondrie sur les neutrophiles (Yousefi et al., 2009). Une deuxième méthode de détection de NETs permet de visualiser la production de NETs directement à l'échelle de l'animal vivant. C'est la microscopie intravivale. C'est une technique à haute résolution. Elle repose sur le même principe que les méthodes *in vitro* et *ex-vivo* de live cell imaging, à savoir le marquage des composants de NETs et l'analyse du phénomène d'induction de NETs par un microscope adapté. Ce mode d'observation permet de suivre la cinétique de production de NETs sur un organe ou un tissu sur l'animal vivant éveillé ou endormi. C'est notamment cette technique qui a permis à Yipp et al de démontrer *in vivo* qu'il existe un mode de sécrétion rapide de NETs d'origine nucléaire par des neutrophiles qui restent vivants. En effet, après infection des souris par des bactéries Gram positives, ils observent par microscopie intravivale la décondensation du noyau, la formation de vésicules nucléaires et la sécrétion de NETs par des neutrophiles viables qui deviennent anucléaires (Yipp et al., 2012).

## II.4 Hétérogénéité phénotypiques et fonctionnelles des neutrophiles

Les neutrophiles n'ont pas que des fonctions pro-inflammatoires. Des sous-populations de neutrophiles distinctes dans leurs phénotypes et leurs fonctions existent. L'hétérogénéité des neutrophiles commence dès leur production. Puisque des études récentes ont mis en évidence de nouvelles populations dans la moelle osseuse. En effet, Kim et al ont montré que les GMPs peuvent produire directement des précurseurs de neutrophiles qui ont la capacité de proliférer et de produire des neutrophiles (Kim et al., 2017). De plus, Evrard et al ont mis en évidence une population de pré-neutrophiles qui se développe en cas de stress tumoral et se différencie en neutrophiles non prolifératifs immatures puis en neutrophiles matures (Evrard et al., 2018). Enfin, Zhu et al ont découvert un progéniteur de neutrophiles produit dans la moelle osseuse et qui augmente la croissance tumorale (Zhu et al., 2018).

Ensuite, les neutrophiles s'adaptent à leurs microenvironnements ainsi qu'à leurs stimuli. On distingue alors les neutrophiles âgés à éliminer dans le sang avec un phénotype  $CD62L^{low} CXCR4^{high}$ , différents des neutrophiles fraîchement produits avec un phénotype  $CD62L^{high} CXCR4^{low}$  (Casanova-Acebes et al., 2013). Ensuite, il y a des neutrophiles  $CD54^{high} Cxcr1^{low}$  qui migrent de façon rétrograde des tissus vers le sang périphérique (Buckley et al., 2006). Plus intrigant encore, des populations de neutrophiles (DC-like) hybrides, acquérant à la fois des marqueurs et des propriétés des neutrophiles comme la production de NETs ou la dégranulation, ainsi que des particularités et un phénotype de cellules dendritiques comme la présentation d'antigène aux lymphocytes T ou encore la formation de podosomes (Matsushima et al., 2013). Aussi, des neutrophiles appelés B cell helper neutrophil ( $N_{BH}$ ) sont décrits dans la zone marginale de la rate, une zone de cellules B spécialisée dans les réponses immunoglobulines aux antigènes circulants indépendamment des cellules T. Les  $N_{BH}$  activent la production des immunoglobulines par les lymphocytes B (Puga et al., 2011). Il existe également des sous-populations de neutrophiles exprimant le récepteur  $VEGFR1^+$ ,  $CD49d^+$  et  $CXCR4^+$  qui sont pro-angiogéniques (Massena et al., 2015). Les neutrophiles ont aussi des propriétés immunorégulatrices. En effet, Pillay et al ont identifié un sous-ensemble de neutrophiles humains exprimant l'intégrine MAC-1, qui peuvent être induits de manière systémique en réponse à une inflammation aiguë et qui suppriment la prolifération des cellules T (Pillay et al., 2012). Des sous-populations de neutrophiles immunosuppresseurs matures  $CD66b^+CD10^+$  circulants sont également décrits. Ils inhibent la prolifération et la production de l' $IFN\gamma$  par les cellules T (Marini et al., 2017). Les neutrophiles immunosuppresseurs sont

particulièrement élucidés dans les neutrophiles associés aux tumeurs, où des populations dites N2 en opposition à N1 se polarisent en neutrophiles anti-inflammatoires en réponse au TGF- $\beta$  (Fridlender et al., 2009). La population N1 peut être rétablie en présence d'IFN- $\beta$  (Andzinski et al., 2016). Les cellules N2 suppriment la production d'IL-17 par les cellules T  $\gamma\delta$  (Mensurado et al., 2018) et inhibent la prolifération des lymphocytes T (Yang et al., 2018) et induisent l'apoptose des lymphocytes T CD8 (Michaeli et al., 2017). D'autres sous-populations de neutrophiles immunosuppresseurs sont les cellules suppressives dérivées des neutrophiles de faible densité (low-density neutrophils ; LDNs) immunosuppessives. Ce sont des populations hétérogènes constituées de granulocytes à différents stades de maturation, avec des fonctions suppressives (Krystal et al., 2007; Youn et al., 2012). Elles sont notamment responsables de production de ROS et de la sécrétion de l'arginase qui supprime les fonctions effectrices des lymphocytes T (Bowers et al., 2014; Gielen et al., 2016). Les LDNs sont des cellules de faible densité, elles se superposent à la fraction des cellules mononuclées du sang périphérique (peripheral blood mononuclear cell ; PBMC) après centrifugation en gradient de densité du sang. Ils sont caractérisés généralement par les marqueurs CD66b, CD11b, CD16 (Rodriguez et al., 2009). En plus des populations immunosuppessives, les LDNs renferment des populations pro-inflammatoires telles que les LDGs, impliquées notamment dans les maladies auto-immunes comme le LES et la PR (Hacbarth and Kajdacsy-Balla, 1986). Elles ont une capacité accrue à sécréter des cytokines pro-inflammatoires et à libérer des NETs (Carmona-Rivera and Kaplan, 2013). Enfin, des infections sévères peuvent induire une mobilisation accrue de neutrophiles immatures CD66b<sup>+</sup>CD10<sup>-</sup> dans le sang, avec des fonctions effectrices similaires aux neutrophiles matures (Drifte et al., 2013).

### **III. Les macrophages**

La deuxième population que nous avons étudiée lors de mes travaux de thèse est le macrophage.

#### **III.1 Origine et développement des macrophages.**

Les macrophages ont été désignés pour la première fois en 1893, par l'immunologiste russe Ilya Ilitch Metchnikov, appelé également Elie Metchnikoff. Ce chercheur a décrit les

macrophages, comme des cellules capables d'engloutir les agents pathogènes par le processus de phagocytose. Ce travail lui a valu un prix Nobel de médecine en 1908.

Par la suite, en 1980 Van Furth a proposé la théorie du "système phagocytaire mononucléaire" (mononuclear phagocytic system ; MPS) (van Furth, 1980). Ce système a été mis en place à l'origine afin d'indiquer une nouvelle classification des macrophages, des monocytes et de leurs précurseurs, en fonction de leur origine, leurs morphologies, leurs rôles et leurs cinétiques (van Furth et al., 1972). Il a ainsi expliqué que les monocytes provenaient de précurseurs myéloïdes de la moelle osseuse, tant chez l'homme que chez la souris et que les macrophages du foyer inflammatoire, ainsi que les macrophages tissulaires dérivent tous de monocytes (van Furth, 1981).

Ensuite, l'origine des macrophages dérivés de monocytes a été affinée. Les MDPs, qui sont les progéniteurs de macrophages et de cellules dendritiques sont d'abord produits, ils sont définis comme la lignée  $c\text{-kit}^+CX3CR1^+Flt3^+CD115^+$  (Fogg et al., 2006; Auffray et al., 2009). Les MDPs induisent ensuite des cMoPs qui sont dépourvus de  $Flt3^+$ . Ils sont ainsi définis phénotypiquement comme la lignée  $c\text{-kit}^+CX3CR1^+Flt3^-CD115^+$ . Ces progéniteurs se différencient successivement en monocytes adultes puis en macrophages (Hettinger et al., 2013; Kawamura et al., 2017) (Figure1).

Les monocytes circulants dérivés de la moelle osseuse ont ainsi été considérés comme les seuls précurseurs de tous les macrophages résidents dans les tissus depuis les travaux fondateurs de Van Furth. Par ailleurs, grâce aux avancées technologiques, plusieurs études ont démontré que les monocytes circulants dérivés des HSCs ne sont pas la seule ressource cellulaire des macrophages tissulaires. Il existe un programme de production de macrophages dans le fœtus, lequel est nécessaire à la survie de l'embryon. Plusieurs macrophages tissulaires chez l'adulte sont maintenus par auto-renouvellement de ces cellules dérivées de fœtus.

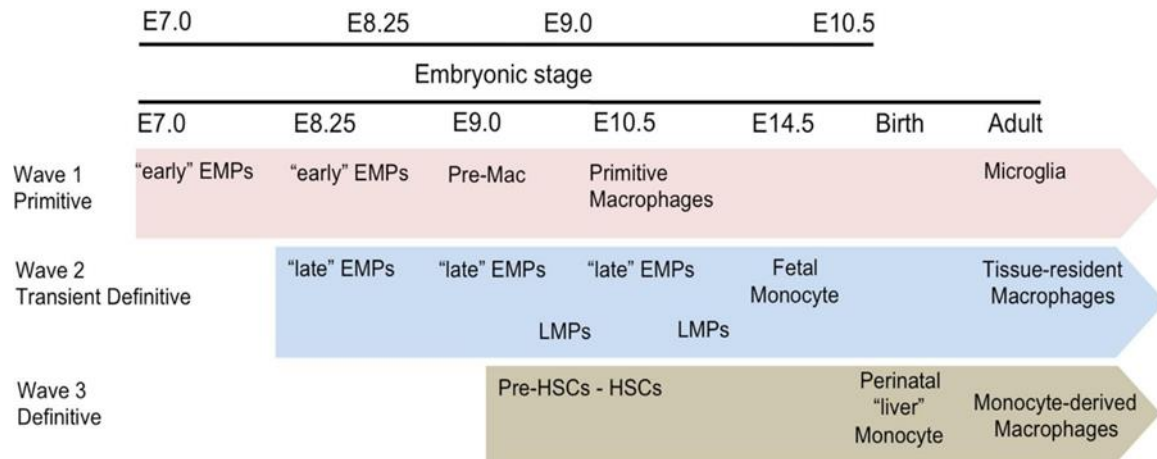
Effectivement, en 1994, une étude d'ontogénie a révélé l'apparition de HSCs qu'à partir du jour embryonnaire (E) 10.5 chez la souris (Müller et al., 1994). Cependant, le début de l'hématopoïèse se produit à E 7,5 (Palis et al., 1999), montrant bien que tous les macrophages ne proviennent pas de HSCs de la moelle osseuse. Ces travaux ont été complétés. Ainsi, dans la littérature, trois vagues de production de macrophages sont décrites chez l'embryon (Bertrand et al., 2005).



La première vague, se fait via la production des progéniteurs myéloïdes primitifs (erythroid/myeloid progenitors ; EMPs) dans le sac vitellin à E 7,5. Elle se produit indépendamment des monocytes et du facteur de transcription C-Myb, nécessaire au développement des HSCs (Schulz et al., 2012). Ces macrophages primitifs pénètrent par la suite dans le foie fœtal, le cerveau et les autres organes via l'émergence du système vasculaire (Stremmel et al., 2018). Parmi les organes adultes, le cerveau est pourvu de macrophages produits par cette première vague (Ginhoux et al., 2010). En effet, les microglies dérivent de macrophages primitifs et persistent à l'âge adulte. La seule source de microglie d'origine hématopoïétique se fait lors d'une inflammation (Xu et al., 2015).

La deuxième vague de production de macrophages se fait au E 8,5. Elle se produit lorsque les EMPs migrent du sac vitellin vers le foie fœtal, après établissement de la circulation sanguine. Cette 2<sup>ème</sup> vague produit des monocytes de façon c-Myb dépendante dans le foie fœtal. Ces monocytes migrent à leur tour dans les autres organes. Ils forment ainsi les principaux macrophages tissulaires (Hoeffel et al., 2015). Les macrophages tissulaires issus du foie fœtal qui s'auto-renouvellent forment les cellules de Langerhans épidermiques (Hoeffel et al., 2012), les macrophages alvéolaires (Guilliams et al., 2013), les macrophages cardiaques (Epelman et al., 2014) mais également les cellules de Kupffer du foie (Gomez Perdiguero et al., 2015).

Enfin, la 3<sup>ème</sup> et dernière vague de production de macrophages chez l'embryon se produit à E 10,5 par l'émergence des HSCs définitives dans la région aorte-gonades-mésonephros. Ces HSCs sont maintenues à la naissance au niveau de la moelle osseuse et s'auto-renouvellent chez l'adulte (Kumaravelu et al., 2002) (Figure 8).



**Figure 8. Développement des macrophages.**

Trois voies distinctes dans l'embryon sont impliquées dans le développement des macrophages. La première vague, se fait via des myéloïdes primitifs EMPs (erythroid/myeloid progenitors) qui donne naissance à des macrophages du sac vitellin, également appelés macrophages primitifs, indépendants des monocytes. Les macrophages primitifs ensemencent chaque tissu et donneront finalement naissance à des microglies dans le cerveau, rapidement isolées par la barrière hémato-encéphalique. La seconde vague, commence dès que les EMPs ensemencent le foie fœtal où elles génèrent des monocytes fœtaux. Les monocytes fœtaux dérivés des EMPs s'infiltrèrent dans tous les autres tissus et génèrent progressivement un groupe de macrophages adultes qui résident dans les tissus. La troisième vague de monocytes dérivés des HSCs (hematopoietic stem cells) émerge également du foie fœtal pour contribuer au pool de macrophages à longue durée de vie établie à la naissance alors que l'hématopoïèse adulte ne fait que commencer dans la moelle osseuse. Adapté de (Hoeffel and Ginhoux, 2018).

Ces découvertes nous ont incité à réexaminer le paradigme dominant sur l'origine hématopoïétique des macrophages. En effet, beaucoup d'études révèlent que les macrophages résidents dans les tissus ne semblent pas être reconstitués par les HSCs de la moelle osseuse après la naissance, mais sont plutôt régénérés par l'auto-renouvellement de macrophages dérivés du fœtus (Cline and Moore, 1972; Schulz et al., 2012; Yona et al., 2013). Néanmoins, de nombreuses autres recherches montrent que plusieurs populations de macrophages dérivent au moins partiellement de monocytes adultes en circulation et pourraient donc suivre le modèle de Van Furth. C'est le cas dans le derme (Hettinger et al., 2013), l'intestin (Bain et al., 2014), le cœur (Molawi et al., 2014), la rate (Gomez Perdiguero et al., 2015), les cellules de kupffer du foie (Scott et al., 2016) et les macrophages péritonéaux (Bain et al., 2016). De ce fait, la majorité des études des phénotypes et des fonctions de macrophages en homéostasie et lors de pathologies sont faites à partir des macrophages dérivés de monocytes.

### III.2 La polarisation macrophagique

Après la naissance, un pool de monocytes dérivés de cMoPs est présent au niveau de la moelle osseuse. Ces monocytes expriment des niveaux élevés de CXCR4. En présence de stimuli, ces monocytes perdent l'expression de CXCR4 et quittent la moelle osseuse pour rejoindre la circulation sanguine (Chong et al., 2016) et la rate (Swirski et al., 2009). Chez un sujet sain, les monocytes de la circulation représentent 4 à 10% des cellules nucléées totales du sang. Ils ont une faible capacité de prolifération et une demi-vie courte, d'environ 25 heures (Ohgami et al., 1991).

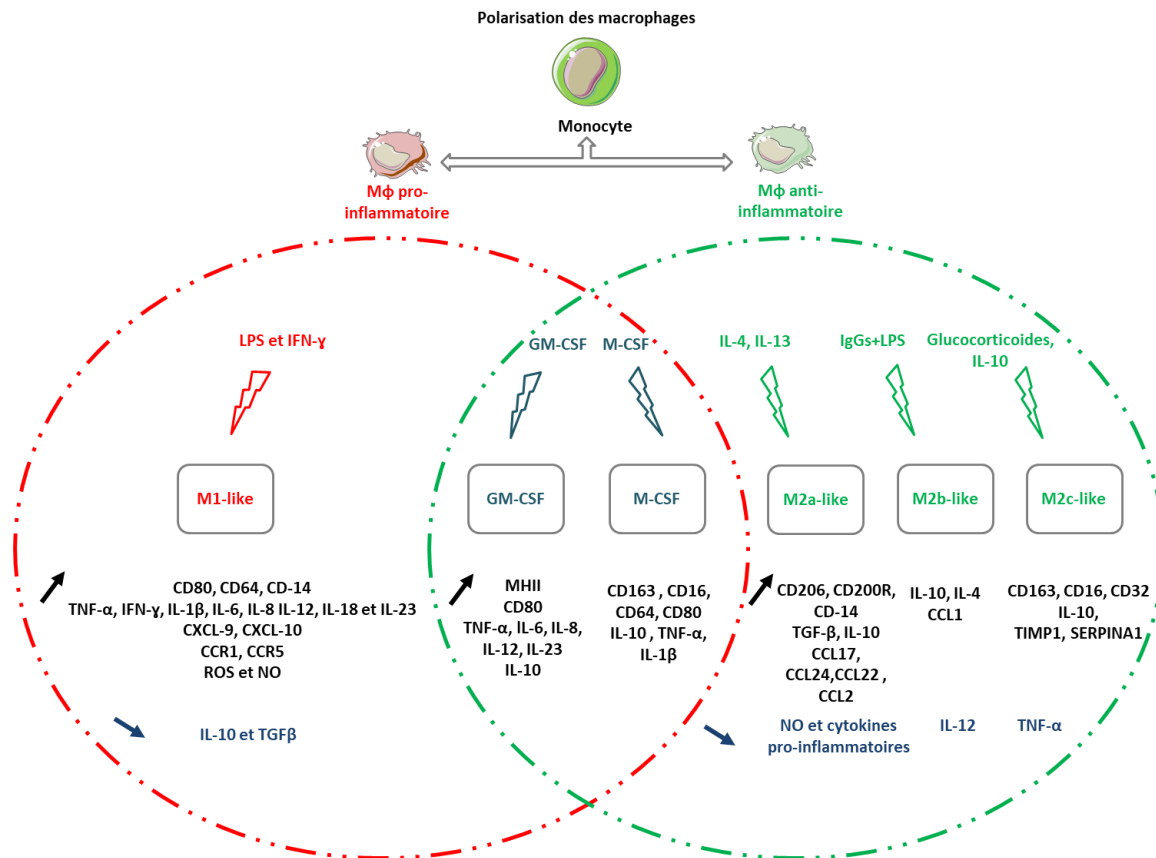
Selon leurs phénotypes, ainsi que leurs fonctions, les monocytes sont classifiés en trois sous-populations dans la circulation sanguine. Chez l'homme les sous-ensembles de monocytes ont été définis comme, CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> pour les monocytes classiques, CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> pour les monocytes intermédiaires et CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> pour les monocytes non classiques ou dits régulateurs. Chez la souris, les monocytes du sang périphérique ont été définis en Ly6C<sup>++</sup>CD43<sup>+</sup> pour les monocytes classiques, en Ly6C<sup>++</sup>CD43<sup>++</sup> pour les monocytes intermédiaires et en Ly6C<sup>+</sup>CD43<sup>++</sup> pour les monocytes non classiques (Ingersoll et al., 2010; Ziegler-Heitbrock et al., 2010; Yona et al., 2013).

Les monocytes circulant dans le sang transmigrent par la suite à travers l'endothélium pour rejoindre les tissus. En homéostasie, un faible nombre de monocytes rejoignent constitutivement les tissus (Jakubzick et al., 2013). Lors d'inflammations, de nombreux médiateurs inflammatoires, dont les composants du système du complément et les produits d'agents pathogènes augmentent le recrutement des monocytes de la circulation sanguine vers les tissus (Nourshargh and Alon, 2014). Suivant le même processus que les neutrophiles, les monocytes roulent dans la circulation sanguine en suivant les forces de cisaillement appliqués par le flux sanguin. En présence d'un gradient de chimiokines liées à l'endothélium, les monocytes adhèrent à l'endothélium et se lient aux chimiokines pour migrer et rejoindre les tissus enflammés (Weber et al., 1999). C'est principalement le monocyte chimioattractant protéine 1 (MCP-1) et l'IL-8 qui déclenchent la chimiotaxie et la migration des monocytes, en interagissant avec les récepteurs des chimiokines de type CC (CCR)-2 ou le CXCR2 respectivement présents sur les monocytes (Gerszten et al., 1999). Une fois recrutés, les monocytes sécrètent à leur tour des médiateurs inflammatoires mais ils ont également la capacité de se différencier en macrophages. La différenciation des monocytes en macrophages

s'accompagne d'une perte de l'expression de CCR2 (Fantuzzi et al., 1999) et d'une augmentation de l'expression de CCR1 et CCR5 (Kaufmann et al., 2001).

Suivant les facteurs spécifiques présents dans leur microenvironnement, les monocytes se différencient en macrophages avec des profils et des fonctions différentes voire opposées. C'est ce que nous appelons la polarisation macrophagique. Ainsi, le décryptage du mode de leur polarisation est important pour comprendre leurs rôles physiologiques et pathologiques.

Plusieurs classes de macrophages ont été décrites chez l'homme et la souris sur la base de l'expression de marqueurs de surface cellulaire, de la production de facteurs spécifiques et leurs activités biologiques. La première classification des macrophages a été faite par Nathan et al. Ils ont montré que les macrophages induits par la cytokine IFN- $\gamma$  activent le métabolisme oxydatif et l'activité antimicrobienne. Ces macrophages sont appelés macrophages classiques (Nathan et al., 1983). Par la suite, Gordon et Stein ont défini la polarisation alternative des macrophages par la cytokine IL-4. Ils ont montré que cette activation est opposée à celle induite par l'IFN- $\gamma$ . Cette réponse est caractérisée par une expression accrue du complexe majeur d'histocompatibilité humain de classe II (CMH II) et une diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Stein et al., 1992a). Plus tard, Mills et al ont classifié les macrophages en M1 et en M2 chez les souris, par analogie avec la réponse des lymphocytes T auxiliaires (T helper ; Th)-1 et Th-2 induite (Mills et al., 2000). Enfin, Mantovani et collègues ont subdivisé les macrophages activés alternativement en macrophages M2a, M2b et M2c. Chaque sous-type est associé à un mode d'activation différent et à des caractéristiques fonctionnelles contrastées (Mantovani et al., 2004). De plus, de nouvelles sous-populations macrophagiques ont également été décrites. Mais pour résumer, deux grandes catégories de macrophages sont reconnues, à savoir, les macrophages classiques ou M1-like qui sont décrits comme pro-inflammatoires et les macrophages alternatifs ou M2-like qui sont classés comme anti-inflammatoires (Figure 9).



**Figure 9. Polarisation des macrophages.**

Pour résumer les macrophages se différencient soit en macrophages pro-inflammatoires (à gauche) ou anti-inflammatoire (à droite) ou en macrophages qui présentent un phénotype mixte appartenant à la fois aux macrophages pro- et anti-inflammatoires (au centre). Les différentes polarisations sont suivies d'une surexpression (en noir) ou une régulation à la baisse (en bleu foncé) de marqueurs, de cytokines et de chimiokines, ou de sécrétion de ROS et de NO.

### III.2.1 Les macrophages pro-inflammatoires (M1-like)

La polarisation en macrophages M1-like se fait principalement en présence de la cytokine IFN-γ (Nathan et al., 1983), le LPS (Nathan et al., 1983; Mills et al., 2000) ou le TNFα (Murray et al., 2014). Ces stimuli sont regroupés en fonction de leur capacité à induire des réponses pro-inflammatoires. Néanmoins, leur source, leurs récepteurs et les voies de signalisation induites sont différentes.

L'IFN-γ est la principale cytokine associée à la polarisation en macrophages pro-inflammatoires (Nathan et al., 1983). Elle est produite par les Th1 et les cellules tueuses naturelles (natural killer ; NK). Une fois libérée, elle se lie à son récepteur, elle recrute des adaptateurs janus kinase (JAK) qui activent la voie de signalisation STAT1 et les facteurs inflammatoires sous le contrôle de cette voie (Waddell et al., 2010; Liang et al., 2017). L'IFN-

γ induit aussi l'augmentation de l'expression du TLR4 sur les macrophages qui est essentielle pour la reconnaissance et l'élimination des bactéries (Bosisio et al., 2002). Le LPS quant à lui se fixe au TLR4 sur la membrane des macrophages. Il stimule la voie de signalisation dépendante de la réponse MYD88. L'activation de MYD88 stimule les facteurs de transcription : le facteur nucléaire kappa B (nuclear factor kappaB ; NF-κB) ou/et le facteur de régulation de l'interféron 5 (Interferon regulatory factor 5 ; IRF5) ou/et la protéine activatrice 1 (Activator Protein-1 ; AP-1) qui activent la production de cytokines pro-inflammatoires. Le TLR4 peut également stimuler la voie TRIF pour TIR domain containing adapter-inducing Interferon-β qui active les facteurs de transcriptions NF-κB et IRF3 et induit les gènes cibles en amont de IFN de type I (Lu, Yeh, and Ohashi, 2008). Le TNFα quant à lui a deux récepteurs, le TNFR1 et le TNFR2. Les effets pro-inflammatoires du TNFα sont surtout dus à sa liaison avec le récepteur TNFR1 qui active la voie des MAPKs et la production de médiateurs inflammatoires en amont de cette voie. Ils coordonnent notamment une réponse immunitaire importante afin de lutter contre les tumeurs et d'éliminer les pathogènes, notamment les bactéries (Celada et al., 1984; Herbst, Schaible, and Schneider, 2011).

Les macrophages M1-like produisent des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-23 et IL-12 (Verreck et al., 2004), TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-18 (Bosisio et al., 2002; Waddell et al., 2010; Liang et al., 2017) et de faibles niveaux de cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGFβ. Ils sécrètent des cytokines chimioattractantes comme le CXCL9 et le CXCL10 (Murray et al., 2014) et ils augmentent l'expression des récepteurs des chimiokines CCR1 et CCR5 (Kaufmann et al., 2001). Ils induisent la production de ROS (Nathan et al., 1983) de RNS, tels que NO, important pour l'activité bactéricide des macrophages (Mills et al., 2000). De plus, ils présentent une forte activité de présentation antigénique (Nau et al., 2002) et ils promeuvent des réponses de type Th1 et Th17 (Mills et al., 2000).

Les macrophages M1-like expriment à leur surface de nombreux marqueurs qui les distinguent des autres sous-populations. Les plus représentatifs de ces populations sont les molécules de costimulation CD80, le récepteur opsonique Fc-γ II qui a une forte affinité avec les IgGs (CD64) et le co-récepteur du TLR4 (CD14) (Ambarus et al., 2012a) (Figure 9).

### **III.2.2 Les macrophages anti-inflammatoires (M2-like)**

Les macrophages de type M1-like utilisent iNOS pour convertir la L-arginine en L-citrulline et en NO qui joue un rôle bactéricide, tandis que les macrophages de type M2-like utilisent l'arginase pour convertir la L-arginine en L-ornithine, rendant les macrophages capables de réduire l'inflammation, d'éliminer les débris par phagocytose et d'assurer le remodelage et la cicatrisation des tissus (Mills et al., 2000). Les médiateurs utilisés pour polariser les macrophages en un profil anti-inflammatoire sont nombreux. Selon les stimuli utilisés et les fonctions induites, trois sous-types de macrophages sont reconnus. Les macrophages M2a-like, les macrophages M2b-like et les macrophages M2c-like. Ces différentes sous populations présentent un phénotype et des fonctions différentes (Edwards et al., 2006a).

#### **III.2.2.1 Les macrophages M2a-like**

La polarisation M2a-like a été décrite par l'équipe de Gordon. Ils ont montré que la cytokine de type Th2 (IL-4) augmentait l'expression du récepteur des mannoses (CD206) au niveau des macrophages. Ce récepteur est en temps normal diminué par l'IFN- $\gamma$ . Ceci conduit, à une activation alternative des macrophages et à la favorisation d'un phénotype anti-inflammatoire (Stein et al., 1992). Actuellement, deux types de cytokines Th2 sont acceptées pour induire la polarisation M2a-like in vitro. Les cytokines IL-4 et IL-13 (Stein et al., 1992; Doyle et al., 1994). L'IL-4 et l'IL-13 sont produites par les lymphocytes Th2, les basophiles, les neutrophiles et les macrophages. Elles se lient à leur récepteur et recrutent JAK1 et JAK3, entraînant l'activation de la voie de signalisation STAT6 (Rutschman et al., 2001; Shirey et al., 2010).

Sur le plan fonctionnel, les macrophages de type M2a-like favorisent l'endocytose des ligands des mannoses, grâce à la présence élevée des récepteurs aux mannoses (Stein et al., 1992). Ils limitent l'induction de l'inflammation en inhibant la production des NO (Doyle et al., 1994; Rutschman et al., 2001), en produisant des cytokines immunosuppressives telles que le TGF- $\beta$  et l'IL-10, en réduisant la production de cytokines pro-inflammatoires (Stein et al., 1992; Yue et al., 2014) et en sécrétant des chimiokines impliquées dans la voie Th2 comme le CCL17, le CCL24, le CCL22 et le CCL2 (Mantovani et al., 2004). Ils sont aussi responsables de la réparation tissulaire en stimulant la fibrinogénèse (Song et al., 2000).

Les macrophages M2a-like présentent un phénotype spécifique (Martinez et al., 2013). Ils augmentent l'expression de l'arginase-1 considérée comme le marqueur M2a-like prototypique (Chang, Liao, and Kuo, 1998; Rutschman et al., 2001). Ils surexpriment le récepteur des mannoses CD206 et le récepteur inhibiteur de la voie de signalisation MAPK (CD200R) (Stein et al., 1992; Koning et al., 2010). Ils ont également la particularité de baisser les niveaux du co-récepteur du TLR4 (CD14). L'expression de CD14 est modulée de façon comparable par l'-13 et l'IL-4, mais la surexpression de CD200R est spécifique aux macrophages polarisés avec la cytokine IL-4 (Ambarus et al., 2012a) (Figure 9).

### **III.2.2.2 Les macrophages M2b-like**

Une autre sous-population de macrophages anti-inflammatoires a été décrite. Elle est appelée M2b-like. Elle est induite par la stimulation avec la combinaison de complexes immuns et des ligands TLR, comme le LPS (Anderson and Mosser, 2002a, 2002b). En effet, les complexes immuns sont reconnus par les Fc $\gamma$ R sur des macrophages activés par le LPS (Sironi et al., 2006). Ces macrophages diminuent la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-12 et induisent la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires IL-10 et l'IL-4 (Edwards et al., 2006a). Ils sécrètent également la chimiokine CCL1 qui favoriserait la chimiotaxie des macrophages alternatifs qui expriment constitutivement leurs récepteurs (Asai et al., 2012), favorisant la réponse Th2 et une immunorégulation (Anderson and Mosser, 2002a) (Figure9).

### **III.2.2.3 Les macrophages M2c-like**

Les macrophages M2c-like sont également classés en macrophages anti-inflammatoires. Ils sont polarisés en présence de la cytokine IL-10 ou de glucocorticoïdes (Glucocorticoid ; GC) et à moindre mesure avec la cytokine TGF- $\beta$ .

Les glucocorticoïdes sont sécrétés par les glandes surrénales. Ils diffusent à travers la membrane des macrophages pour se lier à leurs récepteurs, entraînant la translocation nucléaire du complexe GC-GCR vers le noyau pour moduler la transcription des gènes. Ils régulent également négativement la signalisation STAT1 induite par l'IFN- $\gamma$  dans les macrophages (Hu et al., 2003). L'IL-10 quant à elle est produite par quasiment tous les leucocytes. Après sa liaison avec son récepteur, elle active la voie de signalisation JAK/STAT3. Dans le même temps



elle supprime celle de JAK/STAT1 essentielle pour les macrophages M1-like, inhibant l'expression des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, comme le TNF- $\alpha$  (Ito et al., 1999; Riley et al., 1999).

Les macrophages M2c-like limitent les dommages tissulaires et favorisent la résolution de l'inflammation en activant plusieurs mécanismes. Ils produisent des antioxydants (Ehrchen et al., 2007). Ils augmentent la capacité de phagocytose des agents inflammatoires, notamment via l'expression de nombreux récepteurs scavenger, comme le CD163 (Schaer et al., 2006; Ehrchen et al., 2007). Ils sécrètent aussi de nombreux médiateurs anti-inflammatoires et immunorégulateurs, comme l'IL-10. L'IL-10 est connu pour supprimer l'activation classique des macrophages (Park-Min, Antoniv, and Ivashkiv, 2005). En effet, il diminue l'expression des cytokines induites dans les macrophages classiques comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-1 (Bogdan, Vodovotz, and Nathan, 1991; Fiorentino et al., 1991). Les macrophages M2c-like sécrètent aussi plusieurs chimiokines de la famille des Th2 (Mantovani et al., 2004). Enfin, ils ont un rôle dans la cicatrisation puisqu'ils expriment des protéines impliquées dans le remodelage tissulaire et la cicatrisation, comme les inhibiteurs des métalloprotéinases TIMP1 et la serpin family A member (SERPINA1) mis en évidence par des expériences d'RNAseq (Lurier et al., 2017).

Plusieurs marqueurs cellulaires caractérisent la sous-population macrophagique M2c-like. Les plus représentatifs sont les récepteurs scavenger CD163 mais aussi les récepteurs Fc $\gamma$  de type II (moyenne affinité aux IgGs) CD32 et de type III (faible affinité aux IgGs), CD16 (Schaer et al., 2006; Ambarus et al., 2012a) (Figure9).

### **III.2.3 Les macrophages M-CSF et GM-CSF**

Le M-CSF (CSF-1) et le GM-CSF (CSF-2) sont des facteurs de croissance importants pour le recrutement des monocytes, mais également pour leur différenciation en macrophages (Tagliani et al., 2011). Le M-CSF est produit de manière constitutive par les cellules mésenchymateuses. Il est détectable en circulation dans des conditions de repos. Il contrôle le développement des monocytes ainsi que la prolifération et la survie des macrophages en homéostasie (Tushinski et al., 1982). Il a également été montré que les macrophages et les monocytes en circulation expriment le récepteur du CSF-1, et le blocage de ce récepteur conduit à l'inhibition de la maturation des monocytes en macrophages (Dai et al., 2002). Le GM-CSF

intervient également dans le développement des monocytes. Il est moins important pour leur recrutement et leur différenciation en macrophage en situation de repos. Néanmoins, il joue un rôle primordial en situation inflammatoire (Stanley et al., 1994). Le M-CSF et le GM-CSF ont aussi des effets polarisants importants sur les macrophages. Il a été montré que la stimulation du récepteur du CSF-1 amorce la polarisation des macrophages en un phénotype plutôt anti-inflammatoire. Tandis que le GM-CSF conduit à un état plutôt pro-inflammatoire (Stanley et al., 1994; Verreck et al., 2004). Mais, à ce jour, il n'y a pas d'évidence sur l'appartenance des macrophages induits par le M-CSF et le GM-CSF à la catégorie précise M1-like ou M2-like (Figure9).

### **III.2.3.1 La polarisation macrophagique avec le GM-CSF**

La culture in vitro de monocytes humains ou de cellules de la moelle osseuse de souris avec le GM-CSF est souvent utilisée comme modèle pour la différenciation macrophagique associée à un phénotype pro-inflammatoire. Une fois lié à son récepteur sur les monocytes, le GM-CSF recrute JAK2, entraînant l'activation de STAT5 et les gènes en aval de cette voie de signalisation (Lehtonen et al., 2002). Le GM-CSF induit l'augmentation de l'expression des protéines du CMH II et la molécule de costimulation CD80 à la surface des monocytes. Cette expression est similaire à celle observée sur les macrophages différenciés avec de l'IFN- $\gamma$  pro-inflammatoire (Willman et al., 1989; Ambarus et al., 2012a). De plus, la différenciation avec le GM-CSF induit aussi la production de plusieurs facteurs pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12 et l'IL-23 (Verreck et al., 2004; Fleetwood et al., 2007; Lehtonen et al., 2007). Néanmoins, le GM-CSF ne régule pas positivement le marqueur caractéristique des M1-like (CD64) (Ambarus et al., 2012a). De plus, d'autres travaux montrent que le GM-CSF conduit à une capacité phagocytaire extrêmement élevée des macrophages, ainsi qu'une production accrue d'IL-10 anti-inflammatoire en réponse au LPS (Na et al., 2016), remettant en doute son effet exclusivement pro-inflammatoire (Figure9).

### **III.2.3.2 La polarisation macrophagique avec le M-CSF**

À l'inverse du GM-CSF, les macrophages différenciés avec le M-CSF présentent préférentiellement un phénotype anti-inflammatoire (Xu et al., 2006). La liaison du M-CSF à son

récepteur entraîne l'activation des gènes anti-apoptotiques dépendants de NF- $\kappa$ B (Fleetwood et al., 2007), induisant, une augmentation de la phagocytose par les macrophages, une amplification de la sécrétion d'IL-10 anti-inflammatoire (Verreck et al., 2004) et l'absence de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 ou le TNF (Xu et al., 2006). Il a également été montré, dans de nombreux protocoles, que le M-CSF peut être utilisé comme amorceur (primer) pour induire des macrophages matures. Par la suite, sur ces mêmes populations, un phénotype pro ou anti-inflammatoire est induit avec l'ajout d'IFN- $\gamma$ , d'LPS, d'IL-4 ou d'IL-10 (Ambarus et al., 2012a; Jaguin et al., 2013). La polarisation des macrophages avec le M-CSF ne module pas de manière significative l'expression de CD200R qui est le marqueur des macrophages anti-inflammatoires M2a-like. Par ailleurs, ce facteur induit l'expression de marqueurs caractéristiques des macrophages M2c-like, à savoir le CD163 et le CD16. Ces travaux ont mis en évidence aussi que le M-CSF induit la surexpression de CD64 caractéristique des macrophages pro-inflammatoires (Ambarus et al., 2012a). Une autre étude a montré que les macrophages M-CSF peuvent présenter des effets pro-inflammatoires en augmentant l'expression du marqueur CD80 et des cytokines TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$  en réponse aux complexes immuns contenant des anticorps anti-protéines citrullinées (Clavel et al., 2016) (Figure9).

Il est donc important de rappeler que la polarisation des macrophages pro-inflammatoires versus anti-inflammatoires reflète probablement un processus plus complexe. De ce fait, la liste des sous-populations de macrophages s'allonge encore, et d'autres sous-types de macrophages dérivés de monocytes sont activement étudiés (Chávez-Galán et al., 2015). À titre d'exemple, les antagonistes des TLRs stimulent la production de macrophages anti-inflammatoires de type M2d-like. Il existe aussi des macrophages qui présentent des fonctions distinctes selon le niveau d'expression de CX3CR1 (Burgess et al., 2019). La liaison de CX3CL1 à son récepteur CX3CR1 entraîne notamment un remodelage tissulaire et une cicatrisation (Ishida, Gao, and Murphy, 2008). Il y a aussi une nouvelle population de macrophages dérivés de monocytes mis en évidence récemment, c'est une population pro-inflammatoire induite par un antagoniste du récepteur aryl hydrocarbure (Goudot et al., 2017). Le AhR est un récepteur cytoplasmique et un facteur de transcription impliqué dans de nombreux mécanismes, notamment la détoxification des cellules. Il induit la différenciation des macrophages avec un profil pro-inflammatoire via l'activation du facteur de transcription bZip MafB (MAF BZIP Transcription Factor B ; MafB), qui est connu pour être surexprimé lors de

la différenciation des cellules myéloïdes en macrophages (Kelly et al., 2000; Goudot et al., 2017).

### **III.3 Activation et fonctions des macrophages**

Les macrophages présentent de nombreuses fonctions essentielles à la défense immunitaire, mais également au développement des tissus et au maintien de l'homéostasie. Les travaux fondateurs du chercheur Ilya Metchnikoff, résumés dans les revues suivantes (Gordon, 2016a; Teti, Biondo, and Beninati, 2016) sont les premiers à décrire les fonctions des macrophages. Ils montrent que les macrophages sont présents dans de nombreux tissus et qu'ils sont capables d'éliminer les agents pathogènes par le processus de phagocytose. Depuis, la pluralité des fonctions des macrophages a été mise en évidence. Il a été montré, qu'au cours de l'organogenèse, les macrophages orchestrent le remodelage de nombreux tissus. Par exemple, ils favorisent la différenciation des spermatogonies dans les testicules murins avant la naissance (DeFalco et al., 2014). Ils sont également responsables de la régénération de certains tissus après la naissance comme c'est le cas dans le cœur (Lavine et al., 2014). Une autre fonction des macrophages découverte plus récemment est la formation d'une structure qui ressemble à une membrane autour des cellules de la synoviale dans l'articulation. Ces macrophages présentent des caractéristiques de cellules épithéliales et forment une barrière qui exclut l'articulation du milieu extérieure (Culemann et al., 2019).

Toutefois, les fonctions des macrophages les plus importantes restent la défense de l'organisme contre les agents pathogènes. Cette tâche s'effectue à travers des mécanismes qui régulent la phagocytose des agents pathogènes, la présentation antigénique qui fait le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative, la sécrétion de cytokines et la production de facteurs responsables de la cicatrisation et du remodelage des tissus.

Pour résumer, les PAMPs libérés par les agents pathogènes et les DAMPs sécrétés par les cellules endommagées induisent le recrutement des monocytes et des macrophages vers les sites inflammatoires (Nourshargh and Alon, 2014). Par la suite, l'agent pathogène est capturé par les macrophages, qui d'abord le détruisent par phagocytose et ensuite le présentent via les molécules du CMH II aux lymphocytes T afin d'alerter le système immunitaire adaptatif de la présence du pathogène. Une fois l'agent pathogène éliminé et la phase inflammatoire terminée, les macrophages contribuent à la cicatrisation des tissus enflammés (Kloc et al., 2019). Ces

différents phénomènes que je détaillerai ci-dessous sont accompagnés à chaque fois de la sécrétion de nombreux médiateurs pro-ou anti-inflammatoires.

### **III.3.1 La phagocytose**

La phagocytose est le processus par lequel les phagocytes ingèrent des particules de taille supérieure à 0,5  $\mu\text{m}$ , grâce à des vésicules dérivées de la membrane plasmique, appelées phagosomes. Ce mécanisme permet d'éliminer les agents pathogènes, les cellules apoptotiques et les cellules nécrotiques afin de maintenir l'homéostasie.

Parmi les phagocytes, les macrophages sont les plus importants. En effet, ils ont été classés comme des phagocytes professionnels par Michel Rabinovitch avec les neutrophiles, les monocytes, les cellules dendritiques, les ostéoclastes et les éosinophiles (Rabinovitch, 1995).

#### **III.3.1.1 Reconnaissance de l'agent pathogène**

La première étape de la phagocytose macrophagique est la reconnaissance des particules à ingérer. Pour ce faire, les macrophages possèdent des récepteurs qui permettent de discriminer le soi du non-soi (Gordon, 2002). En effet, ils reconnaissent uniquement des motifs conservés associés aux agents pathogènes (Peiser et al., 2000), ou des motifs associés aux dégâts tissulaires (Greenberg et al., 2006). Les récepteurs qui reconnaissent les particules à phagocyter sont subdivisés en deux types. Les récepteurs non-opsoniques, qui peuvent reconnaître directement les groupes moléculaires de leurs cibles et les phagocyter et les récepteurs opsoniques, qui à l'inverse ont besoin d'opsonines pour stimuler la phagocytose.

##### ***III.3.1.1.1 Récepteurs opsoniques***

Les opsonines sont des molécules solubles, qui se lient à l'agent pathogène cible. Ce sont principalement les anticorps (IgGs ou IgMs) et les composants du complément. Une fois liées, elles sont reconnues à leur tour par les récepteurs Fc $\gamma$ s (Huang et al., 2006) ou les

récepteurs du complément, respectivement (Wright, Cragmyle, and Silverstein, 1983) qui se trouvent à la surface des macrophages, afin d'initier la phagocytose.

Le récepteur Fc $\gamma$  est l'un des récepteurs opsoniques le plus important et le mieux étudié. C'est une famille de glycoprotéines exprimées sur la membrane des leucocytes. Ils ont un domaine extracellulaire, qui reconnaît les parties Fc des complexes immuns, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique qui transduit le signal afin d'amorcer la phagocytose (Odin et al., 1991; Takai et al., 1994).

Une fois que le complexe immunitaire est lié au récepteur Fc, les IgGs s'agrègent induisant l'accumulation des Fc $\gamma$ Rs dans les radeaux lipidiques enrichis en cholestérol, où sont concentrées les kinases de la famille Src (Gatfield and Pieters, 2000; Kwiatkowska and Sobota, 2001). Par la suite, il y a activation de plusieurs protéines de signalisation supplémentaires qui conduisent à la polymérisation de l'actine qui entraîne l'extension des pseudopodes (Hoppe and Swanson, 2004; Beemiller et al., 2010). Chez l'homme, il existe plusieurs types de Fc $\gamma$ Rs qui sont coexprimés par des phagocytes professionnels. Ces récepteurs comprennent les récepteurs activateurs, CD64, CD32 et CD16 et le seul récepteur inhibiteur Fc $\gamma$ RIIB. En plus du Fc $\gamma$ RIIB, une autre molécule régule négativement la phagocytose des macrophages. Il s'agit de CD47 via le signal regulatory protein  $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ) qui bloque le Fc $\gamma$ RI (Oldenburg, Gresham, and Lindberg, 2001; Lopes et al., 2017).

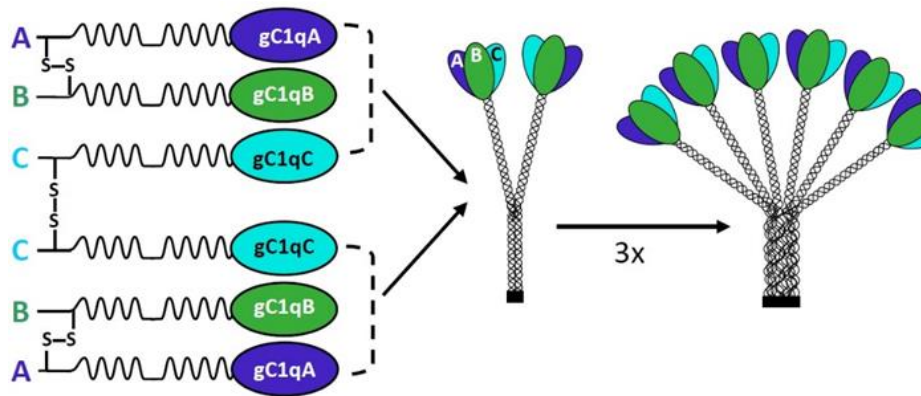
Les récepteurs du complément sont la deuxième catégorie des récepteurs opsoniques. Ils sont regroupés en plusieurs superfamilles. Ils reconnaissent les composants de la cascade du complément déposés à la surface des cibles à phagocyter.

Pour rappel, le système du complément est un ensemble de protéines plasmatiques activant trois voies. La voie classique initiée par la formation de complexes immuns, la voie des lectines induite par les mannoses présents à la surface des pathogènes et la voie alterne activée spontanément après clivage d'un composant du complément. Les trois voies convergent en C3 et induisent la production de plusieurs fragments du complément lesquels conduisent à la sécrétion de cytokines inflammatoires et chimiotactiques, à l'opsonisation, à la formation de complexes d'attaque membranaire afin de lyser les agents pathogènes.

Le C1q est le premier composant de la voie classique du complément. C'est une protéine composée d'une région C-terminale globulaire (C-terminal globular region ; gC1q) et d'une queue N-terminale de type collagène (N-terminal collagen region ; cC1q) (Figure 10) (Reid and

Porter, 1976). La gC1q interagit principalement avec les particules à phagocyter (Gaboriaud et al., 2003) et cC1q se lie généralement avec les récepteurs présents sur les macrophages pour amorcer la phagocytose (Bobak et al., 1987). Plusieurs récepteurs opsoniques du C1q sont présents à la surface des macrophages. Il s'agit notamment des récepteurs CR1 (CD35) (Klickstein et al., 1997), des récepteurs ubiquitaires gC1qR (Ghebrehiwet et al., 1994) et de la calréticuline qui a la particularité de se lier à la fois aux gC1q et au cC1q (Stuart et al., 1997; Païdassi et al., 2011).

Le C1q améliore la phagocytose des complexes immuns médiée par les FcRs (Bobak et al., 1987) en se liant aux régions Fc des IgGs et des IgMs (Gadjeva et al., 2008). Il déclenche aussi la phagocytose en reconnaissant directement plusieurs variétés de ligands. En effet, il s'associe aux cellules apoptotiques et nécrotiques notamment, via la phosphatidylsérine (PS) (Païdassi et al., 2008) et le désoxyribose de la chromatine (Garlatti et al., 2010). Il se lie aussi aux protéines altérées du soi (Biró et al., 2007). Il reconnaît les PAMPs virales et bactériens, particulièrement le LPS (Bredt et al., 1977). Son appauvrissement ou son altération provoque un défaut de phagocytose des agents pathogènes et entraîne de nombreuses pathologies auto-immunes (Bijl et al., 2006), y compris la polyarthrite rhumatoïde (Trinder et al., 1997). À titre d'exemple, Leffler et al ont montré que dans le LES, le C1q se lie aux NETs et empêche leur dégradation, induisant la production d'auto-anticorps contre les NETs et exacerbant la sévérité de la maladie (Leffler et al., 2012).



**Figure 10. Structure du C1q.**

*Le C1q est assemblé à partir de trois chaînes polypeptidiques (A, B et C) codées par 3 gènes différents (C1QA, C1QB et C1QC). Chaque chaîne comprend une séquence N-terminale de type collagène cC1q et un module C-terminal globulaire gC1q, avec des ponts disulfures reliant les extrémités N-terminales des chaînes A et B et des deux chaînes C. Chaque dimère A-B s'associe à une chaîne C, ce qui donne une sous-unité de base composée de deux tiges hétérotrimériques de type collagène liées par des ponts disulfures et prolongées par des domaines globulaires. L'association de 3 sous-unités aboutit à une protéine complète ayant la forme typique d'un bouquet de six fleurs, les tiges étant maintenues ensemble dans leur moitié N-terminale par de fortes interactions non covalentes et divergeant ensuite pour former six tiges individuelles, chacune se terminant par une tête globulaire. D'après (Frachet, Tacnet-Delorme, and Thielens, 2015).*

Les membres de la famille des intégrines CR3  $\alpha$ M $\beta$ 2 appelées également CD11b/CD18 ou Mac-1 sont d'autres récepteurs du complément présents sur les macrophages. Ils se lient au composant du complément iC3b déposé préalablement sur la particule à phagocyter. La liaison de ces récepteurs s'accompagne de l'activation de voies de signalisation spécifiques et de modifications cytosquelettiques (Wright, Craigmyle, and Silverstein, 1983; Patel and Harrison, 2008). La signalisation de l'intégrine CR3 pour la phagocytose est différente de celle du Fc $\gamma$ Rs (Olazabal et al., 2002). Le cytosquelette d'actine seul est nécessaire pour la phagocytose à médiation Fc $\gamma$ Rs, tandis que les cytosquelettes d'actine et de microtubule sont nécessaires pour la phagocytose à médiation CR (Allen and Aderem, 1996). De même, l'accumulation de l'actine F est dépendante de RhoA, mais pas de Rac ou de Cdc42 contrairement au récepteur Fc $\gamma$  (Hall et al., 2006). De plus, contrairement à la voie médiée par les Fc $\gamma$ R, cette voie est plutôt anti-inflammatoire vu qu'elle ne produit pas de ROS, n'active pas la voie de l'acide arachidonique et module l'expression du TNF $\alpha$  (Wright, Craigmyle, and Silverstein, 1983; Aderem et al., 1985; Irani and Maslow, 2005).



### ***III.3.1.1.2 Récepteurs non-opsoniques***

Les récepteurs non-opsoniques qui se lient directement aux pathogènes pour induire la phagocytose sont une famille de plusieurs récepteurs. Nous avons, les molécules de reconnaissance de type lectine, telles que CD169 qui se lie aux résidus sialylés (Delputte et al., 2011), les lectines de type C telles que La déctine 1, qui se lient aux polysaccharides (Herre et al., 2004), les récepteurs du mannose qui reconnaissent le mannose et le fructose à la surface des agents pathogènes (Ezekowitz et al., 1990) et les récepteurs scavenger, tels que SR-A, MARCO, et le CD36 qui reconnaissent les composants de surface des bactéries mais aussi les cellules apoptotiques qui présentent un signal (eat me) à leur surface (Peiser et al., 2000; Greenberg et al., 2006). Il existe également des récepteurs pour réguler la phagocytose non-opsonique lorsque les cellules expriment des molécules qui émettent un signal (d'ont eat me) et par l'expression de CD31 qui empêche la phagocytose en favorisant le détachement des cellules des agents pathogènes (Brown et al., 2002).

### ***III.3.1.1.3 Toll like receptors***

Il existe aussi une autre catégorie de récepteurs qui reconnaissent les agents pathogènes à ingérer mais qui ne fonctionnent pas comme des récepteurs phagocytaires. Ils activent les macrophages et collaborent avec d'autres récepteurs pour stimuler l'ingestion et l'élimination des pathogènes (Sjoelund, Smelkinson, and Nita-Lazar, 2014). Ce sont les PRR. Ils sont un ensemble de récepteurs appartenant à plusieurs familles mais les mieux caractérisés sont les TLRs (Kawai and Akira, 2011).

Les TLRs sont exprimés majoritairement sur les cellules présentatrices d'antigènes comme les macrophages, les monocytes, les DC et les lymphocytes B. Ce sont des glycoprotéines composées d'un ecto-domaine qui reconnaît leurs ligands, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique qui transduit le signal. L'engagement des récepteurs TLRs induit une cascade de signalisation qui active deux voies de signalisation distinctes. Une dépendante de l'adaptateur MyD88 et des MAPKs conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires (Dai et al., 2009) et une autre dépendante de TRIF, responsable de production d'IFN de type I (Yamamoto et al., 2002).

Les TLRs sont subdivisés en deux grandes catégories en fonction de leur localisation : les TLRs présents sur la membrane plasmique et les TLRs intracellulaires présents sur les endomembranes.

Les TLRs de surface comprennent les TLR1, 2, 4, 5, 6 et 10. Le TLR9 est exprimé à la fois sur la membrane plasmique et sur les endomembranes (Lindau et al., 2013). Ils reconnaissent des molécules présentées à la surface des produits microbiens. En effet, le TLR1, le TLR2 et le TLR6 reconnaissent une variété de PAMPs, comme les lipoprotéines et les peptidoglycanes (Takeuchi et al., 2001; Alexopoulou et al., 2002). Les TLR4 sont activés par l'endotoxine (LPS) présente sur les bactéries Gram négatives (Poltorak et al., 1998). Les TLR5 se lient à la flagelline, un composant des flagelles bactériens hautement inflammatoire (Hayashi et al., 2001) et les TLR10 reconnaissent la listeria monocytogène et le virus de la grippe (Regan et al., 2013; Lee et al., 2014).

Les TLRs endosomaux intracellulaires incluent les TLR3, 7, 8, 9, 11, 12 et 13. Ils reconnaissent principalement des acides nucléiques d'origine microbienne ou des acides nucléiques du soi. Les TLR3 reconnaissent le composant universel des virus, l'ARN double brin (ARNdb) et les auto-ARNs sécrétés par les cellules endommagées (Alexopoulou et al., 2001; Takemura et al., 2014). Les TLR7 et les TLR8 ont de fortes homologues et reconnaissent tous les deux de l'ARN simple brin (sb) viral et bactérien (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004). Les TLR9 se lient à l'ADN bactérien et viral riche en motifs CpG-non méthylés via son squelette de sucre (Krug et al., 2004; Latz et al., 2004; Haas et al., 2008). Les TLR11 et les TLR12 reconnaissent la flagelline et la profiline (Yarovinsky et al., 2005; Andrade et al., 2013). Enfin, les TLR13 sont activés par l'ARNr 23S bactérien (Oldenburg et al., 2012).

Les TLRs résident d'abord dans le RE et sont acheminés vers la membrane plasmique ou les endolysosomes via le complexe de golgi (Brinkmann et al., 2007; Chockalingam et al., 2009). Les TLRs endosomaux sont ensuite activés par l'acidification endolysosomales suivie dans certains cas d'un clivage de leurs ectodomains (Häcker et al., 1998; Park et al., 2008). La localisation intracellulaire des TLRs permet de reconnaître les acides nucléiques délivrés dans les endomembranes après leur internalisation, afin de prévenir leurs liaisons à des auto-acides nucléiques et déclencher des maladies auto-immunes.

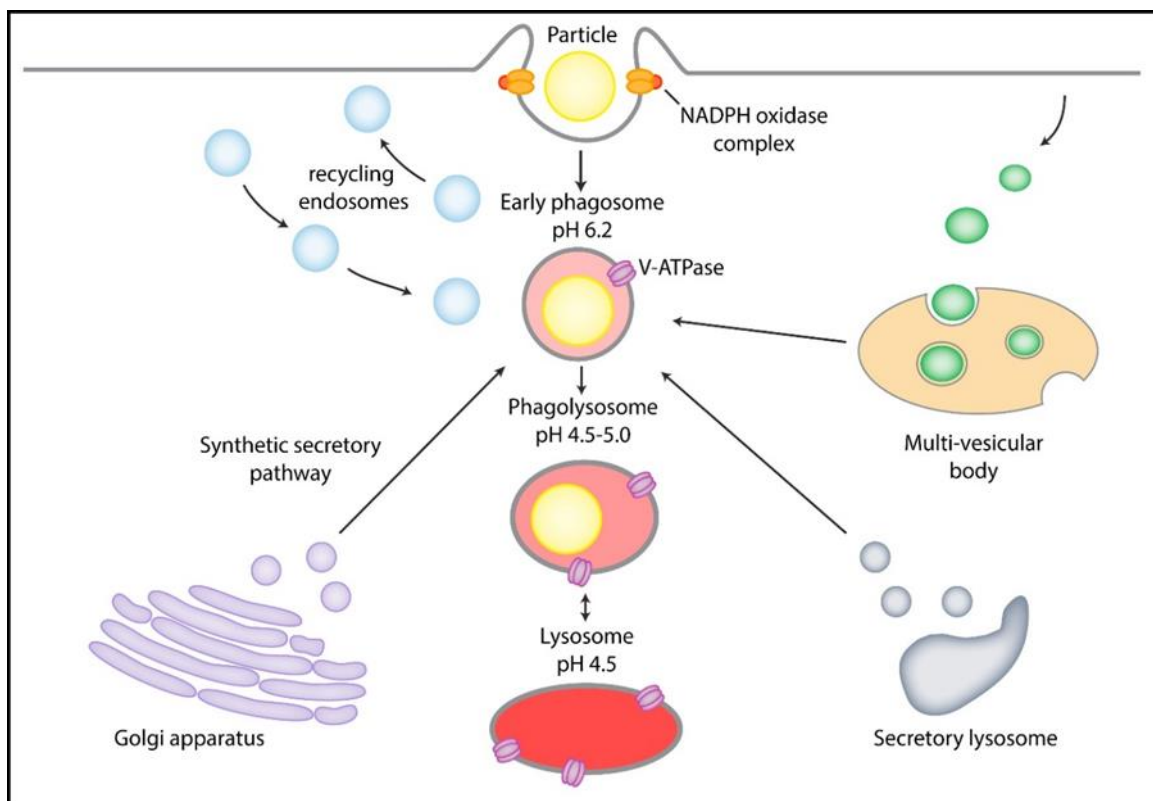
L'engagement des ligands sur les TLRs active les macrophages de nombreuses façons. Ils produisent de l'IFN- $\gamma$  et des cytokines inflammatoires. En parallèle, ils régulent

négativement de nombreux microARN (miR), comme le miR-24, qui est impliqué dans l'inhibition de la production des cytokines inflammatoires, telles que le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 mais aussi la phagocytose dans les macrophages (Naqvi, Fordham, and Nares, 2015; Naqvi et al., 2016). Ils stimulent la production de ROS indispensables à leurs fonctions microbicides (West et al., 2010). Enfin, les TLRs (TLR-2 et 4) potentialisent la phagocytose médiée par le Fc $\gamma$ R dans les macrophages en induisant la phosphorylation de multiples cibles de la voie Fc $\gamma$ R (Sjoelund, Smelkinson, and Nita-Lazar, 2014). Ces différentes fonctions leur confèrent un rôle essentiel dans la protection de l'organisme. En effet en utilisant des modèles de souris déficientes en TLRs, beaucoup d'études ont montré que les TLRs reconnaissent les bactéries et préviennent leurs disséminations (Takeuchi, Hoshino, and Akira, 2000). Ils protègent aussi l'hôte contre les infections virales (Daffis et al., 2008), les infections fongiques (Bellocchio et al., 2004) et parasitaires (Campos et al., 2001). Les TLRs promeuvent notamment des réponses immunitaires adaptatives (Letran et al., 2011). En effet, de nombreux ligands des TLRs sont actuellement exploités comme adjuvants vu la réponse immunitaire adaptative protectrice qu'ils induisent lors de vaccins (Koyama et al., 2007). Néanmoins, les TLRs peuvent également augmenter la sévérité des infections en activant de façon exagérée le système immunitaire (Imai et al., 2008).

### **III.3.1.2 Phagocytose**

La deuxième étape de la phagocytose est la formation du phagosome. En effet, une fois que le signal pour amorcer la phagocytose est donné, le cytosquelette entraîne la formation de pseudopodes, qui recouvrent la particule à éliminer et se ferment afin de former un phagosome (Cox et al., 1999; Schlam et al., 2015). Ensuite, le nouveau phagosome fusionne avec les endosomes précoces de recyclage pour donner lieu au phagosome précoce, qui contient un milieu intérieur plus acide (pH 6,1-6,5). Les événements de fusion membranaire sont régulés par la GTPase Rab5 (Kitano et al., 2008). Le phagosome précoce se lie ensuite à des vésicules qui proviennent du réticulum endoplasmique et du complexe de golgi pour former le phagosome intermédiaire (Wähe et al., 2010; Campbell-Valois et al., 2012). Au fur et à mesure de la maturation, Rab5 se perd et Rab7 est recruté sur la membrane. (Vieira et al., 2003; Rink et al., 2005). Dans le même temps, des vésicules intraluminales se forment. Elles contiennent des molécules associées à la membrane qui sont destinées à la dégradation ou au recyclage (Lee et al., 2005). Une fois que le phagosome intermédiaire a éliminé les protéines qui seront

recyclées ou dégradées, il poursuit sa maturation pour devenir un phagosome tardif en se fusionnant avec les endosomes tardifs. Rab7 s'accumule et devient un marqueur de cette étape (Jordens et al., 2001). À ce stade, le lumen devient plus acide (pH 5,5-6,0). La dernière étape du processus implique la fusion des phagosomes tardifs avec les lysosomes, pour devenir des phagolysosomes. Ces derniers ont un pH très acide (pH à 4,5), grâce à la présence d'un grand nombre de molécules de V-ATPase sur leurs membranes. Ils dégradent ensuite les microorganismes grâce à des enzymes hydrolytiques comme les cathepsines, protéases, lysozymes et lipases, ou la transferrine «lactoferrine» (Tjelle et al., 1998; Levin, Grinstein, and Canton, 2016) (Figure 11).



**Figure 11. La phagocytose.**

*La phagocytose est un processus dynamique de fusion et de fission des membranes plasmiques avec les membranes vésiculaires intracellulaires, de maturation des phagosomes et d'acidification progressive, aboutissant à la fusion et à la digestion des micro-organismes dans les phagolysosomes (Gordon, 2016b).*

### III.3.2 Présentation antigénique

Une fois que les protéines pathogènes sont phagocytées et dégradées par les macrophages dans les compartiments endolysosomiaux (Tjelle et al., 1998), elles sont présentées sur le CMH II au système immunitaire adaptatif afin de l'alerter et de l'activer (Rammensee, 1996).

Les molécules du CMH ou les antigènes des leucocytes humains (human leukocyte antigen ; HLA) chez l'homme, sont des glycoprotéines transmembranaires subdivisées en Complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMHI) et CMH II. Le CMH II est exprimé par toutes les cellules présentatrices d'antigènes (CPAs) professionnelles, y compris les macrophages. Il est codé par les gènes HLA-DR, HLA-DQ et HLA-DP. Son expression est régulée principalement par le transactivateur du CMH II (class II major histocompatibility complex transactivator ; CIITA) (Muhlethaler-Mottet et al., 1997). Les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  qui les composent s'assemblent au niveau du RE. Elles forment un complexe avec une protéine accessoire appelée (chaîne invariante Ii (la chaîne  $\gamma$  du CMH II aussi nommée CD74). Le fragment Ii fonctionne comme une protéine chaperonne. Elle masque les sites de liaison des peptides sur le CMH et le guide vers la membrane plasmique via l'appareil de Golgi (Anderson and Miller, 1992). En présence d'un signal, les molécules du CMH II sont internalisées et transportées vers les endosomes tardifs. Dans les endosomes, Ii est sectionné (Castellino and Germain, 1995; Rammensee, 1996). Les peptides dérivés de protéines dégradées qui présentent une forte affinité avec le CMH II sont chargés sur ce dernier par la protéine HLA-DM (Sanderson et al., 1994). Les complexes CMH II-peptides sont finalement transportés et délivrés à la membrane plasmique en faisant intervenir les molécules du cytosquelette. Enfin, les peptides sont présentés aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Wubbolts et al., 1996; Vascotto et al., 2007) (Figure 12).

En plus de la phagocytose, la délivrance des antigènes exogènes aux compartiments endolysosomiaux afin qu'ils soient présentés aux lymphocytes T, se fait aussi par d'autres mécanismes. En effet, ils peuvent être internalisés par l'endocytose médiée par des récepteurs recouverts de clathrine, qui acheminent directement les pathogènes vers les endosomes tardifs. Ils ont aussi la capacité d'être ingérés en présence de signaux spécifiques, tels que les facteurs de croissance, par le processus de macropinocytose (Welliver and Swanson, 2012), une endocytose non spécifique, qui à partir d'invaginations circulaires de la membrane plasmique encapsule les antigènes extra-cellulaires, formant ainsi des microphagosomes qui délivrent les

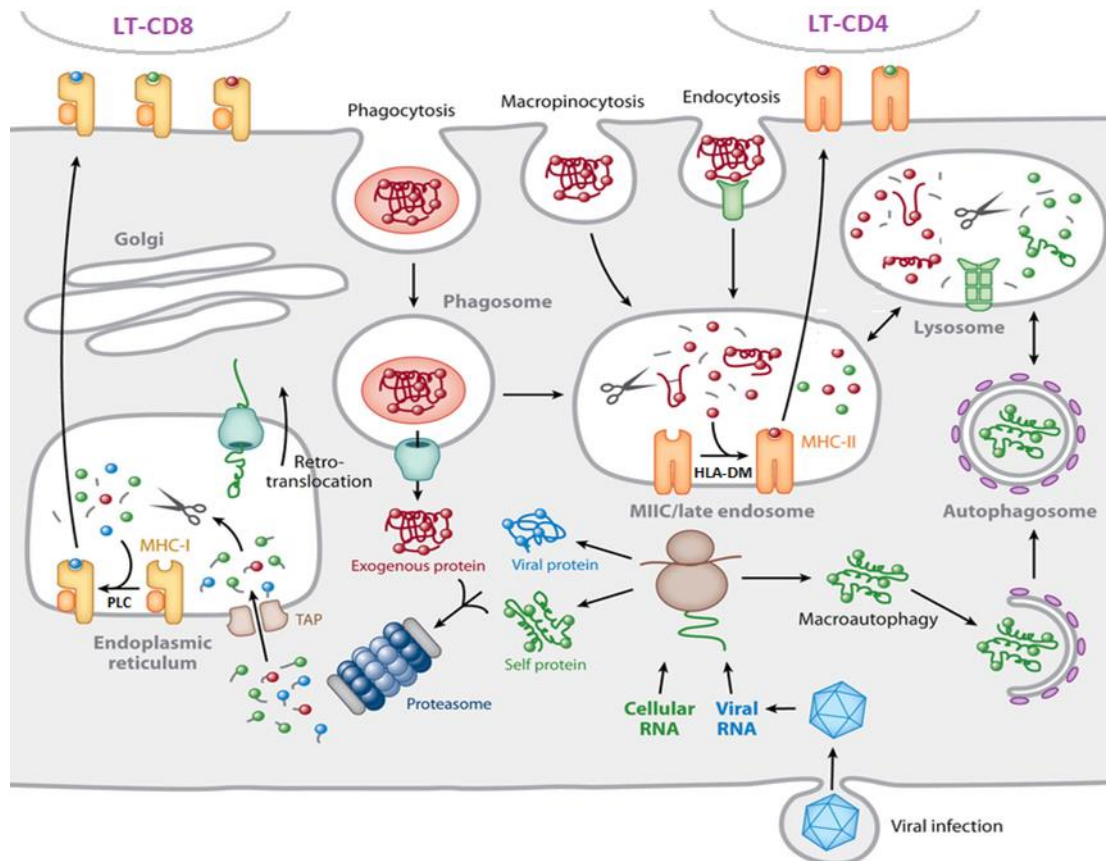
protéines aux endosomes pour leur traitement (von Delwig et al., 2006; Canton et al., 2016). Enfin, les bactéries et les virus qui s'échappent des compartiments de la phagocytose sont ingérés par autophagie, un mécanisme qui encapsule les protéines du cytoplasme et forment des autophagosomes (Gutierrez et al., 2004). Ils fusionnent ensuite avec des vésicules lysosomales et forment des autophagolysosomes qui sont capables de traiter les peptides afin qu'ils soient présentés à la surface par le CMH II (Schmid, Pypaert, and Münz, 2007) (Figure 12).

Il existe une autre classe de CMH, le CMHI. Les molécules du CMHI et du CMH II sont toutes les deux des glycoprotéines ayant la même fonction présentatrice d'antigènes aux lymphocytes T. Toutefois, l'expression du CMHI n'est pas restreinte au CPAs mais à toutes les cellules nucléées et les plaquettes. De plus, contrairement aux molécules de CMH II qui présentent des peptides exogènes aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, les molécules de CMHI exposent à la surface des cellules des peptides endogènes cytoplasmiques ou nucléaires aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup>.

Le CMHI est composé d'une chaîne légère la microglobuline  $\beta 2$  ( $\beta 2m$ ) et d'une chaîne lourde  $\alpha$ . Les chaînes lourdes du CMHI sont codées par le HLA-A, HLA-B et HLA-C chez l'homme. Elles s'assemblent au niveau du RE et fixent des protéines chaperonnes, constituant ainsi le complexe de chargement de peptides (peptide-loading complex ; PLC) (Wearsch, Peaper, and Cresswell, 2011). Le PLC assure le maintien du CMH et le chargement des peptides transloqués dans la lumière du RE sur le CMHI (Roche and Cresswell, 2016). Les peptides à présenter sur le CMHI sont générés après dégradation par les protéasomes cytoplasmiques et nucléaires des protéines défectueuses du soi, y compris les protéines produites pendant une infection virale (Schubert et al., 2000). Des transporteurs associés à la présentation de l'antigène (transporter associated with antigen processing ; TAP) acheminent ensuite ces peptides vers le RE (Reits et al., 2003), où ils sont sectionnés en peptides de plus petite taille par des aminopeptidases et chargés sur le CMHI (Saveanu et al., 2005). Pour finir, les complexes peptide-CMH quittent le RE via le golgi pour être présentés à la surface des cellules aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Figure 12).

Un lien entre la présentation endogène et la présentation exogène des peptides par le CMH est la présentation dite croisée (Schliehe et al., 2011). Elle consiste en l'exposition de peptides d'origine exogène par le CMHI aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Bevan, 1976). Les peptides sont générés par deux voies principales. D'abord, la voie cytosolique, où les protéines exogènes sont transloquées des endosomes vers le cytosol pour être dégradées par les protéasomes.

Ensuite, elles sont transférées au RE pour être chargée par le CMHI (Enders et al., 2020). Mais la voie la plus utilisée par les macrophages est la voie vacuolaire. Dans ce cas, les protéines exogènes sont directement fragmentées en peptides dans les endolysosomes par les protéases. Elles sont ensuite chargées sur le CMHI dans les mêmes compartiments endolysosomaux (Cruz-Leal et al., 2018).



**Figure 12. Étape de présentation antigénique par le CMH I et le CMH II.**

*Les peptides exogènes sont présentés aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> via le CMH II (à droite). Les peptides endogènes sont chargés sur le CMHI et présentés aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (à gauche). Le chargement des peptides exogènes sur le CMHI pour une présentation croisée se fait, soit dans le RE (en bas à gauche) ou dans les endolysosomes (non montré). D'après Roche and Cresswell, 2016.*

### III.3.3 Résolution de l'inflammation et la cicatrisation

Après ces épisodes inflammatoires prédominés par les macrophages pro-inflammatoires M1-like, le microenvironnement des tissus lésés confère aux macrophages des signaux afin de résorber l'inflammation, réparer les tissus et rétablir l'homéostasie. En effet, l'ingestion de cellules apoptotiques par les macrophages, appelée aussi efférocytose (Yanagihashi et al., 2017), les sécrétions des cellules Tregs (Arpaia et al., 2015) et la stimulation des cellules Th2

sur le site de blessure (stérile ou lors d'infections) induisent la production d'IL-4, d'IL-10 et des glucocorticoïdes, conduisant au passage des macrophages avec un phénotype M1-like aux macrophages avec un phénotype M2-like sur le site de la plaie. Les macrophages M2-like activent l'expression de gènes ayant des fonctions pro-résolutives dans les tissus inflammatoires. Ils sécrètent d'abord des molécules anti-inflammatoires comme l'IL-10, l'arginase et le TGF $\beta$ , les résolvines et les protectines, qui augmentent par exemple l'ingestion de cellules apoptotiques (Schwab et al., 2007; Serhan, Chiang, and Van Dyke, 2008). Ensuite, ils produisent des facteurs responsables de la cicatrisation des tissus notamment les facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF et les MMPs bénéfiques. Enfin, Ils assurent le dépôt de la MEC pour régénérer et remodeler les tissus. Pour ce faire, ils produisent soit directement des composants de la MEC, comme la fibronectine, ou indirectement en stimulant la fabrication du collagène par les fibroblastes par exemple (Shearer et al., 1997; Song et al., 2000; Gratchev et al., 2001; Ramachandran et al., 2012).

Durant mes travaux de thèse, j'ai étudié l'effet des neutrophiles et des NETs sur les macrophages. Ces recherches s'inscrivaient dans un contexte physiologique mais également dans le cadre d'une maladie auto-immune, la polyarthrite rhumatoïde (PR). En effet, comme nous le verrons dans le prochain chapitre, les neutrophiles et les macrophages jouent un rôle essentiel dans la physiopathologie de la PR.

## **IV. Polyarthrite rhumatoïde**

### **IV.1 Introduction et étiologie de la polyarthrite rhumatoïde (PR)**

Historiquement appelée l'arthrite déformante ou encore goutte rhumatismale, la PR nommée par Alfred Baring Garrod (GARROD, 1876) est une pathologie inflammatoire chronique et auto-immune. Elle est caractérisée par un système immunitaire inné et adaptatif défaillant, une présence accrue d'auto-anticorps notamment les anticorps anti-protéines citrullinées (anti-citrullinated protein antibodies ; ACPA), le facteur rhumatoïde (rheumatoid factor ; RF) et récemment les anticorps anti-protéines carbamylées (anti-carbamylated protein ; anti-CarP) (Shi et al., 2014). Les ACPA sont des marqueurs de la maladie comme je le



détaillera plus loin. Ils sont utiles pour le diagnostic de la PR. Cependant, il existe également des PR négatives aux ACPA.

La PR touche essentiellement les articulations périphériques. Elle provoque des douleurs articulaires, une hyperplasie synoviale suivie de la destruction du cartilage et de l'os (Figure 13). Elle peut également comporter des atteintes extra articulaires et des comorbidités (Aviña-Zubieta et al., 2008). La prévalence de la PR est généralement de 0,5 à 1% de la population mondiale adulte globale. Mais, la distribution géographique et ethnique de la PR est très variable. Les taux d'incidence peuvent être très élevés et atteindre jusqu'à 5% chez certaines populations, comme les amérindiens (Peschken and Esdaile, 1999). Ils peuvent aussi être très faibles, de l'ordre de 0,3% dans l'europe du sud (Guillemin et al., 2005). La PR affecte 3 fois plus de femmes que d'hommes, soulignant le rôle des hormones sexuelles dans cette maladie et elle survient surtout après l'âge de 40 ans (Luckey, Medina, and Taneja, 2012).

La PR est d'étiologie inconnue. Cependant, de multiples facteurs favorisant son apparition sont mis en évidence, dont les facteurs génétiques et épigénétiques, le tabac, les facteurs hormonaux et infectieux.

#### **IV.1.1 Prédispositions génétiques et épigénétiques**

Les prédispositions génétiques représentent les facteurs de susceptibilité majeurs de la PR, puisqu'ils augmentent d'environ 60% le risque d'être atteint de cette pathologie (MacGregor et al., 2000; Woude et al., 2009). Ils se traduisent par la présence de mutations génétiques au niveau de certains locus spécifiques aux patients atteints de PR ou partagés avec d'autres pathologies (Remmers et al., 2007; Eyre et al., 2012; Okada et al., 2014).

Les mutations au niveau des locus du CMH II (ou HLA chez l'homme) sont les plus importantes. Elles sont corrélées à la présence d'ACPA, à la gravité de la PR ainsi qu'à la réponse aux traitements (Hill et al., 2008; Viatte et al., 2015). Dans les années 1970, il a été montré qu'il existait plusieurs haplotypes ou versions de HLA-DR1, HLA-DR4 et HLA-DR10 qui sont associés à la PR (Stastny, 1978). Quelques années plus tard, Gregersen et son équipe ont proposé une théorie selon laquelle il existerait des épitopes partagés appelés SE pour shared epitope au niveau des HLA, qui sont fortement associés à un risque de PR (Gregersen, Silver, and Winchester, 1987).

Les SE sont définis comme une suite de cinq acides aminés (QKRAA, QRRAA ou RRRAA en positions 70-74). Ils codent pour une boucle appelée P4 qui se situe dans le site de liaison de l'antigène, au niveau de la chaîne  $\beta$ 1 du CMH sur les allèles HLA-DRB1\*01 : 01, HLA-DRB1\*01 : 02, HLA-DRB1\*04 : 01, HLA-DRB1\*04 : 04, HLADRB1\*04 : 05, HLA-DRB1\*04 : 08, HLA-DRB1\*14 : 02, HLA-DRB1\*10 : 01 (Gregersen, Silver, and Winchester, 1987; Hammer et al., 1995). Cette boucle est chargée positivement et favorise particulièrement le développement de PR ACPA<sup>+</sup>, potentiellement, en augmentant la présentation des peptides citrullinés, qui sont ensuite une source d'auto-antigènes reconnus par les ACPA. En effet, les peptides citrullinés se fixeraient de manière plus forte avec la boucle P4 par rapport aux peptides natifs et activent le système immunitaire adaptatif (Hill et al., 2003; Scally et al., 2013; Ting et al., 2018). Cependant, cette théorie est contestée. En effet, plusieurs études montrent que de nombreux types de peptides citrullinés, tels que les peptides citrullinés du fibrinogène ne se lient pas préférentiellement à des molécules HLA-DR positives en SE (Auger et al., 2005; Sidney et al., 2017; Balandraud, Auger, and Roudier, 2021). Roudier et al proposent alors une nouvelle théorie selon laquelle PAD4, une enzyme impliquée fortement dans la PR en convertissant les résidus arginines des peptides en résidus citrullines, serait reconnue par les molécules HLA-DR et déclencherait la production d'IgGs anti-PAD et d'anticorps IgGs contre tout substrat citrulliné par la PAD (Roudier, Balandraud, and Auger, 2018). Cette théorie est soutenue par le fait que l'immunisation avec PAD des souris CH3 contenant des allèles homologues à HLA-DRB1\*04 : 01 induit la production d'ACPA (Arnoux et al., 2017). De plus, le risque de développer une PR ACPA<sup>+</sup> est corrélé à la capacité de liaison des peptides PAD4 sur les motifs SE d'HLA-DR (Balandraud, Auger, and Roudier, 2021). Tout ceci vient soutenir l'association du HLA-DR à la présence d'ACPA et à la physiopathologie de la PR. Par ailleurs, d'autres poches qui ne portent pas de motif SE augmentent la liaison des peptides arthritogéniques citrullinés au HLA (Kampstra et al., 2016), ce qui montre que la théorie HLA-SE et risque de PR serait plus complexe que l'hypothèse d'origine.

D'autres facteurs génétiques prédisposent les individus à la PR mais de manière moins importante. Ils ont été découverts notamment grâce à des études d'associations pangénomiques, utilisant plusieurs cohortes, des méta-analyses et combinant tout ceci, dans certains cas à des études fonctionnelles (Cornélis et al., 1998; MacKay et al., 2002; Stahl et al., 2010; Eyre et al., 2012; Okada et al., 2012). Deux d'entre eux ont montré un effet sur la génération d'ACPA dans la PR. PAD4 et la protéine tyrosine phosphatase non-récepteur de type 22 (protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 ; PTPN22). Il a été montré qu'un haplotype de PAD4 est

associé à une susceptibilité accrue à la PR et aux niveaux en ACPA retrouvés dans les sérums des patients atteints de cette maladie (Suzuki et al., 2003). De plus, une méta analyse (Hou et al., 2013) conforte d'autres travaux (Barton et al., 2004; Caponi et al., 2005) et démontre que le polymorphisme de PAD4 rendrait sensible à la PR, essentiellement les personnes d'origine asiatique.

PTPN12 quant à elle est une enzyme qui déphosphoryle les kinases de la famille Src. Elle intervient dans plusieurs processus cellulaires, dont l'inhibition de la signalisation du TCR. Récemment, il a été montré que cette enzyme se lie aussi à PAD4 indépendamment de son activité de phosphatase. Cette liaison induit l'inhibition de l'activité de citrullination de PAD4 (Chang et al., 2015). Une variation du gène qui code pour la PTPN22 est associée à la PR (Begovich et al., 2004) et ce polymorphisme conduit à la synthèse d'une protéine PTPN22 déficiente, qui ne se lie plus à PAD4. Ceci conduit à une hypercitrullination des peptides (Chang et al., 2015), qui pourrait jouer un rôle important dans la pathogenèse de la PR.

Une centaine d'autres facteurs génétiques de risque sont identifiés dans la PR. Ils jouent souvent un rôle dans le système immunitaire opérant lors de cette maladie. Je cite comme exemple les récepteurs TNFR2 (Barton et al., 2001) et IL-6R (Ferreira et al., 2013), le récepteur inhibiteur des molécules de costimulation antigène 4 du lymphocyte cytotoxique T (protéine T-lymphocyte-associée cytotoxique 4 ; CTLA-4) (Plenge et al., 2005), les transducteurs de signaux STAT4 (Remmers et al., 2007). Enfin, des variants dans la région des gènes C1q sont aussi des facteurs de risque (Trouw et al., 2013).

Les modifications épigénétiques, telles que la méthylation, s'associent à d'autres facteurs génétiques et peuvent représenter aussi un risque ou une conséquence dans la PR. Plusieurs études le démontrent. En effet, le facteur de risque génétique majeur de cette pathologie (HLA-DR) présente plusieurs régions où la méthylation est différente entre les donneurs sains et les patients atteints de PR (Liu et al., 2013). De plus, le statut de méthylation peut contribuer directement à la physiopathologie de la PR, puisque l'hyperméthylation, mais surtout l'hypométhylation de plus de 1000 locus des fibroblastes synoviaux (fibroblast-like synoviocyte ; FLS) induit leur altération, les impliquant dans l'inflammation et les désordres qui sont produits lors de la PR (Nakano et al., 2013; Frank-Bertoncelj et al., 2017). En plus des fibroblastes, les lymphocytes T régulateurs (regulatory T cells ; Tregs) également subissent une méthylation au sein du promoteur du gène CTLA-4 conduisant à son inhibition et l'inactivation de leur effet immunomodulateur dans la PR (Cribbs et al., 2014). Pour finir, les facteurs

génétiques et épigénétiques sont capables de s'allier avec des facteurs à risques environnementaux comme le tabagisme. En effet, par exemple, la cigarette est associée à l'hypométhylation de certaines régions promotrices et plusieurs gènes qui sont impliqués fortement dans la physiopathologie de PR (Svendsen et al., 2016).

Les facteurs génétiques et épigénétiques ne sont pas les seuls facteurs de susceptibilité à la PR. En effet, la PR semble impliquer aussi des facteurs environnementaux, hormonaux et infectieux que nous décrirons ci-dessous.

#### **IV.1.2 Les risques environnementaux**

Le tabagisme constitue un facteur de susceptibilité à la PR chez les deux sexes (Silman, Newman, and MacGregor, 1996; Stolt et al., 2003). Il est le facteur environnemental le plus important et il agit de façon dose dépendante, avec un pic chez les personnes qui fument depuis plus de 20 ans (Källberg et al., 2011). Les fumées de cigarette renforcent uniquement la susceptibilité à la PR séropositive pour les RF (Padyukov et al., 2004) et les ACPA (Klareskog et al., 2006; Pedersen et al., 2006). Elles accroissent ce risque de 20 fois en s'associant aux facteurs génétiques classiques comme le motif SE de HLA-DR (Klareskog et al., 2006). En effet, le tabagisme augmente le risque de PR selon le statut génotypique des patients (Källberg et al., 2011), avec une prévalence élevée constatée chez les fumeurs qui expriment une double copie du HLA-SE (Karlson et al., 2010).

Les fumées de cigarettes sont impliquées dans la pathogenèse de la PR de plusieurs manières. D'abord, elles augmentent chez les patients PR les niveaux de cytokines pro inflammatoires (Sokolove et al., 2016). Elles activent le système immunitaire qui produit des taux élevés de RF (Tuomi et al., 1990; Jónsson, Thorsteinsson, and Valdimarsson, 1998) et d'ACPA (Bidkar et al., 2016). En lien avec les auto-anticorps, elles amplifient par exemple la réponse à l'autoantigène vimentine citrullinée chez les souris exprimant le motif SE, notamment en augmentant la production de PAD responsable de leur citrullination et en stimulant le système immunitaire inné et adaptatif (Bidkar et al., 2016). La nicotine exacerbe aussi la production de NETs chez des modèles murins de PR (Lee et al., 2017). Enfin, le tabac modifie le statut de méthylation de certains gènes responsables de l'inflammation lors de la PR (Svendsen et al., 2016).

Tenant compte de tous ces résultats, une hypothèse propose que le tabac pourrait être à l'origine du développement de la PR en initiant la production d'auto-anticorps dans les poumons. En effet, les ACPA sont d'abord détectés dans les expectorations avant la propagation de l'épitope et leur détection dans le sérum de patients PR (Willis et al., 2013) et de manière intéressante, l'inhalation de fumée chez un modèle murin augmente la production de PAD et la citrullination dans les poumons ainsi que la production d'auto-anticorps (Bidkar et al., 2016). Néanmoins, la cigarette accroît aussi la sévérité de la maladie une fois installée, puisque les fumeurs atteints de PR ont une activité de la maladie plus élevée (Sokolove et al., 2016). Cette constatation est soutenue par des travaux scientifiques qui montrent que le tabac stimule les FLS de patients PR à détruire la matrice extracellulaire et à produire des réponses pro-inflammatoires (Engler et al., 2014). De plus, les fumées de cigarettes augmentent les atteintes articulaires chez l'humain (Sparks et al., 2016) et accentuent la sévérité des arthrites dans des modèles murins de PR (Lee et al., 2017).

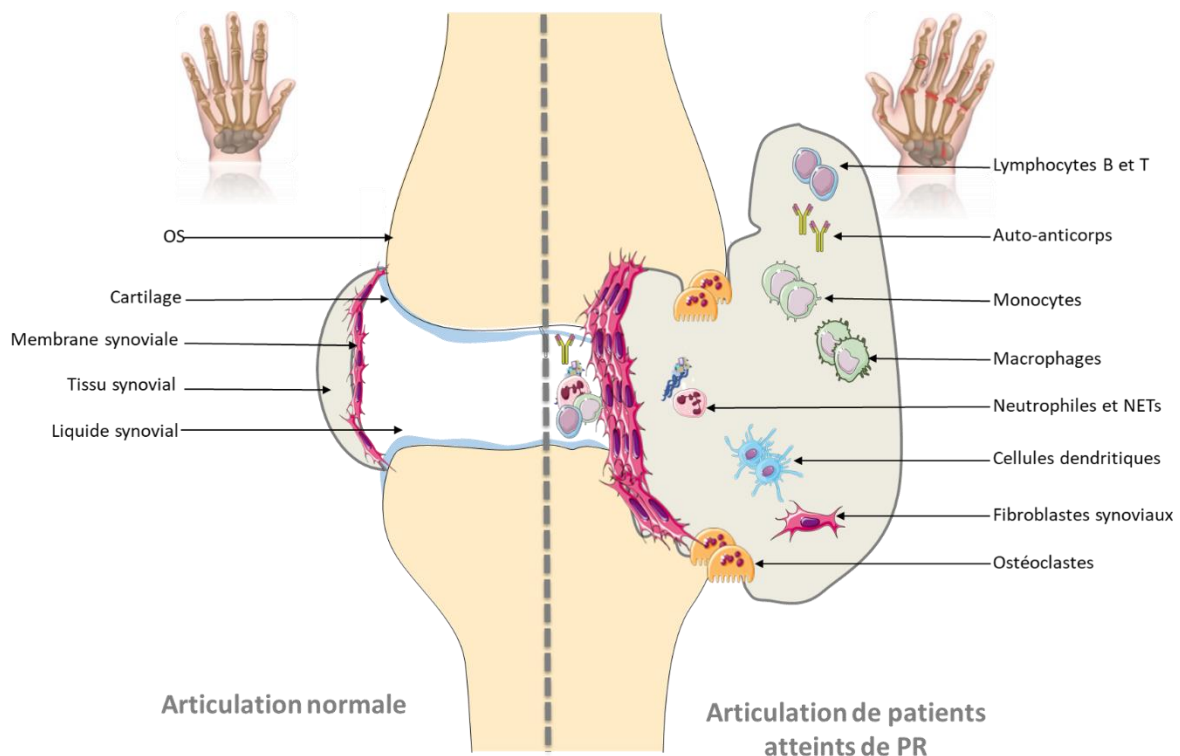
La cigarette augmente donc le risque de la PR. Elle amplifie aussi la sévérité de la maladie. En effet, de manière intéressante, les effets négatifs observés pourraient être améliorés par l'arrêt de la consommation du tabac (Di Giuseppe et al., 2013). Il est important de noter que cela ne s'applique pas à toutes les PR, puisque la présence du motif SE et le facteur environnemental tabac n'expliquent pas l'origine des PR négative aux ACPA et aux RF (Stolt et al., 2003; Padyukov et al., 2004; Klareskog et al., 2006).

La PR est donc multifactorielle. Sa survenue peut être stimulée par plusieurs autres causes que celles citées précédemment. De nombreuses infections augmentent l'incidence de la PR. Celle qui suscite le plus d'intérêt est l'infection parodontale par *P. gingivalis*. En effet, la parodontite causée par cette bactérie orale est associée à la susceptibilité d'être atteint de PR (Chen et al., 2013). *P. gingivalis* agirait grâce à sa capacité à citrulliner les protéines par l'intermédiaire de ses propres PADs. Les antigènes citrullinés seraient ensuite une source d'auto-anticorps dans la PR (Wegner et al., 2010).

L'action des hormones vient également s'ajouter aux risques environnementaux, génétiques et épigénétique de la PR (Sparks et al., 2014). En effet, les femmes sont plus exposées à un risque de PR que les hommes (Crowson et al., 2011) et elles présentent des symptômes plus sévères (Sokka et al., 2009). L'augmentation de la prévalence de la PR chez les femmes est surtout attribuée aux effets inflammatoires et auto-immuns de l'œstrogène (Cutolo et al., 2006; Alpízar-Rodríguez et al., 2017). Toutefois, le rôle exact de cette hormone

dans la PR n'est pas élucidé et parfois même controversé, vu que les femmes après la ménopause possèdent moins d'œstrogènes mais présentent plus de risques d'être atteintes de PR (Bengtsson et al., 2017). Enfin, l'inhalation de certains composants est associée à un risque accru de PR. C'est le cas lors de l'exposition à la silice (Stolt et al., 2005), à la pollution (Hart et al., 2009) ou encore au textile (Too et al., 2016). L'ensemble de ces facteurs et bien d'autres favorisent le risque d'être atteint de cette pathologie auto-immune et inflammatoire dont la physiopathologie est complexe et fait intervenir le système immunitaire inné et adaptatif.

## IV.2 Physiopathologie de la PR



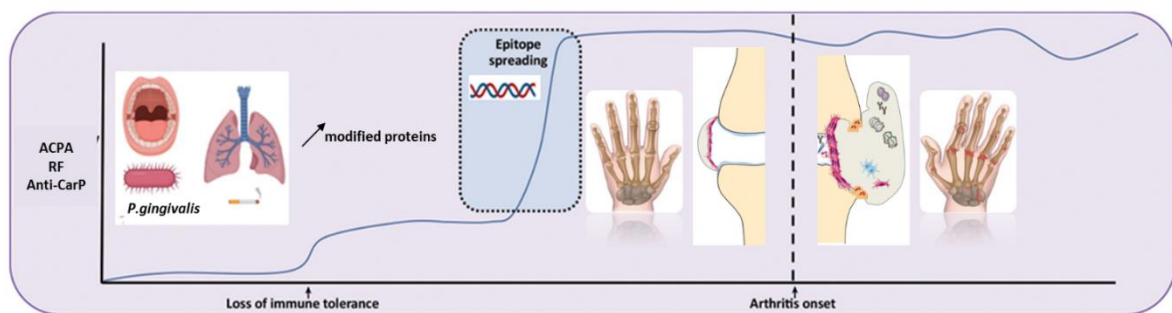
**Figure 13. Structure d'une articulation normale et d'une articulation arthritique.**

Dans une articulation saine (à gauche), l'os est recouvert de cartilage qui permet le mouvement des articulations. Le cartilage baigne dans un liquide articulaire qui permet la lubrification de l'articulation et l'ensemble de ces structures est entouré de chaque côté par la membrane synoviale. Chez les patients arthritiques (à droite), il y a une multiplication des synoviocytes qui cause une hyperplasie de la membrane synoviale et la formation d'un pannus inflammatoire. Le tissu synovial est infiltré par des cellules immunitaires qui induisent une inflammation. Les ostéoclastes sont activés et dégradent le cartilage et l'os. Nous observons également un recrutement de cellules immunitaires dans le liquide synovial, notamment les neutrophiles.

La membrane synoviale d'une articulation normale tapisse l'intérieur de la capsule articulaire. Elle est composée de deux couches. Elle est vascularisée et innervée. La membrane synoviale est fine et formée principalement de synoviocytes macrophagiques qui ont entre autres un rôle dans l'élimination des débris de l'articulation et des synoviocytes fibroblastiques qui produisent du liquide articulaire afin de lubrifier les articulations. Dans la PR, les FLS se multiplient et forment un pannus inflammatoire. Il y a également une angiogenèse importante et de nombreuses cellules qui jouent un rôle clé dans l'induction de l'inflammation infiltrent le tissu synovial comme le montre l'étude de Zhang *et al.* En effet, cette équipe a déterminé sur des biopsies de tissu synovial de patients PR la présence de 18 populations, dont, les

fibroblastes, les monocytes pro-inflammatoires, les cellules B associées à l'auto-immunité, des cellules T auxiliaires périphériques et folliculaires et des cellules T CD8 (Zhang et al., 2019).

Plusieurs années avant l'apparition des premiers signes cliniques, différents isotypes d'auto-anticorps (IgM, IgG et IgA) sont détectés dans le sérum des patients atteints de PR (Rantapää-Dahlqvist et al., 2003; Verpoort et al., 2006). En effet, dans la PR, deux phases se distinguent. La première est asymptomatique. Elle se caractérise par la production d'auto-anticorps, notamment, les RF et les auto-anticorps dirigés contre les protéines modifiées (anti-modified protein antibodies ; AMPAs) (Nielen et al., 2004). La deuxième phase est symptomatique et présente une inflammation et des atteintes articulaires et extra-articulaires (Figure 14).



**Figure 14. Phases de la PR.**

*La phase asymptomatique (à gauche) : les facteurs de risque, notamment le tabac et les infections parodontales favorisent la formation de peptides modifiés post-traductionnellement. Les porteurs de l'épitope partagé présentent efficacement ces peptides modifiés via leur CMH II et induisent la formation d'auto-anticorps. Phase symptomatique (à droite) : elle commence parfois des années plus tard. Les auto-anticorps forment des complexes immuns et induisent le recrutement et l'activation de cellules immunitaires dans l'articulation, l'exacerbation de l'inflammation et la destruction de l'articulation. Adapté de (O'Neil and Kaplan, 2019)*

#### **IV.2.1 Les lymphocytes B et la production d'auto-anticorps dans la PR**

Durant les phases pré-cliniques, des lymphocytes B auto-réactifs se développent. Ils sont recrutés au niveau du synovium (Nanki et al., 2009), où ils reconnaissent des auto-antigènes. Cela induit non seulement l'activation des lymphocytes T mais aussi l'expansion des B et leur différenciation en plasmocytes capables de produire des auto-anticorps et des cytokines pro-inflammatoires (Takemura et al., 2001; O'Neill et al., 2005; Szodoray et al., 2006). De plus, les cellules B autoréactives dans la PR sont résistantes à l'apoptose ce qui les rend persistantes (Rapetti et al., 2015).



La production d'auto-anticorps par les lymphocytes B représente une des caractéristiques principales des patients PR. Les auto-anticorps ACPA et RF produits par les lymphocytes B sont utilisés comme biomarqueurs pour le diagnostic de la PR (Aletaha et al., 2010).

Les ACPA sont les auto-anticorps les plus spécifiques de la PR. Ils sont présents chez environ 70% des patients (Schellekens et al., 1998). Leur taux est associé au développement de la PR au phénotype érosif (Huizinga et al., 2005; Bos et al., 2010). Les ACPA reconnaissent des peptides citrullinés qui représentent un déterminant antigénique majeur de l'apparition de la PR (Schellekens et al., 1998). De plus, la PAD responsable de la citrullination des auto-antigènes est libérée et elle est active dans le liquide synovial de patients (Spengler et al., 2015).

Une fois induits, les ACPA jouent un rôle important dans la pathogenèse de cette maladie. D'abord, ils forment des complexes immuns avec un large spectre de peptides citrullinés dans la synovie de patients PR (Vincent et al., 2005), comme le fibrinogène (Takizawa et al., 2006), l'énolase (Lundberg et al., 2008), la vimentine (Vossenaar et al., 2004) ou encore le collagène II (Uysal et al., 2009). Ensuite, ces complexes immuns se lient aux FcRs et activent le système immunitaire. En effet, ils induisent la sécrétion de TNF $\alpha$  par les macrophages (Clavel et al., 2008) et la production des NETs par les neutrophiles (Aleyd et al., 2016). De plus, ils stimulent la cascade du complément via la voie classique et la voie alternative et libèrent des facteurs chimiotactiques (Trouw et al., 2009). Les ACPA potentialisent également directement l'érosion articulaire dans la PR. En effet, les ostéoclastes responsables de la destruction osseuse expriment des peptides citrullinés. Les ACPA reconnaissent ces peptides et activent fortement les ostéoclastes (Harre et al., 2012).

Le RF représente le deuxième type d'auto-anticorps clé dans la PR. Il n'est pas spécifique à la PR. Néanmoins, il est exprimé chez environ 50% des patients atteints de cette pathologie. De plus, comme pour les ACPA, leur taux est corrélé à la sévérité de la PR mais aussi à l'augmentation de la mortalité due à cette maladie (Williams and Kunkel, 1962; Ajeganova et al., 2016).

Le RF a été le premier type d'auto-anticorps détecté dans la PR en 1958 (Edelman, Kunkel, and Franklin, 1958). Ils reconnaissent la partie Fc des IgGs (Edelman, Kunkel, and Franklin, 1958; Maibom-Thomsen et al., 2019). Les RFs ciblent principalement les complexes immuns contenant des ACPA. Une fois liés, ils potentialisent la sécrétion de cytokines pro-

inflammatoires, notamment par les macrophages (Sokolove et al., 2014) et ils sont aussi capables d'activer le système du complément (Tanimoto et al., 1975).

Un autre facteur de diagnostic supplémentaire de la PR découvert plus récemment est l'anti-CarP) (Shi et al., 2011). Ces auto-anticorps reconnaissent la carbamylation, une modification post-traductionnelle des peptides qui consiste en la conversion des résidus lysines en homocitrullines par un composant non enzymatique, le cyanate. Ils sont présents chez environ 40% des patients atteints de PR (Jiang et al., 2014). Comme pour les ACPA et le RF, les anti-CarP sont détectables des années avant l'apparition des signes cliniques de la PR et leur taux augmente avec la progression de la maladie (Shi et al., 2014; Gan et al., 2015). Ils permettent notamment de prédire la PR négative à l'ACPA et ils sont associés à une arthrite érosive (Ajeganova et al., 2017). Ils reconnaissent plusieurs auto-antigènes carbamylés comme le fibrinogène, la vimentine, l'énolase et le collagène (Turunen et al., 2015; Juarez et al., 2016; Reed et al., 2016) mais leur rôle dans l'induction de l'inflammation dans la PR n'est pas encore établi.

D'autres auto-anticorps contre des protéines modifiées sont couramment observés dans cette pathologie. Par exemple, les auto-anticorps anti-région charnière, qui reconnaissent la partie variable des IgGs clivées par les protéases présentes dans l'environnement inflammatoire de patients atteints de PR (Mellbye and Natvig, 1971; Ryan et al., 2008), ou encore des auto-anticorps contre les protéines acétylées, une modification post-traductionnelle qui consiste en l'ajout de groupements acétyles aux résidus lysine (Juarez et al., 2016).

Les auto-anticorps présents chez les patients atteints de PR, plus particulièrement les ACPA et le RF activent la cascade du complément dans la cavité synoviale. Puis, les composants du complément recrutent les cellules immunitaires dans l'articulation atteinte et amplifient la réponse immune, en agissant comme des chimioattractants. C'est notamment le cas pour la population la plus abondante dans l'articulation des patients atteints de PR, les neutrophiles (Jose et al., 1990).

#### **IV.2.2 Les neutrophiles et les NETs dans la PR**

Les neutrophiles représentent jusqu'à 90% des leucocytes recrutés au niveau du liquide articulaire et le tissu synovial dans la PR (Norberg, Bjelle, and Eriksson, 1983). De plus, leur

apoptose est retardée par l'environnement oxydatif présent dans l'articulation, induisant leur persistance et toutes les conséquences inflammatoires qui en découlent (Cross et al., 2006).

Le rôle des neutrophiles dans l'évolution de la PR est la conséquence de leur activation par les auto-anticorps présents lors de la première phase de cette pathologie (Robinson et al., 1994). Ils déclenchent alors un profil pro-inflammatoire qui se traduit par l'expression des récepteurs aux chimiokines qui augmentent leur recrutement dans l'articulation (Talbot et al., 2015), la sécrétion de ROS qui sont hautement cytotoxiques (Gorlino et al., 2018) et l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme le  $TNF\alpha$  ou le facteur de transcription  $NF-\kappa B$ , régulateur majeur de la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires (Wright et al., 2011).

Les neutrophiles stimulent aussi d'autres cellules emblématiques de cette pathologie. En effet, ils expriment le CMH II (Cross et al., 2003). Nous pouvons alors supposer qu'ils présentent les auto-antigènes aux cellules immunitaires adaptatives afin de les activer. De plus, ils sécrètent directement le facteur d'activation des cellules B (Assi et al., 2007) et le récepteur activateur du ligand du facteur nucléaire kappa b (nuclear factor kappa b ligand ; NF-kappa B-ligand ; RANKL), qui a pour fonction d'activer les ostéoclastes et de provoquer la perte osseuse dans la PR (Chakravarti et al., 2009; Yeo et al., 2011).

En lien avec les dommages osseux, les complexes immuns formés déclenchent également la dégranulation des neutrophiles (Fossati et al., 2002) et libèrent des protéases, qui provoquent la destruction articulaire (Adkison et al., 2002). C'est le cas des élastases et des collagénases neutrophilaires qui coopèrent ensemble pour dégrader le cartilage dans la PR (Baici et al., 1982), ou encore de la MMP8 et la MMP9 qui sectionnent le collagène de la MEC (Van den Steen et al., 2000). La dégranulation augmente aussi l'inflammation dans la PR. En effet, les protéines granulaires comme les CG, les NE et les protéinases clivent et induisent des formes actives d'interleukines pro-inflammatoires IL-8 (Padrines et al., 1994). La MPO quant à elle diminue l'apoptose des neutrophiles. Parallèlement, elle augmente la perméabilité des vaisseaux sanguins et facilite le recrutement de nouveaux neutrophiles via des interactions électrostatiques au niveau des sites inflammatoires (Eiserich et al., 2002; Klinke et al., 2011).

Concernant leur rôle majeur dans la pathogenèse de la PR, les neutrophiles sont considérés comme pouvant induire des ACPA en produisant des auto-antigènes citrullinés. Deux mécanismes sont utilisés pour la production de protéines citrullinées. Le premier est une

citrullination exagérée de plusieurs protéines (hypercitrullination). L'hypercitrullination est induite après la mort des neutrophiles via la LTH (Romero et al., 2013). Le second mécanisme est par une citrullination modérée de peptides après formation de NETs, suivant le stimulus.

Les NETs jouent des fonctions clés dans la PR. D'abord, ils sont présents et persistants lors de cette pathologie. Ils sont détectés dans la circulation sanguine et dans le liquide synovial des patients atteints de PR. Ils infiltrent également les nodules rhumatoïdes et la peau (Khandpur et al., 2013). Leur sécrétion par les neutrophiles est spontanée et leurs taux est supérieur à celui des sujets sains ou à celui des patients atteints d'autres maladies inflammatoires comme l'arthrose (Khandpur et al., 2013; Pérez-Sánchez et al., 2017). De plus, les neutrophiles de patients atteints de PR stimulés avec le PMA ou le LPS produisent de façon plus importante les NETs que les neutrophiles de sujets sains (Ribon et al., 2019). Il est à noter que l'activité de la DNase I essentielle à la dégradation des NETs est très faible chez ces patients (Pérez-Sánchez et al., 2017). Toutes ces observations montrent le maintien des NETs dans la PR suggérant ainsi leur implication. En effet, le taux des NETs dans la PR est associé à celui des RF (Wang, Peng, and Ning, 2018), des ACPA et de marqueurs inflammatoires de la PR (Khandpur et al., 2013). Ils sont également corrélés aux paramètres cliniques de la pathologie, tels que l'activité de la maladie mais aussi au statut oxydatif et auto-immun (Pérez-Sánchez et al., 2017). Enfin, les thérapies anti-TNF $\alpha$  et anti-IL-6R chez les patients atteints de PR diminuent la production de NETs et réduisent leur profil inflammatoire (Pérez-Sánchez et al., 2017).

Pour expliquer l'induction et le maintien des NETs dans la PR, il est d'abord important de savoir que la production de NETs peut être induite par les facteurs à risque de la PR, notamment, le tabagisme et les infections parodontales. Concernant le tabac, il a été montré que la nicotine induit la sécrétion de NETs et ce de façon dépendante de PAD4 (Hosseinzadeh et al., 2016). Ces NETs pourraient ensuite être à l'origine de la production d'ACPA dans le poumon de patients PR. En effet, l'augmentation des niveaux de NETs dans les expectorations est corrélée à la réactivité des ACPA chez les patients atteints de PR (Demoruelle et al., 2018). Pour les infections parodontales, il a été montré que la bactérie *P. gingivalis* stimule la formation de NETs *in vitro* (Delbosc et al., 2011). De plus, la présence de cette bactérie est associée aux niveaux d'ACPA dans la PR (Mikuls et al., 2014), ce qui laisse supposer que les NETs induits par cette infection pourraient être également inducteurs d'ACPA dans la PR.

Les NETs sont également induits par les auto-anticorps de patients atteints d'arthrite. En effet, les neutrophiles produisent des NETs en présence de liquides synoviaux ou de sera de patients PR à haute teneur en ACPA ou en RF. Par ailleurs, en présence de liquides synoviaux et de sera de sujets sains ou de patients atteints d'autres pathologies telles que l'arthrose, les NETs sont peu ou pas induits (Khandpur et al., 2013; Gorlino et al., 2018). La même observation a été faite en présence des IgGs et des IgMs purifiés de liquides synoviaux ou de sera de patients arthritiques positifs en ACPA et/ou RF (Khandpur et al., 2013). En plus du contexte auto-immun, l'environnement inflammatoire de la PR favorise aussi la formation de NETs chez les patients arthritiques. C'est le cas des cytokines pro-inflammatoires emblématiques de cette pathologie, le TNF $\alpha$  et l'IL-17 (Khandpur et al., 2013).

Une fois qu'ils sont induits par les différents médiateurs cités plus haut, les NETs contribuent au développement de la PR. Ils favoriseraient la réponse auto-immune en exposant des auto-antigènes citrullinés qui seraient ensuite inducteurs d'ACPA. Cette hypothèse est confirmée par de nombreux travaux, notamment ceux de Kaplan et son équipe (Khandpur et al., 2013; Carmona-Rivera et al., 2017). En effet, les NETs sont chargés de protéines citrullinées à leur surface, telles que les vimentines (Khandpur et al., 2013), les histones (Wang et al., 2009; Pratesi et al., 2014), la MPO, la NE et bien d'autres protéines (Carmona-Rivera et al., 2017). De façon intéressante, les ACPA de patients PR interagissent avec les NETs (Ribon et al., 2019) et reconnaissent les protéines citrullinées présentées (Pratesi et al., 2014; Corsiero et al., 2016; Carmona-Rivera et al., 2017). Pour expliquer ce phénomène, Carmona-Rivera et al décrivent un processus par lequel les FLS internalisent les NETs de façon dépendante de l'axe du RAGE (receptor for advanced glycation endproducts) et du TLR9 endosomal. Une fois dans le cytoplasme des FLS, les peptides arthritogènes des NETs sont chargés sur le CMH II des FLS et présentés aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Conduisant alors à la stimulation d'une réponse immunitaire adaptative, à la production d'ACPA et à la destruction articulaire (Carmona-Rivera et al., 2017).

Les NETs externalisent aussi des antigènes carbamylés qui sont également source d'auto-anticorps dans la PR. Cette induction accentue la réponse immunitaire dans la PR et augmente la destruction osseuse (O'Neil et al., 2020).

Pour résumer, la production de NETs est stimulée par les inducteurs de la PR. Une fois sécrétés par les neutrophiles, ils exposent des protéines modifiées inductrices d'auto-anticorps. Cependant, les NETs n'ont pas comme seul rôle l'induction d'auto-anticorps dans la PR,

puisqu'ils présentent plusieurs enzymes à leur surface qui ont un impact considérable dans les lésions articulaires de la PR. C'est le cas de la NE qui dégrade directement les composants du cartilage dans la synovie et libère la PAD2 dans le milieu extracellulaire. La PAD2 va à son tour citrulliner les fragments de cartilages dégradés, qui seront internalisés par les FLS et présentés aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Les lymphocytes T stimulent ensuite les lymphocytes B pour produire des auto-anticorps anti-cartilage et les macrophages pour sécréter des cytokines pro-inflammatoires et stimuler les neutrophiles. Les neutrophiles activés produisent des NETs à nouveau, formant ainsi une boucle de production de NETs qui est critique pour la dégradation du cartilage chez les patients arthritiques (Carmona-Rivera et al., 2020).

Outre l'induction d'auto-anticorps et la stimulation de la destruction osseuse, les NETs augmentent la réponse pro-inflammatoire caractéristique de la PR. Ils favorisent la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8 et TNF), l'expression de marqueurs d'activation et la diminution de la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 sur les macrophages et les neutrophiles (Ribon et al., 2019). Ils activent également les fibroblastes synoviaux de patients arthritiques en induisant une sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires, mais également de chimiokines et de molécules d'adhésion (Khandpur et al., 2013).

Ainsi les NETs connectent l'immunité innée et l'immunité adaptative chez les patients PR et contribuent non seulement à la pathogenèse en induisant des ACPA mais également à la progression de la maladie en stimulant la dégradation osseuse et la réponse pro-inflammatoire.

Pour finir, la production de NETs peut être utilisée comme outil supplémentaire de diagnostic ou un moyen d'évaluation de l'efficacité thérapeutique dans la PR. C'est ce que proposent Pérez-Sánchez et al et Wang et al. Pérez-Sánchez soutient cette idée car il montre non seulement que la production de NETs est associée à la majorité des marqueurs caractéristiques de la PR, mais aussi que la production de NETs est corrélée négativement avec l'efficacité des thérapies anti-TNF $\alpha$  et anti-récepteur de IL-6 (Pérez-Sánchez et al., 2017). L'équipe de Wang quant à elle explique que les taux sériques d'ADN-MPO discriminent les patients atteints de PR des sujets non atteints (Wang, Peng, and Ning, 2018). Dernièrement, De Bont et al ont montré que les auto-anticorps anti-NETs (anti-NETs antibody ; ANETA) pouvaient être considérés aussi, entre-autres, comme des bio-marqueurs dans la PR, puisque, les ANETA sont détectés dans les sera de patients atteints de PR et qu'ils sont corrélés aux taux de RF (de Bont et al., 2020b). Cependant ils ne sont pas spécifiques de la PR, puisqu'ils sont retrouvés dans le LES.

### IV.2.3 Les macrophages dans la PR

Les macrophages sont d'autres cellules immunitaires qui médient de nombreux processus pathologiques de la PR. En effet, les macrophages infiltrant le tissu synovial augmentent considérablement en nombre dans la PR. De plus, ils s'accompagnent d'un profil pro-inflammatoire de type M1-like (De Rycke et al., 2005). La polarisation en macrophages M1-like est induite par l'environnement arthritogène de cette maladie, notamment par les ACPA (Zhu et al., 2015). Ainsi, l'activation accrue des macrophage M1-like dans la PR déséquilibre la balance de l'action des macrophages M1-like/M2-like et conduit à l'activation des ostéoclastes et à la destruction articulaire (Fukui et al., 2017). D'autant plus que les effets anti-inflammatoires observés par une activation alternative des macrophages sont largement réduits dans la PR, accentuant ainsi le contexte induit par l'activation des macrophages M1-like (Antoniv and Ivashkiv, 2006). Cette dernière étude montre en outre que les macrophages de patients PR ont une réponse altérée à l'IL-10 anti-inflammatoire.

Des résultats similaires ont été obtenus avec des macrophages non-polarisés (M0). Dans la PR ces macrophages ont également un profil pro-inflammatoire, en particulier en réponse à des complexes immuns contenant des ACPA (Clavel et al., 2016).

Les macrophages synoviaux sont d'abord de puissants sécréteurs de cytokines pro-inflammatoires caractéristiques de la PR. Ils sont les principaux producteurs du TNF $\alpha$ , la cytokine emblématique de la PR (Husby and Williams, 1988; Chu et al., 1991). Ils produisent aussi de IL-1 $\beta$  (Wood et al., 1992). L'IL-1 $\beta$  augmente l'expression du récepteur RAGE et tout le contexte inflammatoire induit par la liaison des ligands de ce récepteur, qui sont présents de façon accrue dans la PR, comme les Produits terminaux de glycation (advanced glycation end products ; AGEs) (Sunahori et al., 2006). Ils produisent aussi à moindre mesure de l'IL-6 qui intervient notamment dans la résorption osseuse (Tamura et al., 1993). Le facteur macrophage migration-inhibitory factor (MIF) est induit aussi par les macrophages du tissu synovial de la PR. Il active entre-autres la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-8 et TNF $\alpha$  et la métalloprotéinase MMP-2 (Pakozdi et al., 2006; Santos and Morand, 2006). Les MMPs sont responsables de la transformation et du remodelage de la MEC. Dans la PR les macrophages produisent des MMPs. Ils surexpriment aussi les facteurs PCGF C et D qui favorisent l'expression des MMPs, comme la collagénase (MMP-1) (Pohlers et al., 2006).

Les macrophages synoviaux sécrètent très peu de cytokine anti-inflammatoire IL-10 et diminuent en parallèle considérablement la réponse anti-inflammatoire induite par l'IL-10 renforçant les fonctions activatrices de type M1-like (Antoniv and Ivashkiv, 2006). Ils produisent aussi de l'IL-12, de l'IL-15 et de l'IL-18, en sachant que ces cytokines pro-inflammatoires peuvent aussi stimuler la production des chimiokines par les macrophages, comme le CCL2 (Yoo et al., 2005). En effet, les macrophages dans la PR produisent des niveaux élevés de chimiokines comme l'IL-8, le CCL2, le CCL3 et le CCL5 lesquels attirent les monocytes, les macrophages et les neutrophiles dans l'articulation enflammée, via leurs récepteurs CXCR1 et 2, CCR2, CCR1 et CCR5 respectivement (Koch et al., 1991, 1992; Koch, 2005). Ils sécrètent aussi les chimioattractants CCL18 et CXCL16 qui en se liant à leur récepteur sur les lymphocytes T, les attirent sur le site de l'inflammation (Nanki et al., 2005; van Lieshout et al., 2006). Ils produisent également CXCL1 et CXCL8 (IL-8) qui non seulement sont chimiotactiques pour les neutrophiles mais stimulent aussi l'angiogenèse (Szekanecz and Koch, 2007). Toutes ces chimiokines augmentent l'influx de cellules immunitaires qui exacerbent l'inflammation. Dans le même temps, les macrophages augmentent leur propre rétention dans l'articulation en exprimant des récepteurs aux chimiokines, comme le CCR1, le CCR2 et le CCR5 qui vont se lier aux chimiokines sécrétées par les macrophages eux-mêmes (Katschke et al., 2001). L'importance de ces chimiokines est telle dans la physiopathologie de la PR que le blocage des récepteurs aux chimiokines CCR1 dans un essai clinique améliore fortement les symptômes de la PR (Haringman et al., 2003).

Les récepteurs aux chimiokines exprimés par les macrophages synoviaux servent également de récepteurs à de nombreuses chimiokines qui ont un rôle pro-angiogénique comme la chimiokine CCL5 (Koch, 2005). L'angiogenèse promeut une inflammation chronique dans la PR, notamment en activant davantage les monocytes et les macrophages (Murakami et al., 2006). L'environnement hypoxique accentue l'angiogenèse via la stimulation de la production du VEGF par les macrophages. Tout en sachant que les macrophages se nichent généralement dans l'environnement hypoxique comme le tissu synovial. Ils entretiennent également cet environnement afin de se maintenir dans le tissu. Ils produisent le facteur induit par l'hypoxie (Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  ; HIF-1 $\alpha$ ) (Hollander et al., 2001) et de nombreux ROS et RNS (Murdoch, Muthana, and Lewis, 2005; Szekanecz, Gáspár, and Koch, 2005).

En plus de la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires et chimioattractants, les macrophages activent directement d'autres cellules immunitaires par le biais de contacts cellulaires. En effet, les macrophages sont des CPA professionnelles. Ils surexpriment HLA-

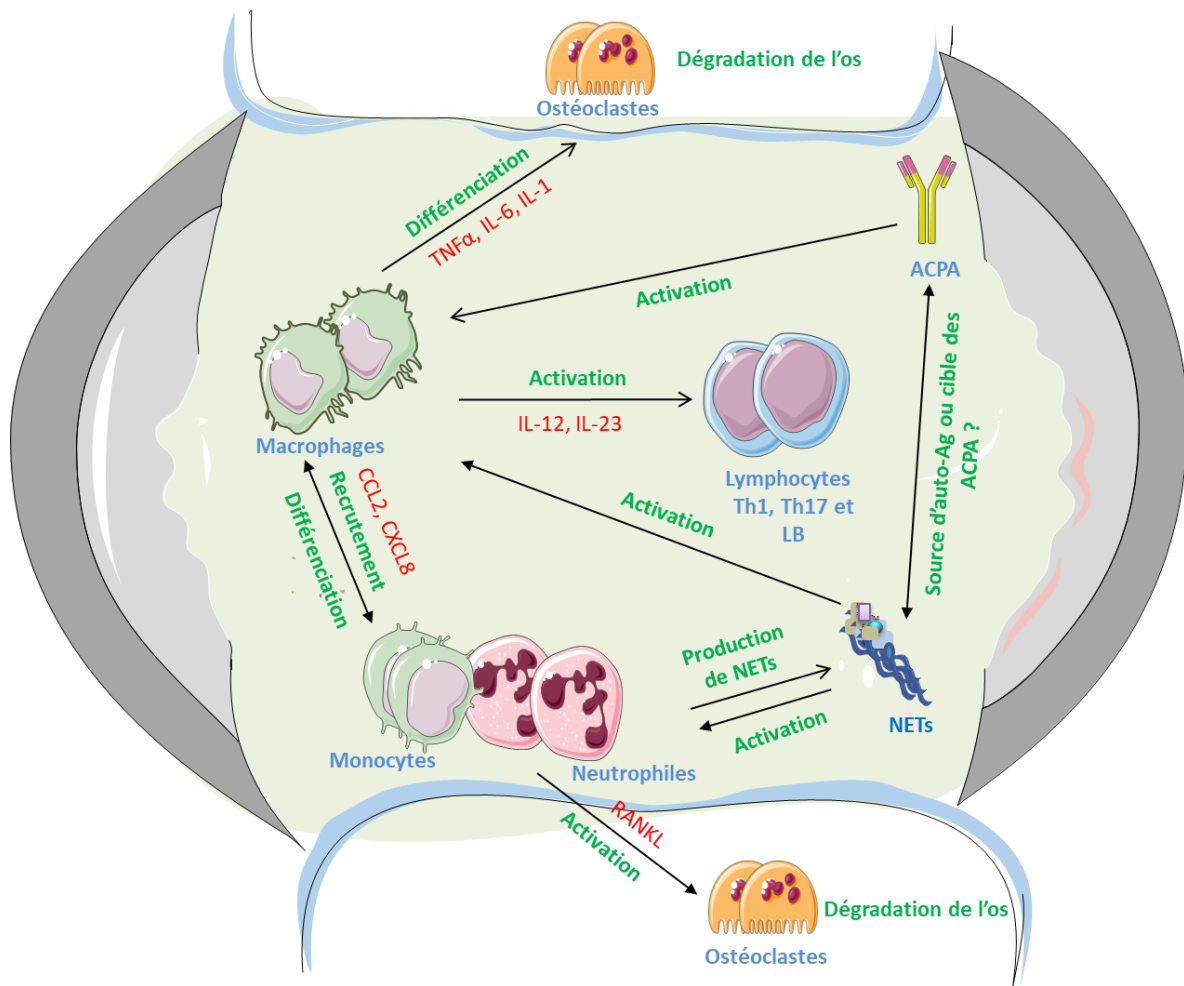


DR dans la PR (Janossy et al., 1981). Ils présentent ainsi les peptides arthritogènes aux lymphocytes T, conduisant, à l'activation des lymphocytes B qui produisent à leur tour des auto-anticorps, entretenant ainsi une boucle qui mène à l'inflammation et l'auto-immunité.

Comme décrit précédemment, les facteurs de croissance M-CSF et GM-CSF ont un rôle primordial dans la maturation des cellules myéloïdes. Les macrophages des tissus synoviaux produisent constitutivement le GM-CSF pendant que le M-CSF est produit par les monocytes. Cette fonction permet notamment le développement de nouvelles cellules immunitaires myéloïdes dans la PR.

Les macrophages contribuent aussi à la perte de l'intégrité de l'articulation. En effet, une nouvelle fonction des macrophages découverte récemment est altérée dans des modèles murins d'arthrites. Il s'agit de la formation de structures de « type-épithéliale » qui forment une barrière à la surface du cartilage et le protège du milieu extérieur (Culemann et al., 2019). Dans cette étude Culemann *et al.* ont identifié des sous-types de macrophages avec une composition et une origine différente dans le tissu synovial. Ils ont mis en évidence notamment un sous-type de macrophages positifs au CX3CR1 qui résident dans les tissus et qui se renouvellent à partir de cellules négatives au CX3CR1. Ces cellules présentent de nombreux marqueurs de cellules épithéliales et forment une barrière immunologique interne au niveau de la membrane synoviale et isolent physiquement l'articulation.

Enfin, les macrophages peuvent promouvoir la destruction articulaire directement dans la PR, puisqu'ils sont capables de se différencier en ostéoclastes matures responsables de la résorption osseuse (Adamopoulos et al., 2006). Ils produisent également des cytokines (TNF $\alpha$  et IL-1) qui activent la production de RANKL, qui est essentiel pour la différenciation ostéoclastique (Takayanagi et al., 2000).



**Figure 15. Neutrophiles et macrophages dans la PR.**

*Les macrophages présentent plusieurs rôles pro-inflammatoires. Ils induisent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires qui activent les lymphocytes B et T. Ils produisent des chimiokines qui recrutent d'autres cellules immunitaires et ils stimulent leur propre différenciation en ostéoclastes responsables de la dégradation de l'os. Les neutrophiles également ont un impact majeur dans l'induction de l'inflammation dans la PR. Ils produisent notamment des NETs, qui seraient une source d'auto-antigènes et cibles des ACPA. Les NETs activent également les neutrophiles et les macrophages.*

#### **IV.2.4 Impact des autres cellules dans la PR**

En plus des macrophages et des neutrophiles qui ont fait l'objet de ma thèse, la PR étant une pathologie hautement inflammatoire, d'autres cellules immunitaires et non-immunitaires envahissent l'articulation des patients et contribuent à l'inflammation et à la destruction articulaire.

Les monocytes ont un impact dans l'inflammation de la PR (Ammari et al., 2018). Leur fréquence est très élevée. Ils sont recrutés dans le tissu synovial et se différencient en macrophages pro-inflammatoires (Misharin et al., 2014). Les monocytes, notamment de phénotype intermédiaire, expriment de façon importante des cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1), des molécules du CMH II et des marqueurs d'activation, comme le CD80. Ces médiateurs induisent l'expansion et l'activation des lymphocytes Th1 et Th17 auto-réactifs et pro-inflammatoires caractéristiques de la PR (Stuhlmüller et al., 2000; Rossol et al., 2012; Yoon et al., 2014).

Les DCs activent également les lymphocytes T. Elles sont les CPAs professionnelles les plus efficaces pour le priming. Chez les patients PR, elles s'accumulent au niveau de la cavité articulaire et expriment des niveaux très élevés de CMH II (Zvaifler et al., 1985). Elles activent les lymphocytes T auto-réactifs et augmentent le taux de TNF $\alpha$  dans l'articulation. Ceci accentue la pathogenèse de la PR (Leung et al., 2002).

Les lymphocytes Th1 et Th17 contribuent aussi à la PR. Ils infiltrent de façon accrue l'articulation enflammée de patients atteints de PR (Koch et al., 1990; Liu et al., 2015). Ils présentent une faible capacité de prolifération et expriment de nombreuses cytokines pro-inflammatoires et de nombreux marqueurs d'activation (Emery, Panayi, and Nouri, 1984; Morita et al., 1998). En effet, les Th1 produisent principalement de l'IFN- $\gamma$  qui stimule les cellules myéloïdes et les Th17 produisent la cytokine IL-17, qui active entre-autres l'ostéoclastogénèse. Les lymphocytes T autoréactifs stimulent aussi la différenciation des lymphocytes B autoréactifs (Thomas et al., 1992). De plus, de manière dépendante de contact cellulaire, les lymphocytes T synoviaux activent la production de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes et les macrophages via la voie PI3K (Brennan et al., 2002; Beech et al., 2006). Ces médiateurs pro-inflammatoires inactivent les Tregs responsables du contrôle de l'inflammation (Herrath et al., 2011). De plus, le blocage de l'activité de ces médiateurs, comme le TNF $\alpha$  restaure la fonction tolérogène des Tregs (Nadkarni, Mauri, and

Ehrenstein, 2007). Cependant, il existe des rôles bénéfiques du TNF $\alpha$  sur les Tregs, dans la PR, notamment via son interaction à son récepteurs TNFR2 (Santinon et al., 2020).

L'exacerbation de l'inflammation dans la PR conduit au dérèglement des cellules non-immunitaires de l'articulation et l'induction de la destruction articulaire. C'est le cas des FLS, qui sont des cellules de soutien qui entourent le cartilage et forment la membrane synoviale dans une articulation normale. Dans la PR, ils sont à l'origine de l'hyperplasie synoviale observée sur les articulations. Les FLS sont activés entre-autres par les sécrétions des macrophages comme l'IL-6. Ensuite, ils prolifèrent et exacerbent l'inflammation à leur tour dans la PR (Mihara et al., 1995). Les FLS peuvent agir comme des CPA et présenter les peptides arthritogènes aux lymphocytes T (Tran et al., 2007). Ils exposent par exemple des peptides citrullinés présents sur les NETs aux lymphocytes T (Carmona-Rivera et al., 2020). Mais, Ils sont surtout associés aux dommages du cartilage et de l'os dans la PR (Lee et al., 2007). En effet, les FLS produisent des protéases, telles que les MMP et dégradent directement les composants de la matrice extra-cellulaire du cartilage. Les chondrocytes sont aussi des cellules qui composent le cartilage avec la MEC. Dans la PR, les cytokines pro-inflammatoires présentes dans le microenvironnement de patients stimulent leur apoptose et empêchent leur différenciation (Kondo et al., 2013; Yang, Lu, and Guo, 2016). Cela aboutit à la dégradation du cartilage. Les FLSs sécrètent aussi du RANKL (Takayanagi et al., 2000) et produisent du M-CSF (Hamilton, Filonzi, and Ianches, 1993) dans la PR. Le RANKL et le M-CSF stimulent la différenciation des ostéoclastes. Les ostéoclastes sont les cellules responsables de la dégradation de l'os, en opposition aux ostéoblastes qui reconstituent l'os. Dans une articulation normale, il y a un équilibre entre la résorption et la régénération osseuse réalisé par ces deux types cellulaires. Chez les patients PR, l'équilibre est en faveur de la résorption osseuse. En effet, l'inflammation induite lors de la PR conduit les FLS à sécréter de grandes quantités de RANKL responsable de la différenciation ostéoclastique (Takayanagi et al., 2000). En plus, les ostéoclastes peuvent se différencier à partir des macrophages de liquides synoviaux de patients atteints de PR (Adamopoulos et al., 2006), conduisant à une activation chronique des ostéoclastes et à une érosion osseuse sévère.

#### **IV.2.5 Cytokines emblématiques de la PR**

Les réponses immunitaires de la PR sont principalement orchestrées par les cytokines. Le TNF $\alpha$  est la principale cytokine de la PR. Il est sécrété de façon accrue dans la PR (Chu et

al., 1991). Le TNF $\alpha$  est hautement pro-inflammatoire et il est associé à la destruction des articulations dans la PR (Saklatvala, 1986). Il agit en synergie avec le RANKL pour induire l'ostéoclastogenèse (Lam et al., 2000). De plus, dans les modèles murins de PR, l'inhibition du TNF $\alpha$  a induit une amélioration importante des scores d'arthrite (Williams, Feldmann, and Maini, 1992). C'est aussi le principal inducteur d'IL-1 (Brennan et al., 1989). L'IL-1 est la deuxième cytokine impliquée dans l'inflammation articulaire de la PR. Puisque, son expression est corrélée aux paramètres cliniques et inflammatoires de la PR et l'expression de son récepteur antagoniste (IL-1 Ra) est altérée dans cette pathologie (Eastgate et al., 1988; Chikanza et al., 1995). De plus, le transfert du gène IL-1 humain dans les articulations du genou des lapins a entraîné une forme sévère d'arthrite, analogue à la polyarthrite rhumatoïde chronique chez l'homme (Ghivizzani et al., 1997). L'IL-1 et le TNF $\alpha$  stimulent la production de nombreuses cytokines, dont l'IL-6 (Guerne et al., 1989). L'IL-6 est une cytokine présente à de fortes concentrations dans la PR (Houssiau et al., 1988). C'est un médiateur de plusieurs réponses inflammatoires dans la PR. Elle stimule la production d'anticorps par les plasmocytes (Guerne et al., 1989). Elle stimule la différenciation des ostéoclastes (Tamura et al., 1993; Kotake et al., 1996) et la prolifération des fibroblastes synoviaux (Mihara et al., 1995). De plus, dans des modèles murins, l'IL-6 semble primordial pour le développement des arthrites (Alonzi et al., 1998).

D'autres cytokines soutiennent la réponse inflammatoire dans la PR. Elles agissent seules ou en synergie avec d'autres cytokines. L'IL-23 exacerbe l'inflammation dans la PR. Elle stimule notamment les lymphocytes Th17 à produire de l'IL-17 (Murphy et al., 2003). L'IL-17 est produite en grande quantité dans cette maladie. Elle accentue l'inflammation notamment en stimulant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et en diminuant les taux de cytokines anti-inflammatoires (Chabaud et al., 1999, 2001). Elle est aussi associée à l'érosion osseuse, puisque sa surexpression dans un modèle murin d'arthrite induit une destruction articulaire excessive et son inhibition conduit à l'amélioration des scores d'arthrite (Lubberts et al., 2001). L'IL-15 et IL-12 sont d'autres cytokines pléiotropes qui activent entre autres les lymphocytes T dans la PR (McInnes et al., 1996; Gracie et al., 1999). L'importance des cytokines dans l'induction ou le renforcement de la PR est telle que plusieurs thérapies anti-cytokines sont utilisées actuellement. L'élaboration de ces différentes thérapies a été possible grâce notamment à des études dans des modèles expérimentaux qui récapitulent une partie de la PR. Plusieurs modèles sont utilisés. Chacun a ses avantages et ses inconvénients. Le choix du modèle se fait selon le but de l'étude à mener.

### IV.3 Les modèles expérimentaux de la PR

De nombreux modèles animaux ont été élaborés pour étudier la PR. Celui qui mime le plus la pathologie humaine est l'arthrite expérimentale au collagène (AEC). Il est induit par une immunisation intradermique des souris (généralement la souche DBA/1) avec le collagène de type II (CII) émulsifié dans l'adjuvant complet de Freund (CFA). Le CII est une protéine exprimée dans le cartilage et le CFA sert à renforcer l'action contre le CII. Un rappel avec du CII dans de l'adjuvant incomplet de Freund (IFA) est nécessaire pour induire des arthrites (Courtenay et al., 1980). Ainsi, à partir du 21<sup>ème</sup> jour après immunisation, les signes cliniques d'arthrites apparaissent. Ils présentent un gonflement et une déformation progressive des articulations des membres antérieurs et postérieurs des souris. L'AEC est caractérisée par une inflammation articulaire similaire à celle observée dans la PR, avec une infiltration de la membrane synoviale par les lymphocytes ainsi que des macrophages et neutrophiles et une destruction du cartilage et de l'os. De plus, lors de ce modèle, la production d'auto-anticorps anti-CII est observée, mimant ainsi l'aspect auto-immun de la PR. Ce qui est intéressant aussi dans ce modèle est qu'il est sensible à l'expression de certaines molécules du CMH II comme pour la PR, en conséquence, certaines souches de souris sont plus répondeuses que d'autres (Rosloniec et al., 1998). L'AEC ne présente pas beaucoup d'inconvénients, excepter le fait que les signes extra-articulaires ne sont pas tous observables.

Un autre modèle récapitule les signes d'une poussée arthritique est l'arthrite induite par des anticorps anti-collagène (Collagen Antibody-Induced Arthritis ; CAIA). Il s'agit d'un modèle d'arthrite induit par injection d'anticorps arthritogènes contre le CII, suivie d'une injection du LPS au 3<sup>ème</sup> jour, à des souris WT (Nandakumar et al., 2003). Les anticorps injectés activent les macrophages et les neutrophiles, qui infiltrent la synovie, induisant un gonflement des membres antérieurs et postérieurs des souris. Ce modèle est très avantageux, puisque la quasi-totalité des souris développent des arthrites, quel que soit leur fond génétique. Néanmoins, il ne permet pas de disposer de tous les aspects de la PR. En effet, la CAIA n'est pas sensible aux molécules de CMH II mais surtout il n'y a pas de réponse des lymphocytes T et des lymphocytes B, des cellules qui jouent un rôle-clé dans la PR. De plus, la CAIA ne reproduit pas une maladie chronique, puisque l'inflammation se résorbe spontanément après quelques jours.

Les souris transgéniques exprimant à la fois un transgène du récepteur des lymphocytes (KRN) et d'une molécule du CMH II A<sup>g7</sup> représentent le modèle expérimental d'arthrite

K/BxN. C'est un modèle spontané généré à partir d'un croisement des souris C57BL/6 possédant un TCR transgénique qui reconnaît la ribonucléase bovine présentée par l'haplotype I-A<sup>k</sup> du CMH II avec des souris Non-Obese-Diabetic (NOD) ayant l'haplotype I-A<sup>g7</sup> du CMH II. Ce modèle induit une auto-réactivité systémique (Kouskoff et al., 1996). Les souris K/BxN développent une arthrite inflammatoire sévère un mois à peine après la naissance. Elles se caractérisent par une infiltration de cellules inflammatoires dans le tissu synovial et une destruction du cartilage et de l'os. Les souris K/BxN produisent aussi les lymphocytes T auto-réactives et des auto-anticorps reconnaissant la glucose-6-phosphate isomérase (GPI). L'aspect intéressant de ce modèle est que les sérums de souris K/BxN peuvent être transférés à des souris WT et induire des arthrites transitoires. Ce modèle de transfert de sérum permet de mettre en évidence les mécanismes par lesquels les auto-anticorps induisent une inflammation spécifique des articulations dans la PR (Korganow et al., 1999).

Il existe également un modèle murin spontané d'arthrite, c'est la souche de souris SKG. Ce sont des souris porteuses de mutation de la kinase ZAP-70, Cette mutation affecte la sélection des cellules T, ce qui permet la fuite des cellules T autoréactives du thymus (Guerard et al., 2016). Les souris SKG présentent à l'âge de deux mois des arthrites. Elles se caractérisent par un gonflement articulaire, une infiltration des cellules immunitaires innées et adaptatives dans le tissu synovial ainsi qu'une présence de facteurs rhumatoïde et d'auto-anticorps contre le CII. Elle conduit aussi à une érosion osseuse et une destruction articulaire sévère.

Un autre modèle intéressant puisqu'il met en jeu la cytokine inflammatoire la plus importante dans la PR est le modèle de souris transgénique pour le TNF- $\alpha$  (Keffer et al., 1991). Dans ce modèle expérimental le transgène du TNF- $\alpha$  est modifié de sorte à être surexprimé. Ainsi un mois après la naissance, toutes les souris présentent une arthrite sévère, progressive et qui atteint toutes les articulations. Les souris transgéniques TNF $\alpha$  présentent une infiltration accrue des cellules immunitaires dans la membrane synoviale ainsi qu'une destruction articulaire. Néanmoins, dans ce modèle il n'y a pas d'augmentation d'auto-anticorps.

Un dernier modèle mis au point plus récemment est le modèle d'arthrite d'hypersensibilité de type retardé (Delayed-Type Hypersensitivity Arthritis ; DTHA). Le protocole consiste à immuniser des souris avec de la sérumalbumine bovine méthylée (methylated Bovine Serum Albumin ; mBSA) émulsionnée dans du CFA. Quatre jours après, afin de cibler les articulations, une solution d'anticorps monoclonaux anti CII est injectée par voie intraveineuse. Enfin, le septième jour, une solution de mBSA est injectée dans une

l'articulation du genou. Les arthrites apparaissent très rapidement après la 2<sup>ème</sup> injection, quasiment 24h après (Tanaka et al., 2007; Santinon et al., 2020). Les arthrites ne durent qu'environ une semaine, néanmoins, ce modèle reproduit beaucoup d'aspects de la PR. En effet, il présente une hyperplasie synoviale, une infiltration de cellules immunitaires dans le tissu synovial et la destruction articulaire. Une particularité de ce modèle est que seule l'articulation injectée présente des signes cliniques et physiopathologiques. Ce qui nous permet de comparer directement sur l'articulation controlatérale de la même souris, différents paramètres.

L'arthrite à protéoglycanes (PGIA) est un modèle d'arthrite induit par immunisation intra-péritonéale de souris ou de rats avec du protéoglycane isolé du cartilage humain émulsifié dans du CFA ou du bromure de diméthylidooctadécylammonium (DDA). Elle est induite notamment sur les souches murines BALB/c et C3H. Les souris développent des arthrites au bout du 21<sup>ème</sup> jours, avec une réponse auto-immune et inflammatoire caractérisée par l'activation des lymphocytes T et B et la production d'auto-anticorps.

Il existe également des modèles d'arthrites de souris et de rats produits par une injection intra-articulaire, dans le genou, de fragments de *streptocoques*. C'est l'arthrite induite par la paroi cellulaire streptococcique (SCW). Ce modèle est utilisé plus rarement. Il est induit sur les souches BALB/c, DBA/1 et C3H. Son avantage est qu'il est rapide, avec des signes cliniques 24h après l'injection. De plus, on observe une inflammation, des auto-anticorps contre le fragment injecté et une destruction articulaire. Son inconvénient est qu'il induit une arthrite aigue qui ne mime pas la chronicité de la PR, néanmoins des poussées peuvent être obtenues par une injection intraveineuse subséquente ou des injections intra-articulaires multiples par le même fragment.

Ainsi grâce à ces différents modèles de PR, la physiopathologie et les manifestations cliniques de la maladie sont mieux comprises et plusieurs thérapies ont pu être élaborées.



## **IV.4 Diagnostic et thérapies de la PR**

### **IV.4.1 Les PR ACPA-positives et ACPA-négatives**

Avant d'introduire les manifestations cliniques de la PR, il est important de rappeler que deux types de PR subsistent. La PR séropositive caractérisée par la présence d'ACPA et la PR séronégative dépourvue d'ACPA. Dans plusieurs études le phénotype séronégatif est classé comme une maladie distincte de la PR. En effet, les deux PR se différencient par leurs facteurs de risques génétiques (Padyukov et al., 2011), puisque les allèles HLA-DR1, HLA-DR4 et HLA-DR10 sont associés à la susceptibilité de la PR positive à l'ACPA tandis que l'allèle HLA-DR3 sont associés à la PR négative à l'ACPA (Stastny, 1978; Verpoort et al., 2005). Les PR ACPA-positives et -négatives diffèrent aussi sur le plan histologique. On observe que les PR ACPA-positives sont associées à une infiltration lymphocytaire plus accrue dans la synovie et à une érosion osseuse plus sévère que les PR ACPA-négatives (van Oosterhout et al., 2008). De plus, les PR ACPA-positives sécrètent plus de cytokines IL-1 et IL-17 que les PR ACPA-négatives (Gómez-Puerta et al., 2013). Pour les manifestations cliniques, le nombre et la distribution des articulations atteintes sont similaires. Néanmoins, les patients présentant des anticorps anti-CCP avaient davantage d'articulations gonflées et une destruction articulaire plus sévère (van der Helm-van Mil et al., 2005). En dépit de ces différences, les mêmes critères cliniques sont utilisés pour le diagnostic de la PR et les mêmes traitements sont administrés indépendamment de leur statut sérologique.

Le diagnostic de la PR se fait à la suite de l'analyse des signes cliniques, biologiques et ainsi que des examens d'imagerie.

### **IV.4.2 Les manifestations cliniques**

Dans la majorité des cas, les signes cliniques de la PR se résument par la manifestation d'une polyarthrite (gonflement et douleur d'au moins trois articulations) qui touche les extrémités bilatérale et symétrique, évoluant depuis plus de 6 semaines. Les douleurs articulaires sont d'horaire inflammatoire, avec un réveil en deuxième partie de nuit et une raideur matinale supérieure à 30 minutes. La PR touche essentiellement les poignets, les

articulations métacarpophalangiennes (MCP) et les articulations interphalangiennes proximales (IPP) mais peut aussi porter atteinte à d'autres articulations. Les gonflements articulaires peuvent être responsables d'une limitation des articulations et en l'absence de prise en charge thérapeutique efficace, des déformations irréversibles peuvent apparaître et ainsi être la source d'un handicap important.

Par ailleurs, la PR peut se manifester par des signes extra-articulaires, comme l'apparition de nodules rhumatoïdes, de vascularites, du syndrome de gougerot-sjögren secondaire ou de la scléromalacie perforante traduisant le caractère systémique de la maladie. Ces manifestations extra-articulaires sont inconstantes mais constituent un facteur pronostic de sévérité de la maladie. La PR peut également être associée à certaines comorbidités qui sont responsables d'une augmentation de la mortalité (Farragher et al., 2008). Ils s'agit notamment de maladies cardiovasculaires, comme l'hypertension artérielle (Panoulas et al., 2007), l'athérosclérose (Aubry et al., 2007) ou les cardiopathies ischémiques (López-Longo et al., 2009), mais aussi les pathologies non cardiaques, comme le diabète (Lillegraven et al., 2019) et le lymphome (Baecklund et al., 2006). Ainsi, l'identification de la PR le plus précocement possible afin de la traiter est fondamentale pour prévenir les manifestations articulaires, extra articulaires et comorbidités associées à cette maladie.

Des critères de classification de la PR ont été établis en 2010 par le collège américain de rhumatologie (American college of rheumatology ; ACR) et la ligue européenne contre le rhumatisme (European league Against Rheumatism ; EULAR) (Aletaha et al., 2010). Ils permettent d'aider le clinicien pour le diagnostic précoce de la maladie. Ils exigent par exemple qu'au moins une (petite) articulation gonflée, avec un score minimal de 6 sur un score de 10 peut être considérée comme critère d'entrée en PR en l'absence d'autres maladies expliquant les mêmes symptômes. Ils impliquent l'évaluation du nombre et du type des articulations gonflées, la durée des symptômes, les marqueurs sérologiques ACPA et RF, les analyses biologiques CRP et VS. Il peut aussi y avoir recours une estimation par imagerie de l'étendue de l'érosion articulaire. Le suivi de la maladie s'effectue grâce à des scores d'activité, dont le plus reconnu est le DAS28. Il se base sur des calculs complexes de l'activité de 28 articulations (2 épaules, 2 coudes, 2 poignets, 10 métacarpophalangiennes, 10 interphalangiennes proximales des doigts et 2 genoux). Le praticien évalue le nombre et l'état des articulations touchées. Le patient quant à lui évalue son état de santé global sur une échelle de 10. Ces paramètres subjectifs sont accompagnés d'analyses biologiques VS et/ou CRP. Ils définissent alors un indice d'activation. Plus l'indice est élevé plus la maladie est sévère. Avec une activité importante de la maladie

pour un indice supérieur à 5,1 et une rémission avec un indice inférieur ou égal à 2.6 (Prevo et al., 1995). D'autres scores d'activité peuvent être utilisés, l'indice d'activité simplifié de la maladie (Simplified Disease Activity Index ; SDAI) comparable au DAS28 mais il prend en compte une évaluation directe du patient (Smolen et al., 2003) et l'indice d'activité clinique de la maladie (Clinical Disease Activity Index ; CDAI) qui est plus rapide et se base uniquement sur des observations cliniques sans analyses biologiques. Elle facilite notamment la prise de décision immédiate (Aletaha et al., 2005). Les critères décrits ci-dessous servent également à évaluer la réponse aux traitements (Smolen, Aletaha, and McInnes, 2016).

#### **IV.4.3 Stratégies de traitement de fond dans la PR**

Les stratégies thérapeutiques utilisées lors de la PR visent à mettre le patient en rémission complète en ciblant l'inflammation. Il est recommandé d'instaurer le plus précocement possible un traitement de fond, dès que le diagnostic de PR est posé. En première intention et en l'absence de contre-indication, le méthotrexate (MTX) est administré. C'est un antirhumatismal modificateur de la maladie (conventional Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drugs ; cDMARD) conventionnel. Il s'agit d'une aminoptérine, une molécule synthétique antagoniste de l'acide folique. Le MTX inhibe le cycle cellulaire et empêche les cellules inflammatoires de progresser. Il induit ainsi une diminution de l'inflammation et une baisse de la majorité des symptômes liés à la PR (Weinblatt et al., 1985). Il est souvent combiné avec de faibles doses de glucocorticoïdes (Smolen et al., 2014). Les glucocorticoïdes potentialisent l'effet anti-inflammatoire des DMARD (Wassenberg et al., 2005). Néanmoins, étant des immunosuppresseurs associés à de nombreux effets indésirables, ils sont progressivement réduits, puis arrêtés après 6 mois de traitement (Smolen et al., 2014).

En cas de contre-indication au MTX, d'autres DMARDs conventionnels comme le léflunomide peuvent être utilisés. Ils ont une efficacité quasi-similaire aux MTX. Le suivi du patient est alors fréquent et rapproché (tous les 1 à 3 mois) où l'activité de la maladie est mesurée (notamment par le DAS28). En l'absence d'amélioration significative, une optimisation du traitement doit être faite (augmentation de doses par exemple) voire initier un traitement de fond de deuxième ligne.

Les DMARD biologiques ciblés représentent les thérapies utilisées en deuxième intention. Ils sont souvent associés au DMARD conventionnels, comme le méthotrexate

(Smolen et al., 2015), sauf en cas d'intolérance à tous les DMARD classiques. En effet, les DMARD biologiques ont une moindre efficacité que les DMARD conventionnels lorsqu'ils sont administrés en monothérapie (Klareskog et al., 2004; Burmester et al., 2007). Les DMARD biologiques ciblent des facteurs spécifiques jouant un rôle clé dans l'induction de l'inflammation dans la PR. Il en existe plusieurs types avec une efficacité quasiment similaire. Ils ne sont pas utilisés en combinaison pour éviter les effets indésirables, notamment une immunodéficience. La règle est: dès lors qu'une thérapie par un type de DMARD biologique échoue, un autre type est administré et habituellement en association avec le méthotrexate (Smolen et al., 2014; Manders et al., 2015).

Parmi les thérapies ciblées dans la PR, les inhibiteurs du TNF $\alpha$  occupent une place très importante. Ils empêchent la liaison avec son récepteur et l'induction de l'inflammation associée. Cinq inhibiteurs sont utilisés. L'etanercept est une protéine recombinante constituée du récepteur du TNF $\alpha$  soluble «TNFR2» fusionné avec un fragment Fc d'IgG1 humain. Son utilisation est généralement bien tolérée et diminue considérablement les signes cliniques de la maladie (Weinblatt et al., 1999). L'infliximab est quant à lui un anticorps monoclonal chimérique (humain-souris) anti-TNF $\alpha$  (Maini et al., 1999). Son administration diminue notamment l'érosion articulaire (Lipsky et al., 2000). L'adalimumab et le golimumab sont aussi des anticorps monoclonaux contre le TNF $\alpha$  utilisés dans le traitement de la PR. Enfin, le dernier anti-TNF $\alpha$  mis sur le marché dans la PR est le certolizumab. C'est un fragment d'anticorps monoclonal, constitué uniquement du fragment variable de l'anticorps, stabilisé par du polyéthylène glycol.

L'IL-6 et l'IL-1 sont des cytokines qui, après le TNF $\alpha$ , jouent un rôle très important dans la PR. De ce fait, des thérapies dirigées contre les voies impliquant ces interleukines ont été mises en place. Deux immunothérapies qui ciblent le récepteur de l'IL-6, le tocilizumab et le sarilumab, ont été mises sur le marché. Ce sont des anticorps monoclonaux humanisés. De nombreux autres DMARD biologiques ciblant l'IL-6 et le récepteur de l'IL-6 sont en phase d'essai clinique dans la PR. Une autre thérapie ciblant l'IL-1 cette fois, l'anakinra, a été développée dans la PR. C'est un antagoniste recombinant humain du récepteur de l'IL-1 (Mertens and Singh, 2009). Néanmoins, il est très rarement utilisé en raison de son efficacité moindre dans la PR.

Enfin, d'autres DMARD biologiques ne ciblent pas des cytokines mais les cellules immunitaires qui provoquent une inflammation dans la PR. C'est le cas du rituximab. C'est un

anticorps monoclonal chimérique qui cible le CD20 présent sur les lymphocytes B, induisant leur lyse. Il présente une bonne efficacité sur l'activité de la maladie (Edwards et al., 2004). Il est conseillé de l'administrer en cas d'échec de toutes les autres thérapies biologiques (Smolen et al., 2014). Les lymphocytes T ayant un rôle majeur dans la PR sont également ciblés. Le CTLA4 est une protéine présente sur les lymphocytes T régulateurs. Elle se lie aux molécules de co-stimulation CD80/CD86 présentes sur les CPA et empêche leur maturation, ce qui indirectement empêche l'activation T. L'abatacept est une protéine de fusion comprenant du CTLA-4 et de la partie Fc des IgGs. Il est utilisé dans la PR pour permettre l'inhibition de l'activité des lymphocytes. Il induit notamment une baisse de la majorité des cytokines pro-inflammatoires et la diminution de la destruction articulaire (Buch et al., 2009; Patakas et al., 2016). Les DMARD biologiques associés au méthotrexate présentent environ 30 à 40% d'efficacité sur l'activité de la PR.

Enfin, des DMARD synthétiques ciblés sont utilisés. Deux d'entre eux sont déjà sur le marché. Le premier est le tofacitinib. C'est le plus utilisé dans la PR (Burmester et al., 2013). C'est un inhibiteur des protéines kinases JAK1, 2 et 3, une voie de signalisation utilisée par plusieurs cytokines pour induire l'inflammation. Il est administré en combinaison avec le méthotrexate et son efficacité est similaire à celle des DMARDs biologiques (van der Heijde et al., 2013). Le second est le baricitinib, un inhibiteur des kinases JAK 1 et 2 (Genovese et al., 2016).

Une fois que le patient entre en rémission persistante sur une période d'au moins six mois, le traitement est réduit progressivement afin d'éviter une nouvelle poussée de l'activité de la maladie.



# **HYPOTHESE ET OBJECTIFS DE LA THESE**

Malgré toutes les avancées thérapeutiques mises en place ces dernières années, seuls 30% des patients entrent en rémission prolongée. Ainsi, une compréhension plus approfondie de l'environnement inflammatoire et auto-immun de la PR est primordiale pour la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques. Durant ma thèse, je me suis particulièrement intéressée au rôle des NETs et des macrophages dans la PR.

Les NETs sont produits de façon accrue dans cette maladie et leur composition est potentiellement modifiée. De plus, ils sont corrélés aux paramètres cliniques et inflammatoires de la PR (Khandpur et al., 2013; Pérez-Sánchez et al., 2017). Ils ont plusieurs modes d'action. Celui que nous avons examiné est leur capacité à activer les cellules myéloïdes, principalement les macrophages. Nous avons alors émis l'hypothèse que les NETs activent les macrophages et exacerberaient l'inflammation induite par ces cellules lors de la PR. Cette hypothèse est confortée par le fait que les NETs sont composés d'ADN décondensé et de protéines granulaires et que des récepteurs à l'ADN (TLR9) et aux protéines chargées sur les NETs sont exprimés par les macrophages. Ainsi, les NETs pourraient se lier aux macrophages qui sont recrutés dans la membrane synoviale de patients atteints de PR et les stimuler. En conséquence, les macrophages s'activeraient fortement et accentueraient l'inflammation dans l'articulation des patients atteints de PR.

Les macrophages sont subdivisés en plusieurs sous-types. Ceux qui ont plutôt un rôle pro-inflammatoire (M1-like) et ceux qui sont plutôt anti-inflammatoires (M2-like) (Mills et al., 2000). Dans la PR, un phénotype hétérogène des macrophages existe. En effet, les cellules expriment à la fois des marqueurs M1-like et M2-like (Ambarus et al., 2012b). Néanmoins, c'est l'activation du profil macrophagique M1-like qui domine (Antoniv and Ivashkiv, 2006). Ce qui nous a amené à supposer que les NETs activeraient de façon différentielle les sous-populations de macrophages dans un contexte physiologique et lors de la PR. Les NETs stimuleraient alors de façon plus importante les macrophages M1-like dans la PR, ce qui pourrait expliquer le profil pro-inflammatoire principal des macrophages dans cette maladie.

Enfin, le but était également de déterminer le mécanisme d'activation des macrophages par les NETs ainsi que les voies activées à la suite d'une stimulation des macrophages par les NETs, pour à terme mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles dans la PR.



# RESULTATS

## **I. Article**

Le but de ce travail était d'examiner l'impact des NETs sur différentes sous-populations de macrophages au repos ou activées, dans un contexte physiologique et lors de la PR. Pour cela, nous avons cultivé des sous-populations de macrophages avec des NETs en présence ou en l'absence de LPS et nous avons analysé la production des médiateurs pro- et anti-inflammatoires par ces macrophages. Enfin, nous avons étudié le mécanisme d'activation des macrophages par les NETs et les voies déclenchées par les NETs dans les macrophages.

**EN COURS DE PREPARATION (Arthritis & Rheumatology).**

**Neutrophil extracellular traps trigger an enhanced pro-inflammatory response in  
macrophage subpopulations in rheumatoid arthritis**

*Dyhia Melbouci<sup>1,2</sup>, Sarra Seninet<sup>1,2</sup>, Delphine Lemeiter<sup>1,2</sup>, Magali Breckler<sup>1,2</sup>, Roxane  
Hervé<sup>1,2</sup>, Marie-Christophe Boissier<sup>1,2,3</sup>, Elodie Segura<sup>4,5</sup> and Patrice Decker<sup>1,2,\*</sup>*

<sup>1</sup>University of Sorbonne Paris Nord, Li2P, <sup>2</sup>Inserm UMR 1125 and <sup>3</sup>Avicenne Hospital,  
Rheumatology Department, AP-HP, Bobigny, France, <sup>4</sup>U932 Inserm and <sup>5</sup>Curie Institute,  
Paris, France.

\*Corresponding author: Prof. Patrice Decker, University Sorbonne Paris Nord, Inserm UMR  
1125, Li2P, 1 rue de Chablis, 93017 Bobigny, France. Phone: + 33 1 48 38 77 91; Fax: +33 1  
48 38 88 93; e-mail: patrice.decker@univ-paris13.fr

Keywords: neutrophil extracellular traps; polymorphonuclear neutrophils; macrophages;  
inflammation; autoimmunity; rheumatoid arthritis.

## **I.1 Abstract**

### **Objective**

Neutrophil extracellular traps (NETs) are pro- or anti-inflammatory on resting or activated non-polarized macrophages, respectively. In this study, we examined the impact of NETs on different macrophage subpopulations in healthy individuals and rheumatoid arthritis (RA) patients. We also studied the activation mechanism of macrophages by NETs and the pathways triggered by NETs in macrophages.

### **Methods**

Non-polarized, pro- and anti-inflammatory macrophages were induced from blood monocytes purified from healthy subjects or patients with RA. NETs were also prepared from autologous blood neutrophils. These macrophages were then characterized and cultured with NETs in the presence or absence of LPS. Several pro- and anti-inflammatory mediators were analyzed in the presence or absence of LPS. The transcriptome of pro-inflammatory macrophages cultured with NETs from RA patients was also examined. Finally, the involvement of Toll-like receptor 9 (TLR9) in macrophages and of complement protein C1q inside NETs was determined by culturing wild-type/TLR9-deficient macrophages with NETs prepared from wild-type/C1q-deficient mice.

### **Results**

NETs induce pro-inflammatory cytokine profile on resting macrophage subpopulations, including those described as anti-inflammatory, more especially in RA patients. In response to LPS, RA macrophages are resistant to the anti-inflammatory activity of NETs. Macrophage activation by NETs is not mediated by TLR9 in macrophages and is not dependent on C1q

loaded on NETs. RNAseq analysis confirmed that NETs activate pro-inflammatory mediators on macrophages but decrease the activation of anti-inflammatory mediators and indicate that they also induce genes of the aryl hydrocarbon receptor pathway.

## Conclusion

In RA, NETs destabilize the pro-/anti-inflammatory balance toward pro-inflammatory activation of macrophage subpopulations and induce the aryl hydrocarbon receptor pathway.

## **I.2 Introduction**

Neutrophil extracellular traps (NETs) are deoxyribonucleic acid (DNA) filaments associated with neutrophil proteins, especially granular proteins. They are released by neutrophils into the extracellular environment response to microbial or self-stimuli. They were first described in 2004 by Brinkmann et al (Brinkmann et al., 2004). They have shown that NETs are able to trap and kill Gram-positive and Gram-negative bacteria, describing thus a new approach to bacterial elimination by neutrophils. Since then, multiple central roles of NETs have been elucidated, especially in induction and aggravation of autoimmune diseases, including rheumatoid arthritis (RA) (Villanueva et al., 2011; Kambas et al., 2014; van der Linden et al., 2018; Carmona-Rivera et al., 2020).

RA is a chronic inflammatory and autoimmune disease leading to joint destruction. It is characterized by the presence of specific autoantibodies, anti-citrullinated protein antibodies (ACPA), synovial hyperplasia followed by the destruction of cartilage and bone. The disease affects approximately 1% of the world's population. It can also display extra-articular damages, notably cardiovascular complications that are associated with a poor vital prognosis (Radner et al., 2017). Therefore, understanding pathophysiology of this disease is of main importance.

In RA, both innate and adaptive immunities are deficient. In this study, we focused on the major impact of neutrophils and macrophages in this disease. Indeed, macrophages mediate many pathological processes in RA. First, the balance between pro-inflammatory-like (M1) and anti-inflammatory-like (M2) macrophages is disturbed, in favor of an M1-like macrophage profile. Indeed, in RA, macrophages infiltrate synovial fluid and are accompanied by an M1-like profile (De Rycke et al., 2005). They secrete many pro-inflammatory cytokines that are characteristic of RA, such as tumor necrosis factor (TNF $\alpha$ ), interleukin (IL)-1 and IL-6 (Chu et al., 1991; Wood et al., 1992). They induce high levels of chemokines such as IL-8 and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1), which increase the influx of other immune cells into articulation and exacerbate inflammation (Koch et al., 1991, 1992). Macrophages also overexpress major histocompatibility complex (MHC) molecules in RA (Janossy et al., 1981), leading to the presentation of arthritogenic peptides to T cells. Thus, B cells become activated and in turn produce autoantibodies. Macrophages can also directly promote joint destruction in RA by directly differentiating into mature osteoclasts, responsible for bone resorption (Adamopoulos et al., 2006).

Neutrophils represent up to 80% of the immune cells recruited in the synovial fluid and infiltrate the synovial tissue. They mediate many pro-inflammatory processes and produce of NETs, which play key functions in RA. Indeed, neutrophils from patients highly produce NETs in vitro (Ribon et al., 2019). NETs are also detected in synovial tissue of RA patients (Khandpur et al., 2013) and levels of NET-derived products correlate with clinical parameters and autoimmune activity of the disease (Pérez-Sánchez et al., 2017). Moreover, IgG from RA patients induce NETs (Khandpur et al., 2013) and bind to NETs (Khandpur et al., 2013; Ribon et al., 2019), especially ACPA (Carmona-Rivera et al., 2017). NETs contribute to RA development in several ways. They have been shown to promote autoimmune response. In fact, they are loaded with numerous citrullinated proteins that are then a source of autoantigens or

the target of ACPAs (Carmona-Rivera et al., 2017). They also display several neutrophilic enzymes on their surface that directly degrade cartilage components (Carmona-Rivera et al., 2020). In addition, NETs increase pro-inflammatory response characteristic of RA. We have previously shown that NETs, especially RA NETs, promote secretion of pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-8, and TNF), expression of activation markers, but low secretion of the anti-inflammatory cytokine IL-10 on resting macrophages and neutrophils (Ribon et al., 2019). Hence, our results we suggested that NETs exacerbate the macrophage-induced pro-inflammatory effects in RA. This hypothesis is supported by the fact that NETs are composed of DNA and proteins and that receptors for both DNA (toll like receptor (TLR)-9) and some proteins loaded on NETs are expressed by macrophages. Thus, NETs could bind to and stimulate macrophages that are recruited to the joint of RA patients to sustain inflammation.

In that previous study, we analyzed non-polarized macrophages. Macrophages are however subdivided into two subtypes, those with a pro-inflammatory function and those with an anti-inflammatory function. In RA, macrophages with both phenotypes remain, but pro-inflammatory profile dominates. In the present study, this led us to hypothesize that NETs may differentially activate macrophage subpopulations both in a physiological context and in RA, with a greater activation of pro-inflammatory macrophages in RA. Moreover, to delineate the impact of NETs on macrophage activation, we would have analyzed the mechanism involved and the pathway triggered, in order to identify potential new therapeutic targets in RA.

## **I.3 Methods**

### **Human samples**

Fresh peripheral EDTA-blood of RA patients not treated with biologic therapies were collected at the Rheumatology Department of Avicenne Hospital, Bobigny, France. Patients were selected according to the American College of Rheumatology (ACR)/European League Against Rheumatism (EULAR) 2010 revised criteria for RA. In addition, fresh peripheral EDTA-blood and cytopheresis from random healthy donors (HD) were collected respectively at “Etablissement Français du Sang (EFS)”, Bobigny and Paris, France. Informed consents were obtained from all individuals prior to study entry and experiments were approved by the local ethics committee CPP “Paris Ile de France” (approval no. NI-2016-11-01).

### **Mouse sample**

Cells from bone marrow (femur and tibia) of female and male mice with different genotypes were collected. C1q-KO mice were developed by Botto et al (Botto et al., 1998) and provided by Franz Petry (University of Mainz, Germany). TLR9-KO mice were generated by Hemmi et al (Hemmi et al., 2000) and provided by Hermann Wagner (Technical University Munich, Germany). We then bred these mice by crossing KO mice with wild-type mice and then by intercrossing +/- genotypes to get +/+ and -/- genotypes. The genotypes of the different mouse strains were confirmed by PCR on tail biopsies.

### **Cell isolation and preparation**

#### **Human cells**



Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and blood neutrophils of HD and RA patients were isolated by density centrifugation of whole blood on dextran (Axi shield) at 500g for 40 minutes. PBMC from cytapheresis samples were isolated by density gradient centrifugation on Ficoll hypaque (Eurobio) diluted two-fold in sterile phosphate-buffer saline (PBS). Monocytes were then purified from the PBMC fraction by CD14 positive magnetic sorting (Miltenyi Biotec), according to manufacturer's instructions. Purity of monocytes and neutrophils (>90%) was assessed by flow cytometry after CD14 or CD66b staining, respectively.

Monocytes were subsequently differentiated into different macrophage subpopulations in perfluoroalkoxy polymer culture inserts (Savillex), either into non-polarized macrophages in X-VIVO 15 medium (LONZA), using recombinant human (rh)M-CSF (Immunotools) at 100ng/ml for 7 days, or into polarized macrophages in IMDM medium (Thermofisher) containing 10% fetal calf serum (FCS), using rhM-CSF (50ng/ml) for 4 days, then rhIFN- $\gamma$  (50ng/ml) or rhIL-4 (40ng/ml) or rhIL-10 (50ng/ml) (Immunotools) for 3 days, to obtain M1-like or M2a-like or M2c-like macrophages respectively. The phenotype of the subpopulations was checked by flow cytometry on day 7 (see below).

### **Mouse cells**

Bone marrow cells were flushed from with sterile PBS. Once washed, red blood cells (RBC) were lysed in hemolysis buffer (NH<sub>4</sub>CL, KHCO<sub>3</sub>, and EDTA). Neutrophils were further isolated by negative magnetic cell sorting (Miltenyi Biotec) according to manufacturer instructions. The eluted fraction represents neutrophils that had been used to prepare NETs. The purity of neutrophils (LY6G<sup>+</sup>) (>90%) was verified by flow cytometry. The fraction retained in the column was used for macrophagic differentiation. For this purpose, cells were re-suspended in IMDM medium supplemented with 10% FCS and containing recombinant mouse (rm)M-

CSF (30ng/ml) or rmGM-CSF (50ng/ml) (Immunotools) for seven days in petri dish. Only adherent cells were considered as macrophages.

### **NETs preparation and characterization**

Freshly isolated neutrophils were seeded on poly-L-lysine-coated 0.001% (Sigma-Aldrich) borosilicate chamber slides (NUNC), settled for 30 minutes, and activated with 50nM and 100nM of phorbol myristate acetate (PMA) respectively for human and mouse PMNs in RPMI 1640 medium (Thermofisher). After 4 h for human PMNs and 16 h for mouse PMNs, the chambers were washed twice with PBS and NETs were detached from the glass by mild deoxyribonuclease 1 (DNase 1, Sigma-Aldrich) digestion (10U/ml, 30 min for human PMNs and 4U/ml, 15 min for mouse neutrophils) in PBS lacking calcium and magnesium (Thermofisher). The reaction was stopped by 3 mM EDTA and the supernatants containing soluble NETs were harvested and centrifuged at 300 g for 10 min to remove any intact cells. The upper phase was collected, and NETs were enriched by a second centrifugation step (16,000 g, 10 min, to remove cell debris) and again the upper phase was collected and frozen. As a control, the same procedure was followed but without PMNs to prepare the corresponding NETs purification buffer. NETs were quantified by fluorescence in a microplate reader using PicoGreen, a dye for quantification of soluble double-stranded DNA (Life Technologies) and spectrophotometry (NanoDrop technology) and characterized by 16% SDS-PAGE and 1.5% agarose gel. Preparations of approximately 12 µg/ml of DNA, as determined spectrophotometrically by measuring optical density at 260 nm were used in cell cultures.

## Flow cytometry

Human macrophages were first incubated with human FcR Blocking Reagent (Miltenyi) according to the associated protocol. They were subsequently stained in PBS containing 5% FCS, 0.02M sodium azide and 100 $\mu$ g/mL human  $\gamma$ -globulin (Calbiochem) with the following antibodies against surface molecules and their isotype control. To analyze their phenotype, we used: anti-human CD200 receptor-BV421 (BD Bioscience, Clone OX-108), anti-human CD14-BV510 (BD Bioscience, Clone M $\phi$ P9), anti-human CD206-BB515 (BD Bioscience, Clone 19.2), anti-human CD64-PE-Cy<sup>TM</sup>7 (BD Bioscience, Clone 10.1), anti-human CD32-APC (BD Bioscience, Clone FLI8.26), anti-human CD16-APC-H7 (BD Bioscience, Clone 3G8). The purification of human and murine neutrophils was also checked in the presence of anti-human CD66b-FITC (BD Bioscience, Clone G10F5) and anti-mouse Ly6G-FITC (BD Bioscience, Clone 1A8) respectively. Cells were acquired on a FACS Canto II cell analyzer (BD Bioscience) and results were analyzed using FACS Diva (BD Bioscience).

## Macrophage cultures

### Human

After differentiation, cells (0.75\*10<sup>6</sup> cells/ml or 1\*10<sup>6</sup> cells/ml) were resuspended in X-vivo 15 medium and IMDM medium supplemented with 10% FCS for non-polarized and polarized macrophages, respectively. Macrophages were then cultured 24h for ELISA tests, with soluble NETs (50% of volume), NETs purification buffer (50% of volume), S. typhimurium lipopolysaccharide (LPS) 250 ng/ml (Sigma-Aldrich).

### Mouse

After 7 days of differentiation, adherent cells were detached by incubation with 5mM EDTA for 40 min at 37°. Cells were then washed with PBS, resuspended in IMDM medium

supplemented with 10% FCS ( $1 \times 10^6$  cells/ml) and cultured for 24h with soluble NETs (50% of volume), NETs purification buffer (50% of volume), *S. typhimurium* lipopolysaccharide (LPS) 1 $\mu$ g/ml (Sigma-Aldrich) or CpG 2395 2 $\mu$ M (Invivogen).

## ELISA

Supernatants from cultures were collected after 24h. Cytokine concentrations were quantified using the following ELISA kits, according to manufacturer's instructions: human IL-6 (BD Bioscience), human IL-8 (BD Bioscience), human IL-10 (BD Bioscience), human TNF $\alpha$  (BD Bioscience), mouse MIP-2 (R&D Systems), mouse IL-6 (R&D Systems), mouse IL-10 (R&D Systems) and mouse TNF $\alpha$  (R&D Systems).

## RNAseq

### RNA-seq library preparation

RNA was extracted by using RNeasy Mini Kit (Qiagen), including on-column DNase digestion as described by the manufacturer's protocol. The integrity of the RNA was confirmed in BioAnalyzer using RNA 6000 Nano kit (Agilent Technologies). Libraries were prepared according to Illumina's instructions accompanying the TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (Illumina). 500 ng of RNA was used for each sample. Library length profiles were controlled with the LabChip GXTouchHT system (Perkin Elmer). Sequencing was performed in the same sequencing unit of NovaSeq (Illumina) (100-nucleotide-length reads, paired ends) with an average depth of 15 million reads per sample.

### RNA-seq analysis

Genome assembly was based on the Genome Reference Consortium (hg38). Quality of RNA-seq data was assessed using FastQC. Reads were aligned to the transcriptome using

STAR. Differential gene expression analysis was performed using DESeq2. Genes with low number of counts (<10) were filtered out.

### **Statistical analysis**

Statistical analyses were performed using Graphpad prism 9.0.1. Data distribution was first tested for normality with D'Agostino and Pearson test. According to data distribution, two-tailed Mann-Whitney test, Two-tailed paired t-test or two-tailed Wilcoxon matched-pairs signed rank test were performed. In some experiment, Kruskal-Wallis test was performed. Data are shown as mean  $\pm$  SEM. In representative experiments, data are from triplicates. In pooled data, each donor was tested in triplicates and then the mean was used for subsequent analysis. Statistical analyses were not performed using all replicates. To analyze individual genes from RNA-seq data, normality was first tested using Kolmogorov-Smirnov normality test with Dallal-Wilkinson-Lillie for p value before performing a two-tailed paired t-test. For p-values<0.05, difference was considered statistically significant.

## **I.4 Results**

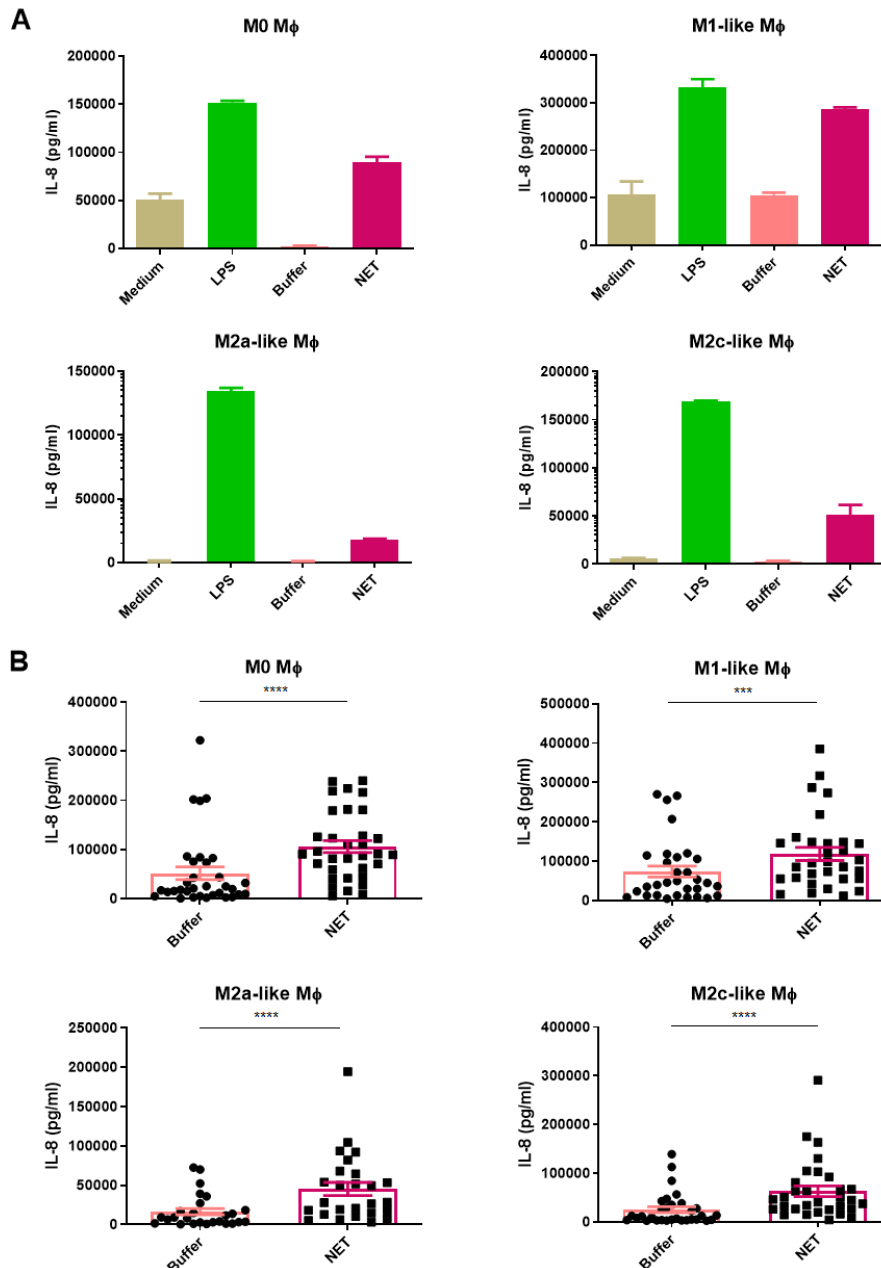
### **I.4.1 NETs induce a pro-inflammatory profile in macrophage subpopulations**

We have previously shown that non-polarized (M0) resting macrophages (M $\phi$  M0) induce pro-inflammatory cytokines, in response to NETs, especially IL-8 (Ribon et al., 2019). M0 macrophages have previously been described as pro-inflammatory in response to RA immune complexes (Clavel et al., 2016). In this study, we analyzed whether pro-inflammatory-like and anti-inflammatory-like macrophage subpopulations respond in the same way to NETs. In addition, we compared cell cultures prepared from healthy individuals to those from RA patients.

For this purpose, we induced M0 M $\phi$ , pro-inflammatory macrophages (M1-like M $\phi$ ), repairing macrophages (M2a-like M $\phi$ ) and immuno-regulatory macrophages (M2c-like M $\phi$ ) from freshly purified human blood monocytes. We then cultured these macrophages with NETs prepared from autologous neutrophils (in most cases) and analyzed IL-8 secretion. Thus, in all experiments, M $\phi$  from healthy individuals were cultured with NETs from healthy individuals and M $\phi$  from RA patients were cultured with NETs from RA patients. Macrophage subpopulations and NETs were characterized as described in supplementary figures 29 and 30 or supplementary figure 31, respectively.

First, we showed that, all macrophage subpopulations secrete IL-8 in the presence of NETs (in comparison to the NETs purification buffer), whereas as a control all subpopulations respond to LPS in comparison to cells in medium (Figure 16A, one representative donor is shown). We then analyzed the effect of NETs on macrophage subpopulations from all independent donors (healthy donors and RA patients). Interestingly, our results showed that all

macrophage subpopulations increase the production of the pro-inflammatory cytokine IL-8 in response to NETs, including M2a-like M $\phi$  and M2c-like M $\phi$  which are described as anti-inflammatory (Figure 16B). We also analyzed the secretion of IL-6 and TNF $\alpha$  by macrophage subpopulations in response to NETs. TNF $\alpha$  appears to be increased by all macrophage subpopulations from all tested donors in response to NETs. However, additional donors will be required to reach significance (data not shown). Regarding IL-6, it is not secreted by macrophages in response to NETs (data not shown). These data show that NETs promote the secretion of pro-inflammatory cytokines by both pro- and anti-inflammatory macrophages.

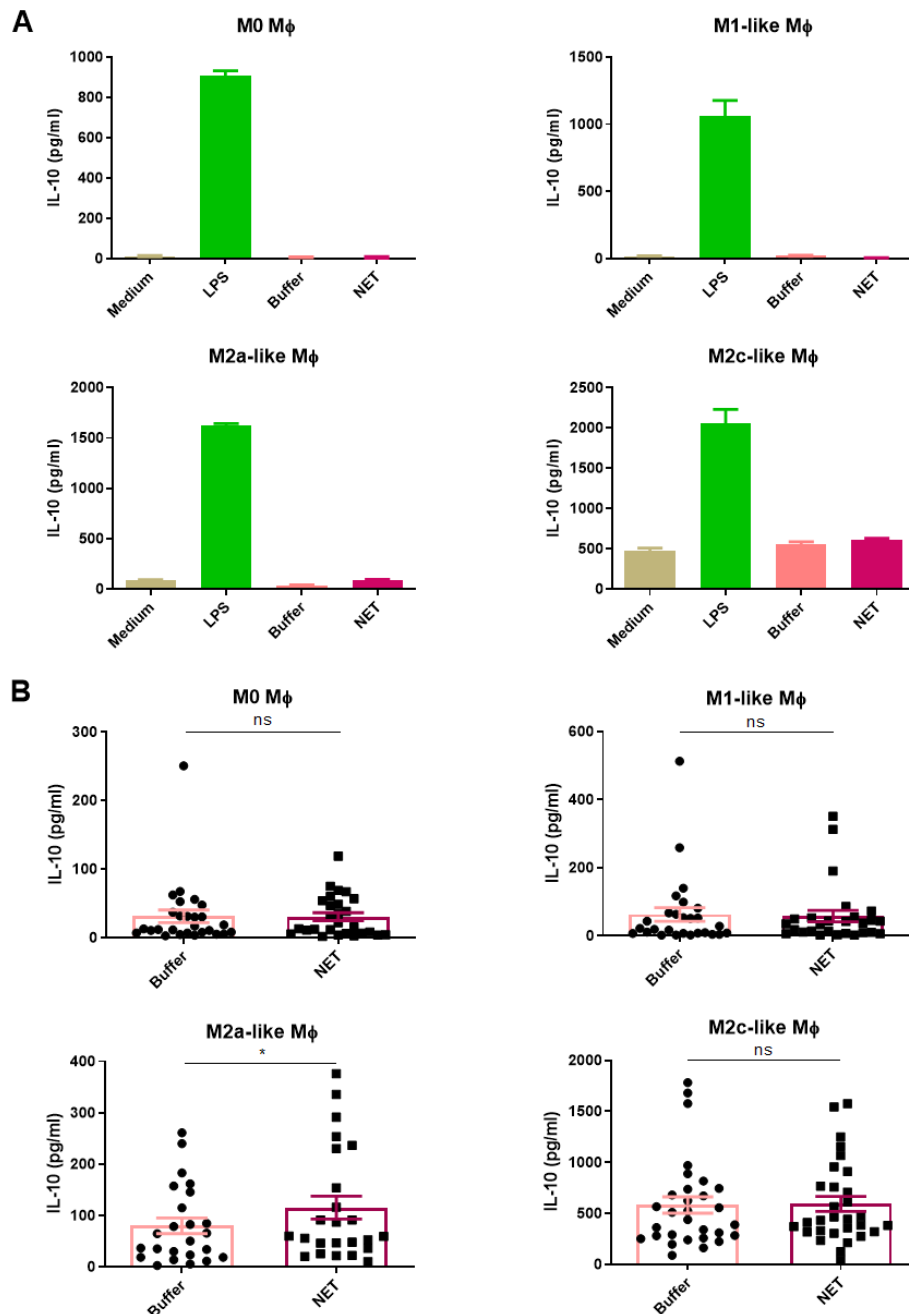


**Figure 16. Secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-8 by macrophage subpopulations stimulated with NETs.**

(A) Representative experiment of at least 26 independent experiments in which human monocyte-derived or -polarized M0, M1-like, M2a-like, or M2c-like macrophages (M $\phi$ ) from a single donor were cultured in the presence of medium, LPS, the purification buffer or NETs from the same donor. The level of IL-8 secretion was then assessed 24 hours later in the cell culture supernatants by ELISA. Values are the mean and SEM of triplicates. (B) Human monocyte-derived or -polarized M0 (n=33 independent experiments), M1-like (n=31), M2a-like (n=26), or M2c-like (n=31) M $\phi$  of healthy subjects or rheumatoid arthritis patients were cultured in the presence of the purification buffer or NETs prepared, respectively, from healthy subjects and rheumatoid arthritis patients. IL-8 secretion was evaluated 24h later in the cell culture supernatants by ELISA. Symbols represent individual and independent donors (patients and controls are pooled). Values are the mean and SEM of all donors. \*\*\*,  $p < 0.0005$  (two-tailed Wilcoxon matched-pairs signed rank test); \*\*\*\*,  $p < 0.0001$  (two-tailed Wilcoxon matched-pairs signed rank test). LPS, lipopolisaccharide; NETs, neutrophil extracellular traps; buffer, NETs purification buffer; M $\phi$ , macrophages.



M2-like macrophages decrease inflammation by, in part, secreting anti-inflammatory mediators. To determine whether NETs affect these anti-inflammatory properties of macrophages, we analyzed the production of the cytokine IL-10 by all macrophage subpopulations in response to NETs. IL-10 is a cytokine found to limit inflammation in autoimmune diseases, including RA (Iyer and Cheng, 2012). It is produced importantly by M2-like M $\phi$ s, in particular, M2c-like M $\phi$ s. We first verified in our culture system that all macrophage subpopulations secrete IL-10 in response to LPS, a well-known property of macrophages (Figure 17A, one representative donor) (Fiorentino et al., 1991). The level of IL-10 secretion was greater for M2-like macrophages, as expected (Figure 17A). We then analyzed the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 by macrophage subpopulations after stimulation with NETs for all accumulated donors (Figure 17B). We observed that non-polarized and pro-inflammatory macrophage subpopulations did not secrete IL-10 in response to NETs, in comparison to the NETs purification buffer. Regarding M2-like macrophages, M2a-like M $\phi$  significantly produced IL-10 in response to NETs. And very interestingly, anti-inflammatory M2c-like M $\phi$ , which are described as the best IL-10 producers, display spontaneous secretion of IL-10, which did not increase in the presence of NETs (Figure 17B). Moreover, for all macrophage subpopulations, NETs-induced IL-8 concentrations are much higher than IL-10 concentrations, even for M2a-like macrophages. Not only the IL-8/IL-10 ratio is in favor of the pro-inflammatory cytokine, but also this ratio is much higher in pro-inflammatory M0 and M1-like macrophages than in anti-inflammatory M2a-like and M2c-like macrophages (supplementary Figure 30). These results suggest that NETs rather induce pro-inflammatory profile on macrophages.



**Figure 17. Secretion of the anti-inflammatory cytokine IL-10 by macrophage subpopulations stimulated with NETs.**

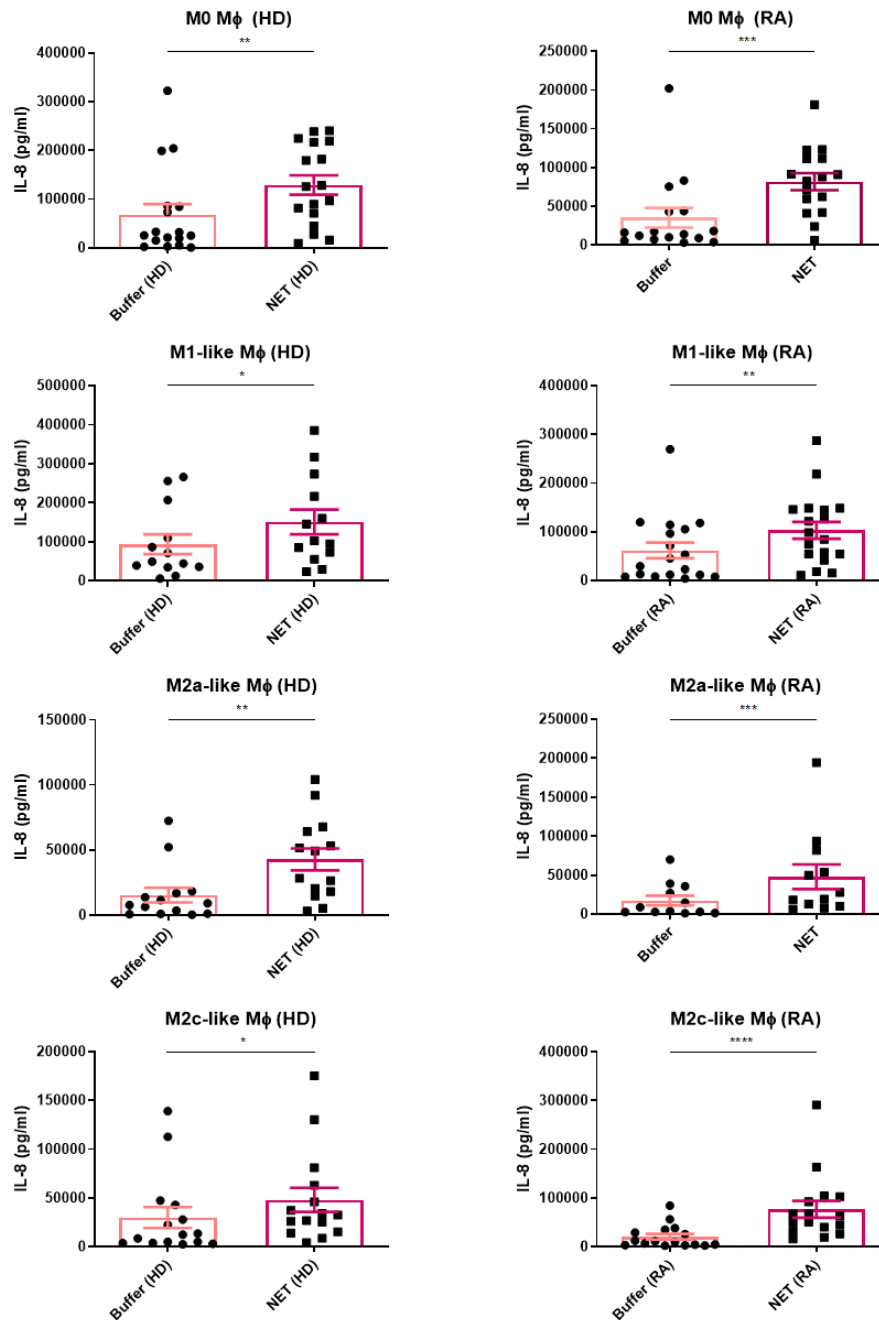
(A) Representative experiment of at least 25 independent experiments in which human monocyte-derived or -polarized M0, M1-like, M2a-like, or M2c-like macrophages (M $\phi$ ) from a single donor were cultured in the presence of medium, LPS, the purification buffer or NETs from the same donor. The level of IL-10 secretion was then assessed 24 hours later in the cell culture supernatants by ELISA. Values are the mean and SEM of triplicates. (B) Human monocyte-derived or -polarized M0 (n=27 independent experiments), M1-like (n=28), M2a-like (n=25), or M2c-like (n=30) M $\phi$  of healthy subjects or rheumatoid arthritis patients were cultured in the presence of the purification buffer or NETs prepared, respectively, from healthy subjects and rheumatoid arthritis patients. IL-10 secretion was evaluated 24h later in the cell culture supernatants by ELISA. Symbols represent individual and independent donors (patients and controls are pooled). Values are the mean and SEM of all donors. \*,  $p < 0.05$  (two-tailed paired  $t$  test); ns, not significant. LPS, lipopolisaccharide; NETs, neutrophil extracellular traps; buffer, NETs purification buffer; M $\phi$ , macrophages.

#### **I.4.2 The pro-inflammatory effect of NETs on macrophage-subpopulation is more prominent in RA patients than in healthy subjects**

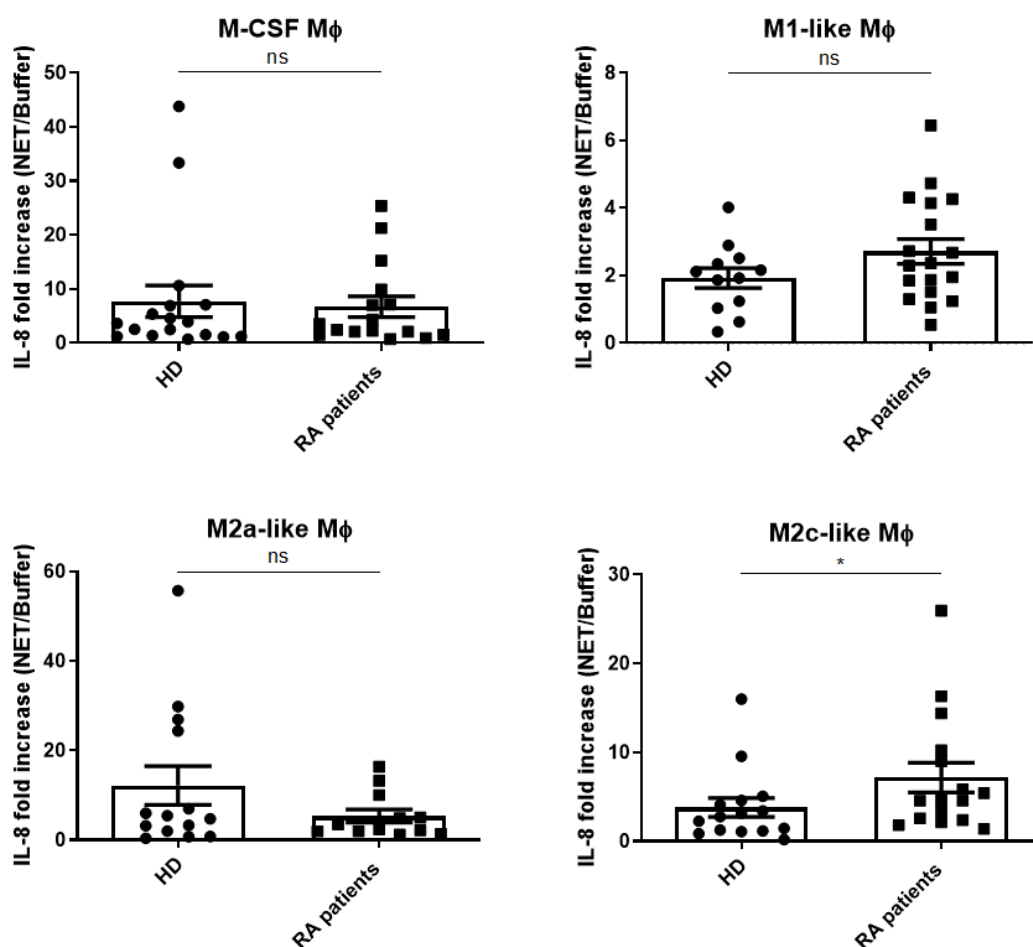
We next analyzed whether the pro-inflammatory effect of NETs observed in Figures 16 and 17 is different between cell cultures from healthy subjects and RA patients. We have therefore assessed IL-8 secretion in macrophages from healthy subjects and RA patients, in the presence of NETs from healthy subjects or RA patients, respectively. ELISA results showed that normal and RA NETs induce activation of M0, M1-like, M2a-like and M2c-like macrophages from healthy subjects as well as those from RA patients, respectively, through increased IL-8 secretion (Figure 18).

We then compared the secretory rate of IL-8 specifically induced by NETs by the four macrophage subpopulations of healthy subjects and RA patients. There was no difference in the level of IL-8 induction in response to NETs in M0, M1-like and M2a-like macrophages between healthy subjects and RA patients (Figure 18). But very importantly, the ratio of IL-8 production was significantly higher in anti-inflammatory M2c-like M $\phi$  from RA patients compared to M2c-like M $\phi$  from healthy subjects (Figure 19).

Next, we evaluated the secretion of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in macrophage subpopulations from healthy subjects and RA patients stimulated with NETs (Figure 20). There was no modulation of IL-10 secretion by M0, M1 and M2c-like M $\phi$  in response to NETs, from either healthy subjects or RA patients. For M2a-like M $\phi$  from healthy subjects, we did not observe an increase of IL-10 in response to NETs, whereas its secretion is increased in M2a-like M $\phi$  from RA patients stimulated with NETs. As expected, the highest basal IL-10 secretion was observed with M2c-like macrophages. But, there is no additional secretion in the presence of NETs. Thus, we suggest that the pro-inflammatory properties of NETs on macrophage subpopulations is prominent on RA patients.

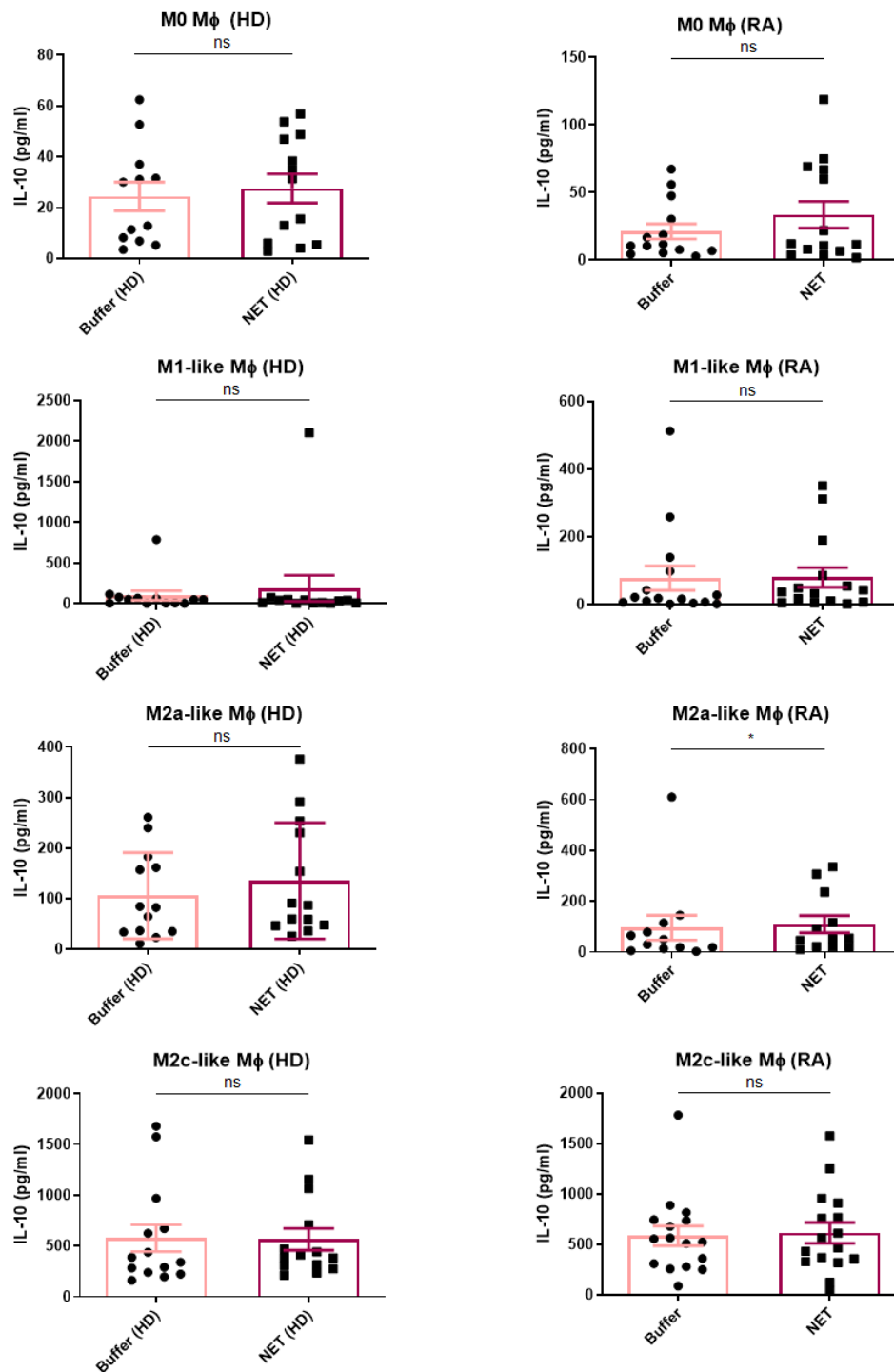


**Figure 18. Secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-8 by macrophage subpopulations of healthy donors and rheumatoid arthritis patients stimulated with NETs.** Human monocyte-derived or -polarized M0 ( $n=17$  independent experiments), M1-like ( $n=13$ ), M2a-like ( $n=14$ ), or M2c-like ( $n=15$ ) macrophages ( $M\phi$ ) of healthy subjects and human monocyte-derived or -polarized M0 ( $n=16$ ), M1-like ( $n=18$ ), M2a-like ( $n=12$ ), or M2c-like ( $n=16$ )  $M\phi$  of rheumatoid arthritis patients were cultured in the presence of the purification buffer or NETs prepared, respectively, from healthy subjects or rheumatoid arthritis patients. IL-8 secretion was evaluated 24h later in the cell culture supernatants by ELISA. Symbols represent individual and independent donors. Values are the mean and SEM of all donors. \*,  $p < 0.05$  (two-tailed paired  $t$  test) for M1-like  $M\phi$ ; \*,  $p < 0.05$  (two-tailed Wilcoxon matched-pairs signed rank test) for M2c-like  $M\phi$ ; \*\*,  $p < 0.005$  (two-tailed Wilcoxon matched-pairs signed rank test); \*\*\*,  $p < 0.0005$  (two-tailed Wilcoxon matched-pairs signed rank test); \*\*\*,  $p < 0.0005$  (two-tailed Wilcoxon matched-pairs signed rank test); \*\*\*\*,  $p < 0.0001$  (two-tailed Wilcoxon matched-pairs signed rank test). NETs, neutrophil extracellular traps; buffer, NETs purification buffer;  $M\phi$ , macrophages; RA, rheumatoid arthritis patients; HD, healthy donors.



**Figure 19. Comparison of IL-8 induction levels by macrophages from healthy donors and rheumatoid arthritis patients stimulated with NETs.**

Human monocyte-derived or -polarized M0 ( $n = 17$  independent experiments), M1-like ( $n = 13$ ), M2a-like ( $n = 14$ ), or M2c-like ( $n = 15$ ) macrophages (Mφ) of healthy subjects and human monocyte-derived or -polarized M0 ( $n = 16$ ), M1-like ( $n = 18$ ), M2a-like ( $n = 12$ ), or M2c-like ( $n = 16$ ) Mφ of rheumatoid arthritis patients were cultured in the presence of the purification buffer or NETs prepared, respectively, from healthy subjects and rheumatoid arthritis patients. IL-8 secretion was evaluated 24h later in the cell culture supernatants by ELISA. The IL-8 fold increase was calculated for all donors of each macrophage subpopulations by dividing the level of IL-8 secretion by macrophages cultured with NETs by the level of IL-8 secretion by the same macrophages cultured with the purification buffer. Symbols represent individual and independent donors. Values are the mean and SEM of all donors. \*,  $p < 0.05$  (two-tailed Mann-Whitney test); ns, not significant. NETs, neutrophil extracellular traps; buffer, NETs purification buffer; Mφ, macrophages; RA, rheumatoid arthritis patients; HD, healthy donors.

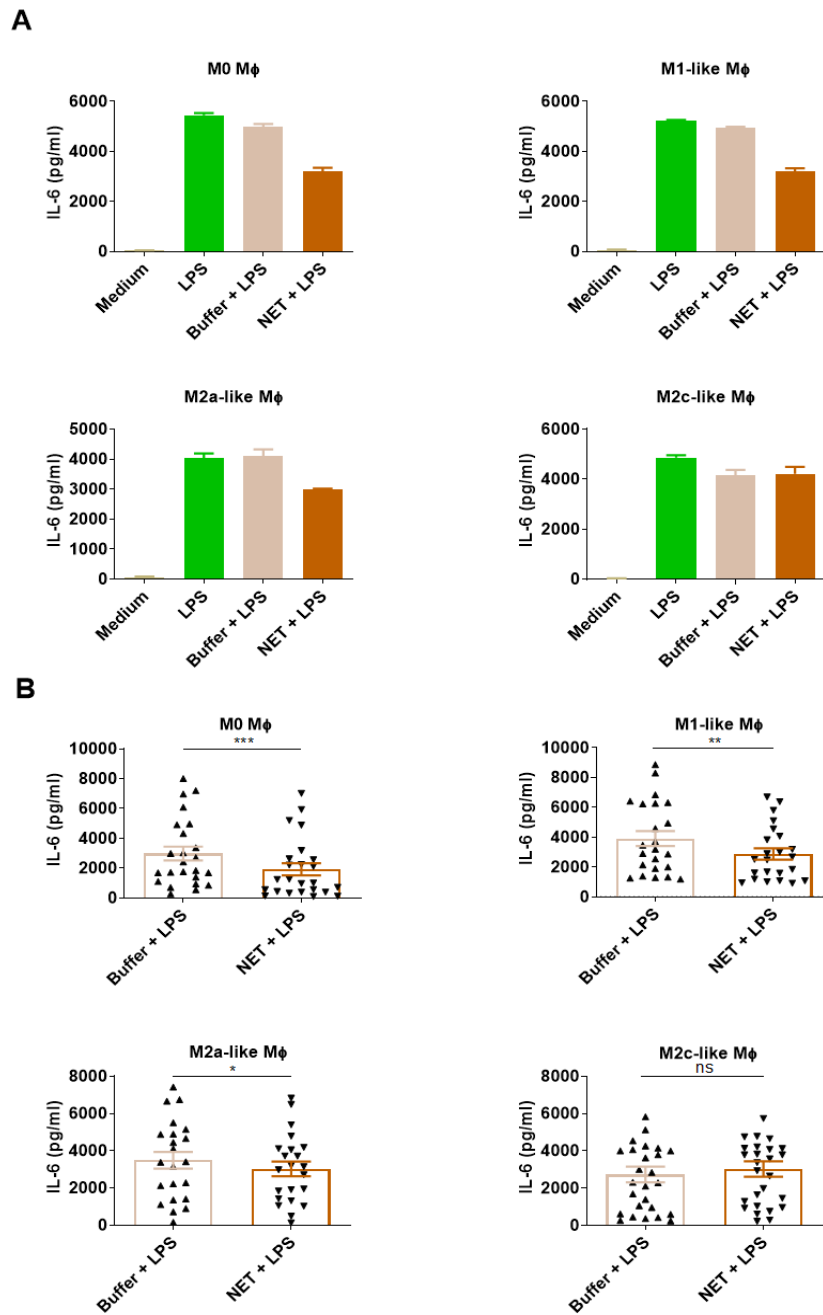


**Figure 20. Secretion of the anti-inflammatory IL-10 by macrophage subpopulations of healthy donors and rheumatoid arthritis patients stimulated with NETs.**

Human monocyte-derived or -polarized M0 ( $n=13$  independent experiments), M1-like ( $n=13$ ), M2a-like ( $n=13$ ), or M2c-like ( $n=14$ ) macrophages ( $M\phi$ ) of healthy subjects and human monocyte-derived or -polarized M0 ( $n=14$ ), M1-like ( $n=14$ ), M2a-like ( $n=12$ ), or M2c-like ( $n=16$ )  $M\phi$  of rheumatoid arthritis patients were cultured in the presence of the purification buffer or NETs prepared, respectively, from healthy subjects and rheumatoid arthritis patients. IL-10 secretion was evaluated 24h later in the cell culture supernatants by ELISA. Symbols represent individual and independent donors. Values are the mean and SEM of all donors. \*,  $p < 0.05$  (two-tailed Wilcoxon matched-pairs signed rank test); ns, not significant. NETs, neutrophil extracellular traps; buffer, NETs purification buffer;  $M\phi$ , macrophages; RA, rheumatoid arthritis patients; HD, healthy donors.

#### **I.4.3 The anti-inflammatory effect of NETs cytokine-dependent and may be compensated by their pro-inflammatory effects**

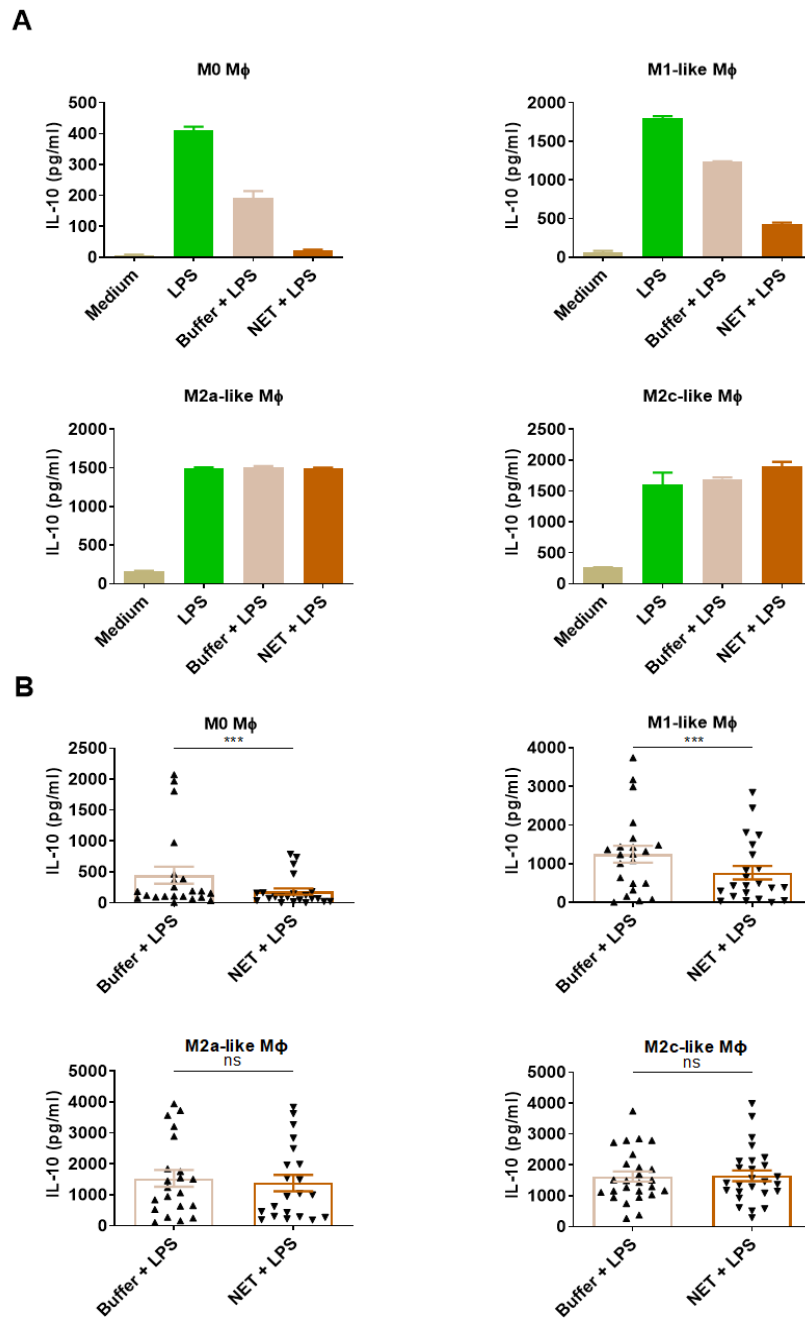
NETs are not only pro-inflammatory, they may also have anti-inflammatory properties. Indeed, they decrease the secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-6 by LPS-stimulated M0 M $\phi$  (Ribon et al., 2019). We then compared this effect on M0 M $\phi$  to the other macrophage subpopulations (M1-like M $\phi$ , M2a-like M $\phi$  and M2c-like M $\phi$ ) to test whether they display the same property. First, the typical response of each macrophage subpopulation stimulated with LPS, in the presence of LPS alone, the NETs purification buffer or NETs is depicted (Figure 21A, one representative donor). As depicted, all macrophage subpopulations secrete IL-6 in response to LPS alone or with LPS and the NETs purification buffer or NETs). Next, we focused on the effect of NETs on all macrophage subpopulations in the cumulated donors (Figure 6B, healthy donors and RA patients pooled). All four macrophage subpopulations secrete significant levels of IL-6 when cultured with LPS and NETs purification buffer. We then confirmed the previously observed results, showing that LPS-stimulated M0 M $\phi$  decrease IL-6 secretion in response to NETs (Figure 21B). we now also demonstrate that LPS-stimulated M1-like and M2a-like M $\phi$  display a reduced IL-6 secretion in response to NETs (Figure 21B). But surprisingly, anti-inflammatory M2c-like M $\phi$  stimulated with LPS did not decrease the secretion of the proinflammatory IL-6 in the presence of NETs.



**Figure 21. Modulation of IL-6 secretion by NETs on LPS-stimulated macrophage subpopulations.** (A) Representative experiment of at least 22 independent experiments in which human monocyte-derived or -polarized M0, M1-like, M2a-like, or M2c-like macrophages (M $\phi$ ) from a single donor were cultured in the presence of medium, LPS, the purification buffer and LPS or NETs and LPS from the same donor. The level of IL-6 secretion was then assessed 24 hours later in the cell culture supernatants by ELISA. Values are the mean and SEM of triplicates. (B) Human monocyte-derived or -polarized M0 (n=24 independent experiments), M1-like (n=23), M2a-like (n=22), or M2c-like (n=27) M $\phi$  of healthy subjects or rheumatoid arthritis patients were cultured in the presence of LPS supplemented with the purification buffer or NETs prepared, respectively, from healthy subjects or rheumatoid arthritis patients. IL-6 secretion was evaluated 24h later in the cell culture supernatants by ELISA. Symbols represent individual and independent donors. Values are the mean and SEM of all donors. \*,  $p < 0.05$  (two-tailed paired *t*-test); \*\*,  $p < 0.01$  (two-tailed paired *t*-test); \*\*\*,  $p < 0.005$  (two-tailed Wilcoxon matched-pairs signed rank test); ns, not significant. LPS, lipopolysaccharide; NETs, neutrophil extracellular traps; buffer, NETs purification buffer; M $\phi$ , macrophages.



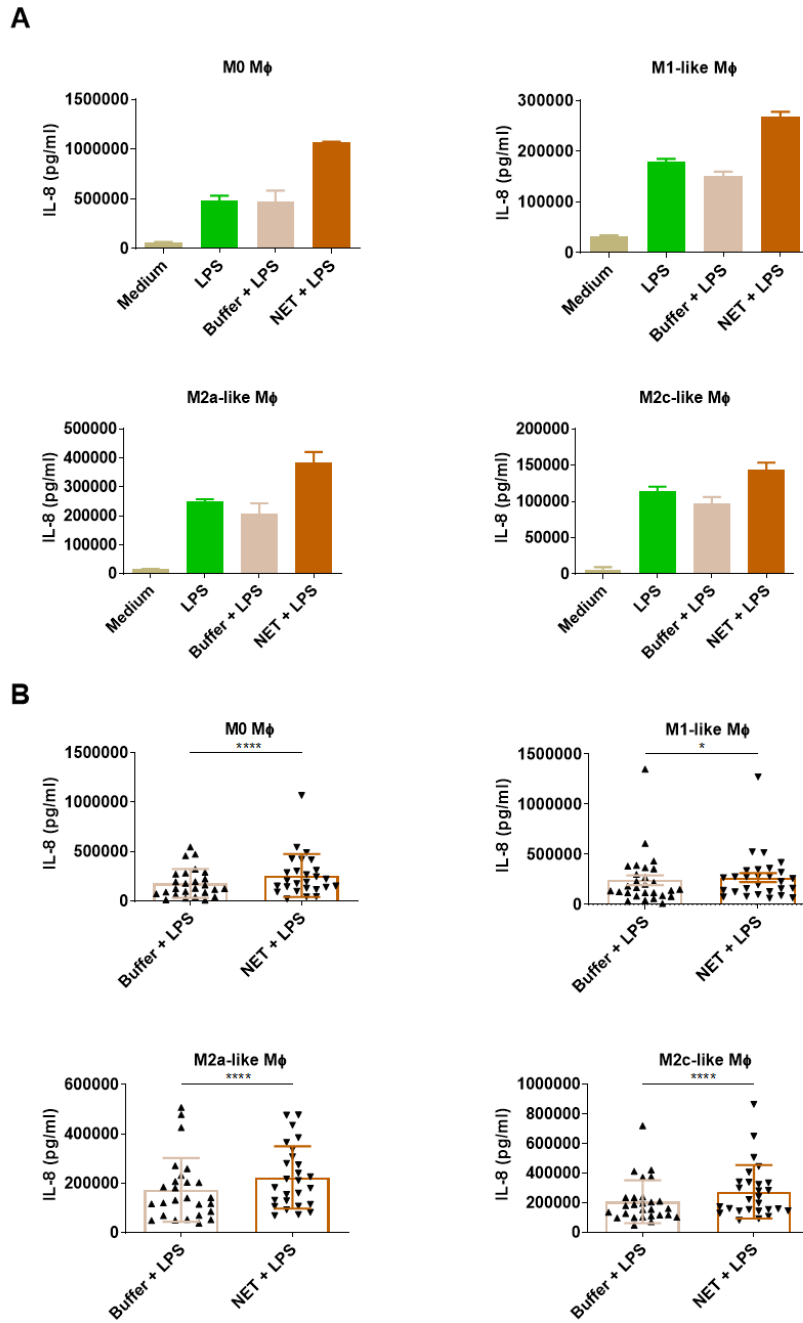
We then analyzed whether the secretion of the anti-inflammatory cytokine IL-10 by LPS-stimulated M0, M1-like, M2a-like and M2c-like M $\phi$  are also modulated by NETs (Figure 22). Figure 22A is a representative data of the culture conditions we have used for each donor. The result showed that all macrophage subpopulations secrete IL-10 in response to LPS alone or with LPS and the NETs purification buffer or NETs. We then analyzed IL-10 secretion in response to NETs on each LPS-stimulated macrophage subpopulation, on all cumulative individual donors (Figure 22B). Interestingly, the LPS-stimulated M0 and M1-like M $\phi$  decrease the secretion of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in response to NETs. In contrast, in M2-like macrophages, the induction of IL-10 by LPS was not modulated in the presence of NETs (Figure 22B). Thus, for M0 and M1-like LPS-stimulated M $\phi$ , but not M2a-like and M2c-like M $\phi$ , the decreased IL-6 secretion in response to NETs is associated with a decreased IL-10 secretion.



**Figure 22. Modulation of IL-10 secretion by NETs on LPS-stimulated macrophage subpopulations.**

(A) Representative experiment of at least 21 independent experiments in which human monocyte-derived or -polarized M0, M1-like, M2a-like, or M2c-like macrophages (M $\phi$ ) from a single donor were cultured in the presence of medium, LPS, the purification buffer and LPS or NETs and LPS from the same donor. The level of IL-10 secretion was then assessed 24 hours later in the cell culture supernatants by ELISA. Values are the mean and SEM of triplicates. (B) Human monocyte-derived or -polarized M0 (n=22 independent experiments), M1-like (n=22), M2a-like (n=21), or M2c-like (n=26) M $\phi$  of healthy subjects or rheumatoid arthritis patients were cultured in the presence of LPS supplemented with the purification buffer or NETs prepared, respectively, from healthy subjects and rheumatoid arthritis patients. IL-10 secretion was evaluated 24h later in the cell culture supernatants by ELISA. Symbols represent individual and independent donors. Values are the mean and SEM of all donors. \*\*\*,  $p < 0.0005$  (two tailed Wilcoxon matched-pairs signed rank test); ns, not significant. LPS, lipopolisaccharide; NETs, neutrophil extracellular traps; buffer, NETs purification buffer; M $\phi$ , macrophages.

To estimate the global pro/anti-inflammatory activity of NETs, we analyzed whether the addition of NETs to the cultures of LPS-stimulated macrophage subpopulations modulates IL-8 secretion. Our results show that for all LPS-stimulated macrophage subpopulations, addition of NETs appears to increase IL-8 secretion (Figure 23A, one representative donor). Indeed, when we analyzed the data for each macrophage subpopulation for all donors, LPS-stimulated M0 M $\phi$ , pro-inflammatory M $\phi$  but also anti-inflammatory M $\phi$  increase the secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-8 in the presence of NETs, showing an additive effect of LPS and NETs on IL-8 secretion (Figure 23B). All these data indicate that the impact of NETs on LPS-stimulated macrophages depends on the cytokine analyzed and suggest that, according to the huge amount of IL-8 produced, the anti-inflammatory effect of NETs on LPS-stimulated macrophages may be counterbalanced by the pro-inflammatory effect that they induce.



**Figure 23. Additive effect of NETs and LPS on IL-8 secretion by macrophage subpopulations.**

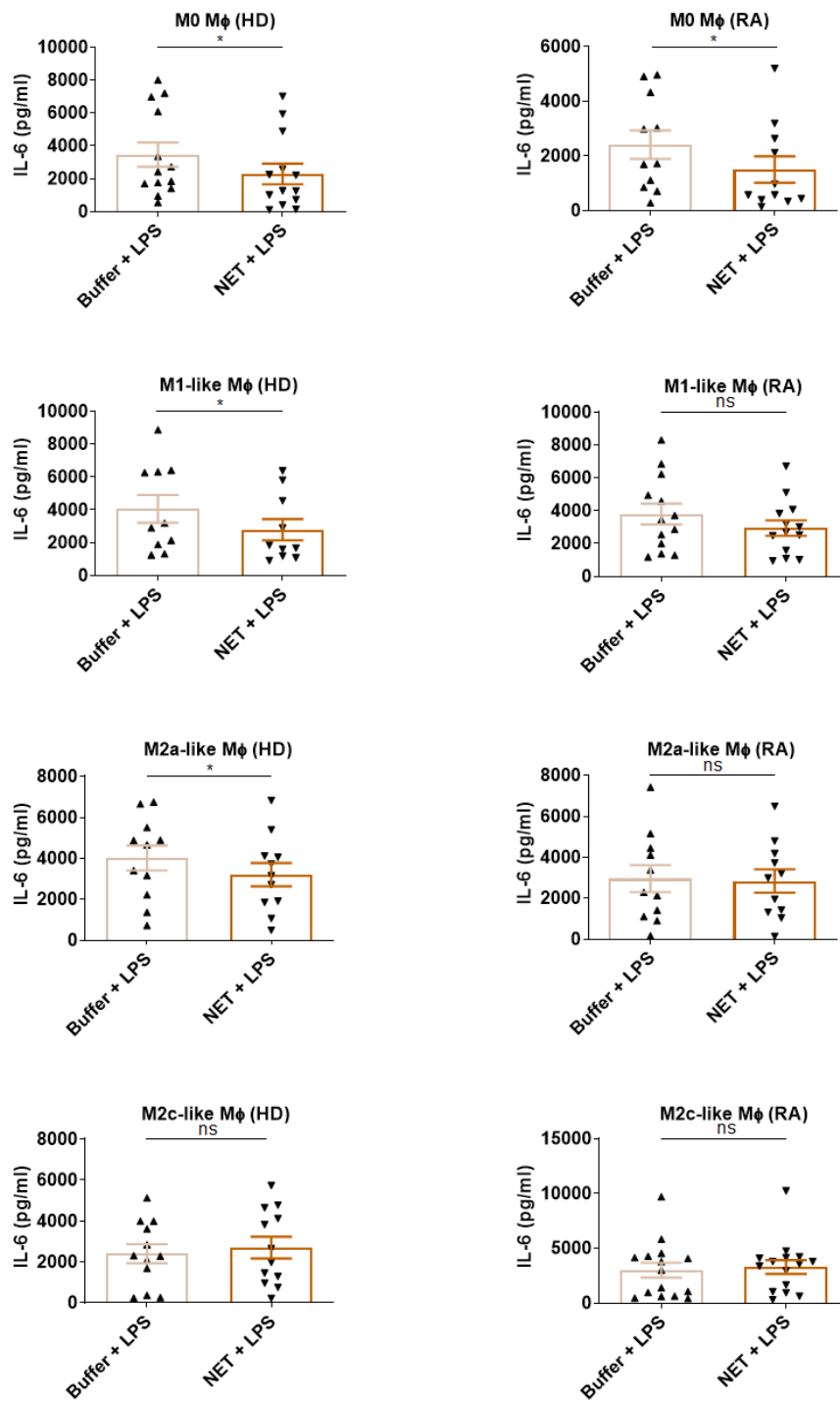
(A) Representative experiment of at least 26 independent experiments in which human monocyte-derived or -polarized M0, M1-like, M2a-like, or M2c-like macrophages ( $M\phi$ ) from a single donor were cultured in the presence of medium, LPS, the purification buffer and LPS or NETs and LPS, from the same donor. The level of IL-8 secretion was then assessed 24 hours later in the cell culture supernatants by ELISA. Values are the mean and SEM of triplicates. (B) Human monocyte-derived or -polarized M0 ( $n=26$  independent experiment), M1-like ( $n=28$ ), M2a-like ( $n=26$ ), or M2c-like ( $n=27$ )  $M\phi$  of healthy subjects or rheumatoid arthritis patients were cultured in the presence of LPS supplemented with the purification buffer or NETs prepared, respectively, from healthy subjects and rheumatoid arthritis patients. IL-8 secretion was evaluated 24h later in the cell culture supernatants by ELISA. Symbols represent individual and independent donors. Values are the mean and SEM of all donors. \*,  $p < 0.05$  (two-tailed Wilcoxon matched-pairs signed rank test); \*\*\*\*,  $p < 0.0001$  (two-tailed Wilcoxon matched-pairs signed rank test). LPS, lipopolisaccharide; NETs, neutrophil extracellular traps; buffer, NETs purification buffer;  $M\phi$ , macrophages.

#### **I.4.4 RA macrophages are resistant to the anti-inflammatory effect of NETs**

We then investigated whether the four subpopulations of LPS-stimulated macrophages respond differentially to NETs in RA patients in comparison to healthy individuals. First, we analyzed the secretion of IL-6. Our results show that LPS-stimulated M0 M $\phi$  decrease the IL-6 secretion in both healthy subjects and RA patients in response to NETs (Figure 24). On the contrary, in response to NETs, LPS-stimulated M1-like and M2a-like M $\phi$  from healthy subjects display an impaired IL-6 secretion but not LPS-stimulated M1-like and M2a-like M $\phi$  from RA patients, whereas M2c-like M $\phi$  do not modulate LPS-induced IL-6 secretion (Figure 24).

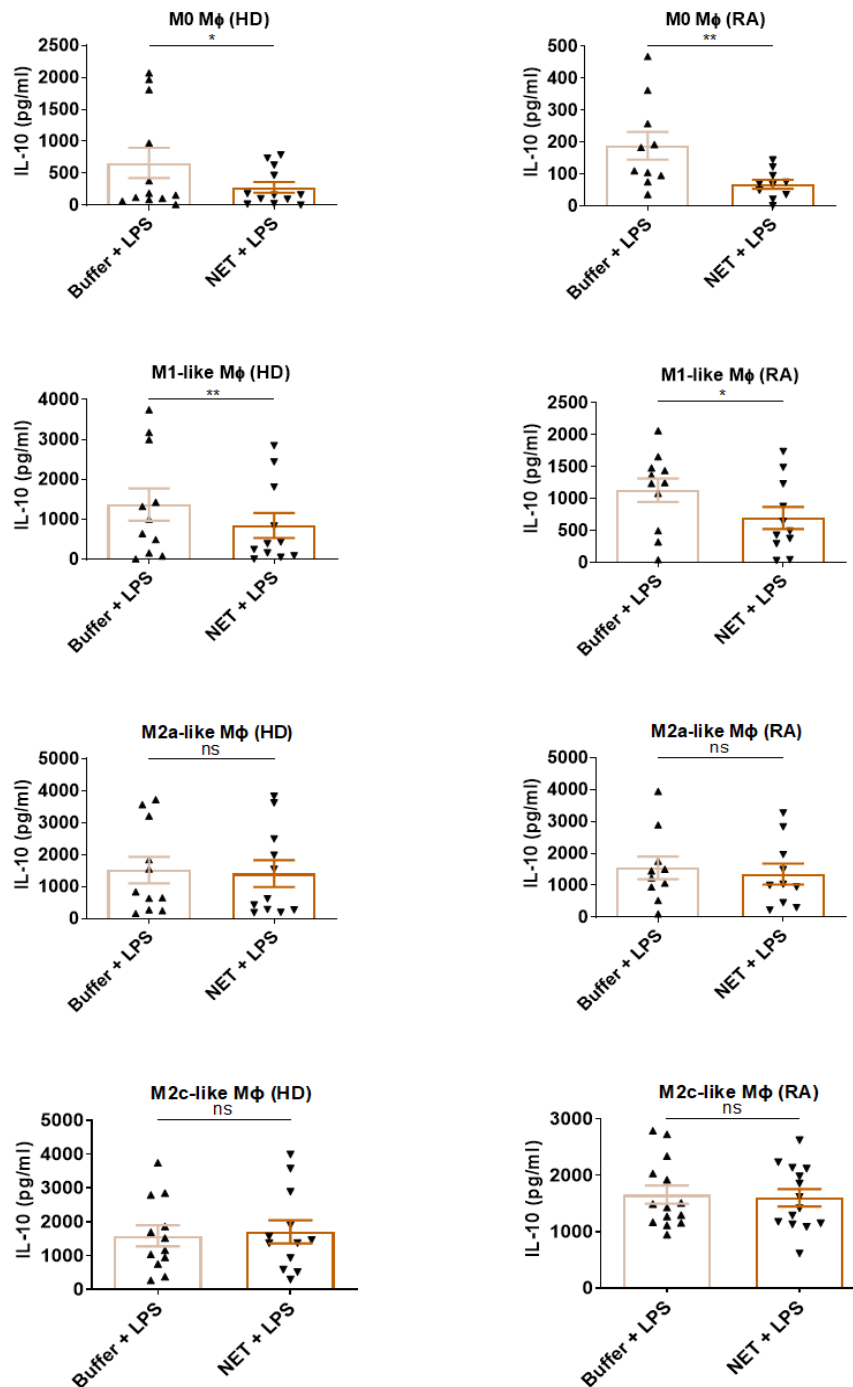
Next, we evaluated the modulation of the secretion of the anti-inflammatory cytokine IL-10, in response to NETs, by LPS-stimulated macrophage subpopulations, in healthy volunteers and RA patients. LPS-stimulated M0 and M1-like M $\phi$  from both healthy subjects and RA patients decreased IL-10 secretion in the presence of NETs, whereas LPS-stimulated M2-like macrophage subpopulations from healthy subjects as well as RA patients do not modulate IL-10 cytokine production in the presence of NETs (Figure 25).

Finally, we analyzed the secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-8 by LPS-stimulated macrophage subpopulations in response to NETs in healthy subjects and RA patients. Our results show that in M0, M2a-like and M2c-like M $\phi$  from both healthy subjects and RA patients, NETs increase LPS-induced IL-8 secretion (Figure 26). Interestingly, LPS-stimulated M1-like macrophages from healthy subjects do not modulate IL-8 secretion, while those from RA patients increase IL-8 secretion in the presence of NETs (Figure 26), showing an additive effect of NETs and LPS on IL-8 secretion only in RA pro-inflammatory macrophages. Altogether, those results indicate that RA macrophages are less sensitive to the anti-inflammatory activity of NETs than normal macrophages.



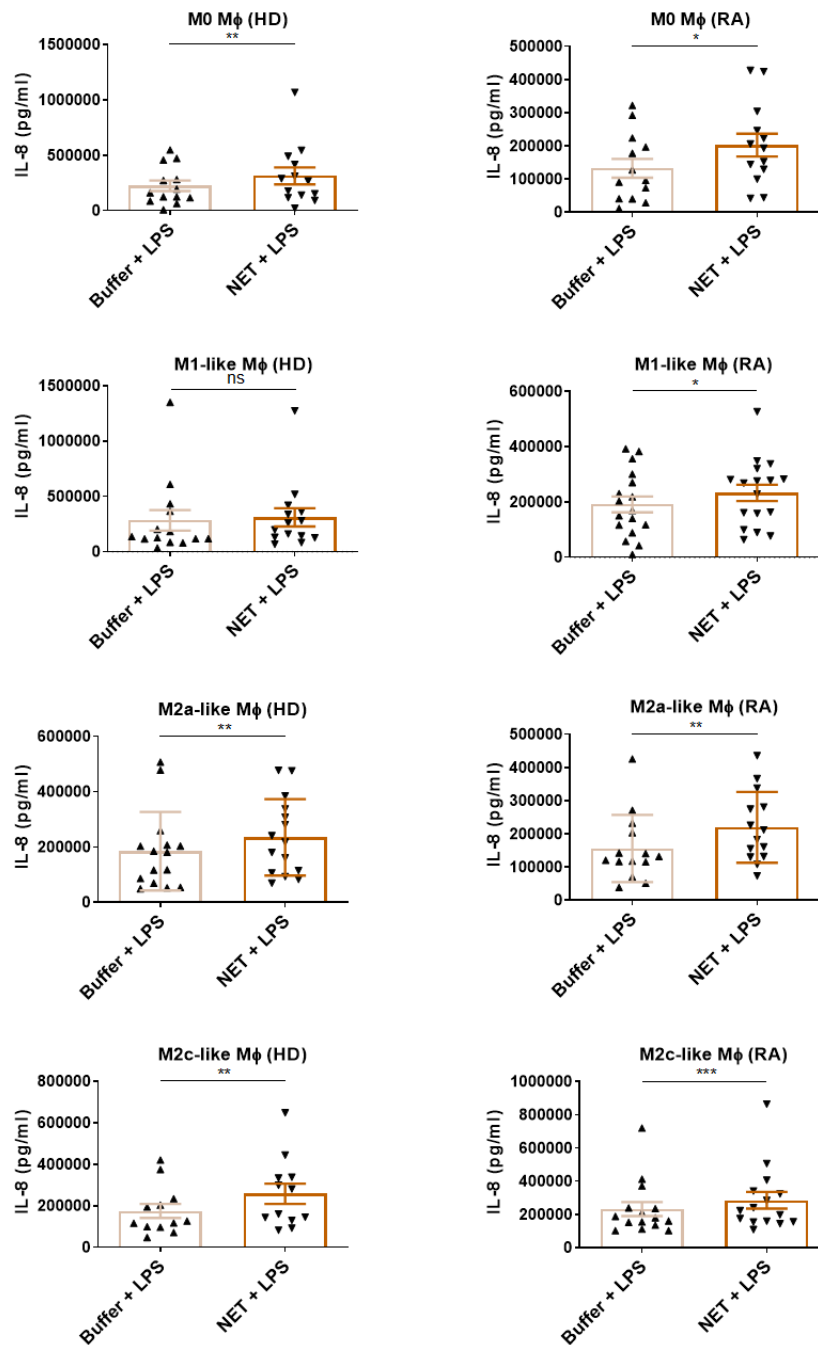
**Figure 24. Modulation of IL-6 secretion by NETs on LPS-stimulated macrophages of healthy donors and rheumatoid arthritis patients.**

Human monocyte-derived or -polarized M0 ( $n = 13$  independent experiments), M1-like ( $n = 10$ ), M2a-like ( $n = 11$ ), or M2c-like ( $n = 12$ ) macrophages ( $M\phi$ ) of healthy subjects and human monocyte-derived or -polarized M0 ( $n = 11$ ), M1-like ( $n = 13$ ), M2a-like ( $n = 11$ ), or M2c-like ( $n = 15$ )  $M\phi$  of rheumatoid arthritis patients were cultured in the presence of LPS supplemented with the purification buffer or NETs prepared, respectively, from healthy subjects and rheumatoid arthritis patients. IL-6 secretion was evaluated 24h later in the cell culture supernatants by ELISA. Symbols represent individual and independent donors. Values are the mean and SEM of all donors. \*,  $p < 0.05$  (two-tailed paired t-test); ns, not significant. LPS, lipopolysaccharide; NETs, neutrophil extracellular traps; buffer, NETs purification buffer;  $M\phi$ , macrophages; RA, rheumatoid arthritis patients; HD, healthy donors.



**Figure 25. Modulation of IL-10 secretion by NETs on LPS-stimulated macrophages of healthy donors and rheumatoid arthritis patients.**

Human monocyte-derived or -polarized M0 ( $n=12$  independent experiment), M1-like ( $n=11$ ), M2a-like ( $n=11$ ), or M2c-like ( $n=12$ ) macrophages ( $M\phi$ ) of healthy subjects and human monocyte-derived or -polarized M0 ( $n=10$ ), M1-like ( $n=11$ ), M2a-like ( $n=10$ ), or M2c-like ( $n=14$ )  $M\phi$  of rheumatoid arthritis patients were cultured in the presence of LPS supplemented with the purification buffer or NETs prepared, respectively, from healthy subjects and rheumatoid arthritis patients. IL-10 secretion was evaluated 24h later in the cell culture supernatants by ELISA. Symbols represent individual and independent donors. Values are the mean and SEM of all donors. \*,  $p < 0.05$  (two-tailed paired t test); \*\*,  $p < 0.005$  (two-tailed paired t test); ns, not significant. LPS, lipopolysaccharides; NETs, neutrophil extracellular traps; buffer, NETs purification buffer;  $M\phi$ , macrophages; RA, rheumatoid arthritis patients; HD, healthy donors.



**Figure 26. Additive effect of NETs and LPS on IL-8 secretion on macrophages subpopulations of healthy donors and rheumatoid arthritis patients.**

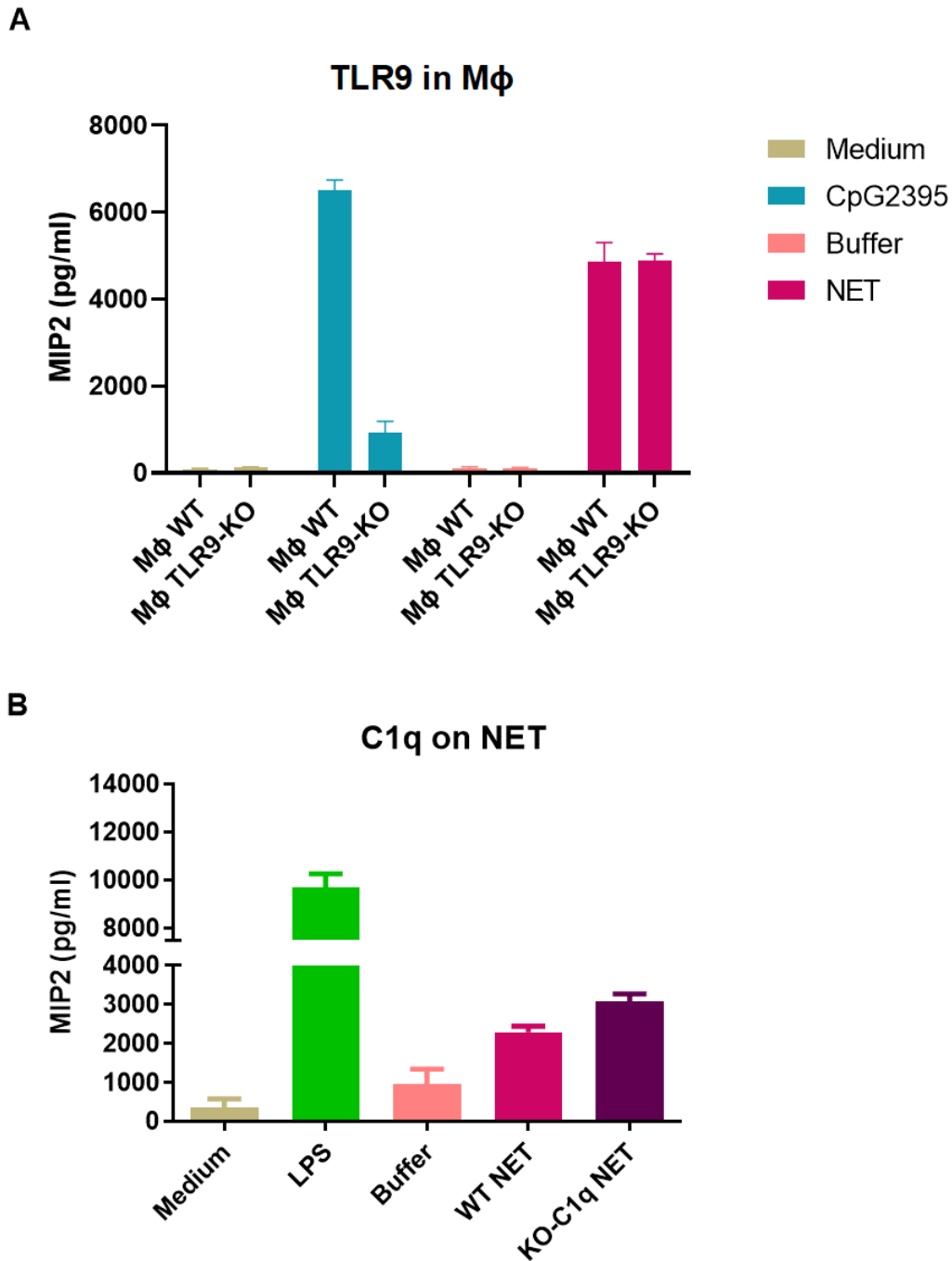
Human monocyte-derived or -polarized M0 ( $n=13$  independent experiment), M1-like ( $n=14$ ), M2a-like ( $n=15$ ), or M2c-like ( $n=12$ ) macrophages ( $M\phi$ ) of healthy subjects and human monocyte-derived or -polarized M0 ( $n=13$ ), M1-like ( $n=17$ ), M2a-like ( $n=14$ ), or M2c-like ( $n=15$ )  $M\phi$  of rheumatoid arthritis patients were cultured in the presence of LPS supplemented with the purification buffer or NETs prepared, respectively, from healthy subjects and rheumatoid arthritis patients. IL-8 secretion was evaluated 24h later in the cell culture supernatants by ELISA. Symbols represent individual and independent donors. Values are the mean and SEM of all donors. \*,  $p < 0.05$  (two-tailed paired t-test); \*\*,  $p < 0.005$  (two-tailed Wilcoxon matched-pairs signed rank test) for M0 and M2a-like  $M\phi$ ; \*\*,  $p < 0.005$  (two-tailed paired t-test) for M2c  $M\phi$ ; \*\*\*,  $p < 0.0005$  (two-tailed Wilcoxon matched-pairs signed rank test); ns, not significant. LPS, lipopolysaccharides; NETs, neutrophil extracellular traps; buffer, NETs purification buffer; RA, rheumatoid arthritis patients; HD, healthy donors.



#### **I.4.5 NETs activate macrophages in a TLR9-independent manner and C1q inside NETs is not crucial for macrophage activation**

In order to determine the mechanism of macrophage activation by NETs, we first investigated the role of TLR9. TLR9 is a receptor recognizing DNA rich in non-methylated CpG motifs and is expressed on macrophages (Latz et al., 2004). We therefore tested whether NETs activate macrophages by binding to TLR9. We have cultured macrophages from wild-type (WT) and TLR9-KO mice in the presence of NETs prepared from neutrophils of naive WT mice and analyzed the secretion of the cytokine macrophage inflammatory protein (MIP2). As a control, the TLR9 agonist (CpG2395) has stimulated WT macrophages and not TLR9-KO macrophages (Figure 27A). Importantly, NETs have activated both macrophages from WT and TLR9-KO mice, demonstrating that the activation of macrophages by NETs is not mediated by TLR9.

We then focused on complement protein C1q. C1q is deposited on NETs (Leffler et al., 2012), whereas C1q receptors are expressed on macrophages (Lay and Nussenzweig, 1968). We have previously shown that C1q modulates NETs-mediated macrophage activation (Ribon et al., 2019). However, whether this is mediated by C1q belonging to NETs is unknown. We therefore analyzed whether C1q inside NETs could mediate macrophage activation. To this purpose, we cultured WT macrophages with NETs prepared from neutrophils of WT or C1q-KO mice. NETs prepared from naive mice activated macrophages by overexpressing MIP2 but this activation was not decreased by NETs prepared from C1q-KO mice (Figure 27B). Thus, C1q present in the NETs was not required for macrophage stimulation.



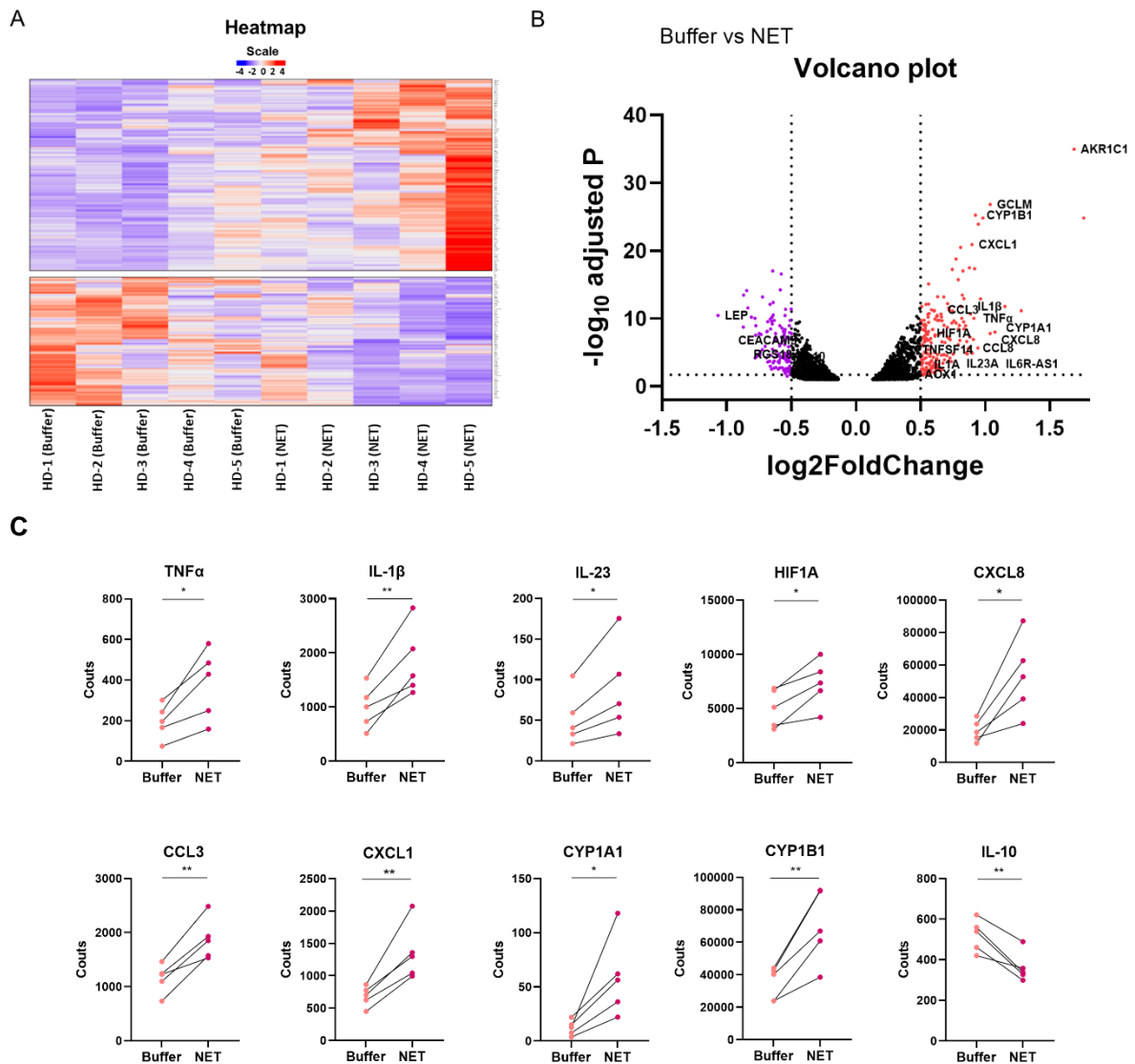
**Figure 27. Evaluation of the activation process of macrophages by NETs.**

(A) Representative experiment of 3 independent experiments in which macrophages derived from the bone marrow of wild-type (WT) and KO-TLR9 mice were cultured in the presence of medium, CpG 2395 (TLR9 agonist), the NETs purification buffer, or NETs prepared from native WT mice. The level of MIP2 secretion was then assessed 24 hours later in the cell culture supernatants by ELISA. Values are the mean and SEM of one representative experiment. (B) Representative experiment of 3 independent experiments in which bone marrow-derived macrophages from WT mice were cultured in the presence of medium, LPS, NETs purification buffer or NETs prepared from WT mice or KO-C1q mice. The level of MIP2 secretion was then assessed 24 hours later in the cell culture supernatants by ELISA. Values are the mean and SEM of triplicates of one representative experiment. LPS, lipopolisaccharide; TLR9; Toll like receptor 9, C1q; complement 1q; NETs, neutrophil extracellular traps; buffer, NETs purification buffer; M $\phi$ , macrophages.

#### **I.4.6 NETs trigger the aryl hydrocarbon receptor pathway in macrophages**

To determine the pathways activated by NETs in macrophages, we performed a transcriptome study of M1-like M $\phi$  stimulated with NETs prepared from a single RA patient in comparison to the NETs purification buffer. Our results show that 303 genes were significantly differentially expressed by M1-like M $\phi$  cultured with NETs (right) compared to M1-like M $\phi$  cultured with the NETs purification buffer (left) (Figure 28A), with 186 genes up-regulated by NETs (Figure 28A, top) and 117 genes down-regulated by NETs (Figure 28A, bottom). Volcano plot analysis (Figure 29B) shows that 2342 genes were differentially expressed and that many genes up-regulated by macrophages in the presence of NETs, as compared to the NETs purification buffer (upper right), are pro-inflammatory cytokines such as TNF $\alpha$ , IL-23, IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  or IL-6 receptor, as well as pro-inflammatory chemokines such as CXCL8, CCL8, CCL3 or CCL1 (Mantovani et al., 2004). Our results also show an increase in RNA expression of hypoxia-inducible transcription factors 1A (HIF1A), induced usually in the presence of hypoxia and oxidative stress (Haddad and Harb 2005) or genes involved in the promotion of osteoclastogenesis, like TNF superfamily 14 (TNFSF14) (Brunetti et al., 2014). Furthermore, there is an interesting increase in several genes regulated by the transcription factor aryl hydrocarbon receptor (AhR), including genes coding for cytochrome CYP1A1 and CYP1B1 (Fig. 28B). The engagement of the AhR pathway in NETs-stimulated macrophages is confirmed by pathway enrichment analysis of the induced genes, which illustrates that many of the induced pathways involve AhR (Data not shown). Finally, when we analyzed the gene expression level for each donor, we confirmed that for all subjects, there is an increased secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines such as TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-23, CXCL8, CCL3 and CXCL1, as well as HIF1A factor in response to NETs (Figure 28C). There is also a significant decrease in the anti-inflammatory cytokine IL-10. What is also very interesting is that the expression of the main targets of AhR, CYP1A1 and CYP1B1, are enhanced by macrophages

from each donor under in response to NETs compared with the NETs purification buffer (Figure 28C).



**Figure 28. NETs-regulated genes on macrophages.**

Human monocyte polarized M1-like macrophages of healthy subjects ( $n=5$ ) were cultured in the presence of the NETs purification buffer or NETs prepared from one rheumatoid arthritis patient. RNA was extracted 6h later and RNAsequencing was performed. (A) heatmap of scaled expression of the 303 differentially expressed genes in response to NETs (right) compared to the NETs purification buffer (left) (based on  $\log_2$  fold change  $> +0.5$  or  $< -0.5$ ). (B) Volcano plot showing the distribution of the 186 up-regulated genes (red) and 117 down-regulated genes (purple) out of the 2342 differentially expressed genes (black) in M1-like macrophages cultured with NETs compared to the NETs purification buffer (most significant genes are defined by a  $\log_2$  fold change  $> +0.5$  or  $< -0.5$  and  $-\log_{10}$  adjusted p value  $> 1.3$  (i.e.  $p < 0.05$ ). Each dot represents the expression of one gene on a pool of M1-like M $\phi$  from 5 healthy subjects. (C) Expression levels of TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-23, HIF1A, IL-10, CXCL8, CCL8, CXCL1, CYP1A1 and CYP1B1 by M1-like M $\phi$  cultured in NETs Buffer or NETs. Each line represents macrophages of a single donor. \*,  $p < 0.05$  (two-tailed paired t-test), \*\*,  $p < 0.001$  (two-tailed paired t-test). NETs, neutrophil extracellular traps; buffer, NETs purification buffer.

## **I.5 Discussion**

NETs are decondensed DNA filaments loaded with neutrophil proteins and secreted by neutrophils in the presence of inflammatory environment (Brinkmann et al., 2004). NETs are highly present in RA patients and their release is correlated with clinical and inflammatory parameters of RA (Khandpur et al., 2013; Pérez-Sánchez et al., 2017). Furthermore, macrophages are classified into two classes. Those that are rather pro-inflammatory (M1-like) and those that are rather anti-inflammatory (M2-like) (Mills et al., 2000). In RA, the phenotypic markers of both M1-like and M-2 like macrophages subsist (Ambarus et al., 2012b). Nevertheless, a pro-inflammatory profile of macrophages is predominant. Our hypothesis was then that NETs present in the inflammatory environment of RA patients might differentially activate macrophage subpopulations in a physiological context and in rheumatoid arthritis, with stronger activation of pro-inflammatory macrophages, this would explain the dominant pro-inflammatory profile of macrophages in RA. Indeed, we have previously shown that RA NETs are more efficient in triggering activation of resting M0 macrophages than NETs from healthy individuals (Ribon et al., 2019).

To further examine this hypothesis, we first differentiated monocytes into four macrophage subpopulations, including non-polarized macrophages (M0) in the presence of M-CSF, proinflammatory macrophages (M1-like) in the presence of IFN- $\gamma$ , and two types of anti-inflammatory macrophages (M2-like), cicatricial macrophages (M2a-like) in the presence of IL-4 and immunoregulatory macrophages (M2c-like) in the presence of IL-10. The phenotype of these macrophages was then assessed by analyzing different typical markers of these subpopulations by flow cytometry (Ambarus et al., 2012a). Using a slightly modified protocol, we have shown that each macrophage subpopulation was characterized by a differential expression of the six markers used (supplementary figure 29). Especially an up-regulation of the TLR4 co-receptor CD14 for M0 macrophages, an up-regulation of the Fc $\gamma$  type I receptor CD64

for M1-like macrophages, an up-regulation of the mannose receptor CD206 and the MAPK pathway inhibitory receptor CD200R for M2a-like macrophages and finally, an overexpression of the Fc $\gamma$  type II (CD32) and III (CD16) receptor, for M2c-like macrophages (supplementary figure 29B). It is important to remember that it is the combination of the differential expression of these six markers that characterizes a macrophage subpopulation.

The different macrophage subpopulations were then cultured with NETs. Macrophages from healthy subjects were always cultured with NETs from healthy subjects and macrophages from RA patients were cultured with NETs from RA patients.

In this study, we showed that NETs activate and induce a pro-inflammatory profile on resting macrophage subpopulations. Indeed, all macrophage subpopulations, including M2a-like and M2c-like macrophages, described as anti-inflammatory (Mantovani et al. 2004), secrete the pro-inflammatory cytokine IL-8 (Figure 16) and TNF $\alpha$  (data not shown) in response to NETs. Because the only difference in the composition of NETs and the purification buffer is the presence of neutrophils, we can exclude contamination by endotoxins.

Reciprocally, M2-like macrophages decrease inflammation by secreting IL-10, an anti-inflammatory cytokine that reduces the production of IL-6, IL-1, and TNF $\alpha$  by pro-inflammatory macrophages (Fiorentino et al. 1991). Our results show that NETs only induce a minimal IL-10 secretion (Figure 17). Thus, in addition to inducing pro-inflammatory cytokines in all macrophage subpopulations, NETs do not induce anti-inflammatory cytokine production by pro-inflammatory macrophages and M2c-like macrophages, tending the balance toward pro-inflammatory activation. As shown in supplementary figure 30, the IL-8/IL-10 secretion ratio induced by NETs is largely in favor of IL-8 in all resting macrophage subpopulations, especially in pro-inflammatory macrophages.

NETs also have an established anti-inflammatory effect because they decrease the secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-6 by LPS-stimulated M0 M $\phi$  (Ribon et al., 2019). Our results showed that NETs counteract this anti-inflammatory effect. In fact, very surprisingly anti-inflammatory M2c-like macrophages are resistant to NETs anti-inflammatory activity (Figure 21). Moreover, the induction of IL-10 by LPS on M0 and M1-like macrophages is decreased by NETs, while M2c-like and M2a-like macrophages do not modulate IL-10 secretion (Figure 22). Additionally, all subpopulations, including M2-like macrophages show an additive effect of NETs and LPS on the secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-8 (Figure 23), leading to very high levels compared with other cytokines (Figure 23).

We conclude that NETs alter the balance between pro- and anti-inflammatory cytokine secretion in favor of the induction of inflammation. In fact, NETs activate pro-inflammatory macrophages and significantly decrease the anti-inflammatory properties of M2-like macrophages, especially M2c-like macrophages (the typical IL-10 producers). Indeed, in response to NETs, M2c-like macrophages produce pro-inflammatory mediators and decrease the production of the anti-inflammatory IL-10. They are in addition resistant to the anti-inflammatory effect of NETs when they are stimulated with LPS and simultaneously increase LPS-induced IL-8 release.

Since macrophages induce a highly inflammatory profile in RA (De Rycke et al., 2005) and NETs activate a pro-inflammatory profile on macrophages, we hypothesized that NETs more significantly promote inflammation through macrophages from RA patients than from healthy subjects.

We showed that the pro-inflammatory effect of NETs on macrophages is more prominent in RA patients than in healthy subjects. In fact, interestingly the level of IL-8 induction is higher in anti-inflammatory M2c-like resting macrophages from RA patients than M2c-like resting

macrophages from healthy subjects (Figure 19). Furthermore, LPS-stimulated M1-like and M2a-like M $\phi$  from RA patients and not from healthy subjects are resistant to the anti-inflammatory effect of NETs on IL-6 secretion (Figure 24). Moreover, LPS-stimulated M1-like macrophages from healthy subjects do not modulate IL-8 secretion, whereas those from RA patients increase IL-8 secretion in the presence of NETs (Figure 26), showing a NETs-induced aggravation of inflammation in RA.

Next, we examined the macrophages activation mechanism by NETs. NETs are composed of DNA decorated with neutrophil proteins. DNA or proteins present in NETs can potentially be recognized by macrophages and activate them. TLR9 is a DNA receptor present on macrophages. We have previously suggested that macrophage activation by NETs is not mediated by endosomal TLRs, as blocking endosomal acidification did not affect macrophage activation by NETs (Ribon et al., 2019). Nevertheless, there are also plasma membrane TLR9s (Lindau et al., 2013) and we hypothesized that these TLR9s could recognize DNA from NETs. Using macrophages from WT and KO-TLR9 mice, we showed that macrophage activation by NETs is not mediated by TLR9 (Figure 27A).

Similarly, C1q can bind to NETs and we supposed that C1q could associate to its receptor on macrophages and activate them. By culturing macrophages with NETs from WT or C1q-KO mice, we showed that it is not the C1q present on the NETs that activates or is recognized macrophages (Figure 27B). As we have previously shown that C1q enhances the effect of NETs on macrophages this suggests that this is mediated by cell-free C1q binding to NETs and not by C1q released in association with NETs.

Finally, we studied the pathways induced in NETs-stimulated macrophages. We have shown that this activation involves several genes involved in the exacerbation of inflammation in RA (Figure 28). Indeed, we found an increase of several pro-inflammatory cytokines (TNF $\alpha$ ,



IL-23, IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6R) and genes involved in the recruitment of new immune cells and thus an exacerbation of inflammation (CXCL8, CCL8, CCL3 and CCL1). There is also an enhanced expression of factors involved in hypoxia, such as HIF1A, which is highly produced in the sublining layer of RA synovium and correlates with angiogenesis and inflammation induced in RA (Brouwer et al., 2009). There is also an increase in genes involved in osteoclastogenesis (TNFSF14), taking into account that osteoclasts are emblematic pathogenic cells of RA involved in bone resorption and bone destruction. Reciprocally, we observed a significant down-regulation of the anti-inflammatory gene IL-10. In particular, there is a very important involvement of genes induced downstream of the AhR pathway (CYP1A1 and CYP1B1), AhR being a transcription factor mainly involved in cell detoxification, suggesting that NETs trigger that pathway.

In conclusion, NETs unbalance the pro-/anti-inflammatory balance of macrophages in favor of an activation that exacerbates inflammation, especially in RA patients. Moreover, we show a new mode of activation of the AhR pathway never reported so far.

## **I.6 References**

**Adamopoulos, I.E., Sabokbar, A., Wordsworth, B.P., Carr, A., Ferguson, D.J., Athanasou, N.A.** (2006): Synovial fluid macrophages are capable of osteoclast formation and resorption. *J. Pathol.* 208: 35–43.

**Ambarus, C.A., Krausz, S., Eijk, M. van, Hamann, J., Radstake, T.R.D.J., Reedquist, K.A., Tak, P.P., Baeten, D.L.P.** (2012a): Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. *J. Immunol. Methods* 375: 196–206.

**Ambarus, C.A., Noordenbos, T., Hair, M.J.H. de, Tak, P.P., Baeten, D.L.P.** (2012b): Intimal lining layer macrophages but not synovial sublining macrophages display an IL-10 polarized-like phenotype in chronic synovitis. *Arthritis Res. Ther.* 14: R74.

**Botto, M., Dell’Agnola, C., Bygrave, A.E., Thompson, E.M., Cook, H.T., Petry, F., Loos, M., Pandolfi, P.P., Walport, M.J.** (1998): Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nat. Genet.* 19: 56–59.

**Brinkmann, V., Reichard, U., Goosman, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weirauch, Y., Zychlinsky, A.** (2004): Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 1532.

**Brouwer, E., Gouw, A.S.H., Posthumus, M.D., Leeuwen, M.A. van, Boerboom, A.L., Bijzet, J., Bos, R., Limburg, P.C., Kallenberg, C.G.M., Westra, J.** (2009): Hypoxia inducible factor-1-alpha (HIF-1alpha) is related to both angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 27: 945–951.

**Brunetti, G., Rizzi, R., Oranger, A., Gigante, I., Mori, G., Taurino, G., Mongelli, T., Colaianni, G., Di Benedetto, A., Tamma, R., Ingravallo, G., Napoli, A., Faienza, M.F., Mestice, A., Curci, P., Specchia, G., Colucci, S., Grano, M.** (2014): LIGHT/TNFSF14

increases osteoclastogenesis and decreases osteoblastogenesis in multiple myeloma-bone disease. *Oncotarget* 5: 12950–12967.

**Carmona-Rivera, C., Carlucci, P.M., Goel, R.R., James, E., Brooks, S.R., Rims, C., Hoffmann, V., Fox, D.A., Buckner, J.H., Kaplan, M.J.** (2020): Neutrophil extracellular traps mediate articular cartilage damage and enhance cartilage component immunogenicity in rheumatoid arthritis. *JCI Insight* 5:.

**Carmona-Rivera, C., Carlucci, P.M., Moore, E., Lingampalli, N., Uchtenhagen, H., James, E., Liu, Y., Bicker, K.L., Wahamaa, H., Hoffmann, V., Catrina, A.I., Thompson, P., Buckner, J.H., Robinson, W.H., Fox, D.A., Kaplan, M.J.** (2017): Synovial fibroblast-neutrophil interactions promote pathogenic adaptive immunity in rheumatoid arthritis. *Sci. Immunol.* 2:.

**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.

**Clavel, C., Ceccato, L., Anquetil, F., Serre, G., Sebbag, M.** (2016): Among human macrophages polarised to different phenotypes, the M-CSF-oriented cells present the highest pro-inflammatory response to the rheumatoid arthritis-specific immune complexes containing ACPA. *Ann. Rheum. Dis.* 75: 2184–2191.

**De Rycke, L., Baeten, D., Foell, D., Kruithof, E., Veys, E.M., Roth, J., De Keyser, F.** (2005): Differential expression and response to anti-TNFalpha treatment of infiltrating versus resident tissue macrophage subsets in autoimmune arthritis. *J. Pathol.* 206: 17–27.

**Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Mosmann, T.R., Howard, M., O'Garra, A.** (1991): IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md* 150 147: 3815–3822.

**Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., Akira, S.** (2000): A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408: 740–745.

**Iyer, S.S., Cheng, G.** (2012): Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. *Crit. Rev. Immunol.* 32: 23–63.

**Janossy, G., Panayi, G., Duke, O., Bofill, M., Poulter, L.W., Goldstein, G.** (1981): Rheumatoid arthritis: a disease of T-lymphocyte/macrophage immunoregulation. *Lancet Lond. Engl.* 2: 839–842.

**Kambas, K., Chrysanthopoulou, A., Vassilopoulos, D., Apostolidou, E., Skendros, P., Girod, A., Arelaki, S., Froudarakis, M., Nakopoulou, L., Giatromanolaki, A., Sidiropoulos, P., Koffa, M., Boumpas, D.T., Ritis, K., Mitroulis, I.** (2014): Tissue factor expression in neutrophil extracellular traps and neutrophil derived microparticles in antineutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis may promote thromboinflammation and the thrombophilic state associated with the disease. *Ann. Rheum. Dis.* 73: 1854–1863.

**Khandpur, R., Carmona-Rivera, C., Vivekanandan-Giri, A., Gizinski, A., Yalavarthi, S., Knight, J.S., Friday, S., Li, S., Patel, R.M., Subramanian, V., Thompson, P., Chen, P., Fox, D.A., Pennathur, S., Kaplan, M.J.** (2013): NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.* 5: 178ra40.

**Koch, A.E., Kunkel, S.L., Burrows, J.C., Evanoff, H.L., Haines, G.K., Pope, R.M., Strieter, R.M.** (1991): Synovial tissue macrophage as a source of the chemotactic cytokine IL-8. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 147: 2187–2195.

**Koch, A.E., Kunkel, S.L., Harlow, L.A., Johnson, B., Evanoff, H.L., Haines, G.K., Burdick, M.D., Pope, R.M., Strieter, R.M.** (1992): Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 90: 772–779.

**Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K.A., Monks, B.G., Knetter, C.F., Lien, E., Nilsen, N.J., Espevik, T., Golenbock, D.T.** (2004): TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat. Immunol.* 5: 190–198.

**Lay, W.H., Nussenzweig, V.** (1968): Receptors for complement of leukocytes. *J. Exp. Med.* 128: 991–1009.

**Leffler, J., Martin, M., Gullstrand, B., Tydén, H., Lood, C., Truedsson, L., Bengtsson, A.A., Blom, A.M.** (2012): Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 188: 3522–3531.

**Lindau, D., Mussard, J., Wagner, B.J., Ribon, M., Rönnefarth, V.M., Quettier, M., Jelcic, I., Boissier, M.-C., Rammensee, H.-G., Decker, P.** (2013): Primary blood neutrophils express a functional cell surface Toll-like receptor 9. *Eur. J. Immunol.* 43: 2101–2113.

**Linden, M. van der, Hoogen, L.L. van den, Westerlaken, G.H.A., Fritsch-Stork, R.D.E., Roon, J.A.G. van, Radstake, T.R.D.J., Meyaard, L.** (2018): Neutrophil extracellular trap release is associated with antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus and anti-phospholipid syndrome. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 57: 1228–1234.

**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.

**Mills, C.D., Kincaid, K., Alt, J.M., Heilman, M.J., Hill, A.M.** (2000): M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 164: 6166–6173.

**Pérez-Sánchez, C., Ruiz-Limón, P., Aguirre, M.A., Jiménez-Gómez, Y., Arias-de la Rosa, I., Ábalos-Aguilera, M.C., Rodríguez-Ariza, A., Castro-Villegas, M.C., Ortega-Castro, R., Segui, P., Martínez, C., Gonzalez-Conejero, R., Rodríguez-López, S., Gonzalez-Reyes, J.A., Villalba, J.M., Collantes-Estévez, E., Escudero, A., Barbarroja, N., López-Pedreira, C.** (2017): Diagnostic potential of NETosis-derived products for disease activity, atherosclerosis and therapeutic effectiveness in Rheumatoid Arthritis patients. *J. Autoimmun.* 82: 31–40.

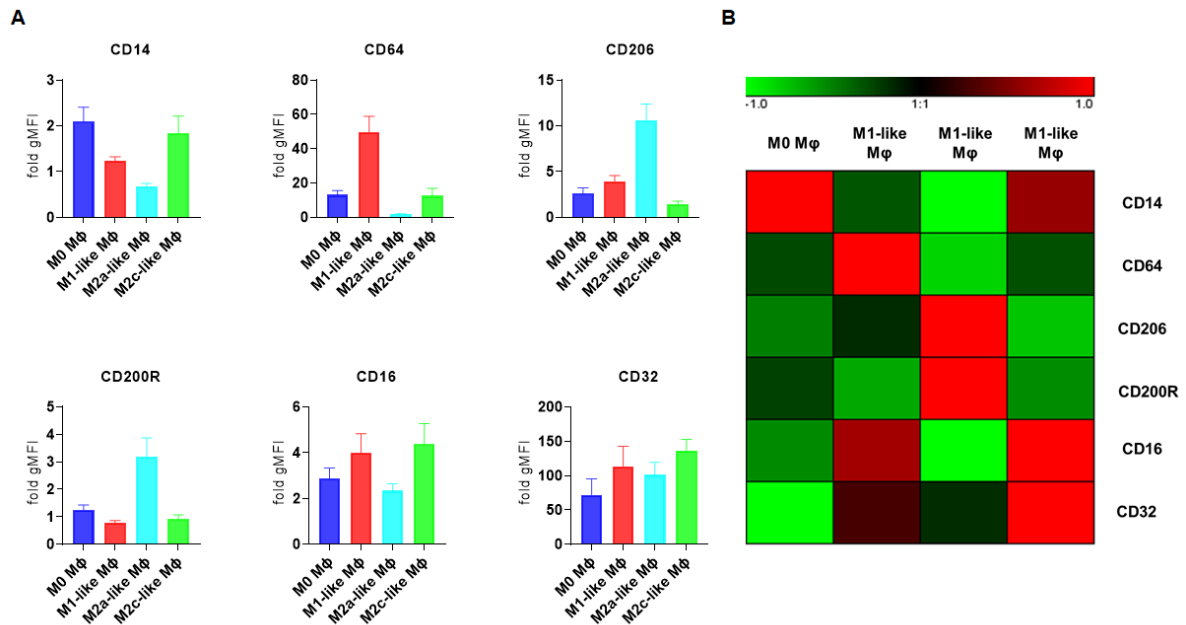
**Radner, H., Lesperance, T., Accortt, N.A., Solomon, D.H.** (2017): Incidence and Prevalence of Cardiovascular Risk Factors Among Patients With Rheumatoid Arthritis, Psoriasis, or Psoriatic Arthritis. *Arthritis Care Res.* 69: 1510–1518.

**Ribon, M., Seninet, S., Mussard, J., Sebbag, M., Clavel, C., Serre, G., Boissier, M.-C., Semerano, L., Decker, P.** (2019): Neutrophil extracellular traps exert both pro- and anti-inflammatory actions in rheumatoid arthritis that are modulated by c1q and Il-37. *J. Autoimmun.* 98: 122–131.

**Villanueva, E., Yalavarthi, S., Berthier, C.C., Hodgins, J.B., Khandpur, R., Lin, A.M., Rubin, C.J., Zhao, W., Olsen, S.H., Klinker, M., Shealy, D., Denny, M.F., Plumas, J., Chaperot, L., Kretzler, M., Bruce, A.T., Kaplan, M.J.** (2011): Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 187: 538–552.

**Wood, N.C., Dickens, E., Symons, J.A., Duff, G.W.** (1992): In situ hybridization of interleukin-1 in CD14-positive cells in rheumatoid arthritis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 62: 295–300.

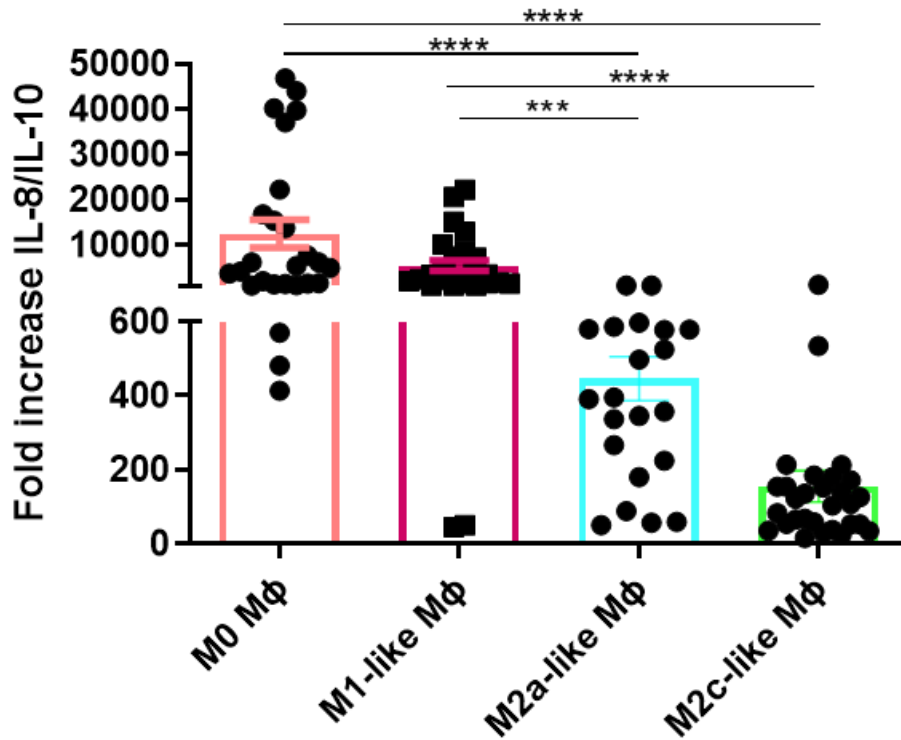
## I.7 Supplementary data



**Figure 29. Phenotypic characterization of macrophage subpopulations.**

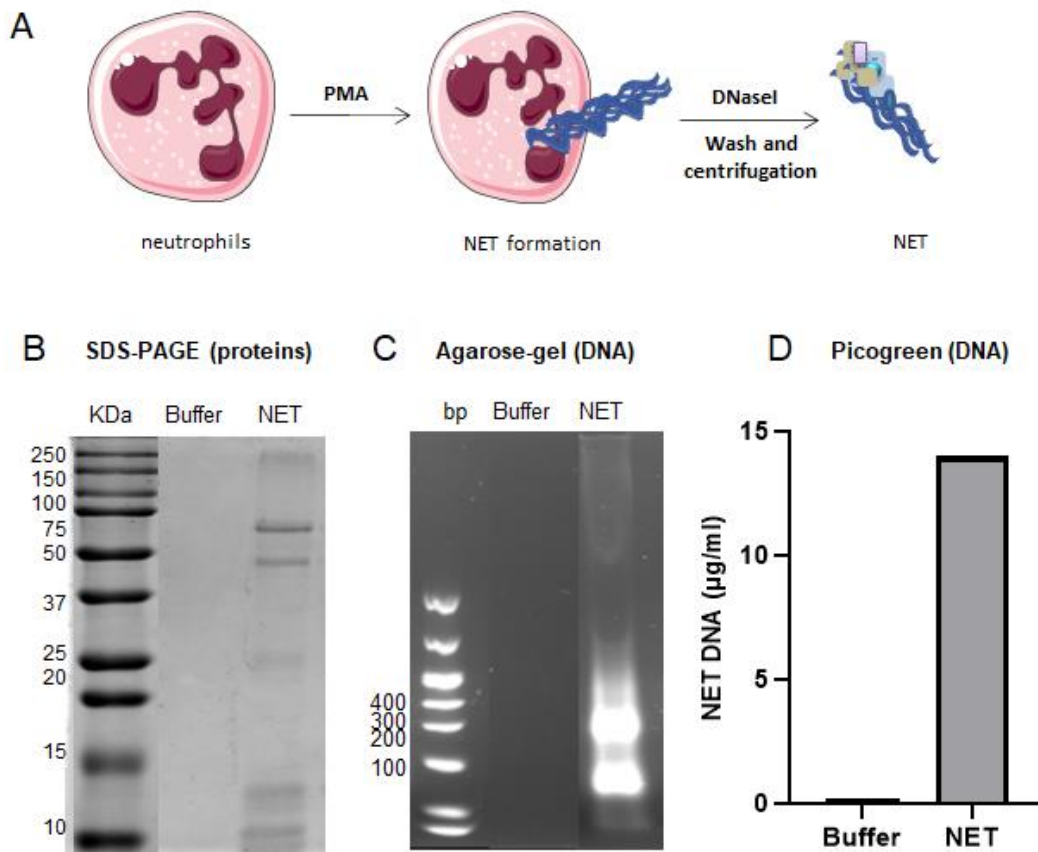
Human monocytes were differentiated during 7 days into M0 macrophages in the presence of M-CSF ( $n=5$  independent experiments), into M1-like macrophages in the presence of IFN- $\gamma$  ( $n=5$ ), into M2a-like macrophages in the presence of IL-4 ( $n=5$ ) and into M2c-like macrophages in the presence of IL-10 ( $n=5$ ). They were then stained with monoclonal antibodies specific for the indicated markers and analyzed by flow cytometry (A and B). (A) differential expression of CD14, CD64, CD206, CD200R, CD16 and CD32 surface markers among the four macrophage subpopulations. (B) correlation matrix of macrophage membrane markers expression levels by each macrophage subpopulation. Each colored square illustrates the correlation between two parameters. Red color illustrates a strong positive correlation, and green color illustrates a strong negative correlation. Mφ, macrophage.





**Figure 30. Determination of the secretory profile of macrophage subpopulations in response to NETs.**

Human monocyte-derived or -polarized M0 (n=26 independent experiment), M1-like (n=28), M2a-like (n=23), or M2c-like (n=29) macrophages (M $\phi$ ) of healthy subjects or rheumatoid arthritis patients were cultured in the presence of the purification buffer or NETs prepared, respectively, from healthy subjects and rheumatoid arthritis patients. IL-8 and IL-10 secretion was evaluated 24h later in the cell culture supernatants by ELISA. The IL-8/IL-10 ratio fold increase of the secretion levels of the pro-inflammatory cytokine IL-8 versus the anti-inflammatory cytokine IL-10 was calculated for each macrophage subpopulations of each donor. Symbols represent individual and independent donor. Values are the mean and SEM of all donors. \*\*\*,  $p < 0.005$  (Kruskal-Wallis test), \*\*\*\*,  $p < 0.0005$  (Kruskal-Wallis test). M $\phi$ , macrophages.



**Figure 31. NETs production and characterization.**

(A) Human neutrophils of healthy subjects or RA patients were activated by PMA to induce NETosis. After NETs induction, NETs were washed and treated neutrophils with DNase 1 to detach NETs. After a series of centrifugations to remove intact cells and cell debris, NETs were then collected. (B) Proteins present in NETs were analyzed by SDS-PAGE. C, NETs-derived DNA was assessed on agarose gel. D, NETs were quantified on a fluorometer by determining the DNA concentration using PicoGreen. Shown is one representative experiment of at least 40 independent experiments. NETs, neutrophil extracellular traps; Buffer, NET purification buffer; DNase 1, deoxyribonuclease 1 bp, base pair; KDa, kilodalton; ; PMA, phorbol myristate acetate.

## **II. Revue scientifique**

Dans cette revue nous avons discuté de l'hétérogénéité fonctionnelle des neutrophiles. Nous nous sommes particulièrement focalisés sur le rôle des NETs produits par ces cellules. Nous avons ainsi décrit les différents mécanismes de formation des NETs et leur implication dans la lutte contre les pathogènes envahisseurs, leurs fonctions délétères dans plusieurs pathologies et enfin leur implication dans la régulation de la réponse immune.

**Neutrophil extracellular traps (NET): not only antimicrobial but also  
immunomodulatory and regulators of inflammation**

Dyhia Melbouci<sup>1,2</sup>, Ahmad Haidar Ahmad<sup>1,2</sup> and Patrice Decker<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>University of Sorbonne Paris Nord, Li2P and <sup>2</sup>Inserm UMR 1125, Bobigny, France.

\*Corresponding author: Prof. Patrice Decker, University Sorbonne Paris Nord, Inserm UMR 1125, Li2P, 1 rue de Chablis, 93017 Bobigny, France. Phone: + 33 1 48 38 77 91; Fax: +33 1 48 38 88 93; e-mail: patrice.decker@univ-paris13.fr

List of abbreviations: ACPA, anti-citrullinated protein antibodies; ANCA, anti-neutrophil cytoplasmic antibodies; C5a, complement factor 5a; DAMP, damage-associated molecular pattern; DC, dendritic cells; IFN-I, type I interferon; LDG, low-density granulocytes; LPS, lipopolysaccharides; LTH, leukotoxic hypercitrullination; MPO, myeloperoxidase; NE, neutrophil elastase; NET, neutrophil extracellular traps; NOX, NADPH oxidase; PAD4, peptidyl-arginine deiminase 4; pDC, plasmacytoid DC; PMA, phorbol myristate acetate; PMN, polymorphonuclear neutrophils; RA, rheumatoid arthritis; RNP, ribonucleoprotein; ROS, reactive oxygen species; SLE, systemic lupus erythematosus; TLR, toll-like receptor.

Keywords: neutrophil extracellular traps; polymorphonuclear neutrophils; inflammation; autoimmunity; regulation.

## II.1 Summary

Polymorphonuclear neutrophils (PMN) represent one of the first lines of defense against invading pathogens and are the most abundant leukocytes in the circulation. Generally described as pro-inflammatory cells, recent data suggest that PMN also have immunomodulatory capacities. In response to certain stimuli, activated PMN expel neutrophil extracellular traps (NET), structures made of DNA and associated proteins. Although originally described as an innate immune mechanism fighting bacterial infection, NET formation (or probably rather an excess of NET together with impaired clearance of NET) may be deleterious. Indeed, NET have been implicated in the development of several inflammatory and autoimmune diseases as rheumatoid arthritis (RA) or systemic lupus erythematosus (SLE), as well as fibrosis or cancer. They have been suggested as a source of (neo)autoantigens or regulatory proteins like proteases or to act as a physical barrier. Different mechanisms of NET formation have been described, leading to PMN death or not, depending on the stimulus. Interestingly, NET may be both pro- and anti-inflammatory and this probably partly depends on the mechanism, and thus the stimuli, triggering NET formation. Within this review, we will describe the pro- and anti-inflammatory activities of NET and especially how NET may modulate both inflammatory and immune responses.

## **II.2 Introduction**

Polymorphonuclear neutrophils (PMN) are classically defined as terminally differentiated, non-dividing cells and short-lived cells dying after a few hours. They represent more than 50 % of blood leukocytes and are described as typical pro-inflammatory cells. Actually, they are among the first cells recruited at inflammatory sites. PMN are often viewed as basic cells acting through elementary functions, namely phagocytosis, production of reactive oxygen and nitrogen species, release of granules containing proteases and antimicrobial peptides as well as secretion of chemokines and pro-inflammatory cytokines as IL-8 and TNF. Although they represent key innate immune cells involved in response to infections, PMN are also activated during sterile inflammation, e.g. in response to endogenous ligands and especially damage-associated molecular pattern (DAMP), and therefore can exert beneficial or detrimental and even pathogenic roles. Surprisingly, although PMN are described as pro-inflammatory cells, they were until recently relatively sparsely studied in inflammatory diseases like rheumatoid arthritis (RA) and systemic lupus erythematosus (SLE), on which we will focus in this review. PMN have gained more interest since the discovery of neutrophil extracellular traps (NET). Although the aim here is not to detail the different signaling pathways leading to NET formation, we will discuss critical points to avoid confusion with other biological processes.

## **II.3 PMN: more sophisticated than believed**

However, vision on PMN has evolved during recent years. PMN have been reported to live up to 120 hours in vivo in zebrafish [1] while another group revealed an in vivo lifespan of 5.4 days for human blood PMN [2]. Moreover, non-classical functions of PMN have been identified, suggesting these cells are more complex than anticipated. PMN may acquire

phenotypic and functional properties of antigen-presenting cells, as surface expression of MHC II and costimulatory molecules and antigen presentation [3-5], revealing plasticity of human and mouse PMN. Even cross-presentation was reported [6;7]. We and others have shown that human and mouse PMN produce type I interferon (IFN-I) upon activation [8-10]. Likewise, we have shown that PMN express a functional cell surface toll-like receptor (TLR) 9 [11]. Importantly, PMN communicate with several innate immune cell types, such as natural killer cells [12] and influence directly or indirectly adaptive immunity, thus linking innate and adaptive immunity. Indeed, PMN interact and activate dendritic cells (DC) [12], whereas PMN and the pro-inflammatory Th17 lymphocytes chemoattract each other [13]. Interestingly, it is clear now that PMN also have immunomodulatory functions. Thus, there are B cell-helper PMN supporting antibody secretion through BAFF production [14]. Our data indicate that DAMP-activated PMN secrete soluble CD66b (soluble CEACAM8) [15], which is known to costimulate B lymphocytes or inhibit TLR2 response. Even IL-10-producing regulatory PMN have been described [16]. We have also reported that PMN cooperate with regulatory T lymphocytes to sustain the activity of the latter [17].

In addition to non-classical functions, neutrophil heterogeneity has become apparent with the description of PMN sub-populations in blood and tissues. First, Puellmann et al. reported a sub-population expressing a functional T-cell receptor leading to IL-8 secretion upon specific engagement [18]. More recently, PMN-DC hybrids with mixed phenotype and activity have been described [19]. One may anticipate that some of the above different functions may be attributed to neutrophil subsets, which however still have to be characterized.

Interestingly, particular functions or subsets have been identified in inflammatory conditions or specific pathologies, especially inflammatory autoimmune diseases. Thus, RA PMN differentiate into DC-like cells [20] and express RANKL [21] which play a key role in osteoclastogenesis. Moreover, PMN from RA patients express BAFF and IFN- $\alpha$  [22]. Synovial

fluid PMN from RA patients have a higher capacity to express cell surface MCH II and to induce T cell proliferation [23]. In psoriasis patients, skin PMN express IL-17 [24]. Regarding subsets, low-density granulocytes (LDG) with pro-inflammatory properties were first observed in SLE [25]. LDG are also present in RA patients and present different characteristics compared with autologous classical RA PMN, e.g., altered transcriptome and lower NET formation in response to phorbol myristate acetate (PMA) [26]. Then, a neutrophil population inhibiting T cell proliferation has been observed during systemic inflammation in healthy donors following endotoxin challenge [27]. More recently, immunosuppressive CD10<sup>+</sup> PMN inhibiting IFN- $\gamma$  production by T lymphocytes have been discovered in inflammatory conditions, namely granulocyte colony-stimulating factor-treated donors [28]. PMN represent thus a heterogeneous population.

Among the new neutrophil functions described during the last two decades, the formation of NET is particularly intriguing and exciting. It became a topic with intense research and is of particular interest in the field of inflammatory autoimmune diseases. It has also generated debates and controversies, especially potential NET triggers as well as mechanisms leading to NET formation, pathways involved and the methods to identify, characterize or analyze NET. The implication of NET in pathological conditions has shed new light on PMN, especially in SLE and RA. Here we will discuss the impact of NET on immune and inflammatory responses as well as the pathogenicity of NET, with a special focus on these two diseases.



## II.4 Understanding properly NET formation and NETosis

NET were first discovered in 2004 by Volker Brinkmann and colleagues [29]. They have shown that stimulation of neutrophils with PMA, lipopolysaccharide (LPS) or IL-8 induces the release in the extracellular environment of structures composed of nuclear DNA filaments decorated with histones, namely chromatin, and granular proteins but devoid of membrane. Importantly, these fibers are capable of trapping and killing gram-positive and gram-negative bacteria, making this process a new approach to the neutralization and removal of pathogenic bacteria by neutrophils. Since this work, the composition and role of NET have received a lot of interest and have been discussed and better characterized [30]. In fact, in addition to bacteria, NET are involved in host defense against fungal [31;32] and parasitic [33] infections. They also have antiviral properties [34]. Therefore, it has been proposed that NET are one of the means used by PMN to degrade microbes that have a too large diameter to be phagocytosed [35].

NET bind to pathogens by electrostatic interactions between NET-histones or NET-DNA and the membrane of microbes and thus prevent their dissemination. Once pathogens are captured, NET inactivate their virulent factors and eliminate them. To do this, numerous proteins have been shown associated with NET. Indeed, Urban et al. identified twenty-four proteins in PMA-induced NET, including some cytoplasmic proteins [36]. Interestingly, it has been demonstrated that, the antimicrobial effect mediated by NET passed especially through histones [29], cathelicidin (LL37 in humans) [37] as well as calprotectin (S100A8/A9) [36]. Some of these proteins kill microbes by forming membrane pores. Similarly, an antimicrobial activity has been reported for DNA [38]. Reciprocally, as a defense mechanism, bacteria have developed evading strategies against NET, e.g. via the secretion of nucleases [39]. And in turn, LL37 confers resistance of NET against bacterial nucleases [40].

After NET extrusion in Brinkmann's original model, neutrophils die by a new process called NETosis which differs from apoptosis or necrosis [41]. This classical mechanism is triggered by PMA, LPS, IL-8 or some viable bacteria and occurs in 2-4 hours. This is the canonical mechanism and is sometimes named suicidal NETosis. However, it is known now that several mechanisms and pathways are involved in NET formation [42;43], depending on the stimulus, and not all of them leads to cell death. The latter alternative mechanisms are named vital (or live) NETosis. Likewise, other NET-inducing stimuli have been discovered. Further investigation is required to determine to which extent the different mechanisms are linked to the physiological function of NETosis, i.e. antimicrobial activity.

Thus, the term "NETosis" should only be used when NET extrusion is accompanied with neutrophil death, or at least "suicidal" or "vital" should be included. Otherwise, the correct term is "NET formation" [30].

NET formation is triggered by several stimuli: parasites [44], immobilized immune complex (IC) [45], activated platelets [46], cytokines like IL-8 [29], bacteria like *Staphylococcus aureus* and their products such as LPS [41], *Candida albicans* [47;48] or HIV-1 [34]. However, the most used in vitro is PMA, which induces classical NETosis. PMA activates protein kinase C which in turn activates mitogen-activated protein kinase signaling pathway and then the multimeric NADPH oxidase (NOX) complex [49]. NOX produces reactive oxygen species (ROS) which are both required for NETosis [41]. ROS primarily trigger the dissociation and activation of neutrophil elastase (NE) from the azurosome complex, which translocates into the nucleus where it partially degrades histones, promoting partial decondensation of chromatin. Secondly, myeloperoxidase (MPO) enters the nucleus. It acts synergistically with already present NE to enhance chromatin decondensation independently of its enzymatic activity [50;51]. MPO is however required for NETosis as PMN from MPO-deficient individuals fail to form NET in response to PMA [48]. Some non-PMA NET inducers

activate peptidyl-arginine deiminase 4 (PAD4), which citrullinates e.g. histones, inducing the reduction of the positive charges of these proteins, their destabilization and a greater chromatin decondensation [52]. In response to PMA, histone citrullination is very low, but detectable in primary human PMN. More recently, it has been shown that NETosis is dependent on gasdermin D [53] and that neutrophils that enter NETosis also activate aspects of cell cycle signaling such as cyclin-dependent kinases 4 and 6 without DNA replication and cytokinesis [54]. In addition, NETosis may involve necroptosis signaling pathway [55] and autophagy [56]. All these molecular events lead to chromatin decondensation and disintegration of the nuclear envelope. As a result, the cytoplasm and karyoplasm become intertwined, the plasma membrane ruptures, and NET are released into the extracellular space [41].

Regarding vital NETosis, it can be accomplished by rapidly (one hour) ejecting mitochondrial DNA bound to granular proteins in a ROS-dependent manner [57]. Indeed, mitochondrial NET are generally produced after priming PMN with GM-CSF, followed by stimulation with LPS or complement factor 5a (C5a) and preserves membrane integrity. The question is whether this mechanism refers to NET formation or defective mitophagy (see below) [58]. Non-suicidal pathways of genomic NET formation have also been described. Indeed, activation of PMN by *Staphylococcus aureus* in vivo and in vitro results in nuclear condensation which is followed by the separation of inner and outer membranes of nucleus. Subsequently, transport vesicles containing nuclear DNA are formed and burgeon through the plasma membrane into the extracellular space, without breach of the plasma membrane in rapid kinetics (5-60 minutes). Once in the external environment the vesicles rupture and NET are released [59;60]. This mechanism is NOX-independent and bactericidal. Intact anuclear PMN or cytoplasts have been observed in vivo and may retain some functions, such as chemotaxis and phagocytosis. However, citrullination levels were not evaluated in these two models.

The function of PAD4 in NET production is the subject of much discussion, especially in the field of RA (see below). Some studies suggested the need for PAD4 to induce NET formation in response to specific stimuli [61-63]. Citrullination of histone H3 was even observed in response to PMA [61]. However, other reports highlight that NET are normally formed in the absence of functional PAD4 [43]. This may be explained firstly by the fact that not all NET activators induce histone citrullination [43]. The latter study suggests that citrullination occurs during NET formation, but that PAD activity is not necessary. Furthermore, the presence of citrullinated histones on NET may be the result of extracellular citrullination by PAD2 (which is also expressed by PMN) and PAD4 enzymes, which are released from the cytoplasm when neutrophils are activated [64]. Finally, the role of PAD4 in neutrophil physiology is not limited to citrullination. PAD4 may be involved in NETosis independently of citrullination. PAD4 associates with and activates NOX2 but activated PAD4 prevents the association of the NOX complex, which is essential to produce NET by certain stimuli such as PMA [65]. The confusion may also come from the variety of stimuli described which are not always specific for NETosis.

These divergences on the mechanisms of NET induction (vital NET or by NETosis) have resulted in several studies confusing NETosis with other extra-cellular DNA induction mechanisms, such as leukotoxic hypercitrullination (LTH) and defective mitophagy. LTH is a strategy used by pathogens to eliminate target cells or host immune cells. It is induced by proteins that form transmembrane pores (either bacterial toxins or host perforins and complement), causing a large influx of ions into the cytosol of the target cells and cytolysis. The increase in intracellular calcium induces an abnormally high activation of PAD, and histone hypercitrullination [66]. This mechanism is mimicked *in vitro* by stimulating PMN with calcium ionophores and leads to nuclear DNA release. It is NOX-independent and not bactericidal. NETosis, on the contrary, is a strategy developed by the cells in order to eliminate

pathogens [29]. NET release does not necessarily result in intracellular calcium influx [43] or citrullination [43;67]. On the other hand, mitophagy is a control mechanism for removing damaged mitochondrial components [68]. However, this mechanism is inefficient in human PMN, leading to extrusion of mitochondrial DNA and proteins (defective mitophagy) [69], which is a normal process, but may be enhanced in response to inflammatory signals like LPS and C5a [57]. Moreover, when mitochondrial DNA undergoes oxidation, it is transported to lysosomes for degradation [69]. However, in IFN-I-primed healthy PMN and lupus PMN, this transport is defective after stimulation with immune complexes. As a result, oxidized DNA accumulates in the mitochondria and is finally extruded as an oxidized mitochondrial DNA-protein complex (also classified as defective mitophagy) which is interferogenic [69]. Release of this DNA has no antimicrobial activity and is dependent on mitochondrial ROS, and not on NOX as in mitochondrial NET [57]. Thus, although LTH and defective mitophagy differ from NETosis, the question remains whether the material extruded may be classified as NET. Indeed, PMN stimulations with calcium ionophores [42;43] or GM-CSF/C5a [57] release complexes made of granular proteins associated with nuclear or mitochondrial DNA, respectively.

## **II.5 Involvement of NET formation in diseases**

For the reasons mentioned above, we focused here on studies either using classical NET inducers or depicting well characterized NET and not studies dealing only with extracellular DNA release.

To support a physiological role of NET, the existence of NET *in vivo* was first demonstrated in shigellosis in rabbits and in human appendicitis [29]. Moreover, NET were shown to enhance bacteria trapping *in vivo* in mice upon cooperation with platelets activated

through TLR4 [70]. Then, vital vesicular NETosis was confirmed in vivo during Gram-positive skin infections in mice and humans [60].

However, besides the physiological and protective effects of NET in response to invading pathogens, NET have been described in several diseases, especially in inflammatory and/or autoimmune diseases and fibrosis. NET can be beneficial and protective, e.g. through anti-inflammatory activity, but in most cases they have a detrimental and pathogenic role in these diseases where they stimulate immune responses through their pro-inflammatory, antigenic (which is particularly true in RA and SLE) and immunogenic activities. NET work as a source of autoantigens and DAMP or may even be considered as DAMP themselves. As such, they may be key endogenous ligands involved in sterile inflammation.

Thus, in gout, monosodium urate crystals induce NET formation [71] which limits inflammation [72]. Likewise, in patients suffering from chronic granulomatous disease, characterized by NOX2 mutations, ROS-dependent NET formation is impaired and results in recurrent bacterial and fungal infections. These patients are also more prone to develop autoimmune syndromes [73], suggesting a protective role of NET.

On the contrary, a pathogenic role of NET has been reported during fibrosis, where pro-fibrotic agents trigger NET and then NET activate fibroblasts and differentiation in myofibroblasts with increased collagen production [74]. In biopsies from patients with lung and skin fibrotic lesions, NET were detected close to fibroblasts. Moreover, NET are involved in thrombus formation by inducing platelet activation and aggregation, as well as fibrin deposition, and are detected in deep vein thrombosis in baboons [75]. Likewise, NET are involved in severity of sterile lung inflammation in mice [76]. During inflammation, NET may lead to vascular occlusion and organ damage, which is normally controlled by extracellular deoxyribonucleases [77]. NET also impair wound healing, especially in diabetes [78] where

PMN from patients extruded more DNA spontaneously or after ionomycin stimulation. Likewise, PMN from healthy individuals extruded more DNA in response to PMA or ionomycin when exposed to high glucose concentration. It should be noted that glucose alone also stimulated DNA release. Thus, altered metabolic regulation, e.g. via the glycolytic pathway, may predispose PMN to form NET. Furthermore, energy metabolism and mitochondria involvement in NET release is supported by the fact that glycolytic ATP production is required for NET formation after GM-CSF priming and subsequent C5a stimulation [79]. Indeed, PMN lacking the mitochondrial protein OPA1 have a decreased ATP production through glycolysis and fail to release NET.

Regarding inflammatory autoimmune diseases (Table 1), NET are also present in skin biopsies from psoriatic patients and contain the pro-inflammatory cytokine IL-17A, which is involved in psoriasis pathogenesis [24]. Similarly, NET were observed in situ in lesional skin biopsy of patients with bullous pemphigoid and blister fluids from patients induces NET formation *ex vivo* [80]. Interestingly, in autoimmune small-vessel vasculitis, anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) trigger *in vitro* formation of NET which are found deposited in inflamed kidneys of patients [81]. Moreover, injection of NET-loaded DC induce ANCA production in mice [82]. In a mouse model of atherosclerosis, NET are induced by cholesterol crystals, leading to Th17 activation and participate in plaque formation [83]. Particularly, it is now believed that NET may also play a pathogenic role in SLE or RA, as a result of increased NET formation, decreased clearance or altered composition. In SLE, a PMN sub-population (LDG) has a higher capacity to form NET in response to PMA and NET are detected in skin and kidney lesions from patients [84]. Moreover, sera from a subgroup of lupus patients have an impaired NET-degrading activity, which correlates with high titers of anti-double stranded DNA autoantibodies (precisely a lupus marker) [85]. However, in different experimental lupus models, using NOX2-deficient or PAD4-deficient mice, NET have been suggested to be

protective [86-88]; nevertheless, NOX2 and PAD4 are also involved in cellular processes other than NET formation. Similarly, RA PMN produce more NET, either spontaneously or in response to LPS and NET are present in rheumatoid nodules [89]. In addition, we and others have shown that anti-citrullinated protein antibodies (ACPA)-rich IgG purified from RA patients bind to NET [89;90] or even induce NET formation [89], ACPA being RA-specific autoantibodies. Likewise, RA sera bind to activated PMN and NET [91] and monoclonal antibodies generated from RA synovial B lymphocytes have a strong reactivity against citrullinated histones and PMA-induced NET [92]. As NET formation is associated with citrullination (at different levels) in response to some stimuli, NET may be a source of RA autoantigens and either the targets of ACPA or even the autoantigen triggering ACPA production. Interestingly, in a RA mouse model consisting of HLA-DR4-transgenic in which fibroblast-like synoviocytes loaded with RA NET were injected in the synovial space, animals develop ACPA and show impaired cartilage integrity, without however overt arthritis [93].

## **II.6 Impact of NET formation on the regulation of immune and inflammatory responses**

Anew we focused here on well characterized NET structures containing DNA and proteins, or induced by well characterized NET inducers, essentially PMA, LPS, crystals, autoantibodies/immune complexes, cytokines but also calcium ionophores. Indeed, although calcium ionophore-induced NET has been suggested as a different process [58], they contain extracellular DNA co-localized with chromatin and NE [43]. Likewise, although structures made of mitochondrial DNA usually do not contain granular proteins, they may play an important role in SLE (especially when enriched in oxidized DNA). Only PMN stimulated with GM-CSF and then LPS or C5a produce such NET containing MPO and NE [57] but this



stimulus is rarely used to analyze effects of NET on immune cells. Thus, NET containing mitochondrial DNA were also suggested as resulting from a different process [58] but will be mentioned due to their potential pathogenic activity in SLE in response to disease-associated stimuli like ribonucleoprotein (RNP)-containing immune complexes or anti-RNP autoantibodies. Moreover, we focused on data generated with primary cells and not cell lines, either for generating NET or for cells targeted by NET. The data described here refer to the immunomodulatory activities of NET rather than their role as autoantigens.

Using a short differentiation protocol (3 days with M-CSF), NET have been shown to be taken up by human monocyte-derived macrophages [94]. Healthy donor NET did not induce (either pro- or anti-inflammatory) cytokine secretion by resting macrophages from healthy donors, although a slight but significant induction of IFN- $\alpha$  was observed, and was thus described as a silent process (Figure 1). Nevertheless, concentrations of NET used to stimulate macrophages were not indicated. Interestingly, NET-mediated induction of IFN- $\alpha$  was also reported for healthy donor plasmacytoid DC (pDC) [95]. Likewise, stimulation of healthy donor monocyte-derived DC with NET from healthy donors was not associated with DC activation as estimated by HLA-DR and CD80/83/86 expression [96]. Cytokine secretion is reported to be unaffected.

On the contrary, using a 6-day differentiation protocol, we have shown that NET from healthy donors induce the secretion of pro-inflammatory cytokines, but not IL-10, by resting M-CSF-differentiated monocyte-derived macrophages [90]. Activation was associated with HLA class I and class II as well as CD86 up-regulation. A similar pro-inflammatory response was triggered by healthy donor NET on unprimed healthy donors PMN. One plausible hypothesis to explain the difference with above results is that highly mature or differentiated macrophages are more responsive to NET. However, and in agreement with our results and a pro-inflammatory response induced by NET, Farrera and Fadeel reported that although NET do

not trigger cytokine secretion by macrophages, they potentiate IL-1 $\beta$ , TNF and IL-6 secretion by LPS-stimulated macrophages [94]. Interestingly, NET also influence cells from adaptive immunity. In healthy individuals, NET can directly prime resting CD4<sup>+</sup> T lymphocytes [97]. NET-induced activation is TCR-dependent but does not trigger T-cell proliferation. In coculture, NET induce cluster formation, upregulation of the activation markers CD25 and CD69, and phosphorylation of the TCR-associated signaling kinase ZAP70 in CD4<sup>+</sup> T cells. Moreover, NET increase T-cell responses to specific antigens, making T cells capable of being activated by sub-optimal stimuli. Although NET-primed T lymphocytes do not proliferate, in the presence of resting DC and without specific antigens (a condition which does not induce resting T-cell activation), resting CD4<sup>+</sup> T cells proliferate and secrete IFN- $\gamma$ . Importantly, this study also confirms indirectly the stimulatory potential of NET on DC. Indeed, when cocultured with DC and only in the presence of NET, both unprimed purified CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were activated. Regarding CD4<sup>+</sup> lymphocytes, NET trigger activation of both naïve and memory cells in the presence of DC. Likewise, in bulk PMBC without previous NET priming, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes are activated by NET, which is probably enhanced by DC and other antigen-presenting cells [97]. Likewise, NET are able to trigger polyclonal activation of memory B lymphocytes from healthy individuals and to induce total IgG secretion [98]. Using complexes made of purified DNA and granular proteins (especially LL37) to mimic NET, authors have shown that these structures are internalized and activate B lymphocytes partly in a TLR9-dependent manner.

Besides their physiological capacity to trigger immune cell activation, similar properties of NET have also been reported in different pathological situations. First of all, we and others have reported that in vitro PMN from RA patients release more NET than PMN from healthy individuals, either spontaneously or after stimulation [89;90;99]. Similar results were obtained in the mouse collagen-induced arthritis model in which bone marrow PMN from diseased mice

produce more NET in vitro than PMN from normal mice [99]. Likewise, freshly isolated lupus LDG (but not classical PMN from SLE patients or healthy individuals) have an enhanced capacity to form NET in vitro [84]. Particularly, we have recently shown that RA NET are more efficient in activating macrophages and PMN than healthy donor NET, leading to the secretion of the pro-inflammatory cytokines IL-8, IL-6 and the key RA cytokine TNF [90]. These data indicate that, in RA, NET formation is increased, and that NET are more active than in healthy individuals. Similarly, NET from RA patients have been shown to activate (although moderately) myeloid DC from healthy volunteers, and with a higher activity than healthy donor NET, as shown by HLA-DR/CD86 upregulation and IL-6/TNF secretion [99]. In RA, autoantibodies induce NET formation in vitro and RA NET stimulate fibroblast-like synoviocytes (the cells invading cartilage in RA) to secrete IL-6 and IL-8 [89] and to upregulate MCH class II upon internalization of NET [93], leading to presentation of NET peptides and T-cell activation. Similarly, in an in vitro mouse cell culture model, ovalbumin-loaded DC have a higher capacity to stimulate ovalbumin-specific CD4<sup>+</sup> T cells from OT-II mice when DC are treated with NET from collagen-induced arthritis mice as compared to NET from control mice, as shown by the increased frequency of IFN- $\gamma$ -producing Th1 cells [99], demonstrating increased antigen-presenting cell functions after NET treatment. Likewise, NET-recognizing antibodies are detected in SLE patients [85] and lupus NET spontaneously produced by LDG stimulate IL-1 $\beta$  and IL-18 secretion by LPS-primed macrophages from healthy individuals [100]. Mature (cleaved) IL-1 $\beta$  was secreted and associated with caspase-1 activation, indicating inflammasome involvement. In addition, NET induced in PMN from healthy donors and SLE patients increase calcium flux in macrophages from healthy donors and SLE patients, whereas NET spontaneously formed by lupus LDG were less efficient [101]. NET induced in classical SLE PMN also trigger TNF and IL-6 secretion in lupus macrophages, and especially TNF, but also IL-10, secretion in response to NET was higher in lupus macrophages versus normal

macrophages. In support of a pathogenic role of NET in SLE, LDG-derived NET impair endothelium-dependent vasorelaxation in vitro [102]. In addition, lupus anti-RNP autoantibodies induce formation of NET containing LL37, a DNA-binding protein facilitating DNA uptake by pDC, in SLE but not healthy PMN [103]. Those anti-RNP-induced lupus NET trigger the activation of healthy pDC and the secretion of IFN- $\alpha$ , a key lupus cytokine, in a TLR9-dependent manner [103]. Likewise, PMN stimulated with RNP-containing immune complexes release oxidized mitochondrial DNA inducing IFN- $\alpha$  production in PBMC in a STING-dependent manner [104]. Such complexes are also spontaneously released by lupus LDG. Lupus patients produce also circulating ANCA, e.g. anti-LL37 antibodies. Importantly, in ANCA-positive SLE patients but not in healthy donors, anti-LL37-induced NET (which also contain LL37) trigger the production of ANCA, and especially anti-LL37 antibodies, by memory SLE B cells in an antigen-dependent manner [98]. Similarly, type 1 diabetes is a Th1-mediated autoimmune disease. In monocyte-derived DC cultures with autologous NET, patient NET contribute to a significant increase in DC maturation markers, inflammatory cytokine production as compared to normal NET-DC cultures. DC capacity to induce IFN- $\gamma$ -producing T lymphocytes (both Th1 and CD8+ cells) was enhanced in DC-T cell cocultures with patient NET and this does not result from the direct effect of NET on T cells. Using RNA-seq analysis, patient NET were shown to downregulate TGF- $\beta$  while upregulating IFN- $\alpha$  in healthy donor DC [105].

In addition to direct effects on cells, NET can also act indirectly via immune complexes. Indeed, as evoked above, NET are also targets of autoantibodies in several diseases (e.g. ACPA in RA, NET-binding antibodies in SLE, ANCA in patients with vasculitis) although those antibodies are not always characterized. For example, what is recognized in NET by lupus autoantibodies is not clear (DNA? or are they true “anti-NET” antibodies recognizing tertiary NET structure?). In RA, there are probably also non-ACPA antibodies binding to NET. Among

classical ANCA, anti-proteinase 3 and anti-MPO are the most frequent autoantibodies. NET are thus a source of autoantigens. These immune complexes may become pathogenic upon recognition through Fc receptors. NET can also become more active in immune complexes. In SLE, anti-LL37 antibodies induce formation of NET containing LL37 [95]. Although NET alone stimulate pDC to secrete IFN- $\alpha$ , this secretion is strongly enhanced in the presence of anti-LL37 antibody, which is abrogated by a TLR9 inhibitor [95]. As other immune complexes, NET-containing immune complexes may bind complement and be even stronger recognized by cells expressing complement receptors.

On the contrary, NET may be anti-inflammatory or may at least limit inflammation in some circumstances. Indeed, we have shown that NET inhibit the response of LPS-stimulated macrophages, leading to reduced IL-6 (but not IL-8 or TNF) secretion, whereas IL-10 secretion was enhanced [90]. This was observed with both NET from healthy individuals or RA patients and on both macrophages from healthy individuals or RA patients. Interestingly, although NET activate also resting PMN, LPS-stimulated PMN are not responsive to inhibition by NET [90]. Similarly, NET from healthy individuals partly inhibit LPS-induced maturation of normal myeloid DC, as shown by reduced HLA-DR, CD40, CD80 and CD86 upregulation as well as reduced secretion of both pro-inflammatory (e.g. TNF or IL-8) and immunomodulatory cytokines (IL-10) [96]. This was associated with a lower ability of DC to stimulate CD4<sup>+</sup> lymphocyte proliferation and altered CD4<sup>+</sup> lymphocyte polarization (reduced IL-10 and Th1/Th17 cytokine secretion, increased Th2 cytokines). Such inhibitory activities of NET on myeloid cells were not observed by Farrera et al., especially not the impaired IL-6 secretion by LPS-stimulated macrophages [94]. This might be explained by the different protocol used to differentiate macrophages from monocytes in that study, harvesting macrophages after 3 days instead of 6 days, which probably generates less differentiated cells. The lower differentiation

status of those macrophages might also explain why they do not respond directly to NET in the absence of LPS.

Finally, NET are immunomodulatory by targeting directly key immune proteins. Free NET (not only NET-containing immune complexes) bind the C1q complement protein and activate the complement cascade, leading to the production of the C5a anaphylatoxin [106]. Thus, non-degraded NET may participate in complement consumption and inflammation in SLE. These NET-complement complexes may also be recognized by cells expressing complement receptors. On the opposite, in some circumstances NET directly degrade some PMN-derived cytokines, especially pro-inflammatory cytokines and chemokines (as well as IL-10), conferring anti-inflammatory properties to NET. This may happen only at sites where PMN are highly concentrated, generating aggregated NET, as observed in gout tophi where monosodium urate crystals induce NET formation [72]. This mechanism depends on NET-associated serine proteases; PMN from patients affected by Papillon-Lefèvre syndrome, characterized by nonfunctional PMN serine proteases and intense periodontal inflammation, produce NET unable to degrade inflammatory mediators [107].

It should be noted that although NET directly act on different immune cell types, resulting in enhanced or impaired cell activity, those effects can be modulated by cofactors able to bind NET, such as C1q and LL37 which recognize DNA, provided the target cells express cell surface receptors for C1q or LL37 [90].

## **II.7 What have we learned from in vitro studies?**

The numerous data described in the present review clearly indicate that NET are extracellular structures composed of DNA and a set of proteins that may vary depending on the

stimuli, the physiological or pathological context and, accordingly, to the pathways and/or the mechanisms triggered during NET formation, although many of these proteins are overlapping. Some of them may be modified or altered, either by post-translational modifications (e.g. citrullination), partial degradation or cleavage as observed with histones [36]. Therefore, the simple measure of cell-free DNA, without at least testing whether DNA forms complexes with proteins and testing known NET proteins (or even better characterizing associated proteins) should not be used as a surrogate to estimate the presence of NET in biological fluids or cell culture supernatants. Likewise, citrullinated histone H3 is found during NET formation, but not in response to all stimuli, and therefore is not a clear NET marker. Moreover, citrullination of histones is not only and specifically induced during NET formation and thus additional tools have to be used simultaneously to refer to NET. As an alternative, NET-detecting sandwich ELISA have been developed that measure extracellular complexes made of DNA and MPO or NE. This approach is more NET-specific but might also only partly reflect the extent of NET formation. Indeed, these ELISA may only detect NET induced by some stimuli and they assume that such complexes are only released during NET formation and not during other cellular processes or by monocytes which also express MPO.

Regarding in vitro cell activation assays with NET prepared from isolated neutrophils, it is preferable to use NET obtained from adherent activated PMN (detached by vigorous pipetting or mild nuclease digestion) rather than NET-containing cell culture supernatants to avoid transferring on target cells the stimulus or e.g. cytokines induced by that stimulus. Likewise, adding target cells directly on adherent NET is not recommended as some NET-inducing stimuli or cytokines induced may adhere to plastic [90]. These approaches can however be used for NET staining, screening of NET-recognizing antibodies and eventually for memory B-cell restimulation.

In all cases, we suggest using primary PMN instead of cell lines and, when working with mouse PMN, Ly-6G<sup>+</sup> and not Gr-1<sup>+</sup> cells should be used [108]. For cell activation assays, NET prepared from highly purified PMN should be used.

Although PMA is the best characterized inducer of NET (especially NETosis), using more physiological stimuli to analyze the impact of NET in different mechanisms and pathologies would be important for a better understanding. However, it is also one of the most often used inducers because it triggers high levels of NET formation. Some bacteria or LPS-derived bacteria would represent an alternative and are also strong inducer, but they are not more relevant for the study of inflammatory and autoimmune diseases in which these bacteria do not represent a natural trigger or when pathogenic mechanisms are mediated by sterile inflammation. Moreover, using bacteria or LPS is technically limiting when analyzing the consequences of NET on immune and inflammatory responses, as many immune cells (e.g. PMN, monocytes, dendritic cells, lymphocytes) do respond to LPS. Finally, there are not so many natural and disease-specific or even disease-associated NET stimuli described. In SLE, stimulation of PMN with anti-RNP antibodies or RNP-containing immune complexes leads to the release of NET made of oxidized mitochondrial DNA which are interferogenic. However, the question is again whether we should consider this mechanism as NET formation or defective mitophagy. In RA, some cytokines or autoantibodies have been reported to induce NET, however often at low levels.

## **II.8 Conclusions**

The data described here raise several questions. Other cell types (eosinophils, basophils, monocytes) have been reported to release extracellular traps or DNA. As their composition may



differ from NET, their capacity to modulate immune cell responses and their role in inflammatory and/or autoimmune diseases should be tested. Likewise, as PMN sub-populations have been described in blood and tissues, it would be interesting to compare activities of NET prepared from these different PMN subtypes, first in healthy individuals, and then in patients suffering from different inflammatory and/or autoimmune diseases. Activities of NET are probably influenced by their composition. NET content and NET-associated proteins were originally characterized by immunofluorescence in NET induced in vitro with normal PMN [29]. NET composition was confirmed on PMA-stimulated healthy PMN by mass spectrometry analysis and proteins were quantified by immunoblotting [36]. Then, proteomic analyses on total blood PMN revealed that NET composition differs in healthy individuals according to the stimulus used (PMA vs. calcium ionophore) [109]. Similar results were obtained with normal PMN stimulated with PMA, calcium ionophore or LPS but showing in addition that post-translational modifications of NET proteins are influenced by the stimulus [110]. Moreover, NET composition also slightly varies according to diseases, as shown with NET induced in vitro by PMA or calcium ionophore on RA versus SLE PMN [109]. Likewise, in vitro, RA-associated stimuli as TNF, rheumatoid factor and RA IgG induce NET with different compositions in PMN from healthy individual [89]. Moreover, IgM rheumatoid factor induce NET containing citrullinated proteins in control PMN [93]. In SLE, NET induced in vitro by LPS stimulation contain lower amounts of ubiquitinated proteins [101]. Likewise, using PMA-stimulated PMN, it has been shown that NET composition is modified in SLE patients as compared with healthy individuals and even characterizes different SLE subsets, especially those with severe disease i.e. with nephritis [111]. Particularly, NET from patients with active SLE are enriched in IL-17A and tissue factor, as evidenced by immunofluorescence and immunoblotting [112]. Replicating proteomic analyses with NET induced by physiological and

disease-related stimuli would support hypotheses on NET functions. These data suggest that epigenetic modifications might also control NET activities and need to be further investigated.

Interestingly, similar properties have been reported for NET and extracellular chromatin. Cell-free chromatin is detected e.g. in SLE and RA patients. In SLE, circulating mono- to oligo-nucleosomes are present at higher concentrations compared with healthy individuals [113;114] and deposit in kidneys and skin, two target organs in patients. Nucleosomes are key lupus autoantigen and IgG3 anti-nucleosome autoantibodies are associated with active disease [115]. Similarly, chromatin is present in the synovial fluid of inflamed joints in RA patients [116] and deposit in affected joints [117]. We have previously shown that extracellular nucleosomes represent a DAMP directly activating DC [118] and PMN [119] in healthy individuals as well as SLE and RA patients, without requiring immune complex formation, suggesting a potential early pathogenic role. In PMN, nucleosomes trigger soluble CEACAM8 release [15], the secretion of pro-inflammatory cytokines, NET formation and even IFN- $\alpha$  secretion [120] in a TLR9-independent manner [121]. Part of circulating nucleosomes might derive from NET, especially from the smooth stretches which are probably only composed of histones and DNA and have dimensions similar to nucleosomes as evidenced by field emission scanning electron microscopy, in contrast to globular domains [36]. Cell and tissue origin of circulating nucleosomes and/or NET might be determined by analyzing nucleosome positioning [122].

In conclusion, NET are not only antimicrobial but also antigenic, immunogenic and pro/anti-inflammatory by exposing immunomodulatory molecules, and as extracellular nucleosomes, NET may behave as a DAMP depending on the microenvironment.

## II.9 References

- [1]. **Dixon,G., Elks,P.M., Loynes,C.A., Whyte,M.K., and Renshaw,S.A.,** A method for the in vivo measurement of zebrafish tissue neutrophil lifespan. *ISRN.Hematol.* 2012. **2012**: 915868.
- [2]. **Pillay,J., den,B., I, Vrisekoop,N., Kwast,L.M., de Boer,R.J., Borghans,J.A., Tesselaar,K., and Koenderman,L.,** In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 2010. **116**: 625-627.
- [3]. **Sharma,S., Davis,R.E., Srivastva,S., Nylen,S., Sundar,S., and Wilson,M.E.,** A Subset of Neutrophils Expressing Markers of Antigen-Presenting Cells in Human Visceral Leishmaniasis. *J.Infect.Dis.* 2016. **214**: 1531-1538.
- [4]. **Vono,M., Lin,A., Norrby-Teglund,A., Koup,R.A., Liang,F., and Lore,K.,** Neutrophils acquire the capacity for antigen presentation to memory CD4(+) T cells in vitro and ex vivo. *Blood* 2017. **129**: 1991-2001.
- [5]. **Abi Abdallah,D.S., Egan,C.E., Butcher,B.A., and Denkers,E.Y.,** Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. *Int.Immunol.* 2011. **23**: 317-326.
- [6]. **Beauvillain,C., Delneste,Y., Scotet,M., Peres,A., Gascan,H., Guermonprez,P., Barnaba,V., and Jeannin,P.,** Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo. *Blood* 2007. **110**: 2965-2973.
- [7]. **Davey,M.S., Morgan,M.P., Liuzzi,A.R., Tyler,C.J., Khan,M.W.A., Szakmany,T., Hall,J.E., Moser,B., and Eberl,M.,** Microbe-specific unconventional T cells induce human neutrophil differentiation into antigen cross-presenting cells. *J.Immunol.* 2014. **193**: 3704-3716.
- [8]. **Lindau,D., Mussard,J., Rabsteyn,A., Ribon,M., Kotter,I., Igney,A., Adema,G.J., Boissier,M.C., Rammensee,H.G., and Decker,P.,** TLR9 independent interferon alpha

production by neutrophils on NETosis in response to circulating chromatin, a key lupus autoantigen. *Ann.Rheum.Dis.* 2014. **73**: 2199-2207.

[9]. **Palanichamy,A., Bauer,J.W., Yalavarthi,S., Meednu,N., Barnard,J., Owen,T., Cistrone,C., Bird,A., Rabinovich,A., Nevarez,S., Knight,J.S., Dedrick,R., Rosenberg,A., Wei,C., Rangel-Moreno,J., Liesveld,J., Sanz,I., Baechler,E., Kaplan,M.J., and Anolik,J.H.**, Neutrophil-mediated IFN activation in the bone marrow alters B cell development in human and murine systemic lupus erythematosus. *J.Immunol.* 2014. **192**: 906-918.

[10]. **Han,J.H., Umiker,B.R., Kazimirova,A.A., Fray,M., Korgaonkar,P., Selsing,E., and Imanishi-Kari,T.**, Expression of an anti-RNA autoantibody in a mouse model of SLE increases neutrophil and monocyte numbers as well as IFN-I expression. *Eur.J.Immunol.* 2014. **44**: 215-226.

[11]. **Lindau,D., Mussard,J., Wagner,B.J., Ribon,M., Ronnefarth,V.M., Quettier,M., Jelcic,I., Boissier,M.C., Rammensee,H.G., and Decker,P.**, Primary blood neutrophils express a functional cell surface Toll-like receptor 9. *Eur.J.Immunol.* 2013. **43**: 2101-2113.

[12]. **Costantini,C., Calzetti,F., Perbellini,O., Micheletti,A., Scarponi,C., Lonardi,S., Pelletier,M., Schakel,K., Pizzolo,G., Facchetti,F., Vermi,W., Albanesi,C., and Cassatella,M.A.**, Human neutrophils interact with both 6-sulfo LacNAc<sup>+</sup> DC and NK cells to amplify NK-derived IFN $\gamma$ : role of CD18, ICAM-1, and ICAM-3. *Blood* 2011. **117**: 1677-1686.

[13]. **Pelletier,M., Maggi,L., Micheletti,A., Lazzeri,E., Tamassia,N., Costantini,C., Cosmi,L., Lunardi,C., Annunziato,F., Romagnani,S., and Cassatella,M.A.**, Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood* 2010. **115**: 335-343.

[14]. **Puga,I., Cols,M., Barra,C.M., He,B., Cassis,L., Gentile,M., Comerma,L., Chorny,A., Shan,M., Xu,W., Magri,G., Knowles,D.M., Tam,W., Chiu,A., Bussel,J.B., Serrano,S., Lorente,J.A., Bellosillo,B., Lloreta,J., Juanpere,N., Alameda,F., Baro,T., de**

**Heredia,C.D., Toran,N., Catala,A., Torrebadell,M., Fortuny,C., Cusi,V., Carreras,C., Diaz,G.A., Blander,J.M., Farber,C.M., Silvestri,G., Cunningham-Rundles,C., Calvillo,M., Dufour,C., Notarangelo,L.D., Lougaris,V., Plebani,A., Casanova,J.L., Ganal,S.C., Diefenbach,A., Arostegui,J.I., Juan,M., Yague,J., Mahlaoui,N., Donadieu,J., Chen,K., and Cerutti,A.,** B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat.Immunol.* 2012. **13**: 170-180.

[15]. **Ribon,M., Mussard,J., Semerano,L., Singer,B.B., and Decker,P.,** Extracellular Chromatin Triggers Release of Soluble CEACAM8 Upon Activation of Neutrophils. *Front Immunol.* 2019. **10**: 1346.

[16]. **Zhang,X., Majlessi,L., Deriaud,E., Leclerc,C., and Lo-Man,R.,** Coactivation of Syk kinase and MyD88 adaptor protein pathways by bacteria promotes regulatory properties of neutrophils. *Immunity.* 2009. **31**: 761-771.

[17]. **Batignes,M., Santinon,F., Boissier,M.C., Decker,P., and Bessis,N.,** Neutrophils and Regulatory T Lymphocytes (Treg) Cooperate to Sustain Treg Activity but This Interaction Is Altered in Rheumatoid Arthritis Patients [abstract]. *Arthritis Rheumatol.* 2019. **71**: 163-164.

[18]. **Puellmann,K., Kaminski,W.E., Vogel,M., Nebe,C.T., Schroeder,J., Wolf,H., and Beham,A.W.,** A variable immunoreceptor in a subpopulation of human neutrophils. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2006. **103**: 14441-14446.

[19]. **Matsushima,H., Geng,S., Lu,R., Okamoto,T., Yao,Y., Mayuzumi,N., Kotol,P.F., Chojnacki,B.J., Miyazaki,T., Gallo,R.L., and Takashima,A.,** Neutrophil differentiation into a unique hybrid population exhibiting dual phenotype and functionality of neutrophils and dendritic cells. *Blood* 2013. **121**: 1677-1689.

[20]. **Iking-Konert,C., Ostendorf,B., Sander,O., Jost,M., Wagner,C., Joosten,L., Schneider,M., and Hansch,G.M.,** Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils to

dendritic-like cells at the site of inflammation in rheumatoid arthritis: evidence for activation by T cells. *Ann.Rheum.Dis.* 2005. **64**: 1436-1442.

[21]. **Poubelle,P.E., Chakravarti,A., Fernandes,M.J., Doiron,K., and Marceau,A.A.,** Differential expression of RANK, RANK-L, and osteoprotegerin by synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis and by healthy human blood neutrophils. *Arthritis Res.Ther.* 2007. **9**: R25.

[22]. **Yeo,L., Toellner,K.M., Salmon,M., Filer,A., Buckley,C.D., Raza,K., and Scheel-Toellner,D.,** Cytokine mRNA profiling identifies B cells as a major source of RANKL in rheumatoid arthritis. *Ann.Rheum.Dis.* 2011. **70**: 2022-2028.

[23]. **Cross,A., Bucknall,R.C., Cassatella,M.A., Edwards,S.W., and Moots,R.J.,** Synovial fluid neutrophils transcribe and express class II major histocompatibility complex molecules in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003. **48**: 2796-2806.

[24]. **Lin,A.M., Rubin,C.J., Khandpur,R., Wang,J.Y., Riblett,M., Yalavarthi,S., Villanueva,E.C., Shah,P., Kaplan,M.J., and Bruce,A.T.,** Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *J.Immunol.* 2011. **187**: 490-500.

[25]. **Denny,M.F., Yalavarthi,S., Zhao,W., Thacker,S.G., Anderson,M., Sandy,A.R., McCune,W.J., and Kaplan,M.J.,** A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs. *J.Immunol.* 2010. **184**: 3284-3297.

[26]. **Wright,H.L., Makki,F.A., Moots,R.J., and Edwards,S.W.,** Low-density granulocytes: functionally distinct, immature neutrophils in rheumatoid arthritis with altered properties and defective TNF signalling. *J.Leukoc.Biol.* 2017. **101**: 599-611.

[27]. **Pillay,J., Kamp,V.M., van Hoffen,E., Visser,T., Tak,T., Lammers,J.W., Ulfman,L.H., Leenen,L.P., Pickkers,P., and Koenderman,L.,** A subset of neutrophils in

human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J.Clin.Invest* 2012. **122**: 327-336.

[28]. **Marini,O., Costa,S., Bevilacqua,D., Calzetti,F., Tamassia,N., Spina,C., De Sabata,D., Tinazzi,E., Lunardi,C., Scupoli,M.T., Cavallini,C., Zoratti,E., Tinazzi,I., Marchetta,A., Vassanelli,A., Cantini,M., Gandini,G., Ruzzenente,A., Guglielmi,A., Missale,F., Vermi,W., Tecchio,C., Cassatella,M.A., and Scapini,P.,** Mature CD10(+) and immature CD10(-) neutrophils present in G-CSF-treated donors display opposite effects on T cells. *Blood* 2017. **129**: 1343-1356.

[29]. **Brinkmann,V., Reichard,U., Goosmann,C., Fauler,B., Uhlemann,Y., Weiss,D.S., Weinrauch,Y., and Zychlinsky,A.,** Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004. **303**: 1532-1535.

[30]. **Boeltz,S., Amini,P., Anders,H.J., Andrade,F., Bilyy,R., Chatfield,S., Cichon,I., Clancy,D.M., Desai,J., Dumych,T., Dwivedi,N., Gordon,R.A., Hahn,J., Hidalgo,A., Hoffmann,M.H., Kaplan,M.J., Knight,J.S., Kolaczowska,E., Kubes,P., Leppkes,M., Manfredi,A.A., Martin,S.J., Maueroeder,C., Maugeri,N., Mitroulis,I., Munoz,L.E., Nakazawa,D., Neeli,I., Nizet,V., Pieterse,E., Radic,M.Z., Reinwald,C., Ritis,K., Rovere-Querini,P., Santocki,M., Schauer,C., Schett,G., Shlomchik,M.J., Simon,H.U., Skendros,P., Stojkov,D., Vandenabeele,P., Berghe,T.V., van,d., V, Vitkov,L., Kockritz-Blickwede,M., Yousefi,S., Zarbock,A., and Herrmann,M.,** To NET or not to NET:current opinions and state of the science regarding the formation of neutrophil extracellular traps. *Cell Death.Differ.* 2019. **26**: 395-408.

[31]. **Urban,C.F., Reichard,U., Brinkmann,V., and Zychlinsky,A.,** Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol.* 2006. **8**: 668-676.

- [32]. **Bianchi,M., Hakkim,A., Brinkmann,V., Siler,U., Seger,R.A., Zychlinsky,A., and Reichenbach,J.**, Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood* 2009. **114**: 2619-2622.
- [33]. **Abi Abdallah,D.S., Lin,C., Ball,C.J., King,M.R., Duhamel,G.E., and Denkers,E.Y.**, Toxoplasma gondii triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps. *Infect.Immun.* 2012. **80**: 768-777.
- [34]. **Saitoh,T., Komano,J., Saitoh,Y., Misawa,T., Takahama,M., Kozaki,T., Uehata,T., Iwasaki,H., Omori,H., Yamaoka,S., Yamamoto,N., and Akira,S.**, Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host.Microbe* 2012. **12**: 109-116.
- [35]. **Branzk,N., Lubojemska,A., Hardison,S.E., Wang,Q., Gutierrez,M.G., Brown,G.D., and Papayannopoulos,V.**, Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat.Immunol.* 2014. **15**: 1017-1025.
- [36]. **Urban,C.F., Ermert,D., Schmid,M., Abu-Abed,U., Goosmann,C., Nacken,W., Brinkmann,V., Jungblut,P.R., and Zychlinsky,A.**, Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS.Pathog.* 2009. **5**: e1000639.
- [37]. **Lauth,X., Kockritz-Blickwede,M., McNamara,C.W., Myskowski,S., Zinkernagel,A.S., Beall,B., Ghosh,P., Gallo,R.L., and Nizet,V.**, M1 protein allows Group A streptococcal survival in phagocyte extracellular traps through cathelicidin inhibition. *J.Innate.Immun.* 2009. **1**: 202-214.
- [38]. **Halverson,T.W., Wilton,M., Poon,K.K., Petri,B., and Lewenza,S.**, DNA is an antimicrobial component of neutrophil extracellular traps. *PLoS.Pathog.* 2015. **11**: e1004593.
- [39]. **Derre-Bobillot,A., Cortes-Perez,N.G., Yamamoto,Y., Kharrat,P., Couve,E., Da,C., V, Decker,P., Boissier,M.C., Escartin,F., Cesselin,B., Langella,P., Bermudez-**



**Humaran,L.G., and Gaudu,P.,** Nuclease A (Gbs0661), an extracellular nuclease of *Streptococcus agalactiae*, attacks the neutrophil extracellular traps and is needed for full virulence. *Mol.Microbiol.* 2013. **89**: 518-531.

[40]. **Neumann,A., Vollger,L., Berends,E.T., Molhoek,E.M., Stapels,D.A., Midon,M., Friaes,A., Pingoud,A., Rooijackers,S.H., Gallo,R.L., Morgelin,M., Nizet,V., Naim,H.Y., and Kockritz-Blickwede,M.,** Novel role of the antimicrobial peptide LL-37 in the protection of neutrophil extracellular traps against degradation by bacterial nucleases. *J.Innate.Immun.* 2014. **6**: 860-868.

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

[42]. **Parker,H., Dragunow,M., Hampton,M.B., Kettle,A.J., and Winterbourn,C.C.,** Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *J.Leukoc.Biol.* 2012. **92**: 841-849.

[43]. **Kenny,E.F., Herzig,A., Kruger,R., Muth,A., Mondal,S., Thompson,P.R., Brinkmann,V., Bernuth,H.V., and Zychlinsky,A.,** Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *Elife.* 2017. **6**.

[44]. **DeSouza-Vieira,T., Guimaraes-Costa,A., Rochael,N.C., Lira,M.N., Nascimento,M.T., Lima-Gomez,P.S., Mariante,R.M., Persechini,P.M., and Saraiva,E.M.,** Neutrophil extracellular traps release induced by *Leishmania*: role of PI3Kgamma, ERK, PI3Ksigma, PKC, and [Ca<sup>2+</sup>]. *J.Leukoc.Biol.* 2016. **100**: 801-810.

[45]. **Behnen,M., Leschczyk,C., Moller,S., Batel,T., Klinger,M., Solbach,W., and Laskay,T.,** Immobilized immune complexes induce neutrophil extracellular trap release by human neutrophil granulocytes via FcgammaRIIB and Mac-1. *J.Immunol.* 2014. **193**: 1954-1965.

- [46]. **Caudrillier,A., Kessenbrock,K., Gilliss,B.M., Nguyen,J.X., Marques,M.B., Monestier,M., Toy,P., Werb,Z., and Looney,M.R.,** Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J.Clin.Invest* 2012. **122**: 2661-2671.
- [47]. **Kenno,S., Perito,S., Mosci,P., Vecchiarelli,A., and Monari,C.,** Autophagy and Reactive Oxygen Species Are Involved in Neutrophil Extracellular Traps Release Induced by *C. albicans* Morphotypes. *Front Microbiol.* 2016. **7**: 879.
- [48]. **Metzler,K.D., Fuchs,T.A., Nauseef,W.M., Reumaux,D., Roesler,J., Schulze,I., Wahn,V., Papayannopoulos,V., and Zychlinsky,A.,** Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood* 2011. **117**: 953-959.
- [49]. **Hakim,A., Fuchs,T.A., Martinez,N.E., Hess,S., Prinz,H., Zychlinsky,A., and Waldmann,H.,** Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat.Chem.Biol.* 2011. **7**: 75-77.
- [50]. **Papayannopoulos,V., Metzler,K.D., Hakim,A., and Zychlinsky,A.,** Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J.Cell Biol.* 2010. **191**: 677-691.
- [51]. **Metzler,K.D., Goosmann,C., Lubojemska,A., Zychlinsky,A., and Papayannopoulos,V.,** A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Rep.* 2014. **8**: 883-896.
- [52]. **Leshner,M., Wang,S., Lewis,C., Zheng,H., Chen,X.A., Santy,L., and Wang,Y.,** PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures. *Front Immunol.* 2012. **3**: 307.
- [53]. **Sollberger,G., Choidas,A., Burn,G.L., Habenberger,P., Di Lucrezia,R., Kordes,S., Menninger,S., Eickhoff,J., Nussbaumer,P., Klebl,B., Kruger,R., Herzig,A., and**

**Zychlinsky,A.**, Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps. *Sci.Immunol.* 2018. **3**.

[54]. **Amulic,B., Knackstedt,S.L., Abu,A.U., Deigendesch,N., Harbort,C.J., Caffrey,B.E., Brinkmann,V., Heppner,F.L., Hinds,P.W., and Zychlinsky,A.**, Cell-Cycle Proteins Control Production of Neutrophil Extracellular Traps. *Dev.Cell* 2017. **43**: 449-462.

[55]. **Desai,J., Kumar,S.V., Mulay,S.R., Konrad,L., Romoli,S., Schauer,C., Herrmann,M., Bilyy,R., Muller,S., Popper,B., Nakazawa,D., Weidenbusch,M., Thomasova,D., Krautwald,S., Linkermann,A., and Anders,H.J.**, PMA and crystal-induced neutrophil extracellular trap formation involves RIPK1-RIPK3-MLKL signaling. *Eur.J.Immunol.* 2016. **46**: 223-229.

[56]. **Remijsen,Q., Vanden Berghe,T., Wirawan,E., Asselbergh,B., Parthoens,E., De Rycke,R., Noppen,S., Delforge,M., Willems,J., and Vandenabeele,P.**, Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res.* 2011. **21**: 290-304.

[57]. **Yousefi,S., Mihalache,C., Kozlowski,E., Schmid,I., and Simon,H.U.**, Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death.Differ.* 2009. **16**: 1438-1444.

[58]. **Konig,M.F. and Andrade,F.**, A Critical Reappraisal of Neutrophil Extracellular Traps and NETosis Mimics Based on Differential Requirements for Protein Citrullination. *Front Immunol.* 2016. **7**: 461.

[59]. **Pilsczek,F.H., Salina,D., Poon,K.K., Fahey,C., Yipp,B.G., Sibley,C.D., Robbins,S.M., Green,F.H., Surette,M.G., Sugai,M., Bowden,M.G., Hussain,M., Zhang,K., and Kubes,P.**, A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J.Immunol.* 2010. **185**: 7413-7425.

- [60]. **Yipp,B.G., Petri,B., Salina,D., Jenne,C.N., Scott,B.N., Zbytnuik,L.D., Pittman,K., Asaduzzaman,M., Wu,K., Meijndert,H.C., Malawista,S.E., de Boisfleury,C.A., Zhang,K., Conly,J., and Kubes,P.,** Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat.Med.* 2012. **18**: 1386-1393.
- [61]. **Hosseinzadeh,A., Thompson,P.R., Segal,B.H., and Urban,C.F.,** Nicotine induces neutrophil extracellular traps. *J.Leukoc.Biol.* 2016. **100**: 1105-1112.
- [62]. **Lewis,H.D., Liddle,J., Coote,J.E., Atkinson,S.J., Barker,M.D., Bax,B.D., Bicker,K.L., Bingham,R.P., Campbell,M., Chen,Y.H., Chung,C.W., Craggs,P.D., Davis,R.P., Eberhard,D., Joberty,G., Lind,K.E., Locke,K., Maller,C., Martinod,K., Patten,C., Polyakova,O., Rise,C.E., Rudiger,M., Sheppard,R.J., Slade,D.J., Thomas,P., Thorpe,J., Yao,G., Drewes,G., Wagner,D.D., Thompson,P.R., Prinjha,R.K., and Wilson,D.M.,** Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation. *Nat.Chem.Biol.* 2015. **11**: 189-191.
- [63]. **Tatsiy,O. and McDonald,P.P.,** Physiological Stimuli Induce PAD4-Dependent, ROS-Independent NETosis, With Early and Late Events Controlled by Discrete Signaling Pathways. *Front Immunol.* 2018. **9**: 2036.
- [64]. **Spengler,J., Lugonja,B., Ytterberg,A.J., Zubarev,R.A., Creese,A.J., Pearson,M.J., Grant,M.M., Milward,M., Lundberg,K., Buckley,C.D., Filer,A., Raza,K., Cooper,P.R., Chapple,I.L., and Scheel-Toellner,D.,** Release of Active Peptidyl Arginine Deiminases by Neutrophils Can Explain Production of Extracellular Citrullinated Autoantigens in Rheumatoid Arthritis Synovial Fluid. *Arthritis Rheumatol.* 2015. **67**: 3135-3145.
- [65]. **Zhou,Y., An,L.L., Chaerkady,R., Mittereder,N., Clarke,L., Cohen,T.S., Chen,B., Hess,S., Sims,G.P., and Mustelin,T.,** Evidence for a direct link between PAD4-mediated citrullination and the oxidative burst in human neutrophils. *Sci.Rep.* 2018. **8**: 15228.

- [66]. **Romero,V., Fert-Bober,J., Nigrovic,P.A., Darrah,E., Haque,U.J., Lee,D.M., van Eyk,J., Rosen,A., and Andrade,F.,** Immune-mediated pore-forming pathways induce cellular hypercitrullination and generate citrullinated autoantigens in rheumatoid arthritis. *Sci.Transl.Med.* 2013. **5**: 209ra150.
- [67]. **Neeli,I. and Radic,M.,** Opposition between PKC isoforms regulates histone deimination and neutrophil extracellular chromatin release. *Front Immunol.* 2013. **4**: 38.
- [68]. **Ashrafi,G. and Schwarz,T.L.,** The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death.Differ.* 2013. **20**: 31-42.
- [69]. **Caielli,S., Athale,S., Domic,B., Murat,E., Chandra,M., Banchereau,R., Baisch,J., Phelps,K., Clayton,S., Gong,M., Wright,T., Punaro,M., Palucka,K., Guiducci,C., Banchereau,J., and Pascual,V.,** Oxidized mitochondrial nucleoids released by neutrophils drive type I interferon production in human lupus. *J.Exp.Med.* 2016. **213**: 697-713.
- [70]. **Clark,S.R., Ma,A.C., Tavener,S.A., McDonald,B., Goodarzi,Z., Kelly,M.M., Patel,K.D., Chakrabarti,S., McAvoy,E., Sinclair,G.D., Keys,E.M., Allen-Vercoe,E., Devinney,R., Doig,C.J., Green,F.H., and Kubes,P.,** Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat.Med.* 2007. **13**: 463-469.
- [71]. **Mitroulis,I., Kambas,K., Chrysanthopoulou,A., Skendros,P., Apostolidou,E., Kourtzelis,I., Drosos,G.I., Boumpas,D.T., and Ritis,K.,** Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1beta and autophagy-related signaling in gout. *PLoS.One.* 2011. **6**: e29318.
- [72]. **Schauer,C., Janko,C., Munoz,L.E., Zhao,Y., Kienhofer,D., Frey,B., Lell,M., Manger,B., Rech,J., Naschberger,E., Holmdahl,R., Krenn,V., Harrer,T., Jeremic,I., Bilyy,R., Schett,G., Hoffmann,M., and Herrmann,M.,** Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat.Med.* 2014. **20**: 511-517.

[73]. **Magnani,A., Brosselin,P., Beaute,J., de Vergnes,N., Mouy,R., Debre,M., Suarez,F., Hermine,O., Lortholary,O., Blanche,S., Fischer,A., and Mahlaoui,N.** Inflammatory manifestations in a single-center cohort of patients with chronic granulomatous disease. *J.Allergy Clin.Immunol.* 2014. **134**: 655-662.

[74]. **Chrysanthopoulou,A., Mitroulis,I., Apostolidou,E., Arelaki,S., Mikroulis,D., Konstantinidis,T., Sivridis,E., Koffa,M., Giatromanolaki,A., Boumpas,D.T., Ritis,K., and Kambas,K.** Neutrophil extracellular traps promote differentiation and function of fibroblasts. *J.Pathol.* 2014. **233**: 294-307.

[75]. **Fuchs,T.A., Brill,A., Duerschmied,D., Schatzberg,D., Monestier,M., Myers,D.D., Jr., Wroblewski,S.K., Wakefield,T.W., Hartwig,J.H., and Wagner,D.D.** Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2010. **107**: 15880-15885.

[76]. **Rossaint,J., Herter,J.M., Van Aken,H., Napirei,M., Doring,Y., Weber,C., Soehnlein,O., and Zarbock,A.** Synchronized integrin engagement and chemokine activation is crucial in neutrophil extracellular trap-mediated sterile inflammation. *Blood* 2014. **123**: 2573-2584.

[77]. **Jimenez-Alcazar,M., Rangaswamy,C., Panda,R., Bitterling,J., Simsek,Y.J., Long,A.T., Bilyy,R., Krenn,V., Renne,C., Renne,T., Kluge,S., Panzer,U., Mizuta,R., Mannherz,H.G., Kitamura,D., Herrmann,M., Napirei,M., and Fuchs,T.A.** Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps. *Science* 2017. **358**: 1202-1206.

[78]. **Wong,S.L., Demers,M., Martinod,K., Gallant,M., Wang,Y., Goldfine,A.B., Kahn,C.R., and Wagner,D.D.** Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. *Nat.Med.* 2015. **21**: 815-819.

[79]. **Amini,P., Stojkov,D., Felser,A., Jackson,C.B., Courage,C., Schaller,A., Gelman,L., Soriano,M.E., Nuoffer,J.M., Scorrano,L., Benarafa,C., Yousefi,S., and Simon,H.U.**

Neutrophil extracellular trap formation requires OPA1-dependent glycolytic ATP production. *Nat. Commun.* 2018. **9**: 2958.

[80]. **Giusti,D., Bini,E., Terryn,C., Didier,K., Le Jan,S., Gatouillat,G., Durlach,A., Nesmond,S., Muller,C., Bernard,P., Antonicelli,F., and Pham,B.N.,** NET Formation in Bullous Pemphigoid Patients With Relapse Is Modulated by IL-17 and IL-23 Interplay. *Front Immunol.* 2019. **10**: 701.

[81]. **Kessenbrock,K., Krumbholz,M., Schonermarck,U., Back,W., Gross,W.L., Werb,Z., Grone,H.J., Brinkmann,V., and Jenne,D.E.,** Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat.Med.* 2009. **15**: 623-625.

[82]. **Sangaletti,S., Tripodo,C., Chiodoni,C., Guarnotta,C., Cappetti,B., Casalini,P., Piconese,S., Parenza,M., Guiducci,C., Vitali,C., and Colombo,M.P.,** Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity. *Blood* 2012. **120**: 3007-3018.

[83]. **Warnatsch,A., Ioannou,M., Wang,Q., and Papayannopoulos,V.,** Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science* 2015. **349**: 316-320.

[84]. **Villanueva,E., Yalavarthi,S., Berthier,C.C., Hodgin,J.B., Khandpur,R., Lin,A.M., Rubin,C.J., Zhao,W., Olsen,S.H., Klinker,M., Shealy,D., Denny,M.F., Plumas,J., Chaperot,L., Kretzler,M., Bruce,A.T., and Kaplan,M.J.,** Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J.Immunol.* 2011. **187**: 538-552.

[85]. **Hakim,A., Furnrohr,B.G., Amann,K., Laube,B., Abed,U.A., Brinkmann,V., Herrmann,M., Voll,R.E., and Zychlinsky,A.,** Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2010. **107**: 9813-9818.

[86]. **Campbell,A.M., Kashgarian,M., and Shlomchik,M.J.**, NADPH oxidase inhibits the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Sci.Transl.Med.* 2012. **4**: 157ra141.

[87]. **Kienhofer,D., Hahn,J., Stoof,J., Csepregi,J.Z., Reinwald,C., Urbonaviciute,V., Johnsson,C., Maueroeder,C., Podolska,M.J., Biermann,M.H., Leppkes,M., Harrer,T., Hultqvist,M., Olofsson,P., Munoz,L.E., Mocsai,A., Herrmann,M., Schett,G., Holmdahl,R., and Hoffmann,M.H.**, Experimental lupus is aggravated in mouse strains with impaired induction of neutrophil extracellular traps. *JCI.Insight.* 2017. **2**.

[88]. **Gordon,R.A., Herter,J.M., Rosetti,F., Campbell,A.M., Nishi,H., Kashgarian,M., Bastacky,S.I., Marinov,A., Nickerson,K.M., Mayadas,T.N., and Shlomchik,M.J.**, Lupus and proliferative nephritis are PAD4 independent in murine models. *JCI.Insight.* 2017. **2**.

[89]. **Khandpur,R., Carmona-Rivera,C., Vivekanandan-Giri,A., Gizinski,A., Yalavarthi,S., Knight,J.S., Friday,S., Li,S., Patel,R.M., Subramanian,V., Thompson,P., Chen,P., Fox,D.A., Pennathur,S., and Kaplan,M.J.**, NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci.Transl.Med.* 2013. **5**: 178ra40.

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

[91]. **Pratesi,F., Dioni,I., Tommasi,C., Alcaro,M.C., Paolini,I., Barbetti,F., Boscaro,F., Panza,F., Puxeddu,I., Rovero,P., and Migliorini,P.**, Antibodies from patients with rheumatoid arthritis target citrullinated histone 4 contained in neutrophils extracellular traps. *Ann.Rheum.Dis.* 2014. **73**: 1414-1422.

[92]. **Corsiero,E., Bombardieri,M., Carlotti,E., Pratesi,F., Robinson,W., Migliorini,P., and Pitzalis,C.**, Single cell cloning and recombinant monoclonal antibodies generation from



RA synovial B cells reveal frequent targeting of citrullinated histones of NETs. *Ann.Rheum.Dis.* 2016. **75**: 1866-1875.

[93]. **Carmona-Rivera,C., Carlucci,P.M., Moore,E., Lingampalli,N., Uchtenhagen,H., James,E., Liu,Y., Bicker,K., Wahamaa,H., Hoffmann,V., Catrina,A.I., Thompson,P.R., Buckner,J.H., Robinson,W.H., Fox,D.A., and Kaplan,M.J.,** Synovial fibroblast-neutrophil interactions promote pathogenic adaptive immunity in rheumatoid arthritis. *Sci.Immunol.* 2017. **2**: eaag3358.

[94]. **Farrera,C. and Fadeel,B.,** Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. *J.Immunol.* 2013. **191**: 2647-2656.

[95]. **Lande,R., Ganguly,D., Facchinetti,V., Frasca,L., Conrad,C., Gregorio,J., Meller,S., Chamilos,G., Sebasigari,R., Riccieri,V., Bassett,R., Amuro,H., Fukuhara,S., Ito,T., Liu,Y.J., and Gilliet,M.,** Neutrophils Activate Plasmacytoid Dendritic Cells by Releasing Self-DNA-Peptide Complexes in Systemic Lupus Erythematosus. *Sci.Transl.Med.* 2011. **3**: 73ra19.

[96]. **Barrientos,L., Bignon,A., Gueguen,C., de Chaisemartin,L., Gorges,R., Sandre,C., Mascarell,L., Balabanian,K., Kerdine-Romer,S., Pallardy,M., Marin-Esteban,V., and Chollet-Martin,S.,** Neutrophil extracellular traps downregulate lipopolysaccharide-induced activation of monocyte-derived dendritic cells. *J.Immunol.* 2014. **193**: 5689-5698.

[97]. **Tillack,K., Breiden,P., Martin,R., and Sospedra,M.,** T lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses. *J.Immunol.* 2012. **188**: 3150-3159.

[98]. **Gestermann,N., Di Domizio,J., Lande,R., Demaria,O., Frasca,L., Feldmeyer,L., Di Lucca,J., and Gilliet,M.,** Netting Neutrophils Activate Autoreactive B Cells in Lupus. *J.Immunol.* 2018. **200**: 3364-3371.

[99]. **Papadaki,G., Kambas,K., Choulaki,C., Vlachou,K., Drakos,E., Bertias,G., Ritis,K., Boumpas,D.T., Thompson,P.R., Verginis,P., and Sidiropoulos,P.,** Neutrophil

extracellular traps exacerbate Th1-mediated autoimmune responses in rheumatoid arthritis by promoting DC maturation. *Eur.J.Immunol.* 2016. **46**: 2542-2554.

[100]. **Kahlenberg,J.M., Carmona-Rivera,C., Smith,C.K., and Kaplan,M.J.,** Neutrophil extracellular trap-associated protein activation of the NLRP3 inflammasome is enhanced in lupus macrophages. *J.Immunol.* 2013. **190**: 1217-1226.

[101]. **Barrera-Vargas,A., Gomez-Martin,D., Carmona-Rivera,C., Merayo-Chalico,J., Torres-Ruiz,J., Manna,Z., Hasni,S., Alcocer-Varela,J., and Kaplan,M.J.,** Differential ubiquitination in NETs regulates macrophage responses in systemic lupus erythematosus. *Ann.Rheum.Dis.* 2018. **77**: 944-950.

[102]. **Carmona-Rivera,C., Zhao,W., Yalavarthi,S., and Kaplan,M.J.,** Neutrophil extracellular traps induce endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus through the activation of matrix metalloproteinase-2. *Ann.Rheum.Dis.* 2015. **74**: 1417-1424.

[103]. **Garcia-Romo,G.S., Caielli,S., Vega,B., Connolly,J., Allantaz,F., Xu,Z., Punaro,M., Baisch,J., Guiducci,C., Coffman,R.L., Barrat,F.J., Banchereau,J., and Pascual,V.,** Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci.Transl.Med.* 2011. **3**: 73ra20.

[104]. **Lood,C., Blanco,L.P., Purmalek,M.M., Carmona-Rivera,C., De Ravin,S.S., Smith,C.K., Malech,H.L., Ledbetter,J.A., Elkon,K.B., and Kaplan,M.J.,** Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nat.Med.* 2016. **22**: 146-153.

[105]. **Parackova,Z., Zentsova,I., Vrabcova,P., Klocperk,A., Sumnik,Z., Pruhova,S., Petruzelkova,L., Hasler,R., and Sediva,A.,** Neutrophil Extracellular Trap Induced Dendritic Cell Activation Leads to Th1 Polarization in Type 1 Diabetes. *Front Immunol.* 2020. **11**: 661.

[106]. **Leffler,J., Martin,M., Gullstrand,B., Tyden,H., Lood,C., Truedsson,L., Bengtsson,A.A., and Blom,A.M.,** Neutrophil extracellular traps that are not degraded in

systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J.Immunol.* 2012. **188**: 3522-3531.

[107]. **Hahn,J., Schauer,C., Czegley,C., Kling,L., Petru,L., Schmid,B., Weidner,D., Reinwald,C., Biermann,M.H.C., Blunder,S., Ernst,J., Lesner,A., Bauerle,T., Palmisano,R., Christiansen,S., Herrmann,M., Bozec,A., Gruber,R., Schett,G., and Hoffmann,M.H.,** Aggregated neutrophil extracellular traps resolve inflammation by proteolysis of cytokines and chemokines and protection from antiproteases. *FASEB J.* 2019. **33**: 1401-1414.

[108]. **Bao,Y. and Cao,X.,** Revisiting the protective and pathogenic roles of neutrophils: Ly-6G is key! *Eur.J.Immunol.* 2011. **41**: 2535-2538.

[109]. **Chapman,E.A., Lyon,M., Simpson,D., Mason,D., Beynon,R.J., Moots,R.J., and Wright,H.L.,** Caught in a Trap? Proteomic Analysis of Neutrophil Extracellular Traps in Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol.* 2019. **10**: 423.

[110]. **Petretto,A., Bruschi,M., Pratesi,F., Croia,C., Candiano,G., Ghiggeri,G., and Migliorini,P.,** Neutrophil extracellular traps (NET) induced by different stimuli: A comparative proteomic analysis. *PLoS.One.* 2019. **14**: e0218946.

[111]. **Bruschi,M., Petretto,A., Santucci,L., Vaglio,A., Pratesi,F., Migliorini,P., Bertelli,R., Lavarello,C., Bartolucci,M., Candiano,G., Prunotto,M., and Ghiggeri,G.M.,** Neutrophil Extracellular Traps protein composition is specific for patients with Lupus nephritis and includes methyl-oxidized alphaenolase (methionine sulfoxide 93). *Sci.Rep.* 2019. **9**: 7934.

[112]. **Frangou,E., Chrysanthopoulou,A., Mitsios,A., Kambas,K., Arelaki,S., Angelidou,I., Arampatzioglou,A., Gakiopoulou,H., Bertsias,G.K., Verginis,P., Ritis,K., and Boumpas,D.T.,** REDD1/autophagy pathway promotes thromboinflammation and fibrosis in human systemic lupus erythematosus (SLE) through NETs decorated with tissue factor (TF) and interleukin-17A (IL-17A). *Ann.Rheum.Dis.* 2019. **78**: 238-248.

- [113]. **Amoura,Z., Piette,J.C., Chabre,H., Cacoub,P., Papo,T., Wechsler,B., Bach,J.F., and Koutouzov,S.,** Circulating plasma levels of nucleosomes in patients with systemic lupus erythematosus: correlation with serum antinucleosome antibody titers and absence of clear association with disease activity. *Arthritis Rheum.* 1997. **40**: 2217-2225.
- [114]. **Rumore,P.M. and Steinman,C.R.,** Endogenous circulating DNA in systemic lupus erythematosus. Occurrence as multimeric complexes bound to histone. *J.Clin.Invest* 1990. **86**: 69-74.
- [115]. **Amoura,Z., Koutouzov,S., Chabre,H., Cacoub,P., Amoura,I., Musset,L., Bach,J.F., and Piette,J.C.,** Presence of antinucleosome autoantibodies in a restricted set of connective tissue diseases: antinucleosome antibodies of the IgG3 subclass are markers of renal pathogenicity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2000. **43**: 76-84.
- [116]. **Yu,D., Rumore,P.M., Liu,Q., and Steinman,C.R.,** Soluble oligonucleosomal complexes in synovial fluid from inflamed joints. *Arthritis Rheum.* 1997. **40**: 648-654.
- [117]. **Monach,P.A., Hueber,W., Kessler,B., Tomooka,B.H., BenBarak,M., Simmons,B.P., Wright,J., Thornhill,T.S., Monestier,M., Ploegh,H., Robinson,W.H., Mathis,D., and Benoist,C.,** A broad screen for targets of immune complexes decorating arthritic joints highlights deposition of nucleosomes in rheumatoid arthritis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2009. **106**: 15867-15872.
- [118]. **Decker,P., Singh-Jasuja,H., Haager,S., Kötter,I., and Rammensee,H.G.,** Nucleosome, the main autoantigen in systemic lupus erythematosus, induces direct dendritic cell activation via a MyD88-independent pathway: consequences on inflammation. *J.Immunol.* 2005. **174**: 3326-3334.
- [119]. **Rönnefarth,V.M., Erbacher,A.I.M., Lamkemeyer,T., Madlung,J., Nordheim,A., Rammensee,H.G., and Decker,P.,** TLR2/TLR4-independent neutrophil activation and

recruitment upon endocytosis of nucleosomes reveals a new pathway of innate immunity in systemic lupus erythematosus. *J.Immunol.* 2006. **177**: 7740-7749.

[120]. **Lindau,D., Mussard,J., Rabsteyn,A., Ribon,M., Kotter,I., Igney,A., Adema,G.J., Boissier,M.C., Rammensee,H.G., and Decker,P.,** TLR9 independent interferon alpha production by neutrophils on NETosis in response to circulating chromatin, a key lupus autoantigen. *Ann.Rheum.Dis.* 2014. **73**: 2199-2207.

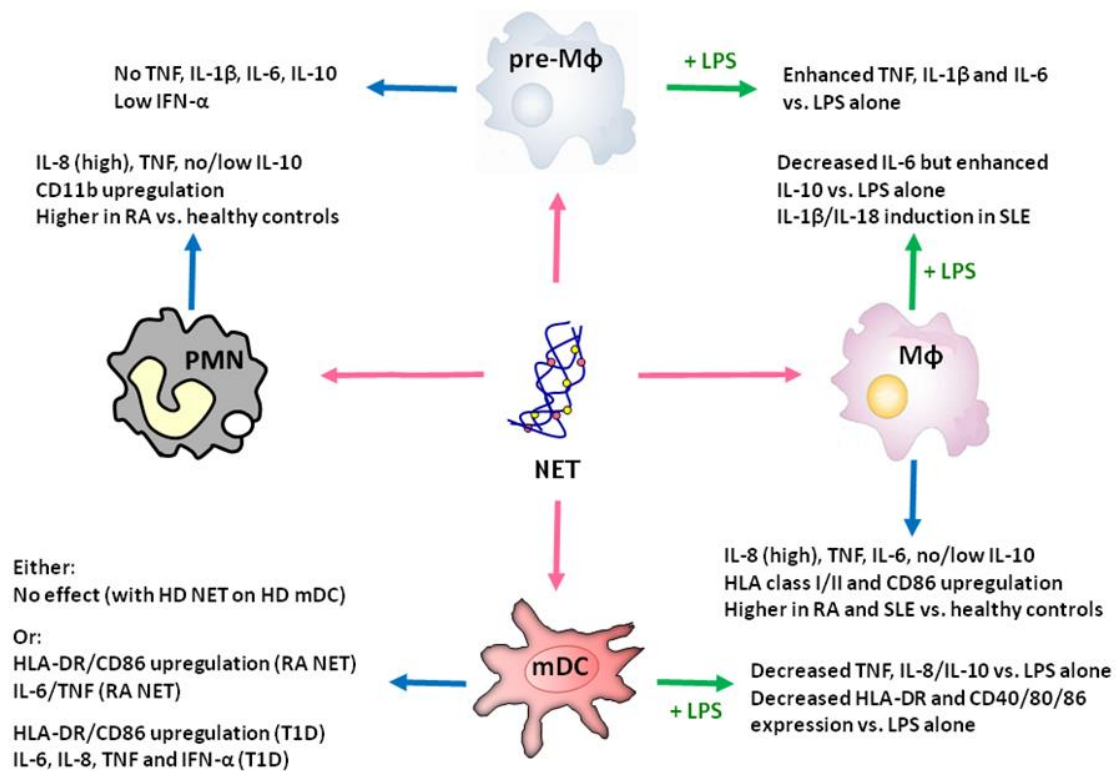
[121]. **Lindau,D., Rönnefarth,V., Erbacher,A., Rammensee,H.G., and Decker,P.,** Nucleosome-induced neutrophil activation occurs independently of TLR9 and endosomal acidification: implications for systemic lupus erythematosus. *Eur.J.Immunol.* 2011. **41**: 669-681.

[122] **Snyder,M.W., Kircher,M., Hill,A.J., Daza,R.M., and Shendure,J.,** Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell* 2016. **164**: 57-68.

**Table 1. Involvement of NET formation in inflammatory and autoimmune diseases.**

Diseases	Potential NET inducers	Effects proposed	Mechanims reported
Gout	monosodium urate crystals	protective	cytokine degradation
Lung fibrosis	cigarette smoke magnesium silicate bleomycin	pathogenic	fibroblast actiavtion
Systemic lupus erythematosus	autoantibodies + IFN- $\alpha$ immune complexes	pathogenic	source of autoantigens plasmacytoid dendritic cell activation: key lupus cytokine IFN- $\alpha$ induced macrophage activation impaired endothelium-dependent vasorelaxation
Rheumatoid arthritis (RA)	autoantibodies, cytokines	pathogenic	source of autoantigens macrophage activation: key RA cytokine TNF induced neutrophil activation: key RA cytokine TNF induced myeloid dendritic cell activation fibroblast-like synoviocyte activation
Autoimmune small-vessel vasculitis	autoantibodies	pathogenic	induction of respiratory burst-activating ANCA <sup>9)</sup>
Diabetes	glucose	pathogenic	impaired wound healing myeloid dendritic cell activation
Psoriasis	?	pathogenic	IL-17 exposure

<sup>9)</sup> anti-neutrophil cytoplasmic antibodies.



**Figure 32. Direct effects of NET on myeloid cells.**

Direct interaction of NET (pink arrows) on different cell types and its consequences in the absence (blue arrows) or presence (green arrows) of LPS. Effects of NET-containing immune complexes are not depicted. Data are pooled from human studies, both in healthy individuals and patients with inflammatory autoimmune diseases. Mechanisms highlighted as stronger in patients as compared with healthy individuals refer to data with either NET from patients or target cells from patients. HD, healthy donor; LPS, lipopolysaccharides; mDC, myeloid dendritic cells; M $\Phi$ , macrophages; PMN, polymorphonuclear neutrophils; pre-M $\Phi$ , macrophages obtained after only 3-day differentiation, RA, rheumatoid arthritis; SLE, systemic lupus erythematosus; T1D, type 1 diabetes.

## **Acknowledgments**

This work was supported by University Sorbonne Paris Nord, Inserm and Fondation Arthritis.

## **Conflict of interest**

Authors have no conflict of interest to disclose.



# **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

La PR est une pathologie inflammatoire chronique et auto-immune. Sa prévalence est d'environ 0.5 à 1% de la population adulte mondiale. Elle se caractérise par une activation excessive du système immunitaire inné et adaptatif, une présence importante d'auto-anticorps, notamment les ACPA et une hyperplasie de la membrane synoviale aboutissant à terme à la destruction du cartilage et de l'os. La PR provoque chez le patient un gonflement, une déformation et des douleurs articulaires pouvant mener à une perte de fonction de l'articulation touchée. Elle peut également avoir des atteintes extra-articulaires et peut-être associées à des complications cardiovasculaires, qui sont associées à un mauvais pronostic vital (Radner et al., 2017). De ce fait, la compréhension de sa physiopathologie est d'une importance majeure.

Dans la PR le système immunitaire inné et adaptatif est défaillant. Au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressée à l'impact majeur des cellules immunitaires myéloïdes, les neutrophiles et les macrophages dans cette maladie.

Les macrophages sont des cellules myéloïdes impliquées dans de nombreux processus pathologiques de la PR. En effet, dans cette maladie, les macrophages infiltrent de façon importante l'articulation et présentent un profil hautement inflammatoire (De Rycke et al., 2005). Ils augmentent notamment la production de cytokines pro-inflammatoires. Parallèlement, ils diminuent la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires. Ils induisent également des niveaux élevés de chimiokines qui augmentent l'afflux des cellules lymphoïdes et myéloïdes sur le site inflammatoire. Ils expriment en parallèle des récepteurs aux chimiokines qu'ils produisent, ce qui favoriserait leur propre rétention dans les tissus enflammés, exacerbant ainsi le contexte inflammatoire. Ils sont aussi de puissants sécréteurs de ROS, d'RNS, de facteurs de croissance, de MMP et d'autres médiateurs inflammatoires qui jouent un rôle clé dans la PR. Enfin, ils présentent les peptides arthritogènes aux lymphocytes T qui s'activent à leur tour et stimulent les lymphocytes B qui produisent des auto-anticorps, entretenant le contexte auto-immun de la PR. Enfin, les macrophages peuvent directement se différencier en ostéoclastes, lesquels, jouent un rôle direct dans la destruction osseuse (Adamopoulos et al., 2006).

Concernant les neutrophiles, Ils représentent jusqu'à 80% des cellules immunitaires recrutées dans l'articulation lors de la PR. Ils contrôlent de nombreux processus pro-inflammatoires. Celui sur lequel je me suis focalisée est la production de NETs.

Les NETs sont des filaments d'ADN décondensés associés à des protéines neutrophilaires. Ils sont relargués par les neutrophiles dans le milieu extra-cellulaire en présence entre-autres de stimuli pro-inflammatoires. Ils ont été décrits la première fois en 2004 par Brinkmann et al (Brinkmann et al., 2004). Cette équipe a démontré que les NETs sont capables de former un maillage qui piège et qui tue les bactéries Gram positives et Gram négatives, faisant de ce processus une nouvelle approche d'élimination des bactéries par les neutrophiles. Depuis, de multiples rôles essentiels des NETs ont été proposés, notamment dans l'induction et l'aggravation de pathologies auto-immunes, dont la PR (Kambas et al., 2014; van der Linden et al., 2018; Carmona-Rivera et al., 2020).

Les NETs jouent des fonctions clés dans la PR. Ils sont détectés dans le liquide synovial des patients (Khandpur et al., 2013) et les niveaux de leurs produits dérivés dans l'articulation sont corrélés aux paramètres cliniques, au statut auto-immun et oxydatif de la maladie (Pérez-Sánchez et al., 2017).

Les NETs contribuent au développement de la PR de plusieurs manières. Ils favoriseraient la réponse auto-immune, puisqu'ils sont chargés de nombreuses protéines citrullinées qui seraient ensuite une source d'auto-antigènes ou une cible des ACPA (Carmona-Rivera et al., 2017). Ils présentent aussi plusieurs enzymes granulaires à leur surface qui dégradent directement les composants du cartilage et de l'os (Carmona-Rivera et al., 2020). Enfin, les NETs augmentent la réponse pro-inflammatoire caractéristique de la PR. En effet, Ils favorisent la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et l'expression de marqueurs d'activation sur les macrophages non polarisés et les neutrophiles (Ribon et al., 2019). Tenant compte de cette dernière caractéristique, nous avons émis l'hypothèse que les NETs exacerbent l'effet pro-inflammatoire induit par les macrophages lors de la PR. Cette hypothèse est confortée par le fait que les NETs sont composés d'ADN et de protéines et que des récepteurs à l'ADN et aux protéines chargées sur les NETs sont exprimés par les macrophages. Ainsi, les NETs pourraient se lier aux macrophages qui sont recrutés de façon accrue dans l'articulation des patients et activer leur profil très inflammatoire.

Par ailleurs, les macrophages sont subdivisés en plusieurs sous-types. Les macrophages M0 (non polarisés), les macrophages M1-like (pro-inflammatoires) et les macrophages M2-like (anti-inflammatoires). Dans la PR, des macrophages avec des phénotypes M1-like et M2-like subsistent (Ambarus et al., 2012b). Néanmoins, comme nous l'avons décrit, c'est le profil pro-inflammatoire des macrophages qui domine. De plus, la stimulation des macrophages

synoviaux avec des inducteurs de macrophages M1-like active les fonctions pro-inflammatoires M1-like, tandis que l'activation de ces mêmes macrophages avec un inducteur de macrophages M2-like n'induit pas les fonctions régulatrices M2-like (Antoniv and Ivashkiv, 2006). Ceci nous a amenés à supposer que l'activation des macrophages dans la PR par les NETs se ferait de façon différentielle sur les sous-populations de macrophages pro- et anti-inflammatoires, avec une activation plus importante des macrophages M1-like. Enfin, nous avons analysé le mécanisme d'activation et les voies induites via l'activation des macrophages par les NETs, dans le but de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles dans la PR.

## **I. Caractérisation des macrophages et préparation de NETs**

D'abord, nous avons différencié des monocytes de sujets sains ou de patients atteints de PR en différentes sous-populations de macrophages. Le protocole utilisé afin d'induire des sous-populations de macrophage est celui décrit par Ambarus et al (Ambarus et al., 2012a). Il consiste d'abord à pré-cultiver les monocytes pendant quatre jours avec le M-CSF, ensuite, suivant le sous-type de macrophage voulu, nous avons ajouté pendant 72 heures, du M-CSF, de l'IFN  $\gamma$ , de l'IL-4, de l'IL-10 pour induire respectivement des macrophages M0, M1-like, M2a-like et M2c-like.

Le choix de ce protocole est conforté par plusieurs aspects: le M-CSF est un facteur de croissance qui contrôle le recrutement des monocytes de la circulation sanguine vers les tissus (Tagliani et al., 2011). Une fois recrutés, ces monocytes se différencient en macrophages. Ainsi, la préincubation des monocytes avec le M-CSF *in vitro*, nous a permis d'être au plus près de ce qui se déroule à l'état physiologique. Ensuite, pour la différenciation macrophagique, le M-CSF a été utilisé pour induire des macrophages M0, qui sont décrits comme des macrophages matures mais non polarisés (Jaguin et al., 2013). Les macrophages M1-like ont été induits par de l'IFN- $\gamma$ , principale cytokine associée à une polarisation M1-like. Ils ont été appelés ainsi par analogie à la réponse Th-1 induite (Nathan et al., 1983; Mills et al., 2000). Les macrophages M2-like ont quant à eux été classés par analogie à la réponse Th2 induite (Mills et al., 2000). Ils sont tous anti-inflammatoires mais plusieurs classes sont décrites dans la littérature. Dans notre étude, nous avons décidé d'utiliser deux sous-types de macrophages M2-like, les M2a-like et M2c-like. Les macrophages M2a-like sont polarisés par IL-4. Ils ont été décrits par l'équipe de Gordon. Ils sont considérés comme des macrophages cicatriciels, pouvant être

importants notamment pour le remodelage et la cicatrisation des tissus lésés (Stein et al., 1992). Nous avons également polarisé les monocytes en macrophages M2c-like, en utilisant de l'IL-10. Ces macrophages sont notamment connus pour être immunorégulateurs. Ils suppriment entre-autres l'activation des macrophages pro-inflammatoires qui jouent un rôle principal dans la PR (Park-Min, Antoniv, and Ivashkiv, 2005).

Afin d'évaluer le phénotype de ces macrophages, nous avons comparé l'expression des différents marqueurs caractéristiques de ces sous-populations, par cytométrie en flux (Ambarus et al., 2012a; Clavel et al., 2016). Nous avons ainsi analysé la présence des récepteurs Fc $\gamma$ , qui lient les complexes immuns, provoquant la phagocytose des agents pathogènes. Nous avons évalué l'expression du récepteur aux mannoses, CD206, lesquels se lient directement aux mannoses et aux fructoses des agents infectieux afin de les ingérer. Nous avons vérifié la présence de CD200R, le récepteur inhibiteur des voies MAPK. Enfin, nous avons examiné l'expression de CD14, le corécepteur du LPS en association avec le TLR4. Les TLRs étant des récepteurs qui stimulent l'élimination des pathogènes par les phagocytes en collaborant avec d'autres récepteurs.

Nous démontrons que chaque sous-population de macrophages est caractérisée par une expression spécifique des six marqueurs utilisés, avec notamment une up-régulation de CD14 pour les macrophages M0, une surexpression des récepteurs Fc $\gamma$  de type I (CD64, forte affinité aux IgGs) pour les macrophages M1-like, une augmentation de CD206 et CD200R pour les macrophages M2a-like et enfin, pour les macrophages M2c-like, une surexpression des récepteurs Fc $\gamma$  de type II (CD32, moyenne affinité aux IgGs) et de type III (CD16, faible affinité aux IgGs), et une diminution de l'expression du CD64. Il est important de considérer que c'est la combinaison de l'expression différentielle de ces six marqueurs qui caractérise une sous-population de macrophages.

Les limites du modèle de polarisation macrophagique que nous utilisons résident dans le fait que c'est un modèle généré artificiellement *in-vitro* qui ne reflète pas complètement l'état des macrophages présents *in-vivo*. La polarisation des macrophages en un phénotype pro- ou anti-inflammatoire *in-vivo* est plus complexe, elle fait intervenir plusieurs médiateurs. En effet, les macrophages répondent au microenvironnement présent à l'état physiologique ou pathologique. En réponse à certains stimuli, comme les infections ou des blessures stériles, ils déploient des propriétés pro-inflammatoires qui sont essentielles à la défense de l'organisme contre tout agent pathogène. En réponse à un ensemble d'autres stimuli, ils développent des

propriétés anti-inflammatoires et immunorégulatrices qui permettent notamment de prévenir une activation exagérée du système immunitaire et qui sont responsables de la cicatrisation et du remodelage des tissus.

Nous avons aussi produit, isolé et enrichi des NETs à partir de neutrophiles primaires humains et de souris, suivant un protocole établi dans notre laboratoire (Ribon et al. 2019). Plusieurs inducteurs de NETs sont connus, mais celui que nous avons utilisé est le PMA. Il a été employé initialement pour décrire le phénomène de production de NETs (Brinkmann et al., 2004). C'est également le stimulus le plus caractérisé pour élucider la succession d'évènements qui mène à leur production. De plus, peu de stimuli naturels associés à la PR ont été décrits et les niveaux de NETs induits sont faibles. Bien que non physiologique, le PMA permet de mimer des niveaux de NETose intenses. Les NETs que nous induisons *in vitro* sont formés d'ADN et de protéines citrullinées de façon dépendante de la NOX (Ribon et al., 2019).

Les NETs produits sont pour chaque donneur caractérisés et quantifiés. Nous avons analysé leur contenu protéique par SDS-PAGE. Nous avons notamment vérifié la présence de bandes entre 10 et 15kDa qui représentent les histones, ainsi qu'une bande à 75kDa qui semble refléter en partie la présence de la lactoferrine. Ces protéines sont connues pour se lier aux NETs et leur présence après stimulation au PMA a préalablement été vérifiée dans notre laboratoire par Western-blot. Nous analysons également l'ADN, qui a une taille entre 100 et 400 paires de bases, sous forme de smear, sur gel d'agarose. De plus, nous avons quantifié à chaque fois l'ADN par fluorescence. La concentration d'ADN dans les NETs que nous avons produits est d'environ 12µg/ml. Une concentration estimée suffisante pour voir leurs effets en culture avec les macrophages.

## **II. L'activation par les NETs induit un profil hautement inflammatoire des sous-populations de macrophages.**

Notre hypothèse soutient que les NETs présents dans l'environnement inflammatoire activent de façon plus importante les macrophages pro-inflammatoires, ce qui expliquerait en partie le profil pro-inflammatoire dominant des macrophages dans la PR. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons d'abord examiné l'effet des NETs sur toutes les sous-populations de macrophages de tous les donneurs confondus.

Les macrophages sont des cellules fortement adhérentes. La trypsine, une enzyme qui digère les protéines de la MEC et l'éthylènediamine tétraacétique (EDTA), un chélateur de cations divalents sont les plus utilisés pour détacher les cellules de leur support de culture. Cependant, la trypsine détériore les marqueurs membranaires. De ce fait l'analyse de certaines protéines membranaires par cytométrie en flux par exemple ne serait pas adaptée. Concernant l'EDTA, Il est généralement utilisé avec un temps d'incubation plus long, ce qui induit une forte toxicité cellulaire. De ce fait, pour analyser l'effet des NETs sur les macrophages, nous avons essentiellement examiné la production de médiateurs pro- et anti-inflammatoires par ELISA, dans le surnageant de culture.

De manière intéressante, nos résultats montrent que les NETs favorisent un profil pro-inflammatoire sur toutes les sous-populations de macrophages (M0, M1-like et M2-like). En effet, les sous-populations de macrophages au repos stimulées par les NETs, y compris les macrophages anti-inflammatoires M2a-like et M2c-like, produisent les cytokines pro-inflammatoires IL-8 et TNF $\alpha$  (non montré). De plus, les NETs induisent la perte des propriétés anti-inflammatoires des macrophages M2c-like. Ces macrophages réduisent habituellement l'inflammation en sécrétant de l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire qui diminue la production d'IL-6, d'IL-1 et du TNF $\alpha$  et d'autres médiateurs induits par les macrophages pro-inflammatoires (Fiorentino et al., 1991; Park-Min, Antoniv, and Ivashkiv, 2005). L'IL-10 est notamment connu pour limiter l'inflammation dans les maladies auto-immunes, dont la PR (Iyer and Cheng, 2012). Nos résultats ont montré que les macrophages M2c-like ne sécrètent pas d'IL-10 en réponse aux NETs, contrairement aux macrophages M2a-like, faisant pencher la balance vers une activation pro-inflammatoire des macrophages par les NETs.

Par ailleurs, les NETs ont également des propriétés anti-inflammatoires établies, puisqu'ils diminuent la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 par les macrophages M0 stimulés au LPS (Ribon et al. 2019). Ces résultats seraient dus à un feedback négatif des macrophages lorsqu'ils sont exposés à de forts stimuli inflammatoires. En effet, dans la littérature il a été rapporté que la stimulation des macrophages par le LPS induit la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-6. L'IL-10 est également produit par ces mêmes macrophages stimulés au LPS. Il a pour rôle de réguler de façon autologue l'inflammation induite par le LPS. En effet, il diminue la sécrétion d'IL-6 produite *via* une stimulation au LPS (Fiorentino et al., 1991). Nous avons alors supposé que l'ajout des NETs induirait le même phénomène de régulation autologue des macrophages.

Nos résultats ont confirmé cet effet anti-inflammatoire des NETs sur les sous-populations de macrophages M0, mais aussi sur les macrophages M1-like et M2a-like. Néanmoins, de manière très surprenante, les macrophages anti-inflammatoires M2c-like stimulés au LPS ont été résistants à l'effet anti-inflammatoire des NETs, puisque les NETs ne réduisent pas la sécrétion d'IL-6. Donc l'effet des NETs sur les macrophages M2c serait en faveur d'un effet global pro-inflammatoire.

D'un autre côté, nous montrons de façon intéressante que les macrophages M0 et les M1-like stimulés au LPS diminuent la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 en réponse aux NETs. Pour ce qui est des macrophages M2-like, l'induction d'IL-10 par le LPS n'a pas été modulée en présence de NETs, ce qui diminue le potentiel régulateur de la cytokine IL-10 sur les macrophages exposés aux stimuli hautement inflammatoires. De plus, toutes les sous-populations de macrophages, y compris les macrophages M2-like, présentent un effet additif des NETs et LPS sur la sécrétion de la chimiokine pro-inflammatoire IL-8.

Nous concluons alors que les NETs modifient l'équilibre de sécrétion des cytokines pro- et anti-inflammatoires en faveur de l'induction de l'inflammation.

Il est important de noter que la sécrétion d'IL-8 par toutes les sous-populations de macrophages en réponse aux NETs serait très intéressante sur un site inflammatoire. En effet, l'IL-8 est responsable du recrutement des neutrophiles, elle pourrait entraîner un cercle vicieux de sur-recrutement de neutrophiles, qui produiraient des NETs, lesquels stimuleraient les macrophages à sécréter de l'IL-8, qui recruterait à nouveau des neutrophiles.

En perspective, il serait intéressant de confirmer cet effet pro-inflammatoire dominant des NETs en examinant les marqueurs d'activation (HLA-DR, le CD40, le CD80/86) des sous-populations de macrophages stimulés avec les NETs, en présence ou en absence de LPS. Nous allons également analyser si le phénotype des sous-populations de macrophages M2-like ne bascule pas vers un phénotype M1-like en présence de NETs. Enfin, pour déterminer les conséquences fonctionnelles de l'activation par les NETs, je ferai des réactions lymphocytaires mixtes avec des macrophages de sujets sains activés avec des NETs de PR et des LT afin de caractériser les populations activées (Th1, Th2, Th17, Tfh) par cytométrie en flux. Les mêmes expériences seront réalisées avec des cellules dendritiques, car également activées par les NETs, et particulièrement efficaces pour activer les LT.



### **III. Le profil pro-inflammatoire induit par les NETs est plus important dans les cultures de patients atteints de PR.**

Étant donné que les macrophages développent un profil pro-inflammatoire dans la PR et que les NETs favorisent largement cet aspect, nous avons supposé que les NETs activeraient de façon plus importante les macrophages de patients atteints de PR que ceux des sujets sains. Nous avons alors évalué la sécrétion de cytokines pro- et anti-inflammatoires par les sous-populations de macrophages de sujets sains et de patients atteints de PR, en réponse aux NETs. Nous avons développé une stratégie lourde et originale dans laquelle des macrophages de patients sans biothérapies sont activés avec des NETs de patients sans biothérapies, en comparaison des macrophages de sujets sains activés par des NETs de sujets sains.

Nous avons choisi de prendre dans notre étude des patients sans biothérapies positifs en ACPA pour éviter que les paramètres liés à la biothérapie en question interfèrent avec nos résultats.

En ce qui concerne la cytokine pro-inflammatoire IL-8, nous avons montré qu'elle est produite par les macrophages au repos de sujets sains et de patients atteints de PR, en réponse aux NETs. Cependant, les NETs augmentent de manière plus importante le niveau de sécrétion d'IL-8 chez les macrophages anti-inflammatoires M2c-like de patients atteints de PR. Fait intéressant également, les macrophages M1-like des patients augmentent significativement la production d'IL-8 induite par le LPS, en présence de NETs, mais pas les macrophages M1-like de sujets sains, renforçant ainsi l'effet pro-inflammatoire des NETs dans la PR.

Concernant la cytokine anti-inflammatoire IL-10, elle n'est pas induite en présence de NETs par les sous-populations de macrophages M0, M1-like et M2c-like au repos de sujets sains ou de patients atteints de PR. Nous avons cependant constaté une sécrétion significative d'IL-10 par les macrophages M2a-like de patients atteints de PR. Malgré cela, les macrophages M2a-like de patients stimulés au LPS perdent l'effet anti-inflammatoire des NETs, puisqu'ils ne diminuent plus la production d'IL-6 induite par le LPS, comme c'était le cas des macrophages M2a-like de sujets sains. Nous avons également fait la même observation pour les macrophages pro-inflammatoires M1-like. Concernant les macrophages M2c-like, ils ne diminuent pas la sécrétion d'IL-6 induite par le LPS, en présence de NETs, que ça soit pour les sujets sains ou les patients atteints de PR.

Toutes ces observations indiquent que l'effet pro-inflammatoire des NETs sur les macrophages est plus accentué chez les patients atteints de PR que chez les sujets sains. Dans les cultures de patients atteints de PR, les NETs activent les macrophages pro-inflammatoires et diminuent considérablement les propriétés anti-inflammatoires des macrophages M2-like (M2c-like notamment). En effet, en réponse aux NETs, les M2c-like de patients atteints de PR produisent des médiateurs pro-inflammatoires mais pas la cytokine anti-inflammatoire IL-10. Ils sont résistants à l'effet anti-inflammatoire des NETs lorsqu'ils sont stimulés au LPS et augmentent la sécrétion d'IL-8 induite par le LPS. Nous proposons alors que les macrophages M2c-like dans la PR pourraient perdre leur effet anti-inflammatoire, ceci pourrait expliquer, en partie, la présence des deux phénotypes (pro et anti-inflammatoire) et la domination du profil pro-inflammatoire des macrophages dans la PR.

Afin de confirmer par une autre technique cet effet pro-inflammatoire des NETs sur les macrophages dans la PR, nous allons réaliser des cultures de macrophages de patients atteints de PR et de sujets sains avec leurs propres NETs et comparer l'état d'activation de ces macrophages en examinant l'expression des marqueurs d'activation (HLA-DR, le CD40, le CD80/86) et étudier le changement de phénotype des macrophages en analysant l'expression des marqueurs utilisés pour les caractériser (CD16, CD32, CD64, CD14, CD206, CD200R) en cytométrie en flux. Nous pourrions également examiner leur aptitude à phagocyter des billes fluorescentes en présence de NETs par cytométrie en flux. Il serait également intéressant de comparer par cytochimie leur capacité à se différencier en ostéoclastes en présence de RANKL (cellules multinucléées et positives au marquage TRAP (tartrate-resistant acid Phosphatase)). En parallèle, nous allons effectuer une étude longitudinale, afin de comparer l'effet des NETs sur les macrophages avant et après l'administration des biothérapies.

Pour expliquer les différences obtenues entre l'état d'activation des macrophages de patients atteints de PR et des macrophages de sujets sains, plusieurs hypothèses ont été émises, dont certaines vont être testées comme ci-dessous.

En premier lieu, nous avons supposé que les macrophages de patients PR seraient plus actifs que les macrophages de sujets sains par le contexte arthritogène et inflammatoire présent dans la PR. Cette hypothèse est partiellement écartée. En effet, les macrophages non polarisés (M-CSF) de sujets sains et de patients atteints de PR, au repos ou activés au LPS, répondent de façon similaire aux NETs de patients atteints de PR, ce qui montre que la réponse est indépendante du contexte physiologique des macrophages. Ceci suggère que les différences

observées proviennent de la quantité ou la composition des NETs. Néanmoins, nous n'avons pas analysé toutes les sous-populations de macrophages. Ainsi, des résultats identiques doivent être confirmés avec des expériences de co-cultures de NETs de patients atteints de PR et des macrophages polarisés en M1-like, M2a-like et M2c-like au repos ou en présence de LPS, de patients et de sujets sains afin de totalement réfuter cette première hypothèse.

En deuxième lieu nous supposons donc que ce sont les NETs de patients qui sont responsables de cette différence d'activation des sous-populations de macrophages des patients atteints de PR versus macrophages de sujets sains. Pour expliquer ce phénomène, nous proposons que *ex-vivo*, les NETs de patients pourraient exposer des protéines différentes (composition altérée ou modifications post-traductionnelles différentes) à leur surface ou bien une quantité plus importante de protéines, ce qui serait responsable d'une activation plus importante des macrophages.

Pour étudier cette hypothèse, il sera nécessaire de comparer la composition protéique des NETs préparés à partir de neutrophiles purifiés des sujets sains versus des patients atteints de PR, stimulés au PMA. Ceci pourrait être fait par des expériences d'analyse protéomiques par spectrométrie de masse, qui vont nous permettre d'identifier mais aussi de quantifier les protéines chargées sur les NETs-PMA générés à partir de neutrophiles de patients atteints de PR en comparaison aux NETs-PMA préparés à partir de neutrophiles de sujets sains. De pareilles expériences ont préalablement été réalisées mais sur des NETs préparés à partir de patients atteints de PR en comparaison aux patients lupiques (Chapman et al., 2019). Cette équipe a stimulé les neutrophiles par le PMA pour induire des NETs et elle a montré que plusieurs protéines étaient différentiellement exprimées par les NETs de patients atteints de PR par rapport aux NETs de patients lupiques, comme la RNase2 qui était plus élevée sur les NETs de patients PR (Chapman et al., 2019). La composition protéique des NETs a aussi été comparée entre les NETs-PMA préparés à partir de neutrophiles de patients atteints de LES avec une glomérulonéphrite en comparaison à des patients lupiques sans glomérulonéphrite. Dans ce cas également la composition protéique des NETs est différente. Les NETs-PMA des patients lupiques avec une glomérulonéphrite et non ceux sans glomérulonéphrite contiennent des protéines modifiées post-traductionnellement, comme l' $\alpha$ -énolase méthyl-oxydée qui est reconnue par les IgG2 anti- $\alpha$ -énolase circulantes, ce qui montre que ces protéines contribuent à l'auto-immunité chez les patients lupiques avec glomérulonéphrite (Bruschi et al., 2019). De plus, selon la nature du stimulus utilisé, la composition protéique des NETs est différente et ceci pourrait avoir différents effets biologiques sur les sous-populations de macrophages,

indépendamment du contexte physiopathologique des neutrophiles (Chapman et al., 2019; Petretto et al., 2019). Il serait alors intéressant de vérifier la présence de protéines importantes dans la physiopathologie de la PR, sur des NETs générés avec différentes conditions (PMA, ionomycine, LPS, levures et si possible des stimuli associés à la PR). Il a récemment été montré par Western-blot que les PAD2 et PAD4, qui jouent un rôle clé dans l'induction de l'auto-immunité dans la PR sont chargées sur les NETs-PMA produits à partir de neutrophiles de sujets sains (Spengler et al., 2015). Cependant, ces résultats n'ont pas été reproduits, parce que ni PAD2 ni PAD4 ne sont détectées en protéomique dans les NETs-PMA préparés de sujets sains ou de patients atteints de PR (données non montrées). De plus, l'immunisation des souris par les NETs n'a pas induit des anticorps anti-PAD2 et PAD4 (données non montrées). Chapman *et al.* également ont montré par spectrométrie de masse que PAD4 est chargé sur les NET-ionomycine mais pas les NET-PMA (Chapman et al., 2019).

Enfin, les modifications post-traductionnelles, notamment la citrullination pourraient être différentes entre les NETs préparés à partir de neutrophiles de patients en comparaison aux sujets sains. Ces modifications pourraient être une source d'autoantigènes reconnus par les ACPA dans la PR. De ce fait, par des expériences de Western-blot, nous avons analysé la citrullination de l'histone H3 des NET-PMA. Il n'y a pas une forte citrullination des histones H3 dans les NET-PMA de sujets sains et de patients atteints de PR et la différence de citrullination entre les NET-PMA de sujets sains versus patients PR n'a pas été quantifiée (Ribon et al., 2019). La citrullination d'autres protéines candidates présentes sur les NETs pourraient être analysée sur les NET-PMA préparés à partir de sujets sains et de patients atteints de PR, comme la vimentine, la lactoferrine, la MPO et la NE.

Dans le cas où nous identifierions des protéines discriminantes des NETs de patients atteints de PR, nous pourrions vérifier l'état d'activation des différentes sous-populations de macrophages en leur présence. Pour cela nous allons cultiver les quatre sous-populations de macrophages en présence de ces protéines et analyser par ELISA, ELISA multiplex ou qPCR la production de médiateurs pro- et anti-inflammatoires. Ces protéines, particulièrement celles modifiées post-traductionnellement pourraient également induire des auto-anticorps dans la PR. Pour le vérifier, nous allons adsorber ces protéines sur des plaques ELISA et tester si des IgGs purifiés à partir de patients atteints de PR ou les sera de patients reconnaissent ces protéines. Ensuite, nous pourrions également adsorber ces protéines sur des plaques de culture et former des complexes immuns avec les anticorps de patients afin d'analyser l'état d'activation des

sous-populations de macrophages en présence des complexes immuns formés. Toutes ces expériences seront réalisées *ex-vivo*.

*In-vivo*, la quantité importante de NETs produite par les neutrophiles de patients atteints de PR pourrait être l'une des causes d'une activation exagérée des macrophages de patients par les NETs. En effet, les neutrophiles de patients PR produisent plus de NETs que les neutrophiles de sujets sains et ce, spontanément mais aussi en réponse au LPS (Khandpur et al., 2013) ou au PMA (Ribon et al., 2019).

#### **IV. Mécanisme d'activation des macrophages par les NETs.**

Nous avons étudié le mécanisme d'activation des macrophages par les NETs. Les NETs sont composés d'ADN décoré avec des protéines neutrophilaires. Notre hypothèse est que l'ADN ou les protéines des NETs pourraient se lier aux macrophages et les activer.

Le TLR9 est un récepteur de l'ADNdb riche en motifs CpG-non méthylés (Kumagai, Takeuchi, and Akira, 2008). Il est exprimé dans les compartiments endosomaux des macrophages (Latz et al. 2004). Le TLR9 endosomal est actif à pH acide. Nous avons préalablement démontré que l'activation des macrophages par les NETs est indépendante de l'acidification endosomale, suggérant un mécanisme indépendant des TLR9 endosomaux (Ribon et al. 2019). Néanmoins, il existe également des TLR9 membranaires (Lindau et al. 2013). Nous avons supposé que ces TLR9 pourraient reconnaître l'ADN des NETs et activer les macrophages. Nous avons alors cultivé des macrophages préparés à partir de souris WT ou déficientes pour le TLR9 avec des NETs de souris naïves. Nous avons démontré qu'il n'y a pas de différence de sécrétion de cytokines par les macrophages WT ou KO-TLR9 en présence de NETs. Nous avons ainsi montré que l'activation des macrophages par les NETs ne passe ni par les TLR9 endosomaux ni par les TLR9 membranaires. Néanmoins, nous avons uniquement analysé la sécrétion des cytokines. Afin de confirmer nos résultats, des expériences supplémentaires pourraient être réalisées. En effet, nous pourrions analyser l'induction d'autres médiateurs inflammatoires comme la production de ROS, la capacité des macrophages à être activées et à présenter des antigènes en étudiant l'expression des marqueurs CMH II, CD80, CD86 et CD40. Enfin, nous pourrions étudier leurs propriétés phagocytaires.

Nous nous sommes intéressés ensuite au C1q, qui joue un rôle important dans la pathogenèse de la PR (Trinder et al., 1996, 1997; Trouw et al., 2013). Le C1q est le premier composant de la voie classique du complément. Il est constitué d'une région C-terminale globulaire (gC1q) et d'une queue N-terminale (cC1q) (Reid and Porter, 1976). La gC1q interagit avec les complexes immuns IgG/IgM-microbes et déclenche la cascade du complément qui détruit le pathogène.

Le C1q peut également accrocher des particules des agents pathogènes de manière directe. En effet, il peut se lier par exemple à leur l'ADN *via* ses deux domaines cC1q et gC1q (Jiang et al., 1992; Garlatti et al., 2010). Enfin, le C1q peut s'associer à ses nombreux récepteurs présents sur les macrophages et déclenche leur activation (Bobak et al., 1987).

Leffler et al ont montré que dans le lupus érythémateux systémique, le C1q se lie aux NETs et empêche leur dégradation par les DNases. Ceci pourrait faciliter la production d'auto-anticorps contre les NETs et exacerber la sévérité de la maladie (Leffler et al., 2012). De plus, il a été montré par notre équipe que la culture des macrophages M0 avec des NETs et du C1q augmente la sécrétion d'IL-8. La préincubation des macrophages avec le C1q à forte concentration dans le but de bloquer les récepteurs du C1q sur les macrophages empêche la sécrétion de l'IL-8 (Ribon et al., 2019). Nous avons alors supposé que le C1q lié aux NETs lors de leur libération par les neutrophiles serait responsable de l'activation des macrophages par les NETs. De ce fait, nous avons cultivé des macrophages avec des NETs préparés à partir de souris WT ou KO-C1q. Nous avons montré que la production de MIP2 n'est pas modulée par les macrophages cultivés avec les NETs de souris KO-C1q par rapport aux NETs de souris WT. Nous avons donc conclu que, le C1q présent dans les NETs n'est pas à l'origine de l'activation des macrophages par les NETs.

Le C1q peut être produit par les macrophages (Bobak et al., 1987). Il peut donc se lier aux NETs et activer les macrophages en autologue via leurs récepteurs. Néanmoins, nous avons exclu cette possibilité. En effet, j'ai cultivé des macrophages de souris WT ou KO-C1q avec des NETs et la sécrétion de MIP2 et TNF $\alpha$  est inchangée dans les deux conditions. C'est donc le C1q exogène, produit par d'autres cellules et fixé aux NETs, qui pourrait être à l'origine en partie, de l'activation des macrophages par les NETs. Cette hypothèse reste néanmoins à confirmer.

Le C1q est présent en très grand nombre dans le liquide synovial de patients atteints de PR (Sjöholm et al., 1986). Sachant que les NETs induisent un profil pro-inflammatoire sur les macrophages et que le C1q se lie aux NETs dans d'autres maladies (Leffler et al., 2012), nous supposons que le C1q présent en quantités importantes dans la PR lie l'ADN des NETs, le complexe NETs-C1q pourrait ensuite activer les macrophages en se liant aux récepteurs des C1q présents sur ces derniers. De plus, les NETs étant source d'auto-antigènes reconnus par les ACPA (Carmona-Rivera et al., 2017; Ribon et al., 2019), le C1q pourrait s'associer directement aux complexes immuns ainsi formés via la partie Fc des ACPA et activer les macrophages directement via leurs récepteurs au C1q. Cette hypothèse reste à explorer. Nous pourrions le faire en cultivant des macrophages avec des NETs ou des complexes immuns NETs-ACPA en présence ou en l'absence de C1q, puis examiner l'état d'activation de ces macrophages.

Cibler les mécanismes d'activation des macrophages par les NETs dans la PR nous permettra d'atténuer l'inflammation induite par les macrophages dans cette maladie.

De nombreux récepteurs à l'ADN et aux protéines chargées sur les NETs sont présents sur les macrophages et pourraient induire leur activation. Une étude suggère que l'activation des macrophages par les NETs pourrait passer par le récepteur cytosolique à l'ADN, le cyclic GMP-AMP synthase (cGAS). En effet, les auteurs ont montré que les macrophages internalisent les NETs et que les composants des NETs passaient des phagolysosomes au cytosol. Ils ont montré également que les NETs sont capables de reconnaître cGAS. Chez la souris, les NETs ont stimulé la production d'IFN de type I d'une manière dépendante de cGAS, ce qui suggère que cGAS agit comme un récepteur de NETs pour stimuler les réponses immunitaires (Apel et al., 2021). Cependant cela a été réalisé *in-vivo* et donc le type cellulaire responsable de l'induction de cette réponse immunitaire en présence de NETs n'a pas été identifié.

Dans notre étude nous avons montré que l'activation des macrophages par les NETs ne passe pas par le TLR9 en utilisant des souris déficientes en TLR9 (membranaire et endosomal). Par ailleurs, Carmona-Rivera *et al.* ont montré que l'activation des FLS par les NETs passe par l'axe RAGE-TLR9 en utilisant le même protocole de production de NETs que celui de notre laboratoire et des antagonistes de TLR9. Ces résultats sont différents de ceux que nous avons obtenus sur les macrophages et ceci réside principalement dans le fait que ce n'est pas le même type cellulaire utilisé pour montrer l'activation d'une CPA par les NETs (Carmona-Rivera et al., 2017). De plus, l'utilisation de souris déficientes permet d'exclure de manière certaine l'implication de ce récepteur.

D'autres récepteurs à l'ADN sont présents sur ou dans les macrophages pourraient être étudiés. L'un d'eux est le récepteur AIM2 (absent in melanoma 2-like receptors). AIM2 est un capteur d'acide nucléique qui s'assemble en inflammasome. Pour rappel l'inflammasome est constitué d'un complexe multimérique engagé dans la défense immunitaire contre les agents pathogènes en induisant une mort cellulaire inflammatoire programmée appelée pyroptose. De nouvelles études ont démontré que la rupture de la membrane plasmique lors de la formation de NETs dépendante des ROS est médiée par la gasdermine D, reliant la formation de NETs à la pyroptose (Chen et al., 2018; Sollberger et al., 2018). Ceci suggère qu'un inflammasome pourrait être engagé dans l'activation de macrophages par les NETs. Pour vérifier cette hypothèse, il sera nécessaire de voir l'état d'activation des macrophages en présence de NETs et d'antagoniste de AIM2 ou d'utiliser des souris déficientes en AIM2.

D'autres récepteurs à l'ADN présents sur les macrophages peuvent être engagés dans l'activation des macrophages par les NETs. Cependant, les NETs sont chargés de plusieurs protéines et l'activation des macrophages par les NETs pourrait passer par ces différentes protéines reconnues leurs récepteurs spécifiques

## **V. Voies induites par l'activation des macrophages par les NETs**

Nous avons finalement étudié les voies induites par les macrophages stimulés aux NETs dans la PR. Pour ce faire, nous avons effectué une étude du transcriptome par RNAseq des macrophages M1-like de cinq sujets sains, en présence de tampon de purification de NETs ou en présence de NETs préparés à partir d'un seul patient atteint de PR.

Nous avons utilisé des macrophages M1-like différenciés à partir de monocytes de sujets sains et non de patients atteints de PR. En effet, les monocytes et les macrophages de patients sont spontanément d'ores et déjà hautement inflammatoires par les différents stimuli de la PR, dont les NETs. De ce fait, les résultats qui auraient pu être obtenus après leur stimulation avec des NETs *in vitro* nous auraient probablement menés à tirer des conclusions à tort sur l'effet des NETs sur les macrophages dans la PR. Ensuite, c'est dû à un souci pratique. En effet, afin d'éviter les artefacts, les cellules de tous les donneurs devaient être manipulées au même moment. Cependant, Il n'est pas possible d'avoir des échantillons de sang d'autant de patients PR sans biothérapie le même jour. Néanmoins, nous avons décidé d'effectuer notre expérience sur des macrophages M1-like, dont le profil est pro-inflammatoire, comme dans la PR. De plus,



les NETs utilisés pour activer les macrophages sont préparés à partir de neutrophiles d'un patient atteint de PR. Ainsi, nous avons seulement pu examiner l'effet des NETs, qui sont présents de façon importante dans la PR, sur des macrophages ayant un profil pro-inflammatoire.

Nos résultats ont montré que l'activation des macrophages par les NETs induit l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'exacerbation de l'inflammation constatée dans la PR. En effet, nous retrouvons une augmentation de plusieurs cytokines pro-inflammatoires emblématiques de la PR, comme le  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-23$ ,  $IL-1\alpha$  et le récepteur à l' $IL-6$ . Nous retrouvons aussi une diminution significative de la cytokine anti-inflammatoire  $IL-10$ , confortant ainsi nos résultats. En plus des cytokines, les macrophages M1-like stimulés avec des NETs augmentent l'expression des gènes impliqués dans l'infiltration des monocytes, neutrophiles et macrophages et la persistance des macrophages dans les tissus enflammés. C'est par exemple le cas de la  $CXCL8$ ,  $CXCL1$  et  $CCL8$ , qui sont présents de façon importante dans la PR et qui sont les chimioattractants majeurs des neutrophiles et des lymphocytes (Hou et al., 2020). C'est aussi le cas pour le chimioattractant  $CCL3$ , qui en se liant à son récepteur  $CCR1$  et  $CCR5$  est impliqué dans l'attraction des macrophages, des monocytes et des neutrophiles dans le site inflammatoire (Gibaldi et al., 2020). De plus, le taux de  $CCL3$  est très élevé dans le liquide synovial ce qui stimule la production des cytokines  $TNF\alpha$ ,  $IL-6$ ,  $IL-1\beta$  et  $RANKL$ , qui participent activement à la pathogenèse de la PR (Zhang et al., 2018). Les macrophages augmentent aussi la sécrétion de la chimiokine  $CCL1$  en réponse aux NETs. Elle se lie à son récepteur  $CCR8$ . Elle a non seulement un rôle dans la chimiotaxie d'autres cellules sur le site inflammatoire mais c'est également un régulateur majeur de l'apoptose, ce qui induit la survie et la persistance des cellules immunitaires sur le site enflammé (Ruckes et al., 2001; Spinetti et al., 2003).

En réponse aux NETs, les macrophages augmentent des médiateurs hypoxiques importants dans la PR comme le  $HIF1\alpha$ , un facteur de transcription induit en état d'hypoxie et de stress oxydatif (Haddad et Harb 2005). De plus, il a été démontré dans un modèle expérimental d'arthrites, la présence d'hypoxie dans les articulations enflammées avec une colocalisation de  $HIF-1\alpha$  dans ces zones hypoxiques, suggérant que l'hypoxie peut induire l'expression de  $HIF-1\alpha$  au cours de l'inflammation des articulations (Peters et al., 2004). De plus,  $HIF-1\alpha$  est fortement produit dans la couche sous-jacente de la synoviale de la PR et son niveau d'expression est corrélé à l'angiogenèse et l'inflammation induites dans cette maladie (Brouwer et al. 2009).  $HIF1\alpha$  contrôle le switch métabolique de la phosphorylation oxydative

vers la glycolyse anaérobie. Le métabolisme énergétique étant important pour la différenciation des sous-populations macrophagiques, ce résultat pourrait être très important dans le profil pro-inflammatoire induit par les macrophages M2-like dans la PR.

Les NETs sont également potentiellement responsables en partie de l'augmentation de l'érosion de l'os observée dans la PR. En effet, ils augmentent l'expression du TNFSF14, un membre de la famille du TNF, impliqué dans l'ostéoclastogénèse dépendante et indépendante de RANKL, et la destruction osseuse dans la PR (Edwards et al., 2006b; Ishida et al., 2009). De plus, les NETs réduisent l'expression de RGS18, la protéine régulatrice de l'activité de signalisation des protéines G. RGS18 est notamment impliquée dans la régulation négative des voies de signalisation qui mènent à l'ostéoclastogénèse (Iwai et al., 2007).

CEACAM3 est une glycoprotéine exprimée exclusivement par les granulocytes. Elle est impliquée dans l'élimination des bactéries pathogènes indépendamment des opsonines (Schmitter et al., 2004). Nous démontrons ici que les macrophages expriment aussi CEACAM3 et que les NETs induisent la diminution de son expression, ce qui favoriserait l'installation de foyers infectieux dans la PR. Tout en sachant que les NETs sont induits par certaines infections et plusieurs infections sont associées à un risque de PR.

Enfin, les macrophages M1-like stimulés avec des NETs induisent des gènes en aval de la voie AhR. L'AhR est un facteur de transcription qui active les gènes qui codent pour les protéines de détoxification telles que les cytochromes CYP1A1 et CYP1B1. Il peut lier plusieurs ligands, dont les métabolites du tryptophane. Selon son ligand et le microenvironnement dans lequel il se trouve, il présente différents effets (Shinde and McGaha, 2018). L'AhR a une fonction anti-inflammatoire (Ye et al., 2017). Il induit un feedback négatif des macrophages stimulés au LPS pour limiter l'inflammation. En effet, la production d'IL-6, du TNF $\alpha$  et d'IL-12 par le LPS est plus élevée dans les macrophages déficients en AhR que dans les macrophages de souris sauvage (Kimura et al., 2009). De plus, la production d'IL-10 est plus faible dans les macrophages déficients en AhR que dans les cellules de souris sauvages (Kimura et al., 2009). Un autre groupe montre également que l'AhR diminue les facteurs de transcription des macrophages PU.1 et limite la différenciation des monocytes en macrophages (Shinde and McGaha, 2018). Cependant, l'AhR joue aussi un rôle pro-inflammatoire, notamment sur les lymphocytes T. En effet, les souris KO-AhR immunisées au collagène ont présenté des taux réduits de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 $\beta$  et IL-6 (Nakahama

et al., 2011). De plus, la déficience d'AhR sur les lymphocytes T dans un modèle expérimental d'arthrite supprime le développement des arthrites (Nakahama et al., 2011).

Nos résultats de RNAseq indiquent que plusieurs gènes en aval de la voie AhR sont induits (CYP1A1, CYP1B1, AOX1, GCLM et AKR1C1). Ceci est très intéressant, puisque cela peut représenter un mécanisme d'activation de ce facteur de transcription jamais démontré auparavant. Nous sommes en train de valider maintenant (avec le Dr. Elodie Segura, Institut Curie) l'implication de ce récepteur et de cette voie. Pour cela nous différencions des monocytes en macrophages avec du M-CSF ou du GM-CSF à partir de cellules de la moelle osseuse de souris sauvages et des souris déficientes en AhR sur les cellules myéloïdes (LysM-Cre  $Ahr^{flox/flox}$ ). Nous préparons également des NETs à partir des neutrophiles triés de souris sauvages. Par la suite nous stimulons les macrophages générés avec les NETs et nous analysons par qRT-PCR l'induction de CYP1A1 et de AhRR (aryl-hydrocarbon receptor repressor). Nous différencions également des monocytes humains en macrophages et nous les stimulons avec des NETs en présence ou en absence d'un antagoniste d'AHR (StemRegenin 1). Nous analysons par qRT-PCR l'expression de CYP1A1 et CYP1B1.

Le rôle de l'engagement de la voie AhR par les macrophages stimulés aux NETs dans la PR reste à déterminer. Deux possibilités subsistent. La première hypothèse spécule que la voie AhR est stimulée afin d'induire un feedback négatif de l'activation par les NETs pour diminuer l'inflammation. Ce processus devrait être cependant déficient dans les macrophages des patients atteints de PR. Pour vérifier cette possibilité, il serait intéressant de comparer la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires en réponse aux NETs *in vitro*, par des macrophages préparés à partir de souris naïves ou de modèles d'arthrite, en présence ou en l'absence de siRNA dirigés contre AhR.

Récemment il a été montré que chez des souris déficientes en AhR, il y a une diminution des signes d'inflammations articulaires dans un modèle de souris arthritique K/BxN (Nehmar et al., 2021). Nous émettons alors une deuxième hypothèse. AhR pourrait être présent de façon plus importante chez les macrophages de patients PR et avoir un effet dans la physiopathologie de la PR. Pour examiner cette possibilité, nous allons analyser par cytométrie en flux, avec un marquage intra-cellulaire le niveau d'expression du récepteur AhR sur des macrophages de sujets sains et de patients atteints de PR, pour voir si les patients expriment de manière plus importante ce récepteur. Nous allons également examiner la possibilité de l'activation de médiateurs pro-inflammatoires par AhR en réponse aux NETs. Pour cela nous allons cultiver

des macrophages M1-like avec des NETs et analyser la sécrétion des médiateurs pro-inflammatoires et l'état d'activation des macrophages en présence ou en l'absence de siRNA ciblant l'AhR.

En conclusion, les NETs induisent un profil pro-inflammatoire, pro-oxydatif et pro-érosif sur les macrophages, notamment ceux de patients atteints de PR. Les NETs modifient aussi les propriétés anti-inflammatoires des macrophages M2-like. L'activation des macrophages par les NETs ne passe pas par le TLR9 ni par le C1q présent dans les NETs. Enfin, une nouvelle voie d'activation des macrophages par les NETs a été mise en évidence, c'est la voie impliquant l'AhR. Son rôle dans la PR reste cependant à déterminer.

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abdel-Latif, D., Steward, M., Macdonald, D.L., Francis, G.A., Dinauer, M.C., Lacy, P. (2004): Rac2 is critical for neutrophil primary granule exocytosis. *Blood* **104**: 832–839.
- Abi Abdallah, D.S., Lin, C., Ball, C.J., King, M.R., Duhamel, G.E., Denkers, E.Y. (2012): *Toxoplasma gondii* triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps. *Infect. Immun.* **80**: 768–777.
- Abreu-Velez, A.M., Smith, J.G., Howard, M.S. (2009): Presence of neutrophil extracellular traps and antineutrophil cytoplasmic antibodies associated with vasculitides. *North Am. J. Med. Sci.* **1**: 309–313.
- Abtin, A., Jain, R., Mitchell, A.J., Roediger, B., Brzoska, A.J., Tikoo, S., Cheng, Q., Ng, L.G., Cavanagh, L.L., Andrian, U.H. von, Hickey, M.J., Firth, N., Weninger, W. (2014): Perivascular macrophages mediate neutrophil recruitment during bacterial skin infection. *Nat. Immunol.* **15**: 45–53.
- Adamopoulos, I.E., Sabokbar, A., Wordsworth, B.P., Carr, A., Ferguson, D.J., Athanasou, N.A. (2006): Synovial fluid macrophages are capable of osteoclast formation and resorption. *J. Pathol.* **208**: 35–43.
- Aderem, A.A., Wright, S.D., Silverstein, S.C., Cohn, Z.A. (1985): Ligated complement receptors do not activate the arachidonic acid cascade in resident peritoneal macrophages. *J. Exp. Med.* **161**: 617–622.
- Adkison, A.M., Raptis, S.Z., Kelley, D.G., Pham, C.T.N. (2002): Dipeptidyl peptidase I activates neutrophil-derived serine proteases and regulates the development of acute experimental arthritis. *J. Clin. Invest.* **109**: 363–371.
- Adrian, J., Bonsignore, P., Hammer, S., Frickey, T., Hauck, C.R. (2019): Adaptation to Host-Specific Bacterial Pathogens Drives Rapid Evolution of a Human Innate Immune Receptor. *Curr. Biol. CB* **29**: 616-630.e5.
- Adrover, J.M., Del Fresno, C., Crainiciuc, G., Cuartero, M.I., Casanova-Acebes, M., Weiss, L.A., Hueriga
- Encabo, H., Silvestre-Roig, C., Rossaint, J., Cossío, I., Lechuga-Vieco, A.V., García-Prieto, J., Gómez-Parrizas, M., Quintana, J.A., Ballesteros, I., Martín-Salamanca, S., Aroca-Crevillen, A., Chong, S.Z., Evrard, M., Balabanian, K., López, J., Bidzhekov, K., Bachelier, F., Abad-Santos, F., Muñoz-Calleja, C., Zarbock, A., Soehnlein, O., Weber, C., Ng, L.G., Lopez-Rodriguez, C., Sancho, D., Moro, M.A., Ibáñez, B., Hidalgo, A. (2019): A Neutrophil Timer Coordinates Immune Defense and Vascular Protection. *Immunity* **50**: 390-402.e10.
- Ajeganova, S., Humphreys, J.H., Verheul, M.K., Steenbergen, H.W. van, Nies, J. a. B. van, Hafström, I., Svensson, B., Huizinga, T.W.J., Trouw, L.A., Verstappen, S.M.M., Helm-van Mil, A.H.M. van der (2016): Anticitrullinated protein antibodies and rheumatoid factor are associated with increased mortality but with different causes of death in patients with rheumatoid arthritis: a longitudinal study in three European cohorts. *Ann. Rheum. Dis.* **75**: 1924–1932.
- Ajeganova, S., Steenbergen, H.W. van, Verheul, M.K., Forslind, K., Hafström, I., Toes, R.E.M., Huizinga, T.W.J., Svensson, B., Trouw, L.A., Helm-van Mil, A.H.M. van der (2017): The association between anti-carbamylated protein (anti-CarP) antibodies and radiographic progression in early rheumatoid arthritis: a study exploring replication and the added value to ACPA and rheumatoid factor. *Ann. Rheum. Dis.* **76**: 112–118.
- 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.
- Aletaha, D., Nell, V.P.K., Stamm, T., Uffmann, M., Pflugbeil, S., Machold, K., Smolen, J.S. (2005): Acute phase reactants add little to composite disease activity indices for rheumatoid arthritis: validation of a clinical activity score. *Arthritis Res. Ther.* **7**: R796-806.
- Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A.J., Funovits, J., Felson, D.T., Bingham, C.O., Birnbaum, N.S., Burmester, G.R., Bykerk, V.P., Cohen, M.D., Combe, B., Costenbader, K.H., Dougados, M., Emery, P., Ferraccioli, G., Hazes, J.M.W., Hobbs, K., Huizinga, T.W.J., Kavanaugh, A., Kay, J., Kvien, T.K., Laing, T., Mease, P., Ménard, H.A., Moreland, L.W., Naden, R.L., Pincus, T., Smolen, J.S., Stanislawska-Biernat, E., Symmons, D., Tak, P.P., Upchurch, K.S., Vencovský, J., Wolfe, F., Hawker, G. (2010): 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* **62**: 2569–2581.

- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., Flavell, R.A. (2001): Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**: 732–738.
- Alexopoulou, L., Thomas, V., Schnare, M., Lobet, Y., Anguita, J., Schoen, R.T., Medzhitov, R., Fikrig, E., Flavell, R.A. (2002): Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. *Nat. Med.* **8**: 878–884.
- Aleyd, E., Al, M., Tuk, C.W., Laken, C.J. van der, Egmond, M. van (2016): IgA Complexes in Plasma and Synovial Fluid of Patients with Rheumatoid Arthritis Induce Neutrophil Extracellular Traps via Fc $\alpha$ RI. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **197**: 4552–4559.
- Allen, L.A., Aderem, A. (1996): Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J. Exp. Med.* **184**: 627–637.
- Allen, L.-A.H., Criss, A.K. (2019): Cell intrinsic functions of neutrophils and their manipulation by pathogens. *Curr. Opin. Immunol.* **60**: 124–129.
- Alonzi, T., Fattori, E., Lazzaro, D., Costa, P., Probert, L., Kollias, G., De Benedetti, F., Poli, V., Ciliberto, G. (1998): Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. *J. Exp. Med.* **187**: 461–468.
- Alpízar-Rodríguez, D., Pluchino, N., Canny, G., Gabay, C., Finckh, A. (2017): The role of female hormonal factors in the development of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **56**: 1254–1263.
- Ambarus, C.A., Krausz, S., Eijk, M. van, Hamann, J., Radstake, T.R.D.J., Reedquist, K.A., Tak, P.P., Baeten, D.L.P. (2012a): Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. *J. Immunol. Methods* **375**: 196–206.
- Ambarus, C.A., Noordenbos, T., Hair, M.J.H. de, Tak, P.P., Baeten, D.L.P. (2012b): Intimal lining layer macrophages but not synovial sublining macrophages display an IL-10 polarized-like phenotype in chronic synovitis. *Arthritis Res. Ther.* **14**: R74.
- Amini, P., Stojkov, D., Felser, A., Jackson, C.B., Courage, C., Schaller, A., Gelman, L., Soriano, M.E., Nuoffer, J.-M., Scorrano, L., Benarafa, C., Yousefi, S., Simon, H.-U. (2018): Neutrophil extracellular trap formation requires OPA1-dependent glycolytic ATP production. *Nat. Commun.* **9**: 2958.
- Amini, P., Stojkov, D., Wang, X., Wicki, S., Kaufmann, T., Wong, W.W.-L., Simon, H.-U., Yousefi, S. (2016): NET formation can occur independently of RIPK3 and MLKL signaling. *Eur. J. Immunol.* **46**: 178–184.
- Ammari, M., Presumey, J., Ponsolles, C., Roussignol, G., Roubert, C., Escriou, V., Toupet, K., Mausset-Bonnefont, A.-L., Cren, M., Robin, M., Georgel, P., Nehmar, R., Taams, L., Grün, J., Grützkau, A., Häupl, T., Pers, Y.-M., Jorgensen, C., Duroux-Richard, I., Courties, G., Apparailly, F. (2018): Delivery of miR-146a to Ly6Chigh Monocytes Inhibits Pathogenic Bone Erosion in Inflammatory Arthritis. *Theranostics* **8**: 5972–5985.
- Amulic, B., Knackstedt, S.L., Abu Abed, U., Deigendesch, N., Harbort, C.J., Caffrey, B.E., Brinkmann, V., Heppner, F.L., Hinds, P.W., Zychlinsky, A. (2017): Cell-Cycle Proteins Control Production of Neutrophil Extracellular Traps. *Dev. Cell* **43**: 449-462.e5.
- Ancuta, P., Liu, K.-Y., Misra, V., Wacleche, V.S., Gosselin, A., Zhou, X., Gabuzda, D. (2009): Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16+ and CD16- monocyte subsets. *BMC Genomics* **10**: 403.
- Anderson, C.F., Mosser, D.M. (2002a): A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *J. Leukoc. Biol.* **72**: 101–106.
- Anderson, C.F., Mosser, D.M. (2002b): Cutting edge: biasing immune responses by directing antigen to macrophage Fc gamma receptors. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **168**: 3697–3701.
- Anderson, M.S., Miller, J. (1992): Invariant chain can function as a chaperone protein for class II major histocompatibility complex molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**: 2282–2286.

- Andrade, W.A., Souza, M. do C., Ramos-Martinez, E., Nagpal, K., Dutra, M.S., Melo, M.B., Bartholomeu, D.C., Ghosh, S., Golenbock, D.T., Gazzinelli, R.T. (2013): Combined action of nucleic acid-sensing Toll-like receptors and TLR11/TLR12 heterodimers imparts resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. *Cell Host Microbe* **13**: 42–53.
- Andzinski, L., Kasnitz, N., Stahnke, S., Wu, C.-F., Gereke, M., Köckritz-Blickwede, M. von, Schilling, B., Brandau, S., Weiss, S., Jablonska, J. (2016): Type I IFNs induce anti-tumor polarization of tumor associated neutrophils in mice and human. *Int. J. Cancer* **138**: 1982–1993.
- Antoniv, T.T., Ivashkiv, L.B. (2006): Dysregulation of interleukin-10-dependent gene expression in rheumatoid arthritis synovial macrophages. *Arthritis Rheum.* **54**: 2711–2721.
- Apel, F., Andreeva, L., Knackstedt, L.S., Streeck, R., Frese, C.K., Goosmann, C., Hopfner, K.-P., Zychlinsky, A. (2021): The cytosolic DNA sensor cGAS recognizes neutrophil extracellular traps. *Sci. Signal.* **14**: eaax7942.
- Arnoux, F., Mariot, C., Peen, E., Lambert, N.C., Balandraud, N., Roudier, J., Auger, I. (2017): Peptidyl arginine deiminase immunization induces anticitrullinated protein antibodies in mice with particular MHC types. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**: E10169–E10177.
- Arpaia, N., Green, J.A., Moltedo, B., Arvey, A., Hemmers, S., Yuan, S., Treuting, P.M., Rudensky, A.Y. (2015): A Distinct Function of Regulatory T Cells in Tissue Protection. *Cell* **162**: 1078–1089.
- Arruda-Silva, F., Bianchetto-Aguilera, F., Gasperini, S., Polletti, S., Cosentino, E., Tamassia, N., Cassatella, M.A. (2017): Human Neutrophils Produce CCL23 in Response to Various TLR-Agonists and TNF $\alpha$ . *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**: 176.
- Asai, A., Nakamura, K., Kobayashi, M., Herndon, D.N., Suzuki, F. (2012): CCL1 released from M2b macrophages is essentially required for the maintenance of their properties. *J. Leukoc. Biol.* **92**: 859–867.
- Ashrafi, G., Schwarz, T.L. (2013): The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ.* **20**: 31–42.
- Assi, L.K., Wong, S.H., Ludwig, A., Raza, K., Gordon, C., Salmon, M., Lord, J.M., Scheel-Toellner, D. (2007): Tumor necrosis factor alpha activates release of B lymphocyte stimulator by neutrophils infiltrating the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum.* **56**: 1776–1786.
- Aubry, M.-C., Maradit-Kremers, H., Reinalda, M.S., Crowson, C.S., Edwards, W.D., Gabriel, S.E. (2007): Differences in atherosclerotic coronary heart disease between subjects with and without rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **34**: 937–942.
- Auffray, C., Fogg, D.K., Narni-Mancinelli, E., Senechal, B., Trouillet, C., Saederup, N., Leemput, J., Bigot, K., Campisi, L., Abitbol, M., Molina, T., Charo, I., Hume, D.A., Cumano, A., Lauvau, G., Geissmann, F. (2009): CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J. Exp. Med.* **206**: 595–606.
- 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.
- Aviña-Zubieta, J.A., Choi, H.K., Sadatsafavi, M., Etmnan, M., Esdaile, J.M., Lacaille, D. (2008): Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Arthritis Rheum.* **59**: 1690–1697.
- Baecklund, E., Iliadou, A., Askling, J., Ekbom, A., Backlin, C., Granath, F., Catrina, A.I., Rosenquist, R., Feltelius, N., Sundström, C., Klareskog, L. (2006): Association of chronic inflammation, not its treatment, with increased lymphoma risk in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **54**: 692–701.
- Baici, A., Salgam, P., Cohen, G., Fehr, K., Böni, A. (1982): Action of collagenase and elastase from human polymorphonuclear leukocytes on human articular cartilage. *Rheumatol. Int.* **2**: 11–16.



- Bain, C.C., Bravo-Blas, A., Scott, C.L., Perdiguero, E.G., Geissmann, F., Henri, S., Malissen, B., Osborne, L.C., Artis, D., Mowat, A.M. (2014): Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat. Immunol.* **15**: 929–937.
- Bain, C.C., Hawley, C.A., Garner, H., Scott, C.L., Schridde, A., Steers, N.J., Mack, M., Joshi, A., Williams, M., Mowat, A.M.I., Geissmann, F., Jenkins, S.J. (2016): Long-lived self-renewing bone marrow-derived macrophages displace embryo-derived cells to inhabit adult serous cavities. *Nat. Commun.* **7**: ncomms11852.
- Bainton, D.F., Ulliyot, J.L., Farquhar, M.G. (1971): The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J. Exp. Med.* **134**: 907–934.
- Balandraud, N., Auger, I., Roudier, J. (2021): Do RA associated HLA-DR molecules bind citrullinated peptides or peptides from PAD4 to help the development of RA specific antibodies to citrullinated proteins? *J. Autoimmun.* **116**: 102542.
- Bao, Y., Cao, X. (2011): Revisiting the protective and pathogenic roles of neutrophils: Ly-6G is key! *Eur. J. Immunol.* **41**: 2535–2538.
- Barrientos, L., Bignon, A., Gueguen, C., Chaisemartin, L. de, Gorges, R., Sandré, C., Mascarell, L., Balabanian, K., Kerdine-Römer, S., Pallardy, M., Marin-Esteban, V., Chollet-Martin, S. (2014): Neutrophil extracellular traps downregulate lipopolysaccharide-induced activation of monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **193**: 5689–5698.
- Barton, A., Bowes, J., Eyre, S., Spreckley, K., Hinks, A., John, S., Worthington, J. (2004): A functional haplotype of the PADI4 gene associated with rheumatoid arthritis in a Japanese population is not associated in a United Kingdom population. *Arthritis Rheum.* **50**: 1117–1121.
- Barton, A., John, S., Ollier, W.E., Silman, A., Worthington, J. (2001): Association between rheumatoid arthritis and polymorphism of tumor necrosis factor receptor II, but not tumor necrosis factor receptor I, in Caucasians. *Arthritis Rheum.* **44**: 61–65.
- Bassler, K., Schulte-Schrepping, J., Warnat-Herresthal, S., Aschenbrenner, A.C., Schultze, J.L. (2019): The Myeloid Cell Compartment-Cell by Cell. *Annu. Rev. Immunol.* **37**: 269–293.
- Basu, S., Hodgson, G., Katz, M., Dunn, A.R. (2002): Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation. *Blood* **100**: 854–861.
- Bazzoni, F., Cassatella, M.A., Laudanna, C., Rossi, F. (1991): Phagocytosis of opsonized yeast induces tumor necrosis factor- $\alpha$  mRNA accumulation and protein release by human polymorphonuclear leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* **50**: 223–228.
- Becker, A.J., McCULLOCH, E.A., Till, J.E. (1963): Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* **197**: 452–454.
- Beech, J.T., Andreakos, E., Ciesielski, C.J., Green, P., Foxwell, B.M.J., Brennan, F.M. (2006): T-cell contact-dependent regulation of CC and CXC chemokine production in monocytes through differential involvement of NF $\kappa$ B: implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **8**: R168.
- Beemiller, P., Zhang, Y., Mohan, S., Levinsohn, E., Gaeta, I., Hoppe, A.D., Swanson, J.A. (2010): A Cdc42 activation cycle coordinated by PI 3-kinase during Fc receptor-mediated phagocytosis. *Mol. Biol. Cell* **21**: 470–480.
- Begovich, A.B., Carlton, V.E.H., Honigberg, L.A., Schrodi, S.J., Chokkalingam, A.P., Alexander, H.C., Ardlie, K.G., Huang, Q., Smith, A.M., Spoerke, J.M., Conn, M.T., Chang, M., Chang, S.-Y.P., Saiki, R.K., Catanese, J.J., Leong, D.U., Garcia, V.E., McAllister, L.B., Jeffery, D.A., Lee, A.T., Batliwalla, F., Remmers, E., Criswell, L.A., Seldin, M.F., Kastner, D.L., Amos, C.I., Sninsky, J.J., Gregersen, P.K. (2004): A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am. J. Hum. Genet.* **75**: 330–337.

- Beiter, K., Wartha, F., Albiger, B., Normark, S., Zychlinsky, A., Henriques-Normark, B. (2006): An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr. Biol. CB* **16**: 401–407.
- Belaouaj, A., Kim, K.S., Shapiro, S.D. (2000): Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase. *Science* **289**: 1185–1188.
- Bellocchio, S., Montagnoli, C., Bozza, S., Gaziano, R., Rossi, G., Mambula, S.S., Vecchi, A., Mantovani, A., Levitz, S.M., Romani, L. (2004): The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **172**: 3059–3069.
- Bengtsson, C., Malspeis, S., Orellana, C., Sparks, J.A., Costenbader, K.H., Karlson, E.W. (2017): Association Between Menopausal Factors and the Risk of Seronegative and Seropositive Rheumatoid Arthritis: Results From the Nurses' Health Studies. *Arthritis Care Res.* **69**: 1676–1684.
- Berends, E.T.M., Horswill, A.R., Haste, N.M., Monestier, M., Nizet, V., Köckritz-Blickwede, M. von (2010): Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *J. Innate Immun.* **2**: 576–586.
- Bertrand, J.Y., Jalil, A., Klaine, M., Jung, S., Cumano, A., Godin, I. (2005): Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac. *Blood* **106**: 3004–3011.
- Bevan, M.J. (1976): Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **117**: 2233–2238.
- Bianchi, M., Hakkim, A., Brinkmann, V., Siler, U., Seger, R.A., Zychlinsky, A., Reichenbach, J. (2009): Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood* **114**: 2619–2622.
- Bidkar, M., Vassallo, R., Luckey, D., Smart, M., Mouapi, K., Taneja, V. (2016): Cigarette Smoke Induces Immune Responses to Vimentin in both, Arthritis-Susceptible and -Resistant Humanized Mice. *PloS One* **11**: e0162341.
- Bijl, M., Reefman, E., Horst, G., Limburg, P.C., Kallenberg, C.G.M. (2006): Reduced uptake of apoptotic cells by macrophages in systemic lupus erythematosus: correlates with decreased serum levels of complement. *Ann. Rheum. Dis.* **65**: 57–63.
- Biró, A., Thielens, N.M., Cervenák, L., Prohászka, Z., Füst, G., Arlaud, G.J. (2007): Modified low density lipoproteins differentially bind and activate the C1 complex of complement. *Mol. Immunol.* **44**: 1169–1177.
- Bobak, D.A., Gaither, T.A., Frank, M.M., Tenner, A.J. (1987): Modulation of FcR function by complement: subcomponent C1q enhances the phagocytosis of IgG-opsonized targets by human monocytes and culture-derived macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **138**: 1150–1156.
- Boeltz, S., Amini, P., Anders, H.-J., Andrade, F., Bilyy, R., Chatfield, S., Cichon, I., Clancy, D.M., Desai, J., Dumych, T., Dwivedi, N., Gordon, R.A., Hahn, J., Hidalgo, A., Hoffmann, M.H., Kaplan, M.J., Knight, J.S., Kolaczowska, E., Kubes, P., Leppkes, M., Manfredi, A.A., Martin, S.J., Maueröder, C., Maugeri, N., Mitroulis, I., Munoz, L.E., Nakazawa, D., Neeli, I., Nizet, V., Pieterse, E., Radic, M.Z., Reinwald, C., Ritis, K., Rovere-Querini, P., Santocki, M., Schauer, C., Schett, G., Shlomchik, M.J., Simon, H.-U., Skendros, P., Stojkov, D., Vandenabeele, P., Berghe, T.V., Vlag, J. van der, Vitkov, L., Köckritz-Blickwede, M. von, Yousefi, S., Zarbock, A., Herrmann, M. (2019): To NET or not to NET: current opinions and state of the science regarding the formation of neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* **26**: 395–408.
- Boettcher, S., Ziegler, P., Schmid, M.A., Takizawa, H., Rooijen, N. van, Kopf, M., Heikenwalder, M., Manz, M.G. (2012): Cutting edge: LPS-induced emergency myelopoiesis depends on TLR4-expressing nonhematopoietic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **188**: 5824–5828.
- Bogdan, C., Vodovotz, Y., Nathan, C. (1991): Macrophage deactivation by interleukin 10. *J. Exp. Med.* **174**: 1549–1555.
- Boll, I.T., Fuchs, G. (1970): A kinetic model of granulocytopenesis. *Exp. Cell Res.* **61**: 147–152.

- Bont, C.M. de, Eerden, N., Boelens, W.C., Pruijn, G.J.M. (2020a): Neutrophil proteases degrade autoepitopes of NET-associated proteins. *Clin. Exp. Immunol.* **199**: 1–8.
- Bont, C.M. de, Stokman, M.E.M., Faas, P., Thurlings, R.M., Boelens, W.C., Wright, H.L., Pruijn, G.J.M. (2020b): Autoantibodies to neutrophil extracellular traps represent a potential serological biomarker in rheumatoid arthritis. *J. Autoimmun.* **113**: 102484.
- Borregaard, N., Kjeldsen, L., Rygaard, K., Bastholm, L., Nielsen, M.H., Sengeløv, H., Bjerrum, O.W., Johnsen, A.H. (1992): Stimulus-dependent secretion of plasma proteins from human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **90**: 86–96.
- Borregaard, N., Miller, L.J., Springer, T.A. (1987): Chemoattractant-regulated mobilization of a novel intracellular compartment in human neutrophils. *Science* **237**: 1204–1206.
- Borregaard, N., Sørensen, O.E., Theilgaard-Mönch, K. (2007): Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol.* **28**: 340–345.
- Bos, W.H., Wolbink, G.J., Boers, M., Tijhuis, G.J., Vries, N. de, Horst-Bruinsma, I.E. van der, Tak, P.P., Stadt, R.J. van de, Laken, C.J. van der, Dijkmans, B. a. C., Schaardenburg, D. van (2010): Arthritis development in patients with arthralgia is strongly associated with anti-citrullinated protein antibody status: a prospective cohort study. *Ann. Rheum. Dis.* **69**: 490–494.
- Bosisio, D., Polentarutti, N., Sironi, M., Bernasconi, S., Miyake, K., Webb, G.R., Martin, M.U., Mantovani, A., Muzio, M. (2002): Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon-gamma: a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide. *Blood* **99**: 3427–3431.
- Bowers, N.L., Helton, E.S., Huijbregts, R.P.H., Goepfert, P.A., Heath, S.L., Hel, Z. (2014): Immune suppression by neutrophils in HIV-1 infection: role of PD-L1/PD-1 pathway. *PLoS Pathog.* **10**: e1003993.
- Branzk, N., Lubojemska, A., Hardison, S.E., Wang, Q., Gutierrez, M.G., Brown, G.D., Papayannopoulos, V. (2014): Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat. Immunol.* **15**: 1017–1025.
- Bredt, W., Wellek, B., Brunner, H., Loos, M. (1977): Interactions between mycoplasma pneumoniae and the first components of complement. *Infect. Immun.* **15**: 7–12.
- Brennan, F.M., Chantry, D., Jackson, A., Maini, R., Feldmann, M. (1989): Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet Lond. Engl.* **2**: 244–247.
- Brennan, F.M., Hayes, A.L., Ciesielski, C.J., Green, P., Foxwell, B.M.J., Feldmann, M. (2002): Evidence that rheumatoid arthritis synovial T cells are similar to cytokine-activated T cells: involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB pathways in tumor necrosis factor alpha production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **46**: 31–41.
- Brinkmann, M.M., Spooner, E., Hoebe, K., Beutler, B., Ploegh, H.L., Kim, Y.-M. (2007): The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J. Cell Biol.* **177**: 265–275.
- Brinkmann, V., Goosmann, C., Kühn, L.I., Zychlinsky, A. (2013): Automatic quantification of in vitro NET formation. *Front. Immunol.* **3**.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosman, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weirauch, Y., Zychlinsky, A. (2004): Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **1532**.
- Brown, S., Heinisch, I., Ross, E., Shaw, K., Buckley, C.D., Savill, J. (2002): Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. *Nature* **418**: 200–203.
- Bruschi, M., Petretto, A., Santucci, L., Vaglio, A., Pratesi, F., Migliorini, P., Bertelli, R., Lavarello, C., Bartolucci, M., Candiano, G., Prunotto, M., Ghiggeri, G.M. (2019): Neutrophil Extracellular Traps protein composition is specific for patients with Lupus nephritis and includes methyl-oxidized aenolase (methionine sulfoxide 93). *Sci. Rep.* **9**: 7934.

- Buch, M.H., Boyle, D.L., Rosengren, S., Saleem, B., Reece, R.J., Rhodes, L.A., Radjenovic, A., English, A., Tang, H., Vratsanos, G., O'Connor, P., Firestein, G.S., Emery, P. (2009): Mode of action of abatacept in rheumatoid arthritis patients having failed tumour necrosis factor blockade: a histological, gene expression and dynamic magnetic resonance imaging pilot study. *Ann. Rheum. Dis.* **68**: 1220–1227.
- Buckley, C.D., Ross, E.A., McGettrick, H.M., Osborne, C.E., Haworth, O., Schmutz, C., Stone, P.C.W., Salmon, M., Matharu, N.M., Vohra, R.K., Nash, G.B., Rainger, G.E. (2006): Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of reverse endothelial migration. *J. Leukoc. Biol.* **79**: 303–311.
- Burdon, P.C.E., Martin, C., Rankin, S.M. (2008): Migration across the sinusoidal endothelium regulates neutrophil mobilization in response to ELR + CXC chemokines. *Br. J. Haematol.* **142**: 100–108.
- Burgess, M., Wicks, K., Gardasevic, M., Mace, K.A. (2019): Cx3CR1 Expression Identifies Distinct Macrophage Populations That Contribute Differentially to Inflammation and Repair. *ImmunoHorizons* **3**: 262–273.
- Burmester, G.R., Blanco, R., Charles-Schoeman, C., Wollenhaupt, J., Zerbini, C., Benda, B., Gruben, D., Wallenstein, G., Krishnaswami, S., Zwillich, S.H., Koncz, T., Soma, K., Bradley, J., Mebus, C., ORAL Step investigators (2013): Tofacitinib (CP-690,550) in combination with methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis with an inadequate response to tumour necrosis factor inhibitors: a randomised phase 3 trial. *Lancet Lond. Engl.* **381**: 451–460.
- Burmester, G.R., Mariette, X., Montecucco, C., Monteagudo-Sáez, I., Malaise, M., Tzioufas, A.G., Bijlsma, J.W.J., Unnebrink, K., Kary, S., Kupper, H. (2007): Adalimumab alone and in combination with disease-modifying antirheumatic drugs for the treatment of rheumatoid arthritis in clinical practice: the Research in Active Rheumatoid Arthritis (ReAct) trial. *Ann. Rheum. Dis.* **66**: 732–739.
- Burton, N.A., Schürmann, N., Casse, O., Steeb, A.K., Claudi, B., Zankl, J., Schmidt, A., Bumann, D. (2014): Disparate impact of oxidative host defenses determines the fate of Salmonella during systemic infection in mice. *Cell Host Microbe* **15**: 72–83.
- Cacalano, G., Lee, J., Kikly, K., Ryan, A.M., Pitts-Meek, S., Hultgren, B., Wood, W.I., Moore, M.W. (1994): Neutrophil and B cell expansion in mice that lack the murine IL-8 receptor homolog. *Science* **265**: 682–684.
- Cai, S., Batra, S., Langohr, I., Iwakura, Y., Jeyaseelan, S. (2016): IFN- $\gamma$  induction by neutrophil-derived IL-17A homodimer augments pulmonary antibacterial defense. *Mucosal Immunol.* **9**: 718–729.
- Caielli, S., Athale, S., Domic, B., Murat, E., Chandra, M., Banchereau, R., Baisch, J., Phelps, K., Clayton, S., Gong, M., Wright, T., Punaro, M., Palucka, K., Guiducci, C., Banchereau, J., Pascual, V. (2016): Oxidized mitochondrial nucleoids released by neutrophils drive type I interferon production in human lupus. *J. Exp. Med.* **213**: 697–713.
- Campbell-Valois, F.-X., Trost, M., Chemali, M., Dill, B.D., Laplante, A., Duclos, S., Sadeghi, S., Rondeau, C., Morrow, I.C., Bell, C., Gagnon, E., Hatsuzawa, K., Thibault, P., Desjardins, M. (2012): Quantitative proteomics reveals that only a subset of the endoplasmic reticulum contributes to the phagosome. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **11**: M111.016378.
- Campos, M.A., Almeida, I.C., Takeuchi, O., Akira, S., Valente, E.P., Procópio, D.O., Travassos, L.R., Smith, J.A., Golenbock, D.T., Gazzinelli, R.T. (2001): Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **167**: 416–423.
- Canton, J., Schlam, D., Breuer, C., Gütschow, M., Glogauer, M., Grinstein, S. (2016): Calcium-sensing receptors signal constitutive macropinocytosis and facilitate the uptake of NOD2 ligands in macrophages. *Nat. Commun.* **7**: 11284.
- Caponi, L., Petit-Teixeira, E., Sebbag, M., Bongiorno, F., Moscato, S., Pratesi, F., Pierlot, C., Osorio, J., Chapuy-Regaud, S., Guerrin, M., Cornelis, F., Serre, G., Migliorini, P., ECRAF (2005): A family based study shows no association between rheumatoid arthritis and the PADI4 gene in a white French population. *Ann. Rheum. Dis.* **64**: 587–593.

- Carman, C.V., Springer, T.A. (2004): A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J. Cell Biol.* **167**: 377–388.
- Carmona-Rivera, C., Carlucci, P.M., Goel, R.R., James, E., Brooks, S.R., Rims, C., Hoffmann, V., Fox, D.A., Buckner, J.H., Kaplan, M.J. (2020): Neutrophil extracellular traps mediate articular cartilage damage and enhance cartilage component immunogenicity in rheumatoid arthritis. *JCI Insight* **5**.
- Carmona-Rivera, C., Carlucci, P.M., Moore, E., Lingampalli, N., Uchtenhagen, H., James, E., Liu, Y., Bicker, K.L., Wahamaa, H., Hoffmann, V., Catrina, A.I., Thompson, P., Buckner, J.H., Robinson, W.H., Fox, D.A., Kaplan, M.J. (2017): Synovial fibroblast-neutrophil interactions promote pathogenic adaptive immunity in rheumatoid arthritis. *Sci. Immunol.* **2**.
- Carmona-Rivera, C., Kaplan, M.J. (2013): Low-density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin. Immunopathol.* **35**: 455–463.
- Casanova-Acebes, M., Pitaval, C., Weiss, L.A., Nombela-Arrieta, C., Chèvre, R., A-González, N., Kunisaki, Y., Zhang, D., Rooijen, N. van, Silberstein, L.E., Weber, C., Nagasawa, T., Frenette, P.S., Castrillo, A., Hidalgo, A. (2013): Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell* **153**: 1025–1035.
- Cassatella, M.A., Bazzoni, F., Ceska, M., Ferro, I., Baggiolini, M., Berton, G. (1992): IL-8 production by human polymorphonuclear leukocytes. The chemoattractant formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces the gene expression and release of IL-8 through a pertussis toxin-sensitive pathway. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **148**: 3216–3220.
- Castellino, F., Germain, R.N. (1995): Extensive trafficking of MHC class II-invariant chain complexes in the endocytic pathway and appearance of peptide-loaded class II in multiple compartments. *Immunity* **2**: 73–88.
- Celada, A., Gray, P.W., Rinderknecht, E., Schreiber, R.D. (1984): Evidence for a gamma-interferon receptor that regulates macrophage tumoricidal activity. *J. Exp. Med.* **160**: 55–74.
- Chabaud, M., Durand, J.M., Buchs, N., Fossiez, F., Page, G., Frappart, L., Miossec, P. (1999): Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum.* **42**: 963–970.
- Chabaud, M., Lubberts, E., Joosten, L., Den Berg, W. van, Miossec, P. (2001): IL-17 derived from juxta-articular bone and synovium contributes to joint degradation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* **3**: 168–177.
- Chakravarti, A., Raquil, M.-A., Tessier, P., Poubelle, P.E. (2009): Surface RANKL of Toll-like receptor 4-stimulated human neutrophils activates osteoclastic bone resorption. *Blood* **114**: 1633–1644.
- Chang, C.I., Liao, J.C., Kuo, L. (1998): Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *Am. J. Physiol.* **274**: H342–348.
- Chang, H.-H., Dwivedi, N., Nicholas, A.P., Ho, I.-C. (2015): The W620 Polymorphism in PTPN22 Disrupts Its Interaction With Peptidylarginine Deiminase Type 4 and Enhances Citrullination and NETosis. *Arthritis Rheumatol.* **67**: 2323–2334.
- Chapman, A.L.P., Hampton, M.B., Senthilmohan, R., Winterbourn, C.C., Kettle, A.J. (2002): Chlorination of bacterial and neutrophil proteins during phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **277**: 9757–9762.
- Chapman, E.A., Lyon, M., Simpson, D., Mason, D., Beynon, R.J., Moots, R.J., Wright, H.L. (2019): Caught in a Trap? Proteomic Analysis of Neutrophil Extracellular Traps in Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus. *Front. Immunol.* **10**: 423.
- Chávez-Galán, L., Olleros, M.L., Vesin, D., Garcia, I. (2015): Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169(+) and TCR(+) Macrophages. *Front. Immunol.* **6**: 263.

- Chen, H.-H., Huang, N., Chen, Y.-M., Chen, T.-J., Chou, P., Lee, Y.-L., Chou, Y.-J., Lan, J.-L., Lai, K.-L., Lin, C.-H., Chen, D.-Y. (2013): Association between a history of periodontitis and the risk of rheumatoid arthritis: a nationwide, population-based, case-control study. *Ann. Rheum. Dis.* **72**: 1206–1211.
- Chen, K.W., Monteleone, M., Boucher, D., Sollberger, G., Ramnath, D., Condon, N.D., Pein, J.B. von, Broz, P., Sweet, M.J., Schroder, K. (2018): Noncanonical inflammasome signaling elicits gasdermin D-dependent neutrophil extracellular traps. *Sci. Immunol.* **3**.
- Chen, Y., Corriden, R., Inoue, Y., Yip, L., Hashiguchi, N., Zinkernagel, A., Nizet, V., Insel, P.A., Junger, W.G. (2006): ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science* **314**: 1792–1795.
- Chessa, T.A.M., Anderson, K.E., Hu, Y., Xu, Q., Rausch, O., Stephens, L.R., Hawkins, P.T. (2010): Phosphorylation of threonine 154 in p40phox is an important physiological signal for activation of the neutrophil NADPH oxidase. *Blood* **116**: 6027–6036.
- Chikanza, I.C., Roux-Lombard, P., Dayer, J.M., Panayi, G.S. (1995): Dysregulation of the in vivo production of interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis. Pathogenetic implications. *Arthritis Rheum.* **38**: 642–648.
- Chockalingam, A., Brooks, J.C., Cameron, J.L., Blum, L.K., Leifer, C.A. (2009): TLR9 traffics through the Golgi complex to localize to endolysosomes and respond to CpG DNA. *Immunol. Cell Biol.* **87**: 209–217.
- Chong, S.Z., Evrard, M., Devi, S., Chen, J., Lim, J.Y., See, P., Zhang, Y., Adrover, J.M., Lee, B., Tan, L., Li, J.L.Y., Liong, K.H., Phua, C., Balachander, A., Boey, A., Liebl, D., Tan, S.M., Chan, J.K.Y., Balabanian, K., Harris, J.E., Bianchini, M., Weber, C., Duchene, J., Lum, J., Poidinger, M., Chen, Q., Rénia, L., Wang, C.-I., Larbi, A., Randolph, G.J., Weninger, W., Looney, M.R., Krummel, M.F., Biswas, S.K., Ginhoux, F., Hidalgo, A., Bachelier, F., Ng, L.G. (2016): CXCR4 identifies transitional bone marrow premonocytes that replenish the mature monocyte pool for peripheral responses. *J. Exp. Med.* **213**: 2293–2314.
- Chou, R.C., Kim, N.D., Sadik, C.D., Seung, E., Lan, Y., Byrne, M.H., Haribabu, B., Iwakura, Y., Luster, A.D. (2010): Lipid-cytokine-chemokine cascade drives neutrophil recruitment in a murine model of inflammatory arthritis. *Immunity* **33**: 266–278.
- Christopher, M.J., Liu, F., Hilton, M.J., Long, F., Link, D.C. (2009): Suppression of CXCL12 production by bone marrow osteoblasts is a common and critical pathway for cytokine-induced mobilization. *Blood* **114**: 1331–1339.
- 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.
- Chumakov, A.M., Chumakova, E.A., Chih, D., Koeffler, H.P. (2000): Molecular analysis of the human myeloperoxidase promoter region. *Int. J. Oncol.* **16**: 401–411.
- Clavel, C., Ceccato, L., Anquetil, F., Serre, G., Sebbag, M. (2016): Among human macrophages polarised to different phenotypes, the M-CSF-oriented cells present the highest pro-inflammatory response to the rheumatoid arthritis-specific immune complexes containing ACPA. *Ann. Rheum. Dis.* **75**: 2184–2191.
- Clavel, C., Nogueira, L., Laurent, L., Iobagiu, C., Vincent, C., Sebbag, M., Serre, G. (2008): Induction of macrophage secretion of tumor necrosis factor alpha through Fcγ receptor IIa engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen. *Arthritis Rheum.* **58**: 678–688.
- Cline, M.J., Moore, M.A. (1972): Embryonic origin of the mouse macrophage. *Blood* **39**: 842–849.
- Colque-Navarro, P., Jacobsson, G., Andersson, R., Flock, J.-I., Möllby, R. (2010): Levels of antibody against 11 *Staphylococcus aureus* antigens in a healthy population. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* **17**: 1117–1123.
- Cornélis, F., Fauré, S., Martinez, M., Prud'homme, J.F., Fritz, P., Dib, C., Alves, H., Barrera, P., Vries, N. de, Balsa, A., Pascual-Salcedo, D., Maenaut, K., Westhovens, R., Migliorini, P., Tran, T.H., Delaye, A., Prince, N., Lefevre, C., Thomas, G., Poirier, M., Soubigou, S., Alibert, O., Lasbleiz, S., Fouix, S., Bouchier, C., Lioté, F., Loste, M.N., Lepage, V., Charron, D., Gyapay, G., Lopes-Vaz, A., Kuntz, D., Bardin, T., Weissenbach, J., ECRAF

- (1998): New susceptibility locus for rheumatoid arthritis suggested by a genome-wide linkage study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 10746–10750.
- Corsiero, E., Bombardieri, M., Carlotti, E., Pratesi, F., Robinson, W., Migliorini, P., Pitzalis, C. (2016): Single cell cloning and recombinant monoclonal antibodies generation from RA synovial B cells reveal frequent targeting of citrullinated histones of NETs. *Ann. Rheum. Dis.* **75**: 1866–1875.
- Courtenay, J.S., Dallman, M.J., Dayan, A.D., Martin, A., Mosedale, B. (1980): Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature* **283**: 666–668.
- Cowland, J.B., Borregaard, N. (1999): The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules. *J. Leukoc. Biol.* **66**: 989–995.
- Cox, D., Tseng, C.C., Bjekic, G., Greenberg, S. (1999): A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. *J. Biol. Chem.* **274**: 1240–1247.
- Cribbs, A.P., Kennedy, A., Penn, H., Read, J.E., Amjadi, P., Green, P., Syed, K., Manka, S.W., Brennan, F.M., Gregory, B., Williams, R.O. (2014): Treg cell function in rheumatoid arthritis is compromised by ctla-4 promoter methylation resulting in a failure to activate the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **66**: 2344–2354.
- Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S.-Y., Senechal, B., Puel, A., Biswas, S.K., Moshous, D., Picard, C., Jais, J.-P., D’Cruz, D., Casanova, J.-L., Trouillet, C., Geissmann, F. (2010): Human CD14dim Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity* **33**: 375–386.
- Cross, A., Barnes, T., Bucknall, R.C., Edwards, S.W., Moots, R.J. (2006): Neutrophil apoptosis in rheumatoid arthritis is regulated by local oxygen tensions within joints. *J. Leukoc. Biol.* **80**: 521–528.
- Cross, A., Bucknall, R.C., Cassatella, M.A., Edwards, S.W., Moots, R.J. (2003): Synovial fluid neutrophils transcribe and express class II major histocompatibility complex molecules in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **48**: 2796–2806.
- Crowson, C.S., Matteson, E.L., Myasoedova, E., Michet, C.J., Ernste, F.C., Warrington, K.J., Davis, J.M., Hunder, G.G., Thorneau, T.M., Gabriel, S.E. (2011): The lifetime risk of adult-onset rheumatoid arthritis and other inflammatory autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* **63**: 633–639.
- Cruz-Leal, Y., Grubbaugh, D., Nogueira, C.V., Lopetegui-González, I., Del Valle, A., Escalona, F., Laborde, R.J., Alvarez, C., Fernández, L.E., Starnbach, M.N., Higgins, D.E., Lanio, M.E. (2018): The Vacuolar Pathway in Macrophages Plays a Major Role in Antigen Cross-Presentation Induced by the Pore-Forming Protein Sticholysin II Encapsulated Into Liposomes. *Front. Immunol.* **9**: 2473.
- Culemann, S., Grüneboom, A., Nicolás-Ávila, J.Á., Weidner, D., Lämmle, K.F., Rothe, T., Quintana, J.A., Kirchner, P., Krljanac, B., Eberhardt, M., Ferrazzi, F., Kretzschmar, E., Schicht, M., Fischer, K., Gelse, K., Faas, M., Pfeifle, R., Ackermann, J.A., Pachowsky, M., Renner, N., Simon, D., Haseloff, R.F., Ekici, A.B., Bäuerle, T., Blasig, I.E., Vera, J., Voehringer, D., Kleyer, A., Paulsen, F., Schett, G., Hidalgo, A., Krönke, G. (2019): Locally renewing resident synovial macrophages provide a protective barrier for the joint. *Nature* **572**: 670–675.
- Cutolo, M., Sulli, A., Capellino, S., Villaggio, B., Montagna, P., Pizzorni, C., Paolino, S., Seriolo, B., Felli, L., Straub, R.H. (2006): Anti-TNF and sex hormones. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1069**: 391–400.
- Cutrona, K.J., Kaufman, B.A., Figueroa, D.M., Elmore, D.E. (2015): Role of arginine and lysine in the antimicrobial mechanism of histone-derived antimicrobial peptides. *FEBS Lett.* **589**: 3915–3920.
- Daffis, S., Samuel, M.A., Suthar, M.S., Gale, M., Diamond, M.S. (2008): Toll-like receptor 3 has a protective role against West Nile virus infection. *J. Virol.* **82**: 10349–10358.
- Dai, P., Jeong, S.Y., Yu, Y., Leng, T., Wu, W., Xie, L., Chen, X. (2009): Modulation of TLR signaling by multiple MyD88-interacting partners including leucine-rich repeat Fli-I-interacting proteins. *J. Immunol. Baltim. Md* **182**: 3450–3460.

- Dai, X.-M., Ryan, G.R., Hapel, A.J., Dominguez, M.G., Russell, R.G., Kapp, S., Sylvestre, V., Stanley, E.R. (2002): Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* **99**: 111–120.
- Dancey, J.T., Deubelbeiss, K.A., Harker, L.A., Finch, C.A. (1976): Neutrophil kinetics in man. *J. Clin. Invest.* **58**: 705–715.
- Day, R.B., Link, D.C. (2012): Regulation of neutrophil trafficking from the bone marrow. *Cell. Mol. Life Sci.* **69**: 1415–1423.
- De Rycke, L., Baeten, D., Foell, D., Kruithof, E., Veys, E.M., Roth, J., De Keyser, F. (2005): Differential expression and response to anti-TNF $\alpha$  treatment of infiltrating versus resident tissue macrophage subsets in autoimmune arthritis. *J. Pathol.* **206**: 17–27.
- DeFalco, T., Bhattacharya, I., Williams, A.V., Sams, D.M., Capel, B. (2014): Yolk-sac-derived macrophages regulate fetal testis vascularization and morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**: E2384-2393.
- Delano, M.J., Kelly-Scumpia, K.M., Thayer, T.C., Winfield, R.D., Scumpia, P.O., Cuenca, A.G., Harrington, P.B., O'Malley, K.A., Warner, E., Gabrilovich, S., Mathews, C.E., Laface, D., Heyworth, P.G., Ramphal, R., Strieter, R.M., Moldawer, L.L., Efron, P.A. (2011): Neutrophil mobilization from the bone marrow during polymicrobial sepsis is dependent on CXCL12 signaling. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **187**: 911–918.
- Delbosc, S., Alsac, J.-M., Journe, C., Louedec, L., Castier, Y., Bonnaure-Mallet, M., Ruimy, R., Rossignol, P., Bouchard, P., Michel, J.-B., Meilhac, O. (2011): Porphyromonas gingivalis participates in pathogenesis of human abdominal aortic aneurysm by neutrophil activation. Proof of concept in rats. *PLoS One* **6**: e18679.
- Delputte, P.L., Van Gorp, H., Favoreel, H.W., Hoebeke, I., Delrue, I., Dewerchin, H., Verdonck, F., Verhasselt, B., Cox, E., Nauwynck, H.J. (2011): Porcine Sialoadhesin (CD169/Siglec-1) Is an Endocytic Receptor that Allows Targeted Delivery of Toxins and Antigens to Macrophages. *PLoS ONE* **6**.
- Delwig, A. von, Hilken, C.M.U., Altmann, D.M., Holmdahl, R., Isaacs, J.D., Harding, C.V., Robertson, H., McKie, N., Robinson, J.H. (2006): Inhibition of macropinocytosis blocks antigen presentation of type II collagen in vitro and in vivo in HLA-DR1 transgenic mice. *Arthritis Res. Ther.* **8**: R93.
- Demoruelle, M.K., Bowers, E., Lahey, L.J., Sokolove, J., Purmalek, M., Seto, N.L., Weisman, M.H., Norris, J.M., Kaplan, M.J., Holers, V.M., Robinson, W.H., Deane, K.D. (2018): Puisque, l'augmentation des niveaux de NET dans les expectorations est significativement corrélée la réactivité des ACPA chez les patients atteints de PR (Demoruelle et al., 2017). *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **70**: 516–527.
- Deretic, V., Levine, B. (2018): Autophagy balances inflammation in innate immunity. *Autophagy* **14**: 243–251.
- Derré-Bobillot, A., Cortes-Perez, N.G., Yamamoto, Y., Kharrat, P., Couvé, E., Cunha, V.D., Decker, P., Boissier, M.-C., Escartin, F., Cesselin, B., Langella, P., Bermúdez-Humarán, L.G., Gaudu, P. (2013): Nuclease A (Gbs0661), an extracellular nuclease of *Streptococcus agalactiae*, attacks the neutrophil extracellular traps and is needed for full virulence. *Mol. Microbiol.* **89**: 518–531.
- Desai, J., Foresto-Neto, O., Honarpisheh, M., Steiger, S., Nakazawa, D., Popper, B., Buhl, E.M., Boor, P., Mulay, S.R., Anders, H.-J. (2017): Particles of different sizes and shapes induce neutrophil necroptosis followed by the release of neutrophil extracellular trap-like chromatin. *Sci. Rep.* **7**: 15003.
- Desai, J., Kumar, S.V., Mulay, S.R., Konrad, L., Romoli, S., Schauer, C., Herrmann, M., Bilyy, R., Müller, S., Popper, B., Nakazawa, D., Weidenbusch, M., Thomasova, D., Krautwald, S., Linkermann, A., Anders, H.-J. (2016): PMA and crystal-induced neutrophil extracellular trap formation involves RIPK1-RIPK3-MLKL signaling. *Eur. J. Immunol.* **46**: 223–229.
- DeSouza-Vieira, T., Guimarães-Costa, A., Rochael, N.C., Lira, M.N., Nascimento, M.T., Lima-Gomez, P. de S., Mariante, R.M., Persechini, P.M., Saraiva, E.M. (2016): Neutrophil extracellular traps release induced by *Leishmania*: role of PI3K $\gamma$ , ERK, PI3K $\sigma$ , PKC, and [Ca<sup>2+</sup>]. *J. Leukoc. Biol.* **100**: 801–810.



- Di Giuseppe, D., Orsini, N., Alfredsson, L., Askling, J., Wolk, A. (2013): Cigarette smoking and smoking cessation in relation to risk of rheumatoid arthritis in women. *Arthritis Res. Ther.* **15**: R56.
- Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., Reis e Sousa, C. (2004): Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**: 1529–1531.
- Douda, D.N., Khan, M.A., Grasemann, H., Palaniyar, N. (2015): SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**: 2817–2822.
- Doyle, A.G., Herbein, G., Montaner, L.J., Minty, A.J., Caput, D., Ferrara, P., Gordon, S. (1994): Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: comparison with interleukin-4 and interferon-gamma. *Eur. J. Immunol.* **24**: 1441–1445.
- Dreiem, A., Myhre, O., Fonnum, F. (2003): Involvement of the extracellular signal regulated kinase pathway in hydrocarbon-induced reactive oxygen species formation in human neutrophil granulocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **190**: 102–110.
- Drifte, G., Dunn-Siegrist, I., Tissières, P., Pugin, J. (2013): Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. *Crit. Care Med.* **41**: 820–832.
- Eash, K.J., Greenbaum, A.M., Gopalan, P.K., Link, D.C. (2010): CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J. Clin. Invest.* **120**: 2423–2431.
- Eash, K.J., Means, J.M., White, D.W., Link, D.C. (2009): CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions. *Blood* **113**: 4711–4719.
- Eastgate, J.A., Symons, J.A., Wood, N.C., Grinlinton, F.M., Giovine, F.S. di, Duff, G.W. (1988): Correlation of plasma interleukin 1 levels with disease activity in rheumatoid arthritis. *Lancet Lond. Engl.* **2**: 706–709.
- Edelman, G.M., Kunkel, H.G., Franklin, E.C. (1958): Interaction of the rheumatoid factor with antigen-antibody complexes and aggregated gamma globulin. *J. Exp. Med.* **108**: 105–120.
- Edwards, J.C.W., Szczepanski, L., Szechinski, J., Filipowicz-Sosnowska, A., Emery, P., Close, D.R., Stevens, R.M., Shaw, T. (2004): Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* **350**: 2572–2581.
- Edwards, J.P., Zhang, X., Frauwirth, K.A., Mosser, D.M. (2006a): Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J. Leukoc. Biol.* **80**: 1298–1307.
- Edwards, J.R., Sun, S.G., Locklin, R., Shipman, C.M., Adamopoulos, I.E., Athanasou, N.A., Sabokbar, A. (2006b): LIGHT (TNFSF14), a novel mediator of bone resorption, is elevated in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **54**: 1451–1462.
- Ehrchen, J., Steinmüller, L., Barczyk, K., Tenbrock, K., Nacken, W., Eisenacher, M., Nordhues, U., Sorg, C., Sunderkötter, C., Roth, J. (2007): Glucocorticoids induce differentiation of a specifically activated, anti-inflammatory subtype of human monocytes. *Blood* **109**: 1265–1274.
- Eiserich, J.P., Baldus, S., Brennan, M.-L., Ma, W., Zhang, C., Tousson, A., Castro, L., Luscis, A.J., Nauseef, W.M., White, C.R., Freeman, B.A. (2002): Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science* **296**: 2391–2394.
- Eitzen, G., Lo, A.N., Mitchell, T., Kim, J.D., Chao, D.V., Lacy, P. (2011): Proteomic analysis of secretagogue-stimulated neutrophils implicates a role for actin and actin-interacting proteins in Rac2-mediated granule exocytosis. *Proteome Sci.* **9**: 70.
- Ekman, A.-K., Cardell, L.O. (2010): The expression and function of Nod-like receptors in neutrophils. *Immunology* **130**: 55–63.

- El-Benna, J., Hurtado-Nedelec, M., Marzaioli, V., Marie, J.-C., Gougerot-Pocidalò, M.-A., Dang, P.M.-C. (2016): Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunol. Rev.* **273**: 180–193.
- Ella, K., Csépanyi-Kömi, R., Káldi, K. (2016): Circadian regulation of human peripheral neutrophils. *Brain. Behav. Immun.* **57**: 209–221.
- Emery, P., Burmester, G.R., Bykerk, V.P., Combe, B.G., Furst, D.E., Barré, E., Karyekar, C.S., Wong, D.A., Huizinga, T.W.J. (2015): Evaluating drug-free remission with abatacept in early rheumatoid arthritis: results from the phase 3b, multicentre, randomised, active-controlled AVERT study of 24 months, with a 12-month, double-blind treatment period. *Ann. Rheum. Dis.* **74**: 19–26.
- Emery, P., Panayi, G.S., Nouri, A.M. (1984): Interleukin-2 reverses deficient cell-mediated immune responses in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* **57**: 123–129.
- Enders, M., Franken, L., Philipp, M.-S., Kessler, N., Baumgart, A.-K., Eichler, M., Wiertz, E.J.H., Garbi, N., Kurts, C. (2020): Splenic Red Pulp Macrophages Cross-Prime Early Effector CTL That Provide Rapid Defense against Viral Infections. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **204**: 87–100.
- Engler, A., Niederer, F., Klein, K., Gay, R.E., Kyburz, D., Camici, G.G., Gay, S., Ospelt, C. (2014): SIRT6 regulates the cigarette smoke-induced signalling in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **92**: 757–767.
- Epelman, S., Lavine, K.J., Beaudin, A.E., Sojka, D.K., Carrero, J.A., Calderon, B., Brija, T., Gautier, E.L., Ivanov, S., Satpathy, A.T., Schilling, J.D., Schwendener, R., Sergin, I., Razani, B., Forsberg, E.C., Yokoyama, W.M., Unanue, E.R., Colonna, M., Randolph, G.J., Mann, D.L. (2014): Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity* **40**: 91–104.
- Evrard, M., Kwok, I.W.H., Chong, S.Z., Teng, K.W.W., Becht, E., Chen, J., Sieow, J.L., Penny, H.L., Ching, G.C., Devi, S., Adrover, J.M., Li, J.L.Y., Liang, K.H., Tan, L., Poon, Z., Foo, S., Chua, J.W., Su, I.-H., Balabanian, K., Bachelier, F., Biswas, S.K., Larbi, A., Hwang, W.Y.K., Madan, V., Koeffler, H.P., Wong, S.C., Newell, E.W., Hidalgo, A., Ginhoux, F., Ng, L.G. (2018): Developmental Analysis of Bone Marrow Neutrophils Reveals Populations Specialized in Expansion, Trafficking, and Effector Functions. *Immunity* **48**: 364–379.e8.
- Eyre, S., Bowes, J., Diogo, D., Lee, A., Barton, A., Martin, P., Zhernakova, A., Stahl, E., Viatte, S., McAllister, K., Amos, C.I., Padyukov, L., Toes, R.E.M., Huizinga, T.W.J., Wijmenga, C., Trynka, G., Franke, L., Westra, H.-J., Alfredsson, L., Hu, X., Sandor, C., Bakker, P.I.W. de, Davila, S., Khor, C.C., Heng, K.K., Andrews, R., Edkins, S., Hunt, S.E., Langford, C., Symmons, D., Biologics in Rheumatoid Arthritis Genetics and Genomics Study Syndicate, Wellcome Trust Case Control Consortium, Concannon, P., Onengut-Gumuscu, S., Rich, S.S., Deloukas, P., Gonzalez-Gay, M.A., Rodriguez-Rodriguez, L., Ärletig, L., Martin, J., Rantapää-Dahlqvist, S., Plenge, R.M., Raychaudhuri, S., Klareskog, L., Gregersen, P.K., Worthington, J. (2012): High-density genetic mapping identifies new susceptibility loci for rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.* **44**: 1336–1340.
- Ezekowitz, R.A., Sastry, K., Bailly, P., Warner, A. (1990): Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J. Exp. Med.* **172**: 1785–1794.
- Fadeel, B., Ahlin, A., Henter, J.I., Orrenius, S., Hampton, M.B. (1998): Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species. *Blood* **92**: 4808–4818.
- Fantuzzi, L., Borghi, P., Ciolli, V., Pavlakis, G., Belardelli, F., Gessani, S. (1999): Loss of CCR2 expression and functional response to monocyte chemotactic protein (MCP-1) during the differentiation of human monocytes: role of secreted MCP-1 in the regulation of the chemotactic response. *Blood* **94**: 875–883.
- Farragher, T.M., Goodson, N.J., Naseem, H., Silman, A.J., Thomson, W., Symmons, D., Barton, A. (2008): Association of the HLA-DRB1 gene with premature death, particularly from cardiovascular disease, in patients with rheumatoid arthritis and inflammatory polyarthritis. *Arthritis Rheum.* **58**: 359–369.
- Farrera, C., Fadeel, B. (2013): Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **191**: 2647–2656.

- Fava, R.A., Olsen, N.J., Postlethwaite, A.E., Broadley, K.N., Davidson, J.M., Nanney, L.B., Lucas, C., Townes, A.S. (1991): Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) induced neutrophil recruitment to synovial tissues: implications for TGF-beta-driven synovial inflammation and hyperplasia. *J. Exp. Med.* **173**: 1121–1132.
- Ferreira, R.C., Freitag, D.F., Cutler, A.J., Howson, J.M.M., Rainbow, D.B., Smyth, D.J., Kaptoge, S., Clarke, P., Boreham, C., Coulson, R.M., Pekalski, M.L., Chen, W.-M., Onengut-Gumuscu, S., Rich, S.S., Butterworth, A.S., Malarstig, A., Danesh, J., Todd, J.A. (2013): Functional IL6R 358Ala allele impairs classical IL-6 receptor signaling and influences risk of diverse inflammatory diseases. *PLoS Genet.* **9**: e1003444.
- Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Mosmann, T.R., Howard, M., O'Garra, A. (1991): IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **147**: 3815–3822.
- Fleetwood, A.J., Lawrence, T., Hamilton, J.A., Cook, A.D. (2007): Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178**: 5245–5252.
- Fliedner, T.M., Cronkite, E.P., Killmann, S.A., Bond, V.P. (1964): GRANULOCYTOPOIESIS. II. EMERGENCE AND PATTERN OF LABELING OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN HUMANS. *Blood* **24**: 683–700.
- Fogg, D.K., Sibon, C., Miled, C., Jung, S., Aucouturier, P., Littman, D.R., Cumano, A., Geissmann, F. (2006): A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* **311**: 83–87.
- Ford, A.M., Bennett, C.A., Healy, L.E., Towatari, M., Greaves, M.F., Enver, T. (1996): Regulation of the myeloperoxidase enhancer binding proteins Pu1, C-EBP alpha, -beta, and -delta during granulocyte-lineage specification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 10838–10843.
- Fossati, G., Moots, R.J., Bucknall, R.C., Edwards, S.W. (2002): Differential role of neutrophil Fc gamma receptor IIIb (CD16) in phagocytosis, bacterial killing, and responses to immune complexes. *Arthritis Rheum.* **46**: 1351–1361.
- Frchet, P., Tacnet-Delorme, P., Thielens, C.G. and N.M. (2015): Role of C1q in Efferocytosis and Self-Tolerance — Links With Autoimmunity. IntechOpen.
- Frank-Bertoncelj, M., Trenkmann, M., Klein, K., Karouzakis, E., Rehrauer, H., Bratus, A., Kolling, C., Armaka, M., Filer, A., Michel, B.A., Gay, R.E., Buckley, C.D., Kollias, G., Gay, S., Ospelt, C. (2017): Epigenetically-driven anatomical diversity of synovial fibroblasts guides joint-specific fibroblast functions. *Nat. Commun.* **8**: 14852.
- Fridlender, Z.G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G.S., Albelda, S.M. (2009): Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: 'N1' versus 'N2' TAN. *Cancer Cell* **16**: 183–194.
- Fritzler, M.J., Tan, E.M. (1978): Antibodies to histones in drug-induced and idiopathic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* **62**: 560–567.
- Frost, P.G., Lachmann, P.J. (1968): The relationship of desoxyribonuclease inhibitor levels in human sera to the occurrence of antinuclear antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* **3**: 447–455.
- Fuchs, T.A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., Zychlinsky, A. (2007): Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* **176**: 231–241.
- Fukui, S., Iwamoto, N., Takatani, A., Igawa, T., Shimizu, T., Umeda, M., Nishino, A., Horai, Y., Hirai, Y., Koga, T., Kawashiri, S.-Y., Tamai, M., Ichinose, K., Nakamura, H., Origuchi, T., Masuyama, R., Kosai, K., Yanagihara, K., Kawakami, A. (2017): M1 and M2 Monocytes in Rheumatoid Arthritis: A Contribution of Imbalance of M1/M2 Monocytes to Osteoclastogenesis. *Front. Immunol.* **8**: 1958.
- Furth, R. van (1980): The mononuclear phagocyte system. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* **64**: 1–11.

- Furth, R. van (1981): Current view of the mononuclear phagocyte system. *Haematol. Blood Transfus.* **27**: 3–10.
- Furth, R. van, Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphrey, J.H., Spector, W.G., Langevoort, H.L. (1972): The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull. World Health Organ.* **46**: 845–852.
- Gaboriaud, C., Juanhuix, J., Gruez, A., Lacroix, M., Darnault, C., Pignol, D., Verger, D., Fontecilla-Camps, J.C., Arlaud, G.J. (2003): The crystal structure of the globular head of complement protein C1q provides a basis for its versatile recognition properties. *J. Biol. Chem.* **278**: 46974–46982.
- Gadjeva, M.G., Rouseva, M.M., Zlatarova, A.S., Reid, K.B.M., Kishore, U., Kojouharova, M.S. (2008): Interaction of human C1q with IgG and IgM: revisited. *Biochemistry* **47**: 13093–13102.
- Gan, R.W., Trouw, L.A., Shi, J., Toes, R.E.M., Huizinga, T.W.J., Demoruelle, M.K., Kolfenbach, J.R., Zerbe, G.O., Deane, K.D., Edison, J.D., Gilliland, W.R., Norris, J.M., Holers, V.M. (2015): Anti-carbamylated protein antibodies are present prior to rheumatoid arthritis and are associated with its future diagnosis. *J. Rheumatol.* **42**: 572–579.
- Garcia-Romo, G.S., Caielli, S., Vega, B., Connolly, J., Allantaz, F., Xu, Z., Punaro, M., Baisch, J., Guiducci, C., Coffman, R.L., Barrat, F.J., Banchereau, J., Pascual, V. (2011): Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* **3**: 73ra20.
- Garlatti, V., Chouquet, A., Lunardi, T., Vivès, R., Païdassi, H., Lortat-Jacob, H., Thielens, N.M., Arlaud, G.J., Gaboriaud, C. (2010): Cutting edge: C1q binds deoxyribose and heparan sulfate through neighboring sites of its recognition domain. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**: 808–812.
- GARROD, S.A.B. (1876): The nature and treatment of gout, and rheumatic gout. Longmans&Company.
- Gatfield, J., Pieters, J. (2000): Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science* **288**: 1647–1650.
- Gavillet, M., Martinod, K., Renella, R., Harris, C., Shapiro, N.I., Wagner, D.D., Williams, D.A. (2015): Flow cytometric assay for direct quantification of Neutrophil Extracellular Traps in blood samples. *Am. J. Hematol.* **90**: 1155–1158.
- Gazendam, R.P., Hamme, J.L. van, Tool, A.T.J., Houdt, M. van, Verkuijlen, P.J.J.H., Herbst, M., Liese, J.G., Veerdonk, F.L. van de, Roos, D., Berg, T.K. van den, Kuijpers, T.W. (2014): Two independent killing mechanisms of *Candida albicans* by human neutrophils: evidence from innate immunity defects. *Blood* **124**: 590–597.
- Geissmann, F., Jung, S., Littman, D.R. (2003): Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**: 71–82.
- Genovese, M.C., Kremer, J., Zamani, O., Ludivico, C., Krogulec, M., Xie, L., Beattie, S.D., Koch, A.E., Cardillo, T.E., Rooney, T.P., Macias, W.L., Bono, S. de, Schlichting, D.E., Smolen, J.S. (2016): Baricitinib in Patients with Refractory Rheumatoid Arthritis. *N. Engl. J. Med.* **374**: 1243–1252.
- Germic, N., Stojkov, D., Oberson, K., Yousefi, S., Simon, H.-U. (2017): Neither eosinophils nor neutrophils require ATG5-dependent autophagy for extracellular DNA trap formation. *Immunology* **152**: 517–525.
- Gerszten, R.E., Garcia-Zepeda, E.A., Lim, Y.C., Yoshida, M., Ding, H.A., Gimbrone, M.A., Luster, A.D., Luscinskas, F.W., Rosenzweig, A. (1999): MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* **398**: 718–723.
- Ghebrehiwet, B., Lim, B.L., Peerschke, E.I., Willis, A.C., Reid, K.B. (1994): Isolation, cDNA cloning, and overexpression of a 33-kD cell surface glycoprotein that binds to the globular ‘heads’ of C1q. *J. Exp. Med.* **179**: 1809–1821.
- Ghivizzani, S.C., Kang, R., Georgescu, H.I., Lechman, E.R., Jaffurs, D., Engle, J.M., Watkins, S.C., Tindal, M.H., Suchanek, M.K., McKenzie, L.R., Evans, C.H., Robbins, P.D. (1997): Constitutive intra-articular expression of

human IL-1 beta following gene transfer to rabbit synovium produces all major pathologies of human rheumatoid arthritis. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 **159**: 3604–3612.

Gibaldi, D., Vilar-Pereira, G., Pereira, I.R., Silva, A.A., Barrios, L.C., Ramos, I.P., Mata Dos Santos, H.A., Gazzinelli, R., Lannes-Vieira, J. (2020): CCL3/Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$  Is Dually Involved in Parasite Persistence and Induction of a TNF- and IFN $\gamma$ -Enriched Inflammatory Milieu in Trypanosoma cruzi-Induced Chronic Cardiomyopathy. *Front. Immunol.* **11**: 306.

Gielen, P.R., Schulte, B.M., Kers-Rebel, E.D., Verrijp, K., Bossman, S.A.J.F.H., Ter Laan, M., Wesseling, P., Adema, G.J. (2016): Elevated levels of polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in patients with glioblastoma highly express S100A8/9 and arginase and suppress T cell function. *Neuro-Oncol.* **18**: 1253–1264.

Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., Samokhvalov, I.M., Merad, M. (2010): Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* **330**: 841–845.

Goetz, D.H., Holmes, M.A., Borregaard, N., Bluhm, M.E., Raymond, K.N., Strong, R.K. (2002): The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol. Cell* **10**: 1033–1043.

Gomez Perdiguero, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., Bruijn, M.F. de, Geissmann, F., Rodewald, H.-R. (2015): Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* **518**: 547–551.

Gómez-Puerta, J.A., Celis, R., Hernández, M.V., Ruiz-Esquide, V., Ramírez, J., Haro, I., Cañete, J.D., Sanmartí, R. (2013): Differences in synovial fluid cytokine levels but not in synovial tissue cell infiltrate between anti-citrullinated peptide/protein antibody-positive and -negative rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res. Ther.* **15**: R182.

Gordon, S. (2002): Pattern Recognition Receptors: Doubling Up for the Innate Immune Response. *Cell* **111**: 927–930.

Gordon, S. (2016a): Elie Metchnikoff, the Man and the Myth. *J. Innate Immun.* **8**: 223–227.

Gordon, S. (2016b): Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity* **44**: 463–475.

Gorlino, C.V., Dave, M.N., Blas, R., Crespo, M.I., Lavanchy, A., Tamashiro, H., Pardo-Hidalgo, R., Pistoresi-Palencia, M.C., Di Genaro, M.S. (2018): Association between levels of synovial anti-citrullinated peptide antibodies and neutrophil response in patients with rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* **48**: 1563–1572.

Goudot, C., Coillard, A., Villani, A.-C., Gueguen, P., Cros, A., Sarkizova, S., Tang-Huau, T.-L., Bohec, M., Baulande, S., Hacohen, N., Amigorena, S., Segura, E. (2017): Aryl Hydrocarbon Receptor Controls Monocyte Differentiation into Dendritic Cells versus Macrophages. *Immunity* **47**: 582-596.e6.

Gracie, J.A., Forsey, R.J., Chan, W.L., Gilmour, A., Leung, B.P., Greer, M.R., Kennedy, K., Carter, R., Wei, X.Q., Xu, D., Field, M., Foulis, A., Liew, F.Y., McInnes, I.B. (1999): A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* **104**: 1393–1401.

Gratchev, A., Guillot, P., Hakiy, N., Politz, O., Orfanos, C.E., Schledzewski, K., Goerdts, S. (2001): Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein beta1G-H3. *Scand. J. Immunol.* **53**: 386–392.

Grayson, P.C., Carmona-Rivera, C., Xu, L., Lim, N., Gao, Z., Asare, A.L., Specks, U., Stone, J.H., Seo, P., Spiera, R.F., Langford, C.A., Hoffman, G.S., Kallenberg, C.G.M., St Clair, E.W., Tchao, N.K., Ytterberg, S.R., Phippard, D.J., Merkel, P.A., Kaplan, M.J., Monach, P.A., Rituximab in ANCA-Associated Vasculitis-Immune Tolerance Network Research Group (2015): Neutrophil-Related Gene Expression and Low-Density Granulocytes Associated With Disease Activity and Response to Treatment in Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **67**: 1922–1932.

- Green, J.N., Kettle, A.J., Winterbourn, C.C. (2014): Protein chlorination in neutrophil phagosomes and correlation with bacterial killing. *Free Radic. Biol. Med.* **77**: 49–56.
- Greenberg, M.E., Sun, M., Zhang, R., Febbraio, M., Silverstein, R., Hazen, S.L. (2006): Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells. *J. Exp. Med.* **203**: 2613–2625.
- 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.
- Groemping, Y., Lapouge, K., Smerdon, S.J., Rittinger, K. (2003): Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell* **113**: 343–355.
- Guerard, S., Boieri, M., Hultqvist, M., Holmdahl, R., Wing, K. (2016): The SKG Mutation in ZAP-70 also Confers Arthritis Susceptibility in C57 Black Mouse Strains. *Scand. J. Immunol.* **84**: 3–11.
- Guerne, P.A., Zuraw, B.L., Vaughan, J.H., Carson, D.A., Lotz, M. (1989): Synovium as a source of interleukin 6 in vitro. Contribution to local and systemic manifestations of arthritis. *J. Clin. Invest.* **83**: 585–592.
- Guillemin, F., Saraux, A., Guggenbuhl, P., Roux, C.H., Fardellone, P., Le Bihan, E., Cantagrel, A., Chary-Valckenaere, I., Euler-Ziegler, L., Flipo, R.-M., Juvin, R., Behier, J.-M., Fautrel, B., Masson, C., Coste, J. (2005): Prevalence of rheumatoid arthritis in France: 2001. *Ann. Rheum. Dis.* **64**: 1427–1430.
- Guilliams, M., De Kleer, I., Henri, S., Post, S., Vanhoutte, L., De Prijck, S., Deswarte, K., Malissen, B., Hammad, H., Lambrecht, B.N. (2013): Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J. Exp. Med.* **210**: 1977–1992.
- Gutierrez, M.G., Master, S.S., Singh, S.B., Taylor, G.A., Colombo, M.I., Deretic, V. (2004): Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell* **119**: 753–766.
- Haas, P.-J., Strijp, J. van (2007): Anaphylatoxins: their role in bacterial infection and inflammation. *Immunol. Res.* **37**: 161–175.
- Haas, T., Metzger, J., Schmitz, F., Heit, A., Müller, T., Latz, E., Wagner, H. (2008): The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. *Immunity* **28**: 315–323.
- Hacbarth, E., Kajdacsy-Balla, A. (1986): Low density neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and acute rheumatic fever. *Arthritis Rheum.* **29**: 1334–1342.
- Häcker, H., Mischak, H., Miethke, T., Liptay, S., Schmid, R., Sparwasser, T., Heeg, K., Lipford, G.B., Wagner, H. (1998): CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J.* **17**: 6230–6240.
- Hakkim, A., Fuchs, T.A., Martinez, N.E., Hess, S., Prinz, H., Zychlinsky, A., Waldmann, H. (2011): Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat. Chem. Biol.* **7**: 75–77.
- Hakkim, A., Fürnrohr, B.G., Amann, K., Laube, B., Abed, U.A., Brinkmann, V., Herrmann, M., Voll, R.E., Zychlinsky, A. (2010): Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 9813–9818.
- Hall, A.B., Gakidis, M.A.M., Glogauer, M., Wilsbacher, J.L., Gao, S., Swat, W., Brugge, J.S. (2006): Requirements for Vav guanine nucleotide exchange factors and Rho GTPases in FcγR- and complement-mediated phagocytosis. *Immunity* **24**: 305–316.
- Halverson, T.W.R., Wilton, M., Poon, K.K.H., Petri, B., Lewenza, S. (2015): DNA is an antimicrobial component of neutrophil extracellular traps. *PLoS Pathog.* **11**: e1004593.
- Hamilton, J.A., Filonzi, E.L., Ianches, G. (1993): Regulation of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) production in cultured human synovial fibroblasts. *Growth Factors Chur Switz.* **9**: 157–165.

- Hammer, J., Gallazzi, F., Bono, E., Karr, R.W., Guenot, J., Valsasini, P., Nagy, Z.A., Sinigaglia, F. (1995): Peptide binding specificity of HLA-DR4 molecules: correlation with rheumatoid arthritis association. *J. Exp. Med.* **181**: 1847–1855.
- Haringman, J.J., Kraan, M.C., Smeets, T.J.M., Zwinderman, K.H., Tak, P.P. (2003): Chemokine blockade and chronic inflammatory disease: proof of concept in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **62**: 715–721.
- Harre, U., Georgess, D., Bang, H., Bozec, A., Axmann, R., Ossipova, E., Jakobsson, P.-J., Baum, W., Nimmerjahn, F., Szarka, E., Sarmay, G., Krumbholz, G., Neumann, E., Toes, R., Scherer, H.-U., Catrina, A.I., Klareskog, L., Jurdic, P., Schett, G. (2012): Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J. Clin. Invest.* **122**: 1791–1802.
- Hart, J.E., Laden, F., Puett, R.C., Costenbader, K.H., Karlson, E.W. (2009): Exposure to traffic pollution and increased risk of rheumatoid arthritis. *Environ. Health Perspect.* **117**: 1065–1069.
- Hayashi, F., Means, T.K., Luster, A.D. (2003): Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* **102**: 2660–2669.
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., Aderem, A. (2001): The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**: 1099–1103.
- Heijde, D. van der, Tanaka, Y., Fleischmann, R., Keystone, E., Kremer, J., Zerbini, C., Cardiel, M.H., Cohen, S., Nash, P., Song, Y.-W., Tegzová, D., Wyman, B.T., Gruben, D., Benda, B., Wallenstein, G., Krishnaswami, S., Zwillich, S.H., Bradley, J.D., Connell, C.A., ORAL Scan Investigators (2013): Tofacitinib (CP-690,550) in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate: twelve-month data from a twenty-four-month phase III randomized radiographic study. *Arthritis Rheum.* **65**: 559–570.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., Bauer, S. (2004): Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**: 1526–1529.
- Heinrich, A., Heyl, K.A., Klaile, E., Müller, M.M., Klassert, T.E., Wiessner, A., Fischer, K., Schumann, R.R., Seifert, U., Riesbeck, K., Moter, A., Singer, B.B., Bachmann, S., Slevogt, H. (2016): *Moraxella catarrhalis* induces CEACAM3-Syk-CARD9-dependent activation of human granulocytes. *Cell. Microbiol.* **18**: 1570–1582.
- Helm-van Mil, A.H.M. van der, Verpoort, K.N., Breedveld, F.C., Toes, R.E.M., Huizinga, T.W.J. (2005): Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **7**: R949-958.
- Héroult, A., Binnewies, M., Leong, S., Calero-Nieto, F.J., Zhang, S.Y., Kang, Y.-A., Wang, X., Pietras, E.M., Chu, S.H., Barry-Holson, K., Armstrong, S., Göttgens, B., Passegué, E. (2017): Myeloid progenitor cluster formation drives emergency and leukaemic myelopoiesis. *Nature* **544**: 53–58.
- Herbst, S., Schaible, U.E., Schneider, B.E. (2011): Interferon gamma activated macrophages kill mycobacteria by nitric oxide induced apoptosis. *PloS One* **6**: e19105.
- Herrath, J., Müller, M., Amoudruz, P., Janson, P., Michaëlsson, J., Larsson, P.T., Trollmo, C., Raghavan, S., Malmström, V. (2011): The inflammatory milieu in the rheumatic joint reduces regulatory T-cell function. *Eur. J. Immunol.* **41**: 2279–2290.
- Herre, J., Marshall, A.S.J., Caron, E., Edwards, A.D., Williams, D.L., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Reis e Sousa, C., Gordon, S., Brown, G.D. (2004): Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. *Blood* **104**: 4038–4045.
- Hettinger, J., Richards, D.M., Hansson, J., Barra, M.M., Joschko, A.-C., Krijgsveld, J., Feuerer, M. (2013): Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat. Immunol.* **14**: 821–830.

- Hill, J.A., Bell, D.A., Brintnell, W., Yue, D., Wehrli, B., Jevnikar, A.M., Lee, D.M., Hueber, W., Robinson, W.H., Cairns, E. (2008): Arthritis induced by posttranslationally modified (citrullinated) fibrinogen in DR4-IE transgenic mice. *J. Exp. Med.* **205**: 967–979.
- Hill, J.A., Southwood, S., Sette, A., Jevnikar, A.M., Bell, D.A., Cairns, E. (2003): Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1\*0401 MHC class II molecule. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **171**: 538–541.
- Hoeffel, G., Chen, J., Lavin, Y., Low, D., Almeida, F.F., See, P., Beaudin, A.E., Lum, J., Low, I., Forsberg, E.C., Poidinger, M., Zolezzi, F., Larbi, A., Ng, L.G., Chan, J.K.Y., Greter, M., Becher, B., Samokhvalov, I.M., Merad, M., Ginhoux, F. (2015): C-Myb(+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages. *Immunity* **42**: 665–678.
- Hoeffel, G., Ginhoux, F. (2018): Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages. *Cell. Immunol.* **330**: 5–15.
- Hoeffel, G., Wang, Y., Greter, M., See, P., Teo, P., Malleret, B., Leboeuf, M., Low, D., Oller, G., Almeida, F., Choy, S.H.Y., Grisotto, M., Renia, L., Conway, S.J., Stanley, E.R., Chan, J.K.Y., Ng, L.G., Samokhvalov, I.M., Merad, M., Ginhoux, F. (2012): Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J. Exp. Med.* **209**: 1167–1181.
- Hollander, A.P., Corke, K.P., Freemont, A.J., Lewis, C.E. (2001): Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha by macrophages in the rheumatoid synovium: implications for targeting of therapeutic genes to the inflamed joint. *Arthritis Rheum.* **44**: 1540–1544.
- Holmes, B., Page, A.R., Good, R.A. (1967): Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function. *J. Clin. Invest.* **46**: 1422–1432.
- Hoppe, A.D., Swanson, J.A. (2004): Cdc42, Rac1, and Rac2 Display Distinct Patterns of Activation during Phagocytosis. *Mol. Biol. Cell* **15**: 3509–3519.
- Hosseinzadeh, A., Thompson, P.R., Segal, B.H., Urban, C.F. (2016): Nicotine Induces Neutrophil Extracellular Traps. *J. Leukoc. Biol.* **100**: 1105–1112.
- Hou, S., Gao, G.-P., Zhang, X.-J., Sun, L., Peng, W.-J., Wang, H.-F., Ge, X.-J., Huang, W., Sun, Y.-H. (2013): PADI4 polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Mod. Rheumatol.* **23**: 50–60.
- Hou, S.-M., Chen, P.-C., Lin, C.-M., Fang, M.-L., Chi, M.-C., Liu, J.-F. (2020): CXCL1 contributes to IL-6 expression in osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by CXCR2, c-Raf, MAPK, and AP-1 pathway. *Arthritis Res. Ther.* **22**: 251.
- Houssiau, F.A., Devogelaer, J.P., Van Damme, J., Deuxchaisnes, C.N. de, Van Snick, J. (1988): Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum.* **31**: 784–788.
- Hu, X., Li, W.-P., Meng, C., Ivashkiv, L.B. (2003): Inhibition of IFN-gamma signaling by glucocorticoids. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **170**: 4833–4839.
- Huang, Z.-Y., Barreda, D.R., Worth, R.G., Indik, Z.K., Kim, M.-K., Chien, P., Schreiber, A.D. (2006): Differential kinase requirements in human and mouse Fc-gamma receptor phagocytosis and endocytosis. *J. Leukoc. Biol.* **80**: 1553–1562.
- Huizinga, T.W.J., Amos, C.I., Helm-van Mil, A.H.M. van der, Chen, W., Gaalen, F.A. van, Jawaheer, D., Schreuder, G.M.T., Wener, M., Breedveld, F.C., Ahmad, N., Lum, R.F., Vries, R.R.P. de, Gregersen, P.K., Toes, R.E.M., Criswell, L.A. (2005): Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum.* **52**: 3433–3438.
- Husby, G., Williams, R.C. (1988): Synovial localization of tumor necrosis factor in patients with rheumatoid arthritis. *J. Autoimmun.* **1**: 363–371.



- Imai, Y., Kuba, K., Neely, G.G., Yaghubian-Malhami, R., Perkmann, T., Loo, G. van, Ermolaeva, M., Veldhuizen, R., Leung, Y.H.C., Wang, H., Liu, H., Sun, Y., Pasparakis, M., Kopf, M., Mech, C., Bavari, S., Peiris, J.S.M., Slutsky, A.S., Akira, S., Hultqvist, M., Holmdahl, R., Nicholls, J., Jiang, C., Binder, C.J., Penninger, J.M. (2008): Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. *Cell* **133**: 235–249.
- Ingelsson, B., Söderberg, D., Strid, T., Söderberg, A., Bergh, A.-C., Loitto, V., Lotfi, K., Segelmark, M., Spyrou, G., Rosén, A. (2018): Lymphocytes eject interferogenic mitochondrial DNA webs in response to CpG and non-CpG oligodeoxynucleotides of class C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**: E478–E487.
- 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.
- Irani, V.R., Maslow, J.N. (2005): Induction of murine macrophage TNF-alpha synthesis by *Mycobacterium avium* is modulated through complement-dependent interaction via complement receptors 3 and 4 in relation to *M. avium* glycopeptidolipid. *FEMS Microbiol. Lett.* **246**: 221–228.
- Ishida, S., Yamane, S., Nakano, S., Yanagimoto, T., Hanamoto, Y., Maeda-Tanimura, M., Toyosaki-Maeda, T., Ishizaki, J., Matsuo, Y., Fukui, N., Itoh, T., Ochi, T., Suzuki, R. (2009): The interaction of monocytes with rheumatoid synovial cells is a key step in LIGHT-mediated inflammatory bone destruction. *Immunology* **128**: e315-324.
- Ishida, Y., Gao, J.-L., Murphy, P.M. (2008): Chemokine receptor CX3CR1 mediates skin wound healing by promoting macrophage and fibroblast accumulation and function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **180**: 569–579.
- Ito, S., Ansari, P., Sakatsume, M., Dickensheets, H., Vazquez, N., Donnelly, R.P., Larner, A.C., Finbloom, D.S. (1999): Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. *Blood* **93**: 1456–1463.
- Iwai, K., Koike, M., Ohshima, S., Miyatake, K., Uchiyama, Y., Saeki, Y., Ishii, M. (2007): RGS18 acts as a negative regulator of osteoclastogenesis by modulating the acid-sensing OGR1/NFAT signaling pathway. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **22**: 1612–1620.
- Iyer, S.S., Cheng, G. (2012): Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. *Crit. Rev. Immunol.* **32**: 23–63.
- Jagels, M.A., Hugli, T.E. (1994): Mechanisms and mediators of neutrophilic leukocytosis. *Immunopharmacology* **28**: 1–18.
- Jaguin, M., Houlbert, N., Fardel, O., Lecreur, V. (2013): Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell. Immunol.* **281**: 51–61.
- Jakubzick, C., Gautier, E.L., Gibbings, S.L., Sojka, D.K., Schlitzer, A., Johnson, T.E., Ivanov, S., Duan, Q., Bala, S., Condon, T., Rooijen, N. van, 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.
- Janossy, G., Panayi, G., Duke, O., Bofill, M., Poulter, L.W., Goldstein, G. (1981): Rheumatoid arthritis: a disease of T-lymphocyte/macrophage immunoregulation. *Lancet Lond. Engl.* **2**: 839–842.
- Jiang, H., Cooper, B., Robey, F.A., Gewurz, H. (1992): DNA binds and activates complement via residues 14-26 of the human C1q A chain. *J. Biol. Chem.* **267**: 25597–25601.
- Jiang, X., Trouw, L.A., Wesemael, T.J. van, Shi, J., Bengtsson, C., Källberg, H., Malmström, V., Israelsson, L., Hreggvidsdottir, H., Verduijn, W., Klareskog, L., Alfredsson, L., Huizinga, T.W.J., Toes, R.E.M., Lundberg, K., Woude, D. van der (2014): Anti-CarP antibodies in two large cohorts of patients with rheumatoid arthritis and their relationship to genetic risk factors, cigarette smoking and other autoantibodies. *Ann. Rheum. Dis.* **73**: 1761–1768.

- Jiménez-Alcázar, M., Rangaswamy, C., Panda, R., Bitterling, J., Simsek, Y.J., Long, A.T., Bilyy, R., Krenn, V., Renné, C., Renné, T., Kluge, S., Panzer, U., Mizuta, R., Mannherz, H.G., Kitamura, D., Herrmann, M., Napirei, M., Fuchs, T.A. (2017): Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps. *Science* **358**: 1202–1206.
- Jónsson, T., Thorsteinsson, J., Valdimarsson, H. (1998): Does smoking stimulate rheumatoid factor production in non-rheumatic individuals? *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* **106**: 970–974.
- Jordens, I., Fernandez-Borja, M., Marsman, M., Dusseljee, S., Janssen, L., Calafat, J., Janssen, H., Wubbolts, R., Neefjes, J. (2001): The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Curr. Biol. CB* **11**: 1680–1685.
- Jose, P.J., Moss, I.K., Maini, R.N., Williams, T.J. (1990): Measurement of the chemotactic complement fragment C5a in rheumatoid synovial fluids by radioimmunoassay: role of C5a in the acute inflammatory phase. *Ann. Rheum. Dis.* **49**: 747–752.
- Juarez, M., Bang, H., Hammar, F., Reimer, U., Dyke, B., Sahbudin, I., Buckley, C.D., Fisher, B., Filer, A., Raza, K. (2016): Identification of novel antiacetylated vimentin antibodies in patients with early inflammatory arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **75**: 1099–1107.
- Kabir, S. (2011): The role of interleukin-17 in the *Helicobacter pylori* induced infection and immunity. *Helicobacter* **16**: 1–8.
- Källberg, H., Ding, B., Padyukov, L., Bengtsson, C., Rönnelid, J., Klareskog, L., Alfredsson, L., EIRA Study Group (2011): Smoking is a major preventable risk factor for rheumatoid arthritis: estimations of risks after various exposures to cigarette smoke. *Ann. Rheum. Dis.* **70**: 508–511.
- Kambas, K., Chrysanthopoulou, A., Vassilopoulos, D., Apostolidou, E., Skendros, P., Girod, A., Arelaki, S., Froudarakis, M., Nakopoulou, L., Giatromanolaki, A., Sidiropoulos, P., Koffa, M., Boumpas, D.T., Ritis, K., Mitroulis, I. (2014): Tissue factor expression in neutrophil extracellular traps and neutrophil derived microparticles in antineutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis may promote thromboinflammation and the thrombophilic state associated with the disease. *Ann. Rheum. Dis.* **73**: 1854–1863.
- Kampstra, A.S.B., Heemst, J. van, Moustakas, A.K., Papadopoulos, G.K., Huizinga, T.W.J., Toes, R.E.M. (2016): The increased ability to present citrullinated peptides is not unique to HLA-SE molecules: arginine-to-citrulline conversion also enhances peptide affinity for HLA-DQ molecules. *Arthritis Res. Ther.* **18**: 254.
- Karlson, E.W., Chang, S.-C., Cui, J., Chibnik, L.B., Fraser, P.A., De Vivo, I., Costenbader, K.H. (2010): Gene-environment interaction between HLA-DRB1 shared epitope and heavy cigarette smoking in predicting incident rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **69**: 54–60.
- Katschke, K.J., Rottman, J.B., Ruth, J.H., Qin, S., Wu, L., LaRosa, G., Ponath, P., Park, C.C., Pope, R.M., Koch, A.E. (2001): Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood, synovial fluid, and synovial tissue monocytes/macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **44**: 1022–1032.
- Kaufmann, A., Salentin, R., Gemsa, D., Sprenger, H. (2001): Increase of CCR1 and CCR5 expression and enhanced functional response to MIP-1 alpha during differentiation of human monocytes to macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **69**: 248–252.
- Kawai, T., Akira, S. (2011): Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* **34**: 637–650.
- Kawamura, S., Onai, N., Miya, F., Sato, T., Tsunoda, T., Kurabayashi, K., Yotsumoto, S., Kuroda, S., Takenaka, K., Akashi, K., Ohteki, T. (2017): Identification of a Human Clonogenic Progenitor with Strict Monocyte Differentiation Potential: A Counterpart of Mouse cMoPs. *Immunity* **46**: 835-848.e4.
- Keffer, J., Probert, L., Cazlaris, H., Georgopoulos, S., Kaslaris, E., Kioussis, D., Kollias, G. (1991): Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J.* **10**: 4025–4031.

- Kelly, L.M., Englmeier, U., Lafon, I., Sieweke, M.H., Graf, T. (2000): MafB is an inducer of monocytic differentiation. *EMBO J.* **19**: 1987–1997.
- Kenno, S., Perito, S., Mosci, P., Vecchiarelli, A., Monari, C. (2016): Autophagy and Reactive Oxygen Species Are Involved in Neutrophil Extracellular Traps Release Induced by *C. albicans* Morphotypes. *Front. Microbiol.* **7**: 879.
- Kenny, E.F., Herzig, A., Krüger, R., Muth, A., Mondal, S., Thompson, P.R., Brinkmann, V., Bernuth, H. von, Zychlinsky, A. (2017): Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *ELife* **6**.
- Kessenbrock, K., Krumbholz, M., Schönemmarck, U., Back, W., Gross, W.L., Werb, Z., Gröne, H.-J., Brinkmann, V., Jenne, D.E. (2009): Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat. Med.* **15**: 623–625.
- Kettle, A.J., Winterbourn, C.C. (1997): Myeloperoxidase: a key regulator of neutrophil oxidant production. *Redox Rep. Commun. Free Radic. Res.* **3**: 3–15.
- Khandpur, R., Carmona-Rivera, C., Vivekanandan-Giri, A., Gizinski, A., Yalavarthi, S., Knight, J.S., Friday, S., Li, S., Patel, R.M., Subramanian, V., Thompson, P., Chen, P., Fox, D.A., Pennathur, S., Kaplan, M.J. (2013): NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.* **5**: 178ra40.
- Khanna-Gupta, A., Zibello, T., Sun, H., Gaines, P., Berliner, N. (2003): Chromatin immunoprecipitation (ChIP) studies indicate a role for CCAAT enhancer binding proteins alpha and epsilon (C/EBP alpha and C/EBP epsilon) and CDP/cut in myeloid maturation-induced lactoferrin gene expression. *Blood* **101**: 3460–3468.
- Kiel, M.J., Yilmaz, O.H., Iwashita, T., Yilmaz, O.H., Terhorst, C., Morrison, S.J. (2005): SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* **121**: 1109–1121.
- Kim, M.-H., Granick, J.L., Kwok, C., Walker, N.J., Borjesson, D.L., Curry, F.-R.E., Miller, L.S., Simon, S.I. (2011): Neutrophil survival and c-kit(+)-progenitor proliferation in *Staphylococcus aureus*-infected skin wounds promote resolution. *Blood* **117**: 3343–3352.
- Kim, M.-H., Yang, D., Kim, M., Kim, S.-Y., Kim, D., Kang, S.-J. (2017): A late-lineage murine neutrophil precursor population exhibits dynamic changes during demand-adapted granulopoiesis. *Sci. Rep.* **7**: 39804.
- Kimura, A., Naka, T., Nakahama, T., Chinen, I., Masuda, K., Nohara, K., Fujii-Kuriyama, Y., Kishimoto, T. (2009): Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses. *J. Exp. Med.* **206**: 2027–2035.
- King, K.Y., Goodell, M.A. (2011): Inflammatory modulation of HSCs: viewing the HSC as a foundation for the immune response. *Nat. Rev. Immunol.* **11**: 685–692.
- Kitano, M., Nakaya, M., Nakamura, T., Nagata, S., Matsuda, M. (2008): Imaging of Rab5 activity identifies essential regulators for phagosome maturation. *Nature* **453**: 241–245.
- Kjeldsen, L., Bainton, D.F., Sengeløv, H., Borregaard, N. (1993): Structural and functional heterogeneity among peroxidase-negative granules in human neutrophils: identification of a distinct gelatinase-containing granule subset by combined immunocytochemistry and subcellular fractionation. *Blood* **82**: 3183–3191.
- Kjeldsen, L., Sengeløv, H., Løllike, K., Nielsen, M.H., Borregaard, N. (1994): Isolation and characterization of gelatinase granules from human neutrophils. *Blood* **83**: 1640–1649.
- Klareskog, L., Heijde, D. van der, Jager, J.P. de, Gough, A., Kalden, J., Malaise, M., Martín Mola, E., Pavelka, K., Sany, J., Settas, L., Wajdula, J., Pedersen, R., Fatenejad, S., Sanda, M., TEMPO (Trial of Etanercept and Methotrexate with Radiographic Patient Outcomes) study investigators (2004): Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* **363**: 675–681.

- Klareskog, L., Stolt, P., Lundberg, K., Källberg, H., Bengtsson, C., Grunewald, J., Rönnelid, J., Harris, H.E., Ulfgren, A.-K., Rantapää-Dahlqvist, S., Eklund, A., Padyukov, L., Alfredsson, L. (2006): A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum.* **54**: 38–46.
- Klickstein, L.B., Barbashov, S.F., Liu, T., Jack, R.M., Nicholson-Weller, A. (1997): Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a receptor for C1q. *Immunity* **7**: 345–355.
- Klinke, A., Nussbaum, C., Kubala, L., Friedrichs, K., Rudolph, T.K., Rudolph, V., Paust, H.-J., Schröder, C., Benten, D., Lau, D., Szocs, K., Furtmüller, P.G., Heeringa, P., Sydow, K., Duchstein, H.-J., Ehmke, H., Schumacher, U., Meinertz, T., Sperandio, M., Baldus, S. (2011): Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces. *Blood* **117**: 1350–1358.
- Kloc, M., Ghobrial, R.M., Wosik, J., Lewicka, A., Lewicki, S., Kubiak, J.Z. (2019): Macrophage functions in wound healing. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **13**: 99–109.
- Koch, A.E. (2005): Chemokines and their receptors in rheumatoid arthritis: Future targets? *Arthritis Rheum.* **52**: 710–721.
- Koch, A.E., Kunkel, S.L., Burrows, J.C., Evanoff, H.L., Haines, G.K., Pope, R.M., Strieter, R.M. (1991): Synovial tissue macrophage as a source of the chemotactic cytokine IL-8. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **147**: 2187–2195.
- Koch, A.E., Kunkel, S.L., Harlow, L.A., Johnson, B., Evanoff, H.L., Haines, G.K., Burdick, M.D., Pope, R.M., Strieter, R.M. (1992): Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* **90**: 772–779.
- Koch, A.E., Robinson, P.G., Radosevich, J.A., Pope, R.M. (1990): Distribution of CD45RA and CD45RO T-lymphocyte subsets in rheumatoid arthritis synovial tissue. *J. Clin. Immunol.* **10**: 192–199.
- Köhler, A., De Filippo, K., Hasenberg, M., Brandt, C. van den, Nye, E., Hosking, M.P., Lane, T.E., Männ, L., Ransohoff, R.M., Hauser, A.E., Winter, O., Schraven, B., Geiger, H., Hogg, N., Gunzer, M. (2011): G-CSF-mediated thrombopoietin release triggers neutrophil motility and mobilization from bone marrow via induction of Cxcr2 ligands. *Blood* **117**: 4349–4357.
- Kolaczowska, E., Kubes, P. (2013): Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **13**: 159–175.
- Kondo, M., Yamaoka, K., Sonomoto, K., Fukuyo, S., Oshita, K., Okada, Y., Tanaka, Y. (2013): IL-17 inhibits chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *PloS One* **8**: e79463.
- Koning, N., Eijk, M. van, Pouwels, W., Brouwer, M.S.M., Voehringer, D., Huitinga, I., Hoek, R.M., Raes, G., Hamann, J. (2010): Expression of the inhibitory CD200 receptor is associated with alternative macrophage activation. *J. Innate Immun.* **2**: 195–200.
- Korganow, A.S., Ji, H., Mangialaio, S., Duchatelle, V., Pelanda, R., Martin, T., Degott, C., Kikutani, H., Rajewsky, K., Pasquali, J.L., Benoist, C., Mathis, D. (1999): From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity* **10**: 451–461.
- Kotake, S., Sato, K., Kim, K.J., Takahashi, N., Udagawa, N., Nakamura, I., Yamaguchi, A., Kishimoto, T., Suda, T., Kashiwazaki, S. (1996): Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **11**: 88–95.
- Kouskoff, V., Korganow, A.S., Duchatelle, V., Degott, C., Benoist, C., Mathis, D. (1996): Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* **87**: 811–822.
- Koyama, S., Ishii, K.J., Kumar, H., Tanimoto, T., Coban, C., Uematsu, S., Kawai, T., Akira, S. (2007): Differential role of TLR- and RLR-signaling in the immune responses to influenza A virus infection and vaccination. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **179**: 4711–4720.

- Krug, A., French, A.R., Barchet, W., Fischer, J.A.A., Dzionek, A., Pingel, J.T., Orihuela, M.M., Akira, S., Yokoyama, W.M., Colonna, M. (2004): TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* **21**: 107–119.
- Krystal, G., Sly, L., Antignano, F., Ho, V., Ruschmann, J., Hamilton, M. (2007): Re: The Terminology Issue for Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Res.* **67**: 3986–3986.
- Kumagai, Y., Takeuchi, O., Akira, S. (2008): TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**: 795–804.
- Kumaravelu, P., Hook, L., Morrison, A.M., Ure, J., Zhao, S., Zuyev, S., Ansell, J., Medvinsky, A. (2002): Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs): role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver. *Dev. Camb. Engl.* **129**: 4891–4899.
- Kwiatkowska, K., Sobota, A. (2001): The clustered Fcγ receptor II is recruited to Lyn-containing membrane domains and undergoes phosphorylation in a cholesterol-dependent manner. *Eur. J. Immunol.* **31**: 989–998.
- Lam, J., Takeshita, S., Barker, J.E., Kanagawa, O., Ross, F.P., Teitelbaum, S.L. (2000): TNF-α induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J. Clin. Invest.* **106**: 1481–1488.
- Lämmermann, T., Afonso, P.V., Angermann, B.R., Wang, J.M., Kastenmüller, W., Parent, C.A., Germain, R.N. (2013): Neutrophil swarms require LTB<sub>4</sub> and integrins at sites of cell death in vivo. *Nature* **498**: 371–375.
- Lande, R., Ganguly, D., Facchinetti, V., Frasca, L., Conrad, C., Gregorio, J., Meller, S., Chamilos, G., Sebasigari, R., Ricciardi, V., Bassett, R., Amuro, H., Fukuhara, S., Ito, T., Liu, Y.-J., Gilliet, M. (2011): Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* **3**: 73ra19.
- Lappann, M., Danhof, S., Guenther, F., Olivares-Florez, S., Mordhorst, I.L., Vogel, U. (2013): In vitro resistance mechanisms of *Neisseria meningitidis* against neutrophil extracellular traps. *Mol. Microbiol.* **89**: 433–449.
- Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K.A., Monks, B.G., Knetter, C.F., Lien, E., Nilsen, N.J., Espevik, T., Golenbock, D.T. (2004): TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat. Immunol.* **5**: 190–198.
- Lauth, X., Köckritz-Blickwede, M. von, McNamara, C.W., Myskowski, S., Zinkernagel, A.S., Beall, B., Ghosh, P., Gallo, R.L., Nizet, V. (2009): M1 protein allows Group A streptococcal survival in phagocyte extracellular traps through cathelicidin inhibition. *J. Innate Immun.* **1**: 202–214.
- Lavine, K.J., Epelman, S., Uchida, K., Weber, K.J., Nichols, C.G., Schilling, J.D., Ornitz, D.M., Randolph, G.J., Mann, D.L. (2014): Distinct macrophage lineages contribute to disparate patterns of cardiac recovery and remodeling in the neonatal and adult heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**: 16029–16034.
- Lazzaretto, B., Fadeel, B. (2019): Intra- and Extracellular Degradation of Neutrophil Extracellular Traps by Macrophages and Dendritic Cells. *J. Immunol.* **203**: 2276–2290.
- Lee, D.M., Kiener, H.P., Agarwal, S.K., Noss, E.H., Watts, G.F.M., Chisaka, O., Takeichi, M., Brenner, M.B. (2007): Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis. *Science* **315**: 1006–1010.
- Lee, J., Luria, A., Rhodes, C., Raghu, H., Lingampalli, N., Sharpe, O., Rada, B., Sohn, D.H., Robinson, W.H., Sokolove, J. (2017): Nicotine drives neutrophil extracellular traps formation and accelerates collagen-induced arthritis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **56**: 644–653.
- Lee, S.M.Y., Kok, K.-H., Jaume, M., Cheung, T.K.W., Yip, T.-F., Lai, J.C.C., Guan, Y., Webster, R.G., Jin, D.-Y., Peiris, J.S.M. (2014): Toll-like receptor 10 is involved in induction of innate immune responses to influenza virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**: 3793–3798.

- Lee, W.L., Kim, M.-K., Schreiber, A.D., Grinstein, S. (2005): Role of ubiquitin and proteasomes in phagosome maturation. *Mol. Biol. Cell* **16**: 2077–2090.
- Leffell, M.S., Spitznagel, J.K. (1974): Intracellular and extracellular degranulation of human polymorphonuclear azurophil and specific granules induced by immune complexes. *Infect. Immun.* **10**: 1241–1249.
- Leffler, J., Martin, M., Gullstrand, B., Tydén, H., Lood, C., Truedsson, L., Bengtsson, A.A., Blom, A.M. (2012): Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **188**: 3522–3531.
- Lehrer, R.I., Barton, A., Daher, K.A., Harwig, S.S., Ganz, T., Selsted, M.E. (1989): Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *J. Clin. Invest.* **84**: 553–561.
- Lehtonen, A., Ahlfors, H., Veckman, V., Miettinen, M., Lahesmaa, R., Julkunen, I. (2007): Gene expression profiling during differentiation of human monocytes to macrophages or dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* **82**: 710–720.
- Lehtonen, A., Matikainen, S., Miettinen, M., Julkunen, I. (2002): Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-induced STAT5 activation and target-gene expression during human monocyte/macrophage differentiation. *J. Leukoc. Biol.* **71**: 511–519.
- Lekstrom-Himes, J.A., Dorman, S.E., Kopar, P., Holland, S.M., Gallin, J.I. (1999): Neutrophil-specific granule deficiency results from a novel mutation with loss of function of the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein epsilon. *J. Exp. Med.* **189**: 1847–1852.
- Letran, S.E., Lee, S.-J., Atif, S.M., Uematsu, S., Akira, S., McSorley, S.J. (2011): TLR5 functions as an endocytic receptor to enhance flagellin-specific adaptive immunity. *Eur. J. Immunol.* **41**: 29–38.
- Leung, B.P., Conacher, M., Hunter, D., McInnes, I.B., Liew, F.Y., Brewer, J.M. (2002): A novel dendritic cell-induced model of erosive inflammatory arthritis: distinct roles for dendritic cells in T cell activation and induction of local inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **169**: 7071–7077.
- Levin, R., Grinstein, S., Canton, J. (2016): The life cycle of phagosomes: formation, maturation, and resolution. *Immunol. Rev.* **273**: 156–179.
- Lew, P.D., Monod, A., Waldvogel, F.A., Dewald, B., Baggiolini, M., Pozzan, T. (1986): Quantitative analysis of the cytosolic free calcium dependency of exocytosis from three subcellular compartments in intact human neutrophils. *J. Cell Biol.* **102**: 2197–2204.
- Lewis, H.D., Liddle, J., Coote, J.E., Atkinson, S.J., Barker, M.D., Bax, B.D., Bicker, K.L., Bingham, R.P., Campbell, M., Chen, Y.H., Chung, C.-W., Craggs, P.D., Davis, R.P., Eberhard, D., Joberty, G., Lind, K.E., Locke, K., Maller, C., Martinod, K., Patten, C., Polyakova, O., Rise, C.E., Rüdiger, M., Sheppard, R.J., Slade, D.J., Thomas, P., Thorpe, J., Yao, G., Drewes, G., Wagner, D.D., Thompson, P.R., Prinjha, R.K., Wilson, D.M. (2015): Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation. *Nat. Chem. Biol.* **11**: 189–191.
- Li, P., Li, M., Lindberg, M.R., Kennett, M.J., Xiong, N., Wang, Y. (2010): PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J. Exp. Med.* **207**: 1853–1862.
- Li, X.J., Tian, W., Stull, N.D., Grinstein, S., Atkinson, S., Dinauer, M.C. (2009): A fluorescently tagged C-terminal fragment of p47phox detects NADPH oxidase dynamics during phagocytosis. *Mol. Biol. Cell* **20**: 1520–1532.
- Liang, Y.-B., Tang, H., Chen, Z.-B., Zeng, L.-J., Wu, J.-G., Yang, W., Li, Z.-Y., Ma, Z.-F. (2017): Downregulated SOCS1 expression activates the JAK1/STAT1 pathway and promotes polarization of macrophages into M1 type. *Mol. Med. Rep.* **16**: 6405–6411.
- Lieschke, G.J., Grail, D., Hodgson, G., Metcalf, D., Stanley, E., Cheers, C., Fowler, K.J., Basu, S., Zhan, Y.F., Dunn, A.R. (1994): Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood* **84**: 1737–1746.

Lieshout, A.W.T. van, Voort, R. van der, Blanc, L.M.P. le, Roelofs, M.F., Schreurs, B.W., Riel, P.L.C.M. van, Adema, G.J., Radstake, T.R.D.J. (2006): Novel insights in the regulation of CCL18 secretion by monocytes and dendritic cells via cytokines, toll-like receptors and rheumatoid synovial fluid. *BMC Immunol.* **7**: 23.

Liew, P.X., Kubes, P. (2019): The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiol. Rev.* **99**: 1223–1248.

Lillegraven, S., Greenberg, J.D., Reed, G.W., Saunders, K., Curtis, J.R., Harrold, L., Hochberg, M.C., Pappas, D.A., Kremer, J.M., Solomon, D.H. (2019): Immunosuppressive treatment and the risk of diabetes in rheumatoid arthritis. *PLOS ONE* **14**: e0210459.

Lindau, D., Mussard, J., Wagner, B.J., Ribon, M., Rönnefarth, V.M., Quettier, M., Jelcic, I., Boissier, M.-C., Rammensee, H.-G., Decker, P. (2013): Primary blood neutrophils express a functional cell surface Toll-like receptor 9. *Eur. J. Immunol.* **43**: 2101–2113.

Linden, M. van der, Hoogen, L.L. van den, Westerlaken, G.H.A., Fritsch-Stork, R.D.E., Roon, J.A.G. van, Radstake, T.R.D.J., Meyaard, L. (2018): Neutrophil extracellular trap release is associated with antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus and anti-phospholipid syndrome. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **57**: 1228–1234.

Linkermann, A., Green, D.R. (2014): Necroptosis. *N. Engl. J. Med.* **370**: 455–465.

Lipsky, P.E., Heijde, D.M. van der, St Clair, E.W., Furst, D.E., Breedveld, F.C., Kalden, J.R., Smolen, J.S., Weisman, M., Emery, P., Feldmann, M., Harriman, G.R., Maini, R.N., Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group (2000): Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. *N. Engl. J. Med.* **343**: 1594–1602.

Liu, C., Jiang, J., Gao, L., Wang, X., Hu, X., Wu, M., Wu, J., Xu, T., Shi, Q., Zhang, X. (2015): Soluble PD-1 aggravates progression of collagen-induced arthritis through Th1 and Th17 pathways. *Arthritis Res. Ther.* **17**: 340.

Liu, Y., Aryee, M.J., Padyukov, L., Fallin, M.D., Hesselberg, E., Runarsson, A., Reinius, L., Acevedo, N., Taub, M., Ronninger, M., Shchetynsky, K., Scheynius, A., Kere, J., Alfredsson, L., Klareskog, L., Ekström, T.J., Feinberg, A.P. (2013): Epigenome-wide association data implicate DNA methylation as an intermediary of genetic risk in rheumatoid arthritis. *Nat. Biotechnol.* **31**: 142–147.

Lominadze, G., Powell, D.W., Luerman, G.C., Link, A.J., Ward, R.A., McLeish, K.R. (2005): Proteomic analysis of human neutrophil granules. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **4**: 1503–1521.

Lood, C., Blanco, L.P., Purmalek, M.M., Carmona-Rivera, C., De Ravin, S.S., Smith, C.K., Malech, H.L., Ledbetter, J.A., Elkon, K.B., Kaplan, M.J. (2016): Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nat. Med.* **22**: 146–153.

Lopes, F.B., Bálint, Š., Valvo, S., Felce, J.H., Hessel, E.M., Dustin, M.L., Davis, D.M. (2017): Membrane nanoclusters of FcγRI segregate from inhibitory SIRPα upon activation of human macrophages. *J. Cell Biol.* **216**: 1123–1141.

López-Longo, F.J., Oliver-Miñarro, D., Torre, I. de la, González-Díaz de Rábago, E., Sánchez-Ramón, S., Rodríguez-Mahou, M., Paravisini, A., Monteagudo, I., González, C.-M., García-Castro, M., Casas, M.D., Carreño, L. (2009): Association between anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and ischemic heart disease in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **61**: 419–424.

Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., Ohashi, P.S. (2008): LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* **42**: 145–151.

Lubberts, E., Joosten, L.A., Oppers, B., Berselaar, L. van den, Coenen-de Roo, C.J., Kolls, J.K., Schwarzenberger, P., Loo, F.A. van de, Berg, W.B. van den (2001): IL-1-independent role of IL-17 in synovial inflammation and joint destruction during collagen-induced arthritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **167**: 1004–1013.

Luckey, D., Medina, K., Taneja, V. (2012): B cells as effectors and regulators of sex-biased arthritis. *Autoimmunity* **45**: 364–376.

- Lundberg, K., Kinloch, A., Fisher, B.A., Wegner, N., Wait, R., Charles, P., Mikuls, T.R., Venables, P.J. (2008): Antibodies to citrullinated alpha-enolase peptide 1 are specific for rheumatoid arthritis and cross-react with bacterial enolase. *Arthritis Rheum.* **58**: 3009–3019.
- Lurier, E.B., Dalton, D., Dampier, W., Raman, P., Nassiri, S., Ferraro, N.M., Rajagopalan, R., Sarmady, M., Spiller, K.L. (2017): Transcriptome analysis of IL-10-stimulated (M2c) macrophages by next-generation sequencing. *Immunobiology* **222**: 847–856.
- MacGregor, A.J., Snieder, H., Rigby, A.S., Koskenvuo, M., Kaprio, J., Aho, K., Silman, A.J. (2000): Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum.* **43**: 30–37.
- Mackness, G.B. (1962): Cellular resistance to infection. *J. Exp. Med.* **116**: 381–406.
- MacKay, K., Eyre, S., Myerscough, A., Milicic, A., Barton, A., Laval, S., Barrett, J., Lee, D., White, S., John, S., Brown, M.A., Bell, J., Silman, A., Ollier, W., Wordsworth, P., Worthington, J. (2002): Whole-genome linkage analysis of rheumatoid arthritis susceptibility loci in 252 affected sibling pairs in the United Kingdom. *Arthritis Rheum.* **46**: 632–639.
- Maibom-Thomsen, S.L., Trier, N.H., Holm, B.E., Hansen, K.B., Rasmussen, M.I., Chailyan, A., Marcatili, P., Højrup, P., Houen, G. (2019): Immunoglobulin G structure and rheumatoid factor epitopes. *PloS One* **14**: e0217624.
- Maini, R., St Clair, E.W., Breedveld, F., Furst, D., Kalden, J., Weisman, M., Smolen, J., Emery, P., Harriman, G., Feldmann, M., Lipsky, P. (1999): Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group. *Lancet Lond. Engl.* **354**: 1932–1939.
- Malachowa, N., Kobayashi, S.D., Freedman, B., Dorward, D.W., DeLeo, F.R. (2013): Staphylococcus aureus leukotoxin GH promotes formation of neutrophil extracellular traps. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **191**: 6022–6029.
- Malle, E., Marsche, G., Arnhold, J., Davies, M.J. (2006): Modification of low-density lipoprotein by myeloperoxidase-derived oxidants and reagent hypochlorous acid. *Biochim. Biophys. Acta* **1761**: 392–415.
- Manders, S.H.M., Kievit, W., Adang, E., Brus, H.L., Moens, H.J.B., Hartkamp, A., Hendriks, L., Brouwer, E., Visser, H., Vonkeman, H.E., Hendriks, J., Jansen, T.L., Westhovens, R., Laar, M.A.F.J. van de, Riel, P.L.C.M. van (2015): Cost-effectiveness of abatacept, rituximab, and TNFi treatment after previous failure with TNFi treatment in rheumatoid arthritis: a pragmatic multi-centre randomised trial. *Arthritis Res. Ther.* **17**: 134.
- 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.
- Manz, M.G., Boettcher, S. (2014): Emergency granulopoiesis. *Nat. Rev. Immunol.* **14**: 302–314.
- Manz, M.G., Miyamoto, T., Akashi, K., Weissman, I.L. (2002): Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 11872–11877.
- Manz, M.G., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I.L., Akashi, K. (2001): Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* **97**: 3333–3341.
- Marini, O., Costa, S., Bevilacqua, D., Calzetti, F., Tamassia, N., Spina, C., De Sabata, D., Tinazzi, E., Lunardi, C., Scupoli, M.T., Cavallini, C., Zoratti, E., Tinazzi, I., Marchetta, A., Vassanelli, A., Cantini, M., Gandini, G., Ruzzenente, A., Guglielmi, A., Missale, F., Vermi, W., Tecchio, C., Cassatella, M.A., Scapini, P. (2017): Mature CD10+ and immature CD10- neutrophils present in G-CSF-treated donors display opposite effects on T cells. *Blood* **129**: 1343–1356.
- Martin, C., Burdon, P.C.E., Bridger, G., Gutierrez-Ramos, J.C., Williams, T.J., Rankin, S.M. (2003): Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity* **19**: 583–593.



- Martinez, F.O., Helming, L., Milde, R., Varin, A., Melgert, B.N., Draijer, C., Thomas, B., Fabbri, M., Crawshaw, A., Ho, L.P., Ten Hacken, N.H., Cobos Jiménez, V., Kootstra, N.A., Hamann, J., Greaves, D.R., Locati, M., Mantovani, A., Gordon, S. (2013): Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. *Blood* **121**: e57-69.
- Massena, S., Christoffersson, G., Hjertström, E., Zcharia, E., Vlodaysky, I., Ausmees, N., Rolny, C., Li, J.-P., Phillipson, M. (2010): A chemotactic gradient sequestered on endothelial heparan sulfate induces directional intraluminal crawling of neutrophils. *Blood* **116**: 1924–1931.
- Massena, S., Christoffersson, G., Vågesjö, E., Seignez, C., Gustafsson, K., Binet, F., Herrera Hidalgo, C., Giraud, A., Lomei, J., Weström, S., Shibuya, M., Claesson-Welsh, L., Gerwins, P., Welsh, M., Kreuger, J., Phillipson, M. (2015): Identification and characterization of VEGF-A-responsive neutrophils expressing CD49d, VEGFR1, and CXCR4 in mice and humans. *Blood* **126**: 2016–2026.
- Matsushima, H., Geng, S., Lu, R., Okamoto, T., Yao, Y., Mayuzumi, N., Kotol, P.F., Chojnacki, B.J., Miyazaki, T., Gallo, R.L., Takashima, A. (2013): Neutrophil differentiation into a unique hybrid population exhibiting dual phenotype and functionality of neutrophils and dendritic cells. *Blood* **121**: 1677–1689.
- McIlroy, D.J., Jarnicki, A.G., Au, G.G., Lott, N., Smith, D.W., Hansbro, P.M., Balogh, Z.J. (2014): Mitochondrial DNA neutrophil extracellular traps are formed after trauma and subsequent surgery. *J. Crit. Care* **29**: 1133.e1–5.
- McInnes, I.B., Mughales, J. al-, Field, M., Leung, B.P., Huang, F.P., Dixon, R., Sturrock, R.D., Wilkinson, P.C., Liew, F.Y. (1996): The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* **2**: 175–182.
- Mellbye, O.J., Natvig, J.B. (1971): Evidence for immune complexes containing antibody to the pepsin site of IgG in rheumatoid synovial fluids. *Clin. Exp. Immunol.* **8**: 889–899.
- Mensurado, S., Rei, M., Lança, T., Ioannou, M., Gonçalves-Sousa, N., Kubo, H., Malissen, M., Papayannopoulos, V., Serre, K., Silva-Santos, B. (2018): Tumor-associated neutrophils suppress pro-tumoral IL-17+  $\gamma\delta$  T cells through induction of oxidative stress. *PLoS Biol.* **16**: e2004990.
- Mertens, M., Singh, J.A. (2009): Anakinra for rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst. Rev.*
- Metcalf, D., Begley, C.G., Williamson, D.J., Nice, E.C., De Lamarter, J., Mermod, J.J., Thatcher, D., Schmidt, A. (1987): Hemopoietic responses in mice injected with purified recombinant murine GM-CSF. *Exp. Hematol.* **15**: 1–9.
- Metzler, K.D., Goosmann, C., Lubojemska, A., Zychlinsky, A., Papayannopoulos, V. (2014): A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Rep.* **8**: 883–896.
- Michaeli, J., Shaul, M.E., Mishalian, I., Hovav, A.-H., Levy, L., Zolotriov, L., Granot, Z., Fridlender, Z.G. (2017): Tumor-associated neutrophils induce apoptosis of non-activated CD8 T-cells in a TNF $\alpha$  and NO-dependent mechanism, promoting a tumor-supportive environment. *Oncoimmunology* **6**: e1356965.
- Mihara, M., Moriya, Y., Kishimoto, T., Ohsugi, Y. (1995): Interleukin-6 (IL-6) induces the proliferation of synovial fibroblastic cells in the presence of soluble IL-6 receptor. *Br. J. Rheumatol.* **34**: 321–325.
- Mikuls, T.R., Payne, J.B., Yu, F., Thiele, G.M., Reynolds, R.J., Cannon, G.W., Markt, J., McGowan, D., Kerr, G.S., Redman, R.S., Reimold, A., Griffiths, G., Beatty, M., Gonzalez, S.M., Bergman, D.A., Hamilton, B.C., Erickson, A.R., Sokolove, J., Robinson, W.H., Walker, C., Chandad, F., O'Dell, J.R. (2014): Periodontitis and *Porphyromonas gingivalis* in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* Hoboken NJ **66**: 1090–1100.
- Miller, B.F., Abrams, R., Dorfman, A., Klein, M. (1942): ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF PROTAMINE AND HISTONE. *Science* **96**: 428–430.
- Miller, L.S., Pietras, E.M., Uricchio, L.H., Hirano, K., Rao, S., Lin, H., O'Connell, R.M., Iwakura, Y., Cheung, A.L., Cheng, G., Modlin, R.L. (2007): Inflammasome-mediated production of IL-1 $\beta$  is required for neutrophil recruitment against *Staphylococcus aureus* in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **179**: 6933–6942.

- Mills, C.D., Kincaid, K., Alt, J.M., Heilman, M.J., Hill, A.M. (2000): M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **164**: 6166–6173.
- Misharin, A.V., Cuda, C.M., Saber, R., Turner, J.D., Gierut, A.K., Haines, G.K., Berdnikovs, S., Filer, A., Clark, A.R., Buckley, C.D., Mutlu, G.M., Budinger, G.R.S., Perlman, H. (2014): Nonclassical Ly6C(-) monocytes drive the development of inflammatory arthritis in mice. *Cell Rep.* **9**: 591–604.
- Mitroulis, I., Kalafati, L., Hajishengallis, G., Chavakis, T. (2018): Myelopoiesis in the Context of Innate Immunity. *J. Innate Immun.* **10**: 365–372.
- Mitroulis, I., Kambas, K., Chrysanthopoulou, A., Skendros, P., Apostolidou, E., Kourtzelis, I., Drosos, G.I., Boumpas, D.T., Ritis, K. (2011): Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1 $\beta$  and autophagy-related signaling in gout. *PloS One* **6**: e29318.
- Miyamoto, M., Prause, O., Sjöstrand, M., Laan, M., Lötvall, J., Lindén, A. (2003): Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **170**: 4665–4672.
- Molawi, K., Wolf, Y., Kandalla, P.K., Favret, J., Hagemeyer, N., Frenzel, K., Pinto, A.R., Klapproth, K., Henri, S., Malissen, B., Rodewald, H.-R., Rosenthal, N.A., Bajenoff, M., Prinz, M., Jung, S., Sieweke, M.H. (2014): Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age. *J. Exp. Med.* **211**: 2151–2158.
- Mollinedo, F., Calafat, J., Janssen, H., Martín-Martín, B., Canchado, J., Nabokina, S.M., Gajate, C. (2006): Combinatorial SNARE complexes modulate the secretion of cytoplasmic granules in human neutrophils. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **177**: 2831–2841.
- Mollnes, T.E., Brekke, O.-L., Fung, M., Fure, H., Christiansen, D., Bergseth, G., Videm, V., Lappegård, K.T., Köhl, J., Lambris, J.D. (2002): Essential role of the C5a receptor in E coli-induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin-based human whole blood model of inflammation. *Blood* **100**: 1869–1877.
- Morita, Y., Yamamura, M., Kawashima, M., Harada, S., Tsuji, K., Shibuya, K., Maruyama, K., Makino, H. (1998): Flow cytometric single-cell analysis of cytokine production by CD4+ T cells in synovial tissue and peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **41**: 1669–1676.
- Morrison, S.J., Weissman, I.L. (1994): The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* **1**: 661–673.
- Morshed, M., Hlushchuk, R., Simon, D., Walls, A.F., Obata-Ninomiya, K., Karasuyama, H., Djonov, V., Eggel, A., Kaufmann, T., Simon, H.-U., Yousefi, S. (2014): NADPH oxidase-independent formation of extracellular DNA traps by basophils. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **192**: 5314–5323.
- Mossadegh-Keller, N., Sarrazin, S., Kandalla, P.K., Espinosa, L., Stanley, E.R., Nutt, S.L., Moore, J., Sieweke, M.H. (2013): M-CSF instructs myeloid lineage fate in single haematopoietic stem cells. *Nature* **497**: 239–243.
- Muhlethaler-Mottet, A., Otten, L.A., Steimle, V., Mach, B. (1997): Expression of MHC class II molecules in different cellular and functional compartments is controlled by differential usage of multiple promoters of the transactivator CIITA. *EMBO J.* **16**: 2851–2860.
- Müller, A.M., Medvinsky, A., Strouboulis, J., Grosveld, F., Dzierzak, E. (1994): Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* **1**: 291–301.
- Murakami, M., Iwai, S., Hiratsuka, S., Yamauchi, M., Nakamura, K., Iwakura, Y., Shibuya, M. (2006): Signaling of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine kinase promotes rheumatoid arthritis through activation of monocytes/macrophages. *Blood* **108**: 1849–1856.
- Murdoch, C., Muthana, M., Lewis, C.E. (2005): Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **175**: 6257–6263.

- Murphy, C.A., Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W., McClanahan, T., Kastelein, R.A., Sedgwick, J.D., Cua, D.J. (2003): Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* **198**: 1951–1957.
- Murray, P.J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E.A., Gilroy, D.W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J.A., Ivashkiv, L.B., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, F.O., Mege, J.-L., Mosser, D.M., Natoli, G., Saeij, J.P., Schultze, J.L., Shirey, K.A., Sica, A., Suttles, J., Udalova, I., Ginderachter, J.A. van, Vogel, S.N., Wynn, T.A. (2014): Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* **41**: 14–20.
- Na, Y.R., Jung, D., Gu, G.J., Seok, S.H. (2016): GM-CSF Grown Bone Marrow Derived Cells Are Composed of Phenotypically Different Dendritic Cells and Macrophages. *Mol. Cells* **39**: 734–741.
- Nadkarni, S., Mauri, C., Ehrenstein, M.R. (2007): Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta. *J. Exp. Med.* **204**: 33–39.
- Nagai, Y., Garrett, K.P., Ohta, S., Bahrn, U., Kouro, T., Akira, S., Takatsu, K., Kincade, P.W. (2006): Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity* **24**: 801–812.
- Naik, S.H., Sathe, P., Park, H.-Y., Metcalf, D., Proietto, A.I., Dakic, A., Carotta, S., O’Keeffe, M., Bahlo, M., Papenfuss, A., Kwak, J.-Y., Wu, L., Shortman, K. (2007): Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat. Immunol.* **8**: 1217–1226.
- Nakahama, T., Kimura, A., Nguyen, N.T., Chinen, I., Hanieh, H., Nohara, K., Fujii-Kuriyama, Y., Kishimoto, T. (2011): Aryl hydrocarbon receptor deficiency in T cells suppresses the development of collagen-induced arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**: 14222–14227.
- Nakano, K., Whitaker, J.W., Boyle, D.L., Wang, W., Firestein, G.S. (2013): DNA methylome signature in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **72**: 110–117.
- Nandakumar, K.S., Andrén, M., Martinsson, P., Bajtner, E., Hellström, S., Holmdahl, R., Kleinau, S. (2003): Induction of arthritis by single monoclonal IgG anti-collagen type II antibodies and enhancement of arthritis in mice lacking inhibitory FcγRIIB. *Eur. J. Immunol.* **33**: 2269–2277.
- Nanki, T., Shimaoka, T., Hayashida, K., Taniguchi, K., Yonehara, S., Miyasaka, N. (2005): Pathogenic role of the CXCL16-CXCR6 pathway in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **52**: 3004–3014.
- Nanki, T., Takada, K., Komano, Y., Morio, T., Kanegane, H., Nakajima, A., Lipsky, P.E., Miyasaka, N. (2009): Chemokine receptor expression and functional effects of chemokines on B cells: implication in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **11**: R149.
- Naqvi, A.R., Fordham, J.B., Nares, S. (2015): miR-24, miR-30b, and miR-142-3p regulate phagocytosis in myeloid inflammatory cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **194**: 1916–1927.
- Naqvi, A.R., Zhong, S., Dang, H., Fordham, J.B., Nares, S., Khan, A. (2016): Expression Profiling of LPS Responsive miRNA in Primary Human Macrophages. *J. Microb. Biochem. Technol.* **8**: 136–143.
- Nässberger, L., Jonsson, H., Sjöholm, A.G., Sturfelt, G., Heubner, A. (1989): Circulating anti-elastase in systemic lupus erythematosus. *Lancet Lond. Engl.* **1**: 509.
- Nathan, C.F., Murray, H.W., Wiebe, M.E., Rubin, B.Y. (1983): Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J. Exp. Med.* **158**: 670–689.
- Nau, G.J., Richmond, J.F.L., Schlesinger, A., Jennings, E.G., Lander, E.S., Young, R.A. (2002): Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 1503–1508.
- Neeli, I., Radic, M. (2013): Opposition between PKC isoforms regulates histone deimination and neutrophil extracellular chromatin release. *Front. Immunol.* **4**: 38.

- Nehmar, R., Fauconnier, L., Alves-Filho, J., Togbe, D., DeCauwer, A., Bahram, S., Le Bert, M., Ryffel, B., Georgel, P. (2021): Aryl hydrocarbon receptor (Ahr)-dependent Il-22 expression by type 3 innate lymphoid cells control of acute joint inflammation. *J. Cell. Mol. Med.* **25**: 4721–4731.
- Neth, O., Jack, D.L., Dodds, A.W., Holzel, H., Klein, N.J., Turner, M.W. (2000): Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. *Infect. Immun.* **68**: 688–693.
- Neth, O., Jack, D.L., Johnson, M., Klein, N.J., Turner, M.W. (2002): Enhancement of complement activation and opsonophagocytosis by complexes of mannose-binding lectin with mannose-binding lectin-associated serine protease after binding to *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **169**: 4430–4436.
- Neumann, A., Völlger, L., Berends, E.T.M., Molhoek, E.M., Stapels, D.A.C., Midon, M., Friães, A., Pingoud, A., Rooijackers, S.H.M., Gallo, R.L., Mörgelin, M., Nizet, V., Naim, H.Y., Köckritz-Blickwede, M. von (2014): Novel role of the antimicrobial peptide LL-37 in the protection of neutrophil extracellular traps against degradation by bacterial nucleases. *J. Innate Immun.* **6**: 860–868.
- Nielen, M.M.J., Schaardenburg, D. van, Reesink, H.W., Stadt, R.J. van de, Horst-Bruinsma, I.E. van der, Koning, M.H.M.T. de, Habibuw, M.R., Vandenbroucke, J.P., Dijkmans, B.A.C. (2004): Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum.* **50**: 380–386.
- Niethammer, P., Grabher, C., Look, A.T., Mitchison, T.J. (2009): A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature* **459**: 996–999.
- Norberg, B., Bjelle, A., Eriksson, S. (1983): Joint fluid leukocytosis of patients with rheumatoid arthritis evidence for neutrophil and monocyte chemotaxis in vivo. *Clin. Rheumatol.* **2**: 237–242.
- Nourshargh, S., Alon, R. (2014): Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity* **41**: 694–707.
- Numata, A., Shimoda, K., Kamezaki, K., Haro, T., Kakumitsu, H., Shide, K., Kato, K., Miyamoto, T., Yamashita, Y., Oshima, Y., Nakajima, H., Iwama, A., Aoki, K., Takase, K., Gondo, H., Mano, H., Harada, M. (2005): Signal transducers and activators of transcription 3 augments the transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding protein alpha in granulocyte colony-stimulating factor signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **280**: 12621–12629.
- Odin, J.A., Edberg, J.C., Painter, C.J., Kimberly, R.P., Unkeless, J.C. (1991): Regulation of phagocytosis and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> flux by distinct regions of an Fc receptor. *Science* **254**: 1785–1788.
- Ohgami, M., Doerschuk, C.M., Gie, R.P., English, D., Hogg, J.C. (1991): Monocyte kinetics in rabbits. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **70**: 152–157.
- Okada, Y., Terao, C., Ikari, K., Kochi, Y., Ohmura, K., Suzuki, A., Kawaguchi, T., Stahl, E.A., Kurreeman, F.A.S., Nishida, N., Ohmiya, H., Myouzen, K., Takahashi, M., Sawada, T., Nishioka, Y., Yukioka, M., Matsubara, T., Wakitani, S., Teshima, R., Tohma, S., Takasugi, K., Shimada, K., Murasawa, A., Honjo, S., Matsuo, K., Tanaka, H., Tajima, K., Suzuki, T., Iwamoto, T., Kawamura, Y., Tanii, H., Okazaki, Y., Sasaki, T., Gregersen, P.K., Padyukov, L., Worthington, J., Siminovitch, K.A., Lathrop, M., Taniguchi, A., Takahashi, A., Tokunaga, K., Kubo, M., Nakamura, Y., Kamatani, N., Mimori, T., Plenge, R.M., Yamanaka, H., Momohara, S., Yamada, R., Matsuda, F., Yamamoto, K. (2012): Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Nat. Genet.* **44**: 511–516.
- Okada, Y., Wu, D., Trynka, G., Raj, T., Terao, C., Ikari, K., Kochi, Y., Ohmura, K., Suzuki, A., Yoshida, S., Graham, R.R., Manoharan, A., Ortmann, W., Bhangale, T., Denny, J.C., Carroll, R.J., Eyler, A.E., Greenberg, J.D., Kremer, J.M., Pappas, D.A., Jiang, L., Yin, J., Ye, L., Su, D.-F., Yang, J., Xie, G., Keystone, E., Westra, H.-J., Esko, T., Metspalu, A., Zhou, X., Gupta, N., Mirel, D., Stahl, E.A., Diogo, D., Cui, J., Liao, K., Guo, M.H., Myouzen, K., Kawaguchi, T., Coenen, M.J.H., Riel, P.L.C.M. van, Laar, M.A.F.J. van de, Guchelaar, H.-J., Huizinga, T.W.J., Dieudé, P., Mariette, X., Louis Bridges Jr, S., Zernakova, A., Toes, R.E.M., Tak, P.P., Miceli-Richard, C., Bang, S.-Y., Lee, H.-S., Martin, J., Gonzalez-Gay, M.A., Rodriguez-Rodriguez, L., Rantapää-Dahlqvist, S., Årlestig, L., Choi, H.K., Kamatani, Y., Galan, P., Lathrop, M., Eyre, S., Bowes, J., Barton, A., Vries, N. de, Moreland, L.W., Criswell, L.A., Karlson, E.W., Taniguchi, A., Yamada, R., Kubo, M., Liu, J.S., Bae, S.-C., Worthington, J., Padyukov, L., Klareskog, L., Gregersen, P.K., Raychaudhuri, S., Stranger, B.E., De Jager,

- P.L., Franke, L., Visscher, P.M., Brown, M.A., Yamanaka, H., Mimori, T., Takahashi, A., Xu, H., Behrens, T.W., Siminovitch, K.A., Momohara, S., Matsuda, F., Yamamoto, K., Plenge, R.M. (2014): Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* **506**: 376–381.
- Olazabal, I.M., Caron, E., May, R.C., Schilling, K., Knecht, D.A., Machesky, L.M. (2002): Rho-kinase and myosin-II control phagocytic cup formation during CR, but not FcγR, phagocytosis. *Curr. Biol. CB* **12**: 1413–1418.
- Oldenburg, P.A., Gresham, H.D., Lindberg, F.P. (2001): CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPα) regulates FcγR and complement receptor-mediated phagocytosis. *J. Exp. Med.* **193**: 855–862.
- Oldenburg, M., Krüger, A., Ferstl, R., Kaufmann, A., Nees, G., Sigmund, A., Bathke, B., Lauterbach, H., Suter, M., Dreher, S., Koedel, U., Akira, S., Kawai, T., Buer, J., Wagner, H., Bauer, S., Hochrein, H., Kirschning, C.J. (2012): TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification. *Science* **337**: 1111–1115.
- Oliveira, S. de, López-Muñoz, A., Candel, S., Pelegrín, P., Calado, Â., Mulero, V. (2014): ATP modulates acute inflammation in vivo through dual oxidase 1-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and NF-κB activation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **192**: 5710–5719.
- O’Neil, L.J., Barrera-Vargas, A., Sandoval-Heglund, D., Merayo-Chalico, J., Aguirre-Aguilar, E., Aponte, A.M., Ruiz-Perdomo, Y., Gucek, M., El-Gabalawy, H., Fox, D.A., Katz, J.D., Kaplan, M.J., Carmona-Rivera, C. (2020): Neutrophil-mediated carbamylation promotes articular damage in rheumatoid arthritis. *Sci. Adv.* **6**: eabd2688.
- O’Neil, L.J., Kaplan, M.J. (2019): Neutrophils in Rheumatoid Arthritis: Breaking Immune Tolerance and Fueling Disease. *Trends Mol. Med.* **25**: 215–227.
- O’Neill, S.K., Shlomchik, M.J., Glant, T.T., Cao, Y., Doodles, P.D., Finnegan, A. (2005): Antigen-specific B cells are required as APCs and autoantibody-producing cells for induction of severe autoimmune arthritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **174**: 3781–3788.
- Oosterhout, M. van, Bajema, I., Levarht, E.W.N., Toes, R.E.M., Huizinga, T.W.J., Laar, J.M. van (2008): Differences in synovial tissue infiltrates between anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis and anti-cyclic citrullinated peptide-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **58**: 53–60.
- Ostendorf, L., Mothes, R., Koppen, S. van, Lindquist, R.L., Bellmann-Strobl, J., Asseyer, S., Ruprecht, K., Alexander, T., Niesner, R.A., Hauser, A.E., Paul, F., Radbruch, H. (2019): Low-Density Granulocytes Are a Novel Immunopathological Feature in Both Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *Front. Immunol.* **10**: 2725.
- Padrines, M., Wolf, M., Walz, A., Baggiolini, M. (1994): Interleukin-8 processing by neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase-3. *FEBS Lett.* **352**: 231–235.
- Padyukov, L., Seielstad, M., Ong, R.T.H., Ding, B., Rönnelid, J., Seddighzadeh, M., Alfredsson, L., Klareskog, L., Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis (EIRA) study group (2011): A genome-wide association study suggests contrasting associations in ACPA-positive versus ACPA-negative rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **70**: 259–265.
- Padyukov, L., Silva, C., Stolt, P., Alfredsson, L., Klareskog, L. (2004): A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **50**: 3085–3092.
- Päidassi, H., Tacnet-Delorme, P., Garlatti, V., Darnault, C., Ghebrehiwet, B., Gaboriaud, C., Arlaud, G.J., Frchet, P. (2008): C1q binds phosphatidylserine and likely acts as a multiligand-bridging molecule in apoptotic cell recognition. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **180**: 2329–2338.
- Päidassi, H., Tacnet-Delorme, P., Verneret, M., Gaboriaud, C., Houen, G., Duus, K., Ling, W.L., Arlaud, G.J., Frchet, P. (2011): Investigations on the C1q-calreticulin-phosphatidylserine interactions yield new insights into apoptotic cell recognition. *J. Mol. Biol.* **408**: 277–290.

- Pakozdi, A., Amin, M.A., Haas, C.S., Martinez, R.J., Haines, G.K., Santos, L.L., Morand, E.F., David, J.R., Koch, A.E. (2006): Macrophage migration inhibitory factor: a mediator of matrix metalloproteinase-2 production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **8**: R132.
- Palis, J., Robertson, S., Kennedy, M., Wall, C., Keller, G. (1999): Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Dev. Camb. Engl.* **126**: 5073–5084.
- Palma, C., Cassone, A., Serbousek, D., Pearson, C.A., Djeu, J.Y. (1992): Lactoferrin release and interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor production by human polymorphonuclear cells stimulated by various lipopolysaccharides: relationship to growth inhibition of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **60**: 4604–4611.
- Panopoulos, A.D., Zhang, L., Snow, J.W., Jones, D.M., Smith, A.M., El Kasmi, K.C., Liu, F., Goldsmith, M.A., Link, D.C., Murray, P.J., Watowich, S.S. (2006): STAT3 governs distinct pathways in emergency granulopoiesis and mature neutrophils. *Blood* **108**: 3682–3690.
- Panoulas, V.F., Douglas, K.M.J., Milionis, H.J., Stavropoulos-Kalinglou, A., Nightingale, P., Kita, M.D., Tselios, A.L., Metsios, G.S., Elisaf, M.S., Kitas, G.D. (2007): Prevalence and associations of hypertension and its control in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **46**: 1477–1482.
- Papayannopoulos, V., Metzler, K.D., Hakkim, A., Zychlinsky, A. (2010): Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* **191**: 677–691.
- Papayannopoulou, T., Craddock, C., Nakamoto, B., Priestley, G.V., Wolf, N.S. (1995): The VLA4/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanisms of lodgement of transplanted murine hemopoietic progenitors between bone marrow and spleen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 9647–9651.
- Park, B., Brinkmann, M.M., Spooner, E., Lee, C.C., Kim, Y.-M., Ploegh, H.L. (2008): Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nat. Immunol.* **9**: 1407–1414.
- Parker, H., Albrett, A.M., Kettle, A.J., Winterbourn, C.C. (2012a): Myeloperoxidase associated with neutrophil extracellular traps is active and mediates bacterial killing in the presence of hydrogen peroxide. *J. Leukoc. Biol.* **91**: 369–376.
- Parker, H., Dragunow, M., Hampton, M.B., Kettle, A.J., Winterbourn, C.C. (2012b): Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *J. Leukoc. Biol.* **92**: 841–849.
- Park-Min, K.-H., Antoniv, T.T., Ivashkiv, L.B. (2005): Regulation of macrophage phenotype by long-term exposure to IL-10. *Immunobiology* **210**: 77–86.
- Patakas, A., Ji, R.-R., Weir, W., Connolly, S.E., Benson, R.A., Nadler, S.G., Brewer, J.M., McInnes, I.B., Garside, P. (2016): Abatacept Inhibition of T Cell Priming in Mice by Induction of a Unique Transcriptional Profile That Reduces Their Ability to Activate Antigen-Presenting Cells. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **68**: 627–638.
- Patel, P.C., Harrison, R.E. (2008): Membrane ruffles capture C3bi-opsonized particles in activated macrophages. *Mol. Biol. Cell* **19**: 4628–4639.
- Pedersen, M., Jacobsen, S., Klarlund, M., Pedersen, B.V., Wiik, A., Wohlfahrt, J., Frisch, M. (2006): Environmental risk factors differ between rheumatoid arthritis with and without auto-antibodies against cyclic citrullinated peptides. *Arthritis Res. Ther.* **8**: R133.
- Peiser, L., Gough, P.J., Kodama, T., Gordon, S. (2000): Macrophage class A scavenger receptor-mediated phagocytosis of *Escherichia coli*: role of cell heterogeneity, microbial strain, and culture conditions in vitro. *Infect. Immun.* **68**: 1953–1963.
- Pérez-Sánchez, C., Ruiz-Limón, P., Aguirre, M.A., Jiménez-Gómez, Y., Arias-de la Rosa, I., Ábalos-Aguilera, M.C., Rodríguez-Ariza, A., Castro-Villegas, M.C., Ortega-Castro, R., Segui, P., Martínez, C., González-Conejero, R., Rodríguez-López, S., González-Reyes, J.A., Villalba, J.M., Collantes-Estévez, E., Escudero, A., Barbarroja, N., López-Pedreira, C. (2017): Diagnostic potential of NETosis-derived products for disease activity, atherosclerosis and therapeutic effectiveness in Rheumatoid Arthritis patients. *J. Autoimmun.* **82**: 31–40.

- Peschken, C.A., Esdaile, J.M. (1999): Rheumatic diseases in North America's indigenous peoples. *Semin. Arthritis Rheum.* **28**: 368–391.
- Peters, C.L., Morris, C.J., Mapp, P.I., Blake, D.R., Lewis, C.E., Winrow, V.R. (2004): The transcription factors hypoxia-inducible factor 1alpha and Ets-1 colocalize in the hypoxic synovium of inflamed joints in adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **50**: 291–296.
- Peterson, P.K., Wilkinson, B.J., Kim, Y., Schmeling, D., Douglas, S.D., Quie, P.G., Verhoef, J. (1978): The key role of peptidoglycan in the opsonization of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.* **61**: 597–609.
- Petretto, A., Bruschi, M., Pratesi, F., Croia, C., Candiano, G., Ghiggeri, G., Migliorini, P. (2019): Neutrophil extracellular traps (NET) induced by different stimuli: A comparative proteomic analysis. *PloS One* **14**: e0218946.
- Phillipson, M., Heit, B., Colarusso, P., Liu, L., Ballantyne, C.M., Kubes, P. (2006): Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J. Exp. Med.* **203**: 2569–2575.
- Phillipson, M., Heit, B., Parsons, S.A., Petri, B., Mullaly, S.C., Colarusso, P., Gower, R.M., Neely, G., Simon, S.I., Kubes, P. (2009): Vav1 is essential for mechanotactic crawling and migration of neutrophils out of the inflamed microvasculature. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **182**: 6870–6878.
- Pietras, E.M., Mirantes-Barbeito, C., Fong, S., Loeffler, D., Kovtonyuk, L.V., Zhang, S., Lakshminarasimhan, R., Chin, C.P., Techner, J.-M., Will, B., Nerlov, C., Steidl, U., Manz, M.G., Schroeder, T., Passegué, E. (2016): Chronic interleukin-1 exposure drives haematopoietic stem cells towards precocious myeloid differentiation at the expense of self-renewal. *Nat. Cell Biol.* **18**: 607–618.
- Pillay, J., Braber, I. den, Vrisekoop, N., Kwast, L.M., Boer, R.J. de, Borghans, J.A.M., Tesselaar, K., Koenderman, L. (2010): In vivo labeling with <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* **116**: 625–627.
- Pillay, J., Kamp, V.M., Hoffen, E. van, Visser, T., Tak, T., Lammers, J.-W., Ulfman, L.H., Leenen, L.P., Pickkers, P., Koenderman, L. (2012): A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J. Clin. Invest.* **122**: 327–336.
- Pilszczek, F.H., Salina, D., Poon, K.K.H., Fahey, C., Yipp, B.G., Sibley, C.D., Robbins, S.M., Green, F.H.Y., Surette, M.G., Sugai, M., Bowden, M.G., Hussain, M., Zhang, K., Kubes, P. (2010): A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**: 7413–7425.
- Plenge, R.M., Padyukov, L., Remmers, E.F., Purcell, S., Lee, A.T., Karlson, E.W., Wolfe, F., Kastner, D.L., Alfredsson, L., Altshuler, D., Gregersen, P.K., Klareskog, L., Rioux, J.D. (2005): Replication of Putative Candidate-Gene Associations with Rheumatoid Arthritis in >4,000 Samples from North America and Sweden: Association of Susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4. *Am. J. Hum. Genet.* **77**: 1044–1060.
- Pohlars, D., Huber, R., Ukena, B., Kinne, R.W. (2006): Expression of platelet-derived growth factors C and D in the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **54**: 788–794.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., Beutler, B. (1998): Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**: 2085–2088.
- Pratesi, F., Dioni, I., Tommasi, C., Alcaro, M.C., Paolini, I., Barbetti, F., Boscaro, F., Panza, F., Puxeddu, I., Rovero, P., Migliorini, P. (2014): Antibodies from patients with rheumatoid arthritis target citrullinated histone 4 contained in neutrophils extracellular traps. *Ann. Rheum. Dis.* **73**: 1414–1422.
- Prevoo, M.L., Hof, M.A. van 't, Kuper, H.H., Leeuwen, M.A. van, Putte, L.B. van de, Riel, P.L. van (1995): Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **38**: 44–48.

Pronk, C.J.H., Rossi, D.J., Månsson, R., Attema, J.L., Norddahl, G.L., Chan, C.K.F., Sigvardsson, M., Weissman, I.L., Bryder, D. (2007): Elucidation of the phenotypic, functional, and molecular topography of a myeloerythroid progenitor cell hierarchy. *Cell Stem Cell* **1**: 428–442.

Puga, I., Cols, M., Barra, C.M., He, B., Cassis, L., Gentile, M., Comerma, L., Chorny, A., Shan, M., Xu, W., Magri, G., Knowles, D.M., Tam, W., Chiu, A., Bussel, J.B., Serrano, S., Lorente, J.A., Bellosillo, B., Lloreta, J., Juanpere, N., Alameda, F., Baró, T., Heredia, C.D. de, Torán, N., Català, A., Torreadell, M., Fortuny, C., Cusí, V., Carreras, C., Diaz, G.A., Blander, J.M., Farber, C.-M., Silvestri, G., Cunningham-Rundles, C., Calvillo, M., Dufour, C., Notarangelo, L.D., Lougaris, V., Plebani, A., Casanova, J.-L., Ganal, S.C., Diefenbach, A., Aróstegui, J.I., Juan, M., Yagüe, J., Mahlaoui, N., Donadieu, J., Chen, K., Cerutti, A. (2011): B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat. Immunol.* **13**: 170–180.

Quetglas, S., Leveque, C., Miquelis, R., Sato, K., Seagar, M. (2000): Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of synaptic SNARE complex assembly via a calmodulin- and phospholipid-binding domain of synaptobrevin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 9695–9700.

Rabinovitch, M. (1995): Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol.* **5**: 85–87.

Radic, M., Pattanaik, D. (2018): Cellular and Molecular Mechanisms of Anti-Phospholipid Syndrome. *Front. Immunol.* **9**: 969.

Radner, H., Lesperance, T., Accortt, N.A., Solomon, D.H. (2017): Incidence and Prevalence of Cardiovascular Risk Factors Among Patients With Rheumatoid Arthritis, Psoriasis, or Psoriatic Arthritis. *Arthritis Care Res.* **69**: 1510–1518.

Ramachandran, P., Pellicoro, A., Vernon, M.A., Boulter, L., Aucott, R.L., Ali, A., Hartland, S.N., Snowdon, V.K., Cappon, A., Gordon-Walker, T.T., Williams, M.J., Dunbar, D.R., Manning, J.R., Rooijen, N. van, Fallowfield, J.A., Forbes, S.J., Iredale, J.P. (2012): Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: E3186–3195.

Ramachandran, V., Williams, M., Yago, T., Schmidtke, D.W., McEver, R.P. (2004): Dynamic alterations of membrane tethers stabilize leukocyte rolling on P-selectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 13519–13524.

Rammensee, H.G. (1996): Antigen Presentation – Recent Developments. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **110**: 299–307.

Rantapää-Dahlqvist, S., Jong, B.A.W. de, Berglin, E., Hallmans, G., Wadell, G., Stenlund, H., Sundin, U., Venrooij, W.J. van (2003): Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **48**: 2741–2749.

Rapetti, L., Chavele, K.-M., Evans, C.M., Ehrenstein, M.R. (2015): B cell resistance to Fas-mediated apoptosis contributes to their ineffective control by regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **74**: 294–302.

Re, F., Mengozzi, M., Muzio, M., Dinarello, C.A., Mantovani, A., Colotta, F. (1993): Expression of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) by human circulating polymorphonuclear cells. *Eur. J. Immunol.* **23**: 570–573.

Reed, E., Jiang, X., Kharlamova, N., Ytterberg, A.J., Catrina, A.I., Israelsson, L., Mathsson-Alm, L., Hansson, M., Alfredsson, L., Rönnelid, J., Lundberg, K. (2016): Antibodies to carbamylated  $\alpha$ -enolase epitopes in rheumatoid arthritis also bind citrullinated epitopes and are largely indistinct from anti-citrullinated protein antibodies. *Arthritis Res. Ther.* **18**: 96.

Reeves, E.P., Lu, H., Jacobs, H.L., Messina, C.G.M., Bolsover, S., Gabella, G., Potma, E.O., Warley, A., Roes, J., Segal, A.W. (2002): Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K<sup>+</sup> flux. *Nature* **416**: 291–297.



- Regan, T., Nally, K., Carmody, R., Houston, A., Shanahan, F., Macsharry, J., Brint, E. (2013): Identification of TLR10 as a key mediator of the inflammatory response to *Listeria monocytogenes* in intestinal epithelial cells and macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **191**: 6084–6092.
- Reid, K.B., Porter, R.R. (1976): Subunit composition and structure of subcomponent C1q of the first component of human complement. *Biochem. J.* **155**: 19–23.
- Reits, E., Griekspoor, A., Neijssen, J., Groothuis, T., Jalink, K., Veelen, P. van, Janssen, H., Calafat, J., Drijfhout, J.W., Neeffjes, J. (2003): Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity* **18**: 97–108.
- Remijnsen, Q., Vanden Berghe, T., Wirawan, E., Asselbergh, B., Parthoens, E., De Rycke, R., Noppen, S., Delforge, M., Willems, J., Vandenabeele, P. (2011): Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res.* **21**: 290–304.
- Remmers, E.F., Plenge, R.M., Lee, A.T., Graham, R.R., Hom, G., Behrens, T.W., Bakker, P.I.W. de, Le, J.M., Lee, H.-S., Batliwalla, F., Li, W., Masters, S.L., Booty, M.G., Carulli, J.P., Padyukov, L., Alfredsson, L., Klareskog, L., Chen, W.V., Amos, C.I., Criswell, L.A., Seldin, M.F., Kastner, D.L., Gregersen, P.K. (2007): STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* **357**: 977–986.
- Ribon, M., Seninet, S., Mussard, J., Sebbag, M., Clavel, C., Serre, G., Boissier, M.-C., Semerano, L., Decker, P. (2019): Neutrophil extracellular traps exert both pro- and anti-inflammatory actions in rheumatoid arthritis that are modulated by c1q and Il-37. *J. Autoimmun.* **98**: 122–131.
- Rice, W.G., Kinkade, J.M., Parmley, R.T. (1986): High resolution of heterogeneity among human neutrophil granules: physical, biochemical, and ultrastructural properties of isolated fractions. *Blood* **68**: 541–555.
- Riley, J.K., Takeda, K., Akira, S., Schreiber, R.D. (1999): Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. *J. Biol. Chem.* **274**: 16513–16521.
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y., Zerial, M. (2005): Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* **122**: 735–749.
- Robinson, J.J., Watson, F., Bucknall, R.C., Edwards, S.W. (1994): Role of Fc gamma receptors in the activation of neutrophils by soluble and insoluble immunoglobulin aggregates isolated from the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **53**: 515–520.
- Roche, P.A., Cresswell, P. (2016): Antigen Processing and Presentation Mechanisms in Myeloid Cells. *Microbiol. Spectr.* **4**.
- Rodriguez, P.C., Ernstoff, M.S., Hernandez, C., Atkins, M., Zabaleta, J., Sierra, R., Ochoa, A.C. (2009): Arginase I-Producing Myeloid-Derived Suppressor Cells in Renal Cell Carcinoma Are a Subpopulation of Activated Granulocytes. *Cancer Res.* **69**: 1553–1560.
- Romero, V., Fert-Bober, J., Nigrovic, P.A., Darrach, E., Haque, U.J., Lee, D.M., Eyk, J. van, Rosen, A., Andrade, F. (2013): Immune-mediated pore-forming pathways induce cellular hypercitrullination and generate citrullinated autoantigens in rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.* **5**: 209ra150.
- Rørvig, S., Østergaard, O., Heegaard, N.H.H., Borregaard, N. (2013): Proteome profiling of human neutrophil granule subsets, secretory vesicles, and cell membrane: correlation with transcriptome profiling of neutrophil precursors. *J. Leukoc. Biol.* **94**: 711–721.
- Rose, S., Misharin, A., Perlman, H. (2012): A novel Ly6C/Ly6G-based strategy to analyze the mouse splenic myeloid compartment. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* **81**: 343–350.
- Rosen, H., Klebanoff, S.J., Wang, Y., Brot, N., Heinecke, J.W., Fu, X. (2009): Methionine oxidation contributes to bacterial killing by the myeloperoxidase system of neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 18686–18691.

- Rosloniec, E.F., Brand, D.D., Myers, L.K., Esaki, Y., Whittington, K.B., Zaller, D.M., Woods, A., Stuart, J.M., Kang, A.H. (1998): Induction of autoimmune arthritis in HLA-DR4 (DRB1\*0401) transgenic mice by immunization with human and bovine type II collagen. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **160**: 2573–2578.
- Rosmarin, A.G., Yang, Z., Resendes, K.K. (2005): Transcriptional regulation in myelopoiesis: Hematopoietic fate choice, myeloid differentiation, and leukemogenesis. *Exp. Hematol.* **33**: 131–143.
- Rossol, M., Kraus, S., Pierer, M., Baerwald, C., Wagner, U. (2012): The CD14(bright) CD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis Rheum.* **64**: 671–677.
- Ruckes, T., Saul, D., Van Snick, J., Hermine, O., Grassmann, R. (2001): Autocrine antiapoptotic stimulation of cultured adult T-cell leukemia cells by overexpression of the chemokine I-309. *Blood* **98**: 1150–1159.
- Russo, R.C., Garcia, C.C., Teixeira, M.M., Amaral, F.A. (2014): The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **10**: 593–619.
- Rutschman, R., Lang, R., Hesse, M., Ihle, J.N., Wynn, T.A., Murray, P.J. (2001): Cutting edge: Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **166**: 2173–2177.
- Ryan, M.H., Petrone, D., Nemeth, J.F., Barnathan, E., Björck, L., Jordan, R.E. (2008): Proteolysis of purified IgGs by human and bacterial enzymes in vitro and the detection of specific proteolytic fragments of endogenous IgG in rheumatoid synovial fluid. *Mol. Immunol.* **45**: 1837–1846.
- Sahoo, M., Del Barrio, L., Miller, M.A., Re, F. (2014): Neutrophil elastase causes tissue damage that decreases host tolerance to lung infection with burkholderia species. *PLoS Pathog.* **10**: e1004327.
- Saitoh, T., Komano, J., Saitoh, Y., Misawa, T., Takahama, M., Kozaki, T., Uehata, T., Iwasaki, H., Omori, H., Yamaoka, S., Yamamoto, N., Akira, S. (2012): Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe* **12**: 109–116.
- Sakai, J., Li, J., Subramanian, K.K., Mondal, S., Bajrami, B., Hattori, H., Jia, Y., Dickinson, B.C., Zhong, J., Ye, K., Chang, C.J., Ho, Y.-S., Zhou, J., Luo, H.R. (2012): Reactive oxygen species-induced actin glutathionylation controls actin dynamics in neutrophils. *Immunity* **37**: 1037–1049.
- Saklatvala, J. (1986): Tumour necrosis factor alpha stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage. *Nature* **322**: 547–549.
- Sanderson, F., Kleijmeer, M.J., Kelly, A., Verwoerd, D., Tulp, A., Neefjes, J.J., Geuze, H.J., Trowsdale, J. (1994): Accumulation of HLA-DM, a regulator of antigen presentation, in MHC class II compartments. *Science* **266**: 1566–1569.
- Sangaletti, S., Tripodo, C., Chiodoni, C., Guarnotta, C., Cappetti, B., Casalini, P., Piconese, S., Parenza, M., Guiducci, C., Vitali, C., Colombo, M.P. (2012): Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity. *Blood* **120**: 3007–3018.
- Santinon, F., Batignes, M., Mebrek, M.L., Biton, J., Clavel, G., Hervé, R., Lemeiter, D., Breckler, M., Busato, F., Tost, J., Zioli, M., Boissier, M.-C., Decker, P., Semerano, L., Bessis, N. (2020): Involvement of Tumor Necrosis Factor Receptor Type II in FoxP3 Stability and as a Marker of Treg Cells Specifically Expanded by Anti-Tumor Necrosis Factor Treatments in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **72**: 576–587.
- Santos, L.L., Morand, E.F. (2006): The role of macrophage migration inhibitory factor in the inflammatory immune response and rheumatoid arthritis. *Wien. Med. Wochenschr.* 1946 **156**: 11–18.
- Sarris, M., Masson, J.-B., Maurin, D., Van der Aa, L.M., Boudinot, P., Lortat-Jacob, H., Herbomel, P. (2012): Inflammatory chemokines direct and restrict leukocyte migration within live tissues as glycan-bound gradients. *Curr. Biol. CB* **22**: 2375–2382.

- Saveanu, L., Carroll, O., Lindo, V., Del Val, M., Lopez, D., Lepelletier, Y., Greer, F., Schomburg, L., Fruci, D., Niedermann, G., Endert, P.M. van (2005): Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nat. Immunol.* **6**: 689–697.
- Saverymuttu, S.H., Peters, A.M., Keshavarzian, A., Reavy, H.J., Lavender, J.P. (1985): The kinetics of <sup>111</sup>Indium distribution following injection of <sup>111</sup>Indium labelled autologous granulocytes in man. *Br. J. Haematol.* **61**: 675–685.
- Savill, J.S., Wyllie, A.H., Henson, J.E., Walport, M.J., Henson, P.M., Haslett, C. (1989): Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J. Clin. Invest.* **83**: 865–875.
- Scally, S.W., Petersen, J., Law, S.C., Dudek, N.L., Nel, H.J., Loh, K.L., Wijeyewickrema, L.C., Eckle, S.B.G., Heemst, J. van, Pike, R.N., McCluskey, J., Toes, R.E., La Gruta, N.L., Purcell, A.W., Reid, H.H., Thomas, R., Rossjohn, J. (2013): A molecular basis for the association of the HLA-DRB1 locus, citrullination, and rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* **210**: 2569–2582.
- Scapini, P., Calzetti, F., Cassatella, M.A. (1999): On the detection of neutrophil-derived vascular endothelial growth factor (VEGF). *J. Immunol. Methods* **232**: 121–129.
- Schaer, C.A., Schoedon, G., Imhof, A., Kurrer, M.O., Schaer, D.J. (2006): Constitutive endocytosis of CD163 mediates hemoglobin-heme uptake and determines the noninflammatory and protective transcriptional response of macrophages to hemoglobin. *Circ. Res.* **99**: 943–950.
- Schauer, C., Janko, C., Munoz, L.E., Zhao, Y., Kienhöfer, D., Frey, B., Lell, M., Manger, B., Rech, J., Naschberger, E., Holmdahl, R., Krenn, V., Harrer, T., Jeremic, I., Bilyy, R., Schett, G., Hoffmann, M., Herrmann, M. (2014): Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat. Med.* **20**: 511–517.
- Schellekens, G.A., Jong, B.A. de, Hoogen, F.H. van den, Putte, L.B. van de, Venrooij, W.J. van (1998): Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J. Clin. Invest.* **101**: 273–281.
- Schiwon, M., Weisheit, C., Franken, L., Gutweiler, S., Dixit, A., Meyer-Schwesinger, C., Pohl, J.-M., Maurice, N.J., Thiebes, S., Lorenz, K., Quast, T., Fuhrmann, M., Baumgarten, G., Lohse, M.J., Opdenakker, G., Bernhagen, J., Bucala, R., Panzer, U., Kolanus, W., Gröne, H.-J., Garbi, N., Kastenmüller, W., Knolle, P.A., Kurts, C., Engel, D.R. (2014): Crosstalk between sentinel and helper macrophages permits neutrophil migration into infected uroepithelium. *Cell* **156**: 456–468.
- Schlam, D., Bagshaw, R.D., Freeman, S.A., Collins, R.F., Pawson, T., Fairn, G.D., Grinstein, S. (2015): Phosphoinositide 3-kinase enables phagocytosis of large particles by terminating actin assembly through Rac/Cdc42 GTPase-activating proteins. *Nat. Commun.* **6**: 8623.
- Schliehe, C., Redaelli, C., Engelhardt, S., Fehlings, M., Mueller, M., Rooijen, N. van, Thiry, M., Hildner, K., Weller, H., Groettrup, M. (2011): CD8- dendritic cells and macrophages cross-present poly(D,L-lactate-co-glycolate) acid microsphere-encapsulated antigen in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **187**: 2112–2121.
- Schmid, D., Pypaert, M., Münz, C. (2007): Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity* **26**: 79–92.
- Schmitter, T., Agerer, F., Peterson, L., Munzner, P., Hauck, C.R. (2004): Granulocyte CEACAM3 is a phagocytic receptor of the innate immune system that mediates recognition and elimination of human-specific pathogens. *J. Exp. Med.* **199**: 35–46.
- Schubert, U., Antón, L.C., Gibbs, J., Norbury, C.C., Yewdell, J.W., Bennink, J.R. (2000): Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* **404**: 770–774.
- Schulz, C., Gomez Perdiguero, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S.E.W., Pollard, J.W., Frampton, J., Liu, K.J., Geissmann, F. (2012): A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* **336**: 86–90.

- Schwab, J.M., Chiang, N., Arita, M., Serhan, C.N. (2007): Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature* **447**: 869–874.
- Scott, C.L., Zheng, F., De Baetselier, P., Martens, L., Saeys, Y., De Prijck, S., Lippens, S., Abels, C., Schoonooghe, S., Raes, G., Devoogdt, N., Lambrecht, B.N., Beschijn, A., Guillemins, M. (2016): Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells. *Nat. Commun.* **7**: 10321.
- Segal, A.W., Dorling, J., Coade, S. (1980): Kinetics of fusion of the cytoplasmic granules with phagocytic vacuoles in human polymorphonuclear leukocytes. *Biochemical and morphological studies. J. Cell Biol.* **85**: 42–59.
- Segal, A.W., Geisow, M., Garcia, R., Harper, A., Miller, R. (1981): The respiratory burst of phagocytic cells is associated with a rise in vacuolar pH. *Nature* **290**: 406–409.
- Semerad, C.L., Christopher, M.J., Liu, F., Short, B., Simmons, P.J., Winkler, I., Levesque, J.-P., Chappel, J., Ross, F.P., Link, D.C. (2005): G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood* **106**: 3020–3027.
- Semerad, C.L., Liu, F., Gregory, A.D., Stumpf, K., Link, D.C. (2002): G-CSF Is an Essential Regulator of Neutrophil Trafficking from the Bone Marrow to the Blood. *Immunity* **17**: 413–423.
- Sengeløv, H., Boulay, F., Kjeldsen, L., Borregaard, N. (1994a): Subcellular localization and translocation of the receptor for N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils. *Biochem. J.* **299 ( Pt 2)**: 473–479.
- Sengeløv, H., Kjeldsen, L., Borregaard, N. (1993): Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **150**: 1535–1543.
- Sengeløv, H., Kjeldsen, L., Diamond, M.S., Springer, T.A., Borregaard, N. (1993): Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **92**: 1467–1476.
- Sengeløv, H., Kjeldsen, L., Kroeze, W., Berger, M., Borregaard, N. (1994b): Secretory vesicles are the intracellular reservoir of complement receptor 1 in human neutrophils. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **153**: 804–810.
- Serhan, C.N., Chiang, N., Van Dyke, T.E. (2008): Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol.* **8**: 349–361.
- Shao, B., Tang, C., Heinecke, J.W., Oram, J.F. (2010): Oxidation of apolipoprotein A-I by myeloperoxidase impairs the initial interactions with ABCA1 required for signaling and cholesterol export. *J. Lipid Res.* **51**: 1849–1858.
- Shattil, S.J., Kim, C., Ginsberg, M.H. (2010): The final steps of integrin activation: the end game. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**: 288–300.
- Shearer, J.D., Richards, J.R., Mills, C.D., Caldwell, M.D. (1997): Differential regulation of macrophage arginine metabolism: a proposed role in wound healing. *Am. J. Physiol.* **272**: E181-190.
- Shi, J., Gilbert, G.E., Kokubo, Y., Ohashi, T. (2001): Role of the liver in regulating numbers of circulating neutrophils. *Blood* **98**: 1226–1230.
- Shi, J., Knevel, R., Suwannalai, P., Linden, M.P. van der, Janssen, G.M.C., Veelen, P.A. van, Levarht, N.E.W., Helm-van Mil, A.H.M. van der, Cerami, A., Huizinga, T.W.J., Toes, R.E.M., Trouw, L.A. (2011): Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 17372–17377.
- Shi, J., Stadt, L.A. van de, Levarht, E.W.N., Huizinga, T.W.J., Hamann, D., Schaardenburg, D. van, Toes, R.E.M., Trouw, L.A. (2014): Anti-carbamylated protein (anti-CarP) antibodies precede the onset of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **73**: 780–783.
- Shinde, R., McGaha, T.L. (2018): The Aryl Hydrocarbon Receptor: Connecting Immunity to the Microenvironment. *Trends Immunol.* **39**: 1005–1020.

Shirey, K.A., Pletneva, L.M., Puche, A.C., Keegan, A.D., Prince, G.A., Blanco, J.C.G., Vogel, S.N. (2010): Control of RSV-induced lung injury by alternatively activated macrophages is IL-4R alpha-, TLR4-, and IFN-beta-dependent. *Mucosal Immunol.* **3**: 291–300.

Sidney, J., Becart, S., Zhou, M., Duffy, K., Lindvall, M., Moore, E.C., Moore, E.L., Rao, T., Rao, N., Nielsen, M., Peters, B., Sette, A. (2017): Citrullination only infrequently impacts peptide binding to HLA class II MHC. *PLoS One* **12**: e0177140.

Silman, A.J., Newman, J., MacGregor, A.J. (1996): Cigarette smoking increases the risk of rheumatoid arthritis. Results from a nationwide study of disease-discordant twins. *Arthritis Rheum.* **39**: 732–735.

Sironi, M., Martinez, F.O., D'Ambrosio, D., Gattorno, M., Polentarutti, N., Locati, M., Gregorio, A., Iellem, A., Cassatella, M.A., Van Damme, J., Sozzani, S., Martini, A., Sinigaglia, F., Vecchi, A., Mantovani, A. (2006): Differential regulation of chemokine production by Fcγ receptor engagement in human monocytes: association of CCL1 with a distinct form of M2 monocyte activation (M2b, Type 2). *J. Leukoc. Biol.* **80**: 342–349.

Sjoelund, V., Smelkinson, M., Nita-Lazar, A. (2014): Phosphoproteome profiling of the macrophage response to different toll-like receptor ligands identifies differences in global phosphorylation dynamics. *J. Proteome Res.* **13**: 5185–5197.

Sjöholm, A.G., Berglund, K., Johnson, U., Laurell, A.B., Sturfelt, G. (1986): C1 activation, with C1q in excess of functional C1 in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **79**: 113–119.

Skiljevic, D., Jeremic, I., Nikolic, M., Andrejevic, S., Sefik-Bukilica, M., Stojimirovic, B., Bonaci-Nikolic, B. (2013): Serum DNase I activity in systemic lupus erythematosus: correlation with immunoserological markers, the disease activity and organ involvement. *Clin. Chem. Lab. Med.* **51**: 1083–1091.

Smolen, J.S., Aletaha, D., McInnes, I.B. (2016): Rheumatoid arthritis. *The Lancet* **388**: 2023–2038.

Smolen, J.S., Breedveld, F.C., Schiff, M.H., Kalden, J.R., Emery, P., Eberl, G., Riel, P.L. van, Tugwell, P. (2003): A simplified disease activity index for rheumatoid arthritis for use in clinical practice. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **42**: 244–257.

Smolen, J.S., Emery, P., Ferraccioli, G.F., Samborski, W., Berenbaum, F., Davies, O.R., Koetse, W., Purcaru, O., Bennett, B., Burkhardt, H. (2015): Certolizumab pegol in rheumatoid arthritis patients with low to moderate activity: the CERTAIN double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Ann. Rheum. Dis.* **74**: 843–850.

Smolen, J.S., Landewé, R., Breedveld, F.C., Buch, M., Burmester, G., Dougados, M., Emery, P., Gaujoux-Viala, C., Gossec, L., Nam, J., Ramiro, S., Winthrop, K., Wit, M. de, Aletaha, D., Betteridge, N., Bijlsma, J.W.J., Boers, M., Buttgerit, F., Combe, B., Cutolo, M., Damjanov, N., Hazes, J.M.W., Kouloumas, M., Kvien, T.K., Mariette, X., Pavelka, K., Riel, P.L.C.M. van, Rubbert-Roth, A., Scholte-Voshaar, M., Scott, D.L., Sokka-Isler, T., Wong, J.B., Heijde, D. van der (2014): EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Ann. Rheum. Dis.* **73**: 492–509.

Söderberg, D., Kurz, T., Motamedi, A., Hellmark, T., Eriksson, P., Segelmark, M. (2015): Increased levels of neutrophil extracellular trap remnants in the circulation of patients with small vessel vasculitis, but an inverse correlation to anti-neutrophil cytoplasmic antibodies during remission. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **54**: 2085–2094.

Söderberg, D., Segelmark, M. (2016): Neutrophil Extracellular Traps in ANCA-Associated Vasculitis. *Front. Immunol.* **7**: 256.

Soehnlein, O., Lindbom, L. (2010): Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **10**: 427–439.

Sokka, T., Toloza, S., Cutolo, M., Kautiainen, H., Makinen, H., Gogus, F., Skakic, V., Badsha, H., Peets, T., Baranauskaitė, A., Géher, P., Ujfalussy, I., Skopouli, F.N., Mavrommati, M., Alten, R., Pohl, C., Sibilia, J., Stancati, A., Salaffi, F., Romanowski, W., Zarowny-Wierzbinska, D., Henrohn, D., Bresnihan, B., Minnock, P., Knudsen, L.S., Jacobs, J.W., Calvo-Alen, J., Lazovskis, J., Pinheiro, G. da R.C., Karateev, D., Andersone, D.,

Rexhepi, S., Yazici, Y., Pincus, T., QUEST-RA Group (2009): Women, men, and rheumatoid arthritis: analyses of disease activity, disease characteristics, and treatments in the QUEST-RA study. *Arthritis Res. Ther.* **11**: R7.

Sokolove, J., Johnson, D.S., Lahey, L.J., Wagner, C.A., Cheng, D., Thiele, G.M., Michaud, K., Sayles, H., Reimold, A.M., Caplan, L., Cannon, G.W., Kerr, G., Mikuls, T.R., Robinson, W.H. (2014): Rheumatoid factor as a potentiator of anti-citrullinated protein antibody-mediated inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **66**: 813–821.

Sokolove, J., Wagner, C.A., Lahey, L.J., Sayles, H., Duryee, M.J., Reimold, A.M., Kerr, G., Robinson, W.H., Cannon, G.W., Thiele, G.M., Mikuls, T.R. (2016): Increased inflammation and disease activity among current cigarette smokers with rheumatoid arthritis: a cross-sectional analysis of US veterans. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **55**: 1969–1977.

Sollberger, G., Choidas, A., Burn, G.L., Habenberger, P., Di Lucrezia, R., Kordes, S., Menninger, S., Eickhoff, J., Nussbaumer, P., Klebl, B., Krüger, R., Herzig, A., Zychlinsky, A. (2018): Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps. *Sci. Immunol.* **3**: eaar6689.

Song, E., Ouyang, N., Hörbelt, M., Antus, B., Wang, M., Exton, M.S. (2000): Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cell. Immunol.* **204**: 19–28.

Spangrude, G.J., Heimfeld, S., Weissman, I.L. (1988): Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* **241**: 58–62.

Sparks, J.A., Chang, S.-C., Deane, K.D., Gan, R.W., Kristen Demoruelle, M., Feser, M.L., Moss, L., Buckner, J.H., Keating, R.M., Costenbader, K.H., Gregersen, P.K., Weisman, M.H., Mikuls, T.R., O'Dell, J.R., Michael Holers, V., Norris, J.M., Karlson, E.W. (2016): Associations of Smoking and Age With Inflammatory Joint Signs Among Unaffected First-Degree Relatives of Rheumatoid Arthritis Patients: Results From Studies of the Etiology of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **68**: 1828–1838.

Spengler, J., Lugonja, B., Jimmy Ytterberg, A., Zubarev, R.A., Creese, A.J., Pearson, M.J., Grant, M.M., Milward, M., Lundberg, K., Buckley, C.D., Filer, A., Raza, K., Cooper, P.R., Chapple, I.L., Scheel-Toellner, D. (2015): Release of Active Peptidyl Arginine Deiminases by Neutrophils Can Explain Production of Extracellular Citrullinated Autoantigens in Rheumatoid Arthritis Synovial Fluid: ENZYMATICALLY ACTIVE PADs AND AUTOANTIGEN PRODUCTION IN RA SF. *Arthritis Rheumatol.* **67**: 3135–3145.

Spinetti, G., Bernardini, G., Camarda, G., Mangoni, A., Santoni, A., Capogrossi, M.C., Napolitano, M. (2003): The chemokine receptor CCR8 mediates rescue from dexamethasone-induced apoptosis via an ERK-dependent pathway. *J. Leukoc. Biol.* **73**: 201–207.

Spronk, P.E., Bootsma, H., Horst, G., Huitema, M.G., Limburg, P.C., Tervaert, J.W., Kallenberg, C.G. (1996): Antineutrophil cytoplasmic antibodies in systemic lupus erythematosus. *Br. J. Rheumatol.* **35**: 625–631.

Staali, L., Monteil, H., Colin, D.A. (1998): The staphylococcal pore-forming leukotoxins open Ca<sup>2+</sup> channels in the membrane of human polymorphonuclear neutrophils. *J. Membr. Biol.* **162**: 209–216.

Stahl, E.A., Raychaudhuri, S., Remmers, E.F., Xie, G., Eyre, S., Thomson, B.P., Li, Y., Kurreeman, F.A.S., Zhenakova, A., Hinks, A., Guiducci, C., Chen, R., Alfredsson, L., Amos, C.I., Ardlie, K.G., BIRAC Consortium, Barton, A., Bowes, J., Brouwer, E., Burtt, N.P., Catanese, J.J., Coblyn, J., Coenen, M.J.H., Costenbader, K.H., Criswell, L.A., Crusius, J.B.A., Cui, J., Bakker, P.I.W. de, De Jager, P.L., Ding, B., Emery, P., Flynn, E., Harrison, P., Hocking, L.J., Huizinga, T.W.J., Kastner, D.L., Ke, X., Lee, A.T., Liu, X., Martin, P., Morgan, A.W., Padyukov, L., Posthumus, M.D., Radstake, T.R.D.J., Reid, D.M., Seielstad, M., Seldin, M.F., Shadick, N.A., Steer, S., Tak, P.P., Thomson, W., Helm-van Mil, A.H.M. van der, Horst-Bruinsma, I.E. van der, Schoot, C.E. van der, Riel, P.L.C.M. van, Weinblatt, M.E., Wilson, A.G., Wolbink, G.J., Wordsworth, B.P., YEAR Consortium, Wijmenga, C., Karlson, E.W., Toes, R.E.M., Vries, N. de, Begovich, A.B., Worthington, J., Siminovitch, K.A., Gregersen, P.K., Klareskog, L., Plenge, R.M. (2010): Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat. Genet.* **42**: 508–514.

Stanley, E., Lieschke, G.J., Grail, D., Metcalf, D., Hodgson, G., Gall, J.A., Maher, D.W., Cebon, J., Sinickas, V., Dunn, A.R. (1994): Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 5592–5596.

- Stastny, P. (1978): Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* **298**: 869–871.
- Stein, M., Keshav, S., Harris, N., Gordon, S. (1992): Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.* **176**: 287–292.
- Steinberg, B.E., Grinstein, S. (2007): Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* **2007**: pe11.
- Stojkov, D., Amini, P., Oberson, K., Sokollik, C., Duppenhaller, A., Simon, H.-U., Yousefi, S. (2017): ROS and glutathionylation balance cytoskeletal dynamics in neutrophil extracellular trap formation. *J. Cell Biol.* **216**: 4073–4090.
- Stolt, P., Bengtsson, C., Nordmark, B., Lindblad, S., Lundberg, I., Klareskog, L., Alfredsson, L., EIRA study group (2003): Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: results from a population based case-control study, using incident cases. *Ann. Rheum. Dis.* **62**: 835–841.
- Stolt, P., Källberg, H., Lundberg, I., Sjögren, B., Klareskog, L., Alfredsson, L., EIRA study group (2005): Silica exposure is associated with increased risk of developing rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA study. *Ann. Rheum. Dis.* **64**: 582–586.
- Stremmel, C., Schuchert, R., Wagner, F., Thaler, R., Weinberger, T., Pick, R., Mass, E., Ishikawa-Ankerhold, H.C., Margraf, A., Hutter, S., Vagnozzi, R., Klapproth, S., Frampton, J., Yona, S., Scheiermann, C., Molkenin, J.D., Jeschke, U., Moser, M., Sperandio, M., Massberg, S., Geissmann, F., Schulz, C. (2018): Yolk sac macrophage progenitors traffic to the embryo during defined stages of development. *Nat. Commun.* **9**: 75.
- Stuart, G.R., Lynch, N.J., Day, A.J., Schwaeble, W.J., Sim, R.B. (1997): The C1q and collectin binding site within C1q receptor (cell surface calreticulin). *Immunopharmacology* **38**: 73–80.
- 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.
- Subramanian, B.C., Majumdar, R., Parent, C.A. (2017): The role of the LTB4-BLT1 axis in chemotactic gradient sensing and directed leukocyte migration. *Semin. Immunol.* **33**: 16–29.
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., Nagasawa, T. (2006): Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* **25**: 977–988.
- Sun, D., Raisley, B., Langer, M., Iyer, J.K., Vedham, V., Ballard, J.L., James, J.A., Metcalf, J., Coggeshall, K.M. (2012): Anti-peptidoglycan antibodies and Fcγ receptors are the key mediators of inflammation in Gram-positive sepsis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **189**: 2423–2431.
- Sunahori, K., Yamamura, M., Yamana, J., Takasugi, K., Kawashima, M., Makino, H. (2006): Increased expression of receptor for advanced glycation end products by synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **54**: 97–104.
- Suratt, B.T., Petty, J.M., Young, S.K., Malcolm, K.C., Lieber, J.G., Nick, J.A., Gonzalo, J.-A., Henson, P.M., Worthen, G.S. (2004): Role of the CXCR4/SDF-1 chemokine axis in circulating neutrophil homeostasis. *Blood* **104**: 565–571.
- Suratt, B.T., Young, S.K., Lieber, J., Nick, J.A., Henson, P.M., Worthen, G.S. (2001): Neutrophil maturation and activation determine anatomic site of clearance from circulation. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **281**: L913-921.
- Suzuki, A., Yamada, R., Chang, X., Tokuhira, S., Sawada, T., Suzuki, M., Nagasaki, M., Nakayama-Hamada, M., Kawaida, R., Ono, M., Ohtsuki, M., Furukawa, H., Yoshino, S., Yukioka, M., Tohma, S., Matsubara, T., Wakitani, S., Teshima, R., Nishioka, Y., Sekine, A., Iida, A., Takahashi, A., Tsunoda, T., Nakamura, Y., Yamamoto, K. (2003): Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.* **34**: 395–402.

- Svendsen, A.J., Gervin, K., Lyle, R., Christiansen, L., Kyvik, K., Junker, P., Nielsen, C., Houen, G., Tan, Q. (2016): Differentially Methylated DNA Regions in Monozygotic Twin Pairs Discordant for Rheumatoid Arthritis: An Epigenome-Wide Study. *Front. Immunol.* **7**: 510.
- 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.
- Szekanecz, Z., Gáspár, L., Koch, A.E. (2005): Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **10**: 1739–1753.
- Szekanecz, Z., Koch, A.E. (2007): Macrophages and their products in rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **19**: 289–295.
- Szodoray, P., Alex, P., Frank, M.B., Turner, M., Turner, S., Knowlton, N., Cadwell, C., Dozmorov, I., Tang, Y., Wilson, P.C., Jonsson, R., Centola, M. (2006): A genome-scale assessment of peripheral blood B-cell molecular homeostasis in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **45**: 1466–1476.
- Tagliani, E., Shi, C., Nancy, P., Tay, C.-S., Pamer, E.G., Erlebacher, A. (2011): Coordinate regulation of tissue macrophage and dendritic cell population dynamics by CSF-1. *J. Exp. Med.* **208**: 1901–1916.
- Takai, T., Li, M., Sylvestre, D., Clynes, R., Ravetch, J.V. (1994): FcR gamma chain deletion results in pleiotropic effector cell defects. *Cell* **76**: 519–529.
- Takayanagi, H., Iizuka, H., Juji, T., Nakagawa, T., Yamamoto, A., Miyazaki, T., Koshihara, Y., Oda, H., Nakamura, K., Tanaka, S. (2000): Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **43**: 259–269.
- Takemura, N., Kawasaki, T., Kunisawa, J., Sato, S., Lamichhane, A., Kobiyama, K., Aoshi, T., Ito, J., Mizuguchi, K., Karuppuchamy, T., Matsunaga, K., Miyatake, S., Mori, N., Tsujimura, T., Satoh, T., Kumagai, Y., Kawai, T., Standley, D.M., Ishii, K.J., Kiyono, H., Akira, S., Uematsu, S. (2014): Blockade of TLR3 protects mice from lethal radiation-induced gastrointestinal syndrome. *Nat. Commun.* **5**: 3492.
- Takemura, S., Klimiuk, P.A., Braun, A., Goronzy, J.J., Weyand, C.M. (2001): T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **167**: 4710–4718.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Akira, S. (2000): Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **165**: 5392–5396.
- Takeuchi, O., Kawai, T., Mühlradt, P.F., Morr, M., Radolf, J.D., Zychlinsky, A., Takeda, K., Akira, S. (2001): Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int. Immunol.* **13**: 933–940.
- Takizawa, Y., Suzuki, A., Sawada, T., Ohsaka, M., Inoue, T., Yamada, R., Yamamoto, K. (2006): Citrullinated fibrinogen detected as a soluble citrullinated autoantigen in rheumatoid arthritis synovial fluids. *Ann. Rheum. Dis.* **65**: 1013–1020.
- Talbot, J., Bianchini, F.J., Nascimento, D.C., Oliveira, R.D.R., Souto, F.O., Pinto, L.G., Peres, R.S., Silva, J.R., Almeida, S.C.L., Louzada-Junior, P., Cunha, T.M., Cunha, F.Q., Alves-Filho, J.C. (2015): CCR2 Expression in Neutrophils Plays a Critical Role in Their Migration Into the Joints in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **67**: 1751–1759.
- Tamassia, N., Arruda-Silva, F., Wright, H.L., Moots, R.J., Gardiman, E., Bianchetto-Aguilera, F., Gasperini, S., Capone, M., Maggi, L., Annunziato, F., Edwards, S.W., Cassatella, M.A. (2019): Human neutrophils activated via TLR8 promote Th17 polarization through IL-23. *J. Leukoc. Biol.* **105**: 1155–1165.
- Tamura, T., Udagawa, N., Takahashi, N., Miyaura, C., Tanaka, S., Yamada, Y., Koishihara, Y., Ohsugi, Y., Kumaki, K., Taga, T. (1993): Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**: 11924–11928.



- Tanaka, D., Kagari, T., Doi, H., Shimozato, T. (2007): Administration of anti-type II collagen antibody sustains footpad swelling of mice caused by a delayed-type hypersensitivity reaction and induces severe arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* **148**: 360–367.
- Tanimoto, K., Cooper, N.R., Johnson, J.S., Vaughan, J.H. (1975): Complement fixation by rheumatoid factor. *J. Clin. Invest.* **55**: 437–445.
- Tapper, H., Furuya, W., Grinstein, S. (2002): Localized exocytosis of primary (lysosomal) granules during phagocytosis: role of Ca<sup>2+</sup>-dependent tyrosine phosphorylation and microtubules. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **168**: 5287–5296.
- Tatsiy, O., McDonald, P.P. (2018): Physiological Stimuli Induce PAD4-Dependent, ROS-Independent NETosis, With Early and Late Events Controlled by Discrete Signaling Pathways. *Front. Immunol.* **9**: 2036.
- Teti, G., Biondo, C., Beninati, C. (2016): The Phagocyte, Metchnikoff, and the Foundation of Immunology. *Microbiol. Spectr.* **4**.
- Thålin, C., Daleskog, M., Göransson, S.P., Schatzberg, D., Lasselin, J., Laska, A.-C., Kallner, A., Helleday, T., Wallén, H., Demers, M. (2017): Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of citrullinated histone H3 as a marker for neutrophil extracellular traps in human plasma. *Immunol. Res.* **65**: 706–712.
- Thomas, R., McIlraith, M., Davis, L.S., Lipsky, P.E. (1992): Rheumatoid synovium is enriched in CD45RBdim mature memory T cells that are potent helpers for B cell differentiation. *Arthritis Rheum.* **35**: 1455–1465.
- 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.
- Tillack, K., Naegele, M., Haueis, C., Schippling, S., Wandinger, K.-P., Martin, R., Sospedra, M. (2013): Gender differences in circulating levels of neutrophil extracellular traps in serum of multiple sclerosis patients. *J. Neuroimmunol.* **261**: 108–119.
- Ting, Y.T., Petersen, J., Ramarathinam, S.H., Scally, S.W., Loh, K.L., Thomas, R., Suri, A., Baker, D.G., Purcell, A.W., Reid, H.H., Rossjohn, J. (2018): The interplay between citrullination and HLA-DRB1 polymorphism in shaping peptide binding hierarchies in rheumatoid arthritis. *J. Biol. Chem.* **293**: 3236–3251.
- Tjelle, T.E., Saigal, B., Froystad, M., Berg, T. (1998): Degradation of phagosomal components in late endocytic organelles. *J. Cell Sci.* **111 (Pt 1)**: 141–148.
- Too, C.L., Muhamad, N.A., Ilar, A., Padyukov, L., Alfredsson, L., Klareskog, L., Murad, S., Bengtsson, C., MyEIRA Study Group (2016): Occupational exposure to textile dust increases the risk of rheumatoid arthritis: results from a Malaysian population-based case-control study. *Ann. Rheum. Dis.* **75**: 997–1002.
- Tran, C.N., Davis, M.J., Tesmer, L.A., Endres, J.L., Motyl, C.D., Smuda, C., Somers, E.C., Chung, K.C., Urquhart, A.G., Lundy, S.K., Kovats, S., Fox, D.A. (2007): Presentation of arthritogenic peptide to antigen-specific T cells by fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Rheum.* **56**: 1497–1506.
- Trinder, P.K., Maeurer, M.J., Brackertz, D., Loos, M. (1996): The collagen-like component of the complement system, C1q, is recognized by 7 S autoantibodies and is functionally impaired in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *Immunology* **87**: 355–361.
- Trinder, P.K.E., Maeurer, M.J., Stoerkel, S.S., Loos, M. (1997): Altered (Oxidized) C1q Induces a Rheumatoid Arthritis-like Destructive and Chronic Inflammation in Joint Structures in Arthritis-Susceptible Rats. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **82**: 149–156.
- Trouw, L.A., Daha, N., Kurreeman, F. a. S., Böhringer, S., Goulielmos, G.N., Westra, H.J., Zhernakova, A., Franke, L., Stahl, E.A., Levarht, E.W.N., Stoeken-Rijsbergen, G., Verduijn, W., Roos, A., Li, Y., Houwing-

- Duistermaat, J.J., Huizinga, T.W.J., Toes, R.E.M. (2013): Genetic variants in the region of the C1q genes are associated with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* **173**: 76–83.
- Trouw, L.A., Haisma, E.M., Levarht, E.W.N., Woude, D. van der, Ioan-Facsinay, A., Daha, M.R., Huizinga, T.W.J., Toes, R.E. (2009): Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies from rheumatoid arthritis patients activate complement via both the classical and alternative pathways. *Arthritis Rheum.* **60**: 1923–1931.
- Tsokos, G.C. (2011): Systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* **365**: 2110–2121.
- Tuomi, T., Heliövaara, M., Palosuo, T., Aho, K. (1990): Smoking, lung function, and rheumatoid factors. *Ann. Rheum. Dis.* **49**: 753–756.
- Turner, J., Cho, Y., Dinh, N.N., Waring, A.J., Lehrer, R.I. (1998): Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 2206–2214.
- Turunen, S., Hannonen, P., Koivula, M.-K., Risteli, L., Risteli, J. (2015): Separate and overlapping specificities in rheumatoid arthritis antibodies binding to citrulline- and homocitrulline-containing peptides related to type I and II collagen telopeptides. *Arthritis Res. Ther.* **17**: 2.
- Tushinski, R.J., Oliver, I.T., Guilbert, L.J., Tynan, P.W., Warner, J.R., Stanley, E.R. (1982): Survival of mononuclear phagocytes depends on a lineage-specific growth factor that the differentiated cells selectively destroy. *Cell* **28**: 71–81.
- Tzeng, Y.-S., Li, H., Kang, Y.-L., Chen, W.-C., Cheng, W.-C., Lai, D.-M. (2011): Loss of Cxcl12/Sdf-1 in adult mice decreases the quiescent state of hematopoietic stem/progenitor cells and alters the pattern of hematopoietic regeneration after myelosuppression. *Blood* **117**: 429–439.
- Urban, C.F., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., Nacken, W., Brinkmann, V., Jungblut, P.R., Zychlinsky, A. (2009): Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* **5**: e1000639.
- Urban, C.F., Reichard, U., Brinkmann, V., Zychlinsky, A. (2006): Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell. Microbiol.* **8**: 668–676.
- Uysal, H., Bockermann, R., Nandakumar, K.S., Sehnert, B., Bajtner, E., Engström, A., Serre, G., Burkhardt, H., Thunnissen, M.M.G.M., Holmdahl, R. (2009): Structure and pathogenicity of antibodies specific for citrullinated collagen type II in experimental arthritis. *J. Exp. Med.* **206**: 449–462.
- Van den Steen, P.E., Proost, P., Wuyts, A., Van Damme, J., Opdenakker, G. (2000): Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* **96**: 2673–2681.
- Vascotto, F., Lankar, D., Faure-André, G., Vargas, P., Diaz, J., Le Roux, D., Yuseff, M.-I., Sibarita, J.-B., Boes, M., Raposo, G., Mougneau, E., Glaichenhaus, N., Bonnerot, C., Manoury, B., Lennon-Duménil, A.-M. (2007): The actin-based motor protein myosin II regulates MHC class II trafficking and BCR-driven antigen presentation. *J. Cell Biol.* **176**: 1007–1019.
- Verbrugh, H.A., Peters, R., Rozenberg-Arska, M., Peterson, P.K., Verhoef, J. (1981): Antibodies to cell wall peptidoglycan of *Staphylococcus aureus* in patients with serious staphylococcal infections. *J. Infect. Dis.* **144**: 1–9.
- Verpoort, K.N., Gaalen, F.A. van, Helm-van Mil, A.H.M. van der, Schreuder, G.M.T., Breedveld, F.C., Huizinga, T.W.J., Vries, R.R.P. de, Toes, R.E.M. (2005): Association of HLA-DR3 with anti-cyclic citrullinated peptide antibody-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **52**: 3058–3062.
- Verpoort, K.N., Jol-van der Zijde, C.M., Papendrecht-van der Voort, E. a. M., Ioan-Facsinay, A., Drijfhout, J.W., Tol, M.J.D. van, Breedveld, F.C., Huizinga, T.W.J., Toes, R.E.M. (2006): Isotype distribution of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis reflects an ongoing immune response. *Arthritis Rheum.* **54**: 3799–3808.

- Verreck, F.A.W., Boer, T. de, Langenberg, D.M.L., Hoeve, M.A., Kramer, M., Vaisberg, E., Kastelein, R., Kolk, A., Waal-Malefyt, R. de, Ottenhoff, T.H.M. (2004): Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 4560–4565.
- Viatte, S., Plant, D., Han, B., Fu, B., Yarwood, A., Thomson, W., Symmons, D.P.M., Worthington, J., Young, A., Hyrich, K.L., Morgan, A.W., Wilson, A.G., Isaacs, J.D., Raychaudhuri, S., Barton, A. (2015): Association of HLA-DRB1 haplotypes with rheumatoid arthritis severity, mortality, and treatment response. *JAMA* **313**: 1645–1656.
- Vieira, O.V., Bucci, C., Harrison, R.E., Trimble, W.S., Lanzetti, L., Gruenberg, J., Schreiber, A.D., Stahl, P.D., Grinstein, S. (2003): Modulation of Rab5 and Rab7 recruitment to phagosomes by phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 2501–2514.
- Villanueva, E., Yalavarthi, S., Berthier, C.C., Hodgins, J.B., Khandpur, R., Lin, A.M., Rubin, C.J., Zhao, W., Olsen, S.H., Klinker, M., Shealy, D., Denny, M.F., Plumas, J., Chaperot, L., Kretzler, M., Bruce, A.T., Kaplan, M.J. (2011): Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **187**: 538–552.
- Vincent, C., Nogueira, L., Clavel, C., Sebbag, M., Serre, G. (2005): Autoantibodies to citrullinated proteins: ACPA. *Autoimmunity* **38**: 17–24.
- Visnjic, D., Kalajzic, Z., Rowe, D.W., Katavic, V., Lorenzo, J., Aguila, H.L. (2004): Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood* **103**: 3258–3264.
- Vissers, M.C., Thomas, C. (1997): Hypochlorous acid disrupts the adhesive properties of subendothelial matrix. *Free Radic. Biol. Med.* **23**: 401–411.
- Vossenaar, E.R., Després, N., Lapointe, E., Heijden, A. van der, Lora, M., Senuki, T., Venrooij, W.J. van, Ménard, H.A. (2004): Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Res. Ther.* **6**: R142-150.
- Waddell, S.J., Popper, S.J., Rubins, K.H., Griffiths, M.J., Brown, P.O., Levin, M., Relman, D.A. (2010): Dissecting interferon-induced transcriptional programs in human peripheral blood cells. *PLoS One* **5**: e9753.
- Wähe, A., Kasmapour, B., Schmaderer, C., Liebl, D., Sandhoff, K., Nykjaer, A., Griffiths, G., Gutierrez, M.G. (2010): Golgi-to-phagosome transport of acid sphingomyelinase and prosaposin is mediated by sortilin. *J. Cell Sci.* **123**: 2502–2511.
- Wang, H., Li, T., Chen, S., Gu, Y., Ye, S. (2015): Neutrophil Extracellular Trap Mitochondrial DNA and Its Autoantibody in Systemic Lupus Erythematosus and a Proof-of-Concept Trial of Metformin. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **67**: 3190–3200.
- Wang, W., Peng, W., Ning, X. (2018): Increased levels of neutrophil extracellular trap remnants in the serum of patients with rheumatoid arthritis. *Int. J. Rheum. Dis.* **21**: 415–421.
- Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correll, S., Li, P., Wang, D., Hayama, R., Leonelli, L., Han, H., Grigoryev, S.A., Allis, C.D., Coonrod, S.A. (2009): Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J. Cell Biol.* **184**: 205–213.
- Wartha, F., Beiter, K., Albiger, B., Fernebro, J., Zychlinsky, A., Normark, S., Henriques-Normark, B. (2007): Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cell. Microbiol.* **9**: 1162–1171.
- Wassenberg, S., Rau, R., Steinfeld, P., Zeidler, H. (2005): Very low-dose prednisolone in early rheumatoid arthritis retards radiographic progression over two years: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* **52**: 3371–3380.
- Watson, R.W., Redmond, H.P., Wang, J.H., Condrón, C., Bouchier-Hayes, D. (1996): Neutrophils undergo apoptosis following ingestion of *Escherichia coli*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **156**: 3986–3992.

- Wearsch, P.A., Peaper, D.R., Cresswell, P. (2011): Essential glycan-dependent interactions optimize MHC class I peptide loading. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 4950–4955.
- Weber, K.S., Hundelshausen, P. von, Clark-Lewis, I., Weber, P.C., Weber, C. (1999): Differential immobilization and hierarchical involvement of chemokines in monocyte arrest and transmigration on inflamed endothelium in shear flow. *Eur. J. Immunol.* **29**: 700–712.
- Wegner, N., Wait, R., Sroka, A., Eick, S., Nguyen, K.-A., Lundberg, K., Kinloch, A., Culshaw, S., Potempa, J., Venables, P.J. (2010): Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and  $\alpha$ -enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **62**: 2662–2672.
- Weinblatt, M.E., Coblyn, J.S., Fox, D.A., Fraser, P.A., Holdsworth, D.E., Glass, D.N., Trentham, D.E. (1985): Efficacy of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* **312**: 818–822.
- Weinblatt, M.E., Kremer, J.M., Bankhurst, A.D., Bulpitt, K.J., Fleischmann, R.M., Fox, R.I., Jackson, C.G., Lange, M., Burge, D.J. (1999): A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. *N. Engl. J. Med.* **340**: 253–259.
- Weinrauch, Y., Drujan, D., Shapiro, S.D., Weiss, J., Zychlinsky, A. (2002): Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature* **417**: 91–94.
- Welliver, T.P., Swanson, J.A. (2012): A growth factor signaling cascade confined to circular ruffles in macrophages. *Biol. Open* **1**: 754–760.
- Wen, X., Xu, X., Sun, W., Chen, K., Pan, M., Wang, J.M., Bolland, S.M., Jin, T. (2019): G-protein-coupled formyl peptide receptors play a dual role in neutrophil chemotaxis and bacterial phagocytosis. *Mol. Biol. Cell* **30**: 346–356.
- West, X.Z., Malinin, N.L., Merkulova, A.A., Tischenko, M., Kerr, B.A., Borden, E.C., Podrez, E.A., Salomon, R.G., Byzova, T.V. (2010): Oxidative stress induces angiogenesis by activating TLR2 with novel endogenous ligands. *Nature* **467**: 972–976.
- Wheeler, M.A., Smith, S.D., García-Cardena, G., Nathan, C.F., Weiss, R.M., Sessa, W.C. (1997): Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **99**: 110–116.
- Williams, R.C., Kunkel, H.G. (1962): Rheumatoid factor, complement, and conglutinin aberrations in patients with subacute bacterial endocarditis. *J. Clin. Invest.* **41**: 666–675.
- 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.
- Willis, V.C., Demoruelle, M.K., Derber, L.A., Chartier-Logan, C.J., Parish, M.C., Pedraza, I.F., Weisman, M.H., Norris, J.M., Holers, V.M., Deane, K.D. (2013): Sputum autoantibodies in patients with established rheumatoid arthritis and subjects at risk of future clinically apparent disease. *Arthritis Rheum.* **65**: 2545–2554.
- Willman, C.L., Stewart, C.C., Miller, V., Yi, T.L., Tomasi, T.B. (1989): Regulation of MHC class II gene expression in macrophages by hematopoietic colony-stimulating factors (CSF). Induction by granulocyte/macrophage CSF and inhibition by CSF-1. *J. Exp. Med.* **170**: 1559–1567.
- Wood, N.C., Dickens, E., Symons, J.A., Duff, G.W. (1992): In situ hybridization of interleukin-1 in CD14-positive cells in rheumatoid arthritis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **62**: 295–300.
- Woude, D. van der, Houwing-Duistermaat, J.J., Toes, R.E.M., Huizinga, T.W.J., Thomson, W., Worthington, J., Mil, A.H.M. van der H., Vries, R.R.P. de (2009): Quantitative heritability of anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **60**: 916–923.
- Wright, H.L., Chikura, B., Bucknall, R.C., Moots, R.J., Edwards, S.W. (2011): Changes in expression of membrane TNF, NF- $\kappa$ B activation and neutrophil apoptosis during active and resolved inflammation. *Ann. Rheum. Dis.* **70**: 537–543.

- Wright, S.D., Craigmyle, L.S., Silverstein, S.C. (1983): Fibronectin and serum amyloid P component stimulate C3b- and C3bi-mediated phagocytosis in cultured human monocytes. *J. Exp. Med.* **158**: 1338–1343.
- Wu, A.M., Till, J.E., Siminovitch, L., McCulloch, E.A. (1968): Cytological evidence for a relationship between normal hemopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid system. *J. Exp. Med.* **127**: 455–464.
- Wubbolts, R., Fernandez-Borja, M., Oomen, L., Verwoerd, D., Janssen, H., Calafat, J., Tulp, A., Dusseljee, S., Neefjes, J. (1996): Direct vesicular transport of MHC class II molecules from lysosomal structures to the cell surface. *J. Cell Biol.* **135**: 611–622.
- Xu, J., Zhu, L., He, S., Wu, Y., Jin, W., Yu, T., Qu, J.Y., Wen, Z. (2015): Temporal-Spatial Resolution Fate Mapping Reveals Distinct Origins for Embryonic and Adult Microglia in Zebrafish. *Dev. Cell* **34**: 632–641.
- Xu, W., Roos, A., Schlagwein, N., Woltman, A.M., Daha, M.R., Kooten, C. van (2006): IL-10-producing macrophages preferentially clear early apoptotic cells. *Blood* **107**: 4930–4937.
- Yalavarthi, S., Gould, T.J., Rao, A.N., Mazza, L.F., Morris, A.E., Núñez-Álvarez, C., Hernández-Ramírez, D., Bockenstedt, P.L., Liaw, P.C., Cabral, A.R., Knight, J.S. (2015): Release of neutrophil extracellular traps by neutrophils stimulated with antiphospholipid antibodies: a newly identified mechanism of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **67**: 2990–3003.
- Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K., Akira, S. (2002): Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **169**: 6668–6672.
- Yanagihashi, Y., Segawa, K., Maeda, R., Nabeshima, Y.-I., Nagata, S. (2017): Mouse macrophages show different requirements for phosphatidylserine receptor Tim4 in efferocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**: 8800–8805.
- Yáñez, A., Ng, M.Y., Hassanzadeh-Kiabi, N., Goodridge, H.S. (2015): IRF8 acts in lineage-committed rather than oligopotent progenitors to control neutrophil vs monocyte production. *Blood* **125**: 1452–1459.
- Yang, J., Lu, Y., Guo, A. (2016): Platelet-rich plasma protects rat chondrocytes from interleukin-1 $\beta$ -induced apoptosis. *Mol. Med. Rep.* **14**: 4075–4082.
- Yang, T.-H., St John, L.S., Garber, H.R., Kerros, C., Ruisaard, K.E., Clise-Dwyer, K., Alatrash, G., Ma, Q., Mollidrem, J.J. (2018): Membrane-Associated Proteinase 3 on Granulocytes and Acute Myeloid Leukemia Inhibits T Cell Proliferation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **201**: 1389–1399.
- Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J.F., Bannenberg, G.L., Serhan, C.N., Hayden, M.S., Hieny, S., Sutterwala, F.S., Flavell, R.A., Ghosh, S., Sher, A. (2005): TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* **308**: 1626–1629.
- Ye, J., Qiu, J., Bostick, J.W., Ueda, A., Schjerven, H., Li, S., Jobin, C., Chen, Z.E., Zhou, L. (2017): Aryl Hydrocarbon Receptor Preferentially Marks and Promotes Gut Regulatory T Cells. *Cell Rep.* **21**: 2277–2290.
- Yeo, L., Toellner, K.-M., Salmon, M., Filer, A., Buckley, C.D., Raza, K., Scheel-Toellner, D. (2011): Cytokine mRNA profiling identifies B cells as a major source of RANKL in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **70**: 2022–2028.
- Yipp, B.G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C.N., Scott, B.N.V., Zbytnuik, L.D., Pittman, K., Asaduzzaman, M., Wu, K., Meijndert, H.C., Malawista, S.E., Boisfleury Chevance, A. de, Zhang, K., Conly, J., Kuberski, P. (2012): Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat. Med.* **18**: 1386–1393.
- Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guillemins, 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, J.K., Kwon, H., Khil, L.-Y., Zhang, L., Jun, H.-S., Yoon, J.-W. (2005): IL-18 induces monocyte chemotactic protein-1 production in macrophages through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and MEK/ERK1/2 pathways. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **175**: 8280–8286.
- Yoon, B.R., Yoo, S.-J., Choi, Y. ho, Chung, Y.-H., Kim, J., Yoo, I.S., Kang, S.W., Lee, W.-W. (2014): Functional phenotype of synovial monocytes modulating inflammatory T-cell responses in rheumatoid arthritis (RA). *PLoS One* **9**: e109775.
- Youn, J.-I., Collazo, M., Shalova, I.N., Biswas, S.K., Gabrilovich, D.I. (2012): Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J. Leukoc. Biol.* **91**: 167–181.
- Yousefi, S., Gold, J.A., Andina, N., Lee, J.J., Kelly, A.M., Kozlowski, E., Schmid, I., Straumann, A., Reichenbach, J., Gleich, G.J., Simon, H.-U. (2008): Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat. Med.* **14**: 949–953.
- Yousefi, S., Mihalache, C., Kozlowski, E., Schmid, I., Simon, H.U. (2009): Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* **16**: 1438–1444.
- Yousefi, S., Stojkov, D., Germic, N., Simon, D., Wang, X., Benarafa, C., Simon, H.-U. (2019): Untangling 'NETosis' from NETs. *Eur. J. Immunol.* **49**: 221–227.
- Yu, L., Quinn, M.T., Cross, A.R., Dinauer, M.C. (1998): Gp91(phox) is the heme binding subunit of the superoxide-generating NADPH oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 7993–7998.
- Yue, S., Rao, J., Zhu, J., Busuttill, R.W., Kupiec-Weglinski, J.W., Lu, L., Wang, X., Zhai, Y. (2014): Myeloid PTEN deficiency protects livers from ischemia reperfusion injury by facilitating M2 macrophage differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **192**: 5343–5353.
- Zhan, Y., Lieschke, G.J., Grail, D., Dunn, A.R., Cheers, C. (1998): Essential roles for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and G-CSF in the sustained hematopoietic response of *Listeria monocytogenes*-infected mice. *Blood* **91**: 863–869.
- Zhang, F., Wei, K., Slowikowski, K., Fonseka, C.Y., Rao, D.A., Kelly, S., Goodman, S.M., Tabechian, D., Hughes, L.B., Salomon-Escoto, K., Watts, G.F.M., Jonsson, A.H., Rangel-Moreno, J., Meednu, N., Roza, C., Apruzzese, W., Eisenhaure, T.M., Lieb, D.J., Boyle, D.L., Mandelin, A.M., Boyce, B.F., DiCarlo, E., Gravallesse, E.M., Gregersen, P.K., Moreland, L., Firestein, G.S., Hacohen, N., Nusbaum, C., Lederer, J.A., Perlman, H., Pitzalis, C., Filer, A., Holers, V.M., Bykerk, V.P., Donlin, L.T., Anolik, J.H., Brenner, M.B., Raychaudhuri, S. (2019): Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry. *Nat. Immunol.* **20**: 928–942.
- Zhang, G., Liu, H.-B., Zhou, L., Cui, X.-Q., Fan, X.-H. (2018): CCL3 participates in the development of rheumatoid arthritis by activating AKT. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **22**: 6625–6632.
- Zhao, W., Fogg, D.K., Kaplan, M.J. (2015): A novel image-based quantitative method for the characterization of NETosis. *J. Immunol. Methods* **423**: 104–110.
- Zhou, Q., Lai, Y., Bacaj, T., Zhao, M., Lyubimov, A.Y., Uevirojngangkoorn, M., Zeldin, O.B., Brewster, A.S., Sauter, N.K., Cohen, A.E., Soltis, S.M., Alonso-Mori, R., Chollet, M., Lemke, H.T., Pfuetzner, R.A., Choi, U.B., Weis, W.I., Diao, J., Südhof, T.C., Brunger, A.T. (2015): Architecture of the synaptotagmin-SNARE machinery for neuronal exocytosis. *Nature* **525**: 62–67.
- Zhou, Y., An, L.-L., Chaerkady, R., Mittereder, N., Clarke, L., Cohen, T.S., Chen, B., Hess, S., Sims, G.P., Mustelin, T. (2018): Evidence for a direct link between PAD4-mediated citrullination and the oxidative burst in human neutrophils. *Sci. Rep.* **8**: 15228.
- Zhu, W., Li, X., Fang, S., Zhang, X., Wang, Y., Zhang, T., Li, Z., Xu, Y., Qu, S., Liu, C., Gao, F., Pan, H., Wang, G., Li, H., Sun, B. (2015): Anti-Citrullinated Protein Antibodies Induce Macrophage Subset Disequilibrium in RA Patients. *Inflammation* **38**: 2067–2075.

Zhu, Y.P., Padgett, L., Dinh, H.Q., Marcovecchio, P., Blatchley, A., Wu, R., Ehinger, E., Kim, C., Mikulski, Z., Seumois, G., Madrigal, A., Vijayanand, P., Hedrick, C.C. (2018): Identification of an Early Unipotent Neutrophil Progenitor with Pro-tumoral Activity in Mouse and Human Bone Marrow. *Cell Rep.* **24**: 2329-2341.e8.

Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J.M., Liu, Y.-J., MacPherson, G., Randolph, G.J., Scherberich, J., Schmitz, J., Shortman, K., Sozzani, S., Strobl, H., Zembala, M., Austyn, J.M., Lutz, M.B. (2010): Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* **116**: e74-80.

Zvaifler, N.J., Steinman, R.M., Kaplan, G., Lau, L.L., Rivelis, M. (1985): Identification of immunostimulatory dendritic cells in the synovial effusions of patients with rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* **76**: 789–800.





# CONGRÈS et COLLOQUES

Inflammatory macrophages are particularly sensitive to activation by Neutrophil Extracellular Traps, especially in Rheumatoid Arthritis, amplifying the pro-inflammatory response.

Dyhia Melbouci, Sarra Seninet, Marie-Christophe Boissier, Elodie Segura and Patrice Decker. Poster, 40<sup>th</sup> European Workshop for Rheumatology Research (EWRR), 2020, Louvain, Belgique.

Neutrophil Extracellular Traps trigger polyclonal B lymphocyte activation independently of antigen specificity.

Maxime Batignes, Delphine Lemeiter, Dyhia Melbouci, Luca Semerano and Patrice Decker. Poster, 40<sup>th</sup> European Workshop for Rheumatology Research (EWRR), 2020, Louvain, Belgique.

Neutrophil extracellular traps trigger an enhanced pro-inflammatory response in macrophage subpopulations in rheumatoid arthritis patients.

Dyhia Melbouci, Sarra Seninet, Marie-Christophe Boissier, Elodie Segura and Patrice Decker. Communication orale et poster, 53<sup>th</sup> Société Française d'Immunologie (SFI), 2021, Paris, France.

Neutrophil extracellular traps trigger a pro-inflammatory profile in both pro-inflammatory and anti-inflammatory macrophages, a response amplified in rheumatoid arthritis patients.

Dyhia Melbouci, Sarra Seninet, Marie-Christophe Boissier, Elodie Segura and Patrice Decker. Soumis, 10<sup>th</sup> International Conference on Autoimmunity: Mechanisms and Novel Treatments, Kos, Grèce.

Among myeloid cells, inflammatory macrophages are particularly sensitive to activation by neutrophil extracellular traps, amplifying the pro-inflammatory response in rheumatoid arthritis.

Dyhia Melbouci, Sarra Seninet, Marie-Christophe Boissier, Elodie Segura and Patrice Decker. Communication orale, Club de Recherche Expérimentale sur les Maladies articulaires, Rueil-Malmaison, 2021.

## Résumé

Les neutrophil extracellular traps (NETs) sont des filaments d'ADN décondensés chargés avec des protéines neutrophilaires, sécrétés par les neutrophiles. Dans cette étude, nous avons examiné l'impact des NETs sur différentes sous-populations de macrophages chez des individus sains et des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR). Nous avons également étudié le mécanisme d'activation des macrophages par les NETs et les voies déclenchées par les NETs dans les macrophages. Pour ce faire, des macrophages, pro- et anti-inflammatoires ont été induits à partir de monocytes sanguins purifiés de sujets sains ou de patients atteints de PR. Des NETs ont également été préparés à partir de neutrophiles sanguins autologues. Ces macrophages ont ensuite été caractérisés et mis en culture avec des NETs en présence ou en l'absence de LPS. Plusieurs médiateurs pro- et anti-inflammatoires ont été analysés en présence ou en l'absence de LPS. Le transcriptome des macrophages pro-inflammatoires cultivés avec des NETs provenant de patients atteints de PR a également été examiné. Enfin, l'implication du récepteur Toll-like 9 (TLR9) dans les macrophages et de la protéine du complément C1q dans les NETs a été déterminée. Nos résultats ont montré que les NETs induisent un profil de cytokines pro-inflammatoires sur les sous-populations de macrophages au repos, y compris celles décrites comme anti-inflammatoires, plus particulièrement chez les patients atteints de PR. En réponse au LPS, les macrophages de la PR sont résistants à l'activité anti-inflammatoire des NETs. L'activation des macrophages par les NETs n'est pas médiée par TLR9 dans les macrophages et ne dépend pas du C1q chargé sur les NETs. Les analyses RNAseq ont confirmé que les NETs activent les médiateurs pro-inflammatoires sur les macrophages mais diminuent l'activation des médiateurs anti-inflammatoires et indiquent qu'ils induisent également les gènes de la voie du récepteur d'aryl hydrocarbure.

## Abstract

Neutrophil extracellular traps (NETs) are decondensed DNA decorated with proteins and released by neutrophils. In this study, we examined the impact of NETs on different macrophage subpopulations in healthy individuals and rheumatoid arthritis (RA) patients. We also studied the activation mechanism of macrophages by NETs and the pathways triggered by NETs in macrophages. Then, pro-, and anti-inflammatory macrophages were induced from blood monocytes purified from healthy subjects or patients with RA. NETs were also prepared from autologous blood neutrophils. These macrophages were then characterized and cultured with NETs in the presence or absence of LPS. Several pro- and anti-inflammatory mediators were analyzed in the presence or absence of LPS. The transcriptome of pro-inflammatory macrophages cultured with NETs from RA patients was also examined. Finally, the involvement of Toll-like receptor 9 (TLR9) in macrophages and of complement protein C1q inside NETs was determined. We have demonstrated that NETs induce pro-inflammatory cytokine profile on resting macrophage subpopulations, including those described as anti-inflammatory, more especially in RA patients. In response to LPS, RA macrophages are resistant to the anti-inflammatory activity of NETs. Macrophage activation by NETs is not mediated by TLR9 in macrophages and is not dependent on C1q loaded on NETs. RNAseq analysis confirmed that NETs activate pro-inflammatory mediators on macrophages but decrease the activation of anti-inflammatory mediators and indicate that they also induce genes of the aryl hydrocarbon receptor pathway.

Discipline : Biologie, mention « Sciences de la Vie et de la Santé ». Mots clé : NETs, macrophages, auto-immunité, rhumatologie. UMR INSERM 1125, Université Sorbonne Paris Nord, 1 Rue de Chablis 93017 BOBIGNY.