



Liens entre inflammations articulaire et digestive : étude expérimentale chez la souris et contribution de l'immunité mucoale

Julie Hablot

► To cite this version:

Julie Hablot. Liens entre inflammations articulaire et digestive : étude expérimentale chez la souris et contribution de l'immunité mucoale. Immunologie. Université de Lorraine, 2018. Français. NNT : 2018LORR0095 . tel-01870524

HAL Id: tel-01870524

<https://theses.hal.science/tel-01870524>

Submitted on 7 Sep 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par Julie HABLOT

Liens entre inflammations articulaire et digestive : étude expérimentale chez la souris et contribution de l'immunité mucoale

11 juillet 2018

Membres du jury :

Rapporteurs :

Madame Florence APPARAILLY

DR2 INSERM, INSERM U1183, Montpellier

Madame Claudine BLIN

DR2 INSERM, CNRS-UNS UMR 7370, Nice

Examineurs :

Monsieur Jean-Yves JOUZEAU

PU-PH, UMR 7365, Nancy, Directeur de thèse

Monsieur David MOULIN

CR1 CNRS, UMR 7365, Nancy, co-directeur de thèse

UMR 7365, Laboratoire « Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire »,
Université de Lorraine, Campus Biologie Santé, Vandoeuvre-lès-Nancy

Remerciements

Je remercie le Professeur Jean-Yves JOUZEAU, directeur de l'UMR7365 ainsi que mon directeur de thèse, de m'avoir permis d'effectuer ma thèse au sein de son laboratoire et d'avoir suivi l'ensemble de mes travaux de Master et de thèse. Je le remercie également pour ses nombreux conseils, son écoute et le partage de ses connaissances qui me paraîtront toujours exceptionnelles. Je lui témoigne mon respect et ma sincère reconnaissance.

Je remercie le Docteur David MOULIN d'avoir co-encadré mes travaux de Master et de thèse. Je le remercie pour la confiance et l'autonomie qu'il m'a accordées ainsi que pour ses conseils scientifiques. Je le remercie pour sa disponibilité et son aide.

Je remercie les Docteurs Florence APPARAILLY et Claudine BLIN d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je suis honorée qu'elles jugent mes travaux et je leur témoigne ma reconnaissance.

Je remercie les membres de l'école doctorale BIOSE pour m'avoir fait confiance en m'attribuant une bourse pour effectuer mes travaux de thèse et pour m'autoriser à soutenir.

Je remercie les Docteurs Sandra KAMINSKI et Federica GILARDI d'avoir accepté d'être les membres de mon comité de suivi de thèse. Je les remercie de leur aide, leurs conseils et leur soutien.

Je remercie l'ensemble des personnes extérieures au laboratoire qui ont participé à mes travaux de thèse. Je les remercie d'avoir mis à contribution leurs compétences pour que ce travail soit riche et complet.

Je remercie le Professeur Pascal REBOUL pour ses conseils et son aide autant pour la compréhension de résultats que pour l'écriture de rapports ou pour la préparation de présentations. Je le remercie aussi pour avoir partagé avec moi ses connaissances.

Je remercie l'ensemble de membres de l'équipe 4 et du laboratoire qui ont contribué de près ou de loin à mes travaux de thèse. Je remercie le personnel technique et administratif du laboratoire.

Je remercie le Docteur Stéphanie GRANDEMANGE qui m'a apporté plus qu'elle ne peut l'imaginer. Je la remercie pour son amitié, son enthousiasme, ses conseils et pour avoir cru en moi. Tu m'as transmis la passion de la Recherche.

Je remercie les Docteurs Virginie LIBANTE et Florence CHARRON-BOURGOIN pour m'avoir accordé leur confiance en enseignement. Cette expérience à vos côtés a été riche et m'a beaucoup apporté. Merci à Virginie pour m'avoir fait vivre l'expérience de « Pint of Science ».

Merci aux doctorants du laboratoire pour leur bonne humeur et leurs conseils. Merci à eux pour les discussions « extra-scientifiques » et pour les petits prêts entre amis.

Enfin, je remercie ma famille. Vous avez toujours cru en moi et vous m'avez soutenue inlassablement pendant ses 9 longues années d'étude. Je tourne enfin cette page pour commencer à en écrire une nouvelle, mais toujours avec vous.

Table des matières

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

ABREVIATIONS

INTRODUCTION

RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

I.	L'intestin, un réservoir à cellules immunitaires	23
I.1.	Les cellules immunitaires de l'intestin grêle et leurs rôles	23
I.1.1.	Rappel sur la structure de l'intestin.....	23
I.1.2.	Rappel sur les structures intestinales hébergeant les cellules immunitaires	28
I.1.3.	Les cellules immunitaires de la muqueuse intestinale	32
I.2.	La capacité migratoire des cellules immunitaires intestinales	46
I.2.1.	Le chimiotactisme : définition	46
I.2.2.	Rôle du chimiotactisme dans le recrutement des cellules immunitaires dans l'intestin grêle.....	50
I.3.	Les cellules de l'immunité de type 3 dans l'homéostasie intestinale	56
I.3.1.	Les cellules de l'immunité de type 3 : caractéristiques et différenciation	56
I.3.2.	Les cellules de l'immunité de type 3 : rôle dans la défense de la barrière intestinale	58
II.	Rôle des récepteurs aux chimiokines et de l'immunité de type 3 dans l'inflammation articulaire.....	60
II.1.	Rappel sur la structure de l'articulation	60
II.2.	Physiopathologie de l'inflammation articulaire.....	62
II.3.	Rôle du chimiotactisme dans l'inflammation articulaire	66
II.3.1.	Rôle des cellules immunitaires présentes, dans les conditions homéostatiques dans l'intestin grêle, dans l'inflammation articulaire.....	66
II.3.2.	Le rôle des récepteurs aux chimiokines localisés sur les cellules résidentes de l'articulation dans l'inflammation synoviale.....	72
II.4.	Le rôle physiopathologique des cellules de l'immunité de type 3 dans l'inflammation articulaire	76

III. Le microbiote intestinal, une nouvelle cible dans les maladies inflammatoires ?	79
III.1. Le microbiote intestinal physiologique et pathologique	79
III.1.1. Le microbiote intestinal physiologique	79
III.1.2. Implication du microbiote dans la maturation et le maintien de l'immunité intestinale	84
III.1.3. Les modifications du microbiote intestinal dans les pathologies inflammatoires articulaires	87
III.2. Liens entre l'immunité, les micro-organismes et les pathologies inflammatoires articulaires	91
III.2.1. Le mimétisme moléculaire	91
III.2.2. La perméabilité intestinale	93
III.2.3. L'immunité intestinale	93
III.3. Des éléments de preuve de l'implication du microbiote dans les RIC apportés par les modèles animaux	97
III.3.1. Modèles animaux et spondylarthrite	97
III.3.2. Modèles animaux et polyarthrite rhumatoïde	98

PREMIERE HYPOTHESE DE TRAVAIL

Liens entre la dysbiose intestinale, l'immunité mucosale et l'inflammation articulaire

RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE SUR LE RECEPTEUR PPAR γ

I. Le récepteur nucléaire PPAR γ : rôle dans l'homéostasie intestinale et dans les pathologies articulaires	108
I.1. Le récepteur nucléaire PPAR γ	108
I.2. Le récepteur nucléaire PPAR γ , rôle dans la régulation de l'immunité et de l'homéostasie intestinale	110
I.2.1. Liens entre le récepteur nucléaire PPAR γ et le microbiote intestinal ...	110
I.2.2. Rôle du récepteur nucléaire PPAR γ dans le contrôle de l'immunité intestinale	114
I.3. Rôle du récepteur nucléaire PPAR γ dans les pathologies inflammatoires articulaires	116

OBJECTIF 1

I. Conséquences de l'induction d'une colite expérimentale sur le développement de l'arthrite induite par injection de collagène chez la souris	120
I.1. Objectif de l'étude	120

I.2.	Résumé du matériel et méthodes	120
I.3.	Synthèse des résultats	121
I.3.1.	La colite au DSS retarde l'apparition de l'arthrite au collagène de type 2 et diminue sa sévérité	122
I.3.2.	Le développement de l'arthrite au collagène de type 2 n'influence pas la sévérité de la colite au DSS.....	122
I.3.3.	Le développement simultané d'une colite et d'une arthrite modifie le microbiote fécal.....	123
I.4.	Conclusion	123

OBJECTIF 2

II.	Conséquences de l'invalidation du récepteur PPAR γ sur l'homéostasie intestinale et l'inflammation articulaire.....	125
II.1.	Objectif de l'étude.....	125
II.2.	Matériel et méthodes	125
II.2.1.	Obtention des souris PPAR $\gamma^{-/-}$ et de leurs frères de litière PPAR $\gamma^{+/+}$ et des souris ROR γ t-crePPAR $\gamma^{-/-}$ et leurs frères de litière ROR γ t-crePPAR $\gamma^{+/+}$	125
II.2.2.	Quantification de l'IL-17 sérique par ELISA	128
II.2.3.	Quantification de la lipocaline-2 fécale par ELISA	128
II.2.4.	Analyses histologiques et immunologiques des intestins et des articulations	128
II.2.5.	Mesure de l'expression de médiateurs de l'inflammation dans l'intestin par RT-PCR quantitative	129
II.2.6.	Quantification des lymphocytes Th17 et T _{reg} et des cellules ILC3 dans la <i>lamina propria</i> des intestins et des ganglions par cytométrie en flux.....	131
II.2.7.	Analyse du microbiote fécal par séquençage de l'ADN codant ARNr 16S	133
II.2.8.	Analyse des conséquences du transfert du microbiote fécal des souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ sur le développement d'une AIC	135
II.3.	Résultats	137
II.3.1.	Conséquences de l'invalidation du récepteur PPAR γ sur l'homéostasie intestinale chez la souris.....	137
II.3.2.	Conséquences de l'invalidation du récepteur PPAR γ sur les articulations.	154
II.3.3.	Conséquences du transfert du microbiote fécal des souris PPAR $\gamma^{-/-}$ chez des souris développant une arthrite au collagène de type 2	158

II.4.	Conclusion et perspectives.....	163
-------	---------------------------------	-----

DEUXIEME HYPOTHESE DES TRAVAIL

Le récepteur CCR3, un acteur dans la migration des cellules immunitaires intestinales vers les articulations arthritiques ?

RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE SUR LE RECEPTEUR CCR3

I.	Le récepteur CCR3, implications physiologiques et pathologiques	174
I.1.	Le récepteur CCR3 : caractéristiques générales et rôle dans la muqueuse intestinale.....	174
I.2.	Le récepteur CCR3 et son implication dans l'arthrite	178

OBJECTIF 1

I.	Evaluation des conséquences de l'inhibition du récepteur CCR3 sur le développement d'une arthrite au collagène chez la souris.....	182
I.1.	Objectif de l'étude.....	182
I.2.	Résumé du matériel et méthodes	182
I.3.	Synthèse des résultats	183
I.4.	Conclusion	185

OBJECTIF 2

II.	Analyse de l'impact de l'inhibition du récepteur CCR3 sur les populations leucocytaires intestinales.....	187
II.1.	Objectif de l'étude.....	187
II.2.	Matériel et méthodes.....	187
II.2.1.	Obtention des souris CCR3 ^{+/+} et CCR3 ^{-/-}	187
II.2.2.	Traitement des souris	188
II.2.3.	Quantification des leucocytes dans la <i>lamina propria</i> de l'intestin grêle et des ganglions mésentériques par cytométrie en flux.....	188
II.3.	Résultats.....	191
II.4.	Conclusion et perspectives.....	194

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

Liste de Figures

Figure 1 : Représentation schématique de la structure de l'intestin	23
Figure 2 : Illustration des principaux mécanismes de l'épithélium intestinal impliqués dans l'homéostasie intestinale	26
Figure 3 : Représentation schématique des structures de l'intestin hébergeant les cellules immunitaires.....	28
Figure 4 : Représentation schématique de l'activation et de la réponse des immunités de types 1, 2, 3 et de l'immunité régulatrice.	32
Figure 5 : Illustration des principales cellules immunitaires présentes au sein de la lamina propria intestinale et de leurs sécrétions	33
Figure 6 : Représentation schématique de l'activation des lymphocytes des immunités innée et adaptative par les cellules dendritiques	40
Figure 7 : Représentation tridimensionnelle de la superposition des structures de sept chimiokines (CXCL4, CXCL8, CXCL12, CXCL13, CCL5, CC14, CCL20)	47
Figure 8 : Représentation des récepteurs aux chimiokines et de leurs interactions avec leurs ligands	49
Figure 9 : Représentation des différentes fonctions des chimiokines et de leurs récepteurs ..	50
Figure 10 : Illustration des principales cellules immunitaires intestinales et de leurs récepteurs aux chimiokines.....	51
Figure 11 : Illustration de la circulation des lymphocytes dans les ganglions (A) et du rôle du récepteur CCR7 dans la migration de ces cellules des vaisseaux sanguins vers les ganglions (B)	54
Figure 12 : Représentation schématique des lymphocytes appartenant à l'immunité de type 3.	58
Figure 13 : Représentation schématique de l'articulation diarthroïdale du genou en coupe sagittale.....	61
Figure 14 : Représentation schématique des articulations atteintes dans les principaux rhumatismes inflammatoires chroniques.....	63
Figure 15 : Représentations schématiques de la progression des lésions de la spondylarthrite dans la moelle épinière (A) et de la polyarthrite rhumatoïde dans une articulation synoviale (B)	65
Figure 16 : Illustration des principales cellules immunitaires recrutées au sein des articulations arthritiques et des récepteurs aux chimiokines permettant leur migration.....	66
Figure 17 : Illustration des cellules immunitaires et résidentes de l'articulation impliquées dans la formation du pannus synovial et des actions des PNN suite à leur activation par des complexes immuns dans le liquide synovial et à la surface du cartilage	71

Figure 18 : Illustration de l'activation des cellules résidentes de l'articulation par les chimiokines au cours d'une arthrite	73
Figure 19 : Représentation schématique de l'action de l'IL-17 sur les cellules résidentes d'une articulation arthritique et de ses conséquences	78
Figure 20 : Illustration du microbiote intestinal (A) et de la concentration bactérienne dans chacun des segments intestinaux (B)	80
Figure 21 : Représentation de l'évolution du microbiote fécal du nouveau-né de la naissance à l'âge de 15 mois	81
Figure 22 : Représentation schématique de la relation symbiotique entre le microbiote intestinal et l'hôte.....	84
Figure 23 : Représentation schématique du contrôle des lymphocytes Th17 et T _{reg} par des bactéries commensales du microbiote intestinal	87
Figure 24 : Comparaison des phyla bactériens (A) et des familles bactériennes (B) du microbiote fécal d'individus contrôles, de patients atteints de spondylarthrite et de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde.....	888
Figure 25 : Illustration du mimétisme moléculaire entre des protéines des bactéries <i>Proteus mirabilis</i> et <i>Klebsiella pneumoniae</i> et des protéines humaines.....	92
Figure 26 : Illustration de l'implication de l'immunité de type 3 intestinale dans le développement des rhumatismes inflammatoires chroniques en conditions dysbiotiques	96
Figure 27 : Illustration des conséquences de l'inhibition du récepteur PPAR γ au sein de la muqueuse intestinale	105
Figure 28 : Représentations schématiques du gène PPAR γ , de ses transcrits et de ses isoformes protéiques (A) et de la structure de la protéine PPAR γ associée à l'ADN (B)	110
Figure 29 : Représentation schématique de l'implication du récepteur PPAR γ dans la régulation du microbiote intestinal.....	113
Figure 30 : Représentation schématique de la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th17 et son inhibition par le récepteur PPAR γ	116
Figure 31 : Illustration du schéma expérimental nous ayant permis d'analyser des conséquences du microbiote des souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ sur le développement d'une arthrite induite au collagène de type 2 bovin	135
Figure 32 : Conséquences de l'inactivation du récepteur PPAR γ sur la structure de l'intestin grêle et du colon et l'expression de médiateurs de l'inflammation.....	138
Figure 33 : Détection de cellules exprimant l'IL-17 dans l'intestin grêle des souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$	139
Figure 34 : Stratégies d'analyse des populations cellulaires ILC3, Th17 et T _{reg}	141
Figure 35 : Conséquences de l'inactivation du récepteur PPAR γ sur le nombre de lymphocytes intestinaux et ganglionnaires.....	142

Figure 36 : Conséquences de l'invalidation du récepteur PPAR γ sur la proportion de cellules lymphoïdes ILC3 dans les intestins et ganglions mésentériques.	143
Figure 37 : Conséquences de l'invalidation du récepteur PPAR γ sur la proportion de lymphocytes Th17 dans les intestins et ganglions mésentériques.....	144
Figure 38 : Conséquences de l'invalidation du récepteur PPAR γ sur la proportion de lymphocytes T _{reg} dans les intestins et ganglions mésentériques	145
Figure 39 : Conséquences de l'invalidation du récepteur PPAR γ sur le microbiote fécal... ..	146
Figure 40 : Conséquences de l'invalidation du récepteur PPAR γ sur les phyla bactérien du microbiote fécal.....	148
Figure 41 : Représentation des taxons bactériens différenciellement présents dans le microbiote fécal des souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$	150
Figure 42 : Conséquences de l'invalidation du récepteur PPAR γ sur la production de mucus intestinal.	151
Figure 43 : Conséquences de l'invalidation du récepteur PPAR γ sur la production de peptides antimicrobiens intestinaux.....	153
Figure 44 : Conséquences de l'invalidation du récepteur PPAR γ la structure des articulations.	155
Figure 45 : Détection de cellules exprimant l'IL-17 dans les articulations de souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$	156
Figure 46 : Conséquences de l'invalidation du récepteur PPAR γ sur les populations lymphocytaires dans les ganglions poplités	157
Figure 47 : Conséquences de l'invalidation du récepteur PPAR γ sur le taux d'IL-17A sérique.	158
Figure 48 : Conséquences du transfert du microbiote fécal de souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ sur l'incidence et la sévérité d'une AIC	160
Figure 49 : Conséquences du transfert du microbiote fécal de souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ sur les populations de cellules immunitaires dans les ganglions poplités.....	161
Figure 50 : Conséquences du transfert du microbiote fécal de souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ sur les populations de cellules immunitaires intestinales.....	162
Figure 51 : Conséquences de l'invalidation du récepteur PPAR γ dans les cellules positives pour le facteur de transcription ROR γ t sur les populations lymphocytaires intestinales	165
Figure 52 : Conséquences de l'invalidation du récepteur PPAR γ dans les cellules ROR γ t positives sur les articulations.....	168
Figure 53 : Représentation tridimensionnelle du récepteur CCR3 et de son interaction avec son ligand CCL11 (A) et représentation schématique des caractéristiques du récepteur CCR3 (B)	175

Figure 54 : Représentations schématiques de l'implication de l'axe CCR3-CCL11 dans l'induction de la synthèse d'enzymes de dégradation par les chondrocytes (A) et les synoviocytes fibroblastiques (B) dans un contexte inflammatoire	180
Figure 55 : Conséquences de l'invalidation du récepteur CCR3 sur les proportions de lymphocytes intestinaux.....	191
Figure 56 : Conséquences de l'invalidation du récepteur CCR3 sur les proportions de lymphocytes dans la rate.	192
Figure 57 : Conséquences de l'invalidation du récepteur CCR3 sur les proportions de lymphocytes ganglionnaires.....	193
Figure 58 : Evaluation de l'impact du fond génétique des souris sur le développement d'une colite au DSS	195
Figure 59 : Conséquence de l'inhibition du récepteur CCR3 sur l'incidence et la sévérité d'une colite au DSS	196
Figure 60 : Hypothèse expliquant les conséquences de l'inhibition du récepteur de CCR3 dans les pathologies inflammatoires.....	207

Liste de tableaux

Tableau 1 : Couples d'amorces utilisés pour le génotypage et la détection de gènes d'intérêt par RT-PCR.....	127
Tableau 2 : Panels d'anticorps utilisés pour la détection des lymphocytes Th17 et T _{reg} et les cellules lymphoïdes ILC3 par cytométrie en flux	133
Tableau 3 : Composition des groupes de souris pour l'analyse de l'impact du microbiote intestinal des souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ sur le développement d'une arthrite au collagène de type 2 bovin.....	135
Tableau 4 : Score clinique d'évaluation de la sévérité d'une arthrite expérimentale (par patte)	137
Tableau 5 : Ligands du récepteur CCR3 présents chez l'Homme et/ou la souris et leur action	175
Tableau 6 : Panels d'anticorps utilisés pour la détection des populations leucocytaires en cytométrie en flux.....	190

Abréviations

9- et 13-HODE	9- et 13-hydroxy-octadecadiénoïque
15-deoxy-$\Delta^{12,14}$-PGJ₂	15-desoxy-delta 12, 14-prostaglandine J2
et 15d-PGJ₂	
15-HETE	Acide 15-hydroxy-eicosatétraénoïque

A

AA	Arthrite à l'adjuvant
Abs	Absorbance
ACPA	Anticorps anti-peptides citrullinés
ADAMTS	A Disintegrin and A Metalloprotease with Thrombospondin Motifs
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADP	Adénosine diphosphate
AF-	Activation function
AGCC	Acides gras à chaîne courte
AHR	Aryl hydrocarbon receptor
AIC	Arthrite induite par injection de collagène
AL	Acide linoléique
ALC	Acide linoléique conjugué
ALDH	Aldehyde deshydrogénase
APRIL	Activation and proliferation-induced ligand
Areg	Amphiréguline
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
Asp	Asparagine
ATP	Adénosine tri-phosphate

B, C

B27 TG¹	HLA B27 transgenic rat
BAFF	B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family
BCMA	B cell maturation antigen
BCG	Bacille Calmette Guérin
BPI	Bactericidal/permeability-increasing protein
BSA	Bovine serum albumin

CCL	CC chemokine ligand
CCR	CC chemokine receptor
CD	Cellule dendritique
CD	Cluster of differentiation
CDp	Cellule dendritique plasmacytoïde
CEI	Cellules épithéliales intestinales
Cox-2	Cyclo-oxygénase 2
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
cNK	Conventional natural killer
CPA	Cellule présentatrice d'antigènes
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
CR	C chemokine receptor
CRP	C-reactive protein
CXCL	CXC chemokine ligand
CX₃CL	CX ₃ C chemokine ligand
CXCR	CXC chemokine receptor
CX₃CR	CX ₃ C chemokine receptor

D

DAS28	Disease activity score 28
Defcr4	Defensin alpha 4
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNBS	2,4-dinitrobenzene sulfonic acid
dNTP	Désoxyribonucléotides triphosphates
DRY	Acide aspartique-arginine-tyrosine
DSS	Dextran sulfate sodium
DTT	Dithiothréitol

E, F

EAEC	Enteroaggrégative <i>Escherichia coli</i>
ECP	Eosinophil cationic protein
EDN	Eosinophil derived neurotoxin
EDTA	Acide Ethylène-Diamine-Tétraacétique
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ELR	Glutamine-Leucine-Arginine
EPO	Eosinophil peroxidase
ERA	Espèces réactives de l'azote
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
FDA	Food Drug Administration

FLI	Follicules lymphoïdes isolés
FLNA	Filamine A
FoxP3	Forkhead box 3
FR	Facteur rhumatoïde
G	
GALT	Gut-associated lymphoid tissue
GATA-3	GATA binding protein 3
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GNS	N-acétylglucosamine-6-sulfate
GPR43	G-protein coupled receptor 43
H	
h/β2m	Human beta-2-microglobulin
HD	Human defensin
HDB	Human defensin beta
hDefB1	Human defensin beta 1
HES	Hématoxyline-éosine-safran
HLA	Human leukocyte antigen
HLA B27h	Human leukocyte antigen B27 human
HMGB1	High mobility group box 1
HNP	Human neutrophil peptide
HRP	Peroxydase du Raifort
I	
ICAM1	Intracellular adhesion molecule 1
IFNγ	Interferon gamma
Ig	Immunoglobuline
IGIP	IgA-inducing protein
ILC	Innate lymphoid cells
IL-	Interleukin
IL-R	Interleukin receptor
IL-RA	Interleukin receptor Antagonist
iNKT	Invariant natural killer T
iNOS	Inductible Nitric Oxide Synthase
iT_{reg}	T _{reg} induit
J, K	
KCL	Chlorure de potassium
KIR3DL2	Killer cell Ig-like receptor

L

LFA1	Lymphocyte function-associated antigen 1
LIE	Lymphocytes intraépithéliaux
LLP	Leucocytes de la <i>lamina propria</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LTc4	Leucotriène C4
LTi	Lymphoid tissue inducer cell
LTo	Lymphoid tissue organizer cell
LtxA	Leucotoxine-A

M

MAIT	Mucosal-associated invariant T
MALT	Mucosa-associated lymphoid tissue
MBP	Major basic protein
MC	Maladie de Crohn
MEC	Matrice extracellulaire
mDefB10	Murin defensin beta 10
MgCL₂	Chlorure de magnésium
MICI	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
M-MLV RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
MMTV	Mouse mammary tumor virus
MMP	Métalloprotéase
MPO	Myéloperoxydase
MR1	MHC class I-related protein

N, O

Na₂EDTA	Acide Edétique sel Disodique
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NaOH	Hydroxyde de sodium
NC-B27	Non-conventional forms of HLA-B27
NCR	Natural cytotoxicity receptor
NET	Neutrophils extracellular traps
NGAL	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NK	Natural killer
NO	Monoxyde d'azote
NO synthase	Nitric oxide synthase
OTU	Operational Taxonomic Unit

P, Q

PAD	Peptidyl-arginine déaminase
PAF	Platelet-activating factor
pb	Paires de bases
PBS	Tampon Phosphate Salin
PD-1	Programmed cell death 1
PGE2	Prostaglandine E2
PGJ2	Prostaglandine J2
pH	Potentiel hydrogène
pIgR	Polymeric Ig receptor
PNB	Polynucléaire basophile
PNE	Polynucléaire éosinophile
PNN	Polynucléaire neutrophile
PP	Plaques de Peyer
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptor
PPRE	PPAR response elements
PR	Polyarthrite rhumatoïde
PSA	Polysaccharide A
PTPN22	Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22
pT_{reg}	Peripheral T _{reg}

R

RANK	Receptor activator of nuclear factor kappa-B
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RAR	Retinoic acid receptor
RCH	Rectocolite hémorragique
RCPG	Récepteur couple aux protéines G
Reg3	Regenerating islet-derived 3
RIC	Rhumatismes inflammatoires chroniques
RORγt	RAR related orphan receptor gamma t
RP	Rhumatisme psoriasique
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction
RXR	Retinoid X receptors

S

S100A8	S100 calcium-binding protein A8
S100A9	S100 calcium-binding protein A9
S1P	Sphingosine-1-phosphate
SA	Spondylarthrite ankylosante

SAA	Serum amyloid A
SFB	Segmented Filamentous Bacteria
SpA	Spondylarthritis
Sox2	Sex determining region Y-box 2
SRC-1	Steroid receptor coactivator-1
SVF	Sérum de veau fœtal
T	
TACI	Transmembrane activator and CALM interactor
T-bet	T-box transcription factor
TCR	T cell receptor
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
Th	Lymphocyte T helper
TLR	Toll-like receptors
TLSP	Thymic stromal lymphopoietin
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid
TNFα	Tumor necrosis factor alpha
Tr1	T regulatory type 1
T_{reg}	Lymphocyte T régulateur
Tris-HCL	Trishydroxyméthylaminométhane hydrochloridate
TxP	Thréonine-acide aminé quelconque-Proline
U, V, W, X, Y, Z	
UV	Ultra-Violet
VEGF	Vascular endothelial growth factor
XCL	XC chemokine ligand
ZAP-70	Zeta chain of T cell receptor associated protein kinase 70

Introduction

Les rhumatismes inflammatoires chroniques (RIC) regroupent l'ensemble des pathologies caractérisées par une inflammation articulaire qui persiste dans le temps. Cependant, l'inflammation articulaire fait intervenir des mécanismes cellulaires et moléculaires qui peuvent varier, selon le RIC donné et, pour un RIC donné, en fonction des patients. Il est donc nécessaire d'étudier les mécanismes physiopathologiques impliqués, pour mieux comprendre la genèse et le développement des pathologies inflammatoires articulaires, afin de choisir la stratégie thérapeutique la plus pertinente, de l'adapter à chaque patient (médecine personnalisée) et développer de nouveaux traitements qui pourraient être utilisés en cas d'échec ou d'échappement thérapeutiques

Plusieurs études cliniques montrent que le microbiote intestinal des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR) ou de Spondylarthrite (SpA) est modifié par comparaison à des sujets sains (Breban et al. 2017). D'autre part, de nombreuses études cliniques suggérant un lien potentiel entre les inflammations intestinale et digestive ont été rapportés dans la littérature. Ainsi, 5 à 10% des patients atteints de SpA développent une inflammation digestive. Réciproquement, 17 à 39% des patients souffrant de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) développent une inflammation articulaire nécessitant une prise en charge par un rhumatologue (Taurog, Chhabra, et Colbert 2016 et Gionchetti, Calabrese, et Rizzello 2015). Cependant, le lien de causalité entre les inflammations articulaire et intestinale chez ces patients reste actuellement mal compris, bien qu'elles fassent intervenir des acteurs cellulaires et moléculaires communs. La *lamina propria* intestinale est naturellement riche en cellules de l'immunité de type 3, comme les lymphocytes T helper (Th) Th17 et les cellules ILC3 (Innate Lymphoid cells 3). Ces cellules sont nécessaires à la protection de l'organisme en contrôlant les interactions avec les micro-organismes du tube digestif. Elles sont très présentes dans la muqueuse intestinale des patients atteints de MICI mais également dans la membrane synoviale des patients arthritiques. Ainsi, au cours de 10 dernières années, des auteurs ont proposé un modèle physiopathologique dans lequel les cellules immunitaires de la *lamina propria* intestinale auraient la capacité de migrer vers d'autres tissus et de participer au développement de pathologies inflammatoires extra-intestinales comme l'arthrite (Scher et Abramson 2011 et Ranganathan et al. 2017). Ce modèle permettrait notamment d'expliquer le développement d'une inflammation articulaire consécutivement à une inflammation digestive chez les patients atteints de MICI. Ainsi, un des objectifs de ce travail a été d'évaluer si une modification du microbiote intestinal, provoquée par une colite expérimentale chez la souris, affectait la sévérité d'une polyarthrite en cours de développement.

La différenciation lymphocytaire est un processus hautement régulé qui requiert l'expression de facteurs de transcription spécifiques. Ainsi, le facteur de transcription ROR γ t (RAR related orphan receptor gamma t) est nécessaire à la différenciation des lymphocytes Th17 et des cellules ILC3 (Ivanov et al. 2006), dont l'abondance est impliquée physiologiquement dans la lutte contre les agents infectieux mais dont l'excès peut conduire à une inflammation et/ou une auto-immunité. On peut donc supposer qu'une dérégulation de l'expression et/ou de l'activité de ROR γ t pourrait contribuer au lien entre inflammations articulaire et digestive.

Le récepteur nucléaire PPAR γ (Peroxisome proliferator activated receptor gamma) est un régulateur intrinsèque de la différenciation des lymphocytes Th17 et des ILC3 ; il réprime l'expression de ROR γ t (Klotz, Burgdorf, et al. 2009) et/ou son activité transactivatrice. Ce récepteur nucléaire est connu pour avoir des potentialités anti-inflammatoires dans de nombreuses pathologies ; ses agonistes ont notamment montré leur efficacité dans plusieurs modèles expérimentaux d'arthrite (Koufany et al. 2008 et Carregaro et al. 2016) et chez les patients souffrant de PR (Ormseth et al. 2013 et Marder et al. 2013). Le récepteur PPAR γ semble également avoir un rôle majeur dans l'homéostasie intestinale, puisqu'il contrôle, non seulement, la différenciation lymphocytaire mais module également la production de défensines antimicrobiennes (Peyrin-Biroulet et al. 2010). Ainsi, un autre objectif ce travail a été d'étudier le rôle régulateur du récepteur PPAR γ à l'interface entre le microbiote intestinal, l'immunité de type 3 et l'arthrite. Nous avons notamment étudié chez la souris les conséquences d'une déficience du récepteur PPAR γ sur le microbiote intestinal, l'immunité de type 3 et le développement d'une inflammation articulaire.

L'importance de l'immunité de type 3 dans les RIC est bien établie. Cependant, il semblerait qu'elle ne soit pas le seul acteur physiopathologique. Ainsi, chez certains patients la PR est associée à une éosinophilie (Sofi, Parrey, et Ahmad 2017) et d'autres cellules immunitaires peuvent intervenir. Le rôle des polynucléaires éosinophiles (PNE), des lymphocytes Th2 et des polynucléaires basophiles (PNB) dans cette pathologie reste mal compris mais leur présence au sein des articulations arthritiques suggère qu'ils pourraient participer au processus inflammatoire. Les PNE expriment à leur surface des récepteurs aux chimiokines dont le récepteur CCR3. Plusieurs études expérimentales montrent l'importance de l'axe CCR3-éotaxines dans l'inflammation articulaire (Ablin et al. 2010), notamment par la présence du récepteur CCR3 sur les cellules immunitaires, mais également sur les cellules résidentes de l'articulation comme les chondrocytes et les synoviocytes (Liu et al. 2017 et

Alaaeddine et al. 2001), et par l'augmentation du taux d'éotaxine dans les articulations arthritiques (Paquet et al. 2012).

Le chimiotactisme est impliqué dans le recrutement de cellules immunitaires aux sites inflammatoires dans les RIC. Mais, c'est avant tout un processus physiologique. Les muqueuses, et en particulier la muqueuse intestinale, sont constamment en interaction avec des agents extérieurs potentiellement dangereux pour l'organisme, comme les bactéries, les virus ou les champignons. Ainsi, des leucocytes sont présents au sein de ces muqueuses et dans les organes lymphoïdes secondaires situés à proximité de celles-ci. Les chimiokines sont des acteurs primordiaux à la fois pour le développement des structures lymphoïdes secondaires comme les ganglions mésentériques et les plaques de Peyer (PP), et pour la migration des leucocytes au sein des muqueuses (Comerford et al. 2013, Okada et al. 2002 et Mackley et al. 2015). Plusieurs cellules immunitaires naturellement présentes dans la muqueuse digestive, comme les PNE, expriment le récepteur CCR3 et participent notamment à la défense de l'organisme contre les parasites de type helminthes. Cependant, des études expérimentales suggèrent également que le blocage des récepteurs aux chimiokines diminuerait la sévérité de la colite expérimentale. Ainsi, le dernier objectif de ce travail était d'évaluer les conséquences de l'inhibition du récepteur CCR3 sur le développement d'une arthrite chez la souris et son impact sur l'immunité mucosale intestinale, en posant l'hypothèse de son implication possible dans la migration cellulaire entre le tube digestif et les articulations.

Rappel bibliographique

I. L'intestin, un réservoir à cellules immunitaires

I.1. Les cellules immunitaires de l'intestin grêle et leurs rôles

I.1.1. Rappel sur la structure de l'intestin

Les muqueuses sont des barrières à l'interface entre l'organisme et l'environnement extérieur. Elles sont en contact permanent avec de potentiels agents pathogènes. Ainsi, pour défendre l'organisme et maintenir un microbiote intestinal stable et bénéfique, le système immunitaire mucosal est très développé et continuellement actif.

Structurellement, l'intestin est composé de plusieurs couches ; de la lumière intestinale vers l'organisme on distingue la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse (**Figure 1**).

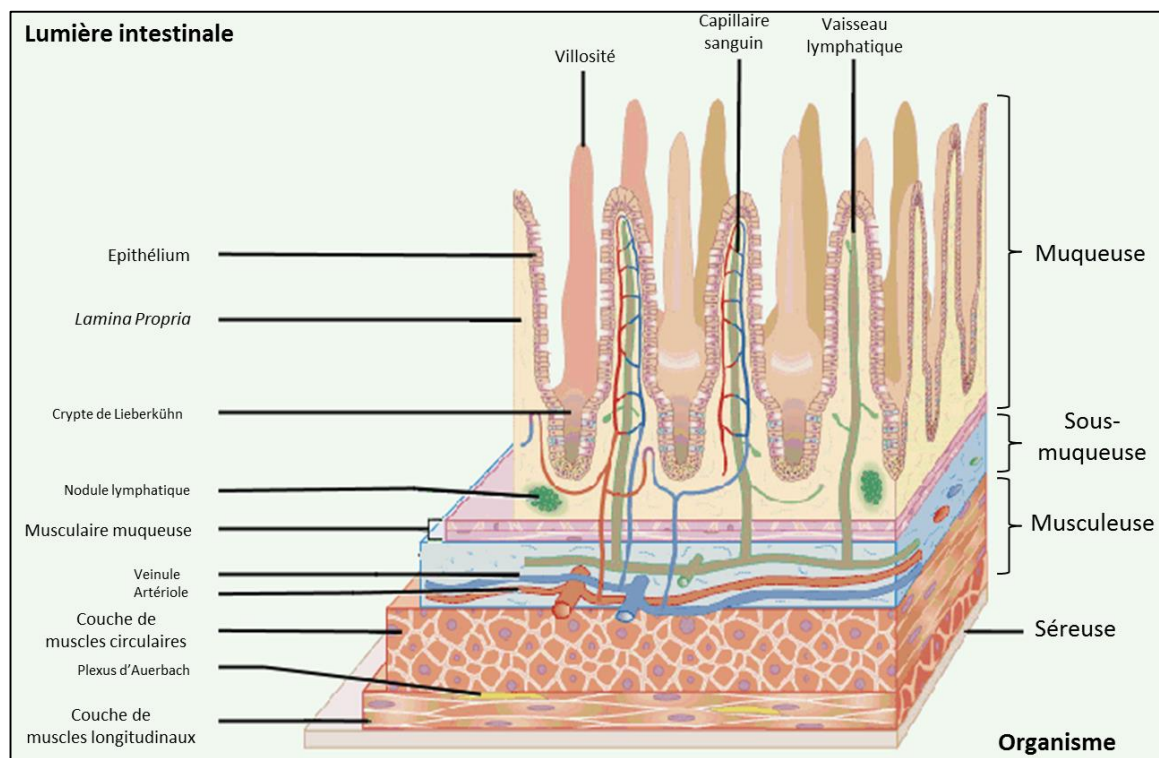


Figure 1: Représentation schématique de la structure de l'intestin

Modifié de <https://anatomytopics.wordpress.com/2008/12/20/20-the-anatomy-histology-and-development-of-the-small-intestine/>

I.1.1.1. La muqueuse

La muqueuse est subdivisée en trois couches : l'épithélium intestinal, la *lamina propria* (aussi appelée chorion), et la *muscularis mucosae* (ou musculaire muqueuse).

L'**épithélium** est une barrière physique qui empêche l'entrée de micro-organismes dans l'organisme. Il est composé principalement de cellules absorbantes, aussi appelées *entérocytes*

ou CEI pour cellules épithéliales intestinales. Le rôle premier de ces cellules est de transférer les nutriments de la lumière intestinale vers les vaisseaux sanguins. Les entérocytes sont liés les uns aux autres par des jonctions serrées (tight junctions, zonula occludens), des desmosomes (zonula adherens) et des jonctions communicantes (gap junctions) et le transfert des nutriments nécessite des transporteurs particuliers. Ainsi, cette organisation empêche l'entrée de pathogènes dans l'organisme.

L'épithélium intestinal est composé de plusieurs types de cellules dont la plupart participe au maintien de l'homéostasie intestinale (**Figure 2**). Les *cellules de Paneth* sont préférentiellement situées à la base des cryptes de Lieberkühn. Elles ont une forme pyramidale et stockent dans leur région apicale des granules protéiques contenant notamment des lysozymes, des défensines (α -défensines et β -défensines) et des cytokines pro-inflammatoires. Ces cellules déversent le contenu de leurs granules dans la lumière intestinale pour éliminer les micro-organismes s'approchant de l'épithélium. Des cytokines telles que l'IL-17 (Interleukine-), le TNF α (Tumor necrosis factor α), l'IL-1 β et l'IL-22 stimulent la production de défensines par les cellules épithéliales (Fruitwala, El-Naccache, et Chang 2018). Les β -défensines ont une activité antimicrobienne large spectre ; elles luttent contre les bactéries, les mycobactéries, les levures et les virus avec et sans enveloppe. Les défensines ciblent directement les micro-organismes, par exemple en perméabilisant les membranes bactériennes ou en inhibant la synthèse d'ARN (acide ribonucléique) et de protéines (Ganz 2003). Elles peuvent aussi agir indirectement sur les micro-organismes en induisant le recrutement et l'activation de cellules immunitaires ; elles ont alors un pouvoir chimioattractant.

Les peptides antimicrobiens peuvent aussi avoir une activité anti-inflammatoire. Les souris déficientes pour la métalloprotéase (MMP) 7 ne produisent pas d' α -défensines dans leur intestin. Ces souris présentent une production d'IL-1 β intestinale plus importante que des souris sauvages de même fond génétique et sont plus susceptibles au développement d'une colite induite par dissolution de dextran sulfate sodium (DSS) dans l'eau de boisson. Les α -défensines bloquent la libération de l'IL-1 β produit par les monocytes stimulés par le lipopolysaccharide (LPS) bactérien (Shi et al. 2007).

Les *cellules caliciformes*, aussi appelées *cellules à mucus*, sont insérées entre les entérocytes. Elles synthétisent le mucus qui lubrifie et protège l'épithélium intestinal. Le mucus est composé principalement de glycoprotéines, et notamment de mucines, lui conférant une texture visqueuse capable de piéger des bactéries, limitant ainsi leur contact avec l'épithélium

intestinal. Ce sont des protéines riches en glycanes, ce qui leur permet de résister aux enzymes protéolytiques endogènes et microbiennes et d'ainsi maintenir la texture du mucus. Des peptides antimicrobiens sont présents dans le mucus. Il s'agit notamment des défensines (α -défensines et β -défensines), des cathelicidines et du lysozyme (ou muramidase), une enzyme catalysant l'hydrolyse des glycosaminoglycanes constituant la paroi bactérienne (Kopp et al. 2015). D'autres protéines antimicrobiennes sécrétées dans le mucus, comme Reg (Regenerating islet-derived protein) 3 α chez l'homme et Reg3 γ chez la souris, et la lipocaline-2, sont impliquées dans l'homéostasie intestinale. Des études montrent l'importance de ces protéines. Les souris déficientes pour la protéine Reg3 γ présentent une altération de la distribution du mucus, une augmentation du contact entre les micro-organismes et l'épithélium intestinal et une sécrétion plus importante de cytokines pro-inflammatoires dans l'iléon (Loonen et al. 2014). Des cytokines libérées par les cellules épithéliales en réponse à des stimuli sont également dans le mucus. Des anticorps tels que des immunoglobulines (Ig) sécrétées, en particulier des IgA produits par les plasmocytes de la muqueuse intestinale, jouent un rôle important dans la régulation du microbiote intestinale et dans l'élimination des pathogènes.

L'épithélium intestinal contient également les *cellules « Microfold »* aussi appelées *cellules M*. Ces cellules sont insérées entre les entérocytes au niveau des plaques de Peyer (PP). Ces cellules sont à l'interface entre le microbiote intestinal et l'immunité mucosale. Elles sont hautement spécialisées dans la phagocytose et la transcytose des micro-organismes ; elles activent les cellules immunitaires présentes dans les PP et participent ainsi à la régulation du microbiote intestinal.

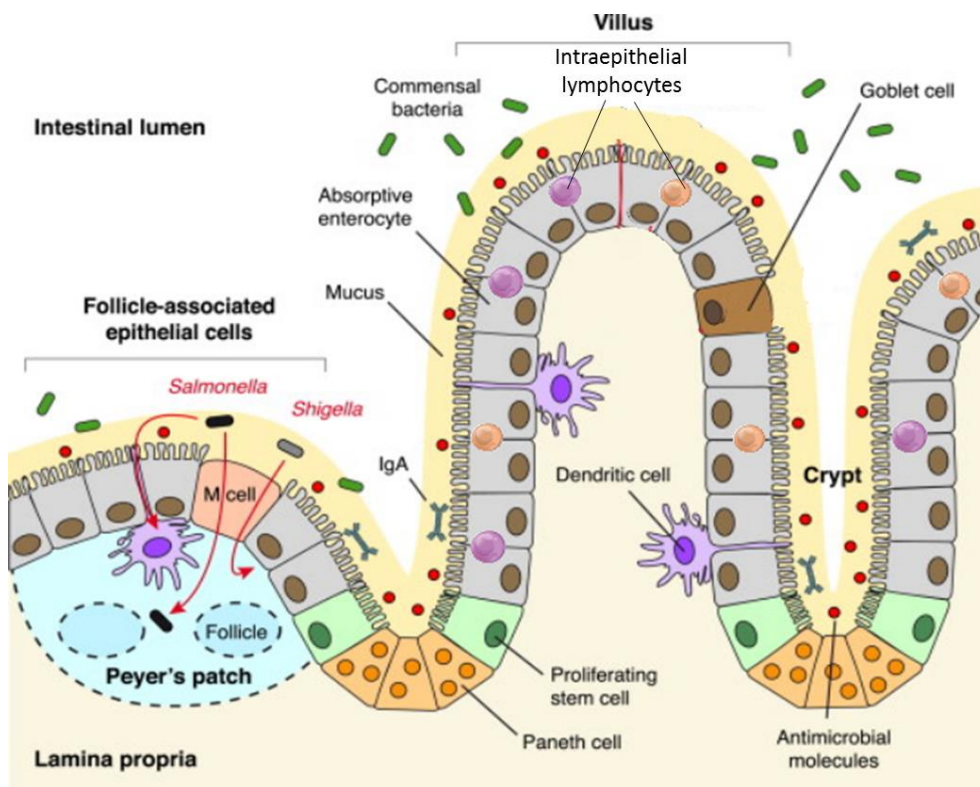


Figure 2 : Illustration des principaux mécanismes de l'épithélium intestinal impliqués dans l'homéostasie intestinale

D'après Ribet et Cossart 2015

D'autres cellules composent l'épithélium intestinal mais ne participent pas directement à la protection de l'organisme. Il s'agit des cellules entéro-endocrines et des cellules indifférenciées. Les *cellules entéro-endocrines* sont disséminées entre les entérocytes et il en existe au moins une dizaine de types qui sécrètent des hormones (gastrine, ghréline, sécrétine...) régulant les étapes de la digestion, comme la vidange gastrique, la sécrétion d'insuline par le pancréas ou la satiété. Les *cellules indifférenciées* sont localisées à la base des cryptes de Lieberkühn. Elles se divisent perpétuellement pour régénérer les différents types cellulaires de l'épithélium intestinal. Leur division est lente ; elles donnent naissance, dans un premier temps, à des cellules dites transitoires (ou intermédiaires) qui se divisent plus rapidement. Ces cellules migrent ensuite vers la surface de l'épithélium et progressivement se différencient en entérocytes, cellules caliciformes ou cellules entéro-endocrines. Elles peuvent aussi rester au niveau des cryptes pour se différencier en cellules de Paneth. La division des cellules indifférenciées est asymétrique ; une des deux cellules filles se différencie alors que la seconde reste souche.

La ***lamina propria***, sous-jacente à l'épithélium, est un tissu conjonctif lâche. L'épithélium est séparé de la *lamina propria* par la membrane basale. La *lamina propria* contient les glandes (ou cryptes) de Lieberkühn, qui résultent de l'invagination de l'épithélium. Ces glandes exocrines sont donc composées d'entérocytes, de cellules de Paneth, de cellules caliciformes et de cellules entéro-endocrines. Elles participent à la production de mucus et d'enzymes digestives ou antibactériennes. La *lamina propria*, qui est richement vascularisée, est responsable de l'irrigation de l'épithélium. Elle contient aussi des MALT (tissu lymphoïde associé à la muqueuse) qui participent à la défense de l'intestin. Au niveau du tractus digestif, les MALT sont appelés « tissus lymphoïdes associés à l'appareil digestif », ou GALT.

La ***muscularis mucosae*** est située à l'interface entre la *lamina propria* et la sous-muqueuse. C'est une fine couche de cellules musculaires lisses qui est responsable des mouvements locaux de la muqueuse.

I.1.1.2 La sous-muqueuse

La sous-muqueuse est un tissu conjonctif contenant les vaisseaux sanguins et lymphatiques, ainsi que les terminaisons nerveuses. Elle renferme le *plexus nerveux de Meissner* (ou plexus sous-muqueux) qui contient les neurones contrôlant la sécrétion des glandes et le débit sanguin local. La sous-muqueuse est plus épaisse au niveau du duodénum ; elle contient au niveau de ce segment les *glandes de Brunner* qui produisent du mucus riche en ions bicarbonates permettant de neutraliser l'acidité du chyme stomacal.

I.1.1.3. La musculature

La musculature est composée de deux couches de tissu musculaire lisse, une couche interne circulaire et une couche externe longitudinale. La couche interne est plus épaisse que la couche externe, elle contient davantage d'afférences nerveuses. La musculature est impliquée dans les mouvements de péristaltisme et de segmentation. Ces deux couches sont séparées par le *plexus nerveux d'Auerbach* et par les *cellules interstitielles de Cajal* qui contrôlent la vitesse du péristaltisme. Les cellules interstitielles de Cajal produisent les ondes électriques lentes nécessaires à la contraction des fibres musculaires ; elles sont ainsi responsables de l'automatisme de l'intestin (rôle pacemaker) et de la synchronisation de l'activité contractile des cellules musculaires lisses. Les cellules de Cajal sont également étroitement liées aux neurones entériques (via des varicosités) ; elles auraient ainsi un rôle dans la transmission de messages nerveux aux cellules musculaires lisses (Al-Shboul 2013).

I.1.1.4. La séreuse

La séreuse correspond à la couche viscérale du péritoine. Le mésentère est fixé à la séreuse.

I.1.2. Rappel sur les structures intestinales hébergeant les cellules immunitaires

De nombreuses cellules immunitaires sont présentes dans l'épithélium intestinal et la *lamina propria*. Le microbiote intestinal, présent dans la lumière digestive, est en interaction permanente avec ces cellules. Dans les conditions physiologiques, il existe un équilibre entre le système immunitaire intestinal et le microbiote. En effet, le système immunitaire contrôle la prolifération des micro-organismes de la lumière intestinale et permet ainsi au microbiote d'avoir une composition stable au cours du temps. En contrepartie, les micro-organismes du microbiote stimulent constamment le système immunitaire afin de le maintenir en veille contre de potentiels agents infectieux. Le système immunitaire intestinal doit donc lutter efficacement contre les pathogènes tout en ayant une tolérance pour les micro-organismes commensaux du microbiote. Le système immunitaire du tractus intestinal contient, à la fois, un tissu lymphoïde diffus, riche en cellules appartenant aux immunités innée et adaptative, et des structures organisées comme les ganglions mésentériques et les GALT (**Figure 3**).

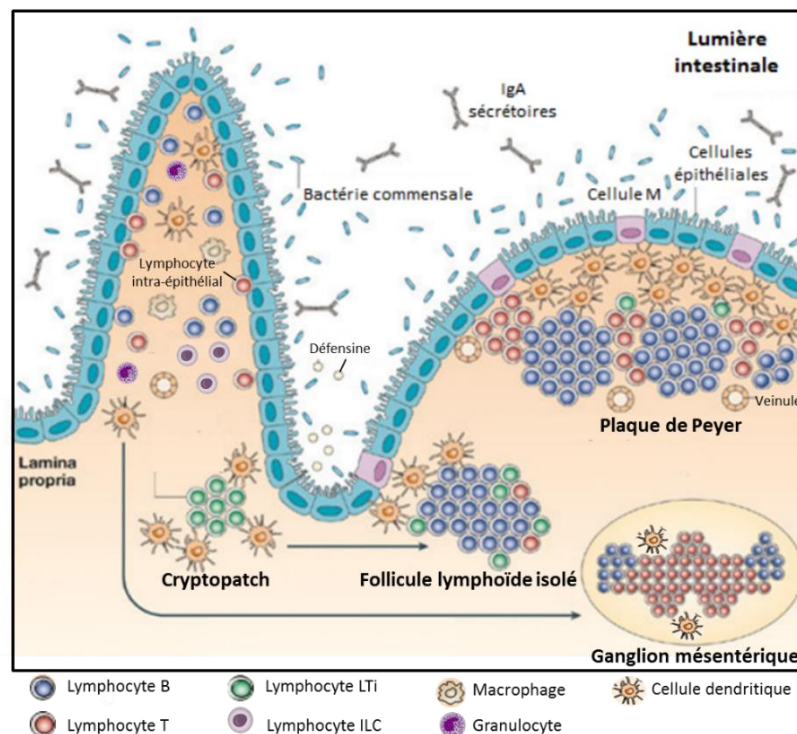


Figure 3 : Représentation schématique des structures de l'intestin hébergeant les cellules immunitaires

Modifié de Eberl 2005

Le tissu lymphoïde diffus représente notamment les cryptopatches, qui sont les précurseurs des follicules lymphoïdes isolés (FLI), et les cellules immunitaires localisées dans l'épithélium intestinal, principalement des lymphocytes T (lymphocytes intra-épithéliaux ou LIE), et dans la *lamina propria* (leucocytes de la *lamina propria* ou LLP). Les GALT comprennent notamment les amygdales, les PP et l'appendice.

I.1.2.1. Les cryptopatches et les follicules lymphoïdes isolés (FLI)

Les cryptopatches sont des petits groupes de cellules localisés sous l'épithélium de l'intestin grêle. Ces structures se mettent en place dès la naissance par accumulation de cellules appelées « lymphoid-tissue inducer cell », ou LTi, qui expriment les marqueurs ROR γ t (RAR related orphan receptor gamma t) et IL-7Ra (Interleukine receptor) (cellules LTi ROR γ ⁺IL7Ra⁺). Ces cellules s'associent à des cellules stromales, les lymphocytes LTo (pour Lymphoid-tissue organizer cell). Les cellules LTi ROR γ ⁺IL7Ra⁺ sont indispensables à la formation des cryptopatches ; la délétion du récepteur ROR γ t chez la souris provoque l'absence de ces structures (Eberl et Littman 2004). Progressivement, des lymphocytes B sont recrutés au niveau des cryptopatches et cette étape marque l'évolution des cryptopatches en FLI immatures. Puis les lymphocytes B s'accumulent et quelques lymphocytes T CD (cluster of differentiation) 4⁺ s'associent au follicule. Cette étape marque la formation de FLI matures. Cette structure possède un centre germinatif vascularisé où les lymphocytes B deviennent matures et produisent des anticorps de type IgA. Les FLI matures possèdent un nombre variable de cellules. Des cellules dendritiques (CD) permettent le développement et le maintien des follicules tout au long de la maturation du cryptopatch. Les FLI sont à proximité des cellules M, ce qui favorise la translocation des antigènes de la lumière intestinale aux cellules immunitaires.

I.1.2.2. Les lymphocytes intra-épithéliaux (LIE)

Les lymphocytes intraépithéliaux (LIE) sont des cellules résidentes de la muqueuse intestinale, qui ne peuvent pas migrer vers d'autres sites anatomiques (**Figure 2**). Leur entrée et leur rétention dans l'intestin sont en partie dues à leur interaction avec les entérocytes. En effet, les LEI expriment l'intégrine α E β 7 (ou CD103) capable de se lier avec l'E-cadhérine exprimée par les entérocytes. Il a été dénombré en moyenne 10 LIE pour 100 CEI dans l'intestin grêle, sachant que le duodénum est la partie de l'intestin grêle la plus riche en LIE, et ce ratio décroît progressivement tout au long de l'intestin pour atteindre un rapport de 2 à 5 LEI pour

100 colonocytes dans le colon. Les LEI sont des populations lymphocytaires hétérogènes ; ils sont subdivisés en sous-populations.

Les LIE peuvent soit exprimer des caractéristiques des lymphocytes périphériques, soit posséder des caractéristiques qui leurs sont propres. Le récepteur des lymphocytes T (TCR pour T cell receptor) permet une première classification des LEI. La majorité des LEI exprime ce récepteur (cellules TCR⁺), mais 10% de ceux-ci sont négatifs pour ce récepteur (cellules TCR⁻). Le TCR des LEI peut être constitué soit des chaînes classiques α et β (TCR $\alpha\beta$), soit des chaînes γ et δ (TCR $\gamma\delta$). Les LIE possédant un TCR $\alpha\beta$ peuvent exprimer les récepteurs CD4 et/ou CD8. Les cellules exprimant les récepteurs TCR $\alpha\beta$ et CD4, principalement des lymphocytes T helper (Th) Th1 et Th17, ou les récepteurs TCR $\alpha\beta$ et CD8 proviennent de sites extra-intestinaux, elles ont migré en réponse à des stimuli et ont pour rôle de lutter contre des pathogènes (D. Masopust et al. 2001). Les cellules exprimant le TCR $\gamma\delta$ participent à la défense de l'organisme en produisant des peptides antimicrobiens tels que la protéine Reg3 (Ismail et al. 2011). Les lymphocytes n'exprimant pas le TCR ont des caractéristiques des lymphocytes innés ILC (Innate lymphoid cell) 1 (ILC1-like) et ILC3 (ILC3-like). En effet, chez l'homme, des cellules présentant un phénotype caractéristique des lymphocytes ILC3 ont été détectés au sein de l'épithélium intestinal. Ces cellules expriment notamment le récepteur Nkp44 et le facteur de transcription ROR γ t (Talayero et al. 2016).

I.1.2.3. Les plaques de Peyer (PP)

Les PP, majoritairement situées au niveau de l'iléon, sont composées de follicules contenant des lymphocytes B (dont les plasmocytes produisant des anticorps de type IgA) et des amas de lymphocytes T. Les PP sont des organes lymphoïdes bien structurés ; les zones de lymphocytes T sont bien distinctes de celles des lymphocytes B et des CD maintiennent ces structures. Elles sont vascularisées. Les PP commencent à se mettre en place au cours du développement embryonnaire et leur maturation se poursuit à la naissance. Les lymphocytes LT_i sont importants dans la formation de ces structures puisque les souris déficientes pour le récepteur ROR γ t ne développent pas de PP (Sun et al. 2000). Les cellules LT_i colonisent progressivement la muqueuse intestinale au cours de l'embryogenèse puis interagissent avec les lymphocytes LT_o pour former les PP (Veiga-Fernandes et al. 2007). Ensuite, les zones de lymphocytes B et de lymphocytes T se mettent progressivement en place.

I.1.2.4. Les ganglions mésentériques

Ces ganglions sont localisés dans le mésentère qui enveloppe l'intestin. Ils sont constitués de lymphocytes T et B et de CD. Leur développement commence au cours de l'embryogenèse et nécessite les lymphocytes LTi. Comme pour les PP, les souris déficientes pour le récepteur ROR γ t ne développent pas de ganglions mésentériques (Eberl et al. 2004 et Sun et al. 2000). Ces ganglions sont en liens étroits avec l'immunité intestinale puisque des vaisseaux lymphatiques et sanguins permettent la migration des cellules de la muqueuse intestinale vers les ganglions et inversement. Ainsi, les CD activées au niveau de l'intestin migrent vers les ganglions mésentériques où elles peuvent activer les lymphocytes qui en retour vont exercer leur action au niveau de l'épithélium intestinal.

I.1.2.5. Les leucocytes de la *lamina propria* (LLP)

La *lamina propria* est un tissu conjonctif riche en cellules immunitaires, qui sont localisées dans les GALT mais aussi de façon diffuse dans le tissu. De nombreux types cellulaires sont présents comme des lymphocytes T, des lymphocytes B et des plasmocytes sécrétant des immunoglobulines (Ig) de type IgA, des macrophages, des CD, des ILC et des granulocytes. Parmi les lymphocytes T, on retrouve des lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺. Ainsi, de nombreux acteurs cellulaires œuvrent à la défense de l'organisme et leur intervention dépend du type d'agression (Eberl 2016). On distingue quatre types d'immunité (**Figure 4**). L'immunité de type 1 qui permet de lutter contre les agressions intracellulaires, comme les virus, les bactéries intracellulaires, les protozoaires et les cellules cancéreuses. L'immunité de type 2 qui fait face aux menaces extracellulaires, comme les helminthes mais réagit également face aux allergènes. Et l'immunité de type 3 qui agit contre les micro-organismes extracellulaires, comme les bactéries extracellulaires et les levures mais peut également contribuer au processus d'auto-immunité. Il existe un équilibre entre ces trois types d'immunité et l'activation d'une d'entre elles entraîne l'inhibition des autres, ce qui permet une réponse efficace et appropriée contre un pathogène donné (Eberl 2016). Chacun de ces quatre types d'immunité est caractérisé par des marqueurs de différenciation spécifiques exprimés par l'ensemble des cellules impliquées dans la réponse (Annunziato et al. 2015). L'immunité de type 1 est caractérisée par l'expression du facteur de transcription T-bet (T-box transcription factor). Cette immunité regroupe des cellules de l'immunité adaptative comme les lymphocytes Th1 et des cellules appartenant à l'immunité innée comme les ILC1 et les cellules NK (Natural Killer). L'immunité de type 2 est caractérisée par le facteur de transcription GATA-3 (GATA

binding protein 3). Les lymphocytes Th2 et des cellules de l'immunité innée comme les ILC2, les PNE, les PNB et les macrophages de type 2 relèvent de cette immunité. Le facteur de transcription ROR γ t est le marqueur des cellules de l'immunité de type 3 (Ivanov et al. 2006). Cette dernière implique des lymphocytes Th17, Tc17 et les cellules ILC3. Une immunité régulatrice a pour objectif de maintenir la tolérance immunitaire et de réguler l'activité des cellules supportant les différentes réponses immunes effectrices. Les cellules appartenant à cette immunité sont notamment les lymphocytes T régulateurs (T_{reg}) et les lymphocytes B régulateurs (B_{reg}). L'ensemble de ces cellules contribue à l'homéostasie intestinale.

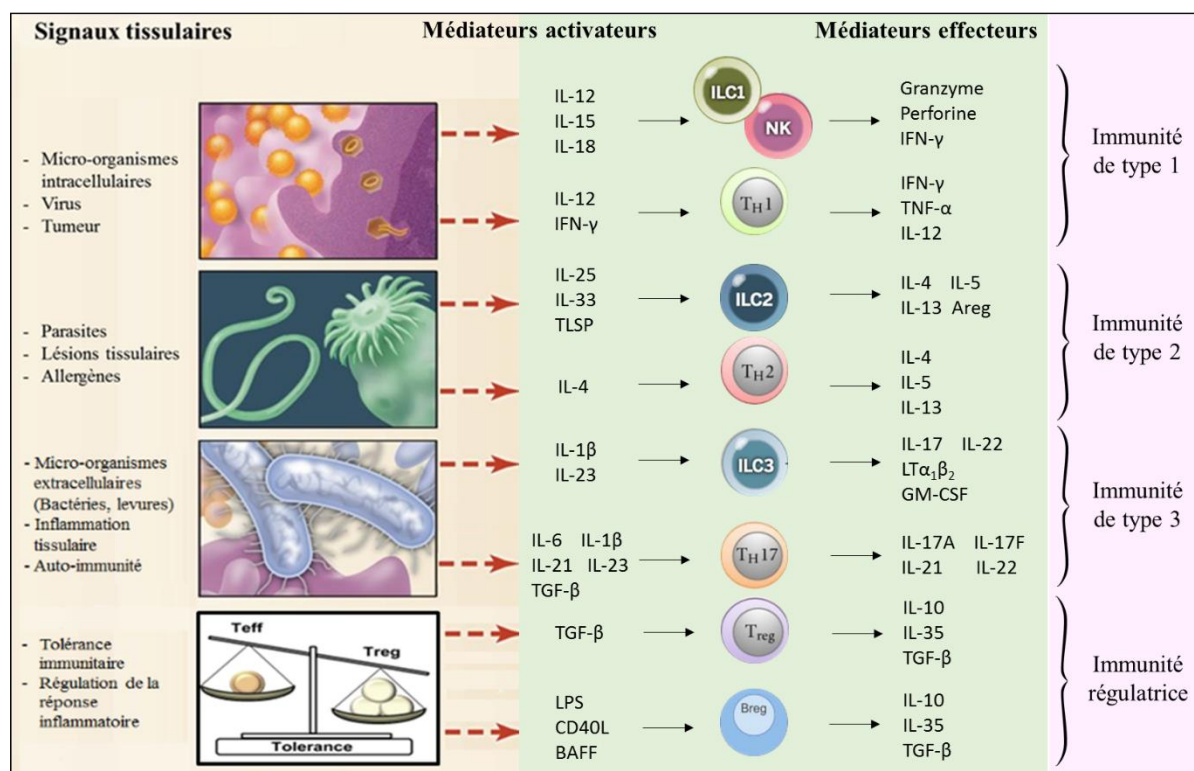


Figure 4 : Représentation schématique de l'activation et de la réponse des immunités de types 1, 2, 3 et de l'immunité régulatrice.

Modifié de Eberl et al. 2015 et Moy Andrea et al. 2016

I.1.3. Les cellules immunitaires de la muqueuse intestinale

I.1.3.1. Les cellules de l'immunité innée

De nombreuses cellules de l'immunité innée sont présentes dans la muqueuse intestinale. Ces cellules participent au maintien de l'homéostasie intestinale et agissent lors de la présence d'un danger. Ici, nous nous intéressons aux principales cellules de l'immunité innée impliquées dans la défense de la barrière intestinale et aux cellules d'intérêt pour notre étude (Figure 5).

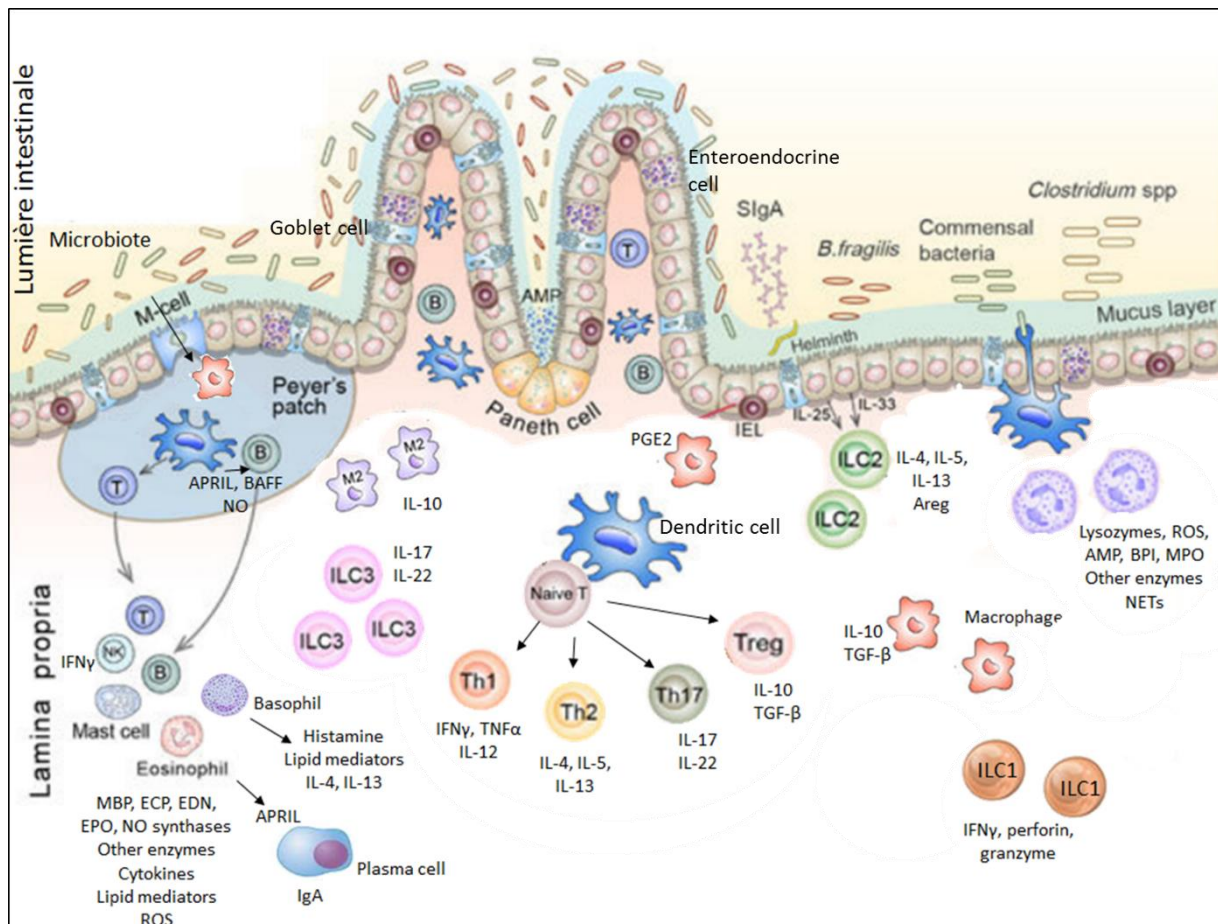


Figure 5 : **Illustration des principales cellules immunitaires présentes au sein de la lamina propria intestinale et de leurs sécrétions**

D'après M. Sun et al. 2015

✧ Les polynucléaires neutrophiles (PNN)

Les granulocytes neutrophiles, ou polynucléaires neutrophiles (PNN) sont présents en grande quantité dans l'organisme. Ils représentent 50 à 60% des leucocytes du sang. Leur mission principale est de repérer et de détruire les bactéries pénétrant dans l'organisme. Les PNN sont des acteurs importants au sein de la muqueuse intestinale ; ce sont les premières cellules recrutées lors d'une inflammation digestive. Les PNN sont produits au sein de la moelle osseuse hématopoïétique puis ils migrent jusque dans la muqueuse intestinale où ils exercent leur rôle. Lors de l'entrée d'un antigène dans la muqueuse, les PNN sont activés. Les PNN luttent contre les agents potentiellement dangereux pour l'organisme grâce à plusieurs mécanismes.

Le cytoplasme des PNN est riche en granules contenant des protéines impliquées dans la lyse des bactéries. On distingue deux types de granulations, les granulations primaires azurophiles et les granulations secondaires (Borregaard, Sørensen, et Theilgaard-Mönch 2007).

Les premières contiennent des lysozymes, des peptides antimicrobiens (comme des α -défensines (HNP (human neutrophil peptides) -1, HNP-2, HNP-3, HNP-4)), des protéines bactéricides ou augmentant la perméabilité (bactericidal/permeability-increasing protein (BPI)) et la myéloperoxydase (MPO). Les granulations secondaires sont riches en lysozymes, collagénase et lactoferrine. Les PNN possèdent aussi des granules contenant des gélatinases et des vésicules sécrétoires. Ils produisent des gélatinases et en particulier la lipocaline-2 aussi appelée NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) (Borregaard, Sørensen, et Theilgaard-Mönch 2007). Ces cellules sont capables de phagocyter des micro-organismes. Ainsi, elles piègent l'agent infectieux puis elles libèrent des protéines stockées dans les granules et synthétisent de grandes quantités d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et d'espèces réactives d'azote (ERA) pour le détruire (Zhou et Liu 2017). Les PNN possèdent notamment l'enzyme NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) oxydase permettant la production de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) très toxique pour les micro-organismes (Petry, Weitnauer, et Görlach 2010). Ils agissent également sur leur environnement proche en libérant le contenu de leur granule. Cette dégranulation permet d'éliminer certains agents pathogènes sans les phagocyter. Les PNN sécrètent également des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-17. Un autre mécanisme d'action de défense est la formation de NETs (neutrophils extracellular traps) (Brinkmann et al. 2004). Ces structures sont composées d'ADN (acide désoxyribonucléique) associé à de nombreuses protéines comme des histones et des protéines issues des granules cytoplasmiques. Les NETs sont formés suite à la reconnaissance d'un antigène. Ils sont issus de la décondensation et de la diffusion de la chromatine ; celle-ci occupe alors un volume plus important au sein de la cellule et l'apoptose du PNN est activée. La libération du contenu cellulaire permet de piéger des micro-organismes environnant (Delgado-Rizo et al. 2017). Enfin, les PNN peuvent traverser l'épithélium et rejoindre la lumière intestinale où ils libèrent des précurseurs de l'adénine, en particulier de l'adénosine triphosphate (ATP) et de l'adénosine diphosphate (ADP). Ces substrats sont hydrolysés par des enzymes CD39 et CD73 présentes à la surface des cellules épithéliales ; le pool d'adénosine extracellulaire stimule la fermeture des jonctions entre les cellules épithéliales (Colgan, Fennimore, et Ehrentaut 2013).

Par leurs différents mécanismes d'action, les PNN sont impliqués dans la régulation du microbiote et sont indispensables au maintien de l'homéostasie intestinale. En effet, des pathogènes intestinaux comme *Campylobacter concisus* sont capables de les activer *in vitro* (Sørensen et al. 2013) en stimulant l'expression de molécules d'adhésion à leur surface et leur

activité oxydative. Les bactéries *Salmonella enterica* de sérotype Typhimurium et *Shigella flexneri* provoquent le développement de pathologies entériques. Ces bactéries sont capables d'induire la migration des PNN à travers l'épithélium intestinal pour éliminer le pathogène (Mumy et al. 2008). De plus, le blocage de l'adhésion des PNN ou leur déplétion aggravent les colites induites par injection d'acide trinitrobenzène sulfonique ou d'acide dinitrobenzène sulfonique (respectivement TNBS et DNBS) (Kühl et al. 2007). Par ailleurs, des patients atteints de la maladie de Crohn (MC) présentent une altération dans le recrutement des PNN ou dans la fonction de ces cellules. Ainsi, les PNN périphériques de ces patients présentent une altération de la migration trans-épithéliale et de la production de ERO en réponse à un stimulus (Somasundaram et al. 2013). Certains patients atteints de cette pathologie ont des taux réduits d'IL-8 (aussi appelée CXCL (CXC chemokine ligand) 8), une cytokine importante dans le recrutement de ces cellules (Korzenik 2007).

✧ Les macrophages

Au sein de la muqueuse intestinale réside un grand nombre de macrophages qui expriment des marqueurs différents ; ce sont des cellules hétérogènes qui participent au maintien de l'homéostasie intestinale. Dans les conditions physiologiques, ils protègent l'intestin de l'inflammation. Ils sont localisés tout au long du tube digestif et sont présents à proximité de l'épithélium intestinal comme dans les couches profondes. Les macrophages veillent à l'intégrité de l'épithélium intestinal ; ils sécrètent de la prostaglandine E2 (PGE2) au niveau des cryptes pour stimuler la prolifération des cellules souches (Bain et Mowat 2014). Les cellules M, insérées dans l'épithélium intestinal, piègent des antigènes de la lumière intestinale et les transfèrent aux cellules des PP. Des macrophages peuvent recevoir ces antigènes et activer la réponse adaptative, ils ont alors le rôle de cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Les macrophages possèdent une fonction importante pour l'homéostasie intestinale : la phagocytose. Ils phagocytent et éliminent les cellules sénescents ou apoptotiques ou encore des micro-organismes (Nagashima et al. 1996).

Classiquement les macrophages sont répartis en deux catégories, les macrophages M1, sécrétant principalement des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α et l'IL-12, et les macrophages M2, producteurs de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10. Les macrophages résidents de la *lamina propria* possèdent certaines caractéristiques des macrophages M1 et d'autres des macrophages M2 ; ils n'appartiennent à aucune des deux catégories (Bain et Mowat 2014). Ils expriment le complexe majeur d'histocompatibilité de

classe (CMH) II mais pas les molécules de co-stimulation, telles que CD40, CD80 et CD86, ce qui limite l'activation des lymphocytes (Smith et al. 2011 et Carlsen et al. 2006). Les macrophages de l'intestin expriment certains récepteurs TLR (Toll-like receptor) mais l'activité de ceux-ci est limitée (Bain Calum C. et Mowat Allan McI. 2011). La stimulation de ces cellules avec des protéines bactériennes telles que le LPS n'induit pas la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme le $\text{TNF}\alpha$, l'IL-1 β et l'IL-6 (Smythies et al. 2010). Les macrophages intestinaux synthétisent des cytokines anti-inflammatoires, en particulier l'IL-10 et le TGF- β (transforming growth factor beta). L'IL-10 maintient l'expression du facteur de transcription FoxP3 (forkhead box 3) dans les lymphocytes T_{reg} , ce qui favorise un contexte anti-inflammatoire au sein de la muqueuse intestinale (Murai et al. 2009). Lors d'une infection digestive l'IL-10 produit par les macrophages limite l'inflammation intestinale en réduisant le niveau d'IL-23 (Krause et al. 2015). Les macrophages résidents de la *lamina propria* peuvent être classés selon l'expression du récepteur CD169 (Asano et al. 2015) et ils sont répartis différemment dans la muqueuse selon son expression. Ainsi, les macrophages exprimant le récepteur CD169 (macrophages CD169⁺) résident dans les couches profondes de l'intestin. Le rôle de ces macrophages CD169⁺ est de recruter des monocytes circulant lors d'une rupture de la perméabilité de la barrière intestinale *via* la sécrétion de la chimiokine CCL8 (CC chemokine ligand).

Des macrophages de types M1 et M2 sont également présents dans la muqueuse intestinale. L'activité des macrophages dépend de leur environnement. Les macrophages M2 sont notamment induits par les cytokines IL-4 et IL-13 et sécrètent des médiateurs anti-inflammatoires tels que l'IL-10. Ils ont un rôle important dans la résolution de l'inflammation et contribuent à la réparation du tissu lésé. Les macrophages M1 sont, quant à eux, stimulés par des stimuli inflammatoires tels que l'IFN γ (interferon gamma) et des produits bactériens comme le LPS. L'activation des macrophages M1 conduit à la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires, en particulier du $\text{TNF}\alpha$, de l'IL-1 β , de l'IL-6 et du NO (monoxyde d'azote). Des métabolites bactériens, comme le butyrate, sont capables d'induire la polarisation des macrophages M2 ; ils favorisent ainsi la tolérance immunitaire (Ji et al. 2016).

✧ Les polynucléaires basophiles (PNB) et les mastocytes

Les polynucléaires basophiles (PNB) et les mastocytes ont des fonctions relativement proches et possèdent des caractéristiques communes. Ils expriment le récepteur de haute affinité aux immunoglobulines de type E (IgE) (récepteur $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$) et sécrètent des

médiateurs communs tels que l'histamine, des médiateurs lipidiques (leucotriènes et prostaglandines), des protéases et des cytokines (IL-4, IL-13 notamment) (Falcone, Zillikens, et Gibbs 2006). Les PNB et les mastocytes ont un rôle majeur dans la défense contre les parasites. Ils protègent l'organisme contre les helminthes *via* la sécrétion d'IL-4 et d'IL-13. Par exemple, des antigènes de l'helminthe *Nippostrongylus brasiliensis* stimulent la production de ces cytokines et lors d'une infection par ce pathogène, des mastocytes et des PNB sont présents au sein de la *lamina propria* de l'intestin grêle des souris (Ohnmacht et Voehringer 2009).

Les PNB et les mastocytes jouent aussi un rôle important dans les allergies (Falcone, Zillikens, et Gibbs 2006). Ces cellules sensibles aux IgE dégranulent rapidement lors d'une allergie, libérant ainsi des médiateurs préformés comme les leucotriènes et de l'histamine, ce qui permet une réponse rapide. L'IL-4 produite par ces cellules permet la polarisation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th2. *In vitro*, les PNB activés synthétisent de l'IL-4, de l'IL-13 et le ligand du récepteur CD40 (CD40L) (Yanagihara et al. 1998). Ces trois acteurs stimulent la production d'IgE par les lymphocytes B.

✧ Les polynucléaires éosinophiles (PNE)

Les polynucléaires éosinophiles (PNE) sont impliqués dans la réponse contre des parasites tels que des métazoaires et dans les réactions allergiques. Ils sont produits dans la moelle osseuse hématopoïétique puis migrent *via* la circulation sanguine vers les tissus, grâce au chimiotactisme (Ramirez et al. 2018). La différenciation et la maturation des PNE nécessite des cytokines telles que l'IL-5, l'IL-3 et le GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor). L'IL-5 est particulièrement importante pour ces cellules ; elle intervient dans les derniers stades de leur différenciation, déclenche leur migration vers les tissus et veille à leur survie. Dans les conditions physiologiques, les PNE sont présents dans plusieurs organes, comme dans les poumons, la rate et le tractus digestif où ils participent au maintien de l'homéostasie tissulaire.

Dans l'intestin grêle, les PNE sont majoritairement localisés dans la *lamina propria*, seuls quelques-uns sont présents au sein des PP. Leur cytoplasme contient des granules riches en protéines telles que la MBP (major basic protein), qui est une protéine cytotoxique affectant aussi bien les bactéries, les parasites, les champignons que les cellules animales, et les protéines ECP (eosinophil cationic protein) et EDN (eosinophil derived neurotoxin). Ces granules contiennent aussi des enzymes comme des peroxydases (EPO (eosinophil peroxidase)), des NO Synthases (nitric oxide synthases), ou encore la métalloprotéase 9 et la collagénase qui

dégradent la matrice extracellulaire. Des cytokines sont aussi stockées dans ces granules comme l'IL-4, l'IL-6, l'IL-10, le GM-CSF, l'IL-8, le TNF α , CCL5 et des éotaxines. Les PNE synthétisent également des médiateurs lipidiques comme le PAF (platelet-activating factor), le LTC4 (leucotriène C4) et la PGE2. Ils luttent contre les pathogènes non seulement en libérant le contenu de leurs granules mais aussi en générant des ERO *via* la NADPH oxydase.

Les PNE ont un rôle important dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Les souris transgéniques déficientes pour ce type cellulaire ont un microbiote intestinal différent de celui de souris sauvages (Chu et al. 2014 et Jung et al. 2015), qui contient un nombre plus important de bactéries. Les PNE participent ainsi au développement et au maintien de l'immunité adaptative, notamment dans le tractus digestif. Ils sécrètent la protéine APRIL (activation and proliferation-induced ligand) essentielle à la survie des plasmocytes, dans la moelle osseuse hématopoïétique mais aussi dans la *lamina propria* intestinale. Cette protéine ainsi que la protéine BAFF (B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family) et le TGF β -1, peut également induire le switch des classes des immunoglobulines en faveur des IgA indépendamment des lymphocytes T (Cerutti 2008). La déplétion en PNE chez des souris engendre une diminution des plasmocytes et des d'anticorps IgA dans la *lamina propria* et une réduction du taux fécal de ces immunoglobulines (Chu et al. 2014). Chez ces souris, cette diminution concerne les plasmocytes synthétisant des IgA et le nombre de plasmocytes produisant des IgM est augmenté (Jung et al. 2015). Ces immunoglobulines sont impliquées dans la régulation du microbiote intestinal, lequel est pauvre en bactéries reconnues par les IgA chez des souris ne possédant pas de PNE.

Les lymphocytes T de l'intestin sont aussi contrôlés par les PNE. Ainsi, les souris dépourvues en PNE ont moins de lymphocytes CD4⁺ et de lymphocytes T_{reg} dans la *lamina propria* de l'intestin grêle et dans les PP (Chu et al. 2014). Par ailleurs, ces souris ont plus de lymphocytes Th17 que les souris sauvages ; il existe d'ailleurs une corrélation inverse entre le nombre de PNE et le nombre de lymphocytes Th17 chez des souris sauvages (Sugawara et al. 2016). *In vitro*, les PNE provenant de l'intestin grêle favorisent la polarisation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T_{reg} *via* la sécrétion de TGF- β 1 et d'ALDH (aldéhyde deshydrogénase) (H.-H. Chen et al. 2015). La perte de PNE chez les souris engendre une diminution du nombre d'ILC ROR γ t⁺ dans la *lamina propria* (Jung et al. 2015).

✧ Les cellules dendritiques (CD)

Des cellules immunitaires sont à l'interface entre l'environnement et l'immunité adaptative ; ce sont des CPA, comme les cellules dendritiques (CD) et les macrophages. De nombreuses sous-populations de CD existent au sein de la *lamina propria* de l'intestin grêle. Ces cellules peuvent être classées selon qu'elles expriment le récepteur CD103 ou le récepteur CX₃CR1 mais, à l'intérieur de ces deux grandes classes, des sous-populations peuvent être définies. Les CD sont composées d'un corps cellulaire duquel se déploie des dendrites capables de traverser l'épithélium intestinal et de piéger des micro-organismes dans la lumière intestinale (**Figure 6**). Les CD peuvent être activées par d'autres mécanismes comme par les cellules M (Neutra et al. 1999). Les micro-organismes peuvent être transportés par les cellules M, de la lumière intestinale vers la muqueuse, au niveau des PP, où des CD les réceptionnent. Les CD peuvent également reconnaître des antigènes associés à des cellules épithéliales apoptotiques ainsi que des molécules de faibles poids moléculaires transférées de la lumière intestinale vers la muqueuse par les cellules M (Huang et al. 2000 et McDole et al. 2012).

Les CD reconnaissent les micro-organismes grâce à des récepteurs particuliers, les TLR. Que le micro-organisme soit capturé par la voie directe ou la voie indirecte par les CD, celles-ci le digèrent et deviennent des cellules matures. Les CD présentent alors à leur surface des peptides microbiens et migrent au sein des ganglions mésentériques, où elles stimulent la différenciation de lymphocytes T et B naïfs (**Figure 6**). Dans les conditions homéostatiques, les CD exprimant le récepteur CD103 induisent la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T_{reg} via la sécrétion de TGF- β et d'acide rétinoïque (C.-M. Sun et al. 2007). Cependant, les CD exprimant le récepteur CX₃CR1 induisent préférentiellement la différenciation de lymphocytes T CD8, lesquels produisent des cytokines telles que l'IL-10, l'IL-13 et l'IL-9. L'IL-10 produite par ces cellules inhibe les lymphocytes T CD4⁺ pro-inflammatoires. Ainsi, les CD maintiennent la tolérance vis-à-vis des antigènes non pathogéniques présents dans la lumière intestinale.

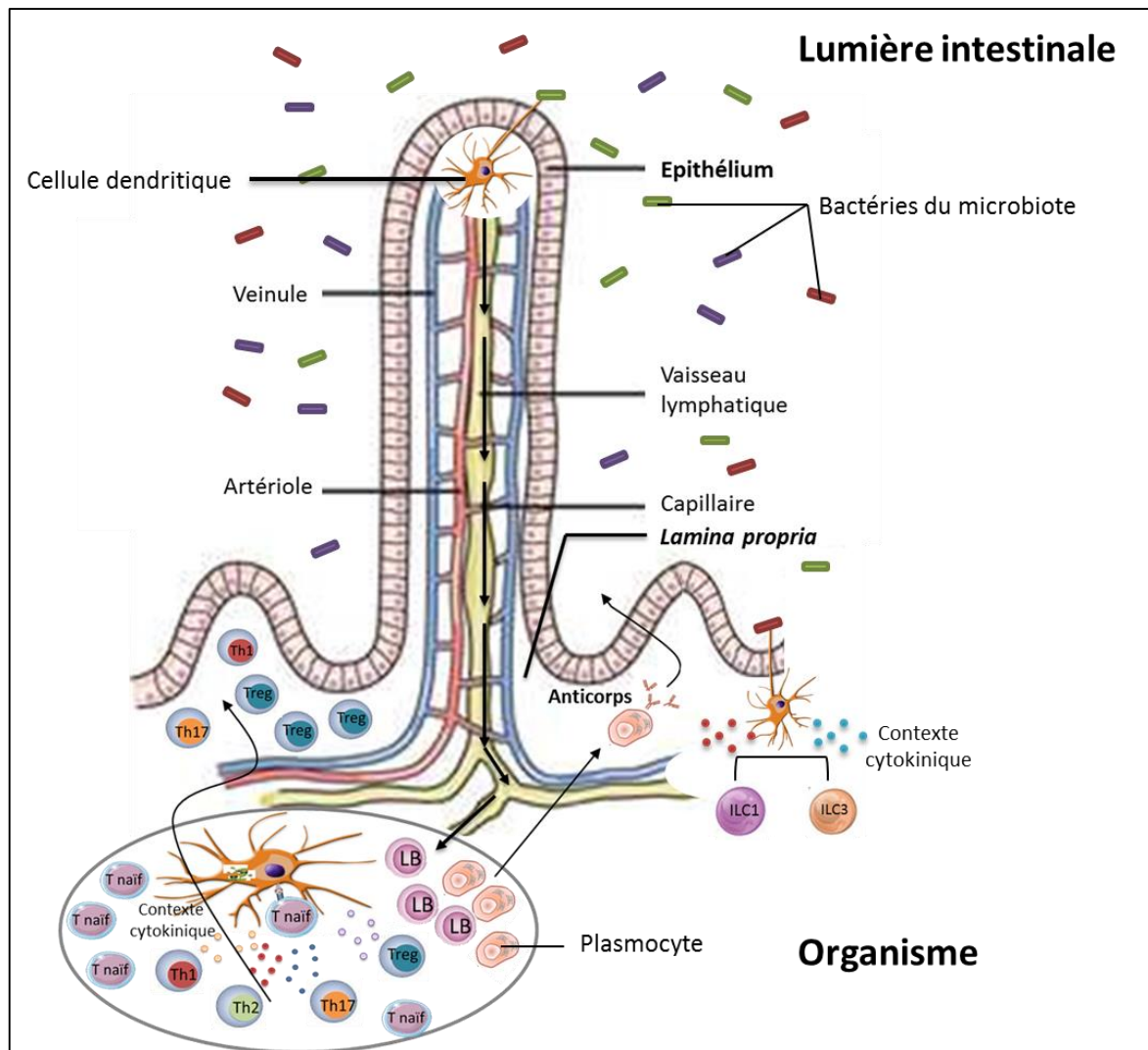


Figure 6 : Représentation schématique de l'activation des lymphocytes des immunités innée et adaptative par les cellules dendritiques

Modifié de <https://socratic.org/questions/why-does-the-wall-of-the-small-intestine-need-a-large-surface-area>

Lors de la rencontre avec certains micro-organismes, les CD peuvent induire la différenciation de lymphocytes pro-inflammatoires tels que les lymphocytes Th17 et Th1 (**Figure 6**). Certaines CD CD103⁺ expriment les récepteurs TLR5 et TLR9. La flagelline, une protéine constitutive du flagelle bactérien, est reconnue par le récepteur TLR5. En réponse à ce stimulus, les CD induisent la différenciation des lymphocytes Th1 et Th17 et stimulent la maturation des lymphocytes B en plasmocytes qui sécrètent alors des immunoglobulines IgA (Uematsu et al. 2008). Chez la souris, la différenciation des lymphocytes Th17 par les CD requière la production d'IL-6 (Persson et al. 2013). Des CD sont également capables d'induire la production d'IgA par les plasmocytes indépendamment des lymphocytes T *via* la sécrétion des protéines APRIL et BAFF et du NO (Tezuka et al. 2011 et Tezuka et al. 2007). Ce switch

en faveur des IgA est amplifié par les conditions environnantes, comme la présence d'acide rétinoïque et de TGF- β 1 dans l'intestin.

✧ Les cellules lymphoïdes de l'immunité innée (ILC)

Les cellules lymphoïdes de l'immunité innée (ILC) sont divisées en trois catégories selon l'expression de facteurs de transcription. Ainsi, on distingue les ILC1, ILC2 et ILC3. Ces trois types cellulaires sont présents dans la *lamina propria* de l'intestin grêle. Ils jouent un rôle important dans la protection contre les pathogènes et dans l'homéostasie intestinale. Les ILC possèdent des caractéristiques communes, comme l'expression du récepteur à l'IL-2, CD25, et le récepteur IL-7R (CD127). Les ILC1 contribuent à la lutte contre les micro-organismes intracellulaires tels que certaines bactéries et les virus. Elles sont divisées en sous-populations, parmi lesquels on distingue les cellules cNK (conventional natural killer). Les ILC2 sont activées en réponse à des parasites ou des helminthes et les ILC3 en réponse à des bactéries extracellulaires et des champignons. Les ILC peuvent être activées par des cellules de l'immunité innée comme par les cellules de l'épithélium intestinal. La sécrétion d'IL-12 et d'IL-18 par des CD ou des macrophages en réponse à un stimulus active les ILC1. En revanche, la sécrétion d'IL-23 et d'IL-1 β par ces CPA stimule les ILC3. Des cellules de l'épithélium intestinal, quant à elles, peuvent activer les ILC2 *via* la sécrétion d'IL-33, de d'IL-25 ou encore de TSLP (thymic stromal lymphopoietin).

La distribution des ILC n'est pas homogène tout au long du tractus gastro-intestinal (Krämer et al. 2017). Le nombre d'ILC augmente progressivement de la partie proximale de l'intestin jusque dans la partie la plus distale. Les ILC1 sont majoritairement présentes dans le haut du tractus gastro-intestinal (œsophage, estomac et duodénum), les ILC2 sont faiblement présentes dans l'ensemble du tube digestif et les ILC3 sont principalement localisées dans l'iléon et le colon. Les ILC1 protègent l'organisme contre des pathogènes tels que *Salmonella enterica* ou encore *Toxoplasma gondii* *via* la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α et l'IFN γ (Klose et al. 2013 et Klose et al. 2014). Les ILC2 luttent contre les parasites, et tout particulièrement les helminthes, en sécrétant des cytokines telles que l'IL-5, l'IL-13 et l'IL-4. Ces cytokines induisent l'activation des PNE qui jouent un rôle important dans la destruction de ces pathogènes. Les ILC2 ont également un rôle dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium intestinal et dans sa réparation. L'activation des ILC2 par l'IL-33 induit leur sécrétion d'amphiréguline (Areg). Dans le modèle murin de colite au DSS, le nombre d'ILC2 synthétisant de l'Areg est augmenté (Monticelli et al. 2015). Dans ce modèle, l'Areg

protège les souris de l'inflammation intestinale et diminue la sévérité des lésions. Les ILC3 ont un rôle important dans le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale. Ces cellules synthétisent notamment les cytokines IL-17 et IL-22. Cette dernière stimule la production de peptides antimicrobiens par les cellules de l'épithélium intestinal et ainsi contribue au contrôle du microbiote (Mukherjee et Hooper 2015). La cytokine IL-17 sécrétée par les ILC3 permet de défendre l'organisme contre des bactéries telles que *Citrobacter rodentium* (Sonnenberg et al. 2012). Les ILC3 stimulent la production d'IgA indépendante des lymphocytes T par les plasmocytes (Tsuji et al. 2008). Ces différents mécanismes permettent de contrôler le microbiote intestinal à proximité de l'épithélium. Certaines ILC3 régulent également l'activité des lymphocytes T reconnaissant des bactéries commensales. Les ILC3 possédant cette fonction expriment à leur surface des molécules du CMH de type II. Elles interagissent grâce à celles-ci avec les lymphocytes T CD4⁺ spécifiques de bactéries commensales et les éliminent (Hepworth et al. 2013).

Les cellules NK intestinales sont une sous-population de lymphocytes ILC1 (Spits et al. 2013). Ces cellules sont produites dans la moelle osseuse hématopoïétique puis migrent vers la muqueuse intestinale. Dans les conditions homéostatiques, des cellules NK matures et immatures sont présentes dans l'intestin (Ivanova et al. 2014). La majorité des cellules NK intestinales exprime le récepteur CD56 mais pas le récepteur CD16 (cellules NK CD56^{bright}CD16⁻) ; ces cellules sont considérées comme immatures. La proportion de cellules NK matures, c'est-à-dire CD56^{dim}CD16⁺, est faible au sein de l'intestin grêle (Lindgren et al. 2010). Les cellules NK matures sont cytolytiques et produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN γ . En revanche, les cellules NK immatures ont une faible capacité de cytolyse mais sécrètent de l'IFN γ . En cas d'infection, le phénotype des cellules NK change et s'adapte pour lutter contre la menace. *In vitro*, ces cellules en présence d'oligonucléotides d'ADN du Bacille Calmette Guérin (BCG) produisent de l'IFN γ qui augmente par une voie autocrine leur cytotoxicité (Iho et al. 1999). La reconnaissance de ces oligonucléotides est spécifique ; une modification de leurs séquences diminue la réponse des cellules NK.

✧ Les autres cellules de l'immunité innée

D'autres cellules de l'immunité innée sont présentes au sein de la muqueuse intestinale, comme les lymphocytes MAIT (mucosal-associated invariant T), et iNKT (invariant natural killer T). Les lymphocytes MAIT sont principalement présents dans le jéjunum, ils sont caractérisés par l'expression d'un TCR semi-invariant incluant l'association des chaînes V α 7.2

et J α 33 chez l'homme et V α 19 et J α 33 chez la souris avec un nombre limité de chaînes V β . Ces cellules possèdent une forte activité antimicrobienne. Elles reconnaissent des métabolites dérivés de produits microbiens, comme les vitamines B, et présentés par les CPA via la protéine de surface MR1 (MHC class I-related protein) (Kjer-Nielsen et al. 2012). Les cellules MAIT sont également activées par des cytokines telles que l'IL-18 et l'IL-12. Elles peuvent être directement activées par des cellules infectées par des micro-organismes. En réponse à ces stimuli, les cellules MAIT synthétisent des cytokines telles que l'IFN γ , le TNF α , l'IL-17 et l'IL-22 et peuvent exercer leur activité cytolytique (Howson, Salio, et Cerundolo 2015).

Les lymphocytes iNKT expriment un TCR semi-invariant composé des chaînes V α 14-J α 18/V β 8.2, -7, ou -2 chez la souris et des chaînes V α 24-J α 18/V β 11 chez l'homme. Ces cellules reconnaissent des glycolipides présentés par la molécule du CMH de type I CD1d et peuvent sécréter diverses cytokines (Van Kaer et Wu 2018). Elles sont classées en sous-populations suivant leur signature cytokinique. Quatre populations d'iNKT sont définies : les iNKT1, iNKT2, iNKT10 et iNKT17 sécrétant respectivement de l'IFN γ , de l'IL-4, de l'IL-10 et de l'IL-17. Les iNKT majoritairement présents dans l'intestin grêle sont les iNKT2, mais la proportion de ces cellules dans la muqueuse digestive est faible (environ 0,5%).

I.1.3.2. Les cellules de l'immunité adaptative

De nombreux lymphocytes sont présents dans la muqueuse intestinale. Ces cellules ont un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Parmi l'ensemble des lymphocytes de la *lamina propria* de l'intestin grêle, il y a notamment des lymphocytes T helper, des lymphocytes T régulateurs, des lymphocytes T cytotoxiques mais aussi des lymphocytes T $\gamma\delta$, des lymphocytes T folliculaires et des lymphocytes B.

Ici, je ne décris que les principaux lymphocytes présents de la *lamina propria* dans les conditions homéostatiques et ceux étudiés au cours de notre étude, soit les lymphocytes T helper, les lymphocytes T régulateurs et les lymphocytes B (**Figure 5**).

✧ Les lymphocytes T helper

Plusieurs lymphocytes T helper (Th), aussi appelés T auxiliaires, sont présents dans la *lamina propria* de l'intestin grêle. Il y a notamment des lymphocytes Th1, Th2, Th17, mais aussi Th22. Dans les conditions homéostatiques, la différenciation de ces cellules est contrôlée afin de conserver la tolérance immunitaire.

Les lymphocytes Th1 sont impliqués dans la défense de l'organisme contre des micro-organismes intracellulaires. Leur activation est notamment induite par les cytokines IL-12 et IFN γ produites par les CPA lors de la présentation antigénique. Les lymphocytes Th2 répondent notamment à l'IL-4. Ils ont un rôle important dans la lutte contre les parasites, notamment les helminthes et sécrètent majoritairement les cytokines IL-4, IL-5 et IL-13. Le nombre de lymphocytes Th2 est restreint dans la muqueuse intestinale dans les conditions physiologiques. La différenciation des lymphocytes Th17 peut être induite par plusieurs associations de cytokines IL-6, TGF- β , IL-21, IL-23 et l'IL-1 β (Korn et al. 2007 et Ghoreschi et al. 2010). Les lymphocytes Th17, comme les ILC3, contribuent à la défense de l'organisme contre les micro-organismes extracellulaires. Ces cellules synthétisent les cytokines IL-17A et IL-17F qui participent au recrutement et à l'activation des PNN pour favoriser l'élimination des micro-organismes. Les lymphocytes Th17 jouent un rôle majeur dans l'homéostasie intestinale en sécrétant de l'IL-22 qui stimule la production de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales et la sécrétion de mucus par les cellules caliciformes. Les lymphocytes Th22 sont impliqués dans la réparation tissulaire et la production de peptides antimicrobiens. Ces cellules produisent majoritairement de l'IL-22 et du TNF α mais, contrairement aux lymphocytes Th17, elles ne sécrètent pas d'IL17 (Eyerich, Dimartino, et Cavani 2017). La différenciation des lymphocytes Th22 est induite par l'IL-6 indépendamment de la présence de TGF- β . La production d'IL-22 par ces cellules requiert l'expression du facteur de transcription T-bet et le récepteur AHR (aryl hydrocarbon receptor). Les lymphocytes Th22 protègent activement l'organisme contre des pathogènes puisque, par exemple, leur sécrétion d'IL-22 protège les souris d'une infection par la bactérie entérique *Citrobacter rodentium* (Basu et al. 2012).

✧ Les lymphocytes T régulateurs

Dans les conditions homéostatiques, les lymphocytes T régulateurs (T_{reg}) sont prédominants dans la *lamina propria* par rapport aux lymphocytes T helper. Ces cellules participent activement à la tolérance immunitaire. Les lymphocytes T_{reg} regroupent plusieurs populations de lymphocytes CD4⁺. Certains lymphocytes T_{reg} peuvent exprimer le facteur de transcription FoxP3. La différenciation de ces cellules a lieu soit dans le thymus (lymphocytes T_{reg}) soit sur des sites extra-thymiques (lymphocytes pT_{reg} pour peripheral T_{reg}) (comme l'intestin) (Abbas et al. 2013). Elle est induite par le TGF- β mais également par l'acide rétinoïque produit par des CD en réponse à des stimuli bactériens ou encore par les antigènes et des métabolites microbiens. En effet, des bactéries du microbiote commensal sécrètent des acides gras à chaîne courte (AGCC), comme le butyrate, capables d'induire la différenciation

des lymphocytes T_{reg} en favorisant l'expression de FoxP3 (Furusawa et al. 2013). Des antigènes bactériens tels que le polysaccharide A (PSA), exprimé à la surface de la bactérie commensale *Bacteroides fragilis*, stimulent la différenciation des lymphocytes T_{reg} (Mazmanian, Round, et Kasper 2008). Ces mécanismes par lesquels les bactéries commensales favorisent le développement des lymphocytes T_{reg} visent à protéger l'intestin d'une réponse inflammatoire excessive et inappropriée face à des micro-organismes non pathogènes.

Les lymphocytes T_{reg} sécrètent des cytokines anti-inflammatoires, telles que l'IL-10 et le TGF- β . Il semblerait que les lymphocytes T_{reg} FoxP3⁺ peuvent également bloquer l'activation des lymphocytes T helper par les CPA (Walker et Sansom 2015). En effet, les lymphocytes T_{reg} FoxP3⁺ expriment à leur surface la protéine CTLA4 (Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4) qui interagit avec les molécules CD80 et CD86 exprimées par les CD, ce qui limite la liaison entre les molécules CD80 et CD86 avec la protéine CD28 exprimée par les lymphocytes T. Cette stratégie bloque l'expansion des lymphocytes T. Au sein de la muqueuse intestinale, les lymphocytes T_{reg} inhibent en particulier les lymphocytes Th17 très actifs contre les bactéries et les champignons extracellulaires (Huber et al. 2011). L'inhibition de ces lymphocytes est en partie due à l'IL-10.

D'autres cellules T régulatrices, appelées Tr1 pour « T regulatory type 1 », sont impliquées dans le maintien de la tolérance immune au sein de la muqueuse intestinale. Ces cellules n'expriment pas le facteur de transcription FoxP3. Comme les lymphocytes T_{reg} FoxP3⁺, elles sécrètent de l'IL-10 et contrôlent l'activation et l'expansion des lymphocytes T via les protéines CTLA4 et PD-1 (Programmed cell death 1), deux molécules inhibitrices des lymphocytes T (Roncarolo et al. 2014).

✧ Les lymphocytes B

Les lymphocytes B sont localisés non seulement au sein de la *lamina propria* mais aussi dans les PP, les FLI et les ganglions mésentériques. Les immunoglobulines sécrétées par les plasmocytes dans l'intestin sont principalement des IgA. Par exemple, dans le jéjunum et le duodénum 79% des plasmocytes produisent des IgA, 18% de ces cellules synthétisent des IgM et seulement 3% sécrètent des IgG (Brandtzaeg et al. 1999). La maturation des lymphocytes B dans ces structures peut être induite par les lymphocytes T. Dans ce cas, le ligand CD40L présent sur les lymphocytes T activés se fixe sur son récepteur exprimé à la surface des lymphocytes B. Cette interaction entre les lymphocytes T et B provoque la prolifération des lymphocytes B et la synthèse des enzymes et des facteurs protéiques nécessaires au switch des

classes d'immunoglobulines. Le switch des classes se fait au bénéfice des IgA. L'activation des lymphocytes B peut également se faire indépendamment de leur interaction avec les lymphocytes T. Ainsi, le TGF- β , l'IL-10 et l'acide rétinoïque contribuent à la maturation des lymphocytes B ou au switch des classes des immunoglobulines (van Vlasselaer, Punnonen, et de Vries 1992 et Seo et al. 2014). La protéine IGIP (IgA-inducing protein) produite par les CD induit également le switch des classes en faveur des IgA (Endsley et al. 2009). La protéine APRIL, sécrétée par des cellules immunitaires résidentes telles que les PNE et des CD mais aussi par les CEI, peut *via* sa fixation sur les récepteurs TACI (Transmembrane activator and CALM interactor) et BCMA (B cell maturation antigen) induire le switch des classes en faveur des IgA (He et al. 2007). La protéine APRIL, le facteur BAFF et la cytokine IL-6 contribuent à la survie des plasmocytes (Mesin et al. 2011). Ces protéines permettent le maintien de niches de survie de plasmocytes notamment au niveau des cryptes de l'intestin.

Une fois produites, les IgA se fixent sur le récepteur pIgR (polymeric Ig receptor) exprimé sur la membrane basolatérale des entérocytes. Ce récepteur permet le transport des immunoglobulines IgA et IgM dans la lumière intestinale. Une fois libérés, les anticorps fixent leurs antigènes, en particulier bactériens, et les neutralisent.

I.2. La capacité migratoire des cellules immunitaires intestinales

I.2.1. Le chimiotactisme : définition

La majorité des cellules immunitaires présentes dans l'intestin est produite sur des sites extra-intestinaux, comme la moelle osseuse hématopoïétique, puis migrent, *via* le processus de chimiotactisme, jusque dans l'intestin. Ce mécanisme est possible grâce à des récepteurs exprimés à la surface des cellules immunitaires et à leurs ligands, les chimiokines. Les chimiokines sont une grande famille de petites cytokines (8-14kDa). La structure de ces protéines est conservée ; elle se compose d'une courte extrémité N-terminale, d'une boucle à cette extrémité, de trois feuillets beta antiparallèles et d'une hélice alpha en position C-terminale (Miller et Mayo 2017) (**Figure 7**). Les chimiokines possèdent plusieurs cystéines qui forment des ponts disulfures et participent ainsi au maintien de la structure de ces protéines. Il existe quelques particularités pour certaines chimiokines. Ainsi, les chimiokines CX₃CL (CX₃C chemokine ligand) 1 et CXCL16 possèdent une extrémité C-terminale plus longue, contenant une séquence de type mucine et un domaine transmembranaire (Matloubian et al. 2000). D'autres cytokines telles que CCL6, CCL9, CCL15 et CCL23 présentent une séquence N-terminale qui peut être clivée, ce qui améliore les capacités d'activation de leurs récepteurs

(Berahovich et al. 2005). Cette particularité permet le maintien des chimiokines à la surface des cellules ; elles peuvent être libérées dans l'espace extra-cellulaire suite à un clivage protéolytique. La fonction commune à l'ensemble des chimiokines est l'attraction des cellules sur leur site d'intérêt. Les chimiokines sont classées en quatre familles selon le nombre d'acides aminés séparant les deux résidus cystéines hautement conservés dans la partie N-terminale de la protéine. Ainsi, on distingue la famille des chimiokines CC pour lesquelles les cystéines sont l'une à côté de l'autre, les familles de chimiokines CXC et CX₃C, dans ce cas les cystéines sont séparées par, respectivement, un et trois acides aminés et la famille des chimiokines XCL (XC chemokine ligand) qui ne possède qu'une cystéine en position N-terminale (cette famille ne contient que deux membres, les lymphotactines alpha et beta). Les chimiokines forment un gradient de concentration décroissant du site de leur production vers les cellules cibles. Elles se fixent sur des récepteurs cellulaires spécifiques, qui permettent la migration des cellules cibles selon le gradient de concentration jusqu'à leur destination.



Figure 7 : **Représentation tridimensionnelle de la superposition des structures de sept chimiokines (CXCL4, CXCL8, CXCL12, CXCL13, CCL5, CC14, CCL20)**
De Miller et Mayo 2017

Les récepteurs aux chimiokines sont des récepteurs de surface à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG). Il existe des récepteurs dits « conventionnels » et des récepteurs dits « atypiques ». Les récepteurs conventionnels sont au nombre de 18. La nomenclature de ces récepteurs est basée sur le groupe de chimiokines auquel appartient son ou ses ligand(s). Ainsi, on distingue les récepteurs CCR (CC chemokine receptor), CXCR (CXC chemokine receptor), CX₃CR (CX₃C chemokine receptor) et CR (C chemokine receptor). Il existe 10 récepteurs CCR, 6 récepteurs CXCR, 1 récepteur XCR et 1 récepteur CX₃CR. Les chimiokines se fixent sur leur récepteur *via* la boucle présente dans leur partie N-terminale. Plusieurs chimiokines peuvent reconnaître le même récepteur (**Figure 8**) ;

par exemple, les chimiokines CCL3, CCL4 et CCL5 se fixent sur le récepteur CCR5. Par ailleurs, une chimiokine peut interagir avec plusieurs récepteurs (**Figure 8**) ; par exemple, CCL5 reconnaît les récepteurs CCR1, CCR3 et CCR5. Certaines chimiokines sont des antagonistes. Par exemple, la chimiokine CCL18 inhibe le recrutement des cellules immunitaires initié par le récepteur CCR3 (Nibbs et al. 2000). Des protéines autres que des chimiokines peuvent activer les récepteurs conventionnels, c'est notamment le cas de défensines et de la protéine HMGB1 (high mobility group box 1) (Yang et al. 1999 et Schiraldi et al. 2012). Les récepteurs atypiques sont des homologues des récepteurs conventionnels ; ils fixent les chimiokines mais ne transmettent pas de signal *via* les protéines G. Ils agissent donc comme des piègeurs de chimiokines et limitent ainsi leur action (Bachelier et al. 2014).

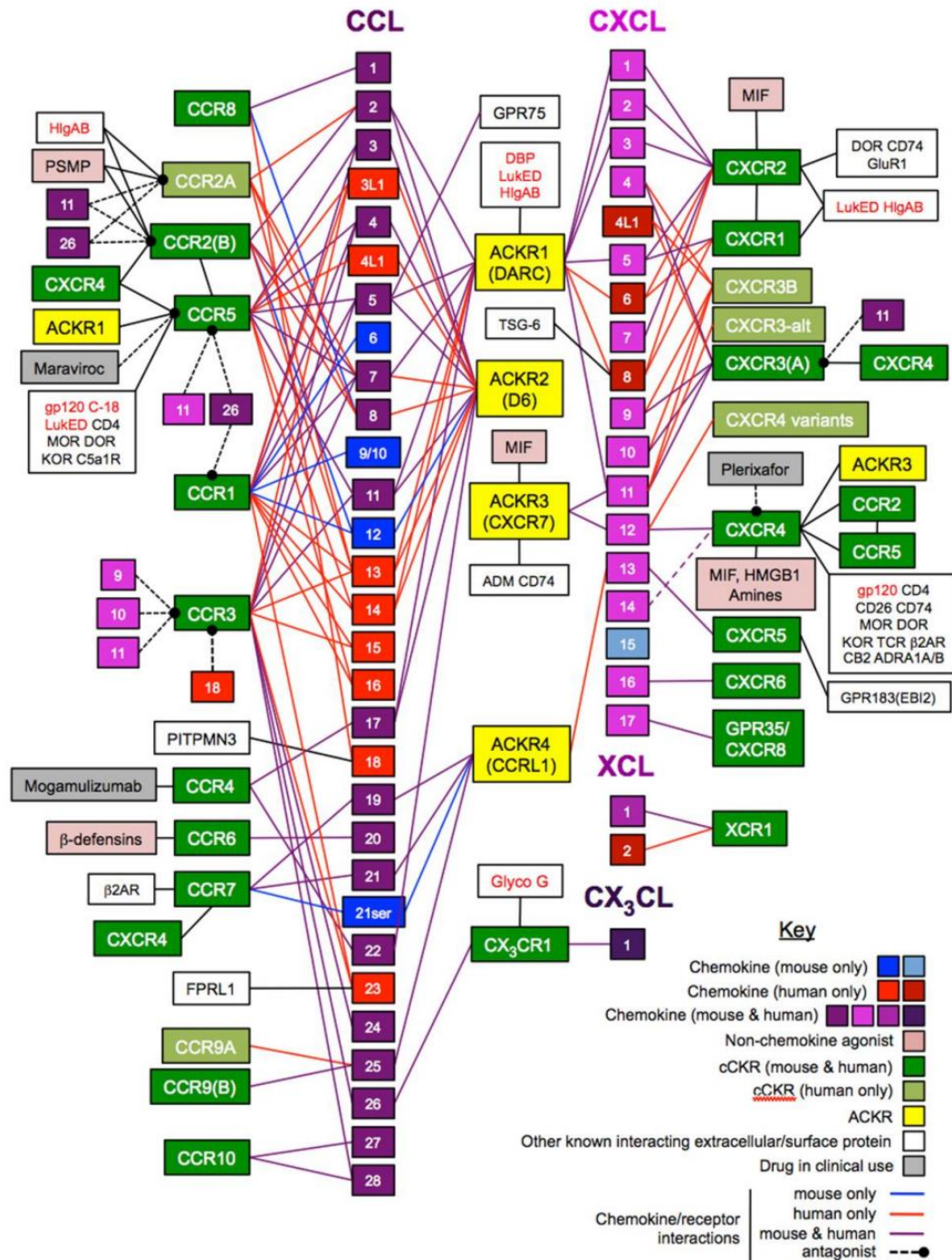


Figure 8 : Représentation des récepteurs aux chimiokines et de leurs interactions avec leurs ligands

De Hughes et Nibbs 2018

Les chimiokines ont beaucoup d'autres fonctions que le recrutement des cellules immunitaires. Elles interviennent en particulier dans la prolifération, la survie, la différenciation, la production de cytokines, la dégranulation et la libération d'ERO, mais ont bien d'autres rôles (**Figure 9**) (López-Cotarelo et al. 2017). Ainsi, les chimiokines participent à la défense de l'organisme mais également à son développement ; la chimiokine CXCL12, par

exemple, participe au développement de gros vaisseaux sanguins, notamment ceux irriguant le tractus digestif et les reins (Takabatake et al. 2009).

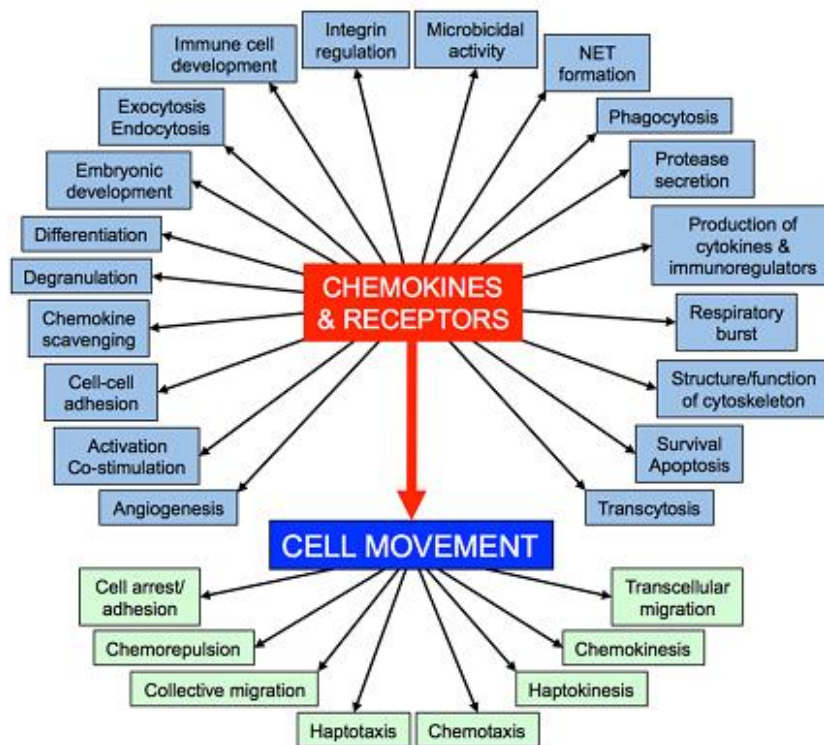


Figure 9 : **Représentation des différentes fonctions des chimiokines et de leurs récepteurs**

De Hughes et Nibbs 2018

Les récepteurs aux chimiokines ne sont pas exclusivement exprimés à la surface des cellules immunitaires. De nombreuses cellules résidentes telles que les neurones, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales ou encore et les chondrocytes possèdent des récepteurs aux chimiokines. Les chimiokines régulent l'activité de ces cellules. Ainsi, ces cytokines sont capables de réguler les grandes fonctions de l'organisme comme l'angiogenèse et le renouvellement de la matrice extracellulaire (MEC) du cartilage (Dimberg 2010 et Borzì et al. 2000).

I.2.2. Rôle du chimiotactisme dans le recrutement des cellules immunitaires dans l'intestin grêle

Les cellules immunitaires de l'intestin contrôlent l'homéostasie intestinale et assurent la protection de l'organisme. Lors d'une lésion de la barrière intestinale et/ou de l'entrée de micro-organismes dans la muqueuse, les cellules constitutivement présentes luttent contre

l'agression. D'autres cellules immunitaires sont également recrutées sur le site lésé afin d'éliminer efficacement et rapidement la menace et de réparer le tissu endommagé. Dans les deux cas, les cellules immunitaires migrent dans l'intestin grâce au processus de chimiotactisme (**Figure 10**).

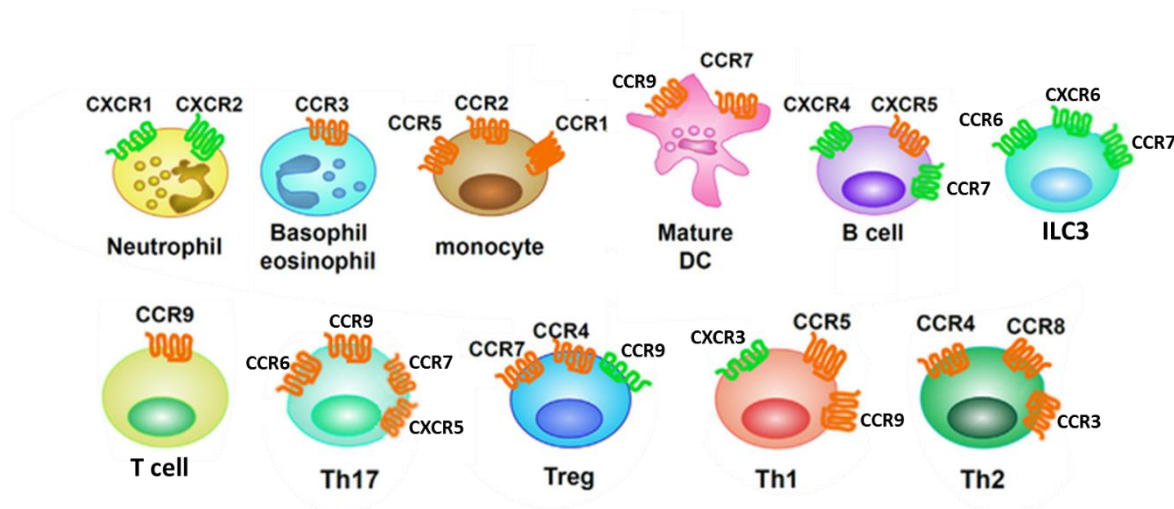


Figure 10 : **Illustration des principales cellules immunitaires intestinales et de leurs récepteurs aux chimiokines**

D'après *Matsushima et al. 2011*

Dans la moelle osseuse hématopoïtique les PNN, les lymphocytes B, les monocytes expriment le récepteur CXCR4 (Mercier, Ragu, et Scadden 2011). Ces cellules en cours de maturation sont retenues dans la moelle osseuse grâce à la chimiokine CXCL12, un ligand de CXCR4. La migration des leucocytes de la moelle osseuse vers les vaisseaux sanguins puis vers les organes périphériques implique des chimiokines particulières spécifiques à chaque type cellulaire. Les PNN matures, prêts à quitter la moelle osseuse, ont une expression de CXCR4 diminuée et expriment à leur surface le récepteur CXCR2 (Suratt et al. 2004 et Mercier, Ragu, et Scadden 2011). La fixation des chimiokines CXCL1 et CXCL2 sur ce récepteur induit la libération des PNN dans la circulation sanguine. La sortie médullaire des monocytes est, quant à elle, possible grâce à l'expression du récepteur CCR2 et à son interaction avec la chimiokine CCL2. Le récepteur CCR2 est indispensable puisque son blocage pharmacologique ou la délétion de son gène chez la souris provoquent une diminution drastique du nombre de monocytes circulants (Wang et al. 2009 et Serbina et Pamer 2006). Les PNE expriment plusieurs récepteurs aux chimiokines à leur surface. Le GM-CSF, l'IL-5 et l'IL-3 induisent la maturation des PNE dans la moelle osseuse puis l'IL-5, *via* sa fixation sur son récepteur (IL-5R), initie leur migration vers les tissus. Ensuite, des chimiokines telles les éotaxines 1, 2 et 3, aussi appelées CCL11, CCL24 et CCL26 respectivement, recrutent les PNE au sein des tissus.

Ces cytokines se fixent sur un récepteur en particulier, le récepteur CCR3. Ce dernier possède d'autres ligands, comme CCL5, CCL7 et CCL13. Le récepteur CCR3 joue un rôle particulièrement important dans la migration des PNE vers la muqueuse intestinale puisque les souris déficientes pour ce récepteur ont 7 fois moins de PNE dans l'intestin que les souris sauvages alors qu'elles possèdent un nombre similaire de cellules dans les poumons (Humbles et al. 2002). Les chimiokines éotaxines et CCL5 sont fortement exprimées dans le jéjunum (Matthews et al. 1998). Dans les pathologies intestinales telles que la MC ou la rectocolite hémorragique (RCH), le nombre de PNE ainsi que l'expression des éotaxines 1 et 2 sont augmentés au sein des tissus inflammatoires (Ahrens et al. 2008). Dans le modèle murin de colite au DSS, le même phénomène a été rapporté. Le recrutement massif de ces cellules est dû principalement à l'éotaxine 1 sécrétée par les macrophages et les cellules de l'épithélium intestinal (Ahrens et al. 2008 et Waddell et al. 2011).

La chimiokine CCL25, sécrétée par les cellules épithéliales intestinales, contribue au recrutement des lymphocytes T dans la *lamina propria*, via l'activation du récepteur CCR9. En effet, les lymphocytes T mémoires et effecteurs, ainsi que les lymphocytes T activés dans les GALT suite à la reconnaissance d'un antigène, expriment CCR9 (Hart et al. 2010). En fonction de la polarisation des lymphocytes T, d'autres chimiokines peuvent participer à leur migration. Les lymphocytes Th17 ont un rôle primordial dans la muqueuse intestinale ; ils participent activement à la défense de l'organisme. La chimiokine CCL20, un ligand du récepteur CCR6 exprimé à la surface des lymphocytes Th17, favorise le recrutement de ces cellules dans la muqueuse intestinale. En effet, les souris déficientes pour le récepteur CCR6 présentent un défaut de migration des lymphocytes Th17 dans la *lamina propria* et dans les PP (Chuanwu Wang et al. 2009). Le TGF- β 1 induit l'expression de CCR6 à la surface des lymphocytes Th17 alors que l'IL-2 la réprime. D'autres récepteurs aux chimiokines sont impliqués dans la localisation des lymphocytes Th17 dans la muqueuse intestinale. Les récepteurs CCR7 et CXCR5 sont fortement exprimés par les lymphocytes Th17 des PP alors que peu de lymphocytes Th17 de la *lamina propria* les expriment (C. Wang et al. 2009). En revanche, le récepteur CCR9 est préférentiellement localisé sur les lymphocytes Th17 de l'intestin grêle. Des lymphocytes Th17 de la muqueuse intestinale peuvent aussi présenter le récepteur CCR4. D'autres lymphocytes expriment le récepteur CCR6, c'est notamment le cas de certaines cellules lymphoïdes ILC3 (ILC3 CCR6⁺) et des lymphocytes T_{reg}. Les cellules ILC3 CCR6⁺ sont principalement localisées dans les ganglions mésentériques, les cryptopatches et les FLI (Satoh-Takayama et al. 2014). La migration de ces cellules vers les ganglions mésentériques

est dépendante de l'interaction du récepteur CCR7 avec la chimiokine CCL21 (Mackley et al. 2015). Les lymphocytes T_{reg} sont très abondants dans la *lamina propria* de l'intestin grêle ; ils veillent à la tolérance immune et participent ainsi au maintien de l'homéostasie intestinale. Ces cellules expriment, comme l'ensemble des lymphocytes, le récepteur CCR9. La chimiokine CCL25 produite par les cellules épithéliales intestinales permet le recrutement de lymphocytes T_{reg} dans la *lamina propria* intestinale (Wermers et al. 2011). Les lymphocytes T_{reg} de la *lamina propria* de l'intestin grêle expriment aussi le récepteur CCR4 (Guo et al. 2008). Cependant, ce récepteur semble davantage exprimé sur des lymphocytes T_{reg} mémoires et ne semble pas participer activement à la migration cellulaire (Grindebacke et al. 2009). Les lymphocytes Th1 de la muqueuse intestinale expriment, dans les conditions homéostatiques, les récepteurs aux chimiokines CCR5 et CXCR3. Au cours du développement d'une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI), ces cellules sont activement recrutées dans la muqueuse inflammatoire *via* l'interaction du récepteur CXCR3 avec les chimiokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11 (Kulkarni, Pathak, et Lal 2017).

Les chimiokines CCL21 et CCL19 sont très présentes dans les ganglions mésentériques. Ces chimiokines activent notamment le récepteur CCR7 exprimé sur plusieurs cellules immunitaires dont les CD et les lymphocytes T et B. La chimiokine CCL21 est également présente dans les vaisseaux sanguins irriguant les ganglions (**Figure 11B**). Elle est immobilisée sur la paroi interne des vaisseaux et son interaction avec le récepteur CCR7 engendre l'activation de la protéine LFA1 (lymphocyte function-associated antigen 1) qui se fixe à la protéine ICAM1 (intracellular adhesion molecule 1) présente à la surface des cellules endothéliales. Ainsi, les lymphocytes se figent et leur transmigration du sang vers les ganglions, dans la zone des lymphocytes T, est effectuée (Masopust et Schenkel 2013). Les lymphocytes peuvent également migrer vers les ganglions *via* les vaisseaux lymphatiques. Cette voie implique également l'activation du récepteur CCR7 (**Figure 11A**). Dans la zone T des ganglions, la chimiokine CCL19 stimule dans un premier temps la mobilité des lymphocytes T, ce qui favorise les interactions entre ces cellules et les CD. Puis CCL19 induit l'internalisation transitoire du récepteur CCR7, ce qui engendre une diminution progressive de la rétention des lymphocytes dans le ganglion (Bardi et al. 2001). Par ailleurs, les lymphocytes deviennent au cours du temps de plus en plus sensibles à la protéine S1P (Sphingosine-1-phosphate). Ces mécanismes permettent la sortie des lymphocytes T du ganglion vers les vaisseaux (Masopust et Schenkel 2013).

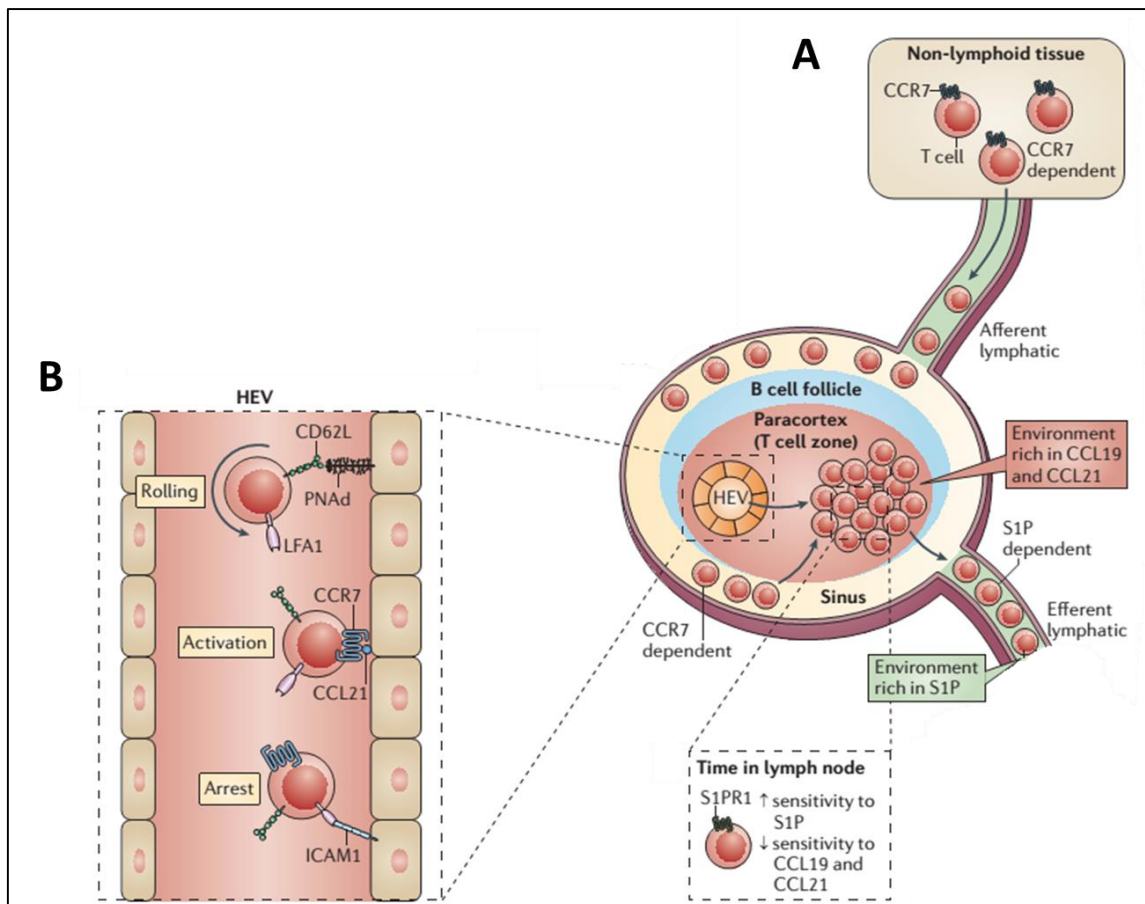


Figure 11 : Illustration de la circulation des lymphocytes dans les ganglions (A) et du rôle du récepteur CCR7 dans la migration de ces cellules des vaisseaux sanguins vers les ganglions (B)

D'après David Masopust et Schenkel 2013

Le récepteur CCR7 ne permet pas seulement la migration des lymphocytes T au sein des ganglions ; il est également indispensable à la migration des CD de la *lamina propria* de l'intestin grêle vers les ganglions mésentériques (Jang et al. 2006). Les CD plasmacytoïdes (CDp) présentes dans la muqueuse intestinale expriment des récepteurs TLR7 et TLR9 qui leur confèrent une activité anti-virale. L'interaction des CDp avec un antigène stimule l'expression du récepteur CCR7 à leur surface, ce qui favorise leur migration dans les ganglions mésentériques (Lombardi et Khaiboullina 2014 et Seth et al. 2011). En revanche, la migration des CD de la moelle osseuse vers les organes périphériques ne dépend pas de l'interaction du récepteur CCR7 avec les chimiokines CCL19 et/ou CCL21 ; en effet, les souris déficientes pour ce récepteur ont une diminution du nombre de CDp dans les ganglions mais pas dans la rate, ni dans la moelle osseuse (Seth et al. 2011). Le récepteur CCR9, *via* son interaction avec la chimiokine CCL25, permet également la mobilité des CDp dans la muqueuse intestinale (Wendland et al. 2007).

Les chimiokines et leurs récepteurs participent au développement des organes lymphoïdes secondaires en initiant la migration des cellules. Par exemple, les récepteurs CXCR5 et CCR7 sont exprimés par des cellules LTi. Ces dernières sont impliquées dans la mise en place des PP, des cryptopatches et des ganglions mésentériques. Les chimiokines CCL21, CCL19, deux ligands du récepteur CCR7, et la chimiokine CXCL13, un ligand de CXCR5, sont sécrétées au sein des organes lymphoïdes secondaires, notamment par des CD et des cellules mésenchymateuses (Eberl et al. 2004 et Comerford et al. 2013). Les lymphocytes B sont des cellules majeures des PP et des ganglions lymphatiques dans lesquels ils sont recrutés par chimiotactisme *via* les veinules de l'endothélium. La migration des lymphocytes B dans les ganglions lymphatiques nécessite les récepteurs aux chimiokines CCR7 et CXCR4. Ces deux récepteurs ainsi que le récepteur CXCR5 sont également importants pour la migration des lymphocytes B dans les PP (Okada et al. 2002).

Certaines associations chimiokines-récepteurs peuvent jouer plusieurs rôles. Par exemple, en plus de la localisation et la rétention des cellules sur des sites bien définis, l'activité cellulaire peut être orchestrée par les chimiokines. Ainsi, la chimiokine CXCL16, sécrétée par certaines CD de l'intestin, permet, *via* l'activation avec le récepteur CXCR6, la rétention des ILC3 Nkp46⁺ dans la *lamina propria* (Melo-Gonzalez et Hepworth 2017). Ce couple CXCL16-CXCR6 est également impliqué dans la défense de l'organisme contre des pathogènes tels que *Citrobacter rodentium* (Sato-Takayama et al. 2014). En effet, la délétion du gène *cxcr-6* chez la souris conduit à la disparition des cellules ILC3 Nkp46⁺, ainsi qu'à la diminution de la production de la cytokine IL-22 (fortement produite par ces cellules et très impliquée dans la lutte contre les pathogènes) ; ces souris sont incapables de se défendre contre *C. rodentium*. Les récepteurs CXCR1 et CXCR2 contrôlent l'activité des PNN. L'activation de ces récepteurs permet la formation des NET, la dégranulation et la libération de protéines bactéricides par ces cellules.

Les peptides antimicrobiens ont un pouvoir chimioattractant ; plusieurs α -défensines telles que HNP1, HNP3 et HD (human defensin) 5 induisent la migration des macrophages, des mastocytes et des lymphocytes (Grigat et al. 2007). L' α -défensine HD5 est majoritairement produite par les cellules de Paneth alors que les α -défensines HNP1 et HNP3 sont sécrétées par les PNN. Certains récepteurs aux chimiokines répondent non seulement à plusieurs chimiokines mais aussi à d'autres stimuli, tels que des peptides antimicrobiens. En effet, les β -défensines 1 et 2 (HDB1 et HDB2 respectivement) interagissent avec le récepteur CCR6 chez l'homme et

les β -defensines 2 et 3 activent ce récepteur chez la souris (Williams 2004). Ces peptides antimicrobiens sont produits dans les muqueuses par les cellules épithéliales.

Les cellules immunitaires de la muqueuse intestinale expriment continuellement leurs récepteurs aux chimiokines de sorte que, sous certaines conditions, elles peuvent migrer vers des sites extra-intestinaux ; la muqueuse intestinale est donc un réservoir à cellules immunitaires. Les lymphocytes Th17 intestinaux peuvent, *via* un mécanisme CCR6-CCL20 dépendant, migrer vers les reins lors de l'induction d'une pathologie rénale chez la souris (Krebs et al. 2016). La chimiokine CCL25 est relativement spécifique au recrutement des lymphocytes dans la muqueuse intestinale dans les conditions homéostatiques. Certaines pathologies hépatiques, comme la cholangite sclérosante primitive, se développent simultanément avec des pathologies inflammatoires de l'intestin. De ce cas, la chimiokine CCL25 est observée au sein des sinusoides hépatiques ainsi que des lymphocytes T effecteurs et mémoires exprimant CCR9 (Salmi et al. 2015). Ces exemples montrent que les cellules immunitaires de la muqueuse intestinale peuvent migrer vers des sites extra-intestinaux et participer au déclenchement de pathologies inflammatoires.

I.3. Les cellules de l'immunité de type 3 dans l'homéostasie intestinale

I.3.1. Les cellules de l'immunité de type 3 : caractéristiques et différenciation

L'immunité de type 3 joue un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie intestinale, en luttant contre les micro-organismes extérieurs. L'immunité de type 3 repose d'une part sur des cellules de l'immunité innée, avec le groupe des ILC3 et, d'autre part, sur des cellules de l'immunité adaptative, avec les lymphocytes Th17 (**Figure 12**).

Les cellules lymphoïdes ILC3 expriment le cluster de différenciation CD45, commun aux cellules leucocytaires, mais pas le récepteur CD3, associé au récepteur des lymphocytes T, (cellules CD45⁺CD3⁻). Ce groupe comprend plusieurs populations cellulaires dont les cellules LT_i qui apparaissent au cours du développement embryonnaire. Ces dernières expriment non seulement le facteur de transcription ROR γ t, mais également le récepteur aux chimiokines CCR6 (LT_i CCR6⁺ROR γ t⁺). Les lymphocytes LT_i sont subdivisés en deux groupes selon qu'ils expriment le récepteur CD4 (LT_i CCR6⁺ROR γ t⁺CD4⁺), ces cellules sont alors appelées LT_i4, ou non (LT_i CCR6⁺ROR γ t⁺CD4⁻), ces lymphocytes sont nommés LT_i0. Indépendamment de l'expression du récepteur CD4, les LT_i présentent à leur surface des molécules du CMHII. En effet, les cellules LT_i persistent à l'âge adulte et jouent un rôle important dans la mise en place et le maintien des PP, des cryptopatches et des FLI mais également dans la régulation du

microbiote. En particulier, Sonnenberg et ses collaborateurs ont montré l'implication de ces cellules dans la défense intestinale contre la protéobactérie *Citrobacter rodentium* (Sonnenberg et al. 2011). A l'âge adulte, les cellules ILC3 sont majoritairement localisées au niveau des muqueuses. Elles sont subdivisées en sous-populations en fonction de l'expression de marqueurs de surface. Ainsi, certaines cellules ILC3 expriment le récepteur CCR6 (ILC3 CCR6⁺). La majorité des ILC3 CCR6⁺ présentent à leur surface le récepteur CD4 (ILC3 CCR6⁺CD4⁺). Les cellules ILC3 négatifs pour le récepteur CCR6 (ILC3 CCR6⁻) peuvent, quant à elles, exprimer le récepteur NCR, pour « Natural Cytotoxicity Receptor » (ILC3 CCR6⁻NCR⁺). La famille des NCR est composée de trois molécules, Nkp30, Nkp46 et Nkp44 (uniquement chez l'homme). Les ILC3 peuvent exprimer Nkp46 et Nkp44.

Les lymphocytes Th17 expriment à leur surface les récepteurs CD45, CD3 et CD4 (lymphocytes CD45⁺CD3⁺CD4⁺). Ces lymphocytes T helper expriment le facteur de transcription ROR γ t, indispensable à la différenciation des lymphocytes Th0 en lymphocytes Th17. Chez la souris, la différenciation des lymphocytes T naïfs en Th17 est induite par IL-6 associée au TGF- β . Ces cytokines engendrent l'expression du facteur de ROR γ t et la synthèse du récepteur à l'IL-23 (IL-23R). La cytokine IL-21 en association avec le TGF- β permet également la différenciation des lymphocytes Th17, et ce indépendamment de l'IL-6 (Korn et al. 2007). L'IL-21 est produite par les lymphocytes Th17 et, permet *via* une action autocrine d'amplifier la différenciation de ces cellules (Nurieva et al. 2007). Cette cytokine a aussi un rôle dans l'expansion et la survie des lymphocytes Th17. L'association des cytokines IL-23, IL-6 et IL-1 β est également capable d'induire la différenciation des lymphocytes Th17 murins, indépendamment de la présence de TGF- β (Ghoreschi et al. 2010). Chez l'homme, la différenciation des lymphocytes Th0 en Th17 est induite par les cytokines TGF- β et IL-1 β couplées avec l'IL-6, l'IL-21 ou l'IL-23. L'IL-23 serait également importante pour l'expansion et la survie des lymphocytes Th17 (Zhou et Littman 2009). La différenciation des lymphocytes Th17 est régulée par plusieurs mécanismes. L'acide tout trans rétinoïque *via*, notamment le récepteur RAR (retinoic acid receptor) α , contrôle la polarisation des lymphocytes Th17 (Elias et al. 2008).

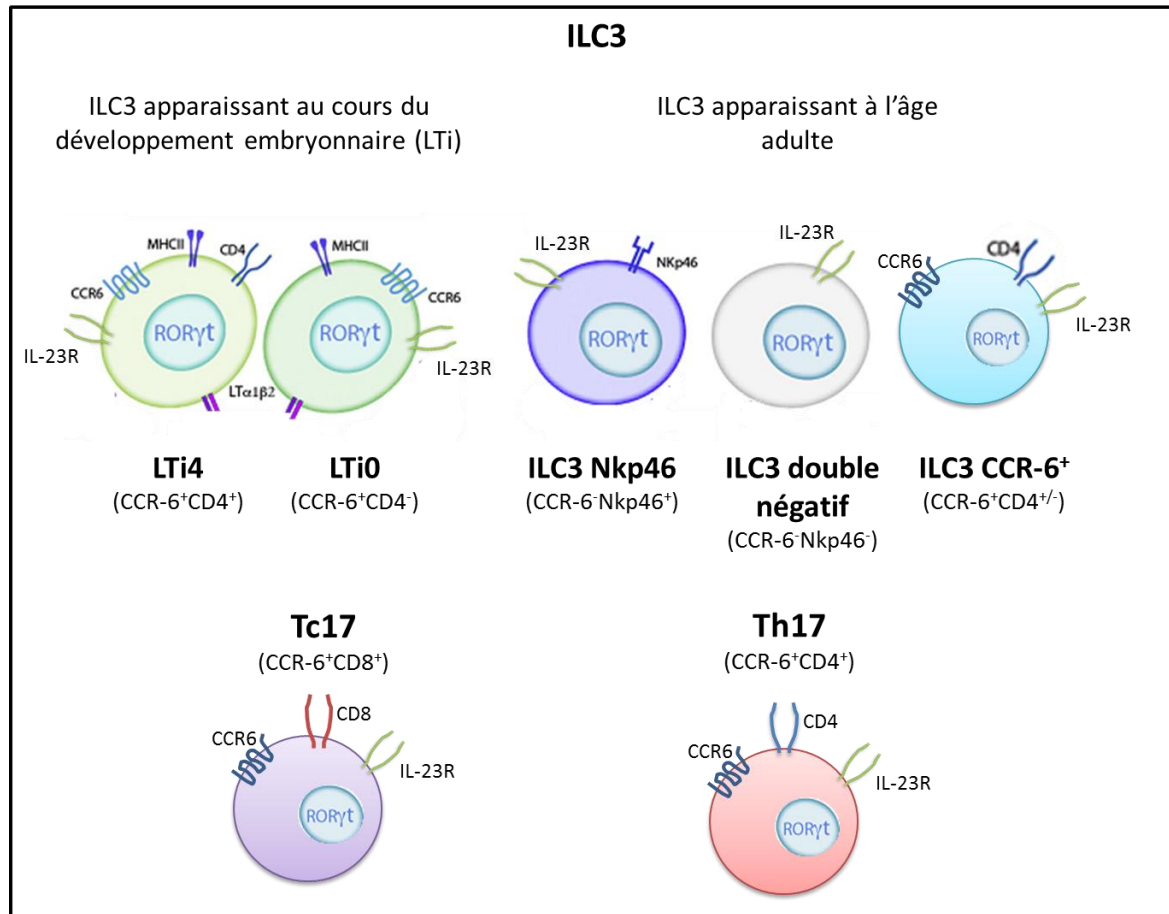


Figure 12 : **Représentation schématique des lymphocytes appartenant à l'immunité de type 3.**

Modifié de *Cording et al. 2014*

I.3.2. Les cellules de l'immunité de type 3 : rôle dans la défense de la barrière intestinale

Les cellules de l'immunité de type 3 produisent notamment les cytokines IL-17 et IL-22 qui activent la réponse anti-microbienne des cellules épithéliales, stimulent l'activité phagocytaire des cellules mononucléées et recrutent des PNN. Les cellules ILC3 répondent aux cytokines IL-1 β et IL-23 en produisant en particulier de l'IL-17A, de l'IL-17F et de l'IL-22. Ces cellules sont une source majeure d'IL-22 qui stimule la production de peptides antimicrobiens, tels que Reg3, S100a (S100 calcium-binding protein A) 8 et S100a9, par les cellules épithéliales (Mukherjee et Hooper 2015 et Sonnenberg et al. 2012). Ces peptides sont excrétés dans la lumière intestinale où ils forment un gradient de concentration décroissant allant de l'épithélium au centre de la lumière intestinale. Ils régulent ainsi spatialement les populations bactériennes (Mukherjee et Hooper 2015). L'IL-22 régule également le microbiote intestinal en induisant l'hyperplasie des cellules à mucus et en favorisant leur production de mucus lors d'une infection par un parasite (Turner, Stockinger, et Helmby 2013). L'absence

des cellules ILC3 ou de la production d'IL-22 chez la souris engendre la translocation de bactéries de l'intestin vers d'autres organes comme la rate et le foie (Sonnenberg et al. 2012). Ceci sous-entend que l'IL-22 produite par les ILC3 est impliquée dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium intestinal et dans le confinement des bactéries afin d'empêcher le développement d'une inflammation systémique (Sonnenberg et al. 2012). L'IL-22 induit également la fucosylation des chaînes d'hydrates de carbone associées aux cellules épithéliales, ce qui favorise la présence de bactéries mutualistes capables d'utiliser cette source d'énergie au sein du microbiote et limite la prolifération de bactéries pathogènes souvent incapables de métaboliser ces substrats (Goto et al. 2014 et Pham et al. 2014). Les cellules ILC3, notamment les ILC3 CCR6⁺, peuvent également réguler l'immunité adaptative en interagissant avec les lymphocytes T et B (Melo-Gonzalez et Hepworth 2017). Les cellules ILC3 CCR6⁺Nkp46⁺ sont principalement localisées dans la *lamina propria* alors que les ILC3 CCR6⁺ sont majoritairement présents dans les organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions mésentériques (Sato-Takayama et al. 2014). Ces dernières expriment à leur surface des molécules du CMH de type II (ILC3 CMHII⁺) et sont capables d'interagir avec des cellules T CD4⁺ spécifiques de bactéries commensales pour favoriser leur élimination (Hepworth et al. 2013 et Hepworth et al. 2015). En effet, une déplétion spécifique des ILC RORγt⁺CMHII⁺ chez la souris engendre une dérégulation de la réponse des lymphocytes CD4⁺ vis-à-vis des bactéries commensales, ce qui provoque l'apparition d'une inflammation intestinale (Hepworth et al. 2013). Il semblerait que les cellules ILC3 CMHII⁺ piègent un antigène microbien au niveau de la muqueuse intestinale avant de migrer vers les ganglions mésentériques où elles régulent la réponse des lymphocytes T CD4⁺ (Mackley et al. 2015). Les ILC3 régulent également l'immunité adaptative en produisant des médiateurs tels que le GM-CSF. Ce dernier induit la différenciation des lymphocytes T_{reg}, ce qui favorise le processus de tolérance (Mortha et al. 2014). L'activité des lymphocytes B est aussi régulée par les cellules ILC3. En effet, ces cellules, en particulier celles présentes dans les PP, augmente la synthèse d'IgA par les plasmocytes (Tsuji et al. 2008).

Les lymphocytes Th17 produisent des cytokines destinées à activer et maintenir des acteurs participant à la protection de la muqueuse intestinale. Les cytokines IL-6 et IL-23, responsables de la différenciation des lymphocytes Th17, stimulent la synthèse d'IL-17A, d'IL-17F et d'IL-21 par ces cellules. Les cytokines IL-17, IL-21 et IL-22 ont un rôle primordial dans la protection de l'hôte contre les infections bactériennes et fongiques (Aujla, Dubin, et Kolls 2007). Notamment, les cytokines IL-17A et IL-17F participent au recrutement et à l'activation

des PNN qui phagocytent de potentiels agents infectieux ayant traversé la barrière épithéliale. Comme pour les ILC3, l'IL-22 produite par les lymphocytes Th17 renforce les barrières physiques de défense de l'organisme contre les agents extérieurs en augmentant les jonctions entre les cellules épithéliales et en stimulant la production de mucines et de peptides antimicrobiens par ces cellules. En conditions inflammatoires, les lymphocytes Th17 synthétisent également du TNF α et du GM-CSF qui contribuent non seulement au recrutement et à l'activation des PNN mais aussi à leur survie, ce qui amplifie le processus inflammatoire.

II. Rôle des récepteurs aux chimiokines et de l'immunité de type 3 dans l'inflammation articulaire

II.1. Rappel sur la structure de l'articulation

Les articulations sont classées suivant leur fonction. Ainsi, il existe trois grands types d'articulations :

- Les articulations immobiles (ou synarthroses), qui sont des articulations dans lesquelles les os sont unis par du tissu fibreux. Ces articulations ne permettent pas de mouvement (ex : le crâne).

- Les articulations semi-mobiles (ou amphiarthroses) sont composées d'os recouverts de cartilage et reliés entre eux par des ligaments fibreux ou fibro-cartilagineux. Ces articulations permettent des mouvements limités (ex : symphyse pubienne).

- Les articulations mobiles, ou diarthroses, permettent de nombreux mouvements.

Au cours de notre étude, nous nous sommes intéressés aux articulations diarthroïdiales, ou articulations synoviales, et notamment aux poignets et aux chevilles. Les articulations diarthroïdiales sont composées de plusieurs os recouverts d'un cartilage hyalin aussi appelé cartilage articulaire et maintenus entre eux par des ligaments. Elles sont délimitées par une capsule articulaire. Une membrane, appelée membrane synoviale ou simplement synoviale, tapisse la face interne de la capsule articulaire. Les mouvements sont facilités par le liquide synovial. Certaines articulations, comme le genou, possèdent d'autres structures, comme les ménisques qui assurent une stabilisation latérale (**Figure 13**).

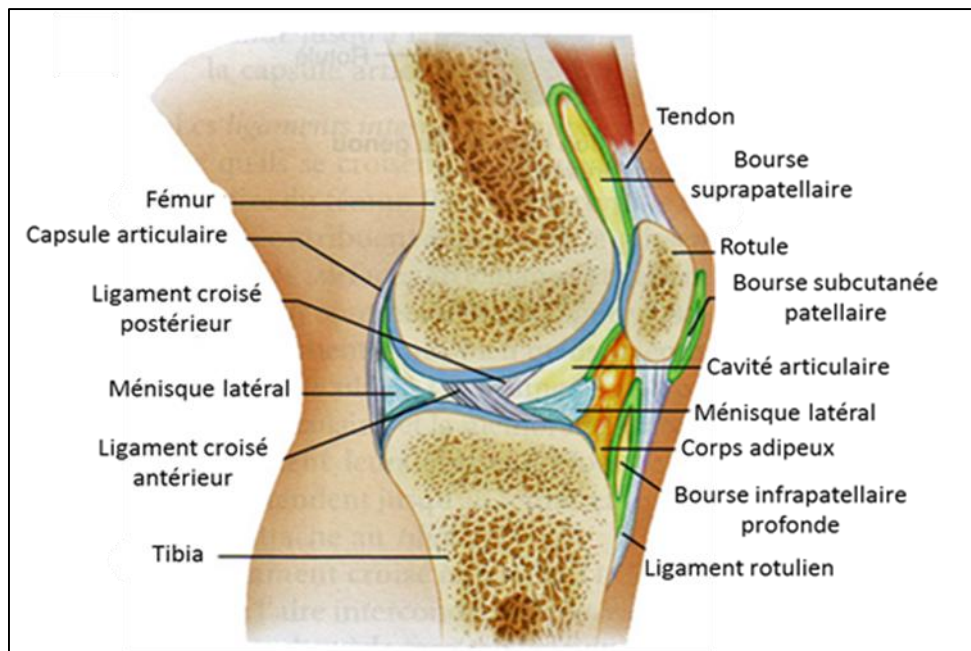


Figure 13 : **Représentation schématique de l'articulation diarthroïdale du genou en coupe sagittale**

Modifié de <https://www.mon-arthrose.com/arthrose-du-genou/les-articulations/>

Les os sont composés d'un tissu osseux recouvert d'une membrane appelée périoste sauf au niveau de leurs extrémités, celles-ci étant recouvertes par du cartilage articulaire. Le tissu osseux est de nature compacte (cortical) ou spongieuse (trabéculaire) selon sa localisation dans le segment osseux. La zone osseuse située juste en dessous du cartilage articulaire est appelée os sous-chondral. L'os sous-chondral joue un rôle de soutien du cartilage articulaire. Il contribue, avec le cartilage, à l'amortissement des chocs et à la dissipation des contraintes biomécaniques exercées sur l'articulation.

Le cartilage est un tissu conjonctif composé d'un seul type cellulaire, le chondrocyte, et d'une matrice extracellulaire (MEC). Ce tissu a la particularité d'être avasculaire et non innervé. A l'âge adulte, il existe trois types de cartilage qui se distinguent par la nature de leur matrice extracellulaire, le cartilage hyalin (ou articulaire), le fibrocartilage (ou cartilage fibreux) et le cartilage élastique. La matrice extracellulaire du cartilage hyalin est majoritairement constituée d'eau (70 à 80%), de fibres de collagène, notamment de collagène de type II (plus de 90%) mais aussi de collagènes de types VI, IX, X et XI, de protéoglycanes, de glycoprotéines de structure, de hyaluronate et d'électrolytes. Cette matrice confère les propriétés mécaniques au cartilage comme une résistance à la déformation, la transmission et la répartition des forces au sein de l'articulation. Elle favorise également le glissement des os de l'articulation les uns par rapport aux autres en limitant les forces de friction.

La capsule articulaire est une enveloppe fibreuse et élastique qui entoure et délimite les articulations diarthroïdiales. Elle permet de maintenir l'ensemble des structures articulaires entre elles et en assure la stabilité. La capsule articulaire est séparée de la membrane synoviale par la subsynoviale, structure composée de cellules conjonctives, de cellules adipeuses et d'une MEC riche en mucopolysaccharides et en collagène lâche. La membrane synoviale est un tissu conjonctif très vascularisé composé d'une à trois couches de cellules. Elle tapisse la face interne de la capsule articulaire. Elle s'organise en deux couches, la couche sous-intimale (subintima) la plus externe et la couche bordante (intima), la plus interne. L'intima est composée majoritairement de deux types cellulaires, les synoviocytes macrophagiques appelés synoviocytes de type A et les synoviocytes fibroblastiques appelés synoviocytes de type B. Les synoviocytes de type A ont une activité phagocytaire qui permet d'éliminer les débris cellulaires et les corps étrangers présents dans le liquide synovial et la matrice de l'intima. Ils défendent également l'articulation en cas d'infections. Les synoviocytes de type B sont responsables de la production du liquide synovial (Iwanaga et al. 2000 et Shikichi et al. 1999), ils contrôlent notamment la synthèse d'acide hyaluronique. La subintima est fibreuse, très vascularisée et contient des vaisseaux lymphatiques. Elle est riche en fibroblastes et possède d'autres types cellulaires comme des cellules endothéliales, des histiocytes et des mastocytes.

II.2. Physiopathologie de l'inflammation articulaire

Les rhumatismes inflammatoires chroniques (RIC), communément appelés arthrites, touchent 0,5 à 0,8% de la population française. On distingue plusieurs types d'arthrites classés en fonction de critères, comme le nombre d'articulations touchées (monoarthrite (une seule articulation touchée), oligoarthrite (2 ou 3 articulations affectées) et polyarthrite (plus de 3 articulations atteintes)), l'âge de l'apparition des premiers signes cliniques (arthrite juvénile (âge d'apparition inférieur à 15 ans), arthrite de l'adulte (âge d'apparition entre 15 ans et 65 ans) et arthrite sénile (âge d'apparition supérieur à 65 ans)), la topographie (les spondylarthrites (articulations axiales affectées), les acropolyarthrites (articulations périphériques touchées) et les arthrites rhizoméliques (racines des membres ou segments proximaux comme les épaules ou anches)), et le mécanisme mis en cause (arthrites rhumatismales, infectieuses, réactionnelles ou encore métaboliques). L'arthrite est une pathologie caractérisée par une inflammation articulaire qui, à plus long-terme, peut entraîner des dommages structuraux (os, cartilage, tendons, ligaments...). Les signes caractéristiques d'une articulation arthritique sont les signes cardinaux de l'inflammation, à savoir un gonflement, une rougeur, une chaleur excessive et une douleur ainsi qu'une diminution de sa mobilité. L'arthrite provoque des douleurs articulaires

au repos, des réveils nocturnes et la nécessité d'un dérouillage au lever le matin. Ainsi, les RIC sont des maladies invalidantes pouvant conduire à la cessation d'activités professionnelles et de certains loisirs et pouvant entraîner un isolement social (altération de la qualité de vie). L'inflammation initialement articulaire peut devenir systémique et provoquer l'apparition de manifestations extra-articulaires affectant différents organes comme les yeux, le cœur, les poumons, les nerfs, les vaisseaux et le tractus digestif. Ces complications apparaissent chez 40% des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR) et chez 20 à 60% des patients développant une spondylarthrite (SpA) ; certaines d'entre-elles nécessitent une prise en charge médicale des patients car elles contribuent à la surmortalité des patients (risque cardiovasculaire notamment). Les deux principaux RIC sont la PR et la SpA. Les articulations touchées sont différentes selon la pathologie (**Figure 14**).

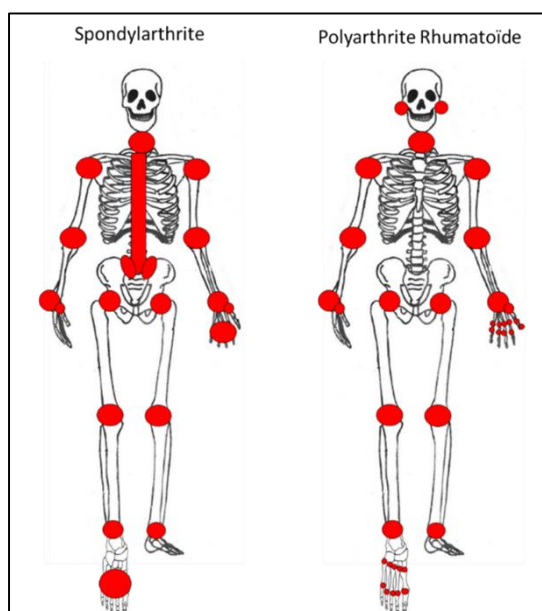


Figure 14 : **Représentation schématique des articulations atteintes dans les principaux rhumatismes inflammatoires chroniques**
Modifié de <http://slideplayer.com/slide/2403634/>

Les SpA sont caractérisées par une inflammation de l'enthèse (enthésite) (Rudwaleit et al. 2009). Ces pathologies sont actuellement classées en deux groupes, selon que les manifestations soient principalement axiales (spondylarthrites axiales), auquel cas le rachis, le bassin et la cage thoracique sont affectés, ou préférentiellement périphériques (spondylarthrites périphériques) (Taurog, Chhabra, et Colbert 2016). Dans les formes axiales, l'inflammation articulaire provoque progressivement une rigidité des articulations jusqu'à la fusion des vertèbres (**Figure 15A**). Les patients atteints de SpA peuvent développer des manifestations extra-articulaires pouvant affecter la peau (psoriasis), les yeux (uvéite) ou encore le tube

digestif. Les manifestations digestives touchent une proportion non négligeable de patients atteints de SpA puisqu'on estime que 5 à 10% d'entre eux développent MICI (Taurog, Chhabra, et Colbert 2016 et Kabeerdoss, Sandhya, et Danda 2016). Les MICI affectent majoritairement les patients atteints de SpA périphériques (del Río-Martínez et al. 2016) ; l'apparition de MICI chez ces patients étant récurrente, la présence d'une de ces pathologies (MC ou RCH) sert de critère pour la classification des SpA (SpA périphérique associée ou non à une MICI) (Taurog, Chhabra, et Colbert 2016). Plusieurs marqueurs prédisposent au développement d'une SpA. La protéine HLA (Human leukocyte antigen) B27, un antigène appartenant au CMH de type I, est souvent présente chez les patients atteints de SpA : elle est retrouvée chez près de 90% des patients atteints de spondylarthrite ankylosante (SA) alors qu'elle est exprimée chez moins de 10% de la population globale (Baraliakos et Braun 2015). La fréquence de cet antigène chez les patients atteints de la MC est la même que dans la population générale, en revanche chez les patients ayant une MC et présentant une inflammation du squelette axial, l'antigène HLA B27 est davantage présent.

La PR est une pathologie auto-immune qui touche principalement les articulations synoviales, comme les genoux, les métacarpo-phalangiennes ou les inter-phalangiennes proximales ou encore les chevilles. Cette pathologie est caractérisée par une inflammation de la membrane synoviale (synovite), qui consiste en un épaississement de la membrane synoviale dû à une prolifération des synoviocytes et à une infiltration par des cellules immunitaires ; une inflammation importante engendre la formation d'un pannus synovial. De nouveaux vaisseaux sanguins sont mis en place dans la membrane synoviale ; ils facilitent l'infiltration cellulaire. Cette inflammation peut, au cours du temps, entraîner des dommages structuraux, comme une dégradation progressive du cartilage, des lésions ligamentaires et tendineuses et une érosion de l'os (**Figure 15B**). Des phases de poussées inflammatoires peuvent être entrecoupées de périodes d'accalmie. Ces périodes sont caractérisées par une tentative de reconstruction de l'os. L'alternance des phases de résorption osseuse, au cours des poussées inflammatoires, et de reconstruction osseuse, pendant les périodes d'accalmie, provoque un remodelage important entraînant des déformations articulaires. Certains patients atteints de PR possèdent des auto-anticorps comme le facteur rhumatoïde (FR) et/ou des auto-anticorps dirigés contre des protéines citrullinées appelés ACPA (Anticorps anti-peptides citrullinés). Le FR est une immunoglobuline, le plus souvent de type IgM, qui reconnaît les immunoglobulines de type IgG. Les auto-anticorps peuvent être détectés bien avant l'apparition des premiers symptômes inflammatoires (jusqu'à 10 ans environ) et leur présence au moment du diagnostic est un facteur

de risque de sévérité. La PR est une maladie multifactorielle faisant intervenir des facteurs génétiques (ex : HLA-DR4/1, PTPN22 (protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22)) et des facteurs environnementaux (ex : pollution de l'air, infections, cigarette). L'ensemble des critères est pris en compte pour déterminer si le patient est atteint de PR et pour choisir la stratégie thérapeutique (Aletaha et al. 2010 et Smolen et al. 2014).

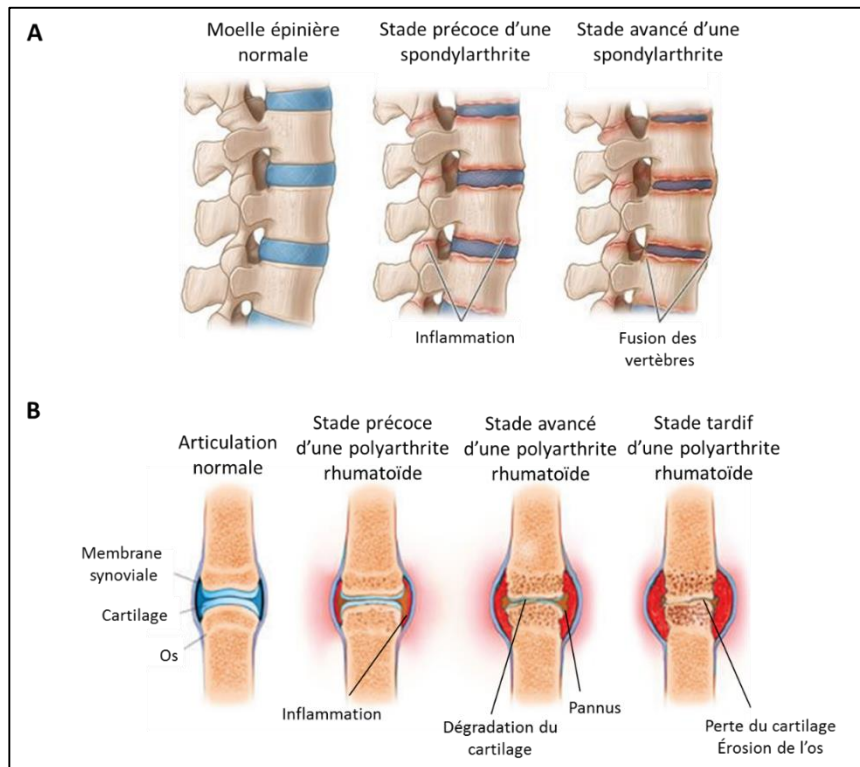


Figure 15 : Représentations schématiques de la progression des lésions de la spondylarthrite dans la moelle épinière (A) et de la polyarthrite rhumatoïde dans une articulation synoviale (B)

Modifiés de <https://disabilitycreditcanada.com/rheumatoid-arthritis-and-genetics-is-it-hereditary/> et <http://www.qmedicine.co.in/top%20health%20topics/A/Ankylosing%20Spondylitis.html>

II.3. Rôle du chimiotactisme dans l'inflammation articulaire

II.3.1. Rôle des cellules immunitaires présentes, dans les conditions homéostatiques dans l'intestin grêle, dans l'inflammation articulaire

La muqueuse intestinale héberge un grand nombre de types cellulaires appartenant aux immunités innée et adaptative. Plusieurs types cellulaires présents physiologiquement dans l'intestin grêle sont impliqués dans le processus inflammatoire de l'arthrite. Les cellules présentes dans les articulations des patients atteints de PR sont recrutées *via* la circulation sanguine grâce au chimiotactisme (**Figure 16**). De nombreuses chimiokines ont été détectées dans la membrane et le liquide synovial de ces patients.

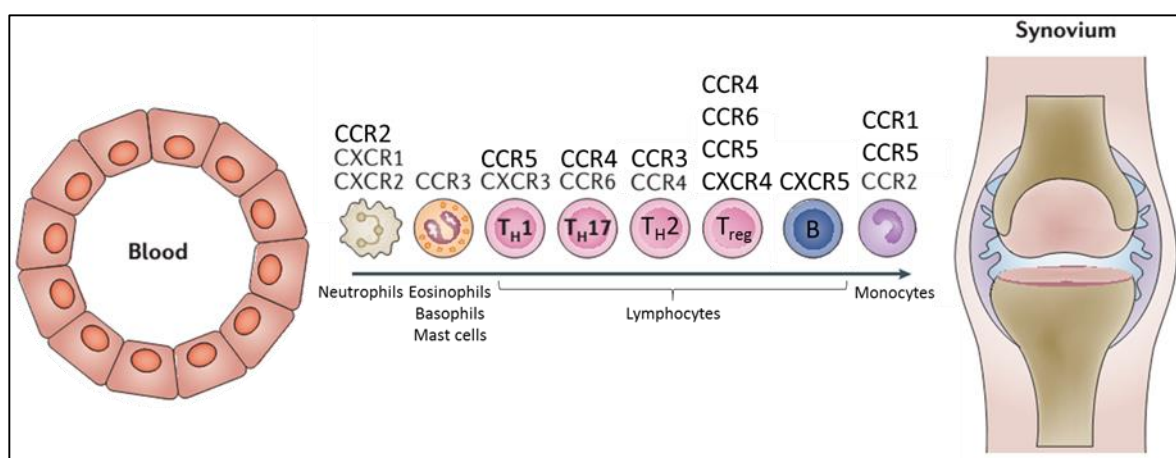


Figure 16 : **Illustration des principales cellules immunitaires recrutées au sein des articulations arthritiques et des récepteurs aux chimiokines permettant leur migration**

D'après Szekanecz et Koch 2016

Les chimiokines CCL2, CCL5, CCL8 et CCL15 sont davantage présentes dans la membrane synoviale des patients atteints de PR, que dans celles de patients atteints d'arthrose (Haringman et al. 2006). Lors du développement d'une PR, les récepteurs CCR1 et CCR5 sont moins exprimés sur les monocytes du sang périphérique que chez des contrôles sains alors qu'ils sont abondamment présents dans la membrane synoviale. Les chimiokines CCL2 et CCL5 sont notamment impliquées dans le recrutement des monocytes et des macrophages. La chimiokine CXCL10 est sécrétée par les synoviocytes et les cellules endothéliales en réponse à l'IFN γ . Cette chimiokine est présente dans le sérum et le liquide synovial des patients atteints de PR (E. Y. Lee, Lee, et Song 2009). L'interaction de CXCL10 avec son récepteur CXCR3 induit, notamment, la migration des macrophages et des monocytes vers les articulations arthritiques (J.-H. Lee et al. 2017). La chimiokine CXCL5 induit principalement la migration des PNN. Cependant, dans des articulations arthritiques cette chimiokine peut être citrullinée par les enzymes PAD (peptidyl-arginine déaminase) 2 et PAD4 fortement exprimées dans la

membrane synoviale (Yoshida et al. 2014). Une fois citrullinée, CXCL5 recrute préférentiellement les monocytes.

Les lymphocytes T CD4⁺ contribuent largement à l'inflammation articulaire. Les cellules T CD4⁺ exprimant le récepteur CXCR4 sont très présentes dans la membrane synoviale des patients atteints de PR (T. Nanki et al. 2000). Le ligand de ce récepteur, la chimiokine CXCL12, est localisé dans les vaisseaux sanguins de la membrane synoviale des patients. De même, les lymphocytes T présents dans la membrane synoviale des patients atteints de PR expriment le récepteur CXCR6 (Toshihiro Nanki et al. 2005) et la chimiokine CXCL16, son ligand, est fortement exprimée dans la synoviale de ces patients. Le modèle d'arthrite induite par injection de collagène (AIC) chez la souris a été utilisé pour confirmer le rôle de CXCL16 dans la PR (Toshihiro Nanki et al. 2005). En effet, l'administration d'un anticorps monoclonal ciblant cette chimiokine diminue la sévérité de la pathologie. Les lymphocytes T présents dans la membrane synoviale des articulations arthritiques sécrètent eux-mêmes des chimiokines telles que CXCL13, une protéine induisant la migration des lymphocytes B (Manzo et al. 2008).

Des études discriminant les sous-populations de lymphocytes T helper ont montré que les lymphocytes Th1 sont recrutés au sein des articulations arthritiques *via* les récepteurs CXCR3 et CCR5 associés aux chimiokines CXCL9 et CXCL10 et CCL3, CCL4 et CCL5 respectivement (Qin et al. 1998). Un modèle d'arthrite expérimentale a permis de montrer l'importance des lymphocytes T CXCR3⁺ dans l'inflammation articulaire. En effet, l'inhibition du récepteur CXCR3 par un anticorps monoclonal diminue significativement le nombre de lymphocytes T dans les articulations et réduit la sévérité de l'arthrite à l'adjuvant (AA) chez le rat (Mohan et Issekutz 2007). De même, la neutralisation de la chimiokine CXCL10 par un anticorps spécifique engendre la même observation dans l'AIC chez la souris (Kwak et al. 2008).

L'interaction du récepteur CCR6, exprimé par les lymphocytes Th17, avec son ligand CCL20 a aussi été impliqué dans le développement de l'inflammation articulaire (Hirota et al. 2007). La chimiokine CCL20 est sécrétée par les synoviocytes des articulations arthritiques (chez les patients atteints de PR et les souris développant spontanément une arthrite médiée par les lymphocytes T (souris SKG)) et les lymphocytes Th17 eux-mêmes. Les cytokines TNF α , IL-1 β et IL-17 sécrétées par ces dernières stimulent la production de CCL20 par les synoviocytes et contribuent ainsi à leur propre recrutement dans les articulations (Kawashiri et al. 2009). Le récepteur CCR4 est également impliqué dans le recrutement des lymphocytes

Th17 dans les articulations arthritiques. Le liquide synovial des patients atteints de PR compte une forte proportion de lymphocytes Th17 co-exprimant les récepteurs CCR4 et CCR6 (Leipe et al. 2010). De plus, la chimiokine CCL22, un ligand de CCR4, est davantage sécrétée dans le liquide synovial et le plasma des patients atteints de PR que chez ceux souffrant d'arthrose (Flytlie et al. 2010). Les modèles animaux témoignent de l'implication de ces cellules dans la PR. De récentes études montrent que la diminution de la sévérité de l'AIC est corrélée à une diminution du nombre de lymphocytes Th17 (Yang et al. 2017, G. Sun et al. 2018 et Park et al. 2018). Dans ce modèle des ILC3 exprimant le récepteur CCR6 ont également un rôle important. Ces cellules sont présentes dans le sang périphérique et les articulations des souris développant une AIC (Takaki et al. 2016).

Les lymphocytes T_{reg} sont également présents dans les articulations des patients atteints d'arthrite (van Roon et al. 2010). En revanche, le nombre de lymphocytes T_{reg} dans la circulation sanguine de ces patients reste controversé. Des études montrent une augmentation de ces cellules circulantes alors que d'autres ont rapporté leur diminution ou un taux similaire aux donneurs sains (Han et al. 2008, Al-Zifzaf et al. 2015 et Lin et al. 2007). Chez l'homme les lymphocytes T_{reg} exprimant FoxP3 sont hétérogènes et peuvent posséder des propriétés immunosuppressives et/ou pro-inflammatoires (Prakken, Ellen Wehrens, et van Wijk 2013). On distingue des lymphocytes T_{reg} qui possèdent uniquement une activité immunosuppressive avec notamment la sécrétion de TGF- β et d'IL-10, des lymphocytes T_{reg} qui commencent progressivement à produire des médiateurs pro-inflammatoires et qui ont une activité immunosuppressive réduite, des lymphocytes instables qui perdent FoxP3 et se différencient en lymphocytes T effecteurs, en perdant leur activité immunosuppressive et des lymphocytes T_{reg} qui conservent FoxP3 mais qui produisent, en plus des cytokines immunosuppressives, des médiateurs typiques de lymphocytes T effecteurs. Cette dernière population de lymphocytes T_{reg} peut exprimer le facteur de transcription ROR γ t (cellules double positive Foxp3⁺ROR γ t⁺) et ainsi produire à la fois de l'IL-10 et de l'IL-17. Ces lymphocytes T_{reg} bivalents sont présents chez les patients atteints de PR (Wang et al. 2015). Chez ces patients, le facteur de transcription FoxP3 peut être inhibé dans les cellules. En effet, le TNF α est capable d'induire la déphosphorylation de FoxP3 et de provoquer ainsi une perte de l'activité immunosuppressive de ces lymphocytes T_{reg} (Nie et al. 2013). La diminution de l'activité des lymphocytes T_{reg} est corrélée à une augmentation des lymphocytes Th1 et Th17 dans la membrane synoviale des patients atteints de PR. L'utilisation d'anticorps dirigés contre le TNF α , tels que l'infliximab, favorise l'émergence de lymphocytes T_{reg} exprimant FoxP3 sécrétant les cytokines

immunosuppressives TGF- β et IL-10 (Nie et al. 2013 et Nadkarni, Mauri, et Ehrenstein 2007). Les lymphocytes T_{reg} semblent importants pour limiter la mise en place de l'arthrite expérimentale. En effet, les souris K/BxN développent spontanément une arthrite ; l'inactivation de FoxP3 chez ces souris engendre une apparition plus précoce des symptômes et augmente la sévérité de l'arthrite (Nguyen et al. 2007). De même, de récentes études montrent qu'une diminution de la sévérité de l'AIC chez la souris est associée à une diminution du nombre de lymphocytes Th17 et à une augmentation des lymphocytes T_{reg} (Yang et al. 2017, G. Sun et al. 2018 et Park et al. 2018). La migration des lymphocytes T_{reg} lors du développement d'une PR fait intervenir les récepteurs CCR6 et CCR4. En effet, l'expression de ces deux récepteurs est plus importante sur les lymphocytes T_{reg} circulants des patients atteints de PR que chez des donneurs sains (Li et al. 2015). L'expression de CCR4 ou CCR6 sur les lymphocytes T_{reg} semble corrélée avec la sévérité de la pathologie. Les lymphocytes T_{reg} présents dans le liquide synovial des atteints de PR expriment également les récepteurs aux chimiokines CCR5 et CXCR4 (Jiao et al. 2007).

Les PNN ont également un rôle majeur dans l'inflammation articulaire des patients atteints de PR (Wright, Moots, et Edwards 2014). Ils sont activés dans l'articulation arthritique par des complexes immuns présents dans le liquide synovial et à la surface du cartilage. Les PNN activés excrètent le contenu de leurs granules et produisent des ERO. Parmi les médiateurs libérés, la MPO inhibe la résolution de l'inflammation alors que la lactoferrine stimule ce processus, et que d'autres enzymes telles que l'élastase, la gélatinase et la collagénase dégradent le cartilage articulaire. A la surface du cartilage, l'association des PNN aux complexes immuns provoque la formation incomplète d'un phagosome, lequel fournit un environnement propice à la production d'agents oxydants et cytotoxiques par ces cellules. Ce mécanisme participe activement à la dégradation du cartilage (**Figure 17**) (Wright, Moots, et Edwards 2014). Les PNN régulent également l'activité de cellules immunitaires et résidentes de l'articulation notamment en sécrétant de nombreuses cytokines et chimiokines. Ils produisent ainsi la cytokine IL-17 et le ligand du récepteur RANK (Receptor activator of nuclear factor kappa-B), RANKL, tous deux impliqués, indirectement ou directement, dans la destruction des structures osseuses et la protéine BAFF qui participe à l'activation des lymphocytes B (Chakravarti et al. 2009 et Assi et al. 2007). Ces cellules présentes dans le liquide synovial synthétisent également les chimiokines CXCL10, CXCL8, CCL3 et CCL18 qui induisent le recrutement de lymphocytes et de PNN (Auer et al. 2007). Contrairement aux PNN de la circulation sanguine, ceux présents dans le liquide synovial sécrètent la chimiokine CCL20 nécessaire au recrutement

des cellules CCR6 positives (Schlenk et al. 2005). Les PNN présents dans la circulation sanguine et le liquide synovial des patients atteints de PR peuvent exprimer à leur surface des molécules de CMH de classe II et présenter ainsi des antigènes aux lymphocytes T (Cross et al. 2003). Cependant, ils n'expriment que faiblement les molécules de co-stimulation. Des chimiokines impliquées dans la migration des PNN et leurs récepteurs ont une expression marquée au sein des articulations arthritiques. Par exemple, les chimiokines CXCL1, CXCL5 (le récepteur cible de ces deux chimiokines est CXCR2) et CXCL8 (CXCR1 et CXCR2 sont les deux récepteurs de cette chimiokine) sont abondamment exprimées dans le sérum, le liquide synovial et la membrane synoviale des patients atteints de PR (Szekanecz et al. 2010). Au sein de l'articulation, les synoviocytes et les cellules endothéliales sécrètent ces chimiokines. Ces dernières ont un pouvoir chimioattractant puissant sur les PNN. L'inhibition de la chimiokine CXCL5 dans l'AA chez le rat réduit la sévérité de la pathologie (Halloran et al. 1999). L'interaction du récepteur CCR2 avec la chimiokine CCL2 peut également contribuer au recrutement des PNN dans les articulations arthritiques (Talbot et al. 2015).

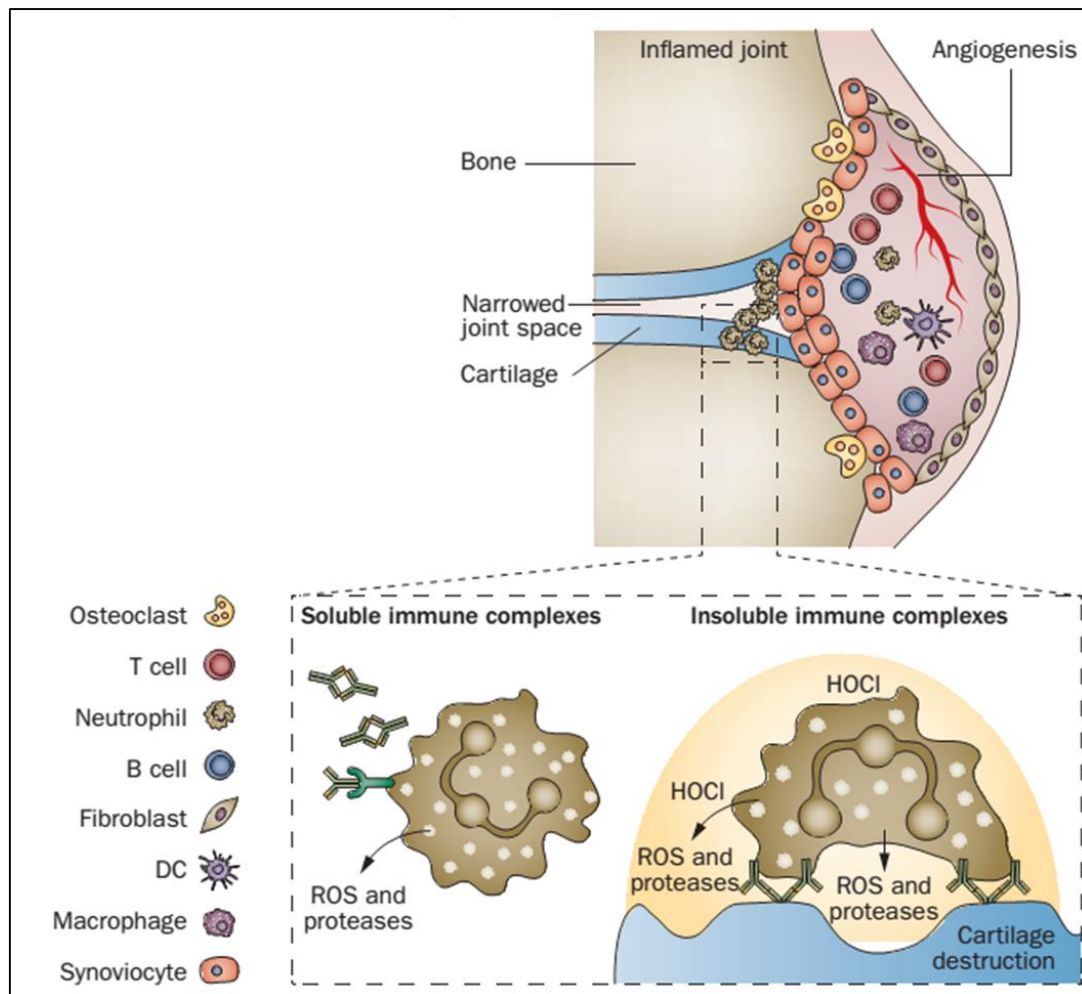


Figure 17 : **Illustration des cellules immunitaires et résidentes de l'articulation impliquées dans la formation du pannus synovial et des actions des PNN suite à leur activation par des complexes immuns dans le liquide synovial et à la surface du cartilage**

D'après Hughes et Nibbs 2018

D'autres cellules immunitaires comme les PNE et les mastocytes ont un rôle dans la physiopathologie de l'arthrite. Les PNE peuvent même avoir une place prépondérante dans l'arthrite dite éosinophilique (Tay 1999). L'éosinophilie peut être associée à différentes formes d'arthrite, comme le rhumatisme psoriasique (RP) ou encore la PR (Vázquez-Triñanes et al. 2013, Chiardola et al. 2008 et Hällgren et al. 1985). Cependant, le nombre de PNE n'est pas nécessairement corrélé avec la sévérité de l'arthrite (Sofi, Parrey, et Ahmad 2017). Les patients arthritiques ont un taux circulant d'IL-17 plus important que les patients sans éosinophilie (Guellec et al. 2015). Les traitements utilisés dans la PR, notamment les traitements de fond conventionnels, sont moins efficaces chez les patients présentant une éosinophilie modérée au moment du diagnostic de leur arthrite. Des patients peuvent présenter un taux important de PNE dans leur liquide synovial tout en conservant un taux de PNE circulant normal (Vázquez-Triñanes et al. 2013). Des patients souffrant de PR présentent dans leur membrane synoviale

de nombreuses cellules exprimant le facteur de transcription GATA3 ; ces cellules peuvent être des lymphocytes Th2, des cellules ILC2 ou encore des PNE (Z. Chen et al. 2016). Les lymphocytes Th2 sont davantage observés dans la membrane synoviale pendant les phases précoces de la PR (Aarvak et al. 2000). La protéine EPO sécrétée par les PNE est élevée dans la membrane synoviale et dans le sérum de ces patients. Cependant, sa présence n'est pas corrélée à la sévérité de l'arthrite. L'induction simultanée d'une infection par le parasite *Nippostrongylus brasiliensis* et d'une arthrite initiée par transfert de sérum des souris K/BxN provoque une réaction immunitaire de type 2 (Z. Chen et al. 2016). L'infection parasitaire conduit à une accumulation des lymphocytes Th2 et des PNE dans les articulations des souris et à une diminution de la sévérité de l'arthrite *via* la sécrétion de cytokines IL-4 et IL-13. Les PNE participent probablement à la diminution de l'inflammation articulaire en favorisant la polarisation des macrophages anti-inflammatoires dans ce modèle. Des chimiokines, comme les éotaxines, impliquées dans le recrutement des PNE et des lymphocytes Th2, sont présentes dans les articulations arthritiques. Ces cellules expriment les récepteurs CCR3 et CCR4. La chimiokine CCL13, un ligand du récepteur CCR3, est impliquée dans la migration des PNE, des PNB, des mastocytes et des lymphocytes Th2 (Mendez-Enriquez et García-Zepeda 2013). Cette chimiokine est produite par les chondrocytes dans les articulations des patients atteints de PR (Iwamoto Takuji et al. 2007). Les PNE purifiés du sang périphérique d'individus sains expriment le récepteur CXCR3 et répondent aux chimiokines CXCL9 et CXCL10 (Jinquan et al. 2000). Ces deux cytokines étant présentes dans les articulations des patients atteints de PR, leur interaction avec le récepteur CXCR3 pourrait être un mécanisme de recrutement des PNE dans les articulations arthritiques.

II.3.2. Le rôle des récepteurs aux chimiokines localisés sur les cellules résidentes de l'articulation dans l'inflammation synoviale

Les récepteurs aux chimiokines ne sont pas exclusivement exprimés à la surface des cellules immunitaires. Des cellules résidentes de l'articulation expriment ces récepteurs et l'activation de ces derniers participe au processus inflammatoire et aux dommages des structures cartilagineuses et osseuses observés au cours d'une arthrite (**Figure 18**). La chimiokine CXCL12, un ligand de CXCR4, est produite naturellement par les synoviocytes et son taux est augmenté dans le liquide synovial des patients atteints de PR (Kanbe, Takagishi, et Chen 2002). Le récepteur CXCR4 est exprimé à la surface des chondrocytes articulaires. La chimiokine CXCL12 stimule la sécrétion de la métalloprotéase MMP3 par les chondrocytes *in vitro* et ce de manière dose-dépendante. Les chondrocytes expriment d'autres récepteurs aux

chimiokines comme CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CXCR1 et CXCR2 (Borzi et al. 2000). L'activation de ces récepteurs par CCL5 pour CCR1, CCR3 et CCR5, par CCL2 pour le récepteur CCR2 et par CXCL1 pour le récepteur CXCR2 déclenche la synthèse et la libération des métalloprotéases MMP1 et MMP3 ainsi que de l'enzyme N-acétyl- β -D-glucosaminidase capable de dégrader les glycosaminoglycanes et l'acide hyaluronique, par les chondrocytes. Ces enzymes, dans les conditions homéostatiques permettent le renouvellement de la matrice cartilagineuse et leur expression est hautement régulée. L'expression de CCR1 sur les chondrocytes humains sains reste cependant controversée puisque Alaaeddine et ses collaborateurs n'ont pas détecté ce récepteur sur les chondrocytes sains (Alaaeddine et al. 2001). CCL5 induit la synthèse de médiateurs de l'inflammation tels que la cytokine IL-6 et l'enzyme iNOS (inductible nitric oxide synthase) par les chondrocytes. Ces cellules issues de patients atteints de PR sont capables de produire la chimiokine CCL13 qui stimule la prolifération des synoviocytes fibroblastiques (Iwamoto et al. 2007).

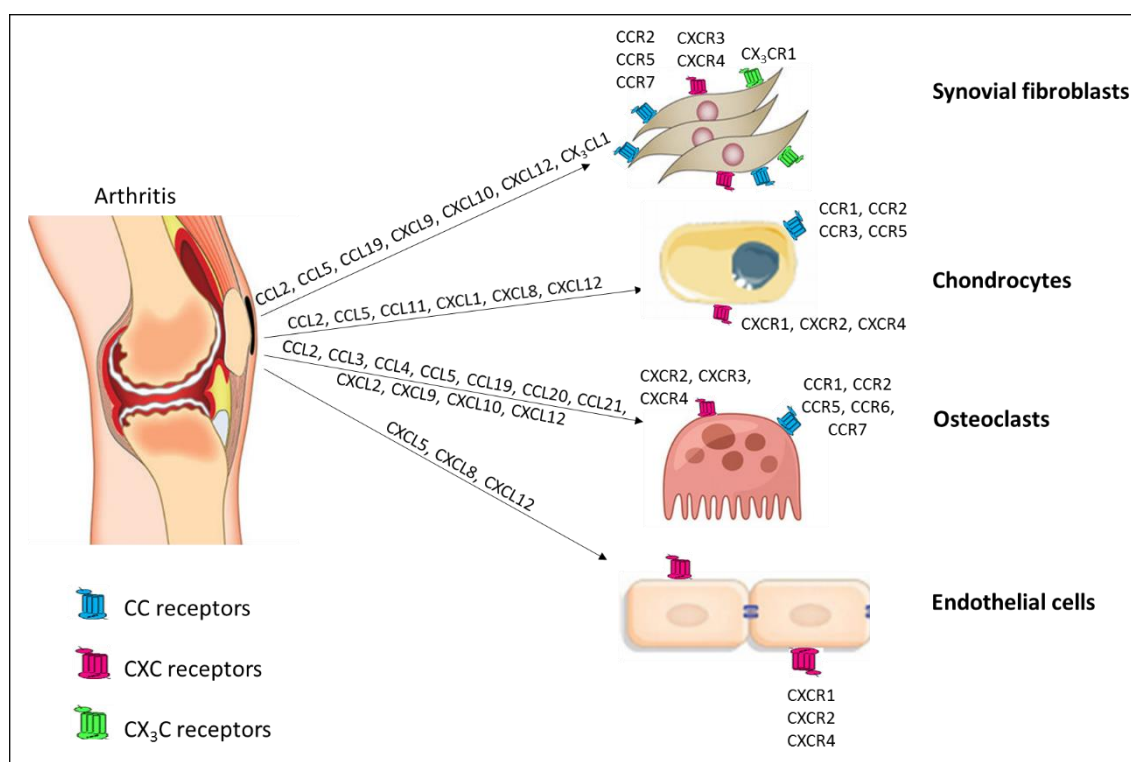


Figure 18 : **Illustration de l'activation des cellules résidentes de l'articulation par les chimiokines au cours d'une arthrite**

D'après White, Iqbal, et Greaves 2013 et <https://dailyhealthpost.com/arthritis-pain/>

Les synoviocytes expriment aussi des récepteurs aux chimiokines. Les synoviocytes fibroblastiques des patients atteints de PR expriment les récepteurs CCR2, CCR5, CXCR3 et CXCR4 (García-Vicuña et al. 2004). *In vitro*, les chimiokines CCL2, CCL5, CXCL9, CXCL10 et CXCL12 induisent la migration et la prolifération des synoviocytes fibroblastiques ainsi que

leur production d'enzymes de dégradation de la matrice cartilagineuse. Ces chimiokines sont présentes dans les articulations des patients atteints de PR (Patel, Zachariah, et Whichard 2001, Kanbe, Takagishi, et Chen 2002 et Pavkova Goldbergova et al. 2012). Les chimiokines CCL2, CCL5 et CXCL12 *via* leur récepteurs respectifs CCR2, CCR5 et CXCR4 induisent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et l'IL-8 par les synoviocytes fibroblastiques des patients atteints de PR (Toshihiro Nanki et al. 2001). Ces cellules, en présence de stimuli pro-inflammatoires, sont capables de produire les chimiokines CCL2, CCL5 et CXCL12 ; ainsi, l'activation des synoviocytes fibroblastiques se fait probablement par un mécanisme autocrine ou paracrine. Les synoviocytes des patients atteints de PR expriment également le récepteur CX₃CR1 et produisent son ligand, la chimiokine CX₃CL1 (Sawai et al. 2007). Ainsi, par un mécanisme autocrine, l'interaction de CX₃CR1 et de CX₃CL1 stimule la prolifération des synoviocytes et contribue ainsi à l'hyperplasie de la membrane synoviale. La chimiokine CXCL7, localisée dans la membrane synoviale des patients atteints de PR, induit également la prolifération des synoviocytes (Alisa E. Koch 2005). La chimiokine CXCL12 produite par les synoviocytes fibroblastiques stimulent l'angiogenèse (Pablos et al. 2003). Les synoviocytes fibroblastiques des patients atteints de PR expriment le récepteur CCR7 (Brühl et al. 2008). La stimulation de ces synoviocytes avec la chimiokine CCL19, un ligand de CCR7, provoque la production de VEGF (Vascular endothelial growth factor) par ces cellules. Ainsi, les synoviocytes d'une articulation arthritique favorisent la mise en place de nouveaux vaisseaux sanguins. Les synoviocytes fibroblastiques participent à l'érosion de l'os au cours de la PR. La chimiokine CXCL12 stimule l'expression de RANKL par les synoviocytes synoviaux ainsi que par les lymphocytes T CD4⁺ et contribue à l'ostéoclastogenèse (Kim et al. 2014). Ce processus est induit par le TNF α .

A l'instar de CXCL12, des chimiokines jouent un rôle dans le remodelage osseux au cours de la PR. Les chimiokines CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9 et CXCL10 sont impliquées dans la différenciation et la survie des ostéoclastes (Maruotti et al. 2011). Les précurseurs des ostéoclastes sont présents dans le liquide synovial des patients atteints de PR (Sucur et al. 2017). Ces cellules expriment le récepteur CXCR3. *In vitro*, la stimulation des précurseurs des ostéoclastes par RANKL induit leur sécrétion de la chimiokine CXCL9 qui, dans ce contexte, induit la migration, l'adhésion de ces cellules et leur différenciation en ostéoclastes (Kwak et al. 2005). *In vitro*, RANKL induit l'expression de CXCL10 dans les précurseurs des ostéoclastes murins (Kwak et al. 2008). En contrepartie, CXCL10 stimule l'expression de RANKL dans les lymphocytes T CD4⁺ et participe ainsi à l'ostéoclastogenèse.

Dans le modèle expérimental d'AIC chez la souris, l'utilisation d'un anticorps neutralisant CXCL10 diminue, non seulement l'infiltration de lymphocytes dans la membrane synoviale, mais limite aussi les atteintes osseuses (Kwak et al. 2008). RANKL stimule également la synthèse de CXCL2, une chimiokine très présente dans le liquide synovial des patients atteints de PR, par les précurseurs des ostéoclastes murins (Ha et al. 2010). Cette chimiokine augmente la prolifération, la migration, l'adhésion et la différenciation de ces précurseurs pendant l'ostéoclastogenèse. Les précurseurs des ostéoclastes présents dans le liquide synovial des patients atteints de PR expriment davantage les récepteurs CCR1, CCR2, CXCR3 et CXCR4 (Sucur et al. 2017). Les chimiokines CCL2, CCL5 et CXCL10 favorisent la migration et la différenciation des ostéoclastes (M. S. Kim, Day, et Morrison 2005 et Sucur et al. 2017). La chimiokine CCL4 quant à elle joue un rôle dans la migration et l'invasion des précurseurs des ostéoclastes mais n'influence pas leur différenciation (Xuan et al. 2017). La différenciation des ostéoclastes chez le rat et la souris est accompagnée d'une augmentation de l'expression de la chimiokine CCL9 et de son récepteur, CCR1 (M. Yang et al. 2006). La chimiokine CCL3 est aussi impliquée dans la différenciation des ostéoclastes (Watanabe et al. 2004). Les ostéoclastes issus des patients atteints de PR expriment à leur surface le récepteur CCR7. Par ailleurs les ligands de ce récepteur, CCL19 et CCL21, sont fortement présents dans le liquide synovial de ces patients. L'interaction de ces chimiokines avec le récepteur CCR7 induit, *in vitro*, la migration des ostéoclastes et favorise la résorption osseuse (Lee et al. 2017). La chimiokine CXCL8 stimule la différenciation des ostéoclastes et ce en lien avec les ACPA (Krishnamurthy et al. 2016). Les ostéoclastes et les ostéoblastes expriment le récepteur CCR6. L'os sous-chondral issu de patients atteints de PR présente une expression importante de CCR6 et de son ligand CCL20 (Lisignoli et al. 2007). La chimiokine CCL20 augmente la prolifération des ostéoblastes mais n'induit pas leur sécrétion de métalloprotéases. En revanche, les cytokines pro-inflammatoires stimulent la production de CCL20 et de RANKL par ces cellules. La chimiokine CCL20 impacte également les ostéoclastes. Elle stimule leur différenciation et induit leur libération de MMP9.

Au cours du processus inflammatoire, le nombre de vaisseaux sanguins augmente dans les articulations arthritiques. Cette néo-vascularisation favorise le recrutement de cellules immunitaires et l'irrigation de l'articulation. Des chimiokines et certains de leurs récepteurs ont été observés sur les cellules endothéliales vasculaires (Rump et al. 2017). Des chimiokines, telles que CCL7, CCL14, CCL16 et CCL22 sont naturellement exprimées par les cellules endothéliales. Les chimiokines CCL14 et CCL22 sont davantage présentes chez les patients

atteints de PR. D'autres chimiokines sont exprimées par les cellules endothéliales chez les patients atteints de PR même si elles ne sont pas toutes présentes dans les mêmes proportions. CCL19, CCL7, CCL17, CCL16 et CCL22 sont les chimiokines les plus exprimées sur ces cellules (plus de 70% des vaisseaux les expriment). Les chimiokines CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CCL10, CCL13, CCL15, CCL18, CCL21, CCL23, CCL24, CCL26 sont modérément exprimées sur les vaisseaux sanguins ; 27 à 64% des vaisseaux sanguins des articulations des patients atteints de PR expriment ces chimiokines. CCL1, CCL11, CCL12, CCL17, CCL20 et CCL27 sont les moins représentées puisque moins de 20% des vaisseaux sanguins sont positifs pour ces chimiokines. Certaines chimiokines CXC inhibent l'angiogenèse alors que d'autres stimulent ce processus. Ainsi, les chimiokines CXC sont classées selon la présence ou non d'un motif de trois acides aminés (ELR pour Glutamine-Leucine-Arginine) en amont de la première cystéine conservée. Les chimiokines possédant ce motif favorisent l'angiogenèse alors que celles ne l'ayant pas inhibent ce processus (Strieter et al. 1995). Les cellules endothéliales expriment à leur surface les récepteurs CXCR1 et CXCR2. Ces récepteurs possèdent de nombreux ligands dont certains, comme CXCL1, CXCL2 et CXCL5, sont présents dans le liquide synovial des patients atteints de PR. Ainsi, ces chimiokines sont potentiellement impliquées dans la néo-vascularisation des articulations arthritiques (Totson et al. 2016). Les chimiokines CXCL5 et CXCL8, possédant le motif ELR, sont localisées à proximité des vaisseaux sanguins dans la membrane synoviale des patients atteints de PR (A. E. Koch et al. 2001). Les homogénats des membranes synoviales de ces patients favorisent l'angiogenèse. La chimiokine CXCL12 ne possède pas le motif ELR et est très abondante dans les articulations arthritiques. Contrairement aux autres chimiokines dépourvues de ce motif, CXCL12 est impliquée dans la formation des vaisseaux sanguins dans les articulations arthritiques (Pablos et al. 2003). CXCL12 et son récepteur CXCR4 sont présents sur les cellules endothéliales. CXCL12 est immobilisée sur la paroi des vaisseaux sanguins grâce à des molécules d'héparane sulfate, ce qui lui permet de favoriser l'angiogenèse et l'infiltration des cellules immunitaires.

II.4. Le rôle physiopathologique des cellules de l'immunité de type 3 dans l'inflammation articulaire

L'immunité de type 3 joue un rôle physiopathologique majeur dans les RIC. La présence de cellules relevant de cette immunité, comme les lymphocytes Th17 et les cellules ILC3, dans les articulations et la circulation sanguine des patients arthritiques témoigne de cette importance. Ainsi, des études montrent un nombre de lymphocytes Th17 périphériques

augmenté chez les patients atteints de PR et de SA (Lei Zhang et al. 2012). Les lymphocytes Th17 et les cellules ILC3 sont également présents dans le liquide synovial et la membrane synoviale des patients souffrant de SpA, de PR et de RP (Al-Mossawi et al. 2015). Chez les patients atteints de SpA, les protéines HLA B27 peuvent former des homodimères *via* l'interaction de leurs chaînes lourdes, et interagir avec le récepteur KIR3DL2 (killer cell Ig-like receptor) exprimé à la surface des lymphocytes Th17. Cette interaction induit la prolifération et la survie des lymphocytes Th17 et stimule leur production d'IL-17 (Bowness et al. 2011).

Les patients souffrant de SA ou de PR ont des taux élevés d'IL-17 et d'IL-23 dans le sérum et le liquide synovial. Les taux d'IL-17A dans le sérum, le liquide synovial et la membrane synoviale des patients atteints de PR sont corrélés à la sévérité de la pathologie et peuvent aider au pronostic (Roşu et al. 2012). La cytokine IL-17 est produite par les lymphocytes Th17 et les cellules ILC3 mais également par d'autres cellules immunitaires telles que les mastocytes et les PNN. Lors d'une inflammation articulaire, cette cytokine stimule les cellules résidentes de l'articulation, comme les ostéoblastes, les chondrocytes, les fibroblastes synoviaux et les cellules endothéliales. L'IL-17 induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6, l'IL-8 et le TNF α , mais également de métalloprotéases matricielles et de RANKL. Ces médiateurs amplifient l'inflammation articulaire, induisent la dégradation du cartilage et l'érosion de l'os (**Figure 19**) (Braun et al. 2016). Chez les patients atteints d'arthrite, l'IL-23 contribue également à la dégradation des structures articulaires en participant à l'érosion de l'os de façon directe et indirecte. En effet, *in vitro*, l'IL-23 induit la différenciation des cellules mononucléées sanguines en ostéoclastes (Yago et al. 2007). Dans la PR, cette cytokine favorise la signalisation RANK/RANKL en stimulant l'expression de RANK sur les précurseurs des ostéoclastes (Chen et al. 2008). Les synoviocytes fibroblastiques des patients atteints de PR expriment à leur surface le récepteur à l'IL-23 et répondent à cette cytokine en augmentant leur production de RANKL (Li et al. 2010). L'IL-23 stimule également la production de RANKL par les lymphocytes T. L'IL-22, produite par les lymphocytes Th17 et les cellules ILC3, a également un rôle important dans le remodelage osseux. Chez les patients atteints de RP, l'IL-22, très présente dans le liquide synovial, induit la néo-formation de l'os et l'expansion des ostéoblastes. En effet, cette cytokine stimule la prolifération et la migration des cellules souches mésenchymateuses et augmente l'expression des gènes ostéogéniques (El-Zayadi et al. 2016).

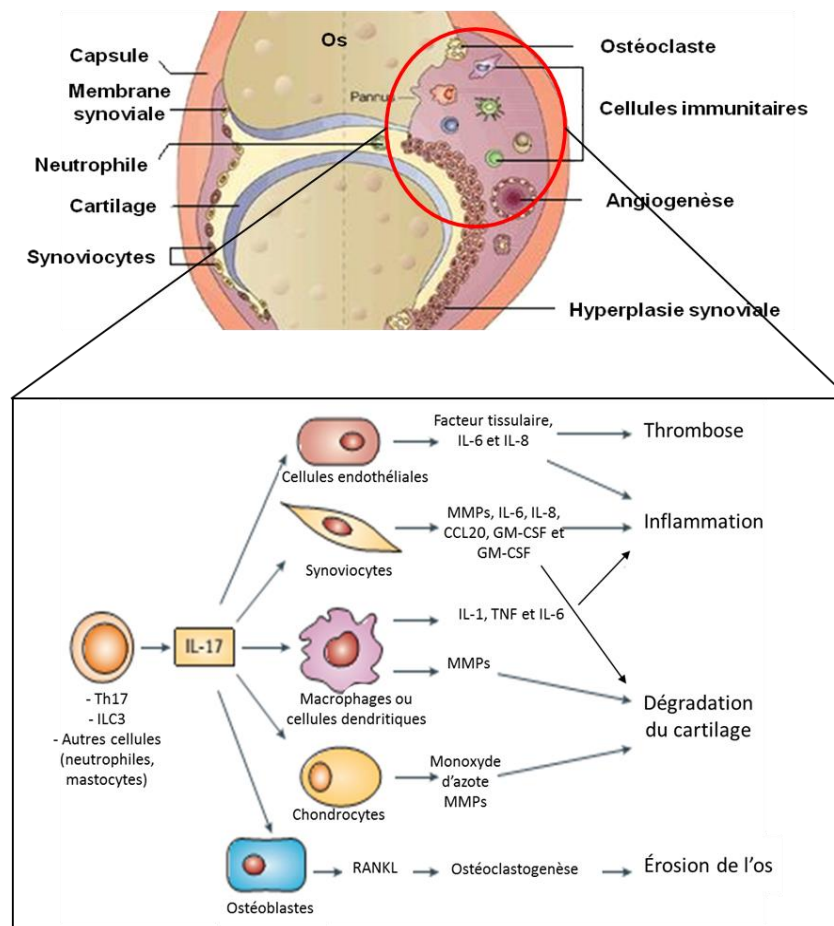


Figure 19 : **Représentation schématique de l'action de l'IL-17 sur les cellules résidentes d'une articulation arthritique et de ses conséquences**
Modifié de *Strand et al. 2007, Miossec et Kolls 2012 et Braun et al. 2016*

Des essais cliniques évaluant l'efficacité d'anticorps inhibant l'activité de médiateurs de l'immunité de type 3 ont été effectués dans plusieurs RIC tels que la SpA et le RP. L'efficacité du secukinumab, un anticorps recombinant monoclonal humain dirigé contre l'IL-17, a été évalué dans la SA, la PR et le RP (McInnes et al. 2015, Strand et al. 2017, Baeten et al. 2013, Baeten et al. 2015 et Blanco et al. 2017). Ce traitement stabilise voire diminue la sévérité de ces pathologies, ce qui lui a valu d'être autorisé en Europe et aux Etats-Unis dans le RP et la SA. D'autres essais cliniques évaluant l'efficacité d'un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre l'IL-17, l'ixekizumab, et d'un anticorps monoclonal humain ciblant le récepteur à l'IL-17 (IL-17RA), le brodalumab, sont également en cours (Cheung 2017). L'ixekizumab semble efficace dans la PR et le brodalumab a montré son efficacité dans le RP et des essais cliniques sont en cours pour évaluer la pertinence de son utilisation dans la SA et la spondylarthrite axiale non-radiographique (Genovese et al. 2016, Genovese et al. 2014 et Mease et al. 2014). La cytokine IL-23 est également une cible potentielle dans les RIC. L'ustekinumab est un anticorps monoclonal humain inhibant les cytokines IL-12 et IL-23 en se liant à leur

sous-unité protéique commune P40. Des essais cliniques ont montré l'efficacité de cet anticorps dans le RP ; ce traitement inhibe la progression des lésions radiographiques (Ritchlin et al. 2014 et McInnes et al. 2013). Il est autorisé dans plusieurs pathologies inflammatoires dont le RP par la Food Drug Administration (FDA).

Les modèles animaux fournissent aussi des preuves de l'implication de l'immunité de type 3 dans les pathologies inflammatoires articulaires. Les rats transgéniques pour l'allèle HLA B27 développent spontanément une SpA. Ces rats ont un nombre augmenté de lymphocytes Th17 dans leurs ganglions poplités et de cellules produisant de l'IL-17 dans leurs articulations (Glatigny et al. 2012). Des modèles animaux mimant la physiopathologie de la PR ont également suggéré l'implication de l'immunité de type 3 dans cette pathologie. En effet, le développement de plusieurs modèles animaux comme l'AIC et l'arthrite induite par injection de sérum issu de souris K/BxN (arthrite K/BxN) requiert les lymphocytes Th17 et la production des cytokines IL-17 et IL-23. Les souris déficientes pour une sous-unité de la protéine IL-23 (sous-unité IL-23p19) ne développent pas d'AIC et développent une arthrite K/BxN moins sévère que des souris sauvages (Pfeifle et al. 2017). De même, l'inhibition de l'IL-23 par un anticorps spécifique diminue la sévérité de l'AIC chez le rat (Yago et al. 2007). La déficience en IL-17 et l'inhibition de cette cytokine par un anticorps spécifique chez la souris engendrent un développement modéré de l'AIC (Nakae et al. 2003 et Lubberts et al. 2004). Dans ce même modèle, les souris déficientes pour l'IL-22 développent une arthrite significativement moins sévère que les souris sauvages (Corneth et al. 2016). L'ensemble de ces données suggère un rôle primordial de l'immunité de type 3 dans les modèles d'arthrites auto-immunes.

III. Le microbiote intestinal, une nouvelle cible dans les maladies inflammatoires ?

III.1. Le microbiote intestinal physiologique et pathologique

III.1.1. Le microbiote intestinal physiologique

Le microbiote correspond à l'ensemble des bactéries, virus, archées et champignons qui colonisent les barrières physiologiques à l'interface entre l'organisme et le milieu extérieur (**Figure 20A**). Ainsi, il existe un microbiote au niveau de la peau, des poumons, de l'utérus et du tractus digestif. Le tube digestif héberge 10^{13} bactéries réparties en une centaine d'espèces. Dans les conditions physiologiques, le microbiote intestinal est en interaction symbiotique avec l'organisme qui l'héberge. En effet, l'hôte fournit un habitat et les éléments nutritifs aux micro-organismes qui en contrepartie, produisent des métabolites essentiels, digèrent des éléments nutritifs, stimulent le système immunitaire et limitent la prolifération de micro-organismes

pathogènes (Eid et al. 2017). La concentration en bactéries augmente progressivement entre l'estomac (moins de 10^2 bactéries par gramme d'échantillon) et le colon (10^{12} bactéries par gramme d'échantillon) et atteint son maximum dans les selles (**Figure 20B**). La répartition des bactéries au sein de l'intestin n'est pas uniforme. La partie proximale du tractus digestif contient davantage de bactéries aérobies et/ou anaérobies facultatives par rapport à la partie distale du petit intestin et au colon (Sartor 2008).

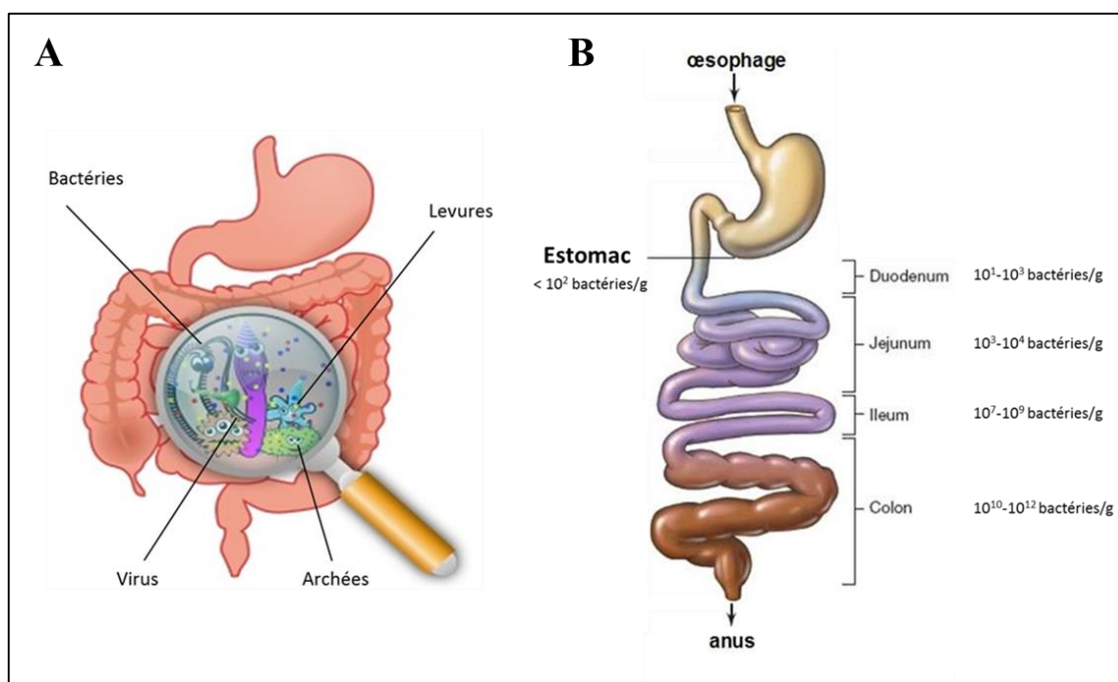


Figure 20 : **Illustration du microbiote intestinal (A) et de la concentration bactérienne dans chacun des segments intestinaux (B)**

Modifiés de <https://gutreactionscience.com/category/obesity/> et <http://edu.mnhn.fr/mod/page/view.php?id=1413>

Contrairement à ce qu'il a longtemps été suggéré, le développement embryonnaire ne s'effectue pas dans des conditions stériles ; des micro-organismes ont été identifiés dans le liquide amniotique, le placenta et le cordon ombilical (Stout et al. 2013 et Jiménez et al. 2005). Le rôle de ces micro-organismes n'est pas bien défini ; le placenta serait un site de collecte d'antigènes qui favoriserait la tolérance du système immunitaire du fœtus face à des antigènes de bactéries commensales (Zaura et al. 2014). Le nouveau-né est colonisé dès la naissance par les micro-organismes présents au niveau de la muqueuse utérine de la mère (pour les naissances par voie basse) ou par les micro-organismes issus de la peau (pour les naissances par césarienne). Les enfants nés par voie basse ont, à l'âge adulte, un microbiote qui ressemble davantage à celui de leur mère. Ce microbiote a des propriétés différentes de celui acquis à la suite d'une césarienne, comme un nombre de gènes de résistance aux antibiotiques moins

important (Bäckhed et al. 2015). Le microbiote des nouveau-nés présente une faible diversité et est riche en bactéries capables de métaboliser le lactate comme celles appartenant aux genres *Bifidobacteria* et *Lactobacillus*. Le lait maternel contient ces deux genres bactériens, et leur présence est augmentée au sein des microbiotes fécal et vaginal au cours de la gestation ce qui favorise leur transmission au nouveau-né à la naissance (Mueller et al. 2015). Pendant les 2-3 premières années de la vie, le microbiote intestinal est instable, sa composition est progressivement modifiée jusqu'à ressembler à celle d'un adulte (Koenig et al. 2011). La diversification alimentaire contribue à son enrichissement notamment *via* le développement de bactéries capables de digérer des résidus alimentaires tels que les sucres (**Figure 21**) (Bäckhed et al. 2015).

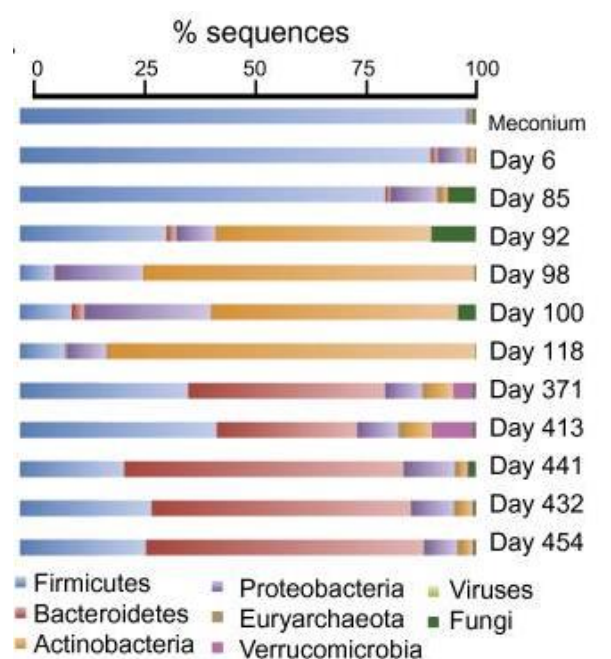


Figure 21 : **Représentation de l'évolution du microbiote fécal du nouveau-né de la naissance à l'âge de 15 mois**
Modifié de Koenig et al. 2011

A l'âge adulte le microbiote intestinal est globalement stable mais sa composition est variable entre différents individus ; elle dépend de nombreux facteurs comme l'alimentation, les origines ethniques ou encore l'environnement. Le microbiote intestinal est dominé par trois phyla bactériens, les Firmicutes, les Bacteroidetes et les Protéobactéries, qui représentent entre 50 et 90% des espèces.

Les Firmicutes, phylum composé majoritairement de bactéries Gram-positives, représentent environ 60 à 80% des bactéries intestinales. Cet embranchement se décline en trois classes, les Clostridia, les Bacilli et les Erysipelotrichales. Les familles, appartenant à la classe

des Clostridia, les plus représentées au sein du microbiote intestinal sont les Clostridiaceae (avec notamment les genres *Clostridium* et *Faecalibacterium*, en particulier l'espèce *Faecalibacterium prausnitzii*), les Eubacteriaceae, les Ruminococcaceae, en particulier avec l'espèce *Ruminococcus gnavus*, les Lachnospiraceae et les Veillonellaceae (Rajilić-Stojanović et al., 2014). Les familles Lactobacillaceae, Streptococcaceae (appartenant à l'ordre des Lactobacillales), Bacillaceae et Paenibacillaceae (appartenant à l'ordre des Bacillales) sont les familles de Bacilles les plus présentes dans le microbiote intestinal.

L'embranchement des Bacteroidetes est un des phyla majeurs du microbiote intestinal. Il est constitué majoritairement de bactéries Gram-négatives. La famille appartenant aux Bacteroidetes la plus présente au sein du microbiote intestinal est la famille des Bacteroidaceae, composée notamment des espèces *Bacteroides fragilis* et *Bacteroides vulgatus*. Par ailleurs, des bactéries des familles des Porphyromonadaceae, des Prevotellaceae (notamment les espèces *Prevotella copri*, *Prevotella stercorea*, *Prevotella nigrescens* et des souches proches des espèces *Prevotella veroralis* et *Prevotella shahii*) et des Rikenellaceae sont également représentées dans le microbiote intestinal (Hayashi et al. 2007).

Le phylum des protéobactéries est principalement composé de bactéries Gram-négatives. Ce phylum est divisé en six classes majeures, les α , β , γ , δ , ϵ et ζ -Protéobactéries. Les cinq premières classes sont représentées dans le microbiote intestinal (Shin Whon, et Bae 2015). On retrouve notamment des espèces de la famille des Neisseriaceae, appartenant à la classe des β -protéobactéries, et des bactéries de la famille des Entérobacteriaceae (notamment *Escherichia coli*), appartenant à la classe des γ -Protéobactéries (Shin, Whon, et Bae 2015). Des bactéries de la famille des Desulfovibrionaceae (δ -Protéobactéries), responsables de la production de sulfure d'hydrogène, sont également présentes.

Au-delà de ces trois phyla majeurs, le microbiote intestinal est composé de bactéries d'autres embranchements, présentes en quantité plus restreinte : le phylum des Actinobactéries, avec le genre *Bifidobacterium* (appartenant à la famille des Bifidobacteriaceae), les ordres des Actinomycetales avec les familles Corynebacteriaceae et Actinomycinaceae (Lagier et al. 2012). Ces familles sont davantage présentes dans l'intestin grêle que dans le colon. Des espèces des embranchements des Tenericutes, des Verrucomicrobia et des Spirochaetes sont également présentes (Human Microbiome Project Consortium, 2012). Il existe physiologiquement un rapport Firmicutes/Bacteroidetes de l'ordre de 10/1 avec une augmentation au cours de l'obésité et une diminution au cours des MICI.

En contrepartie de l'habitat et des éléments nutritifs que lui offre l'organisme, le microbiote intestinal fournit à ce dernier de nombreux services indispensables à sa survie (**Figure 22**). Ainsi, il protège l'organisme en limitant la prolifération des micro-organismes pathogènes et en stimulant le système immunitaire intestinal. Il est aussi primordial pour la synthèse de composés essentiels au bon fonctionnement de l'organisme hôte et pour la digestion de certains nutriments. Des micro-organismes du microbiote intestinal produisent des composés tels que des vitamines B hydrosolubles (ex : vitamines B12, B9) et des vitamines K (LeBlanc et al. 2013). Certaines souches bactériennes, appartenant par exemple aux espèces *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum* ou encore *Bifidobacterium breve*, sont capables de synthétiser la vitamine B9 (Pompei et al. 2007). Les animaux et les végétaux sont incapables de produire la vitamine B12 ; cette vitamine est exclusivement synthétisée par des micro-organismes, comme *Lactobacillus reuteri*, présents dans le microbiote intestinal et qui la synthétisent dans des conditions anaérobies (Santos et al. 2007). Les bactéries du microbiote intestinal sont aussi nécessaires à la dégradation de composés alimentaires. Elles sont notamment responsables de la fermentation des protéines et des glucides partiellement digérés ou non dans l'intestin grêle. Elles transforment les glucides et les acides aminés en métabolites intermédiaires (comme le lactate et le succinate) puis en métabolites terminaux comprenant les AGCC. Les AGCC produits par les bactéries intestinales sont notamment l'acétate, le propionate et le butyrate. L'acétate, produit par les Bifidobactéries, participerait à la défense de l'intestin *via* son interaction avec l'épithélium du colon (Fukuda et al. 2011). Le butyrate quant à lui est une source d'énergie pour les colonocytes (Topping et Clifton 2001). Des sucres complexes comme la cellulose sont dégradés par des bactéries du microbiote appartenant essentiellement aux phyla des Bacteroidetes et des Firmicutes. Les genres *Ruminococcus* et *Enterococcus* regroupent plusieurs espèces bactériennes réalisant cette activité, (en particulier *Enterococcus faecalis*) (Chassard et al. 2010). Des substrats endogènes, comme le mucus et des cellules intestinales desquamées sont également la cible de ces bactéries. Par exemple, la bactérie *Akkermensia muciniphila* et plusieurs espèces bactériennes appartenant au genre *Ruminococcus* ont une grande capacité à dégrader les mucines intestinales en AGCC ; ces bactéries ont ainsi un rôle protecteur envers l'épithélium intestinal (Derrien et al. 2004).

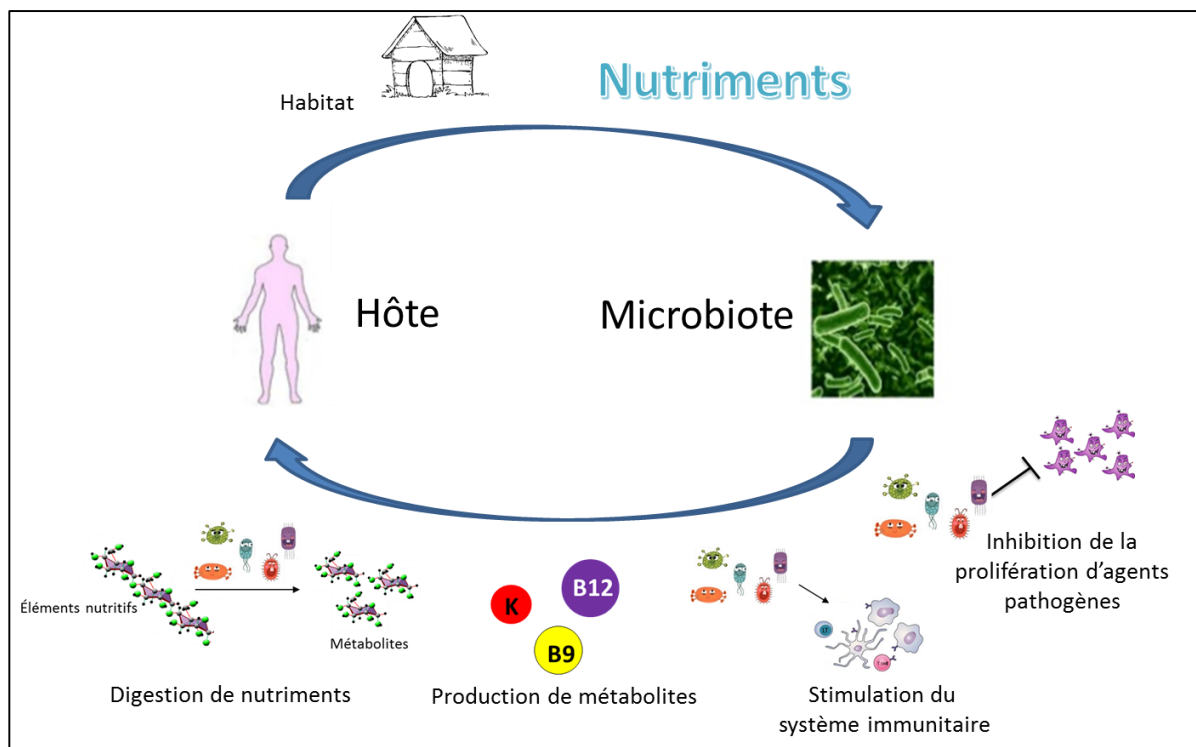


Figure 22 : **Représentation schématique de la relation symbiotique entre le microbiote intestinal et l'hôte**

Modifié de <https://www.slideshare.net/AsmaAlQahtani1/gut-microbiota-in-health-and-disease>

III.1.2. Implication du microbiote dans la maturation et le maintien de l'immunité intestinale

Le microbiote intestinal a un rôle important dans la mise en place et le maintien de la réponse immunitaire locale et systémique. En effet, l'élevage de souris en conditions stériles (axéniques) provoque une altération de l'ensemble de leur système immunitaire avec notamment des PP et des FLI qui sont moins nombreux et plus petits que chez des souris élevées en conditions conventionnelles (Macpherson et Uhr 2004 et Bouskra et al. 2008). L'activité des lymphocytes T et B chez les souris élevées en conditions stériles est altérée et le nombre de lymphocytes T dans la *lamina propria* de l'intestin grêle est plus faible que chez les souris élevées dans des conditions standards (Chung et al. 2012). Les lymphocytes B de la muqueuse intestinale produisent majoritairement des anticorps de type IgA, qui sont sécrétés dans la lumière intestinale où ils reconnaissent des composants microbiens (Brandtzaeg 2009). Ces anticorps sont indispensables à la maturation du microbiote intestinal, ainsi qu'à sa régulation et à sa stabilité. Ainsi, le microbiote fécal des souriceaux nouveau-nés est dominé par des enterobacteriaceae, une famille bactérienne appartenant à la classe des gamma-protéobactéries (Mirpuri et al. 2014). Chez les souris adultes, cette classe bactérienne est peu représentée. Or, les souriceaux ont un taux élevé d'IgA spécifiques des γ -protéobactéries, ce qui suggère que

ces anticorps, produits par des plasmocytes de la muqueuse intestinale, permettent de réguler les populations bactériennes (Mirpuri et al. 2014). D'ailleurs, les souriceaux nouveau-nés et les souris élevées dans des conditions stériles, ont peu de plasmocytes intestinaux et une production d'anticorps réduite. La colonisation de ces souris par un microbiote intestinal commensal provoque une augmentation significative du nombre de ces cellules (Hapfelmeier et al. 2010). Le microbiote intestinal induit la production d'IgA via la production d'AGCC et notamment d'acétate. Ces données montrent l'importance des interactions entre l'immunité mucoale et le microbiote intestinal (Wu et al. 2010).

L'homéostasie intestinale est le fruit d'une stimulation continue de l'immunité mucoale par le microbiote qui, en retour, lutte contre les pathogènes et contrôle la prolifération des bactéries commensales. Les CPA sont les cellules qui assurent l'interface entre le microbiote et l'immunité intestinale. Dans la *lamina propria*, des CPA, telles que les CD et les macrophages, sont capables de recueillir des micro-organismes, de les digérer, de présenter à leur surface des peptides microbiens et d'activer la différenciation des lymphocytes Th0 en lymphocytes Th1, Th2, Th17 ou T_{reg}, suivant le contexte cytokinique. Au cours de ce processus, des lymphocytes B sont également activés ; ces cellules deviennent matures et produisent des anticorps, notamment des IgA. Les cellules lymphoïdes de l'immunité innée, comme les ILC3, sont également activées par les CPA via la production d'IL-23 et d'IL-1 β . Les cellules ILC3 ainsi activées sécrètent des cytokines telles que l'IL-22 qui stimulent la production de peptides antimicrobiens par les CEI (Kabat et al. 2014).

Certaines bactéries du microbiote intestinal contribuant au développement et au maintien de l'immunité mucoale, et notamment de l'immunité de type 3, ont été identifiées. Il s'agit notamment des bactéries filamenteuses segmentées (SFB), connues pour stimuler la différenciation des lymphocytes Th17. En effet, la présence de cette bactérie au sein du tube digestif suffit à elle seule à induire la différenciation des lymphocytes Th17 dans la muqueuse intestinale de souris initialement axéniques (Ivanov et al. 2009). La fixation de SFB aux cellules épithéliales stimule leur production de la protéine SAA (serum amyloid A) et de cytokines qui induisent la différenciation Th17. Ainsi, cette bactérie stimule la différenciation des lymphocytes Th17 et des cellules ILC3 via l'activation de la synthèse d'IL-23 par les CD. Cette production d'IL-23 active la synthèse d'IL-22 par les cellules ILC3, ce qui favorise la production de la protéine SAA par les cellules épithéliales et la différenciation lymphoïde (**Figure 23**) (Sano et al. 2015 et Omenetti et Pizarro 2015). Cependant, le microbiote ne joue qu'un rôle partiel dans la différenciation des cellules ILC3. En effet, les lymphocytes LT_i se

développant au cours de l'embryogenèse ne nécessitent pas la présence des micro-organismes pour leur différenciation (Sawa et al. 2010). En revanche, les AGCC, notamment le butyrate, l'acétate et le propionate, produits par les bactéries du microbiote influencent la différenciation leucocytaire au sein de l'intestin. Les cellules ILC3 sont différenciellement présentes au sein des PP en fonction de leur sous-groupe. Les ILC3 CCR6⁺ et les ILC3 CCR6⁻Nkp46⁺ sont davantage représentées dans les PP du jéjunum alors que les ILC3 CCR6⁻Nkp46⁻ sont présentes en plus grande proportion dans les PP de l'iléon terminal (Kim et al. 2017). Le butyrate issu du métabolisme bactérien du microbiote intestinal contribue à cette régionalisation car il favorise la présence des ILC3 CCR6⁻Nkp46⁻ et réprime celle des ILC3 CCR6⁻Nkp46⁺ (Kim et al. 2017). La différenciation des lymphocytes T_{reg} est également influencée par les AGCC. Plus particulièrement au niveau du colon chez la souris, le butyrate favorise l'expression du facteur de transcription FoxP3, en induisant des modifications épigénétiques de son promoteur (Furusawa et al. 2013). Des antigènes bactériens peuvent directement stimuler la différenciation des lymphocytes T_{reg}. Ainsi, le PSA, exprimé à la surface de bactéries commensales telles que *Bacteroides fragilis*, protège les souris de la colite expérimentale induite par l'administration d'*Helicobacter hepaticus* via l'induction de lymphocytes T_{reg}, cellules qui inhibent les lymphocytes Th17 (Mazmanian, Round, et Kasper 2008) (**Figure 23**). D'autres bactéries, telles que des espèces appartenant au genre *Clostridium*, sont également capables de favoriser la présence des lymphocytes T_{reg} dans la muqueuse intestinale, notamment via la production de butyrate. En effet, le butyrate stimule les CD qui synthétisent de l'acide rétinoïque, un inducteur de l'expression de FoxP3 et un régulateur de la différenciation des lymphocytes Th17 (**Figure 23**).

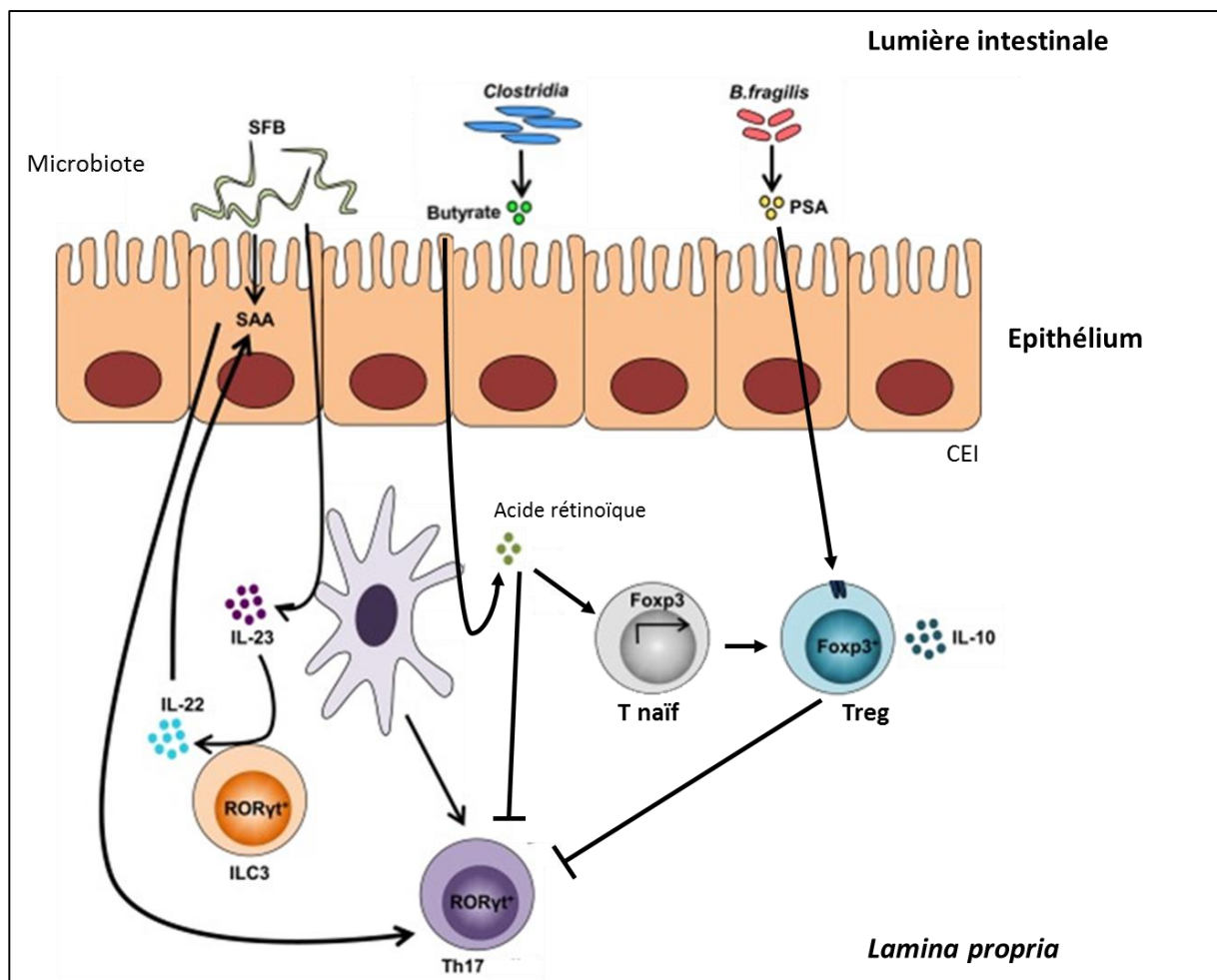


Figure 23 : **Représentation schématique du contrôle des lymphocytes Th17 et T_{reg} par des bactéries commensales du microbiote intestinal**

Modifié de Omenetti et Pizarro 2015

III.1.3. Les modifications du microbiote intestinal dans les pathologies inflammatoires articulaires

L'existence d'un lien entre certains micro-organismes, et notamment les bactéries, et la survenue de pathologies rhumatismales est soupçonnée depuis très longtemps. Le meilleur exemple est le rhumatisme articulaire aigu survenant chez les individus jeunes après une affection pharyngée à streptocoque β -hémolytique du groupe A. Le mécanisme semble impliquer la nature super-antigénique des exotoxines produites par les souches bactériennes et un mimétisme moléculaire entre certains constituants de la membrane bactérienne (protéine M, N-acétyl-glucosamine) et des composants de la MEC (Henningham et al. 2012). Plus récemment, plusieurs bactéries de la sphère buccale, comme *Porphyromonas gingivalis* et *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, impliquées dans les parodontites, ont été associées à la physiopathologie de la PR en raison de leur capacité à provoquer la citrullination de peptides et donc la survenue d'ACPA qui sont des facteurs de risque de développer une forme sévère de

PR (Sakkas et al. 2017). Certains micro-organismes du microbiote intestinal font également partis des agents bactériens impliqués dans la survenue d’une arthrite. Ainsi, les arthrites réactionnelles sont principalement consécutives à une infection digestive ou de l’urètre. Plusieurs bactéries entériques sont susceptibles de participer au développement d’une arthrite réactionnelle, c’est notamment le cas des salmonelles, de *Clostridium difficile*, de plusieurs espèces de Shigella (*C. flexneri*, *S. dysenteriae*, *S. sonnei*), de différentes espèces de Yersinia (*Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*) et d’espèces appartenant au genre *Campylobacter* (*C. jejuni*, *C. coli*) (Leirisalo-Repo 2005). Les patients atteints de RIC tels que la SpA et la PR présentent un microbiote intestinal différents de celui d’individus contrôles ; on parle alors de dysbiose (**Figure 24**).

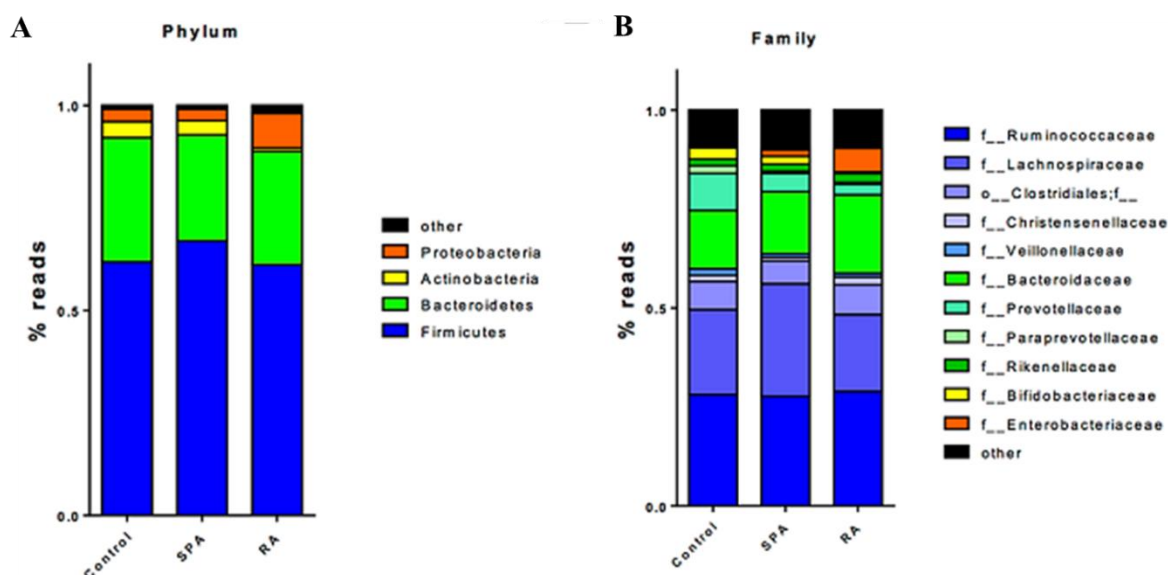


Figure 24 : Comparaison des phyla bactériens (A) et des familles bactériennes (B) du microbiote fécal d’individus contrôles, de patients atteints de spondylarthrite et de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde
Modifiés de Breban et al. 2017

Les études de l’ADN bactérien effectuées par séquençage haut-débit ont permis de mettre en évidence une variation de la composition du microbiote intestinal chez les patients souffrant de RIC. Cette dysbiose est caractérisée par une diminution de la diversité bactérienne et un déséquilibre entre les différentes communautés bactériennes.

III.1.3.1. Dysbiose et spondylarthrite

Le microbiote intestinal des patients atteints de SpA est caractérisé par une augmentation de la famille des Lachnospiraceae (appartenant à l’embranchement des Firmicutes) (Breban et al. 2017). Ces patients présentent également une augmentation de

certaines espèces appartenant aux genres *Ruminococcus* (notamment l'espèce *Ruminococcus gnavus*), *Dorea*, *Coprococcus* et *Blautia* (en particulier l'espèce *Blautia prducta*) dans leur microbiote fécal (Breban et al. 2017). La famille des Coriobacteriaceae, appartenant au phylum des Actinobactéries, est aussi davantage représentée chez les patients atteints de SpA. Le microbiote de ces patients est, en revanche, pauvre en Prevotellaceae et en Paraprevotellaceae, deux familles de l'embranchement des Bacteroidetes (Breban et al. 2017). Des analyses ont également été réalisées sur le microbiote de biopsies d'iléon terminal. Les patients atteints de SA présentent une augmentation des familles Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, appartenant au phylum des Firmicutes, et des familles Rikenellaceae, Porphyromonadaceae et Bacteroidaceae, qui appartiennent à l'embranchement des Bacteroidetes (Costello et al. 2015). En revanche, les familles Veillonellaceae et Prevotellaceae sont sous-représentées dans le microbiote iléal (Costello et al. 2015). D'autres études suggèrent l'implication de l'entérobactérie *Klebsiella pneumoniae* dans le développement de la SA (Puccetti et al. 2017).

III.1.3.2. Dysbiose et polyarthrite rhumatoïde

L'étude de la beta-diversité bactérienne montre que la composition du microbiote intestinal des patients atteints de PR est différente de celles des individus contrôles et des patients atteints de SpA (Breban et al. 2017). Plusieurs études ont montré l'existence d'une corrélation entre des micro-organismes et le développement d'une PR. Tout d'abord, les premières analyses du microbiote fécal par amplification du gène codant l'ARNr (Acide ribonucléique ribosomique) 16S bactérien par RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction), ont montré une proportion moins importante des bactéries de la famille Bacteroides-Porphyromonas-Prevotella, et des espèces *Bacteroides fragilis* et *Eubacterium rectale-Clostridium coccoides* par rapport à des patients atteints de fibromyalgie non-inflammatoire (Vaahtovuori et al. 2008). Le séquençage haut-débit de l'ADN codant l'ARNr 16S bactérien a permis de compléter en partie les analyses du microbiote fécal et de montrer que le développement d'une PR est associé à une déplétion en bactéries Gram-négatives comme certaines Protéobactéries et des Firmicutes Gram-négatives de la famille des Veillonellaceae (X. Zhang et al. 2015). La proportion de bactéries du genre *Faecalibacterium*, appartenant aux Firmicutes, est également diminuée (J. Chen et al. 2016), tout comme le groupe XIV de la classe Clostridia et la famille des Lachnospiraceae, (Scher et al. 2013), ainsi que l'espèce *Megamonas hypermegale* (X. Zhang et al. 2015). Au sein de l'embranchement des protéobactéries, le genre *Haemophilus*, la famille des Bifidobacteriaceae ainsi que les espèces *Klebsiella pneumoniae*, *Sutterella wadsworthensis* sont présentes en quantité moindre chez les patients atteints de PR

(X. Zhang et al. 2015 et Breban et al. 2017). C'est également le cas pour l'espèce *Bifidobacterium bifidum*, de l'embranchement des Actinobactéries, et pour les familles Prevotellaceae et Paraprevotellaceae et le genre *Bacteroides*, appartenant à l'embranchement des Bacteroidetes (Scher et al. 2013 et Breban et al. 2017).

En revanche, d'autres taxons bactériens sont davantage présents dans le microbiote intestinal des patients souffrant de PR. Le microbiote est plus riche en Proteobactéries, et notamment en bactéries de la famille des Enterobacteriaceae, comme le genre *Klebsiella*, et en familles des desulfovibrionaceae et des succinivibrionaceae (Breban et al. 2017). Les bactéries du genre *Prevotella*, et notamment l'espèce *Prevotella Copri*, sont également surreprésentées (Scher et al. 2013 et Maeda et al. 2016). Zhang X et ses collaborateurs ont montré que le microbiote fécal des patients atteints de PR est enrichi en bactéries Gram-positives et tout particulièrement en certaines espèces du genre *Lactobacillus* (X. Zhang et al. 2015 et Liu et al. 2013). D'autres auteurs ont montré une surabondance de bactéries appartenant à l'embranchement des Actinobactéries, comme les genres *Actinomyces*, *Collinsella* et *Eggerthella* (notamment l'espèce *Eggerthella lenta*) et les espèces *Gordonibacter pamelaee* et *Bifidobacterium dentium* (J. Chen et al. 2016 et X. Zhang et al. 2015). Certaines bactéries appartenant à l'embranchement des Firmicutes, comme les genres *Turicibacter* et *Streptococcus* et les espèces *Clostridium asparagiforme*, *Lachnospiraceae bacterium* et *Ruminococcus lactaris* sont également augmentées (J. Chen et al. 2016 et X. Zhang et al. 2015). Des espèces et des familles appartenant au phylum des Tenericutes sont également davantage représentées dans le microbiote fécal des patients atteints de PR (Breban et al. 2017). Zhang X et ses collaborateurs ont aussi montré que chez ces patients les microbiotes salivaire et dentaire sont également modifiés. Par exemple, des bactéries du genre *Veillonella* ainsi que les espèces *Lactobacillus salivarius* et *Cryptobacterium curtum* sont davantage présentes dans la plaque dentaire et la salive (X. Zhang et al. 2015). Au contraire, l'espèce *Rothia aeria* et des bactéries du genre *Neisseria* y sont moins présentes. D'autres espèces bactériennes du microbiote buccal sont susceptibles d'avoir un rôle dans la physiopathologie de la PR. En effet, *Porphyromonas gingivalis*, une bactérie connue pour participer au développement des parodontites, est davantage présente dans le microbiote buccal des patients atteints de PR (Laugisch et al. 2016).

Il a été rapporté que le microbiote fécal est différent entre des sous-populations de patients. Ainsi, les patients positifs pour le FR sont davantage colonisés par les bactéries du genre *Klebsiella* et l'espèce *E. coli* appartenant au groupe phylogénétique D alors que les patients négatifs pour ce facteur présentent davantage de bactéries *E. coli* du groupe

phylogénétique B2 (Newkirk et al. 2010). Le lien potentiel entre le microbiote intestinal et la PR est renforcé par le fait que chez les patients présentant une amélioration clinique, le microbiote intestinal tend à devenir normal (X. Zhang et al. 2015).

III.2. Liens entre l'immunité, les micro-organismes et les pathologies inflammatoires articulaires

III.2.1. Le mimétisme moléculaire

Environ 75% des patients ayant une arthrite réactionnelle ont l'antigène HLA B27, cet antigène est également présent chez 90% des patients atteints de SA. L'hypothèse que cet antigène serait au cœur de la relation micro-organismes-SpA est étudiée depuis les années 1960. Certaines études suggèrent que des anticorps dirigés contre des antigènes exprimés à la surface de certaines espèces bactériennes comme *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae* ou encore *Yersinia enterocolitica* reconnaissent également HLA B27 (van Bohemen, Grumet, et Zanen 1984 et Asquith et al. 2014) selon le principe du mimétisme moléculaire. Les enzymes nitrogénase réductase et pullulanase pul-D de la bactérie *Klebsiella* possèdent des séquences similaires à la protéine HLA B27 (Schwimmbeck, Yu, et Oldstone 1987 et Fielder et al. 1995) (**Figure 25**). L'homologie de séquence entre des protéines bactériennes et humaines peut concerner d'autres antigènes puisque par exemple, l'enzyme pullulanase pul-A possède des séquences homologues aux fibres de collagène I, III et IV (Fielder et al. 1995) (**Figure 25**). Les patients atteints de SA possèdent d'ailleurs davantage d'anticorps dirigés contre *Klebsiella Pneumoniae* que les individus contrôles (Ebringer et al. 2007 et Rashid et Ebringer 2007). Ces anticorps sont majoritairement produits dans le jéjunum de l'intestin grêle (Maki-Ikola et al. 1997). Des modèles animaux ont permis de conforter ces observations. Ainsi, l'injection de lymphocytes exprimant l'antigène HLA B27 à des lapins provoque la production d'anticorps capables de fixer des protéines issues de *Klebsiella* (Welsh et al. 1980). De même, les anticorps produits par des lapins immunisés avec *Klebsiella* fixent les lymphocytes provenant de patients HLA B27 positifs mais pas ceux issus d'individus HLA B27 négatifs (Baines et al. 1990).

Des études suggèrent que le développement d'une PR peut également être influencé par la présence de certaines bactéries possédant des antigènes similaires aux protéines humaines. Plusieurs études depuis le milieu des années 1980, ont montré un lien entre la présence de la bactérie *Proteus mirabilis* et la production d'auto-anticorps conduisant au développement de la PR. En effet, des anticorps dirigés initialement contre la bactérie *Proteus mirabilis* peuvent reconnaître des protéines humaines. Par exemple, des produits libérés par la réaction enzymatique des hémolysines de *Proteus mirabilis* présentent des similitudes avec la protéine

HLA-DR4/1, un antigène du CMH de type 1 (Ebringer et al. 1992). De même, une enzyme exprimée à la surface de cette bactérie, l'uréase, et le collagène de type XI humain ont des séquences homologues (**Figure 25**) (Wilson et al. 1995). Les patients atteints de PR ont des taux plus élevés d'anticorps dirigés contre *Proteus mirabilis* que des individus contrôles (Rashid et al. 2007). Réciproquement, l'injection de lymphocytes humains exprimant HLA-DR4/1 à des lapins provoque la production d'anticorps spécifiques contre *Proteus mirabilis* (Ebringer et al. 1985).

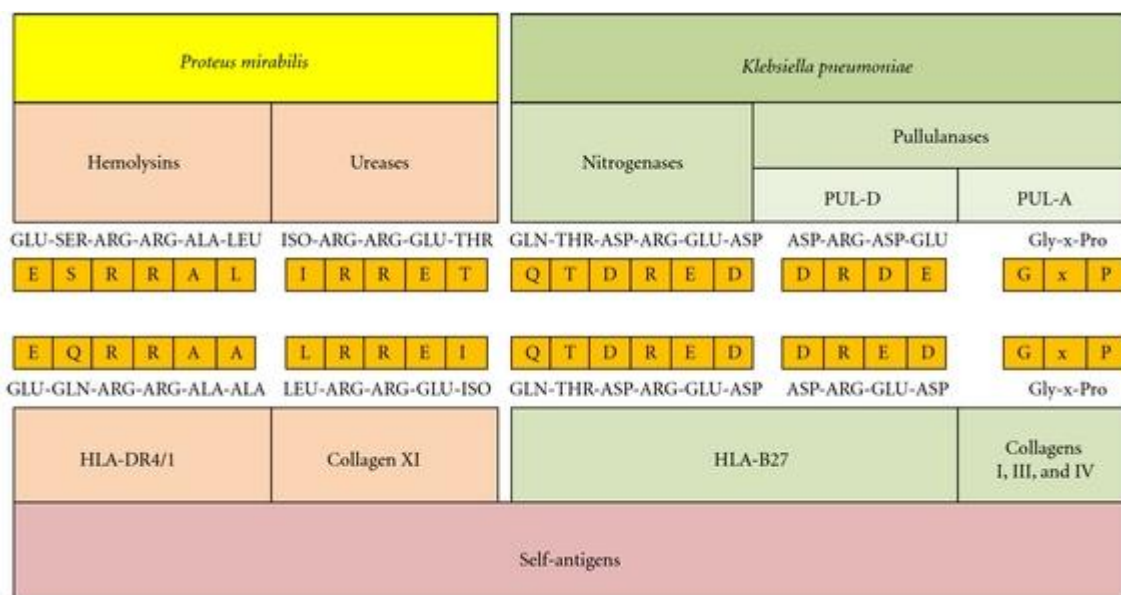


Figure 25 : **Illustration du mimétisme moléculaire entre des protéines des bactéries *Proteus mirabilis* et *Klebsiella pneumoniae* et des protéines humaines**
De Rashid et Ebringer 2012

La bactérie *Porphyromonas gingivalis* est capable d'induire la production locale de protéines citrullinées via l'enzyme, PAD (Wegner et al. 2010). Cette enzyme transforme l'acide aminé arginine en citrulline. La citrullination modifie la structure de certaines protéines, générant ainsi la formation de nouveaux épitopes qui peuvent engendrer la production d'ACPAs (Lourido et al. 2017). Ces anticorps peuvent être retrouvés chez des patients atteints de PR bien avant l'apparition des premiers symptômes. Les ACPAs sont capables de reconnaître de nombreuses protéines modifiées de façon post-traductionnelle comme le collagène de type 2 et la fibronectine (Klareskog et al. 2014). La bactérie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, également associée à des infections du périodonte, est capable de reproduire le répertoire d'antigènes citrullinés présents dans les articulations des patients souffrant de PR (Konig et al. 2016). Cette bactérie produit une toxine, la leucotoxine-A (LtxA), qui active les enzymes de citrullination des PNN, provoquant ainsi une hypercitrullination dans ces cellules. La LtxA induit également la dégranulation des PNN, qui libèrent alors leurs

antigènes citrullinés. Par ailleurs, *Porphyromonas gingivalis* tout comme *Prevotella intermedia*, appartenant également au microbiote buccal, sont présentes dans le liquide synovial des patients atteints de PR (Bedaiwi et Inman 2014). Des anticorps dirigés contre ces bactéries et d'autres (*Prevotella melaninogenica*, *Tannerella forsythia*) sont retrouvés chez ces patients (Farquharson et al. 2012 et Sandhya et al. 2016). La cavité buccale ne serait pas la seule source d'ACPAs. Des peptides citrullinés, comme la vimentine, l'alpha-fibrinogène et l'actine, sont également abondants dans la muqueuse colique et sont la cible des ACPAs (Bennike et al. 2017).

III.2.2. La perméabilité intestinale

Les patients atteints de SA ont une augmentation de leur perméabilité de la muqueuse intestinale (Martínez-González et al. 1994). Ce phénomène pourrait engendrer une augmentation des échanges entre la lumière intestinale et l'organisme, voire permettre des échanges impossibles dans les conditions physiologiques, comme l'entrée de micro-organismes vivants. De l'ADN de bactéries pathogènes, initialement localisées dans la cavité buccale, a été observé dans le sérum et le liquide synovial de patients souffrant de PR (Martinez-Martinez et al. 2009). Dans certaines formes d'arthrite, il a été constaté une augmentation de la perméabilité intestinale, une inflammation intestinale ainsi qu'une dysbiose. Cependant il n'a pas été établi si l'augmentation de la perméabilité de l'épithélium intestinal est la conséquence ou la cause de l'inflammation intestinale et/ou de la dysbiose (Gill et al. 2015). Il semblerait que des bactéries responsables de la production d'AGCC, notamment de butyrate, soient moins représentées dans le microbiote intestinal des patients atteints de SA, ce qui engendrait une diminution de la protection de l'épithélium intestinal (Stoll et al. 2014). Chez ces patients la bactérie *Faecalibacterium prausnitzii* (Clostridia du cluster IV) est présente en quantité moindre. De même, chez les patients souffrant de PR, le groupe XIV de la classe Clostridia est plus faiblement représenté (Scher et al. 2013), comme ces bactéries représentent une importante source de butyrate pour les colonocytes, leur diminution réduit les ressources énergétiques de ces cellules, ce qui pourrait fragiliser l'épithélium intestinal et réduire sa fonction de barrière.

III.2.3. L'immunité intestinale

Plusieurs études montrent des liens entre l'immunité intestinale et le développement d'une arthrite. Tout d'abord, les patients atteints d'arthrite sont susceptibles de développer une inflammation intestinale plus ou moins importante. Deux tiers des patients atteints de SpA présentent une inflammation intestinale microscopique (Kabeerdoss, Sandhya, et Danda 2016).

Certains de ces patients peuvent développer une MICI nécessitant une prise en charge par un gastro-entérologue ; c'est le cas de 5 à 10% des patients (Taurog, Chhabra, et Colbert 2016 et Kabeerdoss, Sandhya, et Danda 2016). Réciproquement, des patients atteints de MICI développent des manifestations extra-intestinales, parmi lesquelles figure l'arthrite. La SpA est la manifestation extra-intestinale la plus fréquente chez les patients atteints de MICI puisqu'elle touche 17 à 39% d'entre eux (Gionchetti, Calabrese, et Rizzello 2015 et Asquith et al. 2014). Les patients souffrant de la MC sont davantage concernés que ceux atteints de RCH. L'incidence cumulative de SpA chez ces patients est de 6,7% 10 ans après le diagnostic des lésions inflammatoires intestinales, de 13,9% à 20 ans et de 18,6% à 30 ans (Shivashankar et al. 2012). Par ailleurs, les molécules HLA B27 des patients atteints de SA HLA B27 positifs peuvent former des homodimères par association des chaînes lourdes. Ces interactions sont dites non-conventionnelles (NC-B27). Les homodimères de protéines HLA B27 sont retrouvés dans la membrane synoviale de ces patients mais également au niveau de leur muqueuse intestinale. Ils sont notamment localisés sur les cellules mononucléées infiltrées dans la *lamina propria*.

Chez les patients souffrant de PR, des études témoignent de l'implication de l'immunité mucosale intestinale dans le développement de la pathologie. Ainsi, dans leurs articulations (membrane synoviale et liquide synovial) et sur leurs cellules mononucléées circulantes, sont exprimés des peptides bactériens présentés par les molécules HLA-DR. Chez 40% de ces patients, des peptides de *Prevotella copri* présentés par HLA-DR stimulent une réponse T et/ou B (Pianta et al., 2017). Des auto-antigènes sont retrouvés dans la membrane synoviale des patients souffrant de PR, comme la N-acétylglucosamine-6-sulfate (GNS) et la filamine A (FLNA). Ces antigènes ont des homologies de séquence avec des protéines appartenant aux bactéries des genres *Prevotella* et *Parabacteroides* pour la GNS et aux genres *Prevotella* et *Butyrivimonas* pour la FLNA. Ces bactéries sont présentes dans le microbiote intestinal commensal (Pianta et al., 2017). Enfin, certains peptides citrullinés propices au développement d'ACPA, comme ceux issus de la myosine-9, de l'inhibiteur de l'ATPase mitochondrial et de la chaîne alpha de la spectrine, sont uniquement présents dans la muqueuse colique des patients atteints de PR.

Que ce soit dans la SpA ou la PR, l'immunité de type 3, notamment les lymphocytes Th17 et les cellules ILC3, jouent un rôle primordial dans l'inflammation articulaire, en particulier en sécrétant des cytokines telles que l'IL-22 et l'IL-17. Cette immunité est également très développée dans la muqueuse de l'intestin grêle qui joue le rôle de réservoir pour ces

cellules. Le microbiote intestinal participe à la mise en place et au maintien de cette immunité. Devant ces éléments de preuve, combinés au fait que les patients atteints de SpA et de PR présentent une dysbiose intestinale, des auteurs ont émis l'hypothèse que dans des conditions dysbiotiques, l'immunité de type 3 intestinale serait particulièrement active et que cela provoquerait une migration de ces cellules par voie sanguine vers des sites extra-intestinaux, comme les articulations (**Figure 26**) (Wu et al. 2016, Scher et Abramson 2011 et Ranganathan et al. 2017). L'ensemble de ces données suggère un lien entre l'activation de la réponse immunitaire mucosale dans l'intestin et le développement d'une inflammation articulaire chez les patients arthritiques.

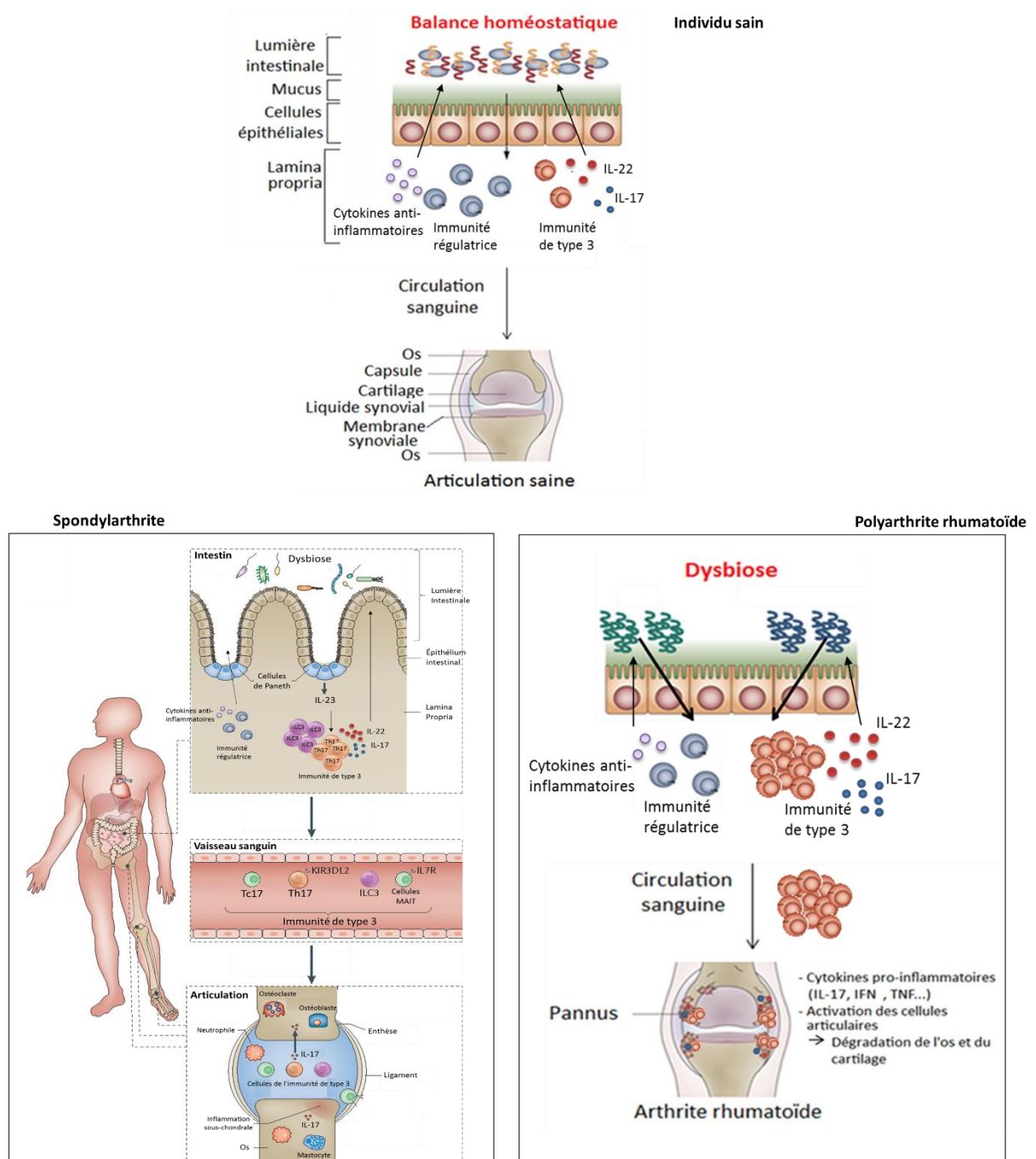


Figure 26 : Illustration de l'implication de l'immunité de type 3 intestinale dans le développement des rhumatismes inflammatoires chroniques en conditions dysbiotiques
Modifié de Scher et Abramson 2011 et Ranganathan et al. 2017

III.3. Des éléments de preuve de l'implication du microbiote dans les RIC apportés par les modèles animaux

Il reste très difficile d'établir chez l'homme des liens entre deux systèmes comme l'immunité intestinale et l'inflammation articulaire. Dans ce contexte, les modèles animaux sont un outil essentiel pour étudier les relations entre l'immunité intestinale, le microbiote et l'inflammation articulaire.

III.3.1. Modèles animaux et spondylarthrite

Les rats transgéniques pour l'allèle HLA B27 (rats HLA B27) et/ou pour la bêta-2-microglobuline humaine (rats HLA B27h/β2m et rats h/β2m respectivement) développent spontanément une SpA et une colite. Ces rats ont un microbiote différent de celui de rats sauvages. En effet, que ce soit dans la lumière ou dans la muqueuse caecales, les microbiotes des rats HLA B27h/β2m et des rats h/β2m sont plus riches en bactéries du genre *Paraprevotella* et présentent une diminution en bactéries d'un genre inconnu de la famille Rikenellaceae (Lin et al. 2014). Par ailleurs, la bactérie *Bacteroides vulgatus* est davantage représentée dans le microbiote caecal des rats HLA B27h/β2m et h/β2m. L'élevage des rats transgéniques HLA B27 en conditions stériles empêche le développement des inflammations articulaire et intestinale (Taurog et al. 1994). La perméabilité de l'épithélium intestinal de ces rats est près de cinq fois plus importante que celle des rats sauvages (Kerr et al. 1999).

Les rats transgéniques B27 TG¹ (rats B27 TG¹) chez lesquels sont administrées de faibles doses de la bactérie *M. Tuberculosis* inactivée développent une arthrite et une spondylite sans inflammation intestinale. Contrairement aux rats Lewis sains, les rats B27 TG¹ expriment une forme non-conventionnelle de la protéine HLA B27 dans leurs articulations inflammatoires, mais aussi dans la *lamina propria* et les PP de leur intestin grêle (Rysnik et al. 2016).

Des souris transgéniques exprimant l'allèle HLA B27 et la β-2-microglobuline humains développent une enthésite au niveau des chevilles et des tarses (Hacquard-Bouder et al. 2006). Cependant, ces souris ne présentent pas de signes d'inflammation sur d'autres sites et un terrain génétique favorable au développement de la SpA est nécessaire (Hacquard-Bouder et al. 2006). Le microbiote intestinal semble jouer un rôle important dans le développement de la pathologie articulaire de ces souris. En effet, leur élevage en conditions stériles provoque une disparition du phénotype articulaire alors que l'administration par voie orale d'un cocktail d'au moins deux bactéries suffit pour déclencher la SpA (Reháková et al. 2000 et Sinkorová et al. 2008).

La souris SKG possède une mutation ponctuelle dans la protéine ZAP-70 (Zeta chain of T cell receptor associated protein kinase 70), une molécule permettant la transduction du signal dans les lymphocytes T (Sakaguchi et al. 2003). Ces souris développent spontanément une arthrite similaire à une PR. En revanche, l'élevage des souris SKG en absence de pathogène prévient le développement de l'arthrite (Yoshitomi et al. 2005). Dans ces conditions, l'injection de polymères de glucose qui composent la paroi de certaines levures telles que des *Candida* et *Saccharomyces*, de champignons comme *Aspergillus* et *Pneumocystis*, ou de certaines bactéries, provoque l'apparition de symptômes caractéristiques d'une SpA (inflammation des articulations axiales et périphériques notamment) et de la MC (Ruutu et al. 2012). Les souris SKG ayant reçu des polymères de glucose ont un microbiote intestinal différent de celui des souris SKG n'ayant pas subi de traitement (Rehaume et al. 2014).

III.3.2. Modèles animaux et polyarthrite rhumatoïde

Les modèles animaux ont également permis de renforcer l'hypothèse d'un lien possible entre le microbiote et la PR. Ainsi, l'inoculation de fragments de parois de certaines bactéries comme *Streptococcus pyogenes*, *Lactobacillus casei* ou encore *Eubacterium aerofaciens* déclenche une polyarthrite chez la souris (van den Broek 1989, Lehman et al. 1983 et Cromartie al. 1977).

Les microbiotes oral et intestinal ont également un rôle important dans le déclenchement d'une arthrite chez la souris en modulant le système immunitaire intestinal. L'inoculation par voie orale des bactéries *Porphyromonas gingivalis* ou *Prevotella nigrescens* à des souris développant une AIC aggrave la sévérité de la pathologie via une réponse Th17 (de Aquino et al. 2014 et Sato et al. 2017).

Les souris déficientes pour l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 ($IL-1Ra^{-/-}$) développent spontanément une arthrite. Ces souris ont un microbiote intestinal différent des souris sauvages de même fond génétique (Rogier, Ederveen, et al. 2017). En effet, leur microbiote est plus riche en bactéries du genre *Helicobacter* et contient moins de bactéries des genres *Ruminococcus* et *Prevotella*. Le microbiote de ces souris favoriserait la différenciation des lymphocytes Th17 dans la *lamina propria* intestinale, avec une augmentation de la sécrétion d'IL-17. L'élevage de ces souris en conditions stériles diminue la sévérité de l'arthrite (Abdollahi-Roodsaz et al. 2008) et limite l'expansion des lymphocytes Th17 dans la muqueuse intestinale (Rogier, Ederveen, et al. 2017). Leur traitement avec des antibiotiques prévient le développement de l'arthrite.

Les souris K/BxN sont le fruit du croisement de souris transgéniques pour le récepteur TCR (souris KRN/B6) avec des souris de la lignée NOD. Ces souris développent spontanément une arthrite. L'élevage de ces souris en conditions stériles empêche le développement de l'arthrite et l'inoculation des SFB rétablit la pathologie (H.-J. Wu et al. 2010). Le rôle important de la bactérie SFB pour le développement de l'arthrite chez les souris K/BxN est confirmé par l'incidence moindre de l'arthrite chez les souris K/BxN jeunes (âgées de 6 à 8 semaines) ayant un microbiote dépourvu de cette bactérie (Teng et al. 2017). A l'inverse, la présence abondante de cette bactérie est propice au développement d'une arthrite sévère. La bactérie SFB induit la différenciation des lymphocytes Th17 dans la *lamina propria* et la production d'auto-anticorps.

Le gène HLA-DR est impliqué dans le développement d'une AIC. Ainsi, l'haplotype HLA-DRB1*0401 est associé à une susceptibilité de développer une AIC alors que l'haplotype HLA-DRB1*0402 est présent chez des souris résistantes à cette arthrite. Le microbiote de souris possédant l'haplotype HLA-DRB1*0402 (souris *0402) est différent de celui des souris exprimant l'haplotype HLA-DRB1*0401 (souris *0401) (Gomez et al. 2012). Les souris *0401 présentent un ratio Bacteroidetes sur Firmicutes moins important que les souris *0402, avec notamment davantage de bactéries du genre *Allobaculum* (phylum des Firmicutes) et moins de bactéries des genres *Barnesiella* et *Parabacteroides* (phylum des Bacteroidetes). Les souris *0402 ont en revanche un microbiote plus riche en bactéries appartenant au phylum des Actinobactéries.

Le microbiote intestinal est modifié lors du développement d'une arthrite chez des souris de phénotype sauvage (Rogier, Evans-Marin, et al. 2017 et Liu et al. 2016). Les souris de fond génétique DBA/1 sont connues pour être susceptibles au développement de l'AIC. Cependant, lors de l'induction de cette pathologie l'incidence n'est pas totale et certaines souris sont réfractaires au développement de l'AIC. Les souris de fond génétique DBA/1, susceptibles au développement d'une AIC, ont moins de bactéries des familles Desulfovibrionaceae et Lachnospiraceae et davantage de bactéries de la famille Lactobacillaceae dans leur microbiote que les souris y étant réfractaires, et ce avant l'apparition des premiers symptômes articulaires (Liu et al. 2016). Pendant la phase immunologique silencieuse, la proportion relative de Bacteroidetes diminue alors que celles de Firmicutes et de Proteobacteries augmentent (Rogier, Evans-Marin, et al. 2017). L'abondance relative de plusieurs familles bactériennes est modifiée au cours de cette phase. En effet, les familles S24-7, Bacteroidaceae, Paraprevotellaceae et Lactobacillaceae sont diminuées alors que les familles Erysipelotrichaceae, Lachnospiraceae, Ruminococcaceae et Desulfovibrinocaceae sont augmentées. Au cours du développement de

l'AIC, le microbiote des souris est progressivement modifié avec une augmentation de bactéries des familles Bacteroidaceae, Lachnospiraceae et S24-7 et une diminution des bactéries de la famille Lactobacillaceae (Liu et al. 2016). Par ailleurs, des souris stériles recevant le microbiote de souris sensibles à l'AIC développent plus facilement une AIC que des souris ayant reçu le microbiote de souris réfractaires à cette pathologie. Plusieurs traitements tels que la norisoboldine et la sinomenine (agonistes AhR) diminuent l'inflammation articulaire dans le modèle d'AIC chez le rat. Ces traitements rééquilibrent la balance entre les lymphocytes Th17 et T_{reg}, non seulement au niveau des articulations mais aussi au sein des ganglions mésentériques et des PP (Tong, Dou, et al. 2015 et Tong, Yu, et al. 2015).

Les produits bactériens synthétisés par le microbiote intestinal influencent le développement des arthrites induites, comme l'arthrite induite par transfert de sérum provenant de souris K/BxN. Le récepteur GPR43 (G-protein coupled receptor 43) est impliqué dans la voie de signalisation activée par les AGCC. Le transfert de sérum de souris K/BxN à des souris déficientes pour le récepteur GPR43 provoque le développement d'une arthrite exacerbée (Maslowski et al. 2009). En revanche, Mizuno et ses collaborateurs, ont montré que l'administration d'AGCC, tels que du propionate, du butyrate ou encore de l'acétate, par voie orale diminue la sévérité de l'AIC mais exacerbe l'arthrite induite par injection de sérum de souris K/BxN (Mizuno et al. 2017). Ces auteurs suggèrent que les AGCC auraient un effet sur l'immunité adaptative impliquant les lymphocytes Th1, Th17 et T_{reg} mais pas sur les cellules de l'immunité innée, requises pour le développement de l'arthrite induite par transfert de sérum de souris K/BxN. Ainsi, les produits bactériens synthétisés dans la lumière intestinale influenceraient le développement de pathologies inflammatoires articulaires.

Première hypothèse de travail

Liens entre la dysbiose intestinale, l'immunité muqueuse
et l'inflammation articulaire

Les rhumatismes inflammatoires chroniques (RIC) sont caractérisés par une inflammation articulaire persistante. La polyarthrite rhumatoïde (PR) et la spondylarthrite (SpA) sont les deux principaux RIC. La PR est une pathologie auto-immune qui affecte majoritairement les articulations synoviales et ce de façon symétrique. Les caractéristiques de cette pathologie sont une inflammation de la membrane synoviale qui, au cours du temps, entraîne une dégradation du cartilage et une érosion de l'os. La SpA est caractérisée par une inflammation de l'enthèse. Deux grands types de SpA existent, la SpA axiale, dans laquelle les articulations de la moelle épinière, du bassin et de la cage thoracique sont touchées, et la SpA périphérique. Dans ce cas les articulations des membres sont les principales affectées. Les RIC sont des pathologies multifactorielles qui font intervenir des facteurs génétiques et environnementaux (Glocker et al. 2006 et Wei et al. 2015).

Plusieurs éléments suggèrent que le microbiote intestinal joue un rôle dans le développement des RIC. Le microbiote intestinal correspond à l'ensemble des micro-organismes présents dans le tractus digestif ; il est composé de bactéries, virus, champignons et archées. Ce microbiote est en interaction permanente avec l'organisme : il est responsable de la mise en place et du maintien de l'immunité intestinale qui, en contre-partie régule la composition du microbiote et la maintient stable au cours du temps. Les patients atteints de SpA et de PR ont un microbiote intestinal différent de celui d'un individu sain (Breban et al. 2017). L'inflammation articulaire des RIC peut être accompagnée de manifestations extra-articulaires affectant l'ensemble de l'organisme. Certains patients atteints de SpA, et notamment de SpA périphérique, souffrent d'inflammation intestinale (Kabeerdoss, Sandhya, et Danda 2016 et del Río-Martínez et al. 2016). Réciproquement, les patients souffrant de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) présentent une dysbiose intestinale et certains de ces patients développent une inflammation articulaire nécessitant une prise en charge par un rhumatologue (Gionchetti, Calabrese, et Rizzello 2015 et Asquith et al. 2014).

Ce lien potentiel entre les inflammations articulaire et digestive est renforcé par le fait que des acteurs cellulaires et moléculaires sont communs entre ces deux inflammations. La *lamina propria* de l'intestin grêle, et notamment le dernier tiers, est riche en cellules de l'immunité de type 3, en particulier des lymphocytes Th17 et des cellules ILC3. Dans les conditions physiologiques, ces cellules jouent un rôle important dans la protection de l'organisme ; elles régulent la prolifération des micro-organismes du microbiote et luttent contre les agents pathogènes extracellulaires (bactéries et levures) (Aujla, Dubin, et Kolls 2007). La différenciation des lymphocytes de l'immunité de type 3 est induite par des cytokines

et notamment l'IL-23 et nécessite l'expression du facteur de transcription ROR γ t (Ivanov et al. 2006). Ces cellules sécrètent des médiateurs tels que l'IL-17 et l'IL-22 qui agissent à la fois sur l'activité des cellules résidentes de l'intestin, en stimulant, par exemple, les productions de mucus et de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales, et sur le recrutement de cellules immunitaires telles que les PNN (Sonnenberg et al. 2012) ; l'objectif est de maintenir l'intégrité de la barrière épithéliale et de protéger l'organisme. Cependant, une activation excessive de l'immunité de type 3 dans la muqueuse intestinale est néfaste ; ainsi, des mécanismes, comme la régulation de la différenciation des cellules de cette immunité et la présence d'une immunité régulatrice anti-inflammatoire, sont mis en place. Lors du développement d'une MICI, les lymphocytes Th17 et des cellules ILC3 sont très présents dans la muqueuse intestinale et la production d'IL-17 et d'IL-22 contribue à l'inflammation intestinale (Forkel et Mjösberg 2016). Ces mêmes cellules ont un rôle primordial dans l'inflammation articulaire chez les patients arthritiques. En effet, leur production d'IL-22 et d'IL-17 stimule les cellules résidentes de l'articulation, comme les synoviocytes, les ostéoblastes et les chondrocytes, qui sécrètent en retour des médiateurs pro-inflammatoires, des enzymes de dégradation de la matrice cartilagineuse et le ligand du récepteur RANK (Braun, Baraliakos, et Kiltz 2016 et Miossec et Kolls 2012). Ce processus participe à l'inflammation articulaire et aux atteintes des structures osseuses et cartilagineuses.

Face à l'ensemble de ces éléments, des auteurs ont émis l'hypothèse qu'une dysbiose intestinale provoque une activité accrue des cellules de l'immunité de type 3 dans la muqueuse intestinale, qui migreraient des cellules de cette immunité vers des sites extra-intestinaux comme les articulations, *via* la circulation sanguine. Ces cellules pourraient ainsi provoquer le développement de pathologies inflammatoires telles que l'arthrite (Wu et al. 2016, Scher et Abramson 2011 et Ranganathan et al. 2017). Cependant, les mécanismes par lesquels la dysbiose intestinale influence la régulation de l'immunité de type 3 dans les pathologies inflammatoires articulaires restent mal connus.

Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPARs), appartiennent à la superfamille des récepteurs d'hormones. Ces récepteurs sont au nombre de trois sous-types, PPAR α , PPAR β (δ) et PPAR γ . Ce sont des facteurs de transcription capables de réguler l'expression de nombreux gènes impliqués, notamment dans les métabolismes lipidique et glucidique, et dans la prolifération et la différenciation cellulaires. Le récepteur PPAR γ est un acteur essentiel du maintien de l'homéostasie de l'organisme. Il intervient dans la différenciation des adipocytes et le stockage de lipides. Ce récepteur joue aussi un rôle

important dans des processus physiopathologiques ; son activation rétablit la sensibilité à l'insuline chez les patients atteints de diabète de type 2 et normalise leur glycémie. Ainsi, plusieurs agonistes synthétiques du récepteur PPAR γ appartenant à la famille des glitazones ont été produits pour cette indication thérapeutique. Des agonistes naturels du récepteur PPAR γ sont aussi connus ; il s'agit d'acides gras poly-insaturés tels que l'acide linoléique et l'acide arachidonique, des dérivés des eicosanoïdes et des prostaglandines. Parmi ces agonistes naturels certains, comme l'acide linoléique et le butyrate, sont produits par les bactéries du microbiote intestinal (Devillard et al. 2007 et Nepelska et al. 2017). Le récepteur PPAR γ quant à lui module la production de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales intestinales. Il stimule notamment la production de certaines défensines et inhibe la sécrétion d'autres peptides antimicrobiens tels que Reg3 γ et la lipocaline-2 (Peyrin-Biroulet et al. 2010 et Kundu et al. 2014). Ainsi, ce récepteur participe à la régulation du microbiote intestinal.

Le récepteur PPAR γ a aussi un rôle dans la régulation de l'immunité de type 3 ; il inhibe le facteur de transcription ROR γ t et contrôle ainsi la différenciation de cellules de l'immunité de type 3 (Klotz, Burgdorf, et al. 2009). L'expression de PPAR γ est diminuée dans le colon des patients atteints de rectocolite hémorragique (RCH) (Dubuquoy et al. 2003) et les agonistes de ce récepteur sont efficaces dans cette pathologie (Lewis et al. 2008). Des études, dont celles de l'équipe, ont montré que des agonistes naturels ou synthétiques de PPAR γ sont efficaces dans plusieurs modèles animaux d'arthrite, avec une diminution de l'inflammation articulaire, notamment caractérisée par une baisse de l'expression de l'IL-17 dans la membrane synoviale, et une réduction des atteintes osseuses (Koufany et al. 2008, Koufany et al. 2013 et Carregaro et al. 2016). L'efficacité d'agonistes du récepteur PPAR γ a également été montrée lors d'essais cliniques chez les patients atteints de PR (Marder et al. 2013, Ormseth et al. 2013 et Shahin et al. 2011).

L'ensemble de ces données suggère que le récepteur PPAR γ , qui est impliqué dans l'homéostasie intestinale, *via* la régulation du microbiote et de l'immunité intestinale, et dont l'activation a des effets bénéfiques dans les pathologies inflammatoires intestinales et articulaires, pourrait être le maillon à l'interface entre la dysbiose intestinale, l'immunité de type 3 et les RIC.

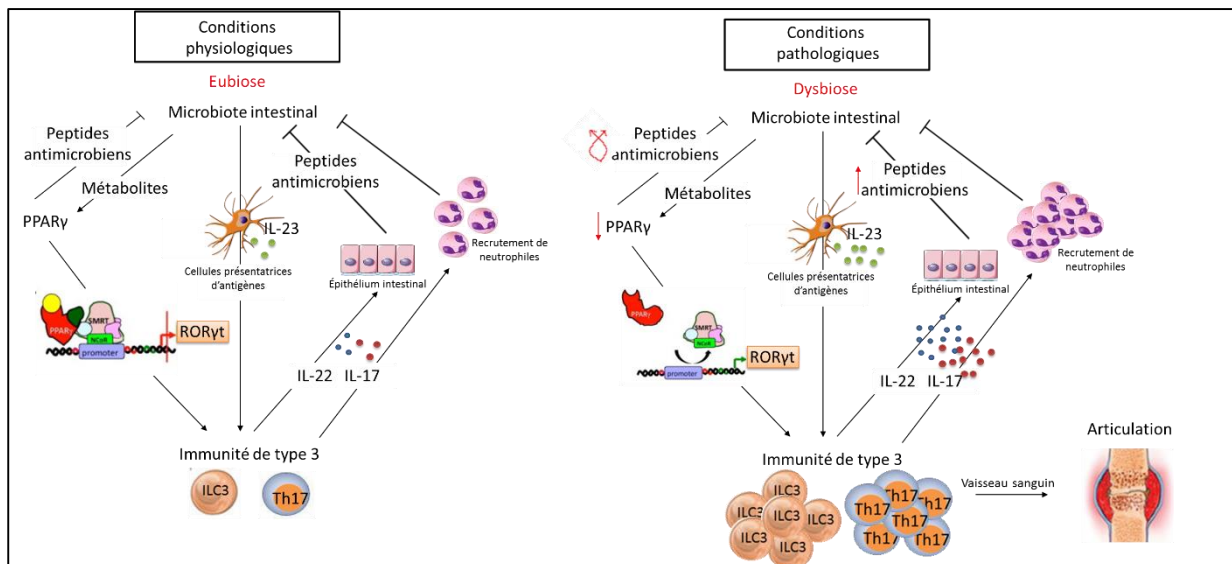


Figure 27 : **Illustration des conséquences de l'inhibition du récepteur PPAR γ au sein de la muqueuse intestinale**

Le premier objectif de cette partie de ma thèse a été

d'évaluer les conséquences de l'induction d'une colite expérimentale sur le développement de l'arthrite induite par injection de collagène chez la souris

Au cours de cette étude, nous avons :

- évalué l'impact d'une colite induite par administration de DSS sur la sévérité de l'arthrite au collagène chez la souris
- analysé les conséquences du développement de l'arthrite au collagène sur la sévérité de la colite au DSS
- comparé la composition du microbiote fécal des souris ayant subi une colite ou une arthrite et celui des souris ayant développé les deux pathologies

Le second objectif de cette partie de ma thèse a été

d'évaluer les conséquences de l'inactivation du récepteur PPAR γ sur l'homéostasie intestinale et l'inflammation articulaire

Au cours de cette étude, nous avons :

- analysé l'impact de la délétion du récepteur PPAR γ sur la structure de l'intestin et sur les populations lymphocytaires ILC3, Th17 et T_{reg} de la *lamina propria* de l'intestin et des ganglions mésentériques
- comparé le microbiote fécal des souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$

- évalué les conséquences de l'invalidation de PPAR γ sur la production de mucus et de peptides antimicrobiens dans l'intestin
- analysé les conséquences de la délétion du récepteur PPAR γ sur la structure des articulations et sur les populations lymphocytaires ILC3, Th17 et T_{reg} dans les ganglions poplités
- évalué les conséquences du transfert du microbiote fécal des souris PPAR $\gamma^{+/+}$ ou PPAR $\gamma^{-/-}$ chez des souris susceptibles au développement d'une arthrite au collagène de type 2 sur la sévérité de cette pathologie

Rappel bibliographique sur le récepteur PPAR γ

I. Le récepteur nucléaire PPAR γ : rôle dans l'homéostasie intestinale et dans les pathologies articulaires

I.1. Le récepteur nucléaire PPAR γ

Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxisomes (PPAR pour Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires d'hormones. Ce sont des facteurs de transcription activés par la fixation de leurs ligands qui régulent les grandes fonctions de l'organisme comme les métabolismes lipidique et glucidique. Ils contrôlent également la prolifération et la différenciation cellulaires. La famille des récepteurs PPAR comprend trois sous-types : PPAR α , PPAR β (δ) et PPAR γ . Ces récepteurs sont synthétisés par des gènes indépendants localisés sur des chromosomes différents. Le récepteur PPAR α est exprimé principalement dans le foie, les muscles, le cœur, les reins, le tissu adipeux brun et la muqueuse de l'estomac. Le récepteur PPAR β (δ) est ubiquitaire mais il est fortement exprimé dans le système nerveux central.

Le gène PPAR γ est localisé sur le chromosome 3, en position 3p25.2. Il est composé de neuf exons. Le processus d'épissage alternatif et des décalages du début de la transcription sur le promoteur du gène permettent de produire quatre transcrits différents : PPAR γ 1, PPAR γ 2, PPAR γ 3 et PPAR γ 4. Cependant, ces quatre transcrits ne donnent naissance qu'à deux protéines différentes, les isoformes PPAR γ 1 et PPAR γ 2 ; les transcrits PPAR γ 1, PPAR γ 3 et PPAR γ 4 sont traduits pour former la protéine PPAR γ 1. La protéine PPAR γ 2 diffère de PPAR γ 1 par vingt-huit acides aminés supplémentaires en position N-terminale. Trois transcrits issus du gène PPAR γ , plus courts que les quatre précédemment cités, ont été identifiés ; ils sont nommés γ 1ORF4, γ 2ORF4 et γ 3ORF4. Ces transcrits codent pour des protéines qui ne possèdent pas le domaine de fixation au ligand et agissent comme des dominants négatifs de PPAR γ (**Figure 28A**) (Aprile et al. 2014). Les isoformes PPAR γ 1 et PPAR γ 2 ont des localisations différentes au sein de l'organisme. La protéine PPAR γ 1 est principalement exprimée dans le tissu adipeux, le colon, les cellules hématopoïétiques, et plus faiblement dans les reins, le foie, le pancréas, les muscles squelettiques et l'intestin grêle alors que l'isoforme PPAR γ 2 est exprimée exclusivement dans le tissu adipeux (Wang et al. 2014). Dans l'intestin, le récepteur PPAR γ est exprimé dans les cellules épithéliales, les macrophages, les monocytes, les lymphocytes et les CD. Ce récepteur est également exprimé dans des cellules résidentes de l'articulation, les fibroblastes synoviaux et les chondrocytes (Ji et al. 2001 et Shao et al. 2005). Le récepteur PPAR γ a un rôle primordial dans la régulation des métabolismes lipidique et glucidique. Il contrôle la sensibilité à l'insuline et il est impliqué dans le stockage des lipides. Ce récepteur

est indispensable à la différenciation et la maturation des adipocytes. Contrairement à l'isoforme PPAR γ 1, l'isoforme PPAR γ 2 a une activité adipogénique (Ren et al. 2002).

La fixation d'un ligand sur le récepteur PPAR γ engendre son hétérodimérisation avec un récepteur de la famille des récepteurs RXRs (Retinoid X receptors). L'hétérodimérisation de ces récepteurs permet leur translocation dans le noyau où ils se fixent sur des éléments de réponse spécifiques appelés PPRE pour « PPAR response elements » pour moduler l'expression de gènes cibles. La protéine PPAR γ est composée d'un domaine A/B qui contient la fonction de transactivation AF (Activation function)-1 (en position N-terminale), un domaine de fixation à l'ADN (domaine C) qui possède une structure dite en « doigt de zinc », une région charnière (domaine D) et un domaine de fixation au ligand contenant la fonction de transactivation AF- 2 (**Figure 28B**) (Jouzeau et al. 2008). Le récepteur PPAR γ est impliqué dans de nombreux processus physiologiques comme les métabolismes du glucose, des lipides et du cholestérol, l'angiogenèse, la prolifération et la différenciation cellulaire et l'inflammation (Rosen et Spiegelman 2001 et Széles, Töröcsik, et Nagy 2007). Il est indispensable à l'adipogenèse *in vitro* et *in vivo* car il contrôle des gènes impliqués dans la différenciation des adipocytes et l'accumulation des lipides (Barak et al. 1999 et Rosen et al. 1999). Des mutations et des polymorphismes du gène codant le récepteur PPAR γ entraînent l'apparition de dysfonctionnements métaboliques, comme la résistance à l'insuline, la dyslipidémie, l'obésité qui peuvent engendrer le développement de pathologies comme le diabète de type 2, des maladies cardiovasculaires ou encore des cancers. Des agonistes de PPAR γ ont été utilisés comme traitements normoglycémiants chez les patients atteints de diabète de type 2 (Jouzeau et al. 2008).

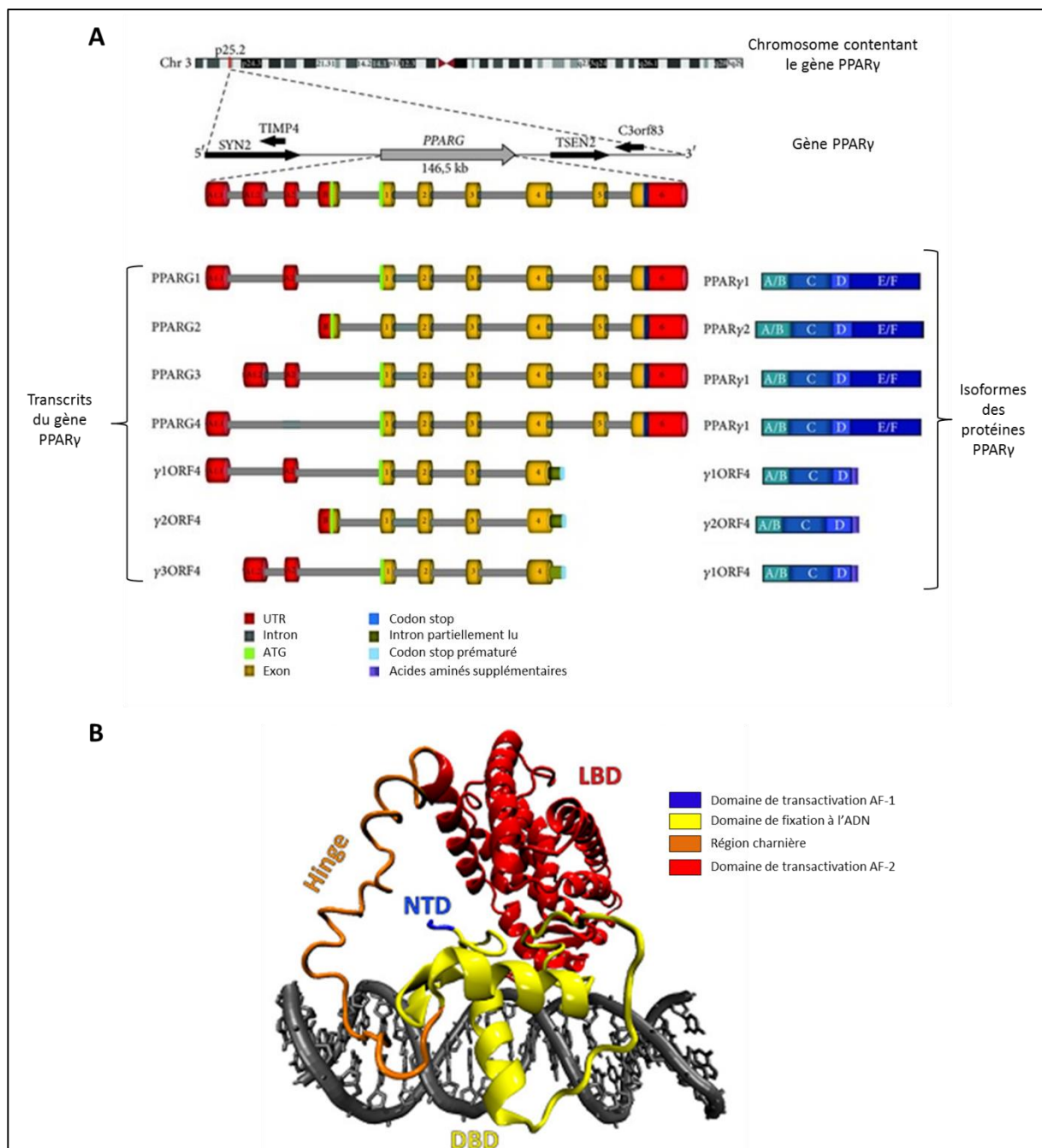


Figure 28 : Représentations schématiques du gène PPAR γ , de ses transcrits et de ses isoformes protéiques (A) et de la structure de la protéine PPAR γ associée à l'ADN (B)
Modifiés de Aprile *et al.* 2014 et Aagaard, Siersbæk, et Mandrup 2011

I.2. Le récepteur nucléaire PPAR γ , rôle dans la régulation de l'immunité et de l'homéostasie intestinale

I.2.1. Liens entre le récepteur nucléaire PPAR γ et le microbiote intestinal

L'expression du récepteur PPAR γ dans l'intestin est étroitement liée au microbiote. Son expression dans les colonocytes est en partie dépendante de la présence de micro-organismes. En effet, le récepteur PPAR γ est très faiblement exprimé dans les colonocytes des souris élevées en conditions stériles. La colonisation de ces souris par une flore commensale issue de souris

sauvages ou par un microbiote humain engendre une augmentation de son expression (Dubuquoy et al. 2003). Cette augmentation est secondaire à l'activation des récepteurs TLR par les micro-organismes (Fernandes et al. 2016). Ainsi, *in vitro*, la stimulation d'une lignée de cellules épithéliales coliques par des ligands des récepteurs TLR ou par des bactéries commensales provoque une augmentation de l'expression du récepteur PPAR γ . La stimulation de ces cellules par du LPS (un ligand de TLR-4) en association avec un agoniste de PPAR γ limite la production de cytokines pro-inflammatoires.

Les récepteurs PPARs ont la capacité de fixer des acides lipophiles, tels que des acides gras essentiels et les eicosanoïdes. De nombreux agonistes naturels ou synthétiques du récepteur PPAR γ sont connus. Les agonistes synthétiques ont été produits dans l'objectif de soigner des pathologies impliquant des dérégulations des métabolismes lipidique et glucidique. Les glitazones, des dérivés des thiazolidinediones, telles que la rosiglitazone, la pioglitazone, la troglitazone et la ciglitazone ont été utilisées dans le diabète de type 2. Les glitazones rétablissent la sensibilité de l'organisme à l'insuline et normalisent la glycémie chez ces patients. Cependant, elles provoquent des effets indésirables comme l'activation de l'adipogenèse et une prise de poids. Des agonistes ciblant PPAR γ et PPAR α , comme le ragaglitazar, le naveglitazar ou encore l'aleglitazar, ont été synthétisés pour soigner le diabète de type 2 associés à une dyslipidémie (Adegate et al. 2011). Leur développement a été arrêté en raison de l'augmentation de fréquence des cancers de la vessie lors des essais pré-cliniques.

Le microbiote intestinal module à la fois l'expression et l'activation du récepteur PPAR γ . Les agonistes naturels de PPAR γ sont des acides gras poly-insaturés tels que l'acide linoléique (AL) et l'acide arachidonique. Des dérivés des eicosanoïdes et des prostaglandines sont les ligands naturels de plus forte affinité du récepteur PPAR γ comme par exemple la prostaglandine J2 (PGJ2), l'acide 15-hydroxy-eicosatetraenoïque (15-HETE), les acides 9- et 13-hydroxy-octadecadienoïque (9- et 13-HODE respectivement) et la 15-desoxy-delta 12, 14-prostaglandine J2 (15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ ou 15d-PGJ₂).

Certaines bactéries du microbiote intestinal sont capables de métaboliser l'AL en acides linoléiques conjugués (ALC). Il s'agit des espèces bactériennes appartenant aux genres *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium* ainsi qu'aux clusters IV et XIVa des clostridium qui convertissent l'AL en ALC trans-9, trans-11, en ALC cis-9, trans-11, et en ALC trans-10, cis-12 (Devillard et al. 2007). Les ALC, *via* l'activation du récepteur PPAR γ , limitent l'inflammation intestinale puisque la supplémentation en ALC diminue la sévérité d'une colite

au DSS chez la souris (Bassaganya-Riera et al. 2004). Cette supplémentation est accompagnée d'une augmentation de l'expression du récepteur PPAR γ et l'absence de ce récepteur dans le colon prévient l'action anti-inflammatoire des ALC. Des résultats similaires ont été obtenus chez le cochon. La supplémentation en ALC augmente l'expression de PPAR γ dans le colon et limite la sévérité de la colite induite par l'administration de bactéries (Bassaganya-Riera et Hontecillas 2006).

D'autres bactéries commensales du microbiote peuvent, au contraire, inhiber l'activation du récepteur PPAR γ . Des souches de *Streptococcus salivarius*, naturellement présentes dans l'estomac et à la surface de la muqueuse iléale, jéjunale et colique, limitent l'activité transcriptionnelle de PPAR γ dans les cellules épithéliales *via* la production de petites molécules non identifiées par les auteurs (Couvigny et al. 2015). En cas d'infection, le récepteur PPAR γ contribue à la limitation du processus inflammatoire et pourrait ainsi favoriser le processus infectieux. Chez la souris, une infection de la muqueuse digestive par la bactérie entero-aggrégative *Escherichia coli* (EAEC) nécessite une activation accrue des lymphocytes Th17. L'inhibition du récepteur PPAR γ favorise la réponse Th17 et permet ainsi une lutte plus efficace contre le pathogène (Philipson et al. 2013). Des agents pathogènes sont également capables de moduler l'expression du récepteur PPAR γ . Par exemple, la bactérie *S. typhimurium* inhibe l'expression du récepteur PPAR γ . L'élimination de PPAR γ dans l'épithélium intestinal augmente la sévérité de la colite induite par cette bactérie et la production de peptides antimicrobiens tels que Reg3 γ et la lipocaline-2 (Kundu et al. 2014).

Les AGCC présents dans la lumière intestinale sont des métabolites pouvant dériver de la fermentation des fibres alimentaires par le microbiote intestinal. Les AGCC les plus abondants sont le propionate, l'acétate et le butyrate, dont certains sont des agonistes du récepteur PPAR γ . Le butyrate est capable d'induire l'expression et l'activation du récepteur PPAR γ dans une lignée de cellules épithéliales (Wächtershäuser, Loitsch, et Stein 2000 et Schwab et al. 2006). Les bactéries anaérobies strictes, notamment celles appartenant à l'ordre des Clostridia (par exemple : la bactérie *Faecalibacterium prausnitzii*), sont des grandes productrices de butyrate (Maier, Anderson, et Roy 2014). Des expériences *in vitro* ont montré que certaines espèces bactériennes du microbiote intestinal, comme *Roseburia hominis*, *Roseburia intestinalis* et *Fusobacterium naviforme*, sont capables d'activer le récepteur PPAR γ dans une lignée de cellules épithéliales, *via* la production de butyrate, mais que d'autres espèces activent le récepteur PPAR γ indépendamment du butyrate. En effet, *Prevotella copri* et *Atopobium parvulum* activent le récepteur PPAR γ en sécrétant des molécules de tailles variées

et thermosensibles (Nepelska et al. 2017). A l'inverse, le milieu de culture de la bactérie intestinale *Akkermansia muciniphila*, productrice de butyrate et de propionate, inhibe l'expression du récepteur PPAR γ dans les cellules d'intestin grêle de souris (Lukovac et al. 2014). L'activation de PPAR γ par le butyrate permet de maintenir l'eubiose puisqu'elle provoque une inhibition de la synthèse de l'enzyme iNOS et limite la biodisponibilité de l'oxygène en orientant le métabolisme énergétique des colonocytes vers la β -oxydation (Byndloss et al. 2017). La croissance des bactéries anaérobies strictes est ainsi favorisée et ces bactéries limitent la prolifération de bactéries pathogènes aérobies anaérobies facultatives.

En contrepartie, le récepteur PPAR γ régule la composition du microbiote intestinal. Il stimule la production de certaines β -défensines par les colonocytes, comme la défensine mDefB10 (Murin defensin beta 10) chez la souris et la défensine hDefB1 (Human defensin beta 1) chez l'homme (Peyrin-Biroulet et al. 2010). D'autre part, les peptides antimicrobiens dont la synthèse est favorisée par le récepteur PPAR γ ciblent des micro-organismes pathogènes. Les peptides extraits de la muqueuse de souris partiellement déficientes pour le récepteur PPAR γ ont une action antimicrobienne moins efficace sur des micro-organismes impliqués dans la pathogenèse des MICI comme *Bacteroides fragilis*, *Enterococcus faecalis* ou encore *Candida albicans* (**Figure 29**).

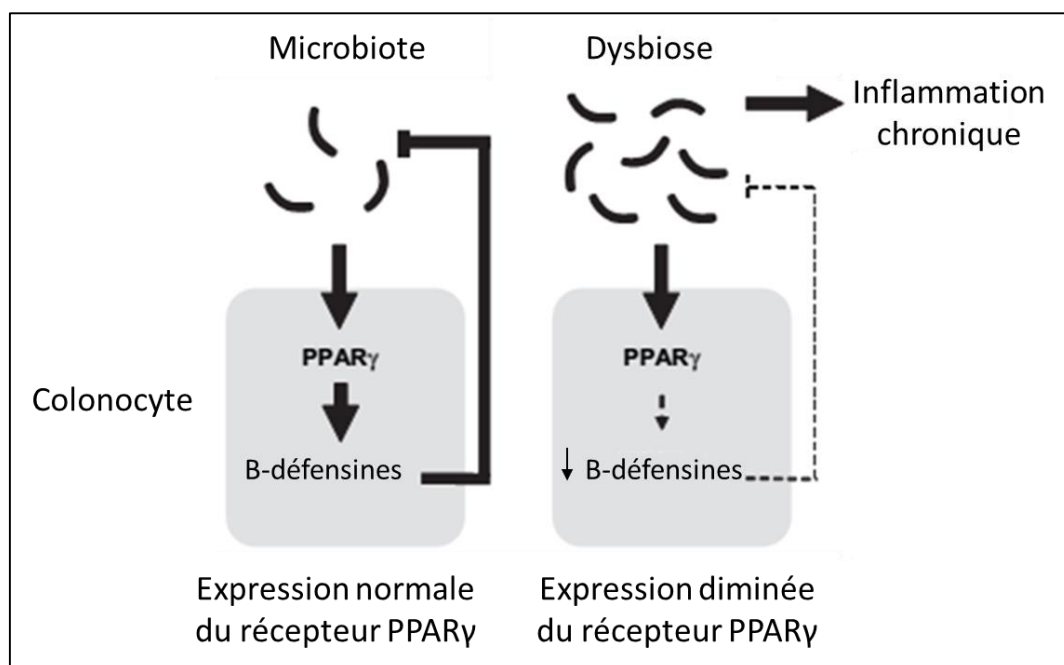


Figure 29 : **Représentation schématique de l'implication du récepteur PPAR γ dans la régulation du microbiote intestinal**

Modifié de Peyrin-Biroulet et al. 2010

I.2.2. Rôle du récepteur nucléaire PPAR γ dans le contrôle de l'immunité intestinale

Le récepteur PPAR γ a très largement été étudié pour son rôle dans les métabolismes lipidique et glucidique. Son implication dans la régulation de l'inflammation n'a été observée qu'au début des années 2000. Le récepteur PPAR γ est exprimé dans de nombreuses cellules immunitaires, comme les monocytes, les macrophages, les CD et les lymphocytes. Il a une action anti-inflammatoire et contribue à la résolution de l'inflammation. Il agit également sur l'immunité innée en contrôlant plusieurs types cellulaires. Dans plusieurs pathologies inflammatoires, le récepteur PPAR γ favorise la polarisation des macrophages M2. Au sein du tube digestif, il stimule l'activité antifongique des macrophages (notamment contre *Candida albicans*) en augmentant leur capacité de phagocytose (Galès et al. 2010). Dans les modèles de colites au DSS ou au TNBS chez le rat, la rosiglitazone diminue l'inflammation intestinale avec notamment une diminution l'expression de la MPO, une enzyme majoritairement produite par les PNN (Celinski et al. 2011 et Sánchez-Hidalgo et al. 2005). *In vitro*, les agonistes de PPAR γ , en particulier la troglitazone et la 15d-PGJ₂, inhibent la migration des PNN en réponse à l'IL-8, une cytokine ayant un pouvoir chimioattractant sur ces cellules (Reddy et al. 2008). Le récepteur PPAR γ permet aussi de réguler l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Le TNF α est une cytokine pro-inflammatoire puissante ; il participe à la destruction des bactéries en cas d'infection et possède un pouvoir chimioattractant sur les PNN et les macrophages. Cependant, une production excessive de TNF α provoque l'apparition d'une inflammation chronique. Ainsi, des mécanismes de rétrocontrôle du TNF α existent : le récepteur PPAR γ inhibe l'expression du TNF α alors que ce dernier augmente l'expression de PPAR γ dans les PNN. En effet, les PNN provenant d'individus sains expriment naturellement le récepteur PPAR γ et leur culture en présence de cytokines telles que le TNF α augmente leur niveau d'expression de PPAR γ (Reddy et al. 2008). Ce mécanisme participe probablement au processus de résolution de l'inflammation. En revanche, des agonistes de PPAR γ tels que la pioglitazone diminuent l'expression du TNF α de façon PPAR γ -dépendante dans un modèle d'asthme induit par administration de LPS (Sharma, Kaundal, et Sharma 2009). Le récepteur PPAR γ ne semble pas être activé directement par le LPS mais plutôt par des médiateurs de l'inflammation induits par cette molécules (Reddy et al. 2008). L'activation du récepteur PPAR γ par des agonistes synthétiques ou naturels influence l'expression d'autres cytokines. L'IL-1 β et IL-6 sont deux cytokines pro-inflammatoires dont la production est réduite par les agonistes du récepteur PPAR γ . Dans certaines pathologies inflammatoires, l'utilisation

d'agonistes de PPAR γ induit la synthèse d'IL-10 impliquée dans la résolution de l'inflammation (Kim et al. 2005).

Dans un état pathologique, l'expression du récepteur PPAR γ est diminuée sur les sites inflammatoires. Par exemple, son expression est diminuée dans le colon des patients atteints de RCH (Dubuquoy et al. 2003) même si les thiazolidinediones ont montré leur efficacité anti-inflammatoire chez ces patients et dans des modèles de colite chez le rat (Desreumaux et al. 2001 et Lewis et al. 2008). Dans les conditions physiologiques, il module l'activation des cellules T. Son expression dans les CD provoque notamment une diminution de leur synthèse d'IL-12 et des molécules de co-stimulation CD80 et CD40 et une production de la molécule de co-inhibition B7H1 (Nencioni et al. 2002, Szatmari, Rajnavolgyi, et Nagy 2006 et Klotz, Huckle, et al. 2009). PPAR γ bloque également la migration des CD vers les organes lymphoïdes secondaires en réprimant la transcription du récepteur aux chimiokines CCR7 (Nencioni et al. 2002). Le récepteur PPAR γ régule aussi directement l'immunité adaptative. Il réprime la production d'IL-2, ce qui inhibe l'activation et la survie des lymphocytes T (Yang et al. 2000) et il contrôle l'équilibre entre les populations lymphocytaires Th1 et Th2. La protéine PPAR γ 2 est davantage exprimée dans les lymphocytes Th2 que dans les lymphocytes Th1. Elle stimule la production de la cytokine IL-4 par les lymphocytes Th2 et inhibe la synthèse d'IFN γ par les lymphocytes Th1.

L'immunité de type 3 est également contrôlée par PPAR γ . Les lymphocytes Th17 et T_{reg} sont en équilibre. Le récepteur PPAR γ contrôle cette balance en inhibant la différenciation des lymphocytes Th17 et en favorisant celle des lymphocytes T_{reg}. Il contrôle la différenciation des lymphocytes Th17 via l'inhibition de la transcription de ROR γ t (**Figure 30**) et favorise la survie des lymphocytes T_{reg} (Klotz, Burgdorf, et al. 2009). Les récepteurs PPAR α et PPAR γ sont capables en présence de TGF- β d'induire la différenciation des cellules T CD4⁺CD25⁻ en lymphocytes T_{reg} exprimant FoxP3 (Lei et al. 2010). Les lymphocytes possèdent une capacité de plasticité. Ainsi, les lymphocytes Th17 peuvent, dans certains contextes, être reprogrammés pour devenir des lymphocytes T_{reg} induits (iT_{reg}). Cette reprogrammation est caractérisée par une diminution de l'expression de ROR γ t et une augmentation de l'expression de FoxP3. Ainsi, le récepteur PPAR γ contribue au passage des lymphocytes Th17 vers un phénotype anti-inflammatoire T_{reg} et des études *in silico* et *in vivo* ont montré que c'est notamment le cas dans la muqueuse digestive (Carbo et al. 2013).

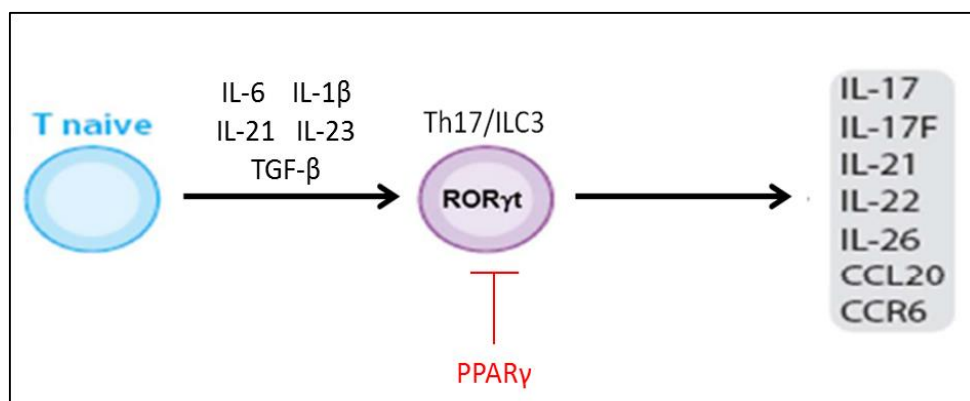


Figure 30 : **Représentation schématique de la différenciation des lymphocytes T naifs en lymphocytes Th17 et son inhibition par le récepteur PPAR γ**

Modifié de Korn et al. 2009

I.3. Rôle du récepteur nucléaire PPAR γ dans les pathologies inflammatoires articulaires

Le récepteur PPAR γ régule le processus inflammatoire et favorise la résolution de l'inflammation. Dans des pathologies inflammatoires telles que l'arthrite, l'activation du récepteur PPAR γ limite l'inflammation et protège les tissus. Des essais cliniques ont évalué l'impact de l'activation de PPAR γ par la pioglitazone sur la sévérité de RIC. Une étude pilote, menée sur un petit nombre de patients présentant un RP actif, a montré que la pioglitazone diminue la sévérité de la pathologie (Bongartz et al. 2005). Plusieurs essais cliniques ont également montré que cet agoniste est efficace dans la PR, avec une réduction de l'activité de la maladie (évaluée par le score DAS28 (Disease activity score 28)) et une diminution de la protéine C-réactive (CRP) (Ormseth et al. 2013, Shahin et al. 2011 et Marder et al. 2013).

Le récepteur PPAR γ régule l'activité de nombreuses cellules immunitaires et résidentes, impliquées dans l'inflammation articulaire. Il est notamment exprimé dans les monocytes et les macrophages, les chondrocytes et les synoviocytes. Des analyses sur les tissus provenant de patients atteints de PR et sur des cultures primaires dérivées de ces tissus ont permis de mieux comprendre les mécanismes par lesquels PPAR γ réduit l'activité de l'arthrite. Le récepteur PPAR γ est davantage exprimé par les monocytes et les macrophages des patients atteints de PR par comparaison à des donneurs sains (Palma et al. 2012). Le traitement, *in vitro*, de monocytes et de macrophages de patients PR par le méthotrexate ou par la 15d-PGJ augmente l'expression de PPAR γ et réduit leur réponse inflammatoire (Palma et al. 2012). Des études ont également été menées sur le rôle de PPAR γ dans les cellules résidentes de l'articulation telles que les synoviocytes et les chondrocytes. Certaines études montrent que le récepteur PPAR γ est

exprimé de façon similaire dans les synoviocytes de patients atteints de PR, d'arthrose ou d'individus sains (Ji et al. 2001). D'autres études montrent, au contraire, que PPAR γ est davantage exprimé dans les synoviocytes de patients souffrant de PR que dans ceux de patients atteints d'arthrose ou de donneurs sains (Li et al. 2017 et Kawahito et al. 2000). Des études *in vitro* ont permis de montrer le rôle anti-inflammatoire du récepteur PPAR γ dans les synoviocytes de patients arthritiques. Son activation dans ces cellules par la troglitazone diminue la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , l'IL-6 et l'IL-8 ainsi que de certaines métalloprotéases matricielles comme MMP-3 (Yamasaki et al. 2002). Des agonistes naturels ou synthétiques de PPAR γ ont des effets comparables sur des synoviocytes de patients atteints de PR activés par un stimulus pro-inflammatoire comme le TNF α . Dans ces conditions expérimentales, l'activation du récepteur PPAR γ engendre une diminution de la synthèse d'IL-1 β , de TNF α et de MMP-13 (Ji et al. 2001 et Lin et al. 2011). Les chondrocytes d'individus sains ou de patients atteints de PR expriment aussi le récepteur PPAR γ (Fahmi et al. 2001 et Shan et al. 2004). Les agonistes de PPAR γ réduisent la production de MMP-13 et de NO par les chondrocytes sains stimulés par une cytokine pro-inflammatoire telle que l'IL-1 β , le TNF α mais aussi l'IL-17 (Fahmi et al. 2001). L'agoniste naturel 15d-PGJ2 peut être produit par les chondrocytes de patients atteints de PR ou d'individus sains. La synthèse de cet agoniste par ces cellules est augmentée en présence de médiateurs pro-inflammatoires et peut induire l'apoptose des chondrocytes *in vitro* (Shan et al. 2004).

Les modèles animaux ont permis de confirmer le rôle de PPAR γ dans l'arthrite, d'évaluer l'efficacité des agonistes de PPAR γ sur la sévérité de cette pathologie et d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents. Le récepteur PPAR γ est impliqué dans l'AA ; son expression est diminuée dans la membrane synoviale des rats développant cette arthrite (Li et al. 2017). *In vitro*, l'inhibition totale de PPAR γ dans les synoviocytes extraits de ces rats provoque une augmentation de la synthèse des métalloprotéases matricielles MMP-3 et MMP-9. Plusieurs travaux, dont ceux du laboratoire, effectués dans différents modèles expérimentaux d'arthrite chez le rongeur ont montré que l'activation de PPAR γ par des agonistes naturels ou synthétiques limitent l'inflammation articulaire et les atteintes structurales. En effet, la pioglitazone et la rosiglitazone limitent l'inflammation articulaire dans le modèle d'AA chez le rat (Koufany et al. 2014, Koufany et al. 2008 et Shahin et al. 2011). Ces agonistes diminuent les médiateurs de l'inflammation à la fois *in situ*, au sein de la membrane synoviale, et dans la circulation sanguine (Koufany et al. 2008 et Shahin et al. 2011). Dans le modèle d'AA chez la souris, la pioglitazone et la rosiglitazone diminuent l'expression

de biomarqueurs de l'inflammation tels que Cox-2 (cyclo-oxygénase 2) et iNOS et empêchent la formation de nitrotyrosines au sein des articulations (Shiojiri et al. 2002). L'efficacité des agonistes du récepteur PPAR γ sur l'inflammation articulaire a été montrée dans un autre modèle d'arthrite expérimentale, l'AIC (Cuzzocrea et al. 2003 et Carregaro et al. 2016). Dans ce modèle, le traitement des souris avec de la rosiglitazone ou de la 15d-PGJ2 diminue la sévérité de l'arthrite et réduit la présence des nitrotyrosines et de médiateurs pro-inflammatoires dans l'articulation et de cytokines telles que le TNF α , l'IL-1 β et l'IL-6 dans le plasma. Le rôle anti-inflammatoire des agonistes du récepteur PPAR γ pourrait être dû à une polarisation des lymphocytes vers un phénotype T_{reg}. En effet, dans le modèle d'AIC chez la souris, la 15d-PGJ2 réduit l'expression du facteur de transcription ROR γ t dans les ganglions au bénéfice de FoxP3 (Carregaro et al. 2016). La pioglitazone et la rosiglitazone protègent les structures osseuses lors du développement d'une AA chez le rat mais n'ont pas d'effet sur le cartilage articulaire (Koufany et al. 2008). Cet effet, est notamment dû à une diminution de la protéine RANKL et la cytokine IL-17 dans les articulations arthritiques (Koufany et al. 2013). Certains traitements testés dans des modèles animaux d'arthrite modulent également l'expression du récepteur PPAR γ . Le ginsenoside, un composé issu de la plante *Panax ginseng*, et l'acide ursodésoxycholique diminuent respectivement la sévérité de l'AA chez le rat et de l'AIC chez la souris et augmentent l'expression de PPAR γ (Zhang et al. 2017 et Lee et al. 2017). Les modèles expérimentaux d'arthrite permettent également d'étudier de nouvelles pistes thérapeutiques. Les CD expriment le récepteur PPAR γ et peuvent avoir un rôle anti-inflammatoire après une stimulation par un agoniste de ce récepteur. En effet, des CD obtenues par différenciation *in vitro* à partir de progéniteurs médullaires de souris, traitées par la rosiglitazone, diminuent la sévérité de l'AIC lorsqu'elles sont administrées aux souris et ce probablement en favorisant la polarisation des lymphocytes T_{reg} (Byun et al. 2016).

Objectif 1

Conséquences de l'induction d'une colite expérimentale
sur le développement de l'arthrite induite au collagène
chez la souris

I. Conséquences de l'induction d'une colite expérimentale sur le développement de l'arthrite induite par injection de collagène chez la souris

I.1. Objectif de l'étude

De nombreux patients atteints de SpA développent des manifestations extra-articulaires parmi lesquelles figure l'inflammation intestinale. Réciproquement, des patients souffrant d'une MICI, comme la RCH et la MC, développent des manifestations extra-intestinales, dont la SpA est la plus fréquente. Les patients atteints SpA, comme ceux présentant une MICI, ont un microbiote intestinal différent de celui des sujets sains. Ces maladies possèdent des caractéristiques physiopathologiques communes impliquant les mêmes acteurs cellulaires et moléculaires. Des études pré-cliniques renforcent l'hypothèse d'un lien entre les MICI et la SpA. Ainsi, les rats transgéniques pour la protéine HLA-B27 développent spontanément des inflammations articulaire et digestive. D'autre part, le développement d'une AIC est étroitement lié au microbiote intestinal des souris. Par ailleurs, l'induction d'une colite au DSS provoque une modification du microbiote intestinal ou dysbiose. L'objectif de ce travail a été d'étudier les conséquences de la modification du microbiote intestinal par l'induction d'une colite au DSS sur le développement d'une arthrite au collagène de type 2.

I.2. Résumé du matériel et méthodes

Pour mener à bien notre étude, nous avons effectué quatre groupes de souris mâles de fond génétique DBA/1 âgées de 7 semaines (Janvier Labs) :

- Un groupe de souris contrôle : « saines » ou « Healthy »
- Un groupe de souris chez lesquelles nous avons induit uniquement une arthrite : « arthritiques » ou « Arthritis »
- Un groupe de souris chez lesquelles nous avons induit uniquement une colite : « colitiques » ou « Colitis »
- Un groupe de souris chez lesquelles nous avons induit une arthrite et une colite : « arthritiques et colitiques » ou « Arthritis + colitis »

L'arthrite au collagène de type 2 a été induite (J0) par une injection intradermique de 100µg de collagène de type 2 bovin émulsifiés dans de l'adjuvant complet de Freund. Vingt-et-un jours (J21) plus tard une deuxième injection de 100µg de collagène de type 2 a été effectuée par voie intrapéritonéale.

La colite a été induite par l'ingestion d'une solution à 3% de DSS (DSS, colitis grade MW 36-50kDa) dans l'eau de boisson entre le quatorzième jour (J14) et le vingt-et-unième jour (J21) après l'induction de l'arthrite.

La sévérité de l'arthrite et de la colite a été évaluée quotidiennement par un score clinique validé pour chacune des pathologies. Des prélèvements de selles ont été effectués aux temps J14, J21, J30 et J41 après l'induction de l'arthrite afin de quantifier la lipocaline-2, un marqueur de l'inflammation intestinale, par ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) et d'analyser le microbiote fécal par séquençage haut-débit. L' α -diversité, la β -diversité et la composition bactérienne du microbiote fécal ont été analysées par séquençage haut-débit du gène de l'ARNr 16S.

Les souris ont été mises à mort quarante-et-un jours (J41) après l'induction de l'arthrite. Des analyses histologiques ont été réalisées sur les chevilles et les colons des souris afin d'évaluer la sévérité des lésions articulaires et digestives. Ces analyses ont été complétées par la mesure de l'expression de certains gènes de l'inflammation (TNF α , IL-1 β , iNOS) dans les poignets et dans le colon par RT-PCR quantitative.

I.3. Synthèse des résultats

Cette étude a fait l'objet d'une publication :

Experimental colitis delays and reduces the severity of collagen-induced arthritis in mice
Hablot J, Peyrin-Biroulet L, Kokten T, El Omar R, Netter P, Bastien C, Jouzeau JY, Sokol H, Moulin D.
PLoS One. 2017; 12(9): e0184624

Cette publication est référencée en annexe n°1, publication 1.

Résumé de la publication :

Parmi les manifestations extra-intestinales (MEI) survenant chez les patients atteints de MICI, les manifestations rhumatismales sont les plus fréquentes. La compréhension des relations entre l'arthrite et la colite est un prérequis pour l'amélioration de la prise en charge de ces patients. Le microbiote des patients atteints de MICI ou de maladies rhumatismales, comme la spondylarthrite (SpA), est différent de celui des individus sains. Ainsi, nous avons évalué l'impact de la colite sur le développement d'une arthrite chez la souris et nous avons analysé les modifications du microbiote. L'arthrite au collagène (AIC) a été induite au jour 0 chez des souris DBA/1 exposées ou non à une colite au Dextran Sodium Sulfate (DSS) entre les jours 14 et 21. La sévérité de l'arthrite et de la colite est régulièrement évaluée (score clinique, œdème des pattes postérieures). Le microbiote fécal a été analysé par séquençage haut-débit du gène de l'ARNr 16S aux temps critiques (J14, J21, J30 et J41). Au jour J41, soit à la fin de l'expérience, une analyse histologique des colons et des chevilles a été effectuée. L'induction de la colite a légèrement retardé l'apparition de l'arthrite (2 ± 1 jours de retard) et a réduit sa

sévérité ($5,75 \pm 1,62$ dans le groupe arthrite seule vs $4,00 \pm 1,48$ dans le groupe arthrite + colite ($p=0,02$ au jour 28)) macroscopiquement et histologiquement. Au contraire, la sévérité de la colite n'a pas été affectée par le développement de l'arthrite. L'induction de la colite a provoqué une modification de la composition du microbiote et une diminution de l' α -diversité. La composition du microbiote fécal était différente entre les groupes colite et arthrite + colite pendant le développement de la colite. De façon intéressante, une diminution plus faible de la diversité bactérienne dans le groupe arthrite + colite a été observée. La colite expérimentale protège les souris contre l'arthrite au collagène et ceci est associée à des modifications de la composition du microbiote intestinal.

Synthèse des résultats

I.3.1. La colite au DSS retarde l'apparition de l'arthrite au collagène de type 2 et diminue sa sévérité

Les souris des groupes « saines » et « colitiques » ne développent pas d'arthrite. Les premiers signes d'arthrite apparaissent au vingtième jour (J20) pour le groupe « arthritiques » et au vingt-huitième jour (J28) pour le groupe « arthritiques et colitiques », soit un retardement de huit jours des manifestations articulaires en cas de colite concomittante. La sévérité de l'arthrite augmente progressivement dans les deux groupes depuis l'apparition des premiers signes jusqu'à la mise à mort. Cependant, les souris du groupe « arthritiques et colitiques » développent une arthrite moins sévère que les souris du groupe « arthritiques ». Les analyses histologiques réalisées au quarante-et-unième jour (J41) confirment que les lésions articulaires sont moins sévères dans le groupe « arthritiques et colitiques » ; l'inflammation de la membrane synoviale (synovite) et les dommages structuraux osseux et cartilagineux sont moins importants dans ce groupe. De même, l'expression articulaire des ARNm (Acide ribonucléique messenger) du $\text{TNF}\alpha$, de l' $\text{IL-1}\beta$ et d' iNOS est plus faible dans le groupe « arthritiques et colitiques » que dans le groupe « arthritiques ».

I.3.2. Le développement de l'arthrite au collagène de type 2 n'influence pas la sévérité de la colite au DSS

Les souris des groupes « saines » et « arthritiques » ne développent pas de colite. Dans les groupes « colitiques » et « arthritiques et colitiques », les premiers symptômes de la colite sont observés au quinzième jour (J15) et la colite se développe jusqu'au vingt-septième jour (J27) avec un pic d'inflammation intestinale à J20. Le développement de l'inflammation digestive est donc similaire dans ces deux groupes. Ceci est confirmé par l'augmentation comparable de la lipocaline-2 fécale dans ces deux groupes par rapport au groupe « saines ». Les analyses histologiques et les mesures de l'expression colique des ARNm du $\text{TNF}\alpha$, de l' $\text{IL-1}\beta$ et d' iNOS révèlent une inflammation de la muqueuse similaire dans ces deux groupes.

I.3.3. Le développement simultané d'une colite et d'une arthrite modifie le microbiote fécal.

Le développement de la colite seule provoque une diminution du nombre d'espèces bactériennes dans le microbiote fécal au pic de sévérité de la maladie (J21). Cette modification de l' α -diversité n'est pas retrouvée dans les groupes « arthritiques » et « arthritiques et colitiques ». La β -diversité est également impactée par la colite et ce de façon très marquée à J21. Le développement de l'arthrite ne modifie pas ces paramètres. La composition bactérienne est différente entre les groupes « arthritiques », « colitiques » et « arthritiques et colitiques », notamment à J21. A ce temps, plusieurs taxons du phylum des Firmicutes, comme le genre des *Lactobacillus* et la famille des Lachnospiraceae, sont davantage présents dans le groupe « arthritiques et colitiques » que le groupe « colitiques ». En revanche, le genre *Gemella*, du phylum des Firmicutes, et la famille des Pseudomonadaceae, appartenant aux Protéobactéries, sont moins présents dans le microbiote fécal du groupe « arthritiques et colitiques ». Des différences entre les groupes « arthritiques » et « arthritiques et colitiques » sont également visibles à J30. La famille des Lactobacillaceae et l'espèce *Ruminococcus gnavus*, appartenant au phylum des Firmicutes, et la famille des Desulfovibrionaceae, appartenant aux Protéobactéries, sont davantage présents dans le groupe « arthritiques et colitiques ».

I.4. Conclusion

Au cours de notre étude, nous avons montré que l'induction d'une colite expérimentale au cours du développement d'une arthrite au collagène de type 2, provoque un retard dans l'apparition des premiers symptômes arthritiques et diminue la sévérité de l'arthrite. Au contraire, la colite n'est pas affectée par le développement d'une arthrite. La colite provoque un déséquilibre du microbiote fécal caractérisé par une diminution du nombre d'espèces bactériennes, un changement de β -diversité et une modification de la composition bactérienne. Les souris ayant subi l'induction d'une colite pendant le développement de l'arthrite ont un microbiote fécal qui possède sa propre signature ; la composition bactérienne est différente de celle des souris chez lesquelles une seule des pathologies a été induite. Les différences les plus marquantes entre ces souris et celles des groupes « colitiques » ou « arthritiques » concernent les phyla des Firmicutes et des Protéobactéries, qui sont deux des trois principaux phyla du microbiote intestinal humain.

Objectif 2

Conséquences de l'invalidation du récepteur PPAR γ sur
l'homéostasie intestinale et l'inflammation articulaire

II. Conséquences de l'invalidation du récepteur PPAR γ sur l'homéostasie intestinale et l'inflammation articulaire

II.1. Objectif de l'étude

Evaluer à l'aide d'un modèle de souris transgéniques déficientes pour le récepteur PPAR γ , qui développent spontanément une inflammation articulaire, les conséquences de cette délétion sur l'immunité de type 3, la composition du microbiote fécal et sa capacité à moduler le développement d'une arthrite expérimentale. Pour s'affranchir des effets métaboliques provoqués par la délétion globale de PPAR γ , des expériences complémentaires ont été menées avec des souris chez lesquelles ce récepteur a été invalidé sélectivement dans les cellules exprimant le facteur de transcription ROR γ t (gène cible de PPAR γ contrôlant la différenciation des lymphocytes Th17 et des cellules lymphoïdes ILC3).

II.2. Matériel et méthodes

II.2.1. Obtention des souris PPAR $\gamma^{-/-}$ et de leurs frères de litière PPAR $\gamma^{+/+}$ et des souris ROR γ t-crePPAR $\gamma^{-/-}$ et leurs frères de litière ROR γ t-crePPAR $\gamma^{+/+}$

La délétion totale du récepteur PPAR γ provoque la mort *in utero* des souriceaux ; ce récepteur a un rôle primordial dans l'organisation de la vasculature du placenta. Le Professeur Béatrice Desvergne a réussi pour la première fois à créer des souris totalement déficientes pour le récepteur PPAR γ (souris PPAR $\gamma^{-/-}$). Une collaboration entre le Professeur Desvergne et l'équipe nous a permis d'obtenir ces souris. La stratégie permettant de produire des souris PPAR $\gamma^{-/-}$ viables est d'éliminer totalement le gène PPAR γ uniquement dans les cellules de l'embryon. Ainsi, l'obtention de souris PPAR $\gamma^{-/-}$ nécessite plusieurs croisements. Dans un premier temps des souris hétérozygotes pour le récepteur PPAR γ (souris PPAR $\gamma^{+/-}$) sont croisées avec des souris hétérozygotes pour l'enzyme Cre placée en amont du promoteur du gène SOX2 (Sex determining region Y-box 2), un gène exprimé précocement au cours de l'embryogenèse mais pas dans les tissus extra-embryonnaires (souris Sox2-cre^{tg/+}). Ce croisement permet d'obtenir des souris hétérozygotes pour le récepteur PPAR γ et exprimant l'enzyme Cre dans l'ensemble de leurs cellules (souris Sox2-cre^{tg/+} PPAR $\gamma^{+/-}$). Ensuite, ces souris sont croisées avec des souris possédant des séquences LoxP de part et d'autre du gène PPAR γ , et ce sur les deux allèles (souris PPAR $\gamma^{fl/fl}$), ce qui nous a permis d'obtenir à la fois des souris totalement déficientes pour le récepteur PPAR γ (souris Sox2-cre^{tg/+} PPAR $\gamma^{fl/-}$ que nous appellerons PPAR $\gamma^{-/-}$) et des souris ne possédant pas l'enzyme Cre et ayant un allèle du gène PPAR γ sauvage et le deuxième allèle floxé (souris Sox2-cre^{+/+} PPAR $\gamma^{fl/+}$ que nous appellerons

PPAR $\gamma^{+/+}$). Ces dernières souris nous ont servi de comparateur pour étudier le phénotype des souris PPAR $\gamma^{-/-}$.

Nous avons également utilisé des souris déficientes pour le récepteur PPAR γ sélectivement dans les cellules exprimant le facteur de transcription ROR γ t. Pour obtenir ces souris, nous avons tout d'abord croisé des souris hétérozygotes pour l'enzyme Cre placée en amont du promoteur du gène ROR γ t (souris ROR γ t-cre^{tg/+}) avec des souris PPAR $\gamma^{fl/fl}$. Ce croisement nous a permis d'obtenir des souris exprimant l'enzyme Cre dans l'ensemble des cellules ROR γ t positives et étant hétérozygotes pour le récepteur PPAR γ dans ces cellules (souris ROR γ t-cre^{tg/+}PPAR $\gamma^{fl/+}$). Ces souris ont ensuite été croisées avec des souris PPAR $\gamma^{fl/fl}$, ce qui nous a permis d'obtenir des souris déficientes pour le récepteur PPAR γ dans les cellules ROR γ t positives (souris ROR γ t-cre^{tg/+}PPAR $\gamma^{fl/fl}$ que nous appellerons souris ROR γ t-cre/PPAR $\gamma^{-/-}$) et des souris n'exprimant pas l'enzyme Cre et présentant leurs deux allèles floxés (souris ROR γ t-cre^{+/+}PPAR $\gamma^{fl/fl}$ que nous appellerons souris ROR γ t-cre/PPAR $\gamma^{+/+}$). Ces dernières souris nous ont servi de comparateur pour étudier le phénotype des souris ROR γ tcrePPAR $\gamma^{-/-}$.

Pour sélectionner les souris présentant le bon génotype, un génotypage a été effectué à chaque croisement. Pour cela, une biopsie d'oreille est réalisée. L'ADN est extrait par dissolution des échantillons dans une solution composée de NaOH (25mM) (*Carlo Erba Reagents, Fr.*) et de Na₂EDTA (2mM) (*Fisher Scientific, UK*), pH 12. Après une incubation de 10 minutes à 37°C, du tris-HCl, pH 5 (*Euromedex, Fr.*) est ajouté. Une PCR semi-quantitative est réalisée sur chaque échantillon. Pour cela, l'ADN génomique est incorporé à un mélange réactionnel (HotStartTaq Plus Master Mix (*Qiagen, USA*)) composé d'une ADN polymérase, de désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) et d'un tampon propice à l'activité de l'enzyme. Le couple d'amorces nécessaire à la vérification de la présence de l'enzyme Cre ou du statut du récepteur PPAR γ est ajouté au mélange réactionnel (**Tableau 1**). Pour déterminer le statut du récepteur PPAR γ , deux réactions sont nécessaires. Le volume est ajusté à 20 μ l avec de l'eau. Les échantillons sont chauffés à 95°C pendant 15 minutes pour activer l'enzyme, puis 35 cycles d'amplification sont effectués. Chaque cycle comprend une étape de dénaturation des brins d'ADN à 94°C pendant 1 minute, puis une étape à la température d'hybridation des amorces, cette température est variable selon les amorces, (**Tableau 1**) pendant 1 minute et une étape d'élongation est effectuée à 72°C pendant 1 minute. A la fin du dernier cycle les échantillons sont chauffés à 72°C pendant 10 minutes. Les produits de PCR sont analysés après migration sur gel d'agarose 2% contenant du GelRed® (*Biotium, USA*) sous une lampe UV.

Tableau 1 : Couples d'amorces utilisés pour le génotypage et la détection de gènes d'intérêt par RT-PCR

Nom du gène	Amorces sens et antisens	Taille du fragment amplifié	Température d'hybridation
Enzyme Cre Génotypage	5'-AGG TGT AGA GAA GGC ACT TAG-3' 5'-CTA ATC GCC ATC TTC CAG CAG G-3' 5'-CCA ATC CCT TGG TTC ATG GTT GC-3' 5'-CGT AAG GCC CAA GGA AGT CCT GC-3'	Mutant 230pb et 472pb Sauvage 472pb	62°C
PPARγ Génotypage	Réaction 1 : 5'-CCA CGT CTG TTA GAA TAG CTA GTC CA-3' 5'-GGG ACA GAC CTC ACT AAC CCG TAA CT-3' Réaction 2 : 5'-GGG ACA GAC CTC ACT AAC CCG TAA CT-3' 5'-GAC CCA ACT CTA CAA CAG GC-3'	400pb 500pb et/ou 700pb	58°C 58°C
KC (CXCL1)	5'-AGA CCA TGG CTG GGA TTC AC-3' 5'-AGT GTG GCT ATG ACT TCG GT-3'	94pb	60°C
IL-17A	5'-GGA CTC TCC ACC GCA ATG AA-3' 5'-TTT CCC TCC GCA TTG ACA CA-3'	94pb	60°C
Mucine 1	5'-TCG TCT ATT TCC TTG CCC TG-3' 5'-ATT ACC TGC CGA AAC CTC CT-3'	185pb	60°C
Mucine 2	5'-ACA AAA ACC CCA GCA ACA AG-3' 5'-GAG CAA GGG ACT CTG GTC TG-3'	190pb	60°C
Défensine Defb1	5'-TCC TGG TGA TGA TAT GTT TTC TTT TCT-3' 5'-TGT TCT TCG TCC AAG ACT TGT GA -3'	77pb	60°C
Défensine Defb10	5'-TTG TCC TGG TAA TAG CAG GTT TAT GA -3' 5'-CGG AGA TTC TCT GGG TGA CAG T-3'	51pb	60°C
Défensine Defcr4	5'-TGG CCT CCA AAG GAG ATA GAC A-3' 5'-AGG CTG ATC CTA TCC AAA ACA CA-3'	94pb	60°C
Reg3γ	5'-TTC CTG TCC TCC ATG ATC AAA A-3' 5'-CAT CCA CCT CTG TTG GGT TCA-3'	101pb	60°C

II.2.2. Quantification de l'IL-17 sérique par ELISA

A la mise à mort des souris le sang est prélevé sur tube sec par ponction intra-cardiaque et incubé 15 minutes à température ambiante. Après une centrifugation à 3000g pendant 10 minutes, le sérum est prélevé et conservé à -80°C jusqu'à utilisation. La cytokine IL-17 est quantifiée par ELISA (*BioLegend, USA*) selon les recommandations du fournisseur. Les échantillons ont été dilués au dixième dans un tampon adéquat fourni dans le kit. Les concentrations évaluables sont obtenues entre 7,8pg/ml et 1000pg/ml.

II.2.3. Quantification de la lipocaline-2 fécale par ELISA

Des selles des souris ont été prélevées à différents âges afin de quantifier la protéine lipocaline-2 par ELISA. Une fois prélevées, les selles sont immédiatement stockées dans l'azote liquide puis à -80°C jusqu'à l'extraction des protéines. Chaque selle est pesée puis broyée dans 1ml de PBS (Tampon Phosphate Salin) (*Gibco, UK*) contenant 0,1% de Tween 20 (*Fisher Scientific, USA*) et broyée à l'ultra-turrax (*IKA*). Les échantillons sont ensuite centrifugés à 12000rpm pendant 10 minutes et les surnageants sont stockés à -20°C. La lipocaline-2 est quantifiée par ELISA (*R&D systems, USA*). Les recommandations du fournisseur ont été suivies. Les échantillons ont été dilués au cinquantième dans un tampon de BSA (bovine serum albumin) (*Euromedex, Fr.*) à 1% dans du PBS. Les concentrations évaluables sont obtenues entre 7,8pg/ml et 1000pg/ml.

II.2.4. Analyses histologiques et immunologiques des intestins et des articulations

Les souris sont mises à mort par dislocation cervicale. Les chevilles sont prélevées, puis la peau et les muscles sont éliminés avant fixation dans du formol tamponné à 4% (*Labonord, Fr.*). Une partie de l'intestin grêle et du colon est également prélevée. Après un lavage au PBS, les échantillons digestifs sont fixés dans du formol tamponné à 4%.

Les chevilles sont décalcifiées dans l'EDTA (Acide Ethylène-Diamine-Tétraacétique) à 10% (*Sigma Aldrich, USA*) pendant deux mois. Les intestins et les chevilles sont ensuite déshydratés et inclus en paraffine. Les colorations et les marquages immunohistologiques sont effectuées sur des coupes de 5µm d'épaisseur.

II.2.4.1. Analyses hitologiques

Une coloration hématoxyline-éosine-safran (HES) a été réalisée sur les coupes d'intestins grêles, de colons et des articulations des souris. Cette coloration a permis d'observer

l'architecture des organes et la présence éventuelle de signes d'inflammation. Pour les intestins, l'infiltration de cellules immunitaires et la présence d'abcès cryptiques et d'ulcérations ont été prises en compte pour effectuer un score allant de 0 (structure normale) à 4 (intestin très inflammatoire). Une coloration au bleu alcian a également été effectuée afin d'évaluer la présence de mucus. Pour l'inflammation articulaire, l'hyperplasie de la membrane synoviale et l'infiltration cellulaire ont été observées. Les lames sont montées au Pertex® (*Histolab, Se.*). Les analyses sont effectuées en double insu par deux observateurs au microscope (*DMD108 Leica*).

II.2.4.2. Analyses immunohistologiques

Nous avons effectué des analyses immunohistologiques sur les intestins grêles et les articulations des souris afin de visualiser les cellules positives pour la cytokine IL-17. Pour ce faire, les échantillons sont préalablement incubés pendant 6 heures dans du tampon citrate 10mM, pH6 (*Zytomed systems, All.*) à 70°C, pour permettre une restitution antigénique. Les échantillons sont ensuite incubés dans du peroxyde d'hydrogène (*Zytomed systems, All.*) pendant 10 minutes pour éliminer les peroxydases endogènes, puis pendant 20 minutes dans du sérum de cheval (*Vector Labs, USA*) pour bloquer les sites aspécifiques. Les échantillons sont mis en contact d'un anticorps primaire polyclonal dirigé contre l'IL-17 (*Abbiotec, USA*) pendant toute la nuit (dilution au 200^{ème}). Le lendemain, après deux lavages au PBS, les échantillons sont incubés avec un anticorps secondaire dirigé contre la partie Fc des anticorps de lapin et couplé à l'enzyme HRP (Peroxydase de raifort) (*Vector Labs, USA*) pendant 30 minutes. La révélation est effectuée avec un chromogène AEC permanent (*Zytomed systems, All.*). Une contre-coloration à l'hématoxyline est effectuée et les lamelles sont montées au Pertex®. Les analyses sont effectuées en double insu par deux observateurs au microscope (*DMD108 Leica*).

II.2.5. Mesure de l'expression de médiateurs de l'inflammation dans l'intestin par RT-PCR quantitative

II.2.5.1. Extraction d'ARN

Immédiatement après la mise à mort des souris, une partie de l'intestin grêle et du colon de chaque souris est prélevée, lavée au PBS et conservée dans 1ml de trizolTM (*Qiagen, USA*). Les échantillons sont immédiatement placés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C. Après décongélation, les échantillons sont broyés dans 3ml de trizolTM à l'ultra-turrax puis centrifugés à 12000g pendant 10 minutes à 4°C. Un volume de 200µl de chloroforme (*Carlo Erba*

Reagents, Fr.) par millilitre de trizol™ est alors ajouté à chaque échantillon. Après une nouvelle centrifugation à 12000g pendant 15 minutes à 4°C, la phase aqueuse est isolée et 500µl d'isopropanol (*Carlo Erba Reagents, Fr.*) par millilitre de trizol™ sont ajoutés à chaque échantillon avant une incubation de 2 heures à -20°C. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 12000g pendant 10 minutes et le culot d'ARN est lavé deux fois à l'éthanol 70%. Les culots d'ARN sont brièvement séchés à l'air puis dissous dans de l'eau RNase free. La concentration d'ARN totaux est déterminée par spectrophotométrie au NanoDrop™ (*Thermo Scientific, USA*) à 260nm, avec une unité d'absorbance (abs) correspondant à 40µg/ml d'ARN. Les rapports abs 260/280 et abs 260/230 sont calculés et sont respectivement supérieurs à 1,8 et 1,7. Les ARN extraits sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

II.2.5.2. Transcription inverse

Une transcription inverse permettant la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) à partir des ARN est réalisée avec 2µg d'ARN totaux préalablement chauffés à 65°C pendant 5 minutes. Les ARN sont incorporés à un mélange contenant des amorces de séquences aléatoires de 6 nucléotides (0,2µg/µl), se fixant sur les brins d'ARN et permettant l'initiation de l'activité de l'ADN polymérase ARN-dépendante, M-MLV RT (200U) (*Invitrogen, USA*) qui, par ajout de dNTP, est à la base de la rétro-transcription, et des dNTP (5mM). Cette réaction est réalisée dans du tampon rétrotranscriptase 5x (250mM Tris-HCl, pH 8,3, 375mM KCL, 15mM MgCL₂) auquel est ajouté du DTT (dithiothréitol) (100mM). La réaction dure 1 heure et 30 minutes à 37°C, puis l'enzyme est inactivée par une augmentation de la température à 95°C pendant 10 minutes. Les échantillons sont conservés à -20°C, jusqu'à utilisation.

II.2.5.3. PCR quantitative

L'expression des gènes est mesurée par PCR quantitative. Pour cela, les ADNc dilués au 5^{ème} sont incorporés à un mélange contenant les amorces sens et antisens du gène d'intérêt (*Eurogentec, Be.*) (**Tableau 1**), de l'eau, et un mélange SYBR Green iTaq™ (*Bio-Rad, USA*) composé d'une ADN polymérase, du tampon de réaction, des dNTPs et de molécules fluorescentes (cyanines asymétriques), le SYBR Green. La réaction d'amplification est réalisée dans un thermocycleur (*Applied Biosystems Step One Plus*) programmé pour effectuer une étape initiale de dénaturation des brins d'ADN et d'activation de l'enzyme à 95°C, puis 40 cycles permettant l'amplification spécifique du gène d'intérêt. Chaque cycle est décomposé en une dénaturation des ADNc à 95° pendant 1 minute, suivie d'une hybridation des amorces et d'une élongation permettant la synthèse des brins complémentaires par l'ADN polymérase à 60°C.

L'expression des gènes d'intérêt est rapportée par rapport à celle d'un gène de référence invariant, S29. L'expression du gène d'intérêt est quantifiée grâce à la méthode du $\Delta\Delta C_t$. Une courbe de fusion est réalisée pour vérifier la spécificité de l'amplification.

II.2.6. Quantification des lymphocytes Th17 et T_{reg} et des cellules ILC3 dans la *lamina propria* des intestins et des ganglions par cytométrie en flux

II.2.6.1. Extraction des cellules

✧ Cellules des ganglions

Les ganglions mésentériques et poplités sont prélevés après mise à mort des souris et déposés dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) enrichi en glucose (*Gibco, UK*), supplémenté avec 10% de SVF (sérum de veau fœtal) (*Dutscher, Fr.*) et 1% de L-glutamine à 200mM (*Gibco, UK*). Les cellules sont extraites en broyant les ganglions sur un tamis cellulaire de 40 μ m. Les cellules sont récupérées dans un tube contenant 5ml de milieu, comptées au lecteur de cellules (*Bio-Rad, USA*) puis centrifugées à 350g pendant 10 minutes. Le culot est repris dans un volume adapté pour obtenir une concentration cellulaire de 4 millions par millilitre.

✧ Cellules de la *lamina propria*

Les intestins sont prélevés et les PP sont éliminées. Ils sont ensuite ouverts longitudinalement et lavés dans du PBS froid. La troisième étape consiste à incuber les intestins pendant 45 minutes dans du PBS auquel ont été ajoutés 30mM d'EDTA, à 4°C. Les intestins sont ensuite lavés plusieurs fois par agitation dans des bains de PBS puis subissent plusieurs digestions enzymatiques (3 pour les intestins grêles et 4 pour les colons). Lors de ces digestions, les intestins sont incubés pendant 20 minutes à 37°C dans du milieu DMEM (*Gibco, UK*) contenant deux enzymes, la libérase TL (*Roche, All.*) et la DNase (*Sigma, USA*). Chaque digestion s'effectue avec une concentration de 50 μ g/ml de libérase TL pour l'intestin grêle et de 75 μ g/ml pour le colon, associée dans les deux cas à une concentration de 2U/ml de DNase. Après chaque incubation, le surnageant est filtré à travers un filtre de 100 μ m et les cellules sont récupérées dans 5ml de milieu supplémenté avec 10% de SVF. Les cellules sont ensuite centrifugées à 350g pendant 10 minutes puis le culot est repris dans 5ml de PercollTM (*GE Healthcare, Fr.*) à 40%. Le même volume de PercollTM à 80% est glissé sous le PercollTM 40% grâce à une pipette Pasteur. Les cellules sont centrifugées à 2800rpm pendant 15 minutes. L'anneau de leucocytes est présent à l'interface entre les deux PercollTM. Ces cellules sont

recupérées, comptées au compteur de cellules et de nouveau centrifugées. Le culot cellulaire est finalement repris dans un volume de milieu adapté pour obtenir une concentration cellulaire à 4 millions par millilitre.

II.2.6.2. Marquage des cellules et analyse par cytométrie en flux

Le marquage des cellules s'effectue sur 1 million de cellules. Les cellules sont centrifugées à 350g pendant 5 minutes et sont lavées avec 200µl de PBS. Les cellules sont incubées pendant 15 minutes dans le noir à température ambiante dans 100µl de Zombie Aqua (*BioLegend, USA*), un marqueur de viabilité, dilué au 1000^{ème} dans du PBS. Les cellules sont ensuite centrifugées à 350g pendant 5 minutes et sont lavées avec 200µl de BSA à 1% dans du PBS. Un blocage des récepteurs Fc est réalisé par incubation des cellules dans 50µl de Fc block (*BioLegend, USA*) dilué au 50^{ème} pendant 15 minutes dans le noir à 4°C. Puis le marquage extracellulaire est effectué. Deux panels d'anticorps ont été réalisés au cours de cette étude, un panel permettant de quantifier les lymphocytes Th17 et ILC3 et un panel permettant la détection des lymphocytes T_{reg} (**Tableau 2**). Pour réaliser le marquage extracellulaire, les cellules sont incubées pendant 15 minutes dans le noir à 4°C avec un mélange de l'ensemble des anticorps détectant des protéines de surface (en rose dans le **tableau 2**). A la fin de l'incubation, les cellules sont centrifugées à 350g pendant 5 minutes et lavées avec 200µl de BSA à 1% dans du PBS. Elles sont ensuite incubées toute la nuit à 4°C dans un tampon de fixation (*ebioscience, USA*). Le lendemain, les cellules sont lavées avec 200µl de BSA à 1% dans du PBS puis deux fois avec un tampon de perméabilisation (*ebioscience, USA*). Puis elles sont incubées pendant 1 heure, à 4°C avec les anticorps marquant les protéines intra-nucléaires appropriées à chaque panel (en vert dans le **Tableau 2**). Après un lavage au tampon de perméabilisation, les cellules sont reprises dans 300µl de BSA à 1% dans du PBS et transférées dans des tubes adéquats pour le cytomètre en flux (*Beckman Coulter*). Les analyses sont effectuées grâce au logiciel Kaluza™.

Tableau 2 : Panels d'anticorps utilisés pour la détection des lymphocytes Th17 et T_{reg} et les cellules lymphoïdes ILC3 par cytométrie en flux

Panel de détection des ILC3				
Protéine	Fluorochrome	Hôte	Isotype	Fournisseur
CD45	BV421	Rat	IgGb, kappa	BioLegend
CD19	APC	Rat	IgG2a, kappa	BioLegend
IL7-Ra	PerCP-eFluor710	Rat	IgG2b	eBioscience
CD3	APCFire750	Rat	IgG2b, kappa	BioLegend
RORγt	PE	Rat	IgG2a	eBioscience
Panel de détection des Th17				
CD45	BV421	Rat	IgGb, kappa	BioLegend
CD19	APC	Rat	IgG2a, kappa	BioLegend
CD3	APCFire750	Rat	IgG2b, kappa	BioLegend
CD4	FITC	Rat	IgG2a, kappa	BioLegend
RORγt	PE	Rat	IgG2a	eBioscience
Panel de détection des T_{reg}				
CD45	BV421	Rat	IgGb, kappa	BioLegend
CD3	APCFire750	Rat	IgG2b, kappa	BioLegend
CD4	FITC	Rat	IgG2a, kappa	BioLegend
CD25	APC	Rat	IgG1, lambda	BioLegend
FoxP3	PE	Mouse	IgG1, kappa	BioLegend

II.2.7. Analyse du microbiote fécal par séquençage de l'ADN codant ARNr 16S

Les selles des souris ont été prélevées à l'âge de 7 semaines afin d'analyser leur microbiote par séquençage haut-débit de l'ADN codant l'ARNr 16S. Les étapes d'extraction de l'ADN, de séquençage haut-débit et d'analyse des données ont été effectuées par le Professeur Harry Sokol de l'institut Micalis. Une fois prélevées, les selles sont immédiatement stockées dans l'azote liquide puis à -80°C jusqu'à l'extraction des acides nucléiques. L'ADN génomique a été extrait à partir de 200mg de selles. Les acides nucléiques ont été précipités dans l'isopropanol pendant 10 minutes à température ambiante, puis incubés pendant 15 minutes sur glace avant centrifugation à 15000g pendant 30 minutes à 4°C. Les culots d'acides nucléiques ont été repris dans un tampon phosphate et de l'acétate de potassium. Un traitement

avec une RNase a ensuite été réalisé et l'ADN a été précipité puis culotté par centrifugation à 15000g pendant 30 minutes à 4°C. Les culots sont repris dans 100µl de tampon TE.

Un protocole de préparation d'une librairie d'amplicons 16S est appliqué (*Metabiote, GenoScreen, Fr.*) afin d'amplifier les fragments du gène de l'ARNr 16S contenant les régions hypervariables V3 et V4 (amorces 16S : sens 5'-TACGGRAGGCAGCAG-3' et antisens 5'-CTACCNGGGTATCTAAT-3'). Au cours de ce protocole, la PCR du gène de l'ARNr 16S est réalisée avec 5ng d'ADN génomique et 192 amorces (*Metabiote MiSeq Primers*) utilisées à une concentration finale de 0,2µM. 30 cycles de PCR sont effectués avec une température d'hybridation de 50°C. Les produits de PCR sont ensuite purifiés grâce au kit Agencourt® AMPure® XP (*Beckman Coulter, USA*). Le séquençage est effectué en utilisant un protocole de séquençage de 300 paires de bases appariées sur la la plateforme Illumina Miseq™ (*Illumina, USA*).

Pour le traitement des données, les séquences sont démultiplexées, filtrées selon la qualité à l'aide d'un logiciel « quantitative insights into microbial ecology » (QIIME, version 1.9.1) et les lectures Illumina sens et antisens sont ajoutées grâce à la méthode fast-join (<http://code.google/p/ea-utils>). Les séquences sont assignées aux OTUs (Operational Taxonomic Unit) en utilisant le logarithme UCLUST avec un seuil d'identité des paires de 97% et classées par taxon en utilisant la base de données de référence Greengenes. Une raréfraction a été effectuée (25000 séquences par échantillon) et utilisée pour comparer l'abondance des OTU dans les échantillons. Les analyses en composante principale de la distance Unifrac non pondérée avec chaque échantillon, colorées selon le phénotype de la pathologie sont construites et utilisées pour évaluer la variation entre les groupes expérimentaux. Le nombre d'espèces observées est calculé en utilisant les données raréfiées et il est utilisé pour caractériser la diversité des espèces dans une communauté. L'analyse différentielle est réalisée en utilisant l'analyse discriminante linéaire.

II.2.8. Analyse des conséquences du transfert du microbiote fécal des souris $\text{PPAR}\gamma^{+/+}$ et $\text{PPAR}\gamma^{-/-}$ sur le développement d'une AIC

Pour cette étude six groupes de 7 souris mâles DBA/1 âgées de 7 semaines (*Janviers lab, Fr.*) ont été constitués (**Tableau 3**). Le schéma expérimental est résumé en **figure 31**.

Tableau 3 : Composition des groupes de souris pour l'analyse de l'impact du microbiote intestinal des souris $\text{PPAR}\gamma^{+/+}$ et $\text{PPAR}\gamma^{-/-}$ sur le développement d'une arthrite au collagène de type 2 bovin

	Antibiothérapie	Arthrite	Gavage
Groupe saines + PBS	Non	Non	PBS
Groupe saines + antibiothérapie + PBS	Oui	Non	PBS
Groupe arthritiques + PBS	Non	Oui	PBS
Groupe arthritiques + antibiothérapie + PBS	Oui	Oui	PBS
Groupe arthritiques + antibiothérapie + selles des souris $\text{PPAR}\gamma^{+/+}$	Oui	Oui	Selles des souris $\text{PPAR}\gamma^{+/+}$
Groupe arthritiques + antibiothérapie + selles des souris $\text{PPAR}\gamma^{-/-}$	Oui	Oui	Selles des souris $\text{PPAR}\gamma^{-/-}$

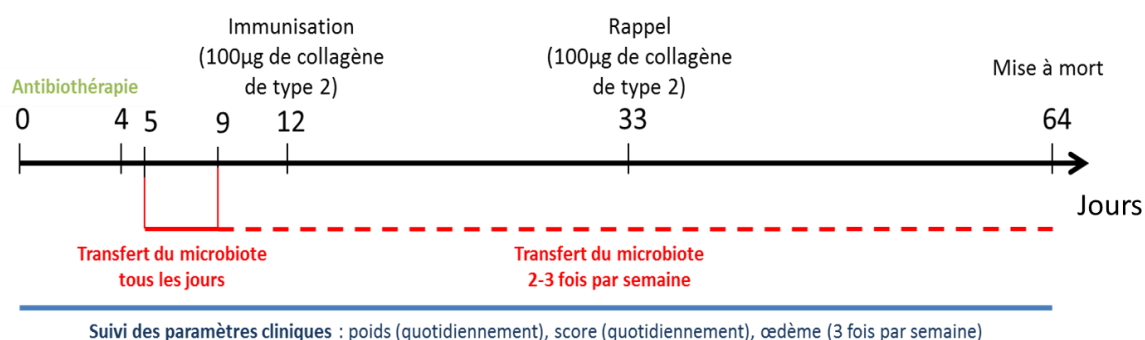


Figure 31 : Illustration du schéma expérimental nous ayant permis d'analyser des conséquences du microbiote des souris $\text{PPAR}\gamma^{+/+}$ et $\text{PPAR}\gamma^{-/-}$ sur le développement d'une arthrite induite au collagène de type 2 bovin

II.2.8.1. Antibiothérapie

Les souris ont été traitées avec un cocktail d'antibiotiques composé de néomycine (1g/l) (*Sigma, USA*), de métronidazole (1g/l) (*Sigma, USA*) et de vancomycine (0,5g/l) (*Sandoz, Fr.*). Les antibiotiques sont dissous dans l'eau de boisson des souris et un édulcorant (2g/l) (*Sigma, USA*) est ajouté pour appater les souris. L'eau de boisson est changée quotidiennement. Le traitement a été effectué pendant 4 jours.

II.2.8.2. Transfert du microbiote fécal

Les selles des souris $\text{PPAR}\gamma^{+/+}$ et $\text{PPAR}\gamma^{-/-}$ sont fraîchement collectées le jour du transfert de microbiote. Une selle par souris gavée est prélevée, soit 7 selles de souris $\text{PPAR}\gamma^{+/+}$ et 7 selles de souris $\text{PPAR}\gamma^{-/-}$. L'ensemble des selles provenant des souris $\text{PPAR}\gamma^{+/+}$ ou $\text{PPAR}\gamma^{-/-}$ est broyé dans 1ml de PBS stérile. Le broyat est ensuite centrifugé à 800g pendant 3 minutes. Le surnageant est prélevé et le transfert de microbiote s'effectue avec 100 μ l de celui-ci. Les souris ne subissant pas de transfert de microbiote sont gavées avec 100 μ l de PBS.

Le premier transfert de microbiote a lieu 24 heures après la fin de l'antibiothérapie. Le transfert de microbiote est quotidien pendant 4 jours, puis il est réalisé 2 à 3 fois par semaine jusqu'à la mise à mort des souris (**Figure 31**).

II.2.8.3. Induction de l'arthrite au collagène de type 2 bovin et suivi des paramètres cliniques

L'arthrite a été induite 8 jours après l'arrêt de l'antibiothérapie par injection intra-dermique (base de la queue) de 100 μ l d'une suspension à 2mg/ml de collagène de type 2 bovin (*mbdioproducts, USA*) dans l'acide acétique 100mM émulsifiée, volume à volume, dans l'adjuvant complet de Freund. Une deuxième injection de 100 μ l d'une suspension à 2mg/ml de collagène de type 2 bovin émulsifiée, volume à volume, dans l'adjuvant incomplet de Freund a été effectuée par injection intra-dermique 21 jours après l'induction de l'arthrite. Ces injections ont été réalisées sous anesthésie à l'isoflurane.

Chaque jour les souris ont été pesées et la sévérité de l'arthrite a été évaluée grâce à un score, préalablement validé selon les critères indiqués dans le **tableau 4**, allant de 0 à 4 pour chaque patte (score maximal = 16 par souris). Le volume de l'œdème des pattes arrière a été mesuré par plethysmographie trois fois par semaine. Le volume des pattes mesuré avant l'induction de l'arthrite, a été utilisé comme valeur de référence.

Tableau 4 : Score clinique d'évaluation de la sévérité d'une arthrite expérimentale (par patte)

Symptômes inflammatoires	Score
Normal (pas de rougeur ni de gonflement)	0
Rougeur et léger gonflement de la patte ou gonflement d'un ou deux doigt(s)	1
Plus de trois doigts inflammatoires ou un gonflement modéré de la patte accompagnée d'une rougeur	2
Gonflement marqué s'étalant de la cheville au tarse ou du poignet au métacarpe accompagné d'une rougeur	3
Gonflement sévère avec rougeur s'étalant sur l'ensemble de la patte	4

Le souris ont été mises à mort 68 jours après le début de l'antibiothérapie et les populations cellulaires Th17, ILC3 et T_{reg} de la *lamina propria* de l'intestin grêle, des ganglions mésentériques et des ganglions poplités ont été quantifiées par cytométrie en flux, suivant le protocole décrit au point II.2.6.

II.3. Résultats

II.3.1. Conséquences de l'invalidation du récepteur PPAR γ sur l'homéostasie intestinale chez la souris

II.3.1.1. L'invalidation du récepteur PPAR γ n'induit pas spontanément le développement d'une inflammation intestinale

Nous avons, dans un premier temps, observé les conséquences de l'invalidation du récepteur PPAR γ sur la structure de l'intestin grêle et du colon. Les analyses histologiques n'ont pas révélé de lésions au niveau du jéjunum, de l'iléon et du colon des souris PPAR $\gamma^{-/-}$, ni de signe d'inflammation majeur quel que soit l'âge des souris (**Figure 32A**). L'expression des gènes de l'inflammation KC et l'IL-17A, quantifiée par RT-PCR quantitative (**Figure 32B**), est similaire dans l'intestin grêle et le colon des souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$.

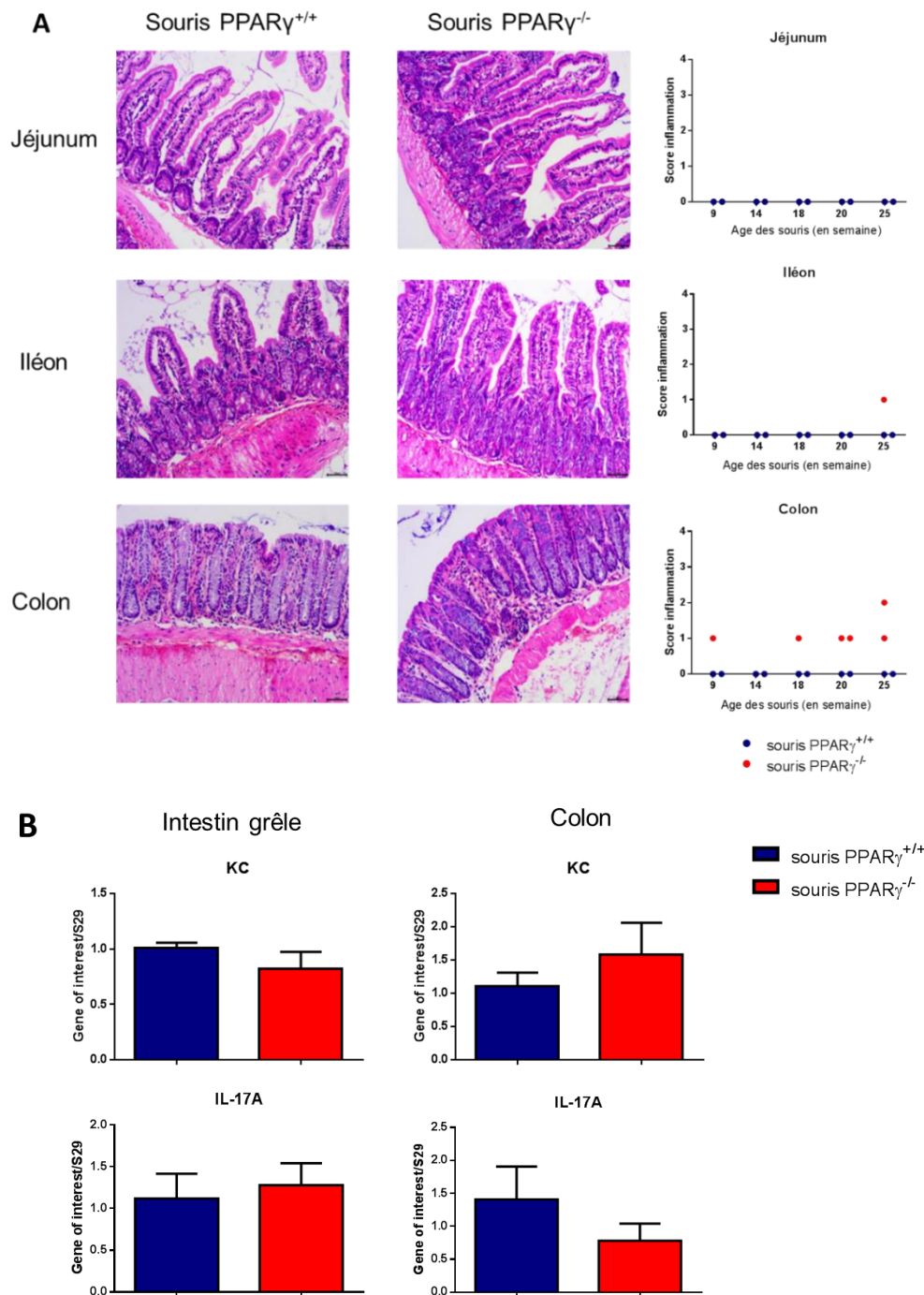


Figure 32 : Conséquences de l'invalidation du récepteur $PPAR\gamma$ sur la structure de l'intestin grêle et du colon et l'expression de médiateurs de l'inflammation.

Une coloration HES a été effectuée sur des coupes d'intestins grêles et de colons de souris $PPAR\gamma^{+/+}$ et $PPAR\gamma^{-/-}$ âgées de 9, 14, 18, 20 et 25 semaines afin de visualiser la structure de ces organes et de détecter des signes d'inflammation (Grossissement X20). Un score allant de 0 (intestin normal) à 4 (intestin très inflammatoire) a été établi (A).

L'expression des gènes de l'inflammation KC et IL-17A a été mesurée par RT-PCR quantitative dans l'intestin grêle et le colon de souris $PPAR\gamma^{+/+}$ et $PPAR\gamma^{-/-}$ âgées de 16 semaines (B) (n=5). Les résultats de RT-PCR quantitative correspondent à la moyenne $\pm$ SEM. Une différence significative entre les souris $PPAR\gamma^{+/+}$ et $PPAR\gamma^{-/-}$ est indiquée par un astérisque (*= p<0,05).

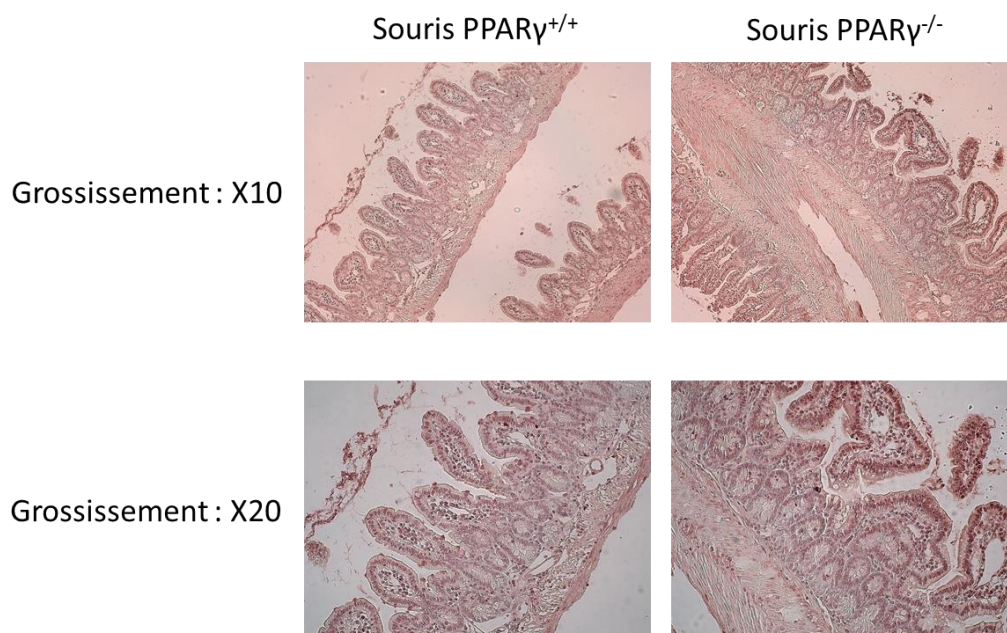


Figure 33 : **Détection de cellules exprimant l'IL-17 dans l'intestin grêle des souris PPAR γ ^{+/+} et PPAR γ ^{-/-}**

Un marquage immunohistochimique avec un anticorps primaire anti-IL-17 a été effectué sur des coupes d'intestins grêles de souris PPAR γ ^{+/+} et PPAR γ ^{-/-} afin de visualiser les cellules sécrétant de l'IL-17 et de les identifier. Les coupes ont été observées en microscopie aux grossissements X10 et X20.

Par analyse immunohistochimique, nous avons observé la présence de la cytokine IL-17 dans l'intestin grêle (**Figure 33**). Ce marquage est présent de façon comparable chez les souris PPAR γ ^{+/+} et PPAR γ ^{-/-}.

II.3.1.2. L'invalidation du récepteur PPAR γ modifie les populations des cellules immunitaires dans l'intestin grêle

Nous nous sommes intéressés aux populations cellulaires ILC3, Th17 et T_{reg} présentes dans les *lamina propria* de l'intestin grêle et du colon, ainsi que dans les ganglions mésentériques des souris PPAR γ ^{+/+} et PPAR γ ^{-/-}. Ces populations ont été identifiées selon les schémas présentés en **Figure 34**. Nous avons dans un premier temps constaté que la *lamina propria* de l'intestin grêle des souris PPAR γ ^{-/-} est plus riche en lymphocytes que celles des souris PPAR γ ^{+/+} (**Figure 35A**). En effet, elle contient en moyenne 4 fois plus de lymphocytes que celle des souris PPAR γ ^{+/+}. En revanche, un nombre similaire de lymphocytes est présent dans la *lamina propria* du colon des souris PPAR γ ^{+/+} et PPAR γ ^{-/-} ainsi que dans leurs ganglions mésentériques (**Figures 35B et C**).

Nous avons ensuite observé que la proportion de cellules ILC3 est plus importante dans la *lamina propria* de l'intestin grêle des souris PPAR γ ^{-/-} que des souris PPAR γ ^{+/+} (**Figure 36A**).

En revanche, il n'existe pas de différence dans la *lamina propria* du colon ainsi que dans les ganglions mésentériques (**Figures 36B et C**). La proportion de lymphocytes Th17 est moins importante dans la *lamina propria* de l'intestin grêle des souris PPAR $\gamma^{-/-}$ que des souris sauvages (**Figure 37A**). Ces lymphocytes sont présents de façon comparable dans les ganglions mésentériques (**Figure 37B**). Nous n'avons pas détecté de lymphocytes Th17 dans la *lamina propria* du colon des souris PPAR $\gamma^{+/+}$, ni des souris PPAR $\gamma^{-/-}$. Les lymphocytes T_{reg}, sont davantage représentés dans les *lamina propria* de l'intestin grêle et du colon des souris PPAR $\gamma^{-/-}$ que des souris PPAR $\gamma^{+/+}$ (**Figures 38A et B**). Ces lymphocytes sont en revanche présents de façon similaire dans les ganglions mésentériques dans les deux groupes de souris (**Figure 38C**).

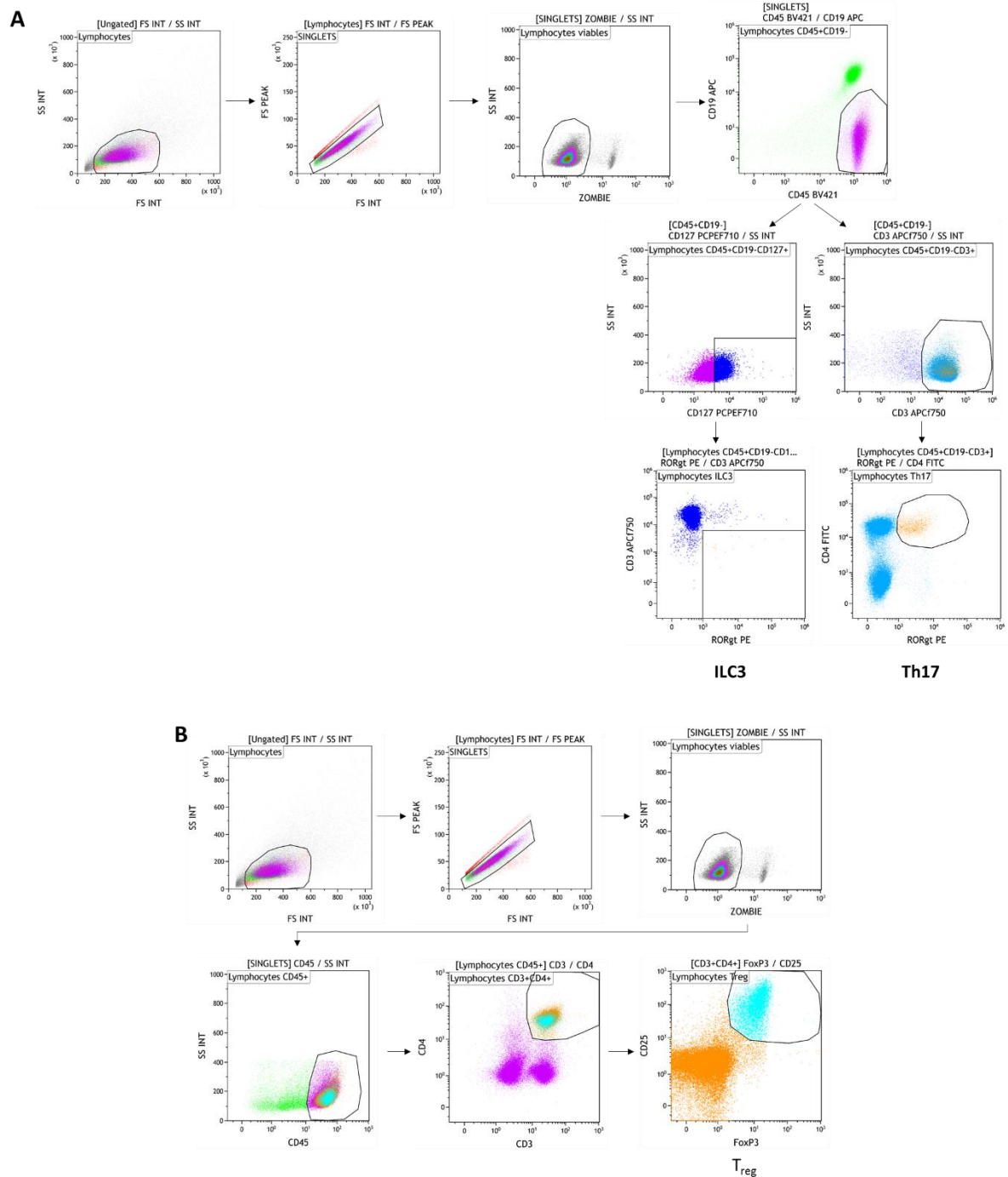


Figure 34 : **Stratégies d'analyse des populations cellulaires ILC3, Th17 et T_{reg}**

Les lymphocytes des *lamina propria* de l'intestin grêle et du colon ainsi que des ganglions mésentériques des souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ ont été identifiés par cytométrie en flux selon les stratégies présentées en **A** pour les cellules ILC3 et les lymphocytes Th17 et en **B** pour les lymphocytes T_{reg}.

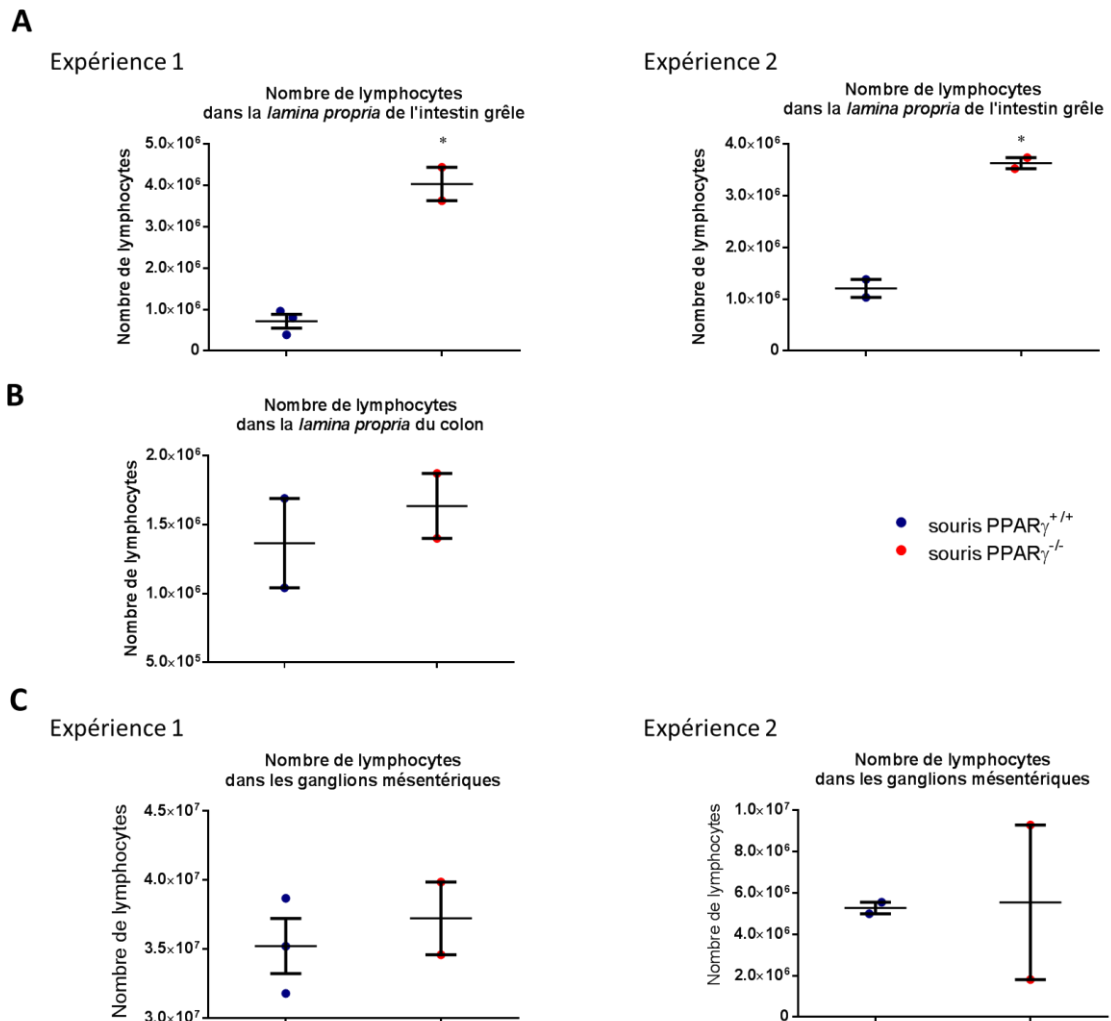


Figure 35 : Conséquences de l'invalidation du récepteur $\text{PPAR}\gamma$ sur le nombre de lymphocytes intestinaux et ganglionnaires.

Les lymphocytes $\text{CD45}^+\text{CD19}^-$ ont été dénombrés dans les *lamina propria* de l'intestin grêle (**A**) et du colon (**B**) ainsi que dans les ganglions mésentériques (**C**) des souris $\text{PPAR}\gamma^{+/+}$ et $\text{PPAR}\gamma^{-/-}$ par cytométrie en flux ($n=2-3$). Le dénombrement a été effectué sur deux groupes de souris pour l'intestin grêle et les ganglions mésentériques. Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM. Une différence significative entre les souris $\text{PPAR}\gamma^{+/+}$ et $\text{PPAR}\gamma^{-/-}$ est indiquée par un astérisque (* = $p < 0,05$).

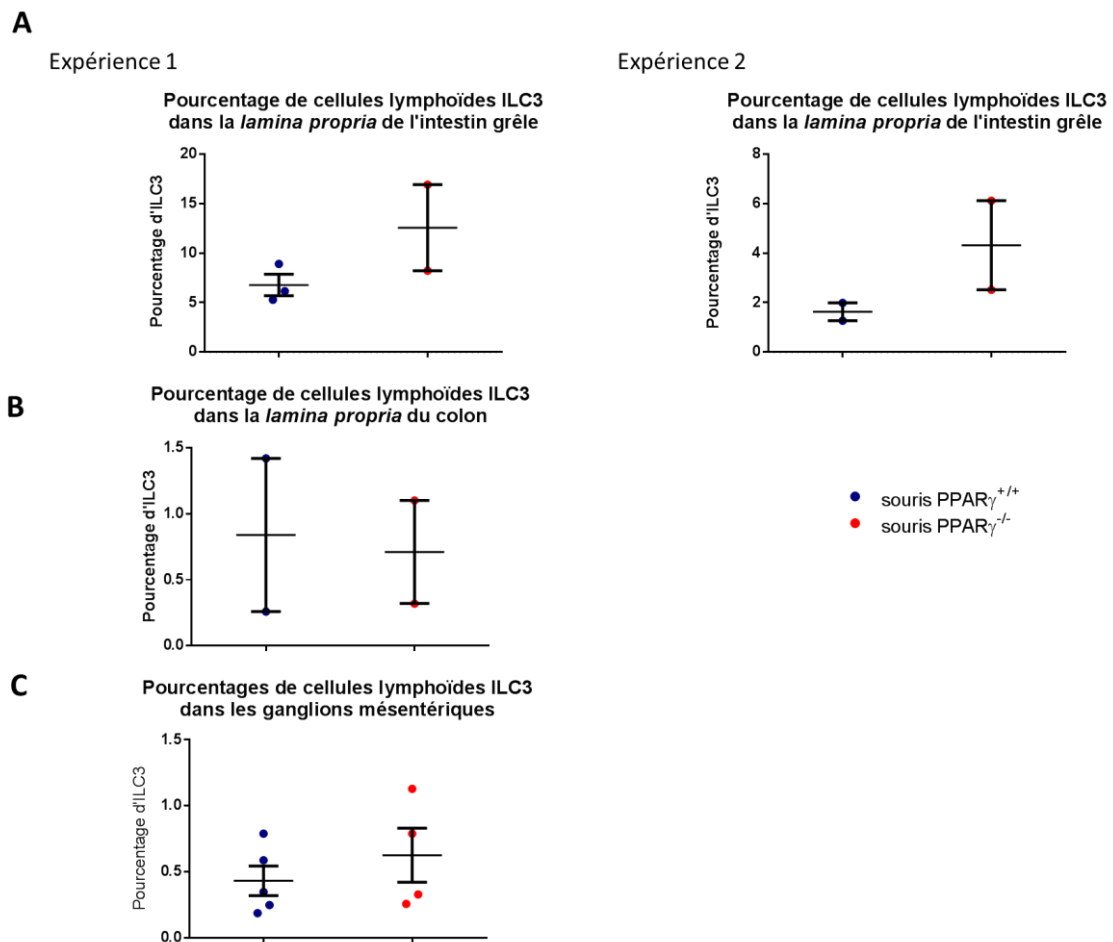


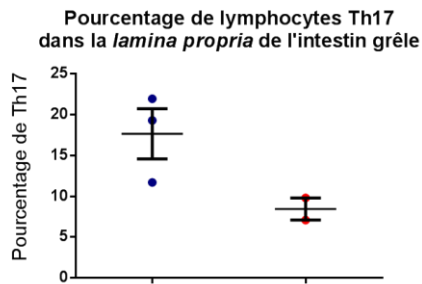
Figure 36 : Conséquences de l'inactivation du récepteur $PPAR\gamma$ sur la proportion de cellules lymphoïdes ILC3 dans les intestins et ganglions mésentériques.

La proportion de cellules lymphoïdes ILC3 parmi les lymphocytes $CD45^+CD19^-$ a été déterminée dans les *lamina propria* de l'intestin grêle (**A**) et du colon (**B**) ainsi que dans les ganglions mésentériques (**C**) des souris $PPAR\gamma^{+/+}$ et $PPAR\gamma^{-/-}$ par cytométrie en flux (n=2-3).

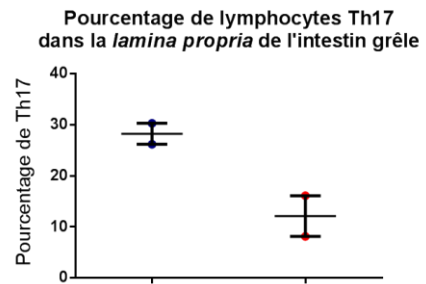
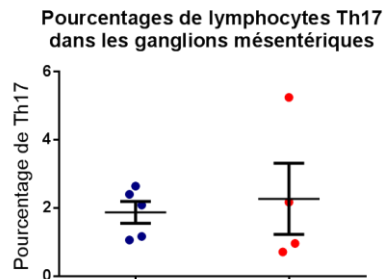
Cette analyse a été effectuée sur deux groupes de souris pour l'intestin grêle. Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM. Une différence significative entre les souris $PPAR\gamma^{+/+}$ et $PPAR\gamma^{-/-}$ est indiquée par un astérisque (*= p<0,05).

A

Expérience 1



Expérience 2

**B**

● souris PPAR $\gamma^{+/+}$
 ● souris PPAR $\gamma^{-/-}$

Figure 37 : Conséquences de l'inactivation du récepteur PPAR γ sur la proportion de lymphocytes Th17 dans les intestins et ganglions mésentériques.

La proportion de lymphocytes Th17 parmi les lymphocytes CD45⁺CD19⁻ a été déterminée dans les *lamina propria* de l'intestin grêle (**A**) ainsi que dans les ganglions mésentériques (**B**) des souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ par cytométrie en flux (n=2-3). Cette analyse a été effectuée sur deux groupes de souris pour l'intestin grêle. Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM. Une différence significative entre les souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ est indiquée par un astérisque (*= p<0,05).

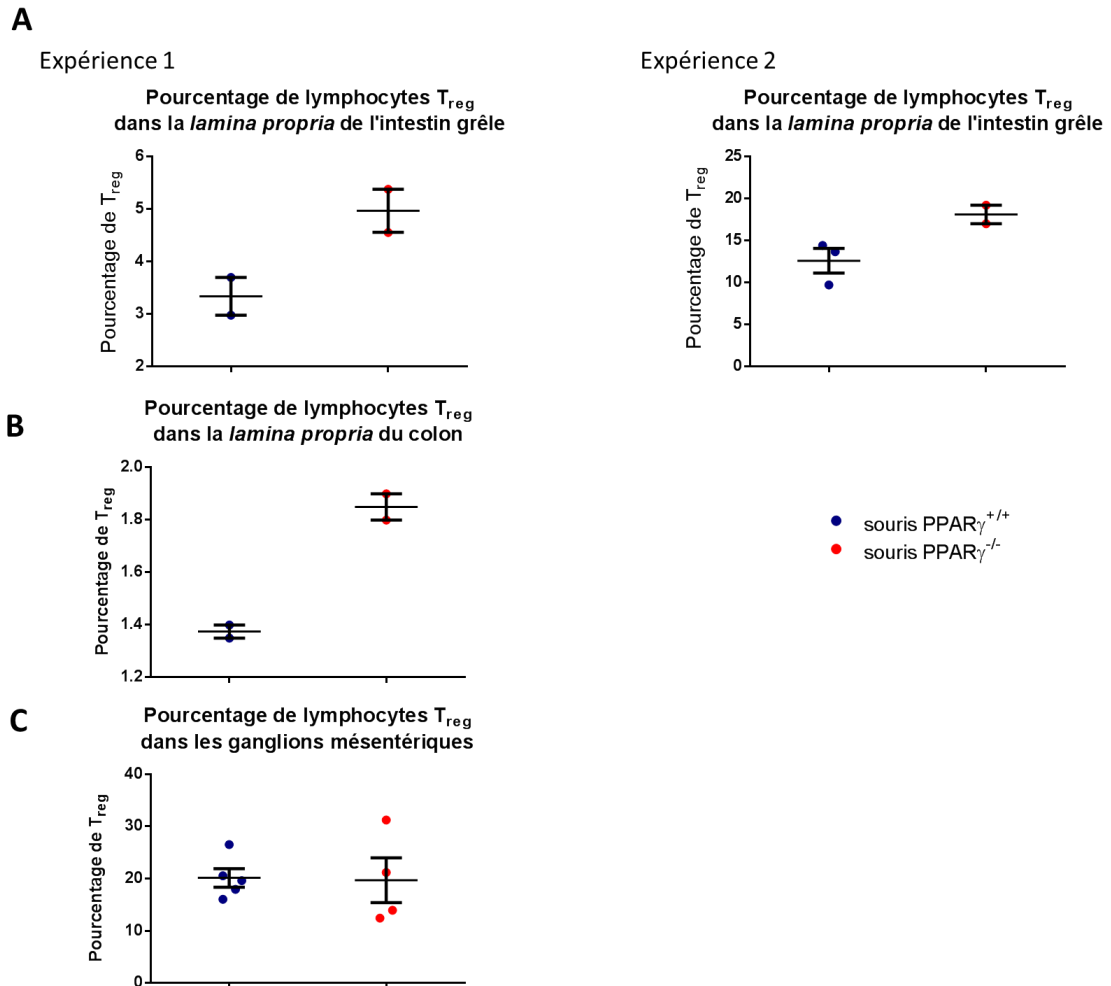


Figure 38 : Conséquences de l'invalidation du récepteur $PPAR\gamma$ sur la proportion de lymphocytes T_{reg} dans les intestins et ganglions mésentériques

La proportion de lymphocytes T_{reg} parmi les lymphocytes $CD45^+CD19^-$ a été déterminée dans les *lamina propria* de l'intestin grêle (**A**) et du colon (**B**) ainsi que dans les ganglions mésentériques (**C**) des souris $PPAR\gamma^{+/+}$ et $PPAR\gamma^{-/-}$ par cytométrie en flux (n=2-3). Cette analyse a été effectuée sur deux groupes de souris pour l'intestin grêle. Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM. Une différence significative entre les souris $PPAR\gamma^{+/+}$ et $PPAR\gamma^{-/-}$ est indiquée par un astérisque (*= p<0,05).

II.3.1.3. L'invalidation du récepteur PPAR γ modifie le microbiote fécal

L'analyse du microbiote fécal des souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ âgées de 7 semaines a montré que les souris PPAR $\gamma^{-/-}$ ont un nombre d'espèces bactériennes significativement moins importants que les souris PPAR $\gamma^{+/+}$ (**Figure 39A**). Nous avons évalué l' α -diversité grâce à l'indice de diversité de Shannon. Cet indice est la somme de la proportion de chaque espèce par rapport au nombre total des espèces présentes dans l'échantillon analysé ; il prend en compte le nombre d'espèces bactériennes et leur abondance. L' α -diversité est réduite chez les souris PPAR $\gamma^{-/-}$ par rapport aux souris PPAR $\gamma^{+/+}$ (**Figure 39B**).

Nous nous sommes également intéressés à la β -diversité qui représente le degré de similitudes (ou de différences) dans la composition bactérienne entre les échantillons étudiés. Nous avons observé que la β -diversité est différente entre les souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ (**Figure 39C**).

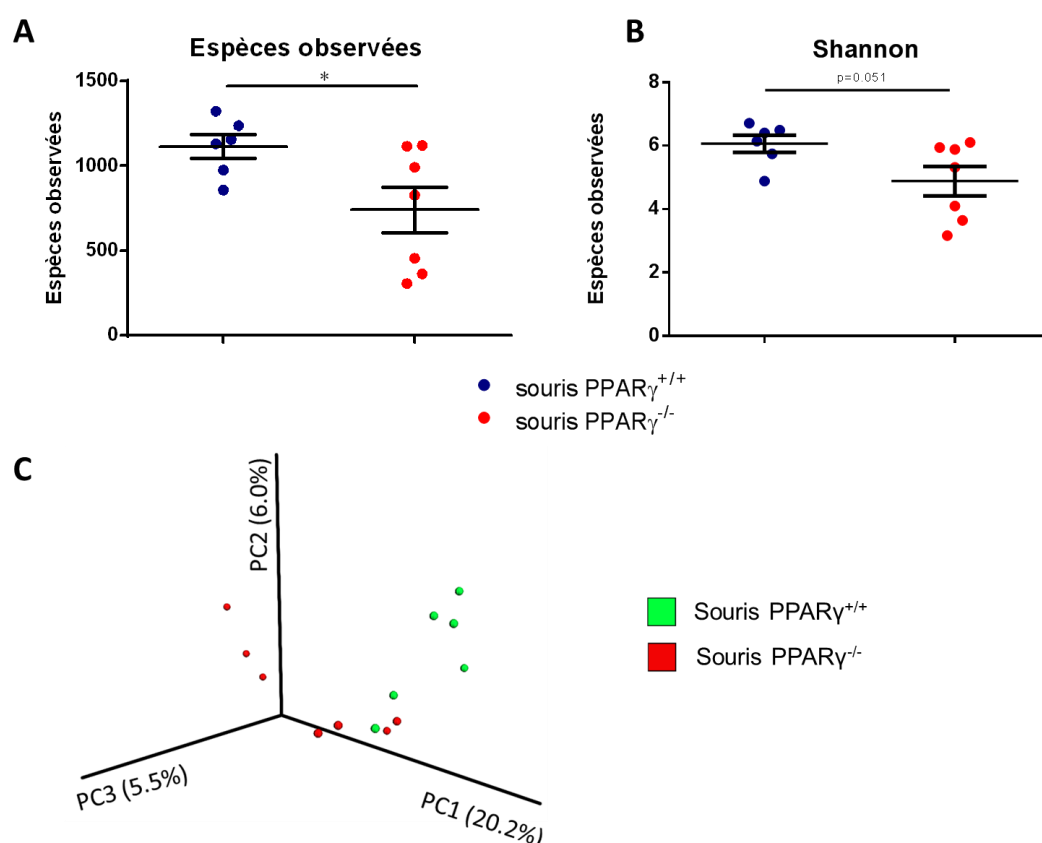


Figure 39 : Conséquences de l'invalidation du récepteur PPAR γ sur le microbiote fécal.

Le microbiote fécal a été analysé par séquençage haut-débit du gène de l'ARNr 16S. Le nombre d'espèces bactériennes a été quantifié (**A**) et l' α -diversité a été évaluée grâce à l'indice de diversité de Shannon dans les selles de souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ âgées de 7 semaines (**B**) (n=5-7). La β -diversité a été mesurée dans les selles des mêmes souris (**C**) (n=6-7). Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM. Une différence significative entre les souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ est indiquée par un astérisque (*= $p<0,05$).

L'analyse de la composition du microbiote fécal des souris $PPAR\gamma^{+/+}$ et $PPAR\gamma^{-/-}$ confirme qu'il est dominé par trois phyla bactériens, les Firmicutes, les Protéobactéries et les Bacteroidetes (**Figure 40A**). Cependant, des différences marquantes ont été observées (**Figures 40A et B**). Ainsi, la proportion de Firmicutes tend à être plus faible dans le microbiote fécal des souris $PPAR\gamma^{-/-}$ alors que celle des Bactéroidetes tend à être plus importante que chez les souris $PPAR\gamma^{+/+}$. Ces différences engendrent un ratio Bactéroidetes sur Firmicutes plus élevé chez les souris $PPAR\gamma^{-/-}$ (**Figure 40C**). En revanche, les proportions de Protéobactéries et d'Actinobactéries sont comparables entre les deux génotypes (**Figure 40B**). Le ratio Protéobactéries sur Firmicutes est légèrement plus élevé chez les souris $PPAR\gamma^{-/-}$ mais cette différence est majoritairement due à la baisse des Firmicutes (**Figure 40C**).

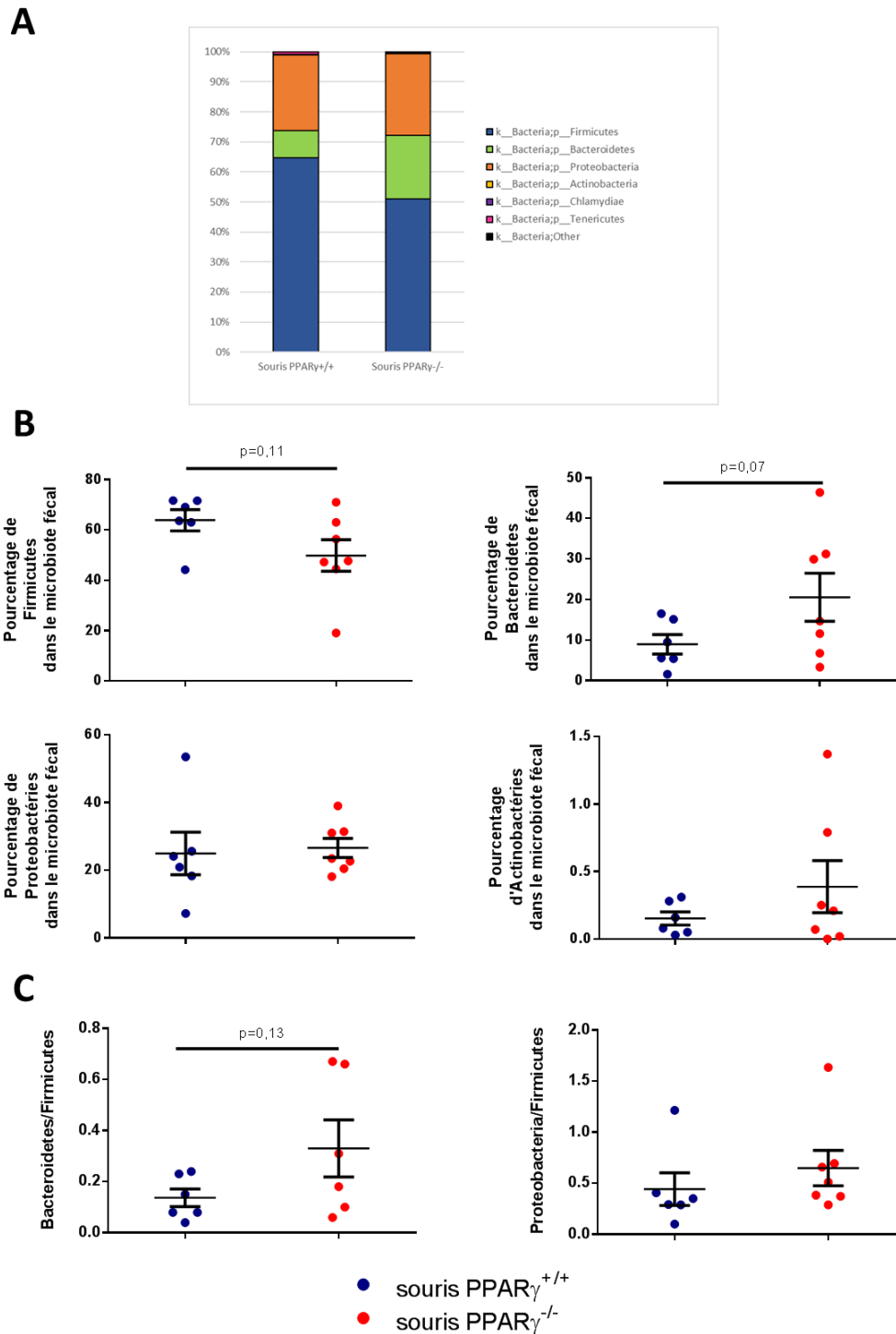


Figure 40 : Conséquences de l'inactivation du récepteur PPAR γ sur les phyla bactérien du microbiote fécal.

La composition du microbiote fécal a été analysée par séquençage haut-débit de l'ARNr 16S. La répartition des phyla bactériens (A) et la proportion de Firmicutes, de Bactéroidetes, de Protéobactéries et d'Actinobactéries (B) chez les souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ à l'âge de 7 semaines ont été étudiées. Les ratios entre les Bacteroidetes et les Firmicutes et entre les Protéobactéries et les Firmicutes ont été comparés entre les souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ (C).

L'analyse détaillée des taxons bactériens montre cependant des différences entre le microbiote fécal des souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et celui des souris PPAR $\gamma^{-/-}$ (**Figure 41**).

Ainsi, le genre *Ruminococcus* et des espèces appartenant à ce genre sont moins abondantes dans le microbiote fécal des souris PPAR $\gamma^{-/-}$ (**Figure 41**). D'autres taxons bactériens appartenant au phylum des Firmicutes sont également moins présents. C'est le cas de certains genres et de certaines espèces de la famille des Lachnospiraceae et de la famille des Mogibacteriaceae. Des taxons bactériens du phylum des Tenericutes sont également moins abondants dans le microbiote fécal des souris PPAR $\gamma^{-/-}$. C'est notamment le cas de l'ordre des Anaeroplasmatales, de la famille des Anaeroplasmataceae, du genre *Anaeroplasma* et de l'ensemble des espèces de ce genre. Enfin, l'ensemble des espèces bactériennes appartenant au genre Bifidobacteriaceae (taxon appartenant au phylum des Actinobactéries) est moins abondant chez les souris PPAR $\gamma^{-/-}$.

A l'inverse, certains taxons bactériens, appartenant principalement aux phyla des Protéobactéries et des Bacteroidetes, sont davantage représentés dans le microbiote fécal des souris PPAR $\gamma^{-/-}$. Dans le phylum des Protéobactéries, l'ordre des Enterobacteriales, appartenant à la classe des Gammaprotéobactéries, la famille des Enterobacteriaceae, l'ensemble des genres et des espèces appartenant à cette famille sont notamment plus abondants chez les souris PPAR $\gamma^{-/-}$. De même, la classe des Betaprotéobactéries, l'ordre des Burkholderiales, la famille des Alcaligenaceae, le genre des *Sutterella* et l'ensemble des espèces appartenant à ce genre sont davantage représentés. En ce qui concerne le phylum des Bacteroidetes, l'ensemble des familles, des genres et des espèces appartenant à l'ordre des Bacteroidales, et en particulier la famille des Bacteroidaceae, le genre des *Bacteroides* et l'ensemble des espèces de ce genre sont présents en plus grandes proportions dans le microbiote fécal des souris PPAR $\gamma^{-/-}$.

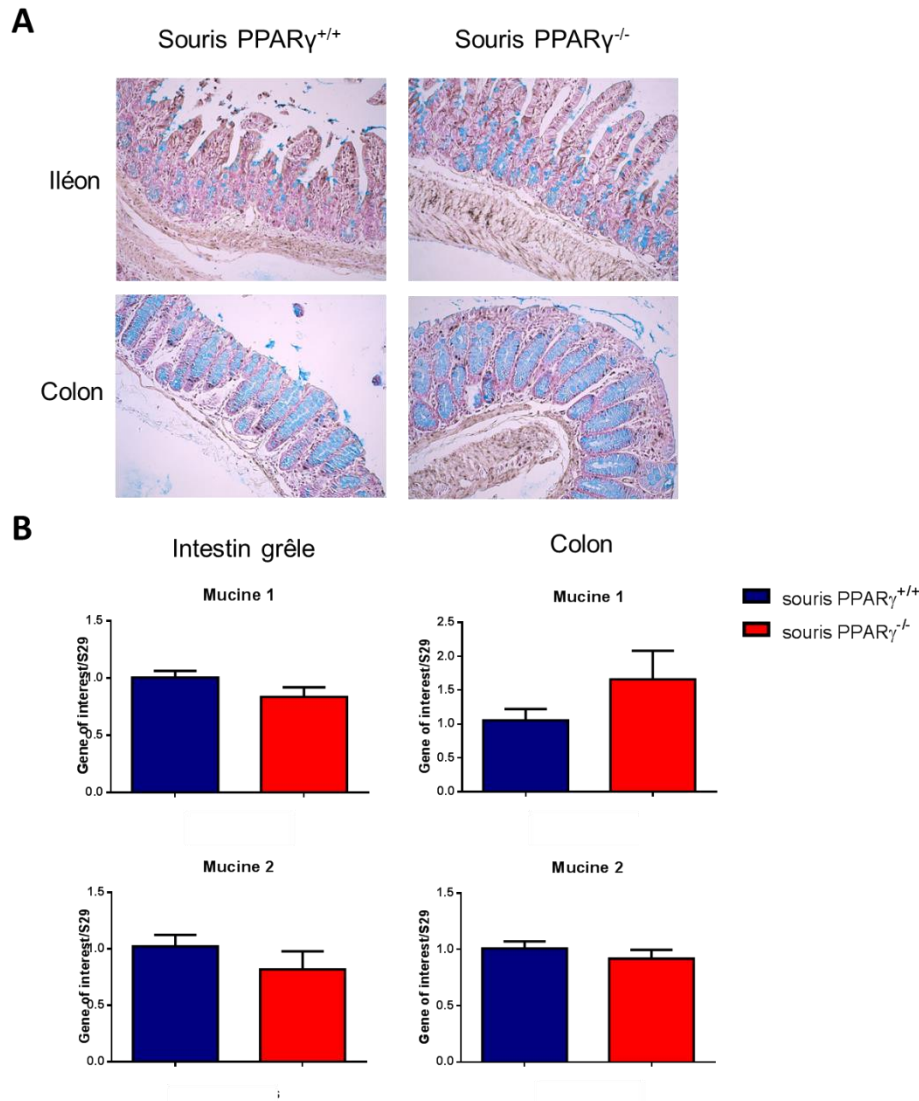


Figure 42 : Conséquences de l'inactivation du récepteur PPAR γ sur la production de mucus intestinal.

Une coloration bleue alcian a été effectuée sur des coupes d'intestins grêles et de colons de souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ âgées de 16 semaines afin de visualiser le mucus présent dans les cellules caliciformes (A). L'expression des gènes des mucines 1 et 2 a été mesurée par RT-PCR quantitative dans l'intestin grêle et le colon de souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ âgées de 16 semaines (B) (n=5). Les résultats de RT-PCR quantitative correspondent à la moyenne $\pm$ SEM. Une différence significative entre les souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ est indiquée par un astérisque (*= p<0,05).

En revanche, le profil d'expression des peptides antimicrobiens est différent entre l'intestin grêle et le colon chez les souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ (Figure 43A).

Les β -défensines Defb1 et Defb10 sont davantage exprimées dans l'intestin grêle des souris PPAR $\gamma^{-/-}$ (Figure 43A). L' α -défensine Defcr4 (Defensin alpha 4) a, quant à elle, une expression similaire dans l'intestin grêle des souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ tandis que la lectine

de type C Reg3 γ est significativement moins exprimée dans cet organe chez les souris PPAR $\gamma^{-/-}$.

Dans le colon, la β -défensine Defb1 et l' α -défensine Defcr4 ont une expression similaire chez les souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ (**Figure 43A**). La défensine Defb10 est en revanche significativement moins exprimée dans colon des souris PPAR $\gamma^{-/-}$ alors que la lectine de type C Reg3g semble augmentée.

La lipocaline-2 fécale augmente progressivement de l'âge de 7 semaines à l'âge de 17 semaines chez les souris PPAR $\gamma^{-/-}$ alors qu'elle varie peu chez les souris PPAR $\gamma^{+/+}$ (**Figure 43B**). Par conséquent, la concentration de lipocaline-2 fécale est plus importante chez les souris PPAR $\gamma^{-/-}$ que dans celles des souris PPAR $\gamma^{+/+}$, dès l'âge de 7 semaines et avec une amplitude maximale à l'âge de 17 semaines. Aux âges de 19 et 20 semaines, la concentration de cette protéine diminue dans les selles des souris PPAR $\gamma^{-/-}$ et se rapproche de celle des souris PPAR $\gamma^{+/+}$.

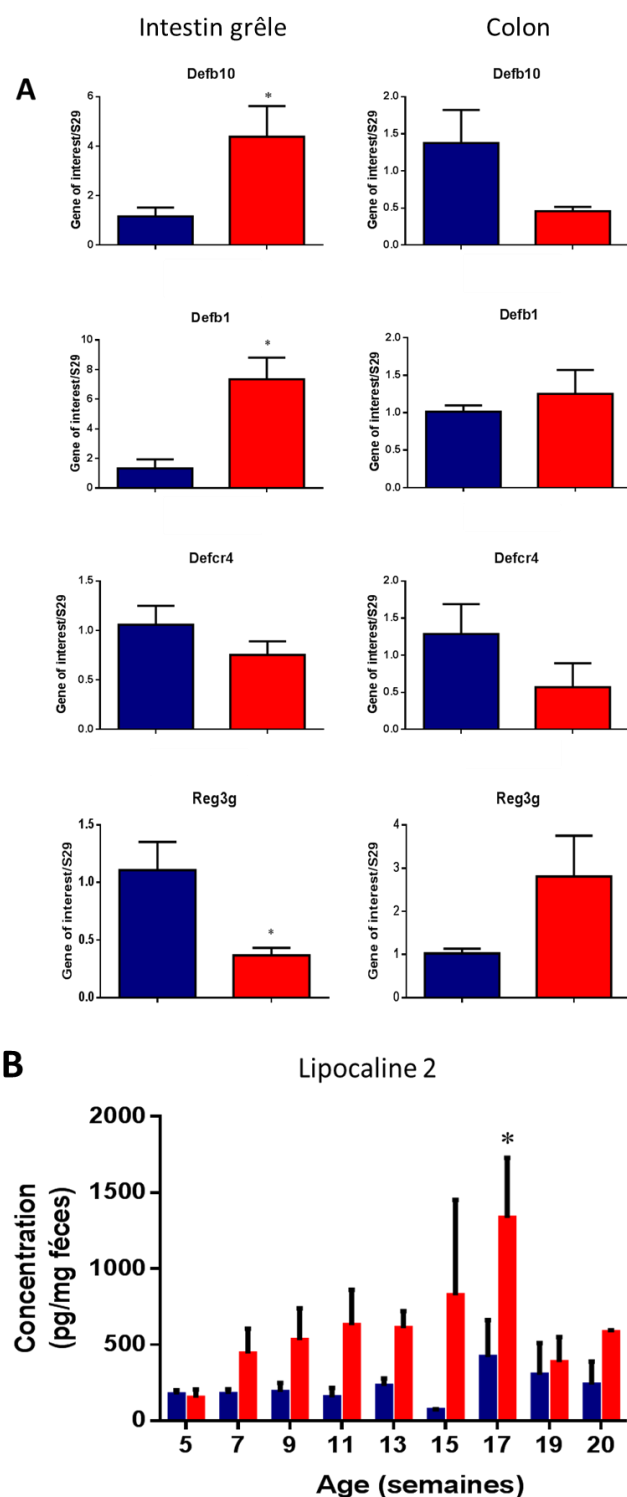


Figure 43 : Conséquences de l'inactivation du récepteur PPAR γ sur la production de peptides antimicrobiens intestinaux.

L'expression des gènes des peptides antimicrobiens defb1, defb10, defcr4 et Reg3g a été mesurée par RT-PCR quantitative dans l'intestin grêle et le colon de souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ âgées de 16 semaines (A) (n=5). La concentration en lipocaline-2 fécale a été quantifiée par ELISA (B). Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM. Une différence significative entre les souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ est indiquée par un astérisque (*= p<0,05).

II.3.2. Conséquences de l'invalidation du récepteur PPAR γ sur les articulations

II.3.2.1. L'invalidation du récepteur PPAR γ induit le développement d'une inflammation articulaire spontanée

Nous avons analysé et comparé la structure des articulations des souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ (**Figure 44**). Comme attendu, la moelle osseuse et la membrane synoviale des souris PPAR $\gamma^{-/-}$ sont dépourvues de tissu adipeux. Au sein de la membrane synoviale, le tissu adipeux est remplacé par un tissu conjonctif fibreux. Les articulations des souris PPAR $\gamma^{-/-}$, contrairement à celles des souris PPAR $\gamma^{+/+}$, présentent également un infiltrat de cellules immunitaires. Plusieurs types de cellules immunitaires sont retrouvés dans la membrane synoviale de ces souris, en particulier des mastocytes, des lymphocytes et des plasmocytes.

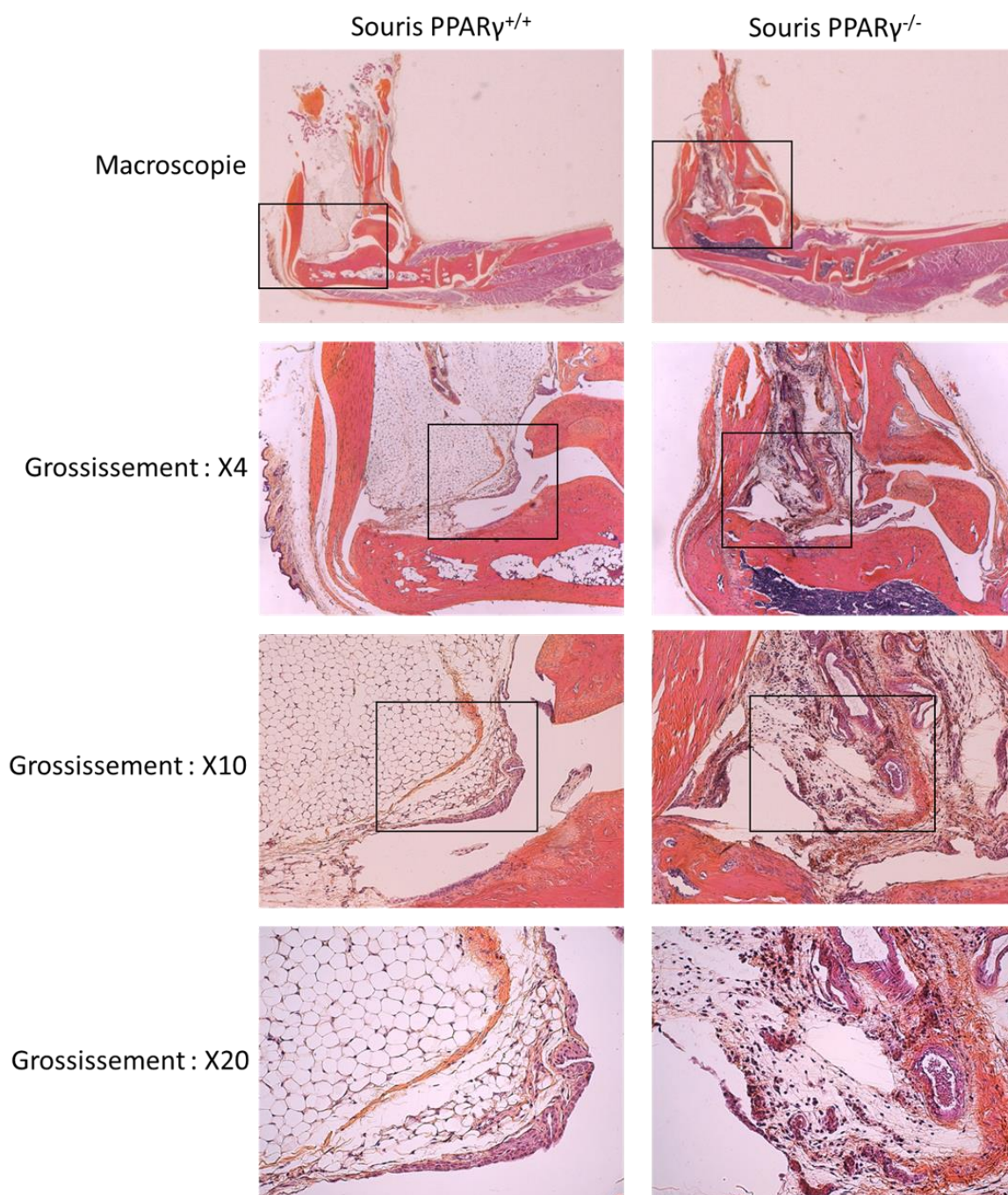


Figure 44 : **Conséquences de l'invalidation du récepteur PPAR γ la structure des articulations.**

Une coloration HES a été effectuée sur des coupes de chevilles de souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ afin de visualiser la structure des articulations et de détecter des signes d'inflammation. Les coupes ont été observées en macroscopie et en microscopie aux grossissements X4, X10 et X20.

Par analyse immunohistochimique, nous avons montré la présence de cellules productrices d'IL-17 dans les articulations des souris PPAR $\gamma^{-/-}$ (**Figure 45**). Ce marquage n'est pas retrouvé dans les articulations des souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et concerne principalement des mastocytes et quelques lymphocytes (**Figure 45**).

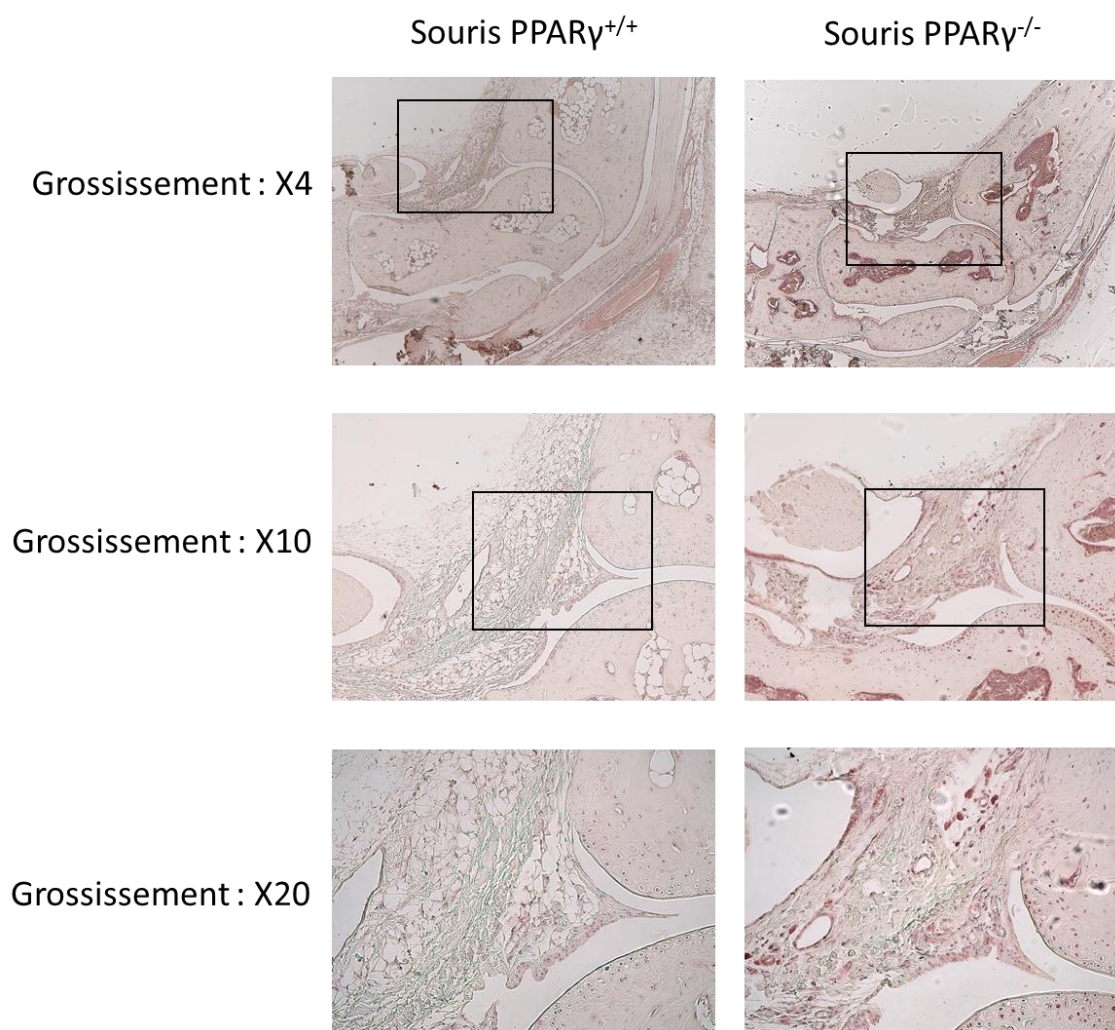


Figure 45 : **Détection de cellules exprimant l'IL-17 dans les articulations de souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$**

Un marquage immunohistochimique avec un anticorps primaire anti-IL-17 a été effectué sur des coupes de chevilles de souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ afin de visualiser les cellules sécrétant de l'IL-17 et de les identifier. Les coupes ont été observées en microscopie aux grossissements X4, X10 et X20.

II.3.2.2. L'invalidation du récepteur PPAR γ ne modifie pas les populations lymphocytaires dans les ganglions poplités

Nous avons quantifié, par cytométrie en flux, les lymphocytes totaux ainsi que les populations cellulaires ILC3, Th17 et T_{reg} dans les ganglions poplités des souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ (**Figure 46**). Nous avons montré que le nombre total de lymphocytes est comparable entre les deux groupes de souris (**Figure 46A**). Nous n'avons détecté aucune cellule ILC3 et la proportion de lymphocytes Th17 et T_{reg} n'est pas différente entre les souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ (**Figures 46B et C**).

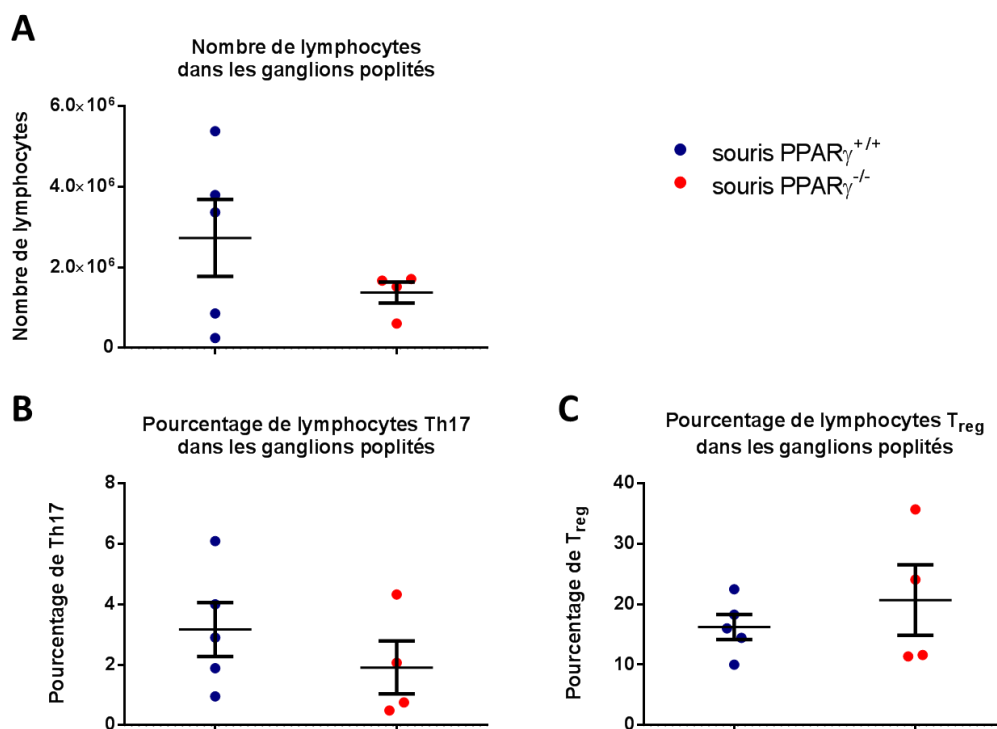


Figure 46 : **Conséquences de l'invalidation du récepteur PPAR γ sur les populations lymphocytaires dans les ganglions poplités**

Les lymphocytes totaux (**A**) et les proportions de lymphocytes Th17 (**B**) et T_{reg} (**C**) ont été quantifiés au sein des ganglions poplités des souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ par cytométrie en flux (n=4). Les résultats correspondent à la moyenne ± SEM. Une différence significative entre les souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ est indiquée par un astérisque (*= p<0,05).

II.3.2.3. L'invalidation du récepteur PPAR γ augmente le taux d'IL-17A sérique

Nous avons quantifié le taux circulant d'IL-17A chez les souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ (**Figure 47**). Les souris PPAR $\gamma^{-/-}$ ont des taux d'IL-17A circulant toujours supérieurs à ceux des souris sauvages, en particulier à partir de l'âge de 16 semaines.

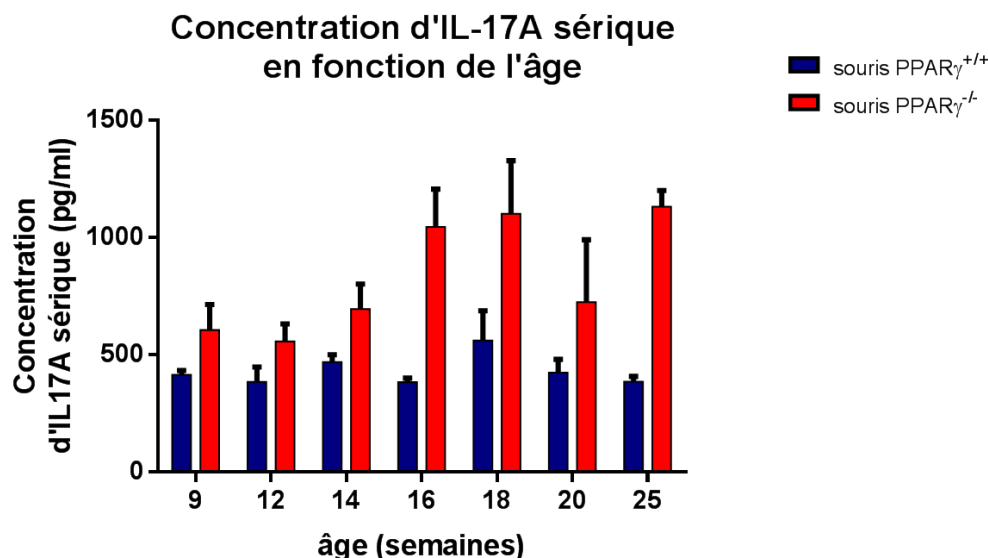


Figure 47 : Conséquences de l'inactivation du récepteur PPAR γ sur le taux d'IL-17A sérique.

Le taux d'IL-17A sérique des souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ a été quantifié par ELISA aux âges de 9, 12, 14, 16, 18, 20 et 25 semaines (n=2-5). Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM. Une différence significative entre les souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ est indiquée par un astérisque (*= p<0,05).

II.3.3. Conséquences du transfert du microbiote fécal des souris PPAR $\gamma^{-/-}$ chez des souris développant une arthrite au collagène de type 2

Comme il existe une dysbiose chez les souris PPAR $\gamma^{-/-}$ et qu'elles développent spontanément une inflammation articulaire, nous avons voulu savoir si leur microbiote avait des potentialités arthritogéniques. Dans ce but, nous avons transféré le microbiote fécal de souris PPAR $\gamma^{+/+}$ ou PPAR $\gamma^{-/-}$ à des souris sauvages DBA/1 susceptibles au développement de l'AIC. Après l'induction de l'arthrite nous avons suivi son développement puis nous avons évalué les populations lymphocytaires intestinales et ganglionnaires.

II.3.3.1. Evaluation de l'impact du transfert du microbiote fécal des souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ sur le développement d'une AIC

Nous avons, dans un premier temps, évalué l'impact du transfert du microbiote fécal sur l'incidence et la sévérité de l'AIC (**Figure 48**). Les souris chez lesquelles l'AIC n'a pas été induite (groupes « Saines + PBS » et « Saines + antibiothérapie + PBS ») ne présentent aucun signe d'inflammation articulaire et le volume de leurs pattes arrière reste identique à celui mesuré à J0 (**Figures 48B et C**). Dans les groupes chez lesquels l'AIC a été induite, l'incidence augmente progressivement au cours du temps, et 70% des souris ont développé une arthrite au moment de la mise à mort (52 jours après l'induction de l'arthrite) (**Figure 48A**). Le score

clinique moyen des souris appartenant au groupe « Arthritiques + PBS » est de $9,2 \pm 1,1$ au pic de l'inflammation (43 jours après l'induction de l'arthrite) ce qui témoigne d'une sévérité moyenne de l'arthrite (**Figure 48B**). Le traitement antibiotique, bien que terminé huit jours avant l'induction de l'arthrite, a des répercussions sur le développement de la pathologie (**Figures 48B et C**). En effet, il retarde l'apparition de l'arthrite d'environ 9 jours (premiers symptômes à J23 contre J14 dans le groupe sans antibiothérapie. D'autre part, le score clinique est toujours plus faible dans le groupe « Arthritiques + antibiothérapie + PBS » que dans le groupe « Arthritiques + PBS ».

Le transfert du microbiote fécal des souris $\text{PPAR}\gamma^{+/+}$ supprime l'impact de l'antibiothérapie sur la sévérité de l'arthrite (**Figures 48B et C**). Ainsi, au pic de l'inflammation articulaire (J43) le score arthritique moyen du groupe « Arthritiques + antibiothérapie + selles des souris $\text{PPAR}\gamma^{+/+}$ » est de $7,5 \pm 1,9$, ce qui est comparable à celui du groupe « Arthritiques + PBS » dont le score moyen à ce temps est de $6,5 \pm 1,8$, alors que le score moyen du groupe « Arthritiques + antibiothérapie + PBS » n'est que de $4,8 \pm 1,9$ (**Figure 48B**). L'œdème des pattes postérieures mesuré par plethysmographie montre des résultats similaires (**Figure 48C**).

Le transfert du microbiote fécal des souris $\text{PPAR}\gamma^{-/-}$ ne modifie pas l'impact de l'antibiothérapie (**Figures 48B et C**). En effet, au pic de l'inflammation articulaire, le score moyen du groupe « Arthritiques + antibiothérapie + selles des souris $\text{PPAR}\gamma^{-/-}$ » est de $4,7 \pm 1,9$, c'est-à-dire identique à celui des souris du groupe « Arthritiques + antibiothérapie + PBS » ($4,8 \pm 1,9$) (**Figure 48B**). Le volume moyen des pattes postérieures des souris de ces deux groupes est très proche (**Figure 48C**). Ainsi, les souris qui ont reçu les selles des souris $\text{PPAR}\gamma^{-/-}$ développent une arthrite moins sévère que celles qui ont reçu les selles des souris $\text{PPAR}\gamma^{+/+}$, même si cela doit être interprété en tenant compte de l'effet « anti-arthritique » de l'antibiothérapie.

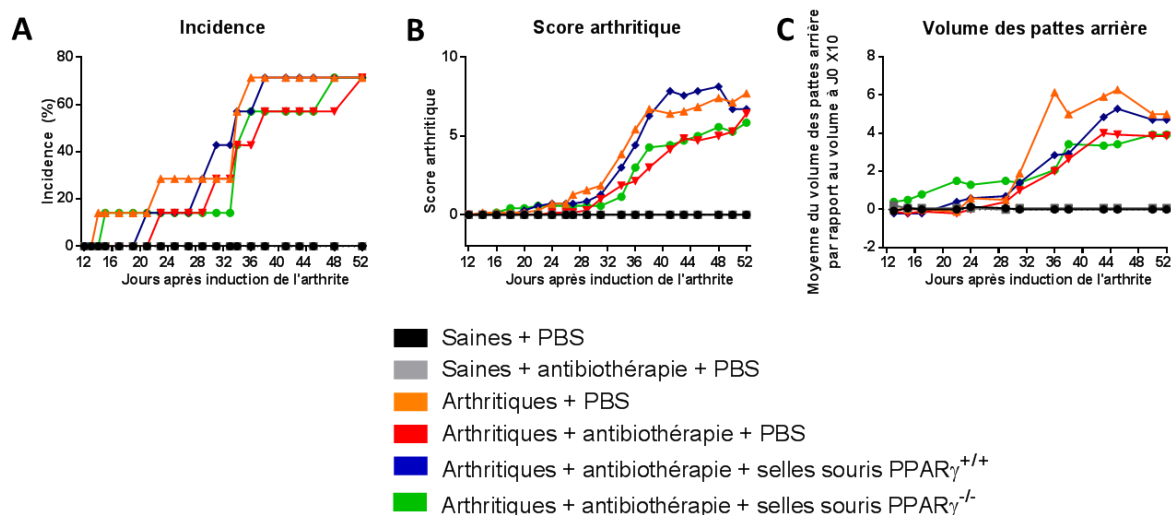


Figure 48 : **Conséquences du transfert du microbiote fécal de souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ sur l'incidence et la sévérité d'une AIC**

Le microbiote fécal de souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ a été transféré à des souris DBA/1 après une antibiothérapie. Une arthrite a ensuite été induite chez les souris DBA/1 et nous avons suivi l'incidence (**A**) et la sévérité de l'arthrite qualitativement grâce à un score clinique préalablement validé (**B**) et quantitativement par mesure du volume de l'œdème des pattes postérieures (**C**) (n=7). Les points correspondent à la moyenne de chaque groupe.

II.3.3.2. Impact du transfert du microbiote fécal des souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ sur les populations lymphocytaires des ganglions poplités

A la mise à mort des souris, soit 52 jours après l'induction de l'arthrite, nous avons quantifié le nombre de lymphocytes totaux ainsi que le nombre de cellules ILC3 et de lymphocytes Th17 et T_{reg} dans les ganglions poplités (**Figure 49**). Chez les souris saines, l'antibiothérapie ne modifie ni le nombre total de lymphocytes ni le nombre de lymphocytes ILC3, Th17 et T_{reg} (**Figure 49**).

Comme attendu, l'induction de l'arthrite provoque une augmentation du nombre de lymphocytes dans les ganglions poplités des souris (**Figure 49A**) : on dénombre en moyenne 1,2 millions de lymphocytes $\pm$ 580000 chez les souris saines et 6 fois plus de cellules chez les souris arthritiques. Le nombre de cellules ILC3 et de lymphocytes Th17 et T_{reg} est également augmenté chez les souris du groupe « Arthritiques + PBS » par comparaison aux souris saines (**Figures 49B, C et D**). Le traitement antibiotique diminue le nombre de cellules ILC3 et Th17 dans les ganglions poplités (**Figures 49B et C**), sans modifier le nombre de lymphocytes totaux et de lymphocytes T_{reg} (**Figures 49A et D**).

Les souris des groupes « Arthritiques + antibiothérapie + selles des souris PPAR $\gamma^{+/+}$ » et « Arthritiques + antibiothérapie + selles des souris PPAR $\gamma^{-/-}$ » ont un nombre similaire de lymphocytes totaux, de cellules ILC3, Th17 et T_{reg} et qui est identique à celui mesuré chez les

souris n'ayant pas reçu de transfert fécal (**Figure 49**). Par ailleurs, le profil lymphocytaire dans les ganglions mésentériques de ces deux groupes est semblable à celui des souris du groupe « Arthritiques + antibiothérapie + PBS ». Ainsi, le microbiote fécal des souris $PPAR\gamma^{+/+}$, comme celui des souris $PPAR\gamma^{-/-}$, ne corrige pas l'impact de l'antibiothérapie.

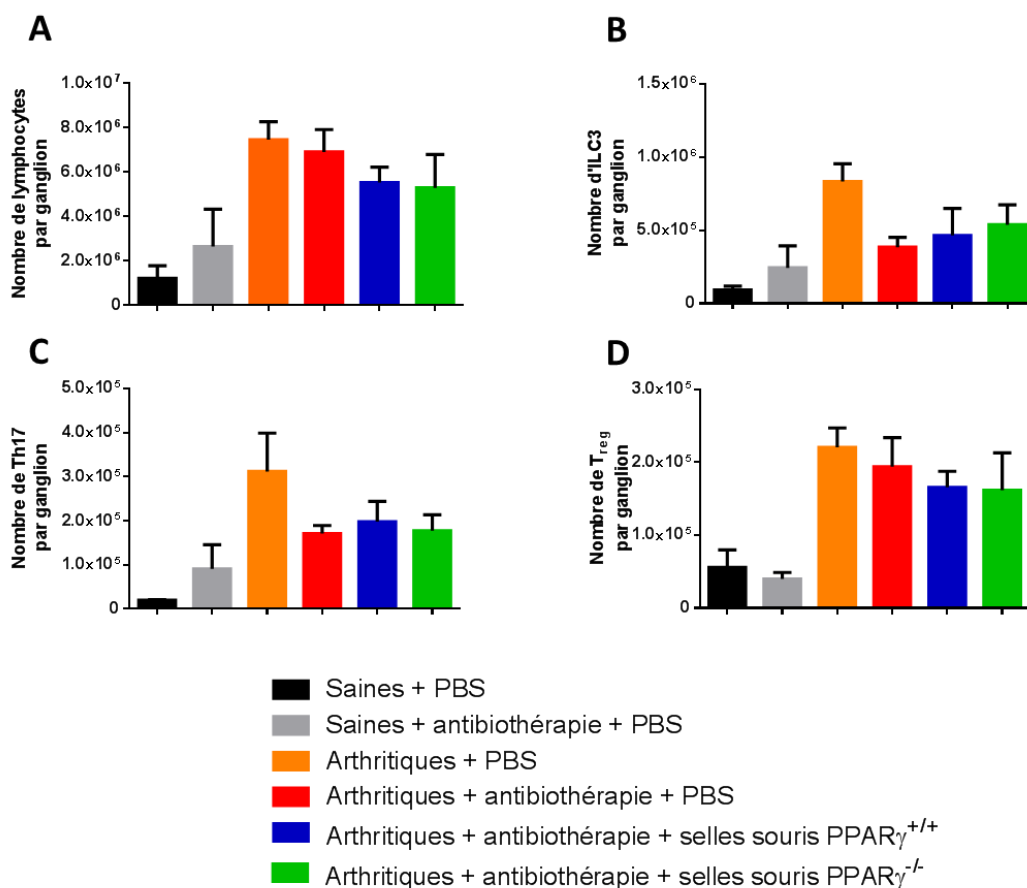


Figure 49 : Conséquences du transfert du microbiote fécal de souris $PPAR\gamma^{+/+}$ et $PPAR\gamma^{-/-}$ sur les populations de cellules immunitaires dans les ganglions poplités

Le microbiote fécal de souris $PPAR\gamma^{+/+}$ et $PPAR\gamma^{-/-}$ a été transféré à des souris DBA/1 après une antibiothérapie. Une arthrite a ensuite été induite chez les souris DBA/1 et, à la mise à mort des souris, nous avons quantifié le nombre de lymphocytes totaux (A), d'ILC3 (B), de Th17 (C) et de T_{reg} (D) dans les ganglions poplités des souris par cytométrie en flux (n=3). Les résultats correspondent à la moyenne ± SEM.

II.3.3.3. Evaluation de l'impact du transfert du microbiote fécal des souris $PPAR\gamma^{+/+}$ et $PPAR\gamma^{-/-}$ sur les populations lymphocytaires intestinales

Nous avons également évalué l'impact du transfert du microbiote fécal des souris $PPAR\gamma^{+/+}$ et $PPAR\gamma^{-/-}$ sur les populations cellulaires ILC3, Th17 et T_{reg} de l'intestin grêle (**Figure 50**). Le développement de l'arthrite n'engendre pas de modification de répartition des

populations ILC3, Th17 et T_{reg} (**Figure 50**). De même, le transfert fécal ne modifie pas la proportion des populations ILC3, Th17 et T_{reg} indépendamment du statut PPAR γ des souris donneuses. L'antibiothérapie ne modifie pas non plus le pourcentage d'ILC3 au sein de la *lamina propria* de l'intestin grêle (**Figure 50A**), mais semble diminuer la proportion de lymphocytes Th17 et T_{reg} intestinale (**Figures 50B et C**).

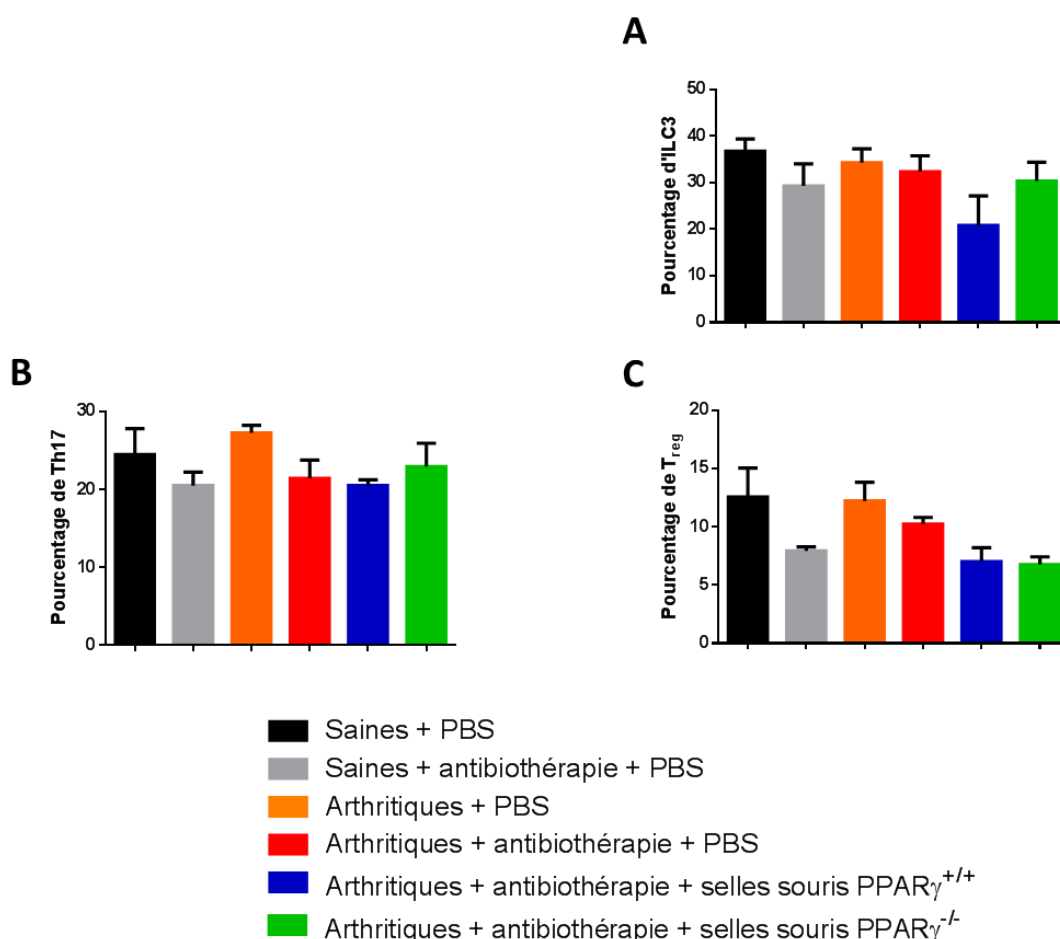


Figure 50 : Conséquences du transfert du microbiote fécal de souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ sur les populations de cellules immunitaires intestinales

Le microbiote fécal de souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ a été transféré à des souris DBA/1 après une antibiothérapie. Une arthrite a ensuite été induite chez les souris DBA/1 et, à la mise à mort des souris, nous avons évalué la proportion de cellules ILC3 (**A**) et des lymphocytes Th17 (**B**) et T_{reg} (**C**) dans la *lamina propria* de l'intestin grêle des souris par cytométrie en flux (n=3). Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM.

II.4. Conclusion et perspectives

Le récepteur PPAR γ est impliqué dans plusieurs processus physiologiques comme le contrôle de la prolifération cellulaire et la régulation des métabolismes glucidique et lipidique. Il contrôle la sensibilité à l'insuline *via* son effet sur la différenciation et la maturation des adipocytes et est impliqué également dans le stockage des lipides. Le récepteur PPAR γ est également impliqué dans la régulation de l'inflammation et le contrôle de la différenciation de cellules immunitaires. En effet, il inhibe l'expression du facteur de transcription ROR γ t, indispensable à la différenciation des lymphocytes Th17 et des ILC3 (Klotz, Burgdorf, et al. 2009). Ces cellules sont naturellement localisées dans la muqueuse digestive, où elles veillent au maintien de l'homéostasie intestinale en assurant la stabilité du microbiote intestinal et la lutte contre de potentiels agents pathogènes. Cependant, les lymphocytes Th17 et les cellules ILC3 sont également des acteurs majeurs dans le développement de pathologies auto-immunes et/ou inflammatoires lorsqu'ils sont produits en quantité excessive. Ils contribuent notamment à la physiopathologie des MICI telles que la RCH et la MC, *via* la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires comme la cytokine IL-17 (Forkel et Mjösberg 2016). Lorsque nous avons étudié la muqueuse intestinale des souris PPAR γ ^{-/-}, nous n'avons pas observé d'inflammation spontanée alors qu'elles développent une inflammation articulaire. Cependant, nous avons observé des modifications dans les proportions des sous-populations lymphocytaires dans de l'intestin grêle. En effet, la proportion de lymphocytes Th17 est diminuée dans la *lamina propria* des souris PPAR γ ^{-/-} alors que nous n'avons pas détecté ces cellules dans la muqueuse colique des souris, indépendamment de leur statut PPAR γ ^{+/+} ou PPAR γ ^{-/-}. Par ailleurs, l'expression de l'IL-17 est comparable entre les souris PPAR γ ^{+/+} et PPAR γ ^{-/-} dans ces deux muqueuses. Ces résultats suggèrent que le récepteur PPAR γ n'est pas le seul acteur de la régulation de la différenciation des lymphocytes Th17. Ainsi, l'activité du facteur de transcription ROR γ t peut également être limitée suite à l'ubiquitination de l'arginine K446 (He et al. 2016). L'ubiquitination de cet acide aminé limite le recrutement du co-activateur SRC-1 (Steroid receptor coactivator-1) et réduit ainsi la différenciation des lymphocytes Th17. De même, la phosphorylation de la sérine S484 de ROR γ t inhibe la différenciation des lymphocytes Th17 (He et al. 2017). Par ailleurs, nous avons observé une proportion plus importante de lymphocytes T_{reg} dans les *lamina propria* de l'intestin grêle et du colon des souris PPAR γ ^{-/-}. Le récepteur PPAR γ est naturellement fortement exprimé dans les lymphocytes T_{reg} du tissu adipeux viscéral (Cipolletta et al. 2012). Les souris déficientes sélectivement pour ce récepteur dans les cellules FoxP3 positives présentent une diminution du nombre de lymphocytes T_{reg} dans ce tissu. Cependant, le récepteur PPAR γ n'influence pas le développement des

lymphocytes T_{reg} des tissus lymphoïdes. La proportion de cellules ILC3 est augmentée dans la muqueuse de l'intestin grêle des souris PPAR γ ^{-/-} alors qu'elle est similaire dans la muqueuse colique entre les deux génotypes. Nous avons généré au laboratoire des souris déficientes sélectivement pour le récepteur PPAR γ dans les cellules ROR γ t positives et nous avons commencé à caractériser ces souris. Nous n'avons pas observé de modification de la proportion des lymphocytes Th17 et T_{reg} et des cellules ILC3 dans leur intestin grêle et dans les ganglions mésentériques (**Figure 51**). Ces résultats semblent indiquer que le récepteur PPAR γ n'est pas un régulateur majeur, *in vivo*, de la différenciation des lymphocytes Th17 et T_{reg} et des ILC3 au sein de ces organes. De plus, les souris déficientes pour le récepteur PPAR γ sélectivement dans les cellules hématopoïétiques et les cellules épithéliales (souris MMTV-Cre⁺ (Mouse mammary tumor virus)) ont un nombre de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ similaire à celui des souris de génotype sauvage dans la rate, les ganglions mésentériques et le thymus (Hontecillas et Bassaganya-Riera 2007). Les différences entre les populations lymphocytaires observées dans la muqueuse intestinale des souris PPAR γ pourraient être dues à des modifications de l'environnement de ces cellules et notamment à leur microbiote intestinal. Elles pourraient également être la conséquence de leur absence de tissu adipeux puisque son invalidation ciblée dans les cellules ROR γ t positives ne reproduit pas son impact. En effet, des adipokines produites par les adipocytes, telles que la leptine et l'adiponectine, contrôlent la différenciation des lymphocytes Th17 et T_{reg} et contribuent ainsi aux pathologies auto-immunes (Chuang et Tan 2017 et Zeng et Chi 2015).

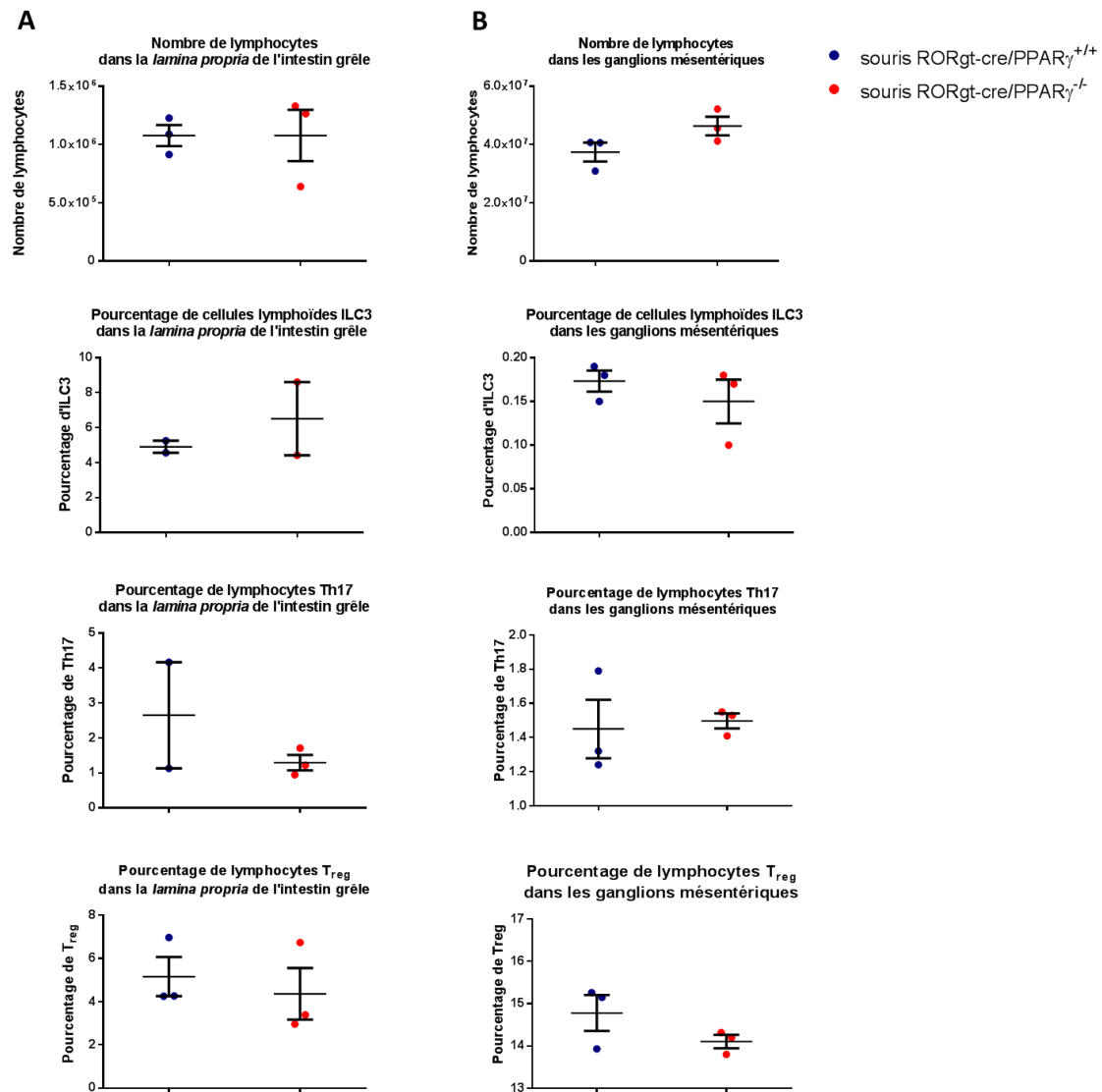


Figure 51 : Conséquences de l'inactivation du récepteur PPAR γ dans les cellules positives pour le facteur de transcription ROR γ t sur les populations lymphocytaires intestinales

Les lymphocytes totaux et les proportions de lymphocytes Th17 et T_{reg} et les cellules lymphoïdes ILC3 ont été quantifiés dans la *lamina propria* de l'intestin grêle (**A**) et des ganglions mésentériques (**B**) des souris PPAR $\gamma^{+/+}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ par cytométrie en flux (n=3). Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM. Une différence significative entre les souris ROR γ t-crePPAR $\gamma^{+/+}$ et ROR γ t-crePPAR $\gamma^{-/-}$ est indiquée par un astérisque (*= p<0,05).

Nous avons montré que le microbiote fécal des souris PPAR $\gamma^{-/-}$ est différent de celui des souris sauvages. Il comprend un nombre moins important d'espèces bactériennes et une diminution globale de la proportion de Firmicutes au profit des Bactéroïdètes. Parmi les taxons bactériens du phylum des Firmicutes impactés par la délétion du récepteur PPAR γ , les familles des Ruminococcaceae et des Lachnospiraceae sont les plus concernées. Ces deux familles appartiennent à la classe des Clostridia et regroupent des bactéries anaérobies strictes productrices de butyrate (Vital, Howe, et Tiedje 2014). Dans les conditions homéostatiques, ces

bactéries limitent la production d'oxygène par les cellules épithéliales et limitent ainsi la présence des bactéries aérobies et aérobies-anaérobies facultatives. Nous avons montré que le microbiote fécal des souris $PPAR\gamma^{-/-}$ est plus riche en bactéries de la famille des Enterobacteriaceae, appartenant au phylum des protéobactéries. Une augmentation des protéobactéries, et en particulier des Enterobacteriaceae, est considérée comme un marqueur de dysbiose et témoigne de troubles métaboliques (Shin, Whon, et Bae 2015). Ces bactéries sont aérobies-anaérobies facultatives. Le butyrate est un ligand naturel du récepteur $PPAR\gamma$. Ainsi, l'élimination des bactéries productrices de butyrate par un traitement antibiotique réduit la signalisation dépendante de $PPAR\gamma$ dans les cellules épithéliales intestinales ce qui limite leur capacité d'utilisation de la β -oxydation et stimule leur production de NO, ce qui se traduit par une augmentation de nitrates et d'oxygène dans la lumière intestinale (Byndloss et al. 2017). Chez les souris $PPAR\gamma^{-/-}$, on peut supposer que la perte du récepteur $PPAR\gamma$ dans l'épithélium intestinal supprime l'impact des bactéries productrices de butyrate et favorise la production de métabolites comme les nitrates qui peuvent favoriser la croissance de bactéries aérobies-anaérobies facultatives capables de les métaboliser (comme les entéro-bactéries qui sont NO_3^- réductase positives). Nous avons également montré que les peptides antimicrobiens sont différentiellement exprimés dans l'intestin grêle et le colon des souris $PPAR\gamma^{-/-}$. L'expression de la β -défensine Defb10 est diminuée dans le colon des souris $PPAR\gamma^{-/-}$ alors que les peptides antimicrobiens Reg3 γ et lipocaline-2 sont augmentés. L'activation du récepteur $PPAR\gamma$ stimule la synthèse de la β -défensine Defb10 dans la muqueuse colique chez la souris (Peyrin-Biroulet et al. 2010). Par ailleurs, certaines bactéries infectieuses comme *S Typhimurium* sont capables d'inhiber le récepteur $PPAR\gamma$ dans les cellules épithéliales coliques, ce qui conduit à une synthèse accrue de cytokines pro-inflammatoires et des peptides antimicrobiens lipocaline-2 et Reg3 γ par ces cellules (Kundu et al. 2014). Cependant, nous avons montré que d'autres défensines telles que Defb1 et Defcr4 sont similairement exprimées dans le colon des souris $PPAR\gamma^{+/+}$ et $PPAR\gamma^{-/-}$. Peyrin-Biroulet et ses collaborateurs ont déjà rapporté que l'absence du récepteur $PPAR\gamma$ ne module pas l'expression colique de la β -défensine Defb1 (Peyrin-Biroulet et al. 2010). Dans l'intestin grêle, nous avons observé que les β -défensines Defb1 et Defb10 sont significativement plus exprimées chez les souris $PPAR\gamma^{-/-}$ alors que l' α -défensine Defcr4 est similairement exprimée chez les souris $PPAR\gamma^{+/+}$ et $PPAR\gamma^{-/-}$. La lectine de type C Reg3 γ est, quant à elle, moins exprimée dans l'intestin grêle des souris $PPAR\gamma^{-/-}$. Les α -défensines Defcr1 à Defcr5 sont exprimées dans l'intestin grêle des souris $PPAR\gamma^{+/+}$ et $PPAR\gamma^{-/-}$ de façon comparable (Peyrin-Biroulet et al. 2010). Le récepteur $PPAR\gamma$ module l'expression de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales digestives en fonction de la richesse de

l'alimentation en acide gras (Tomas et al. 2016). Le microbiote intestinal régule l'expression du récepteur PPAR γ et influence la production de ces peptides. La modification du microbiote intestinal chez les souris PPAR $\gamma^{-/-}$ semble donc étroitement liée au déficit d'activité du récepteur PPAR γ dans les cellules épithéliales conduisant à un enrichissement en gamma-protéobactéries, capables de métaboliser les nitrates (l'activité NOS augmente en absence de PPAR γ).

Nous avons observé une inflammation articulaire spontanée chez les souris PPAR $\gamma^{-/-}$ et mis en évidence des cellules productrices d'IL-17. Ces cellules sont majoritairement des mastocytes et quelques lymphocytes. Par ailleurs, des analyses préliminaires réalisées sur des souris déficientes sélectivement pour le récepteur PPAR γ dans les cellules ROR γ t positives ne montrent aucune atteinte articulaire (**Figure 52**). Les populations cellulaires ILC3, Th17 et T_{reg} sont similaires dans les ganglions poplités des souris ROR γ t-cre/PPAR $\gamma^{+/+}$ et ROR γ t-cre/PPAR $\gamma^{-/-}$. Ainsi, la délétion du récepteur PPAR γ dans les cellules immunitaires ROR γ t positives (notamment les cellules ILC3 et les lymphocytes Th17), ne suffit pas à déclencher l'apparition d'une inflammation articulaire.

Les patients atteints de RIC tels que la PR et la SpA ont un microbiote fécal dysbiotique (Breban et al. 2017). Nous avons observé une augmentation des bactéries appartenant aux familles des Bacteroidaceae et des Enterobacteriaceae et au genre *Sutterella* dans le microbiote fécal des souris PPAR $\gamma^{-/-}$ et une diminution des bactéries appartenant au phylum des Ténéricutes, au genre des *Ruminococcus* et aux familles des Lachnospiraceae et des Mogibacteriaceae. Les patients atteints de PR ont une augmentation des *Ruminococcus*, des Enterobacteriaceae et des Ténéricutes et une proportion réduite de Lachnospiraceae, de Bacteroidaceae et de *Sutterella* (Breban et al. 2017 et X. Zhang et al. 2015). Le microbiote fécal des patients atteints de SpA est caractérisé par une proportion plus importante de Lachnospiraceae et de Ruminococcaceae et une diminution des Bacteroidaceae (Breban et al. 2017). Par ailleurs, nous avons observé que le traitement pendant 4 jours des souris par une antibiothérapie large spectre réduit la sévérité de l'arthrite. Les effets sont visibles plus de 50 jours après le traitement antibiotique. En fonction du cocktail antibiotique utilisé les effets sur l'arthrite peuvent être différents. Des antibiotiques ont été prescrits dans le traitement contre la PR (Ogrendik 2013). En revanche le traitement préventif des souris avec de l'enrofloxacin et pendant la phase d'immunisation augmente la sévérité de l'arthrite dans les phases tardives (Dorożyńska et al. 2014). Nous avons montré que l'administration du microbiote fécal des souris PPAR $\gamma^{+/+}$ contrecarre les effets de l'antibiothérapie sur la sévérité de l'arthrite alors que le transfert de microbiote des souris PPAR $\gamma^{-/-}$ est sans influence. Cette différence d'effet est

possiblement dû à la moindre diversité bactérienne du microbiote fécal des souris $\text{PPAR}\gamma^{-/-}$. Néanmoins, ce résultat suggère que le microbiote fécal de ces souris ne promeut et/ou n'est pas directement responsable du développement des manifestations articulaires.

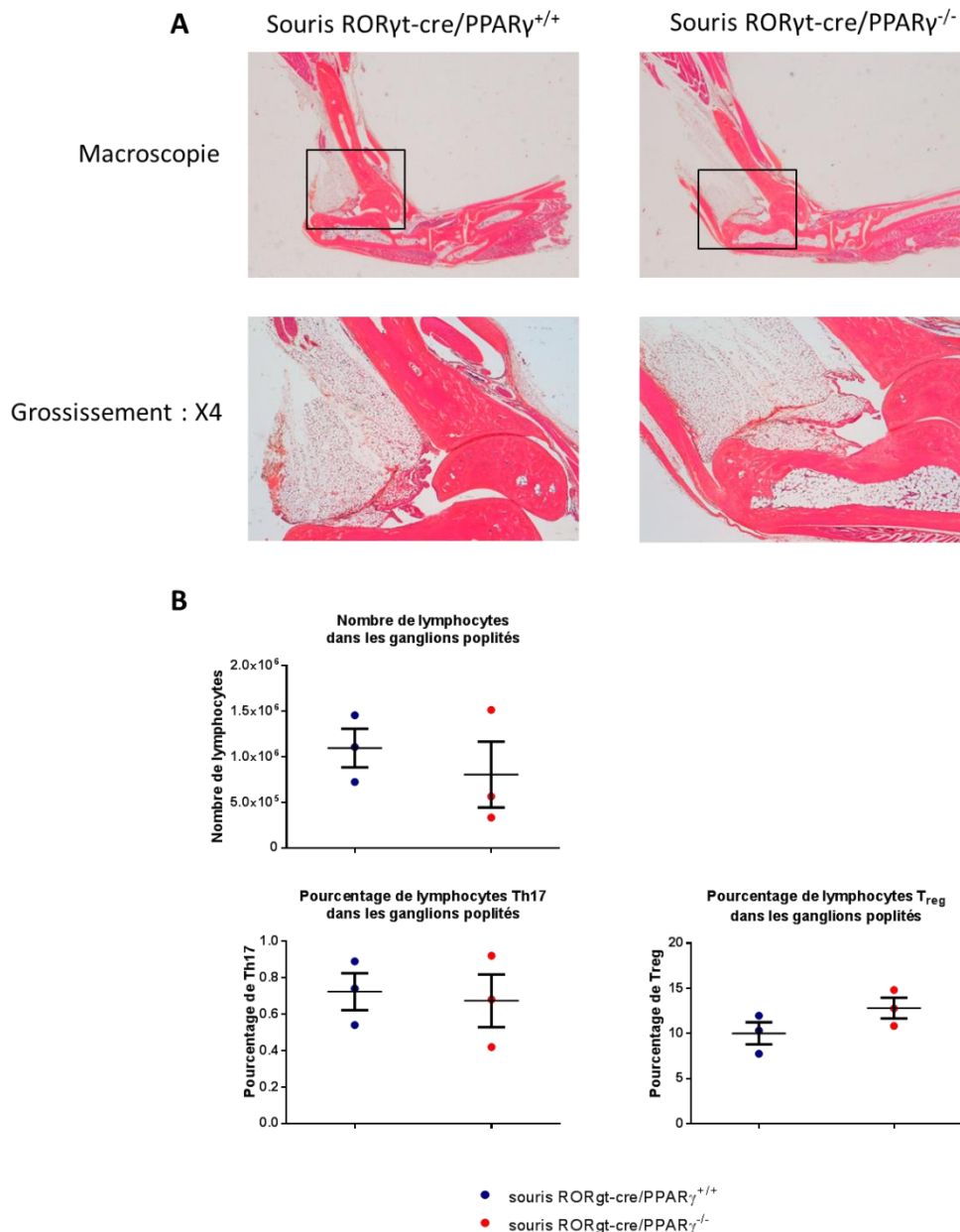


Figure 52 : Conséquences de l'invalidation du récepteur $\text{PPAR}\gamma$ dans les cellules $\text{ROR}\gamma\text{t}$ positives sur les articulations.

Une coloration HES a été effectuée sur des coupes de chevilles de souris $\text{ROR}\gamma\text{t-cre/PPAR}\gamma^{+/+}$ et $\text{ROR}\gamma\text{t-cre/PPAR}\gamma^{-/-}$ afin de visualiser la structure des articulations et de détecter des signes d'inflammation (**A**). Les coupes ont été observées en macroscopie et en microscopie aux grossissements X4. Les lymphocytes totaux et les proportions de lymphocytes Th17 et T_{reg} ont été quantifiés au sein des ganglions poplités de ces souris par cytométrie en flux (n=3) (**B**). Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM. Une différence significative entre les souris $\text{ROR}\gamma\text{t-cre/PPAR}\gamma^{+/+}$ et $\text{ROR}\gamma\text{t-cre/PPAR}\gamma^{-/-}$ est indiquée par un astérisque (*= p<0,05).

Deuxième hypothèse de travail

Le récepteur CCR3, un acteur dans la migration des
cellules immunitaires intestinales vers les articulations
arthritiques ?

Les muqueuses, et en particulier la muqueuse intestinale, sont en contact permanent avec l'environnement extérieur ; ainsi elles sont sujettes à des attaques par de potentiels agents infectieux. Pour limiter les interactions entre la barrière intestinale et les micro-organismes, plusieurs stratégies sont mises en place. De nombreuses cellules immunitaires sont localisées dans l'épithélium et dans la *lamina propria* intestinale. Ces cellules ont pour rôle de défendre l'organisme contre de potentiels agents infectieux, tout en conservant une tolérance immunitaire contre des micro-organismes commensaux. La nature des leucocytes intestinaux est variée et les immunités 1, 2 et 3 ainsi que l'immunité régulatrice sont représentées (Geremia et Arancibia-Cárcamo 2017). Dans les conditions homéostatiques, les lymphocytes Th17 et les ILC3 sont majoritairement présents dans le dernier tiers de la *lamina propria* de l'intestin grêle. Les PNE sont également abondants dans l'intestin grêle (Griffith, Sokol, et Luster 2014). La majorité des leucocytes localisés dans l'intestin provient de sites extra-intestinaux, comme la moelle osseuse hématopoïétique et la rate. Ces cellules migrent jusque dans l'intestin grâce au mécanisme de chimiotactisme (Griffith, Sokol, et Luster 2014). De même, ce processus permet aussi la migration des leucocytes entre l'épithélium digestif, la *lamina propria* intestinale et les organes lymphoïdes secondaires. Ainsi, l'ensemble des cellules immunitaires expriment des récepteurs aux chimiokines, qui, lorsqu'ils sont liés à leurs ligands, favorisent la migration des cellules jusqu'aux sites d'intérêt (Luster, Alon, et von Andrian 2005). Ce processus physiologique permet également le recrutement de cellules immunitaires sur un site lésé ou impacté par un agent infectieux.

De nombreuses cellules immunitaires sont impliquées dans le développement de l'arthrite. Les cellules de l'immunité de types 3, telles que les lymphocytes Th17 et ILC3 et les PNN sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, en particulier l'IL-17. Cette cytokine active les cellules résidentes de l'articulation telles que les chondrocytes, les synoviocytes fibroblastiques et les ostéoclastes qui en retour produisent des médiateurs de l'inflammation, des enzymes de dégradation de la matrice cartilagineuse et stimulent l'ostéoclastogenèse (Miossec et Kolls 2012). Les cellules de l'immunité de type 2, comme les PNE, les lymphocytes Th2 et les cellules ILC2, les PNB et les mastocytes, jouent également un rôle prépondérant dans l'inflammation et les lésions structurales articulaires. Une accumulation des lymphocytes Th2 dans les articulations peut être associée à une arthrite active et érosive (Aarvak et al. 2000). De même, dans certaines formes d'arthrite les PNE peuvent être très présents dans les articulations atteintes (Tay 1999) et leur dégranulation provoque la libération de médiateurs de l'inflammation dans la membrane synoviale. Le recrutement des cellules immunitaires dans les

articulations arthritiques est réalisé grâce au processus de chimiotactisme. De fortes concentrations de chimiokines sont détectées dans la membrane et le liquide synovial inflammatoire (Rump et al. 2017). Des cellules résidentes de l'articulation, comme les synoviocytes fibroblastiques, les ostéoblastes, les ostéoclastes, les chondrocytes, les cellules endothéliales et les cellules immunitaires de la membrane et du liquide synovial sécrètent également des chimiokines capables de recruter de nombreux leucocytes. Les récepteurs aux chimiokines sont également exprimés par ces cellules résidentes de l'articulation. Leur activation provoque la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires et d'enzymes de dégradation de la matrice cartilagineuse et stimule l'ostéoclastogenèse (Alaaeddine et al. 2001 et Kwak et al. 2005).

Le récepteur CCR3 est exprimé, à la fois, par certaines cellules immunitaires et par des cellules résidentes de l'articulation. Il possède plusieurs ligands, en particulier les éotaxines 1, 2 et 3. L'interaction de ces chimiokines avec le récepteur CCR3 permet la localisation physiologique des PNE, des PNB, des mastocytes et des lymphocytes Th2 dans la muqueuse intestinale (Humbles et al. 2002). Par ailleurs, l'axe CCR3-CCL11 est impliqué dans l'inflammation chronique intestinale. En effet, les lymphocytes Th2 et les PNE peuvent jouer un rôle prépondérant dans les MICI (Bamias et Cominelli 2015 et Blom et al. 2012). De plus, certaines pathologies gastro-intestinales sont caractérisées par une accumulation anormale de PNE dans la muqueuse digestive (Ahrens et al. 2008). L'axe CCR3-CCL11 est également impliqué dans des pathologies inflammatoires extra-intestinales. En particulier, la chimiokine CCL11 est fortement présente dans le liquide synovial des patients atteints de PR et le récepteur CCR3 est exprimé dans la membrane synoviale inflammatoire (Zhebrun et al. 2014). Le récepteur CCR3 n'est pas exprimé à la surface des PNN dans les conditions physiologiques mais, chez les patients atteints de PR, CCR3 est exprimé et son activation initie le recrutement articulaire de ces cellules (Hartl et al. 2008). Par ailleurs, ce récepteur est également exprimé à la surface des chondrocytes et des synoviocytes dans les articulations arthritiques. Son activation par CCL11 stimule la synthèse de métalloprotéases qui participent à la dégradation de la matrice cartilagineuse (Hsu et al. 2004 et Liu et al. 2017). Des études réalisées sur des modèles animaux témoignent de l'importance de l'activation du récepteur CCR3 dans l'arthrite. En effet, l'équipe d'accueil a montré que dans les phases précoces d'une arthrite à l'antigène, le taux de CCL11 dans le liquide synovial est élevé et le nombre de PNE péri-vasculaires dans la membrane synoviale est important (Paquet et al. 2012). Par ailleurs, l'inhibition de CCL24 dans le modèle de l'AA chez le rat limite la sévérité de la pathologie (Ablin et al. 2010).

Le récepteur CCR3 a donc un rôle physiologique important dans le recrutement des cellules de l'immunité de type 2 dans la muqueuse intestinale mais également un rôle physiopathologique supposé dans l'arthrite. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse qu'au cours du développement d'une arthrite le récepteur CCR3 pourrait permettre la migration des immunitaire de la *lamina propria* de l'intestin grêle vers les articulations.

Le premier objectif de cette partie de ma thèse a été

d'évaluer les conséquences de l'inhibition pharmacologique du récepteur CCR3 sur le développement d'une arthrite induite par injection de collagène chez la souris

Au cours de cette étude, nous avons :

- évalué les conséquences de l'inhibition du récepteur CCR3 sur l'inflammation articulaire au cours d'une arthrite chez la souris
- analysé l'impact de l'inhibition du récepteur CCR3 sur les atteintes structurales des articulations arthritiques
- analysé les conséquences du blocage de CCR3 sur les populations cellulaires ILC3, Th17 et T_{reg} dans les ganglions poplités des souris arthritiques
- étudié les populations cellulaires exprimant CCR3 dans les articulations arthritiques

Le deuxième objectif de cette partie de ma thèse a été

d'évaluer les conséquences de l'invalidation génétique du récepteur CCR3 et de son inhibition pharmacologique sur les populations lymphocytaires intestinales

Au cours de cette étude, nous avons :

- analysé l'impact de l'invalidation et de l'inhibition du récepteur CCR3 sur les populations lymphocytaires Th1, Th2, Th17 et T_{reg} dans la *lamina propria* de l'intestin grêle, les ganglions mésentériques et la rate de souris dans les conditions basales

Rappel bibliographique sur le récepteur CCR3

I. Le récepteur CCR3, implications physiologiques et pathologiques

I.1. Le récepteur CCR3 : caractéristiques générales et rôle dans la muqueuse intestinale

Le récepteur CCR3, aussi appelé CD193, est une protéine de 355 acides aminés codée par un gène localisé sur le chromosome 3 (White, Iqbal, et Greaves 2013). Celui-ci forme avec sept autres gènes un cluster codant pour des récepteurs aux chimiokines dans la région 3p21.3 du chromosome 3. Le récepteur CCR3 est une protéine à sept domaines transmembranaires hydrophobes couplée à une protéine G (RCPG) ; il appartient à la même famille que le récepteur à la rhodopsine et possède de nombreuses caractéristiques communes aux récepteurs des chimiokines (**Figure 53**). Il présente quatre résidus cystéine dans ses domaines extracellulaires permettant la fixation correcte du ligand par formation de ponts disulfures. Dans le deuxième segment transmembranaire, le motif TxP (Thréonine-acide aminé quelconque-Proline) permet l'activation du récepteur et le résidu aminé acide aspartique (asp) ainsi que la séquence conservée DRY (acide aspartique-arginine-tyrosine) déclenchent l'activation de la protéine G couplée au récepteur. Une série de huit résidus sérine et thréonine permet le recrutement des protéines arrestines nécessaires à l'internalisation et la désactivation du récepteur. Le récepteur CCR3 a également des caractéristiques qui lui sont propres, comme la présence d'une leucine à la place de la proline dans le motif proline-cystéine de la partie N-terminale et la perte de la séquence consensus pour la N-glycosylation (Ponath et al. 1996). Le récepteur CCR3 est exprimé à la surface de nombreuses cellules immunitaires mais également sur des cellules résidentes. Les PNE l'expriment fortement. Les PNB, les mastocytes et les lymphocytes de type Th2 expriment aussi le récepteur CCR3 à leur surface (Ugucioni et al. 1997, Brightling et al. 2005 et Gerber et al. 1997).

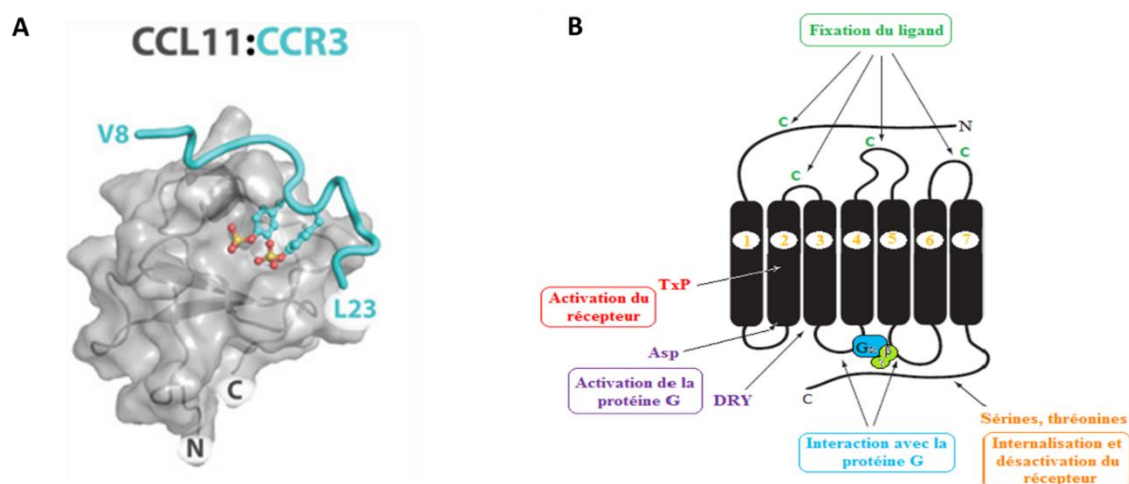


Figure 53 : **Représentation tridimensionnelle du récepteur CCR3 et de son interaction avec son ligand CCL11 (A) et représentation schématique des caractéristiques du récepteur CCR3 (B)**

D'après Ziarek et al. 2017 et White, Iqbal, et Greaves 2013

Ce récepteur répond à plusieurs chimiokines (**tableau 5**). A la différence des autres ligands, les éotaxines sont relativement spécifiques du récepteur CCR3. Les chimiokines CCL18, CXCL9, CXCL10 et CXCL11 ont une action antagoniste sur le récepteur CCR3 et permettent ainsi sa régulation.

Tableau 5 : Ligands du récepteur CCR3 présents chez l'Homme et/ou la souris et leur action
D'après Zlotnik et Yoshie 2012

Ligands	Autres dénominations couramment utilisées	Actions	Souris
CCL3L1		Activatrice	Absent
CCL5	RANTES	Activatrice	Présent
CCL7	MCP -3	Activatrice	Présent
CCL8	MCP-2	Activatrice	Présent
CCL11	éotaxine-1	Activatrice	Présent
CCL13	MCP-4	Activatrice	Absent
CCL15	HCC-2	Activatrice	Absent
CCL18		Antagoniste	Absent
CCL24	éotaxine-2	Activatrice	Présent
CCL26	éotaxine-3	Activatrice	Absent
CCL28		Activatrice	Absent
CXCL9	MIG	Antagoniste	Présent
CXCL10	IP-10	Antagoniste	Présent
CXCL11	IP-9	Antagoniste	Présent

MCP-: Monocyte chemoattractant protein, MIP-: Macrophage inflammatory protein, RANTES: Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted, IP-: IFN-gamma-inducible protein, MIG: Monokine induced by interferon gamma

Le récepteur CCR3 est impliqué dans la défense de l'organisme. Il participe au recrutement et à l'activation de cellules immunitaires sur des sites cibles d'attaques extérieures et contribue à la migration préventive de ces cellules dans les muqueuses. Lors d'une agression de l'organisme par un corps étranger, des cellules du système immunitaire sont rapidement mobilisées pour faire face à la menace. Ces cellules sont recrutées, *via* le processus de chimiotactisme, sur le site agressé et sont activées. Le récepteur CCR3 a un rôle dans le processus inflammatoire. Il induit le recrutement de cellules immunitaires, notamment des PNE mais aussi des PNB, des mastocytes et des lymphocytes de type Th2. Il agit également sur l'activité de ces cellules. Il induit la dégranulation des PNE, qui libèrent des molécules pro-inflammatoires comme les ECPs, les EDNs et les MBPs (Fujisawa et al. 2000). Une inhibition du récepteur CCR3 par un anticorps spécifique inhibe la dégranulation des PNE induite par CCL5 et CCL11. Le récepteur CCR3 permet aussi la libération d'ERO par les PNE (Elsner et al. 1998). Il participe également à la dégranulation des PNB (leucotriènes et histamine, notamment), en particulier *via* son interaction avec CCL5, CCL11 et CC13 (Uguccioni et al. 1997). Les mastocytes stockent le récepteur CCR3 au sein de granules. L'activation de ces cellules par des IgE induit la fusion de ces granules avec la membrane plasmique, ce qui augmente la présence de CCR3 à la surface de ces cellules (Price et al. 2003). L'activation du récepteur CCR3 par CCL11 ne provoque pas la dégranulation des mastocytes mais elle potentialise ce processus.

La muqueuse digestive est en contact permanent avec des agents menaçant l'intégrité de l'organisme et de nombreuses cellules immunitaires veillent au maintien de l'homéostasie intestinale. Le récepteur CCR3 participe à ce processus et les cellules l'exprimant sont notamment impliquées dans la lutte contre les infections parasitaires. Des mastocytes exprimant le récepteur CCR3 sont localisés plus particulièrement dans la sous-muqueuse intestinale (Romagnani et al. 1999). Ces cellules contiennent des granules riches en tryptase et en chymase, elles peuvent répondre rapidement en cas d'infection. Des PNE sont également présents dans la muqueuse intestinale et le récepteur CCR3 est impliqué dans leur recrutement. Ainsi, les souris déficientes pour ce récepteur ont une anomalie de leur localisation (Humbles et al. 2002) : ces souris ont beaucoup moins de PNE dans leur muqueuse intestinale. La chimiokine CCL28, un ligand de CCR3, est naturellement produite par les cellules épithéliales de l'intestin (Berri et al. 2014). Cette chimiokine possède une activité antimicrobienne contre des pathogènes mais également contre des micro-organismes entériques commensaux. Les chimiokines CCL5 et

CCL11 sont aussi présentes dans l'intestin grêle, notamment dans le jéjunum (Matthews et al. 1998).

Les PNE peuvent avoir un rôle prépondérant dans certaines pathologies gastro-intestinales, comme quelques affections à éosinophilie et les hypersensibilités allergiques gastro-intestinales. Les pathologies gastro-intestinales à PNE sont caractérisées par une accumulation anormale de PNE dans le tractus digestif. Ces derniers peuvent être localisés principalement dans l'œsophage, l'estomac ou le colon. Des études réalisées dans des modèles animaux montrent que, dans le cas d'une hypersensibilité allergique gastro-intestinale, les PNE mais aussi les lymphocytes Th2 ont un rôle important, notamment par la sécrétion des cytokines IL-4 et IL-5 (Hogan et al. 2001). Les PNE semblent également avoir un rôle dans les MICI ; des polymorphismes associés aux gènes codant les protéines EPO et ECP sont associés au développement de ces pathologies (Blom et al. 2012). Une activation accrue des lymphocytes Th2 dans l'intestin peut être délétère et conduire à une inflammation chronique, comme observé dans la RCH (Bamias et Cominelli 2015). Ces cellules participent aussi au processus de réparation à la suite d'une inflammation aiguë et à la fibrogenèse de la muqueuse intestinale (Lopetuso, Scaldaferri, et Pizarro 2012). Dans les MICI, les lymphocytes Th2 peuvent contribuer à l'accroissement de dépôts fibreux (Bamias et Cominelli 2015). Par ailleurs, les patients souffrant de rectocolite hémorragique pédiatrique ont un important taux de CCL11 dans le colon ainsi qu'un nombre accru de PNE (Ahrens et al. 2008). Cette chimiokine est produite par les macrophages et les cellules épithéliales. Une augmentation de l'expression du récepteur CCR3 a également été détectée dans le colon des patients atteints de colite microscopique (Günaltay et al. 2015). Les modèles animaux contribuent à montrer l'implication du récepteur CCR3 dans les pathologies intestinales. Ainsi, l'induction d'une colite au DSS chez la souris provoque une augmentation de l'expression de CC11 et CCL24 dans le colon et un recrutement des PNE (Ahrens et al. 2008). CCL11 semble avoir un rôle prépondérant dans le recrutement de ces cellules dans ce modèle. L'utilisation d'un anticorps spécifique du récepteur CCR3 chez des souris développant spontanément une iléite à PNE diminue la sévérité de la pathologie et limite les atteintes structurales (Masterson et al. 2011). Similairement, l'administration d'un anticorps ciblant le récepteur CCR3 diminue la sévérité d'une inflammation à PNE induite par l'administration d'ovalbumine chez la souris (Song et al. 2017). Les lymphocytes T exprimant CCR3 sont également observés dans l'intestin de patients atteints de RCH et, en plus faible proportion, dans celui des patients atteints de la maladie de MC (Manousou et al. 2010). Dans ces pathologies, les cellules épithéliales sont de grandes

productrices des ligands de CCR3 et plus particulièrement des chimiokines CCL11 et CCL24. L'implication du récepteur CCR3 et de ces ligands est suffisamment importante dans les pathologies gastro-intestinales, qu'un anticorps monoclonal humain ciblant CCL11, le Bertilimumab, est actuellement en essai clinique de phase 2 dans la RCH.

I.2. Le récepteur CCR3 et son implication dans l'arthrite

Le récepteur CCR3, associé aux cellules immunitaires et résidentes qui l'expriment, est impliqué dans différentes pathologies comme l'asthme, les MICI et l'athérosclérose. Il participe aussi à la physiopathologie de l'arthrite. En effet, CCR3 et ses ligands (éotaxines et CCL5) sont fortement exprimés dans la membrane synoviale des patients atteints d'arthrite (Zhebrun et al. 2014). Nous avons détaillé précédemment que l'immunité de type 2 regroupant en particulier les PNE, les PNB, les mastocytes, les lymphocytes Th2 et les cellules lymphoïdes ILC2 peut jouer un rôle important dans cette pathologie. Les lymphocytes Th2 présents chez les patients atteints de PR expriment le récepteur CCR3 (Aarvak et al. 2000). Une accumulation des lymphocytes Th2 dans la membrane synoviale peut être associée à une arthrite active et érosive. Au contraire, un taux sérique de CCL11 élevé chez des patients atteints de PR débutante est corrélé à une progression des lésions radiologiques moins sévère (Syversen et al. 2008). Les taux circulants de la cytokine IL-4, associée aux lymphocytes Th2, et de la chimiokine CCL11 sont augmentés chez des patients avant le développement de l'arthrite (Kokkonen et al. 2010). Cette chimiokine aurait donc un rôle dans la mise en place précoce de l'arthrite. Les cellules mononuclées circulantes des patients atteints de PR débutante expriment davantage le récepteur CCR3 et le taux de CCL11 circulant de ces patients est plus important que celui des individus sains (J. Wang et Zhao 2017). Les monocytes du sang périphérique d'individus sains n'expriment pas le récepteur CCR3 (Katschke et al. 2001). En revanche, les monocytes du liquide synovial des patients atteints de PR l'expriment. Ainsi, ce récepteur a probablement un rôle dans le recrutement et la rétention des monocytes dans les articulations arthritiques. De même, les PNN dans les conditions homéostatiques n'expriment pas le récepteur CCR3. En revanche, les PNN circulants et ceux présents dans le liquide synovial des patients atteints de PR possèdent ce récepteur (Hartl et al. 2008), et CCR3 semble impliqué dans leur migration.

Les cellules résidentes de l'articulation peuvent aussi exprimer le récepteur CCR3. Les chondrocytes expriment naturellement le récepteur CCR3. Chez les patients atteints d'arthrose, ces cellules expriment davantage le récepteur CCR3, qui est impliqué dans la synthèse de médiateurs de l'inflammation et d'enzyme de dégradation (Alaaeddine et al. 2001 et Borzi et al. 2000). L'activation des chondrocytes par des cytokines pro-inflammatoires telles que le

TNF α et l'IL-1 β induit la synthèse de CCL11 ; cette cytokine, probablement par une voie paracrine et/ou autocrine, stimule l'expression de son propre récepteur ainsi que des métalloprotéases MMP-3 et MMP-13 et contribue ainsi à la dégradation du cartilage (Hsu et al. 2004) (**Figure 54A**). L'activation du récepteur CCR3 par CCL11 induit également la sécrétion de ces enzymes, en particulier de MMP-3 (Chao et al. 2011). Les synoviocytes fibroblastiques des patients so

uffrant de PR expriment le récepteur CCR3 (Liu et al. 2017). L'activation de ces cellules par des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β induit leur sécrétion de CCL11. Comme observé pour les chondrocytes, CCL11 stimule l'expression de son récepteur. L'activation de CCR3 par CCL11 induit la production de la métalloprotéase MMP-9 par les synoviocytes. Ainsi, dans les conditions inflammatoires, ces cellules contribuent à la dégradation de la matrice cartilagineuse (**Figure 54B**). Les ostéoblastes expriment la chimiokine CCL11 (Kindstedt et al. 2017). Contrairement à ces cellules, les précurseurs des ostéoclastes ne synthétisent pas cette chimiokine mais ils possèdent le récepteur CCR3 à leur surface. La chimiokine CCL11 favorise la migration des précurseurs de ostéoclastes ainsi que la résorption osseuse.

Des études réalisées dans des modèles animaux témoignent de l'importance du récepteur CCR3 dans l'arthrite. Dans le modèle de l'AA chez le rat, l'expression de CCR3 sur les macrophages synoviaux est augmentée au début de la pathologie, ce qui suggère qu'il aurait un rôle dans les phases précoces de la maladie (Haas et al. 2005). Dans ce modèle, l'utilisation d'un anticorps monoclonal ciblant l'éotaxine 2 diminue la sévérité de l'arthrite (Ablin et al. 2010). D'autres modèles ont permis de montrer l'implication de l'axe CCR3-éotaxine dans l'arthrite. L'équipe a montré une augmentation de la sécrétion de CCL11 dans le liquide synovial dans la phase précoce de l'arthrite à l'antigène chez le rat (Paquet et al. 2012). Elle a également identifié la présence de PNE péri-vasculaires dans la membrane synoviale de ces rats dans les premières heures qui suivent l'induction de l'arthrite.

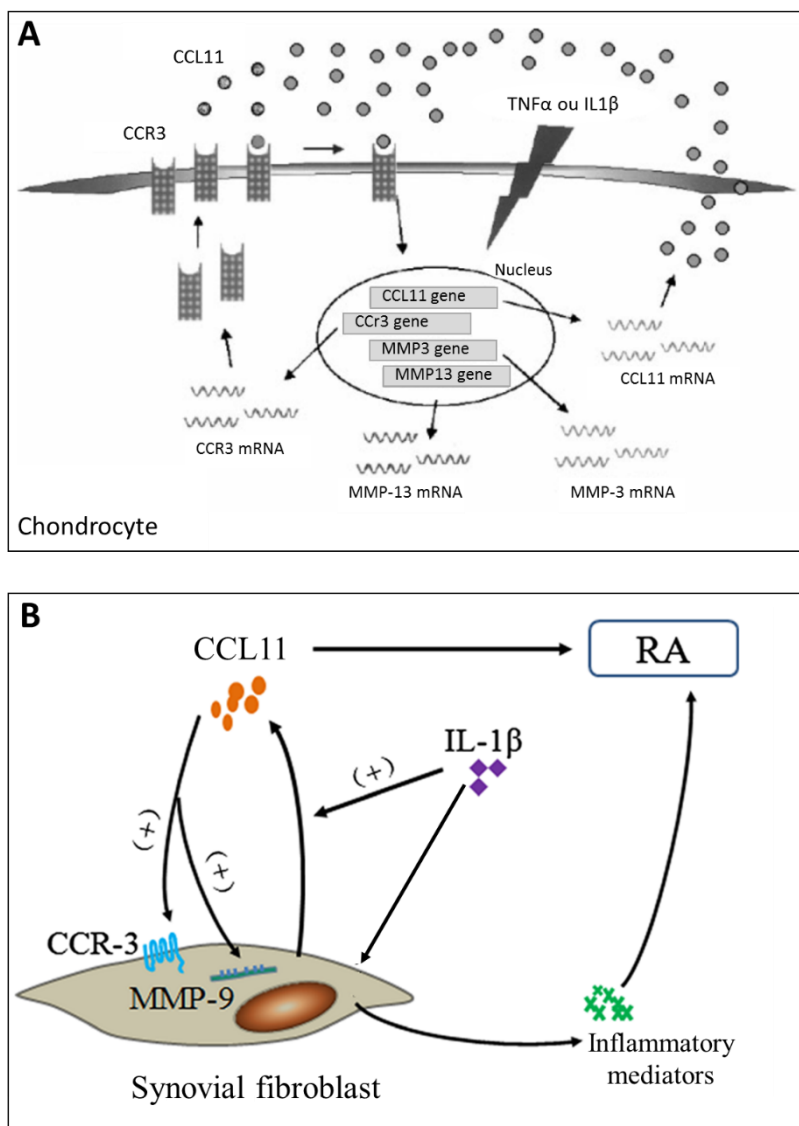


Figure 54 : Représentations schématiques de l'implication de l'axe CCR3-CCL11 dans l'induction de la synthèse d'enzymes de dégradation par les chondrocytes (A) et les synoviocytes fibroblastiques (B) dans un contexte inflammatoire
D'après Hsu et al. 2004 et Liu et al. 2017

Objectif 1

Conséquences de l'inhibition pharmacologique du récepteur CCR3 sur le développement d'une arthrite au collagène chez la souris

I. Evaluation des conséquences de l'inhibition du récepteur CCR3 sur le développement d'une arthrite au collagène chez la souris

I.1. Objectif de l'étude

L'interaction du récepteur aux chimiokines CCR3 avec ses ligands, dont les principaux sont les éotaxines 1, 2 et 3, joue un rôle majeur dans la migration des cellules de l'immunité de type 2. De nombreux éléments de preuve montrent l'implication de l'axe CCR3-CCL11 dans les pathologies articulaires. En effet, les patients atteints de PR présentent une expression de CCL11 et de CCR3 élevée dans la membrane et le liquide synovial de leurs articulations inflammatoires. Le récepteur CCR3 permet le recrutement de cellules immunitaires dans les articulations *via* le processus de chimiotactisme. D'autre part, il participe aux dommages structuraux des tissus articulaires en stimulant la synthèse d'enzymes de dégradation de la matrice cartilagineuse par les chondrocytes et les synoviocytes fibroblastiques et en favorisant la résorption osseuse. Par ailleurs, des études pré-cliniques confirment la présence de CCR3 et CCL11 dans les articulations arthritiques et montrent que l'inhibition de l'axe CCR3-CCL11 prévient la sévérité des lésions. Ainsi, l'objectif de cette première partie a été d'évaluer les conséquences de l'inhibition pharmacologique du récepteur CCR3 sur le développement d'une arthrite au collagène chez la souris.

I.2. Résumé du matériel et méthodes

Pour mener à bien notre étude, nous avons effectué trois groupes de souris mâles de fond génétique DBA/1 âgées de 7 semaines (Janvier Labs) :

- Un groupe de souris ne subissant pas l'induction de l'arthrite : « saines » ou « healthy »
- Un groupe de souris chez lesquelles nous avons induit une arthrite et qui ont reçu le véhicule : « AIC contrôles » ou « CIA controls »
- Un groupe de souris chez lesquelles nous avons induit une arthrite et qui ont reçu l'antagoniste du récepteur CCR3 (GW766994) : « AIC + 10mg/kg/j GW766994 » ou « CIA + 10mg/kg/d GW766994 »

L'arthrite au collagène de type 2 a été induite au jour 0 (J0) par une injection intradermique de 100µg de collagène de type 2 bovin émulsifiés dans l'adjuvant complet de Freund. Vingt-et-un jours (J21) après l'induction de l'arthrite une deuxième injection de collagène de type 2 a été effectuée. L'antagoniste du récepteur CCR3 dissous dans du NaCl 0,9% (appelé GW766994) a été administré à une dose de 10mg/kg quotidiennement par

injection intra-péritonéale. Le traitement a débuté 15 jours (J15) après l'induction de l'arthrite. Les souris du groupe « AIC contrôles » ont reçu quotidiennement le même volume de NaCl 0,9%.

La sévérité de l'arthrite a été évaluée quotidiennement grâce à un score préalablement validé. Les souris ont été mises à mort 39 jours (J39) après l'induction de l'arthrite. Des analyses histologiques ont été réalisées sur les chevilles. Ces analyses ont été complétées par la mesure de l'expression des gènes de l'inflammation et d'enzymes de dégradation de la matrice cartilagineuse dans les poignets par RT-PCR. Nous avons également quantifié les lymphocytes Th17, T_{reg} et les cellules ILC3 dans les ganglions poplités par cytométrie en flux et recherché les cellules positives pour le récepteur CCR3 dans les articulations par immunohistochimie. L'IL-6 et les anticorps anti-collagène de type 2 circulants ont été quantifiés par ELISA.

I.3. Synthèse des résultats

Cette étude a fait l'objet d'une publication qui est en cours de finalisation.

CCR-3 inhibition by a small molecule antagonist reduces collagen-induced arthritis severity

Hablot J, Mariotte A, Koufany M, Bastien C, Netter P, Reboul P, Georgel P, Peyrin-Biroulet L, Jouzeau JY, Moulin D.

Cette publication est référencée en annexe n°1, publication 2.

Résumé de la publication :

Introduction

Les chimiokines sont des médiateurs physiopathologiques clés dans la phase précoce de l'arthrite. L'éotaxine et RANTES, deux chimiokines considérées comme des cibles thérapeutiques potentielles dans l'arthrite, sont des ligands du récepteur CCR3 (CC Chemokine Receptor 3). Le GW766994, un antagoniste puissant et sélectif de CCR3 a été développé dans le traitement de l'asthme et plus récemment testé dans un modèle expérimental de néovascularisation choroïdienne.

Objectif

L'objectif de cette étude était d'étudier l'effet de l'inhibition du récepteur CCR3 par le GW766994 sur le développement de l'arthrite au collagène (AIC) chez la souris.

Matériel et méthodes

L'AIC a été induite chez des souris DBA/1J mâles par injection de 100µg de collagène de type II bovin émulsifiés dans de l'adjuvant complet de Freund à la base de la queue. Une deuxième injection a été effectuée au jour 21. Les souris ont été traitées quotidiennement à partir du jour 15 avec 10mg/kg de GW766994 par voie ip. Les souris ont été suivies régulièrement et la sévérité de l'arthrite a été évaluée grâce à un score clinique macroscopique et par mesure du volume de l'œdème des pattes postérieures par plethysmographie. Au jour 39, des analyses histologiques ont été réalisées sur les chevilles après une coloration HES et safranine-O fast green. Le sang a été collecté et le taux d'IL-6 sérique a été quantifiée par Multiplex et les anticorps anti-collagène de type II ont été quantifiés par ELISA.

Résultats

L'inhibition du récepteur CCR3 a retardé et a réduit l'incidence et la sévérité de l'arthrite, comme le démontre les paramètres cliniques (score arthritique de $8,3 \pm 1,6$ pour le groupe de souris traitées avec le véhicule vs $3,7 \pm 1,2$ pour le groupe de souris traitées avec le GW766994 au jour 39). Les analyses histologiques ont indiqué que le GW766994 a réduit l'hyperplasie de la membrane synoviale et a limité la dégradation du cartilage dans les articulations arthritiques. Les taux d'IL-6 et d'anticorps anti-collagène de type II ont été réduits chez les souris traitées avec l'antagoniste de CCR3 en comparaison avec les souris arthritiques non traitées.

Conclusion

Ainsi, notre étude montre que CCR3 a un rôle important dans le développement de l'arthrite le désigne comme une cible thérapeutique potentielle.

Synthèse des résultats

Les premiers symptômes arthritiques apparaissent 15 jours et 20 jours après l'induction de l'arthrite dans les groupes « AIC contrôles » et « AIC + 10mg/kg/j GW766994 » respectivement. La sévérité de l'arthrite augmente progressivement du jour de l'apparition des premiers symptômes (J15) à la mise à mort des souris (J39) pour le groupe « AIC contrôles ». La sévérité de l'arthrite se stabilise 33 jours après l'induction de l'arthrite pour les souris du groupe « AIC + 10mg/kg/j GW766994 ». Les souris de ce groupe développent une arthrite significativement moins sévère que celles du groupe « AIC contrôles ».

Les analyses histologiques et moléculaires des articulations des souris confirment que les souris du groupe « AIC + 10mg/kg/j GW766994 » développent une arthrite moins sévère que celle du groupe « AIC contrôles ». En effet, l'hyperplasie de la membrane synoviale et l'infiltration de cellules immunitaires sont significativement moins importantes dans les chevilles des souris du groupe « AIC + 10mg/kg/j GW766994 ». Par ailleurs, les gènes de l'inflammation IL-1 β , iNOS et IL-17A sont fortement exprimés dans les poignets des souris du groupe « AIC contrôles » et l'administration du GW766994 diminue l'expression de ces gènes. L'IL-6 et les anticorps anti-collagène de type 2 sont présents en moins grande concentration dans le sérum des souris du groupe « AIC + 10mg/kg/j GW766994 » que dans celui des souris du groupe « AIC contrôles ».

Les atteints structurales sont également atténuées après administration du GW766994. En effet, les scores histologiques montrent que la dégradation du cartilage et l'érosion de l'os sont significativement moins importantes. Par ailleurs, les gènes ADAMTS4 (A disintegrin and metalloproteinase 4) et MMP3 sont fortement exprimés dans les poignets des souris du groupe « AIC contrôles ». Le traitement par GW766994 réduit significativement l'expression de ces gènes.

Les cellules ILC3 et les lymphocytes Th17 sont impliquées dans le développement de l'AIC. Par ailleurs, les lymphocytes T_{reg} contrecarrent les effets de ces cellules. Nous avons quantifié le nombre de lymphocytes Th17 et T_{reg} et les cellules ILC3 dans les ganglions poplités des souris. Ces trois populations cellulaires sont très présentes dans les ganglions poplités des souris du groupe « AIC contrôles » et le traitement par GW766994 diminue significativement leur nombre. Des analyses immunohistochimiques ont révélé que contrairement au groupe « AIC + 10mg/kg/j GW766994 », l'expression du récepteur CCR3 est très marquée dans les articulations des souris du groupe « AIC contrôles ». Les cellules exprimant CCR3 sont majoritairement des PNN.

I.4. Conclusion

Au cours de cette étude, nous avons montré que l'utilisation d'un antagoniste sélectif du récepteur CCR3 réduit la sévérité de l'arthrite au collagène de type 2 chez la souris et retarde l'apparition des premiers symptômes. Cet antagoniste diminue l'inflammation articulaire et la sévérité des dommages structuraux. Il réduit le recrutement des lymphocytes Th17 et T_{reg} et des cellules ILC3, très impliqués dans la physiopathologie de l'AIC, dans les ganglions poplités. Les cellules exprimant le récepteur CCR3 présentes dans les articulations arthritiques sont principalement des PNN.

Objectif 2

Conséquences de l'invalidation génétique du récepteur CCR3 et de son inhibition pharmacologique sur les populations lymphocytaires intestinales

II. Analyse de l'impact de l'inhibition du récepteur CCR3 sur les populations leucocytaires intestinales

II.1. Objectif de l'étude

Dans les conditions homéostatiques, le récepteur aux chimiokines CCR3 participe à la migration des cellules immunitaires de leur site de différenciation vers les tissus périphériques. Il permet également le recrutement de ces cellules sur les sites d'une inflammation aiguë où elles contribuent à l'élimination de l'agent agresseur et/ou à la réparation du tissu lésé. Le récepteur CCR3 a été impliqué dans le développement de pathologies inflammatoires intestinales. De nombreuses cellules immunitaires telles que les lymphocytes Th17 et les PNE sont principalement localisées dans le tractus digestif. Ces cellules ont aussi été impliquées dans des pathologies inflammatoires. Dans cette seconde partie, nous avons analysé les conséquences de l'inhibition ou l'invalidation du récepteur CCR3 sur l'immunité intestinale dans les conditions homéostatiques dans la perspective de réaliser la même étude chez des animaux développant une inflammation digestive ou articulaire.

II.2. Matériel et méthodes

II.2.1. Obtention des souris CCR3^{+/+} et CCR3^{-/-}

Nous possédons au laboratoire des souris de fond génétique BALB/c sauvages (que nous appellerons souris CCR3^{+/+}) et des souris BALB/c déficientes pour le récepteur CCR3 (que nous appellerons souris CCR3^{-/-}). Le génotype des souris a été vérifié par génotypage. Pour cela, une biopsie d'oreille est prélevée. L'ADN est extrait par dissolution du tissu dans une solution composée de NaOH (25mM) (*Carlo Erba Reagents, Fr.*) et de Na₂EDTA (2mM) (*Fisher Scientific, UK*), pH 12. Les échantillons sont incubés 10 minutes à 37°C puis du tris-HCl, pH 5 (*Euromedex, Fr.*) est ajouté. Une PCR semi-quantitative est réalisée sur chaque échantillon : l'ADN génomique est ajouté à un mélange réactionnel (HotStartTaq Plus Master Mix (*Qiagen, USA*)) composé d'une ADN polymérase, de désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) et d'un tampon propice à l'activité de l'enzyme. Les deux couples d'amorces 5'-TGG CAT TCA ACA CAG ATG AAA-3'/5'- CAT GAC CCC AGC TCT TTG AG-3' et 5'-CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC-3'/5'-AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC-3' permettant d'amplifier la forme sauvage et mutante du gène codant le récepteur CCR3 respectivement sont ajoutés au mélange réactionnel. Le volume est ajusté à 20µl avec de l'eau DNase free. Les échantillons sont chauffés à 95°C pendant 15 minutes pour activer l'enzyme, puis 35 cycles d'amplification sont effectués. Chaque cycle comprend une étape de dénaturation des brins

d'ADN à 94°C pendant 1 minute, puis une étape à 62°C permettant l'hybridation des amorces pendant 1 minute et une étape d'élongation est réalisée à 72°C pendant 1 minute. A la fin du dernier cycle les échantillons sont chauffés à 72°C pendant 10 minutes. Les produits de PCR sont analysés, après migration sur un gel d'agarose à 2% contenant du GelGreen® (*Biotium, USA*), sous une lampe UV. Les souris présentant une bande à 120pb ont un phénotype sauvage, celles ayant une bande à 280pb sont déficientes pour le récepteur CCR3 et celles présentant les deux bandes sont hétérozygotes pour le récepteur CCR3.

II.2.2. Traitement des souris

Pour mener à bien notre étude nous avons utilisé des souris mâles âgés de 6 à 7 semaines. Trois groupes ont été réalisés :

- Un groupe de souris CCR3^{+/+} recevant du NaCl 0,9% : « CCR3^{+/+} + NaCl 0,9% »
- Un groupe de souris CCR3^{+/+} recevant l'antagoniste de CCR3 : « CCR3^{+/+} + 10mg/kg/j GW766994 »
- Un groupe de souris CCR3^{-/-} recevant du NaCl 0,9% : « CCR3^{-/-} + NaCl 0,9% »

L'antagoniste du récepteur CCR3, le GW766994, dissous dans du NaCl 0,9% a été administré quotidiennement à une dose de 10mg/kg par injection intra-péritonéale. Les souris ne recevant pas le traitement ont subi une injection de NaCl 0,9% quotidiennement. Le traitement a été effectué pendant 20 jours.

II.2.3. Quantification des leucocytes dans la *lamina propria* de l'intestin grêle et des ganglions mésentériques par cytométrie en flux

II.2.3.1. Extraction des cellules

✧ Cellules des ganglions mésentériques

Les ganglions mésentériques sont prélevés après mise à mort des souris et déposés dans du milieu DMEM enrichi en glucose (*Gibco, UK*), supplémenté avec 10% de SVF (*Dutscher, Fr.*) et 1% de L-glutamine à 200mM (*Gibco, UK*). Les cellules sont extraites en broyant les ganglions sur un tamis cellulaire de 70µm. Les cellules sont récupérées dans un tube contenant 5ml de milieu, comptées au lecteur de cellules (*Bio-Rad, USA*), puis centrifugées à 350g pendant 10 minutes et le culot est repris dans un volume adapté pour obtenir une concentration cellulaire finale de 4 millions par millilitre.

✧ Cellules de la *lamina propria*

Les intestins sont prélevés et après avoir éliminé les PP, ils sont ouverts longitudinalement et lavés dans du PBS froid. Ils sont ensuite incubés pendant 45 minutes dans du PBS dans lequel ont été ajoutés 30mM d'EDTA, à 4°C. Les intestins sont lavés plusieurs fois par agitation dans des bains de PBS. Ils subissent ensuite trois digestions enzymatiques successives par incubation pendant 20 minutes à 37°C dans du milieu DMEM contenant deux enzymes, la libérase TL (*Roche, All.*), à une concentration de 50µg/ml, et la DNase (*Sigma, USA*), à une concentration de 2U/ml. Après chaque incubation, le surnageant est filtré à travers un filtre de 100µm et les cellules sont récupérées dans 5ml de milieu supplémenté avec 10% de SVF. Elles sont ensuite centrifugées à 350g pendant 10 minutes puis le culot est repris dans 5ml de Percoll™ (*GE Healthcare, Fr.*) à 40%. Le même volume de Percoll™ à 80% est glissé sous le Percoll™ 40% grâce à une pipette Pasteur. Les cellules sont alors centrifugées à 2800rpm pendant 15 minutes et l'anneau de leucocytes est recueilli à l'interface entre les deux Percoll™. Ces cellules sont comptées au compteur de cellules et de nouveau centrifugées. Le culot cellulaire est repris dans un volume de milieu permettant d'obtenir une concentration cellulaire finale de 4 millions par millilitre.

II.2.3.2. Marquage des cellules et analyse par cytométrie en flux

Le marquage des cellules s'effectue sur 1 million de cellules, donc à partir de 250µl de chaque échantillon déposés dans une plaque 96 puits à fond rond. Elles sont centrifugées à 350g pendant 5 minutes et sont lavées avec 200µl de PBS. Elles sont ensuite incubées pendant 15 minutes dans le noir à température ambiante dans 100µl de Zombie Aqua (*BioLegend, USA*), un marqueur de viabilité, dilué au 1000^{ème} dans du PBS. Les cellules sont ensuite centrifugées à 350g pendant 5 minutes et sont lavées avec 200µl de BSA à 1% dans du PBS à 1% dans du PBS. Un blocage des récepteurs Fc est réalisé par incubation des cellules dans 50µl de Fc block (*BioLegend, USA*) dilué au 50^{ème} pendant 15 minutes dans le noir à 4°C. Puis le marquage extracellulaire est effectué. Deux panels d'anticorps ont été réalisés au cours de cette étude, un panel permettant de quantifier les lymphocytes Th1, Th2 et Th17 et un panel permettant la détection des lymphocytes T_{reg} (**Tableau 6**). Pour réaliser le marquage extracellulaire, les cellules sont incubées pendant 15 minutes dans le noir à 4°C avec un mélange de l'ensemble des anticorps détectant des protéines de surface (en rose dans le **tableau 6**). A la fin de l'incubation, les cellules sont centrifugées à 350g pendant 5 minutes et lavées avec 200µl de BSA à 1% dans du PBS. Elles sont ensuite incubées toute la nuit à 4°C dans un tampon de

fixation (*ebioscience, USA*). Le lendemain, les cellules sont lavées avec 200µl de BSA à 1% dans du PBS puis deux fois avec un tampon de perméabilisation (*ebioscience, USA*). Puis elles sont incubées pendant 1 heure, à 4°C avec les anticorps marquant les protéines intra-nucléaires appropriées à chaque panel (en vert dans le **Tableau 6**). Après un lavage au tampon de perméabilisation, les cellules sont reprises dans 300µl de BSA à 1% dans du PBS et transférées dans des tubes adéquats pour le cytomètre en flux (*Beckman Coulter*). Les analyses sont effectuées grâce au logiciel Kaluza™.

Tableau 6 : Panels d'anticorps utilisés pour la détection des populations leucocytaires en cytométrie en flux

Panel de détection des Th1				
Protéine	Fluorochrome	Hôte	Isotype	Fournisseur
CD45	BV421	Rat	IgGb, kappa	BioLegend
CD4	FITC	Rat	IgG2a, kappa	BioLegend
CD3	APCFire750	Rat	IgG2b, kappa	BioLegend
T-Bet	PE/Dazzle 594	Souris	IgG1, kappa	BioLegend
Panel de détection des Th2				
CD45	BV421	Rat	IgGb, kappa	BioLegend
CD4	FITC	Rat	IgG2a, kappa	BioLegend
CD3	APCFire750	Rat	IgG2b, kappa	BioLegend
GATA3	PE/cy7	Rat	IgG1, kappa	eBioscience
Panel de détection des Th17				
CD45	BV421	Rat	IgGb, kappa	BioLegend
CD3	APCFire750	Rat	IgG2b, kappa	BioLegend
CD4	FITC	Rat	IgG2a, kappa	BioLegend
RORγt	APC	Rat	IgG2a	eBioscience
Panel de détection des T _{reg}				
CD45	BV421	Rat	IgGb, kappa	BioLegend
CD3	APCFire750	Rat	IgG2b, kappa	BioLegend
CD4	FITC	Rat	IgG2a, kappa	BioLegend
CD25	APC	Rat	IgG1, lambda	BioLegend
FoxP3	PE	Mouse	IgG1, kappa	BioLegend

II.3. Résultats

L'inhibition de CCR3 ou son invalidation augmente la proportion de lymphocytes Th1 et des lymphocytes T_{reg} dans la muqueuse digestive (**Figure 55A** et **55D** respectivement). La proportion de lymphocytes Th2 est similaire en présence et en absence du récepteur CCR3 (**Figure 55B**) alors que la population Th17 est diminuée dans les groupes « CCR3^{+/+} + 10mg/kg/j GW766994 » et « CCR3^{-/-} » (**Figure 55C**). Ces résultats doivent être confirmés en augmentant le nombre de souris de l'étude.

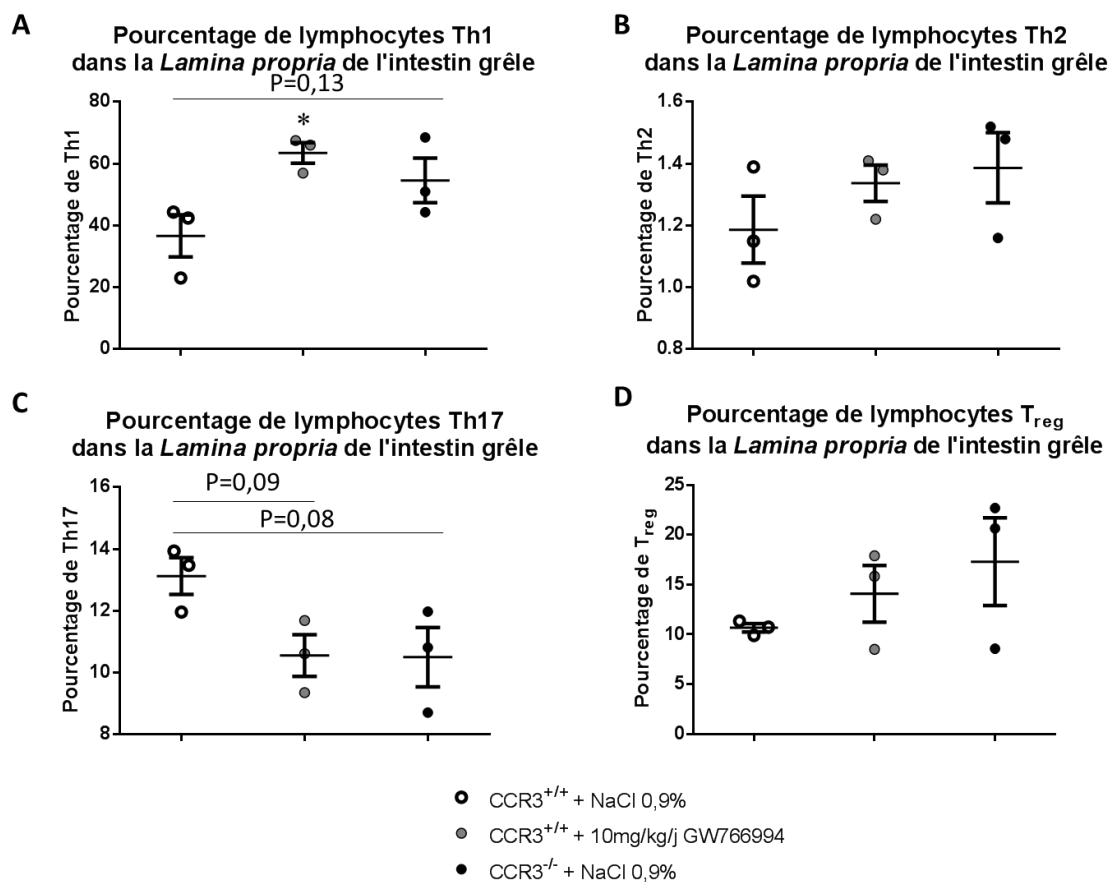


Figure 55 : **Conséquences de l'invalidation du récepteur CCR3 sur les proportions de lymphocytes intestinaux.**

La proportion de lymphocytes Th1 (**A**), Th2 (**B**), Th17 (**C**) et T_{reg} (**D**) a été déterminée au sein des *lamina propria* de l'intestin grêle par cytométrie en flux (n=3). Les résultats correspondent à la moyenne ± SEM. Une différence significative entre deux groupes est indiquée par un astérisque (*= p<0,05).

Nous avons également étudié les populations lymphocytaires Th1, Th2, Th17, T_{reg} dans les organes lymphoïdes (rate et ganglions mésentériques) (**Figures 56 et 57**). Nous avons montré qu'il n'existe pas de différence pour ces quatre populations dans la rate (**Figure 56**). Les lymphocytes Th1, Th2 et Th17 sont présents de façon similaire dans les ganglions mésentériques des souris des trois groupes (**Figures 57A, B et C**). En revanche, les lymphocytes T_{reg} sont significativement plus abondants chez les souris ayant reçu le GW766994 que chez les souris sauvages ou déficientes pour CCR3 traitées avec du NaCl 0,9% (**Figure 57D**). Ces résultats suggèrent que l'antagoniste de CCR3 pourrait avoir un effet stimulant sur certaines populations T_{reg} qui serait indépendant du blocage de CCR3.

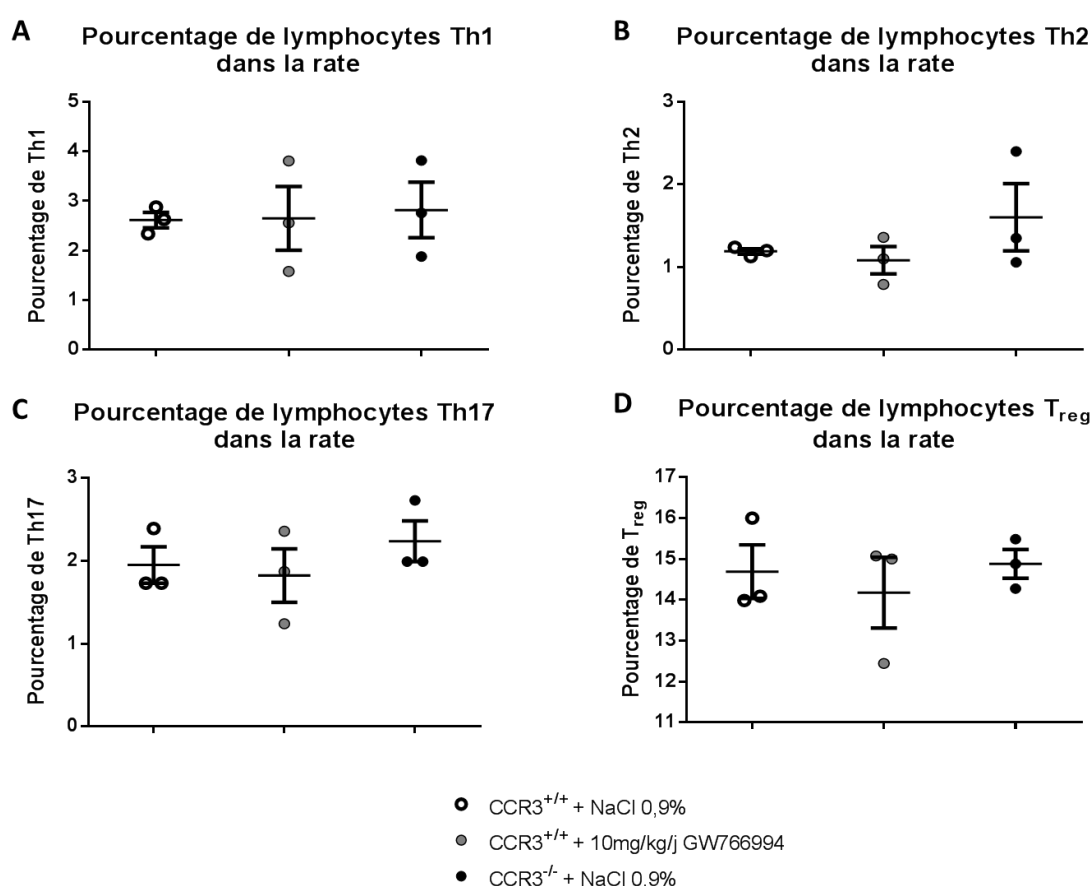


Figure 56 : Conséquences de l'inactivation du récepteur CCR3 sur les proportions de lymphocytes dans la rate.

La proportion de lymphocytes Th1 (**A**), Th2 (**B**), Th17 (**C**) et T_{reg} (**D**) a été déterminée au sein de la rate par cytométrie en flux (n=3). Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM. Une différence significative entre deux groupes est indiquée par un astérisque (*= $p < 0,05$).

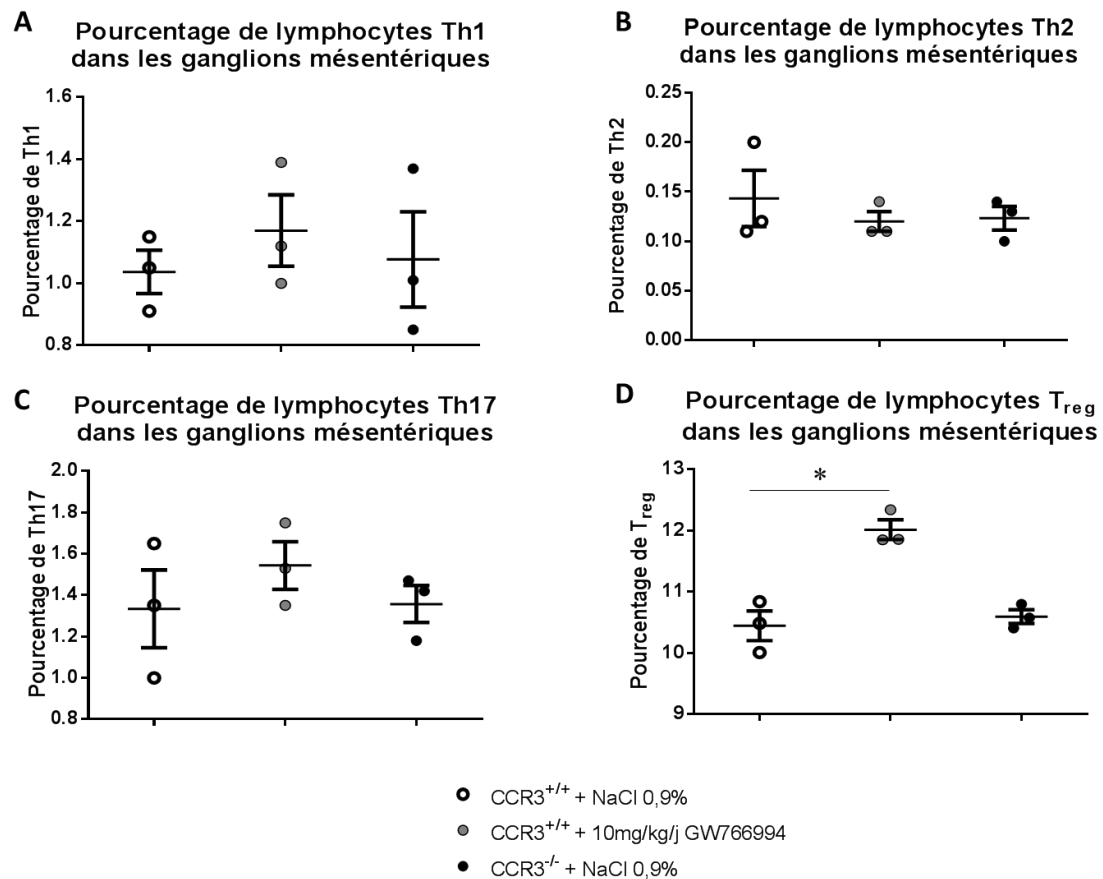


Figure 57 : **Conséquences de l'inactivation du récepteur CCR3 sur les proportions de lymphocytes ganglionnaires.**

La proportion de lymphocytes Th1 (A), Th2 (B), Th17 (C) et T_{reg} (D) a été déterminée au sein des ganglions mésentériques par cytométrie en flux (n=3). Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM. Une différence significative entre deux groupes est indiquée par un astérisque (*= $p < 0,05$).

II.4. Conclusion et perspectives

Le récepteur CCR3 est exprimé à la surface de plusieurs cellules immunitaires telles que les PNE, les PNB, les lymphocytes Th2 et les mastocytes. Dans les conditions homéostatiques, ce récepteur est impliqué dans la migration des cellules immunitaires de leur site de différenciation vers les tissus périphériques. Son inhibition ou son invalidation modifie la localisation de certaines de ces cellules puisque, par exemple, les souris CCR3^{-/-} ont une augmentation du nombre de PNE dans la rate et une réduction de ce nombre dans la *lamina propria* intestinale (Humbles et al. 2002). La muqueuse intestinale est riche en cellules immunitaires qui défendent l'organisme contre les agents infectieux et participent au maintien de l'homéostasie intestinale. Les lymphocytes sont largement impliqués dans ce processus ; par exemple, les lymphocytes Th17, dans les conditions homéostatiques, sont principalement localisés dans le dernier tiers de l'intestin grêle. Nous avons montré que l'inhibition pharmacologique ou l'invalidation génétique du récepteur CCR3 modifie la représentation des sous-populations de lymphocytes T helper et des lymphocytes T_{reg} dans la *lamina propria* de l'intestin grêle. De façon surprenante, les lymphocytes Th2, qui expriment consécutivement le récepteur CCR3 (Mendez-Enriquez et García-Zepeda 2013), sont présents en proportions similaires chez les souris sauvages et les souris délétées pour CCR3. Ces résultats suggèrent que ces cellules sont différenciées *in situ* ou qu'elles ont migré en utilisant d'autres signaux chimiotactiques. Nous avons mis en évidence que la délétion du récepteur CCR3 provoque une augmentation de la proportion des lymphocytes Th1 et probablement des lymphocytes T_{reg} alors que la proportion des lymphocytes Th17 est diminuée, dans la *lamina propria*. On peut supposer que ces souris auraient une réponse inflammatoire moins importante en réponse à une agression bactérienne. Nous avons observé que les souris BALB/c sont moins sensibles au développement d'une colite au DSS que les souris C57BL/6, ce qui confirme des travaux antérieurs (F. Yang et al. 2017) (**Figure 58**). En effet, dans notre étude toutes les souris de fond génétique C57BL/6 ont développé la colite et ce en moins de 3 jours après le début de l'administration du DSS. Dans le groupe des souris de fond génétique BALB/c, l'incidence a augmenté progressivement du quatrième jour au septième jour et l'incidence maximale de 83,3% n'a été atteinte qu'à J7 (**Figure 58A**). Le score DAI et le pourcentage de perte de poids par rapport à J0 ont également été moins importants chez les souris BALB/c que chez les souris C57BL/6 (**Figures 58B et C**). Yang et ses collaborateurs ont montré que dans la muqueuse intestinale des souris BALB/c les lymphocytes sont davantage de types Th2, Th17 et T_{reg} alors que chez les souris C57BL/6 les

lymphocytes sont plutôt de type Th1 (F. Yang et al. 2017). Ainsi, les souris BALB/c sont partiellement protégées de la colite au DSS.

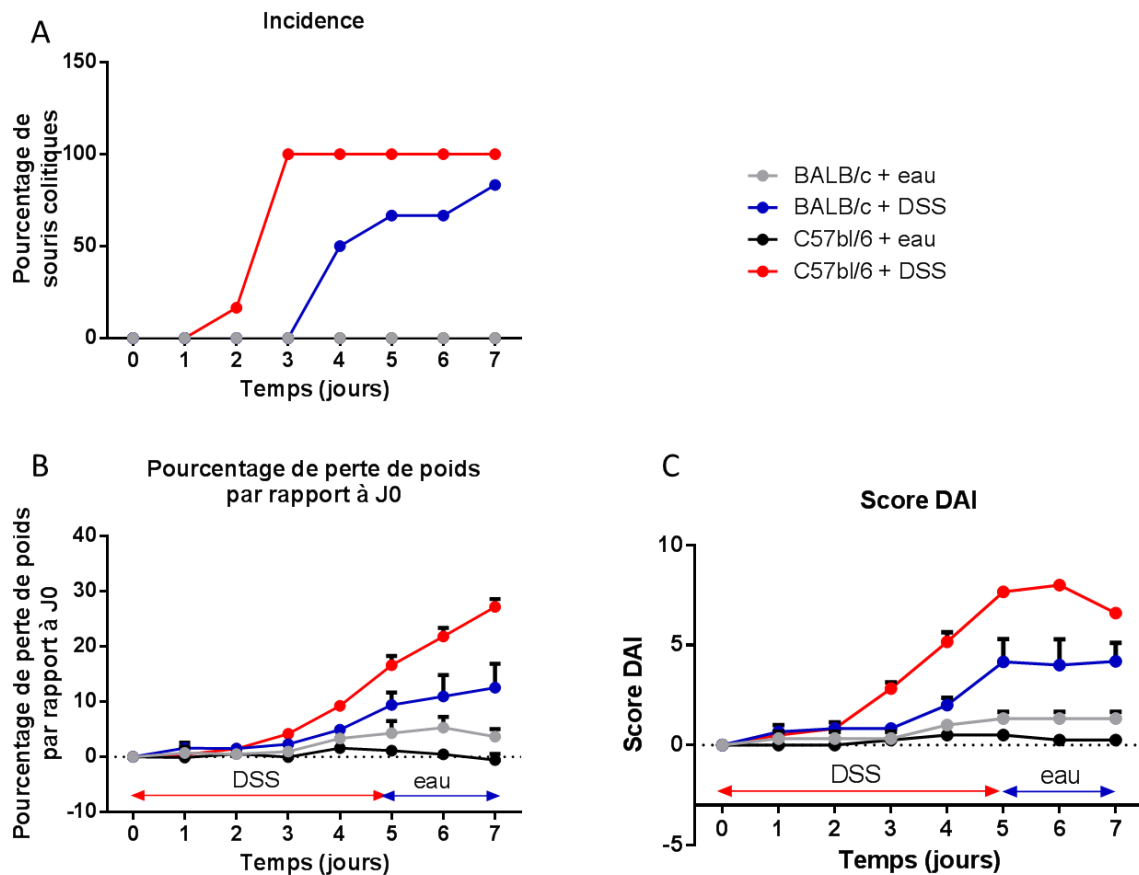


Figure 58 : Evaluation de l'impact du fond génétique des souris sur le développement d'une colite au DSS

Une colite a été induite par l'administration de 3% de DSS dans l'eau de boisson de souris de fond génétique BALB/c et C57BL/6 pendant 5 jours puis les souris ont reçu 3 jours d'eau avant leur mise à mort. Nous avons suivi l'incidence (A), la perte de poids (B) et la sévérité de la colite grâce à un score clinique préalablement défini (C) (n=6). Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM.

Nous avons montré que, dans le fond génétique BALB/c, les souris déficientes pour le récepteur CCR3 ont une immunité orientée Th1, ce qui suggère qu'elles devraient être plus sensibles au développement de la colite au DSS que les souris CCR3^{+/+}. Nous avons induit cette pathologie chez des souris CCR3^{+/+}, des souris CCR3^{-/-} et des souris CCR3^{+/+} recevant l'antagoniste de CCR3 (GW766994) à une dose de 10mg/kg/j par voie orale pendant toute la durée du protocole de colite. Nous avons suivi quotidiennement l'incidence et la sévérité de la pathologie (Figure 59). Nous avons montré que l'inhibition ou l'absence du récepteur CCR3 augmente l'incidence et la sévérité de la colite. Ainsi, le déséquilibre des populations lymphocytaires observé dans les conditions homéostatiques semble influencer la sévérité des

pathologies inflammatoires chez ces souris. L'élimination des PNE par délétion de gènes impliqués dans la production de ces cellules engendre une modification de la sévérité de la colite au DSS qui est différente selon les études. Masterson et ses collaborateurs ont montré que les souris PHIL, dépourvues de PNE, développent une colite au DSS plus sévère que les souris sauvages (Masterson et al. 2015). A l'inverse, Ahrens et ses collaborateurs ont rapporté que ces mêmes souris développent une colite moins sévère que les souris sauvages (Ahrens et al. 2008). Par ailleurs, les souris $\Delta dbfGATA$ également dépourvues de PNE, mais aussi de PNB, développent une colite au DSS moins sévère que les souris BALB/c sauvages (Vieira et al. 2009). La divergence observée entre ces études est probablement due aux conditions expérimentales. Vieira et ses collaborateurs utilisent une concentration de DSS de 4% alors que Masterson et nous avons utilisé une concentration de 3%. Par ailleurs, la déplétion des PNB chez les souris $\Delta dbfGATA$ peut aussi influencer la sévérité de la colite. Dans notre étude, nous utilisons des souris déficientes pour le récepteur CCR3, qui possèdent des PNE et d'autres cellules exprimant ce récepteur, ce qui peut avoir des conséquences sur la sévérité de la pathologie.

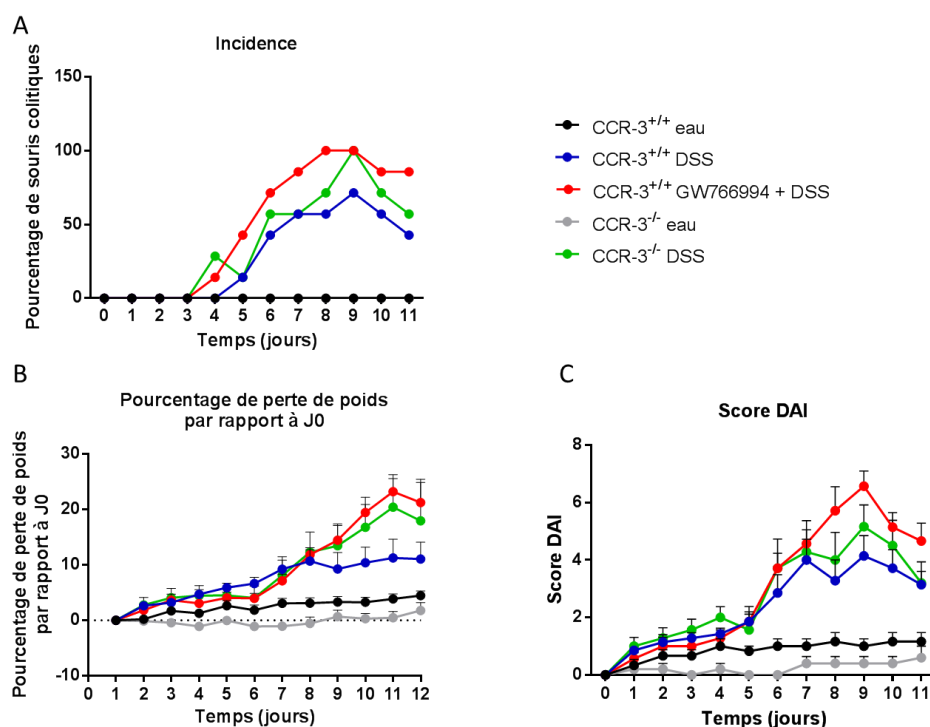


Figure 59 : Conséquence de l'inhibition du récepteur CCR3 sur l'incidence et la sévérité d'une colite au DSS

Une colite a été induite par administration de 3% de DSS dans l'eau de boisson de souris CCR3^{+/+}, CCR3^{+/+} recevant le GW766994 à une dose de 10mg/kg/j pendant toute la durée du protocole et de souris CCR3^{-/-}. Nous avons suivi l'incidence (A), la perte de poids (B) et la sévérité de la colite grâce à un score clinique préalablement défini (C) (n=7). Les résultats correspondent à la moyenne $\pm$ SEM.

Dans la colite au DSS chez la souris BALB/c, l'injection par voie intrapéritonéale d'un anticorps ciblant la chimiokine CCL11 aux jours J0 et J4 réduit la sévérité de la pathologie à la fin du protocole, soit J7 (Adar et al. 2016). De même, l'utilisation d'un anticorps anti-CCR3 chez des souris développant spontanément une iléite, après l'apparition des premiers symptômes d'inflammation intestinale, réduit la sévérité de la pathologie (Masterson et al. 2011). L'administration d'un anticorps ciblant CCR3, après la phase d'immunisation, chez des souris BALB/c subissant une inflammation intestinale induite par administration d'ovalbumine réduit la sévérité de l'inflammation (Song et al. 2017). Dans notre étude nous administrons l'antagoniste de CCR3 quotidiennement à partir du premier jour de l'administration du DSS par voie orale. Ces résultats suggèrent que l'impact de l'inhibition de CCR3 sur la sévérité de la colite dépend du moment de son inhibition et/ou du mode d'injection de la molécule ciblant CCR3.

Des auteurs tels que Scher et Abramson et Ranganathan et ses collaborateurs suggèrent que l'immunité intestinale, en association avec le microbiote, peut influencer le développement de pathologies inflammatoires extra-intestinales et notamment la PR et la SpA (Scher et Abramson 2011 et Ranganathan et al. 2017). La déplétion du récepteur CCR3 engendrant un déséquilibre des populations lymphocytaires Th17 et T_{reg}, et les lymphocytes Th17 ayant un rôle prédominant dans l'AIC, nous avons émis l'hypothèse que la diminution de la sévérité de l'arthrite induite par l'antagoniste de CCR3 pourrait être liée à une modification des populations leucocytaires intestinales. Ainsi, nous envisageons d'étudier ces populations lymphocytaires dans les groupes « saines », « AIC contrôles » et « AIC + 10mg/kg/j GW766994 ». Nous envisageons également de comparer la sévérité d'une AIC chez des souris CCR3^{+/+} et CCR3^{-/-}. Les souris CCR3^{-/-} que nous possédons actuellement au laboratoire sont dans le fond génétique BALB/c. Ce dernier n'étant pas susceptible au développement de l'AIC, nous transférons actuellement la déficience du récepteur CCR3 dans le fond génétique DBA/1. Par ailleurs, cette modification des populations lymphocytaires chez les souris ayant une inhibition du récepteur CCR3 pourrait être liée à une dysbiose intestinale. Nous envisageons également d'analyser la composition du microbiote intestinal des souris sauvages ou déficientes pour le récepteur CCR3 dans les conditions homéostatiques et pathologiques.

Par ailleurs, les populations lymphocytaires Th1, Th2, Th17 et T_{reg} sont présentes dans les mêmes proportions dans la rate des souris sauvages ou déficientes pour CCR3. Dans les ganglions mésentériques, l'antagoniste de CCR3, contrairement à l'inactivation du gène codant cette protéine, entraîne une augmentation de la proportion des lymphocytes T_{reg}. Les autres

populations lymphocytaires ne sont pas impactées. Ces résultats suggèrent que le GW766994 aurait des effets indépendants de l'inhibition de CCR3. Il semble induire une augmentation de la migration et/ou de la séquestration des lymphocytes T_{reg} dans les ganglions mésentériques.

Discussion générale et perspectives

Les muqueuses, et notamment la muqueuse digestive, sont en interaction permanente avec l'environnement extérieur. Elles sont ainsi en contact avec de potentiels agents infectieux et ont un rôle primordial dans la protection de l'organisme. De nombreuses stratégies sont mises en place afin d'empêcher l'entrée d'agents pathogènes et de maintenir l'homéostasie intestinale. La première ligne de défense est l'épithélium intestinal. Les entérocytes composant l'épithélium intestinal sont liés les uns aux autres par des jonctions serrées, des desmosomes et des jonctions communicantes afin de former une barrière imperméable aux micro-organismes de la lumière intestinale. Par ailleurs, le mucus synthétisé par les cellules caliciformes et les peptides antimicrobiens sécrétés par les cellules de Paneth contribuent à maintenir une distance entre les micro-organismes du microbiote intestinal et l'épithélium. Des lymphocytes intra-épithéliaux, localisés entre les entérocytes, participent également à la défense de l'organisme. Les leucocytes présents dans la *lamina propria* intestinale représentent une deuxième ligne de défense contre l'entrée d'agents pathogènes. Ces leucocytes participent aussi activement au maintien de l'homéostasie intestinale. La nature de ces cellules est variée ; des cellules des immunités innée et adaptative sont présentes dans la *lamina propria* qui est considérée comme un « réservoir » pour certaines cellules immunitaires. C'est notamment le cas pour les cellules de l'immunité de type 3, en particulier les lymphocytes Th17 et les cellules lymphoïdes ILC3. Des cellules de l'immunité de type 2 sont également localisées dans la muqueuse intestinale ; par exemple, les PNE sont principalement présents dans les poumons, la rate et le tractus digestif dans les conditions homéostatiques.

Les leucocytes de la *lamina propria* veillent au maintien de l'homéostasie intestinale ; ils sont en étroite interaction avec le microbiote intestinal et participent à sa stabilité. Le microbiote intestinal, composé de bactéries, virus, archées et levures, est un acteur indispensable à la survie de l'organisme. Les micro-organismes commensaux synthétisent des métabolites essentiels, digèrent des éléments nutritifs et limitent la prolifération de micro-organismes pathogènes notamment en occupant l'espace (Eid et al., 2017). Par ailleurs, le microbiote intestinal est fortement impliqué dans le développement du système immunitaire de l'organisme hôte. En effet, les souris axéniques ont un système immunitaire peu développé caractérisé par des PP et des FLI moins nombreux et plus petits et l'activité des lymphocytes T et B est altérée (Macpherson et Uhr 2004, Bouskra et al., 2008 et Chung et al., 2012). En contrepartie, le système immunitaire intestinal favorise la présence des micro-organismes commensaux ; il est tolérant face à ces derniers. Des mécanismes sont mis en place afin d'éviter une activation accrue du système immunitaire de la *lamina propria* face à ces micro-organismes

commensaux. En effet, l'immunité régulatrice intestinale (en particulier avec les lymphocytes T_{reg}) est très développée et contrôle l'activation des cellules lymphocytes T helper (Roncarolo et al., 2014). Des cellules localisées préférentiellement dans la muqueuse de l'intestin grêle dans les conditions homéostatiques ont un rôle majeur dans des pathologies inflammatoires extra-intestinales telles que l'arthrite. Par ailleurs, la plupart des patients développant un RIC ont un microbiote intestinal dysbiotique.

Malgré les différentes stratégies mises en place pour maintenir l'homéostasie intestinale, une inflammation incontrôlée peut survenir et entraîner le développement de MICI. Les principales MICI sont la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). Ces pathologies sont caractérisées par une inflammation de la paroi d'une ou plusieurs parties du tractus digestif. Les patients atteints d'une de ces pathologies ont un microbiote intestinal dysbiotique, caractérisé par une diminution de la diversité microbienne et par une modification de sa composition (Matsuoka et al., 2015). Le microbiote intestinal de ces patients comprend notamment une plus faible proportion de bactéries appartenant au phylum des Firmicutes et une augmentation des bactéries du phylum des Protéobactéries. Une dysbiose intestinale est également observée au cours du développement de pathologies inflammatoires extra-intestinales. Les patients atteints d'arthrite, en particulier de PR et de SpA, ont un microbiote intestinal dysbiotique (Breban et al., 2017). Par ailleurs, les patients atteints de MICI peuvent développer des manifestations extra-intestinales, parmi lesquelles figurent l'inflammation articulaire ; 17 à 39% des patients atteints de MICI développent une SpA (Gionchetti et al., 2015 et Asquith et al., 2014). Parallèlement, des 5 à 10% des patients atteints de SpA développent une MICI (Taurog et al., 2016 et Kasbeerdoss et al., 2016). Dans ce contexte, nous avons évalué l'impact d'une colite au DSS sur le développement d'une AIC préalablement induite. Nous avons montré que la colite retarde l'apparition des premiers symptômes d'arthrite et réduit la sévérité de la pathologie. En revanche, le développement de l'arthrite n'impacte pas la sévérité de la colite. L'induction d'une colite au DSS chez la souris provoque une dysbiose intestinale caractérisée par une diminution de la diversité et une modification de la composition du microbiote (Yeom 2016). Nous avons mis en évidence que le microbiote fécal des souris développant une colite et une arthrite est différent de celui des souris ne développant seulement une AIC. Le microbiote des souris influence leur susceptibilité au développement de cette pathologie (Gomez et al., 2012 et Liu et al., 2016). Par ailleurs, l'élevage de souris en conditions stériles ou l'utilisation d'antibiotique affectent la sévérité de l'arthrite chez la souris (Wu, 2010 et Dorozynska et al., 2014). Ainsi, nos résultats suggèrent que l'induction d'une colite protège

les souris contre le développement d'une AIC, et ce probablement *via* une modification du microbiote intestinal.

Le récepteur activé par le récepteur PPAR γ est impliqué dans l'homéostasie des métabolismes glucidique et lipidique ; il est indispensable à la différenciation des adipocytes et au stockage des lipides. PPAR γ participe également à l'homéostasie intestinale ; son activation est étroitement liée avec le microbiote intestinal. En effet, des métabolites produits par des bactéries commensales, comme l'acide linoléique et le butyrate, activent le récepteur PPAR γ (Devillard et al., 2007 et Nepelska et al., 2017). L'activation de ce récepteur dans les cellules épithéliales coliques stimule leur production de peptides antimicrobiens et participe ainsi à la défense de l'organisme contre des agents pathogènes (Peyrin-Biroulet et al. 2010 et Kundu et al. 2014). Nous avons montré que les souris déficientes pour le récepteur PPAR γ ont une expression des peptides antimicrobiens modifiée par rapport à celle de souris sauvages. Cette variation d'expression est différente selon le peptide antimicrobien considéré et le segment intestinal étudié. En effet, nous avons mis en évidence, comme l'a précédemment montré Peyrin-Biroulet et ses collaborateurs, que l'élimination du récepteur PPAR γ ne modifie pas les α -défensines dans l'intestin grêle et la β -défensine Defb1 dans le colon des souris mais inhibe la synthèse de la défensine Defb10 dans le colon (Peyrin-Biroulet et al. 2010). Nous avons montré que l'inhibition du récepteur PPAR γ peut avoir des effets opposés entre l'intestin grêle et le colon pour un même peptide antimicrobien : l'absence du récepteur PPAR γ induit une augmentation de l'expression de la défensine Defb10 dans l'intestin grêle et une diminution de l'expression de cette défensine dans le colon et le strict contraire est observé pour le peptide antimicrobien Reg3 γ . Le récepteur PPAR γ régule la différenciation des lymphocytes Th17 ; il inhibe l'expression du facteur de transcription ROR γ t, indispensable à la différenciation de ces cellules (Klotz et al., 2009), qui sont impliquées dans le développement de pathologies inflammatoires. Nous avons montré que l'invalidation du récepteur PPAR γ induit une augmentation du nombre total de lymphocytes dans la *lamina propria* de l'intestin grêle. Cependant, la proportion de lymphocytes Th17 est plus faible dans ce tissu chez les souris PPAR $\gamma^{-/-}$ alors que les proportions des cellules lymphoïdes ILC3 et les lymphocytes T_{reg} sont plus importantes. Par ailleurs, nous avons observé que la cytokine IL-17 est présente de façon similaire dans l'intestin grêle des souris sauvages ou déficientes pour le récepteur PPAR γ . Nos résultats indiquent que le récepteur PPAR γ ne semble pas être un régulateur majeur de la différenciation des lymphocytes Th17, *in vivo*, et que d'autres mécanismes sont mis en place chez les souris PPAR $\gamma^{-/-}$ pour limiter la différenciation de ces cellules. Les variations de

l'expression des peptides antimicrobiens et les modifications de proportions des populations des cellules immunitaires observées chez les souris $\text{PPAR}\gamma^{-/-}$ ne sont pas suffisantes pour déclencher spontanément une inflammation intestinale.

De nombreux travaux, dont ceux de l'équipe, montrent que l'activation du récepteur $\text{PPAR}\gamma$ par des agonistes naturels ou synthétiques réduit la sévérité de l'arthrite chez l'animal et chez l'homme (Koufany et al., 2008, Koufany et al., 2013, Carregaro et al., 2016, Mader et al., 2013, Ormseth et al., 2013, Shahin et al., 2011). Nous avons montré que les souris déficientes pour le récepteur $\text{PPAR}\gamma$ présentent une inflammation articulaire. Dans les articulations de ces souris, nous avons détecté des cellules immunitaires productrices d'IL-17, qui sont majoritairement des mastocytes et quelques lymphocytes. Les patients atteints de pathologies inflammatoires articulaires ont un microbiote dysbiotique (Breban et al., 2017). Nous avons rapporté que le microbiote des souris $\text{PPAR}\gamma^{-/-}$ est différent de celui des souris sauvages. Nous avons montré une augmentation des bactéries appartenant aux familles des Bacteroidaceae et des Enterobacteriaceae et au genre *Sutterella* et une diminution des bactéries appartenant au phylum des Ténérécutes, au genre des *Ruminococcus* et aux familles des Lachnospiraceae et des Mogibacteriaceae. Les patients atteints de PR présentent un microbiote riche en *Ruminococcus*, Enterobacteriaceae et Ténérécutes et une proportion moindre de Lachnospiraceae, de Bacteroidaceae et de *Sutterella* (Breban et al., 2017 et Zhang et al., 2015). Chez les patients atteints de SpA le microbiote fécal est caractérisé par une augmentation des Lachnospiraceae et des Ruminococcaceae et par une diminution des Bacteroidaceae (Breban et al., 2017). Par ailleurs, nous avons montré que le transfert du microbiote fécal des souris $\text{PPAR}\gamma^{-/-}$ n'aggrave pas la sévérité d'une AIC. L'ensemble de ces résultats suggère que le déséquilibre du microbiote fécal des souris $\text{PPAR}\gamma^{-/-}$ n'est pas suffisant pour favoriser le développement d'une arthrite et que les lymphocytes Th17 intestinaux ne sont pas critiques pour l'inflammation articulaire chez les souris $\text{PPAR}\gamma^{-/-}$. Dans les conditions homéostatiques, les lymphocytes Th17 sont davantage présents dans la muqueuse de l'intestin grêle, ainsi nous envisageons d'analyser la composition du microbiote de la lumière de l'intestin grêle.

Les souris $\text{PPAR}\gamma^{-/-}$ n'ont pas de tissu adipeux. Ce dernier est impliqué dans le développement de l'immunité. En effet, par exemple, la leptine, une hormone produite en particulier par les cellules du tissu adipeux blanc, participe à la différenciation des lymphocytes Th17 (Chuang et Tan 2017). En revanche, cette adipokine limite la différenciation des lymphocytes T_{reg} (Zeng et Chi 2015). Le rôle de l'adiponectine sur la différenciation des lymphocytes Th17 est controversé. Il a été montré que cette adipokine supprime la

différenciation des Th17 et limitent ainsi la sévérité de l'encéphalomyélite expérimentale (Zhang et al. 2017), mais d'autres auteurs proposent qu'elle aggrave l'AIC *via* notamment une augmentation des lymphocytes Th17 dans les articulations arthritiques des souris (Sun et al. 2015). Par ailleurs, le nombre de cellules ILC3 recrutées dans les poumons lors du développement d'une inflammation pulmonaire est plus important chez les souris obèses (Everaere et al. 2016). Ainsi, ces études témoignent du rôle complexe que joue le tissu adipeux dans le contrôle de l'immunité. Pour nous affranchir de l'impact potentiel du manque de tissu adipeux chez les souris $\text{PPAR}\gamma^{-/-}$, nous avons développé au laboratoire des souris déficientes pour le récepteur $\text{PPAR}\gamma$ sélectivement dans les cellules $\text{ROR}\gamma\text{t}$ positives. Les premières données obtenues sur ces souris montrent que cette délétion sélective ne suffit pas à modifier les populations leucocytaires dans l'intestin grêle, ce qui suggère que chez les souris $\text{PPAR}\gamma^{-/-}$, les variations des populations ILC3, Th17 et T_{reg} sont probablement dues à d'autres mécanismes que le contrôle de $\text{ROR}\gamma\text{t}$ par le récepteur $\text{PPAR}\gamma$. Afin de vérifier l'implication des cellules $\text{ROR}\gamma\text{t}$ positives dans le développement de l'inflammation articulaire chez les souris $\text{PPAR}\gamma^{-/-}$, nous envisageons d'induire une AIC chez des souris.

Le microbiote fécal des souris $\text{PPAR}\gamma^{-/-}$ présente une proportion moins importante de bactéries appartenant aux familles des Ruminococcaceae et des Lachnospiraceae, qui appartiennent à l'ordre des Clostridia, et davantage de bactéries de la famille des Enterobacteriaceae. Les bactéries de l'ordre des Clostridia produisent du butyrate (Vital et al., 2014). Ainsi, la délétion du récepteur $\text{PPAR}\gamma$ provoque une réduction des bactéries productrices de butyrate. Une diminution du butyrate au sein de la lumière intestinale modifie l'activité métabolique des cellules épithéliales, lesquelles produisent davantage de nitrates et d'oxygène (Byndloss et al., 2017). Le changement de métabolisme des cellules épithéliales intestinales favorise la prolifération de bactéries aérobies et aérobies-anaérobies facultatives telles que celles appartenant à la famille des Enterobacteriaceae. Ainsi, la délétion du récepteur $\text{PPAR}\gamma$ modifie l'activité métabolique des entérocytes et leur production de peptides antimicrobiens et favorise le développement de bactéries utilisant l'oxygène et les nitrates au profit des bactéries productrices de butyrate.

Le récepteur CCR3 est exprimé à la surface de plusieurs cellules immunitaires telles que les PNE, les PNB et les lymphocytes Th2. L'activation de ce récepteur par ses ligands, en particulier les éotaxines 1, 2 et 3 et CCL5, permet la migration de ces cellules de leur site de différenciation vers les tissus périphériques. Elle permet également le recrutement de cellules immunitaires sur le site d'une infection ou d'une inflammation aiguë afin d'éliminer la menace

et de réparer le tissu lésé. L'interaction de CCR3 avec ses ligands a également un rôle dans le développement de pathologies inflammatoires. Nous avons montré que l'inhibition du récepteur CCR3 par un antagoniste sélectif retarde l'apparition des premiers symptômes arthritiques et réduit la sévérité de l'AIC. Nous avons observé que l'utilisation de cet antagoniste réduit l'infiltration de cellules immunitaires dans la membrane synoviale. Le récepteur CCR3 a un rôle primordial dans le développement d'une PR. De nombreuses études réalisées sur des modèles animaux et des biopsies de patients atteints de PR témoignent de l'importance de ce récepteur dans l'arthrite. L'expression de CCR3 ainsi que celle de ses ligands sont augmentées au dans les articulations arthritiques chez ces patients (Zhebrun et al., 2014). L'équipe a montré que la chimiokine CCL11 est davantage présente dans le liquide synovial des rats dans les phases précoces d'une arthrite à l'antigène (Paquet et al., 2012). Le récepteur CCR3 est impliqué dans le recrutement de cellules immunitaires telles que les PNE et les lymphocytes Th2 sur les sites de l'inflammation (Aavak et al., 2000). Nous avons mis en évidence que les cellules exprimant le récepteur CCR3 dans les articulations des souris développant une AIC sont majoritairement des PNN. Dans les conditions homéostatiques, ces cellules n'expriment pas le récepteur CCR3. Cependant, les PNN circulants ou présents dans le liquide synovial des patients atteints de PR l'expriment (Hartl et al., 2008). Ainsi, la migration des PNN vers les articulations arthritiques pourrait, en partie, être due à l'activation de CCR3. Alternativement, l'expression de CCR3 par ces cellules indique leur capacité à être activées par de nombreuses chimiokines de sorte que son inhibition génère un effet anti-arthritique direct. Nous avons montré que l'inhibition du récepteur CCR3 réduit la dégradation du cartilage et l'érosion de l'os. Le récepteur CCR3 est également exprimé par des cellules résidentes de l'articulation comme les chondrocytes et les synoviocytes. Son activation sur ces cellules participe aux lésions des structures osseuses et cartilagineuses. En effet, la stimulation des chondrocytes par la chimiokine CCL11 induit leur production de la métalloprotéase MMP3 (Hsu et al., 2004). L'axe éotaxine-CCR3 engendre la production de la métalloprotéase MMP9 par les synoviocytes fibroblastiques (Liu et al., 2017). La stimulation de CCR3 favorise la migration des précurseurs des ostéoclastes et la résorption osseuse (Kindstedt et al., 2017).

Nous avons observé que les lymphocytes Th17 et T_{reg} et les cellules lymphoïdes ILC3 et sont augmentés dans les ganglions poplités des souris arthritiques par comparaison à des souris saines. Le GW766994 réduit l'abondance de ces populations cellulaires. Par ailleurs, nous avons mis en évidence que l'inhibition du récepteur CCR3, dans les conditions homéostatiques, modifie les proportions des populations lymphocytaires dans la *lamina propria*

de l'intestin grêle. Les lymphocytes Th1 et T_{reg} sont davantage présents alors que les lymphocytes Th17 sont sous-représentés. Les lymphocytes Th17 sont impliqués dans le développement d'une AIC alors que les lymphocytes Th1 prédominent dans une colite au DSS (Yang et al., 2017). Ainsi, nous envisageons d'étudier les populations lymphocytaires intestinales chez les souris arthritiques et arthritiques traitées avec l'antagoniste de CCR3. Par ailleurs, nous transférons actuellement la déficience du récepteur CCR3 du fond génétique BALB/c vers le fond génétique DBA/1 afin d'évaluer les conséquences de l'invalidation génétique du récepteur CCR3 sur l'AIC. Cette expérience permettra notamment de confirmer si l'effet anti-arthritique du GW766994 est dû exclusivement au blocage de CCR3, car cette molécule tend à augmenter la population T_{reg} dans les ganglions mésentériques dans les conditions basales. Nous avons montré que l'inhibition de CCR3 aggrave la sévérité de la colite au DSS. Des études montrent que l'inhibition de CCL11 ou de CCR3 réduit la sévérité de l'inflammation de la muqueuse colique et de l'intestin grêle (Adar et al., 2016, Masterson et al. 2011 et Song et al., 2017). Le mode d'induction de l'inflammation intestinale et les modalités d'administration des antagonistes peuvent expliquer les différences de résultats observés. Nous envisageons d'approfondir notre étude et d'analyser les mécanismes provoquant une aggravation de la colite au DSS chez les souris déficientes pour CCR3. Le fait que l'inhibition du récepteur CCR3 diminue la sévérité de l'arthrite au collagène et aggrave la colite au DSS suggère que l'inhibition de ce récepteur est bénéfique dans les pathologies Th17 dépendants mais pas dans les pathologies Th1 dépendants. Ainsi, l'inhibition de CCR3 provoquerait une diminution des lymphocytes Th17 intestinaux, ce qui limiterait la mobilisation de ces cellules lors de l'induction de l'arthrite et donc diminuerait la sévérité de cette pathologie. En revanche, l'élimination de CCR3 entraîne une augmentation des lymphocytes Th1 intestinaux, lesquels pourraient être rapidement recrutés en cas d'induction d'une pathologie dépendante de ces cellules, comme la colite au DSS, et ainsi amplifieraient la sévérité de la maladie. Pour vérifier l'intérêt de l'inhibition du récepteur CCR3 dans les pathologies dont le développement est caractérisé par les lymphocytes Th17, nous proposons d'utiliser l'antagoniste de CCR3 dans d'autres pathologies, comme l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale.

Nous proposons trois hypothèses pouvant expliquer la modulation des populations lymphocytaires intestinales lors de l'inhibition de CCR3. La première hypothèse est une modification du microbiote intestinal. Nous envisageons de comparer le microbiote de souris CCR3^{+/+} et CCR3^{-/-} et de transférer le microbiote de souris CCR3^{-/-} à des souris sauvages et d'étudier les populations lymphocytaires intestinales de ces dernières. La deuxième hypothèse

est que le récepteur CCR3 est impliqué dans la régulation de la différenciation lymphocytaire. Pour étudier cette hypothèse, nous proposons d'analyser, *in vitro*, les capacités de différenciation des splénocytes des souris CCR3^{-/-} en lymphocytes Th1, Th2, Th17 et T_{reg}. La troisième hypothèse est que le récepteur CCR3 est directement ou indirectement impliqué dans la migration des lymphocytes dans la *lamina propria* intestinale. Nous proposons d'utiliser des chambres de Boyden pour comparer les capacités migratoires des lymphocytes préalablement différenciés *in vitro*. Plusieurs chimioattractants pourront être testés, comme des ligands de CCR3 (éotaxines, CCL5) mais aussi des cytokines sécrétées par des cellules exprimant CCR3 (IL4, IL13) ou encore des protéines extraites de broyats intestinaux de souris CCR3^{+/+} et CCR3^{-/-}.

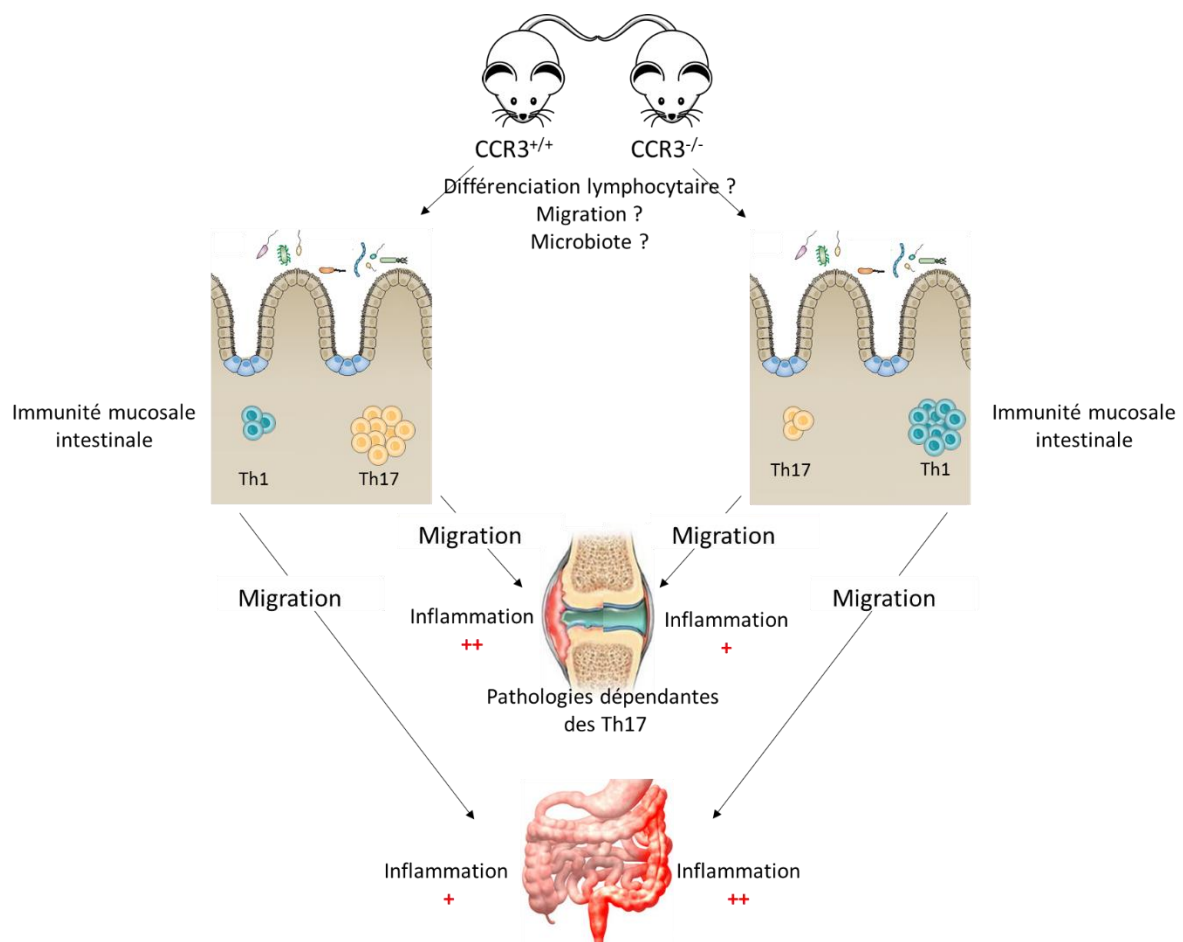


Figure 60 : Hypothèse expliquant les conséquences de l'inhibition du récepteur de CCR3 dans les pathologies inflammatoires

Références bibliographiques

Aagaard MM, Siersbæk R, Mandrup S. 2011. « Molecular Basis for Gene-Specific Transactivation by Nuclear Receptors ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1812 (8): 824-35.

Aarvak T, Chabaud M, Thoen J, Miossec P, Natvig JB. 2000. « Changes in the Th1 or Th2 Cytokine Dominance in the Synovium of Rheumatoid Arthritis (RA): A Kinetic Study of the Th Subsets in One Unusual RA Patient ». *Rheumatology (Oxford, England)* 39 (5): 513-22.

Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA, Campbell DJ, Ghosh S, Hori S, Jiang S, Kuchroo VK, Mathis D, Roncarolo MG, Rudensky A, Sakaguchi S, Shevach EM, Vignali DA, Ziegler SF. 2013. « Regulatory T Cells: Recommendations to Simplify the Nomenclature » 14 (4): 307-8.

Abdollahi-Roodsaz S, Joosten LA, Marije I, Koenders MI, Devesa I, Roelofs MF, Radstake TR, Heuvelmans-Jacobs M, Akira S, Nicklin MJ, Ribeiro-Dias F, van den Berg W.B. 2008. « Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis ». *The Journal of Clinical Investigation* 118 (1): 205-16.

Ablin JN, Entin-Meer M, Aloush V, Oren S, Elkayam O, George J, Barshack I. 2010. « Protective Effect of Eotaxin-2 Inhibition in Adjuvant-Induced Arthritis ». *Clinical and Experimental Immunology* 161 (2): 276-83.

Adar T, Shteingart S, Ben-Ya'acov A, Shitrit AB, Livovsky DM, Shmorak S, Mahamid M, Melamud B, Vernea F, Goldin E. 2016. « The Importance of Intestinal Eotaxin-1 in Inflammatory Bowel Disease: New Insights and Possible Therapeutic Implications ». *Digestive Diseases and Sciences* 61 (7): 1915-24.

Adeghate E, Adem A, Hasan MY, Tekes K, Kalasz H. 2011. « Medicinal Chemistry and Actions of Dual and Pan PPAR Modulators ». *The Open Medicinal Chemistry Journal* 5 : 93-98.

Ahrens R, Waddell A, Seidu L, Blanchard C, Carey R, Forbes E, Lampinen M, Wilson T, Cohen E, Stringer K, Ballard E, Munitz A, Xu H, Lee N, Lee JJ, Rothenberg ME, Denson L, Hogan SP. 2008. « Intestinal Macrophage/Epithelial Cell-Derived CCL11/Eotaxin-1 Mediates Eosinophil Recruitment and Function in Pediatric Ulcerative Colitis ». *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 181 (10): 7390-99.

Alaaeddine N, Olee T, Hashimoto S, Creighton-Achermann L, Lotz M. 2001. « Production of the Chemokine RANTES by Articular Chondrocytes and Role in Cartilage Degradation ». *Arthritis and Rheumatism* 44 (7): 1633-43.

Al-Mossawi MH, De Wit J, Kendrick B, Gundle R, Bowness P. 2015. « A1.1 Identification and Phenotyping of Innate Lymphoid Cells Present in the Diseased Joints of Patients with Spondyloarthritis, Rheumatoid Arthritis and Psoriatic Arthritis ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 74 (Suppl 1): A1-A1.

Al-Shboul O.A. 2013. « The Importance of Interstitial Cells of Cajal in the Gastrointestinal Tract ». *Saudi Journal of Gastroenterology: Official Journal of the Saudi Gastroenterology Association* 19 (1): 3-15.

Al-Zifzaf DS, El Bakry SA, Mamdouh R, Shawarby LA, Abdel Ghaffar AY, Amer HA, Alim AA, Sakr HM, Rahman RA. 2015. « FoxP3+T regulatory cells in Rheumatoid arthritis and the imbalance of the Treg/TH17 cytokine axis ». *The Egyptian Rheumatologist* 37 (1): 7-15.

Annunziato F, Romagnani C, et Romagnani S. 2015. « The 3 Major Types of Innate and Adaptive Cell-Mediated Effector Immunity ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 135 (3): 626-35.

Aprile M, Ambrosio MR, D'Esposito V, Beguinot F, Formisano P, Costa V, Ciccodicola A. 2014. « PPAR γ in Human Adipogenesis: Differential Contribution of Canonical Transcripts and Dominant Negative Isoforms ». *PPAR Research* 2014.

Aquino de SG, Abdollahi-Roodsaz S, Koenders MI, van de Loo FA, Pruijn GJ, Marijnissen RJ, Walgreen B, Helsen MM, van den Bersselaar LA, de Molon RS, Avila Campos MJ, Cunha FQ, Cirelli JA, van den Berg WB. 2014. « Periodontal Pathogens Directly Promote Autoimmune Experimental Arthritis by Inducing a TLR2- and IL-1-Driven Th17 Response ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 192 (9): 4103-11.

Asano K, Takahashi N, Ushiki M, Monya M, Aihara F, Kuboki E, Moriyama S, Iida M, Kitamura H, Qiu CH, Watanabe T, Tanaka M. 2015. « Intestinal CD169⁺ macrophages initiate mucosal inflammation by secreting CCL8 that recruits inflammatory monocytes ». *Nature Communications* 6.

Asquith M, Elewaut D, Lin P, Rosenbaum JT. 2014. « The role of the gut and microbes in the pathogenesis of spondyloarthritis ». *Best practice & research. Clinical rheumatology* 28 (5): 687-702. Aujla, Shean J., Patricia J. Dubin, et Jay K. Kolls. 2007. « Th17 cells and Mucosal Host Defense ». *Seminars in immunology* 19 (6): 377-82.

Assi LK, Wong SH, Ludwig A, Raza K, Gordon C, Salmon M, Lord JM, Scheel-Toellner D. 2007. « Tumor Necrosis Factor α Activates Release of B Lymphocyte Stimulator by Neutrophils Infiltrating the Rheumatoid Joint ». *Arthritis and rheumatism* 56 (6): 1776-86.

Auer J, Bläss M, Schulze-Koops H, Russwurm S, Nagel T, Kalden JR, Röllinghoff M, Beuscher HU. 2007. « Expression and regulation of CCL18 in synovial fluid neutrophils of patients with rheumatoid arthritis ». *Arthritis Research & Therapy* 9 (5): R94.

Bachelier F, Ben-Baruch A, Burkhardt AM, Combadiere C, Farber JM, Graham GJ, Horuk R, Sparre-Ulrich AH, Locati M, Luster AD, Mantovani A, Matsushima K, Murphy PM, Nibbs R, Nomiyama H, Power CA, Proudfoot AE, Rosenkilde MM, Rot A, Sozzani S, Thelen M, Yoshie O, Zlotnik A. 2014. « International Union of Pharmacology. LXXXIX. Update on the Extended Family of Chemokine Receptors and Introducing a New Nomenclature for Atypical Chemokine Receptors ». *Pharmacological Reviews* 66 (1): 1-79.

Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P, Li Y, Xia Y, Xie H, Zhong H, Khan MT, Zhang J, Li J, Xiao L, Al-Aama J, Zhang D, Lee YS, Kotowska D, Colding C, Tremaroli V, Yin Y, Bergman S, Xu X, Madsen L, Kristiansen K, Dahlgren J, Wang J. 2015. « Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life ». *Cell Host & Microbe* 17 (6): 852.

- Baeten** D, Baraliakos X, Braun J, Sieper J, Emery P, van der Heijde D, McInnes I, van Laar JM, Landewé R, Wordsworth P, Wollenhaupt J, Kellner H, Paramarta J, Wei J, Brachat A, Bek S, Laurent D, Li Y, Wang YA, Bertolino AP, Gsteiger S, Wright AM, Hueber W. 2013. « Anti-Interleukin-17A Monoclonal Antibody Secukinumab in Treatment of Ankylosing Spondylitis: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial ». *Lancet (London, England)* 382 (9906): 1705-13.
- Baeten** D, Sieper J, Braun J, Baraliakos X, Dougados M, Emery P, Deodhar A, Porter B, Martin R, Andersson M, Mpofu S, Richards HB et al. 2015. « Secukinumab, an Interleukin-17A Inhibitor, in Ankylosing Spondylitis ». *The New England Journal of Medicine* 373 (26): 2534-48.
- Bain** CC, Mowat AM. 2011. « Intestinal macrophages – specialised adaptation to a unique environment ». *European Journal of Immunology* 41 (9): 2494-98.
- Bain** CC, Mowat AM.. 2014. « Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation ». *Immunological Reviews* 260 (1): 102-17.
- Baines** M, Ebringer A, Avakian H, Samuel D, James DC. 1990. « The Use of Enzyme Immunoassay (EIA) and Radiobinding Assay to Investigate the Cross-Reactivity of Klebsiella Antigens and HLA B27 in Ankylosing Spondylitis Patients and Healthy Controls ». *Scandinavian Journal of Rheumatology* 19 (5): 341-49.
- Baines** M, Ebringer A, Avakian H, Samuel D, James DC. 1999. « PPAR Gamma Is Required for Placental, Cardiac, and Adipose Tissue Development ». *Molecular Cell* 4 (4): 585-95.
- Bamias** G, Cominelli F. 2015. « Role of Type 2 Immunity in Intestinal Inflammation ». *Current Opinion in Gastroenterology* 31 (6): 471-76.
- Baraliakos** X, J Braun. 2015. « Non-radiographic axial spondyloarthritis and ankylosing spondylitis: what are the similarities and differences? » *RMD Open* 1 (Suppl 1).
- Bardi** G, Lipp M, Baggiolini M, Loetscher P. 2001. « The T Cell Chemokine Receptor CCR7 Is Internalized on Stimulation with ELC, but Not with SLC ». *European Journal of Immunology* 31 (11): 3291-97.
- Bassaganya-Riera** J, Hontecillas R. 2006. « CLA and N-3 PUFA Differentially Modulate Clinical Activity and Colonic PPAR-Responsive Gene Expression in a Pig Model of Experimental IBD ». *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)* 25 (3): 454-65.
- Bassaganya-Riera** J, Reynolds K, Martino-Catt S, Cui Y, Hennighausen L, Gonzalez F, Rohrer J, Benninghoff AU, Hontecillas R. 2004. « Activation of PPAR Gamma and Delta by Conjugated Linoleic Acid Mediates Protection from Experimental Inflammatory Bowel Disease ». *Gastroenterology* 127 (3): 777-91.
- Basu** R, O'Quinn DB, Silberger DJ, Schoeb TR, Fouser L, Ouyang W, Hatton RD, Weaver CT. 2012. « Th22 Cells are an Important Source of IL-22 for Host Protection against Enteropathogenic Bacteria ». *Immunity* 37 (6): 1061-75.

Bedaiwi MK, Inman RD. 2014. « Microbiome and Probiotics: Link to Arthritis ». *Current Opinion in Rheumatology* 26 (4): 410-15.

Bennike TB, Ellingsen T, Glerup H, Bonderup OK, Carlsen TG, Meyer MK, Bøgsted M, Christiansen G, Birkelund S, Andersen V, Stensballe A. 2017. « Proteome Analysis of Rheumatoid Arthritis Gut Mucosa ». *Journal of Proteome Research* 16 (1): 346-54.

Berahovich RD, Miao Z, Wang Y, Premack B, Howard MC, Schall TJ. 2005. « Proteolytic Activation of Alternative CCR1 Ligands in Inflammation ». *The Journal of Immunology* 174 (11): 7341-51.

Berri M, Virlogeux-Payant I, Chevaleyre C, Melo S, Zanello G, Salmon H, Meurens F. 2014. « CCL28 Involvement in Mucosal Tissues Protection as a Chemokine and as an Antibacterial Peptide ». *Developmental and Comparative Immunology* 44 (2): 286-90.

Biswas A, Petnicki-Ocwieja T, Kobayashi KS. 2012. « Nod2: a key regulator linking microbiota to intestinal mucosal immunity ». *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 90 (1): 15-24.

Blanco FJ, Möricke R, Dokoupilova E, Coddling C, Neal J, Andersson M, Rohrer S, Richards H. 2017. « Secukinumab in Active Rheumatoid Arthritis: A Phase III Randomized, Double-Blind, Active Comparator- and Placebo-Controlled Study ». *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 69 (6): 1144-53.

Blom K, Rubin J, Halfvarson J, Törkvist L, Rönnblom A, Sangfelt P, Lördal M, Jönsson UB, Sjöqvist U, Håkansson LD, Venge P, Carlson M. 2012. « Eosinophil Associated Genes in the Inflammatory Bowel Disease 4 Region: Correlation to Inflammatory Bowel Disease Revealed ». *World Journal of Gastroenterology* 18 (44): 6409-6419; discussion p. 6417-6418.

Bohemen van CG, Grumet FC, Zanen HC. 1984. « Identification of HLA-B27M1 and -M2 cross-reactive antigens in Klebsiella, Shigella and Yersinia. » *Immunology* 52 (4): 607-10.

Bongartz T, Coras B, Vogt T, Schölmerich J, Müller-Ladner U. 2005. « Treatment of Active Psoriatic Arthritis with the PPARgamma Ligand Pioglitazone: An Open-Label Pilot Study ». *Rheumatology (Oxford, England)* 44 (1): 126-29.

Borreagaard N, Sørensen OE, Theilgaard-Mönch K. 2007. « Neutrophil Granules: A Library of Innate Immunity Proteins ». *Trends in Immunology* 28 (8): 340-45.

Borzi RM, Mazzetti I, Cattini L, Uguccioni M, Baggiolini M, Facchini A. 2000. « Human Chondrocytes Express Functional Chemokine Receptors and Release Matrix-Degrading Enzymes in Response to C-X-C and C-C Chemokines ». *Arthritis and Rheumatism* 43 (8): 1734-41.

Bouskra D, Brézillon C, Bérard M, Werts C, Varona R, Boneca IG, Eberl G. 2008. « Lymphoid Tissue Genesis Induced by Commensals through NOD1 Regulates Intestinal Homeostasis ». *Nature* 456 (7221): 507-10.

Bowness P, Ridley A, Shaw J, Chan AT, Wong-Baeza I, Fleming M, Cummings F, McMichael A, Kollnberger S. 2011. « Th17 Cells Expressing KIR3DL2+ and Responsive to

HLA-B27 Homodimers Are Increased in Ankylosing Spondylitis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186 (4): 2672-80.

Brandtzaeg P. 2009. « Mucosal Immunity: Induction, Dissemination, and Effector Functions ». *Scandinavian Journal of Immunology* 70 (6): 505-15.

Brandtzaeg P, Farstad IN, Johansen FE, Morton HC, Norderhaug IN, Yamanaka T. 1999. « The B-Cell System of Human Mucosae and Exocrine Glands ». *Immunological Reviews* 171: 45-87.

Braun J, Baraliakos X, Kiltz U. 2016. « Secukinumab (AIN457) in the Treatment of Ankylosing Spondylitis ». *Expert Opinion on Biological Therapy* 16 (5): 711-22.

Breban M, Tap J, Leboime A, Said-Nahal R, Langella P, Chiocchia G, Furet JP, Sokol H. 2017. « Faecal Microbiota Study Reveals Specific Dysbiosis in Spondyloarthritis ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 76 (9): 1614-22.

Brightling CE, Kaur D, Berger P, Morgan AJ, Wardlaw AJ, Bradding P. 2005. « Differential Expression of CCR3 and CXCR3 by Human Lung and Bone Marrow-Derived Mast Cells: Implications for Tissue Mast Cell Migration ». *Journal of Leukocyte Biology* 77 (5): 759-66.

Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. 2004. « Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria ». *Science (New York, N.Y.)* 303 (5663): 1532-35.

Broek van den MF. 1989. « Streptococcal Cell Wall-Induced Polyarthritis in the Rat. Mechanisms for Chronicity and Regulation of Susceptibility ». *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 97 (10): 861-78.

Brühl H, Mack M, Niedermeier M, Lochbaum D, Schölmerich J, Straub RH. 2008. « Functional Expression of the Chemokine Receptor CCR7 on Fibroblast-like Synoviocytes ». *Rheumatology (Oxford, England)* 47 (12): 1771-74.

Byndloss MX, Olsan EE, Rivera-Chávez F, Tiffany CR, Cevallos SA, Lokken KL, Torres TP, Byndloss AJ, Faber F, Gao Y, Litvak Y, Lopez CA, Xu G, Napoli E, Giulivi C, Tsolis RM, Revzin A, Lebrilla CB, Bäumlér AJ. 2017. « Microbiota-Activated PPAR- γ Signaling Inhibits Dysbiotic Enterobacteriaceae Expansion ». *Science (New York, N.Y.)* 357 (6351): 570-75.

Byun SH, Lee JH, Jung NC, Choi HJ, Song JY, Seo HG, Choi J, Jung SY, Kang S, Choi YS, Chung JH, Lim DS. 2016. « Rosiglitazone-Mediated Dendritic Cells Ameliorate Collagen-Induced Arthritis in Mice ». *Biochemical Pharmacology* 115: 85-93.

Carbo A, Hontecillas R, Kronsteiner B, Viladomiu M, Pedragosa M, Lu P, Philipson CW, Hoops S, Marathe M, Eubank S, Bisset K, Wendelsdorf K, Jarrah A, Mei Y, Bassaganya-Riera J. 2013. « Systems Modeling of Molecular Mechanisms Controlling Cytokine-driven CD4⁺ T Cell Differentiation and Phenotype Plasticity ». *PLoS Computational Biology* 9 (4).

Carlsen HS, Yamanaka T, Scott H, Rugtveit J, Brandtzaeg P. 2006. « The Proportion of CD40⁺ Mucosal Macrophages Is Increased in Inflammatory Bowel Disease Whereas CD40 Ligand (CD154)⁺ T Cells Are Relatively Decreased, Suggesting Differential Modulation of

These Costimulatory Molecules in Human Gut Lamina Propria ». *Inflammatory Bowel Diseases* 12 (11): 1013-24.

Carregaro V, Napimoga MH, Peres RS, Benevides L, Sacramento LA, Pinto LG, Grespan R, Cunha TM, da Silva JS, Cunha FQ. 2016. « Therapeutic Treatment of Arthritic Mice with 15-Deoxy $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂(15d-PGJ₂) Ameliorates Disease through the Suppression of Th17 Cells and the Induction of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Cells ». *Mediators of Inflammation* 2016: 9626427.

Celinski K, Dworzanski T, Korolczuk A, Piasecki R, Slomka M, Madro A, Fornal R. 2011. « Effects of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors-Gamma Ligands on Dextran Sodium Sulphate-Induced Colitis in Rats ». *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society* 62 (3): 347-56.

Cerutti A. 2008. « The regulation of IgA class switching ». *Nature reviews. Immunology* 8 (6): 421-34.

Chakravarti A, Raquil MA, Tessier P, Poubelle PE. 2009. « Surface RANKL of Toll-like Receptor 4-stimulated Human Neutrophils Activates Osteoclastic Bone Resorption ». *Blood* 114 (8): 1633-44.

Chao PZ, Hsieh MS, Cheng CW, Lin YF, Chen CH. 2011. « Regulation of MMP-3 expression and secretion by the chemokine eotaxin-1 in human chondrocytes ». *Journal of Biomedical Science* 18 (1): 86.

Chassard C, Delmas E, Robert C, Bernalier-Donadille A. 2010. « The Cellulose-Degrading Microbial Community of the Human Gut Varies According to the Presence or Absence of Methanogens ». *FEMS Microbiology Ecology* 74 (1): 205-13.

Chen HH, Sun AH, Ojcius DM, Hu WL, Ge YM, Lin X, Li LJ, Pan JP, Yan J. 2015. « Eosinophils from Murine Lamina Propria Induce Differentiation of Naïve T Cells into Regulatory T Cells via TGF- β 1 and Retinoic Acid ». *PLoS ONE* 10 (11).

Chen J, Wright K, Davis JM, Jeraldo P, Marietta EV, Murray J, Nelson H, Matteson EL, Taneja V. 2016. « An expansion of rare lineage intestinal microbes characterizes rheumatoid arthritis ». *Genome Medicine* 8.

Chen L, Wei XQ, Evans B, Jiang W, Aeschlimann D. 2008. « IL-23 Promotes Osteoclast Formation by up-Regulation of Receptor Activator of NF-KB (RANK) Expression in Myeloid Precursor Cells ». *European Journal of Immunology* 38 (10): 2845-54.

Chen Y, Chou K, Fuchs E, Havran WL, Boismenu R. 2002. « Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial $\gamma\delta$ T cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (22): 14338-43.

Chen Z, Andreev D, Oeser K, Krljanac B, Hueber A, Kleyer A, Voehringer D, Schett G, Bozec A. 2016. « Th2 and eosinophil responses suppress inflammatory arthritis ». *Nature Communications* 7.

Cheung PP. 2017. « Anti-IL17A in Axial Spondyloarthritis—Where Are We At? » *Frontiers in Medicine* 4.

- Chiardola** F, Schneeberger EE, Citera G, Rosemffet GM, Kuo L, Santillan G, Maldonado-Cocco JA. 2008. « Prevalence and Clinical Significance of Eosinophilia in Patients with Rheumatoid Arthritis in Argentina ». *Journal of Clinical Rheumatology: Practical Reports on Rheumatic & Musculoskeletal Diseases* 14 (4): 211-13.
- Chu** VT, Beller A, Rausch S, Strandmark J, Zänker M, Arbach O, Kruglov A, Berek C. 2014. « Eosinophils Promote Generation and Maintenance of Immunoglobulin-A-Expressing Plasma Cells and Contribute to Gut Immune Homeostasis ». *Immunity* 40 (4): 582-93.
- Chuang** HC, et Tan TH. 2017. « MAP4K4 and IL-6+ Th17 Cells Play Important Roles in Non-Obese Type 2 Diabetes ». *Journal of Biomedical Science* 24 (1): 4.
- Chung** H, Pamp SJ, Hill JA, Surana NK, Edelman SM, Troy EB, Reading NC, Villablanca EJ, Wang S, Mora JR, Umesaki Y, Mathis D, Benoist C, Relman DA, Kasper DL. 2012. « Gut Immune Maturation Depends on Colonization with a Host-Specific Microbiota ». *Cell* 149 (7): 1578-93.
- Cipolletta** D, Feuerer M, Li A, Kamei N, Lee J, Shoelson SE, Benoist C, Mathis D. 2012. « PPAR- γ Is a Major Driver of the Accumulation and Phenotype of Adipose Tissue Treg Cells ». *Nature* 486 (7404): 549-53.
- Colgan** SP, Fennimore B, Ehrentraut SF. 2013. « Adenosine and Gastrointestinal Inflammation ». *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 91 (2): 157-64.
- Comerford** I, Harata-Lee Y, Bunting MD, Gregor C, Kara EE, McColl SR. 2013. « A Myriad of Functions and Complex Regulation of the CCR7/CCL19/CCL21 Chemokine Axis in the Adaptive Immune System ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 24 (3): 269-83.
- Cording** S, Medvedovic J, Cherrier M, Eberl G. 2014. « Development and Regulation of ROR γ t(+) Innate Lymphoid Cells ». *FEBS Letters* 588 (22): 4176-81.
- Corneth** OB, Reijmers RM, Mus AM, Asmawidjaja PS, van Hamburg JP, Papazian N, Siegers JY, Mourcin F, Amin R, Tarte K, Hendriks RW, Cupedo T, Lubberts E. 2016. « Loss of IL-22 Inhibits Autoantibody Formation in Collagen-Induced Arthritis in Mice ». *European Journal of Immunology* 46 (6): 1404-14.
- Costello** ME, Ciccia F, Willner D, Warrington N, Robinson PC, Gardiner B, Marshall M, Kenna TJ, Triolo G, Brown MA. 2015. « Brief Report: Intestinal Dysbiosis in Ankylosing Spondylitis ». *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 67 (3): 686-91.
- Couvigny** B, de Wouters T, Kaci G, Jacouton E, Delorme C, Doré J, Renault P, Blottière HM, Guédon E, Lapaque N. 2015. « Commensal *Streptococcus salivarius* Modulates PPAR γ Transcriptional Activity in Human Intestinal Epithelial Cells ». *PLoS ONE* 10 (5).
- Cromartie** WJ, Craddock JG, Schwab JH, Anderle SK, Yang CH. 1977. « Arthritis in Rats after Systemic Injection of Streptococcal Cells or Cell Walls ». *The Journal of Experimental Medicine* 146 (6): 1585-1602.
- Cross** A, Bucknall RC, Cassatella MA, Edwards SW, Moots RJ. 2003. « Synovial Fluid Neutrophils Transcribe and Express Class II Major Histocompatibility Complex Molecules in Rheumatoid Arthritis ». *Arthritis and Rheumatism* 48 (10): 2796-2806.

Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Patel NS, Serraino I, Di Paola R, Genovese T, Britti D, De Maio M, Caputi AP, Thiernemann C. 2003. « Reduction in the Evolution of Murine Type II Collagen-Induced Arthritis by Treatment with Rosiglitazone, a Ligand of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma ». *Arthritis and Rheumatism* 48 (12): 3544-56.

Delgado-Rizo V, Martínez-Guzmán MA, Iñiguez-Gutierrez L, García-Orozco A, Alvarado-Navarro A, Fafutis-Morris M. 2017. « Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview ». *Frontiers in Immunology* 8.

Derrien M, Vaughan EE, Plugge CM, de Vos WM. 2004. « Akkermansia Muciniphila Gen. Nov., Sp. Nov., a Human Intestinal Mucin-Degrading Bacterium ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54 (Pt 5): 1469-76.

Desreumaux P, Dubuquoy L, Nutten S, Peuchmaur M, Englaro W, Schoonjans K, Derijard B, Desvergne B, Wahli W, Chambon P, Leibowitz MD, Colombel JF, Auwerx J. 2001. « Attenuation of Colon Inflammation through Activators of the Retinoid X Receptor (RXR)/Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPARgamma) Heterodimer. A Basis for New Therapeutic Strategies ». *The Journal of Experimental Medicine* 193 (7): 827-38.

Devillard E, McIntosh FM, Duncan SH, Wallace RJ. 2007. « Metabolism of Linoleic Acid by Human Gut Bacteria: Different Routes for Biosynthesis of Conjugated Linoleic Acid ». *Journal of Bacteriology* 189 (6): 2566-70.

Dimberg A. 2010. « Chemokines in Angiogenesis ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 341: 59-80.

Dorożyńska I, Majewska-Szczepanik M, Marcińska K, Szczepanik M. 2014. « Partial Depletion of Natural Gut Flora by Antibiotic Aggravates Collagen Induced Arthritis (CIA) in Mice ». *Pharmacological Reports: PR* 66 (2): 250-55.

Dubuquoy L, Jansson EA, Deeb S, Rakotobe S, Karoui M, Colombel JF, Auwerx J, Pettersson S, Desreumaux P. 2003. « Impaired Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma in Ulcerative Colitis ». *Gastroenterology* 124 (5): 1265-76.

Eberl G. 2005. « Inducible Lymphoid Tissues in the Adult Gut: Recapitulation of a Fetal Developmental Pathway? » *Nature Reviews. Immunology* 5 (5): 413-20.

Eberl G. 2016. « Immunity by Equilibrium ». *Nature Reviews. Immunology* 16 (8): 524-32.

Eberl G, Colonna M, Di Santo JP, McKenzie AN. 2015. « Innate Lymphoid Cells. Innate Lymphoid Cells: A New Paradigm in Immunology ». *Science (New York, N.Y.)* 348 (6237): aaa6566.

Eberl G, Littman DR. 2004. « Thymic Origin of Intestinal Alphabeta T Cells Revealed by Fate Mapping of RORgammat+ Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 305 (5681): 248-51.

Eberl G, Marmon S, Sunshine MJ, Rennert PD, Choi Y, Littman DR. 2004. « An Essential Function for the Nuclear Receptor RORgamma(t) in the Generation of Fetal Lymphoid Tissue Inducer Cells ». *Nature Immunology* 5 (1): 64-73.

- Ebringer** A, Cunningham P, Ahmadi K, Wrigglesworth J, Hosseini R, Wilson C. 1992. « Sequence Similarity between HLA-DR1 and DR4 Subtypes Associated with Rheumatoid Arthritis and Proteus/Serratia Membrane Haemolysins ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 51 (11): 1245-46.
- Ebringer** A, Cunningham P, Ahmadi K, Wrigglesworth J, Hosseini R, Wilson C. 1985. « Antibodies to Proteus in Rheumatoid Arthritis ». *Lancet (London, England)* 2 (8450): 305-7.
- Ebringer** A, Rashid T, Tiwana H, Wilson C. 2007. « A Possible Link between Crohn's Disease and Ankylosing Spondylitis via Klebsiella Infections ». *Clinical Rheumatology* 26 (3): 289-97.
- Eid** HM, Wright ML, Anil Kumar NV, Qawasmeh A, Hassan STS, Mocan A, Nabavi SM, Rastrelli L, Atanasov AG, Haddad PS. 2017. « Significance of Microbiota in Obesity and Metabolic Diseases and the Modulatory Potential by Medicinal Plant and Food Ingredients ». *Frontiers in Pharmacology* 8.
- El-Zayadi** AA, Jones EA, Churchman SM, Baboolal TG, Cuthbert RJ, El-Jawhari JJ, Badawy AM, Alase AA, El-Sherbiny YM, McGonagle D. 2016. « Interleukin-22 Drives the Proliferation, Migration and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells: A Novel Cytokine That Could Contribute to New Bone Formation in Spondyloarthropathies ». *Rheumatology*, kew384.
- Elias** KM, Laurence A, Davidson TS, Stephens G, Kanno Y, Shevach EM, O'Shea JJ. 2008. « Retinoic acid inhibits Th17 polarization and enhances FoxP3 expression through a Stat-3/Stat-5 independent signaling pathway ». *Blood* 111 (3): 1013-20.
- Elsner** J, Petering H, Kluthe C, Kimmig D, Smolarski R, Ponath P, Kapp A. 1998. « Eotaxin-2 Activates Chemotaxis-Related Events and Release of Reactive Oxygen Species via Pertussis Toxin-Sensitive G Proteins in Human Eosinophils ». *European Journal of Immunology* 28 (7): 2152-58.
- Endsley** MA, Njongmeta LM, Shell E, Ryan MW, Indrikovs AJ, Ulualp S, Goldblum RM, Mwangi W, Estes DM. 2009. « Human IgA-Inducing Protein from Dendritic Cells Induces IgA Production by Naive IgD+ B Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182 (4): 1854-59.
- Everaere** L, Ait-Yahia S, Molendi-Coste O, Vorng H, Quemener S, LeVu P, Fleury S, Bouchaert E, Fan Y, Duez C, de Nadai P, Staels B, Dombrowicz D, Tsicopoulos A 2016. « Innate Lymphoid Cells Contribute to Allergic Airway Disease Exacerbation by Obesity ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 138 (5): 1309-1318.e11.
- Eyerich** K, Dimartino V, Cavani A. 2017. « IL-17 and IL-22 in immunity: Driving protection and pathology ». *European Journal of Immunology* 47 (4): 607-14.
- Fahmi** H, Di Battista JA, Pelletier JP, Mineau F, Ranger P, Martel-Pelletier J. 2001. « Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Activators Inhibit Interleukin-1beta-Induced Nitric Oxide and Matrix Metalloproteinase 13 Production in Human Chondrocytes ». *Arthritis and Rheumatism* 44 (3): 595-607.

- Falcone** FH, Zillikens D, Gibbs BF. 2006. « The 21st Century Renaissance of the Basophil? Current Insights into Its Role in Allergic Responses and Innate Immunity ». *Experimental Dermatology* 15 (11): 855-64.
- Farquharson** D, Butcher JP, Culshaw S. 2012. « Periodontitis, Porphyromonas, and the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis ». *Mucosal Immunology* 5 (2): 112-20.
- Fernandes** P, MacSharry J, Darby T, Fanning A, Shanahan F, Houston A, Brint E. 2016. « Differential expression of key regulators of Toll-like receptors in ulcerative colitis and Crohn's disease: a role for Tollip and peroxisome proliferator-activated receptor gamma? » *Clinical and Experimental Immunology* 183 (3): 358-68.
- Fielder** M, Pirt SJ, Tarpey I, Wilson C, Cunningham P, Ettelaie C, Binder A, Bansal S, Ebringer A. 1995. « Molecular Mimicry and Ankylosing Spondylitis: Possible Role of a Novel Sequence in Pullulanase of Klebsiella Pneumoniae ». *FEBS Letters* 369 (2-3): 243-48.
- Flytlie** HA, Hvid M, Lindgreen E, Kofod-Olsen E, Petersen EL, Jørgensen A, Deleuran M, Vestergaard C, Deleuran B. 2010. « Expression of MDC/CCL22 and Its Receptor CCR4 in Rheumatoid Arthritis, Psoriatic Arthritis and Osteoarthritis ». *Cytokine* 49 (1): 24-29.
- Forkel** M, Mjösberg J. 2016. « Dysregulation of Group 3 Innate Lymphoid Cells in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease ». *Current Allergy and Asthma Reports* 16 (10).
- Fruitwala** S, El-Naccache DW, Chang TL. 2018. « Multifaceted immune functions of human defensins and underlying mechanisms ». *Seminars in Cell & Developmental Biology*.
- Fuchs** A, Vermi W, Lee JS, Lonardi S, Gilfillan S, Newberry RD, Cella M, Colonna M. 2013. « Intraepithelial Type 1 Innate Lymphoid Cells Are a Unique Subset of IL-12- and IL-15-Responsive IFN- γ -Producing Cells ». *Immunity* 38 (4): 769-81.
- Fujisawa** T, Kato Y, Nagase H, Atsuta J, Terada A, Iguchi K, Kamiya H, Morita Y, Kitauro M, Kawasaki H, Yoshie O, Hirai K. 2000. « Chemokines Induce Eosinophil Degranulation through CCR-3 ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 106 (3): 507-13.
- Fukuda** S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, Tobe T, Clarke JM, Topping DL, Suzuki T, Taylor TD, Itoh K, Kikuchi J, Morita H, Hattori M, Ohno H. 2011. « Bifidobacteria Can Protect from Enteropathogenic Infection through Production of Acetate ». *Nature* 469 (7331): 543-47.
- Furusawa** Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, Nakanishi Y, Uetake C, Kato K, Kato T, Takahashi M, Fukuda NN, Murakami S, Miyauchi E, Hino S, Atarashi K, Onawa S, Fujimura Y, Lockett T, Clarke JM, Topping DL, Tomita M, Hori S, Ohara O, Morita T, Koseki H, Kikuchi J, Honda K, Hase K, Ohno H. 2013. « Commensal Microbe-Derived Butyrate Induces the Differentiation of Colonic Regulatory T Cells ». *Nature* 504 (7480): 446-50.
- Galès** A, Conduché A, Bernad J, Lefevre L, Olganier D, Béraud M, Martin-Blondel G, Linas MD, Auwerx J, Coste A, Pipy B. 2010. « PPAR γ Controls Dectin-1 Expression Required for Host Antifungal Defense against Candida Albicans ». *PLoS Pathogens* 6 (1): e1000714.

Ganz T. 2003. « Defensins: Antimicrobial Peptides of Innate Immunity ». *Nature Reviews. Immunology* 3 (9): 710-20.

García-Vicuña R, Gómez-Gavero MV, Domínguez-Luis MJ, Pec MK, González-Alvaro I, Alvaro-Gracia JM, Díaz-González F. 2004. « CC and CXC Chemokine Receptors Mediate Migration, Proliferation, and Matrix Metalloproteinase Production by Fibroblast-like Synoviocytes from Rheumatoid Arthritis Patients ». *Arthritis and Rheumatism* 50 (12): 3866-77.

Genovese MC, Braun DK, Erickson JS, Berclaz PY, Banerjee S, Heffernan MP, Carlier H. 2016. « Safety and Efficacy of Open-Label Subcutaneous Ixekizumab Treatment for 48 Weeks in a Phase II Study in Biologic-Naive and TNF-IR Patients with Rheumatoid Arthritis ». *The Journal of Rheumatology* 43 (2): 289-97.

Genovese MC, Greenwald M, Cho CS, Berman A, Jin L, Cameron GS, Benichou O, Xie L, Braun D, Berclaz PY, Banerjee S. 2014. « A Phase II Randomized Study of Subcutaneous Ixekizumab, an Anti-Interleukin-17 Monoclonal Antibody, in Rheumatoid Arthritis Patients Who Were Naive to Biologic Agents or Had an Inadequate Response to Tumor Necrosis Factor Inhibitors ». *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 66 (7): 1693-1704.

Gerber BO, Zanni MP, Uguccioni M, Loetscher M, Mackay CR, Pichler WJ, Yawalkar N, Baggiolini M, Moser B. 1997. « Functional Expression of the Eotaxin Receptor CCR3 in T Lymphocytes Co-Localizing with Eosinophils ». *Current Biology: CB* 7 (11): 836-43.

Geremia A, Arancibia-Cárcamo CV. 2017. « Innate Lymphoid Cells in Intestinal Inflammation ». *Frontiers in Immunology* 8.

Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE, Ramos HL, Wei L, Davidson TS, Bouladoux N, Grainger JR, Chen Q, Kanno Y, Watford WT, Sun HW, Eberl G, Shevach EM, Belkaid Y, Cua DJ, Chen W, O'Shea JJ. 2010. « Generation of Pathogenic T(H)17 Cells in the Absence of TGF- β Signalling ». *Nature* 467 (7318): 967-71.

Gill T, Asquith M, Rosenbaum JT, Colbert RA. 2015. « The Intestinal Microbiome in Spondyloarthritis ». *Current opinion in rheumatology* 27 (4): 319-25.

Gionchetti P, Calabrese C, Rizzello F. 2015. « Inflammatory Bowel Diseases and Spondyloarthropathies ». *The Journal of Rheumatology. Supplement* 93 : 21-23.

Glatigny S, Fert I, Blaton MA, Lories RJ, Araujo LM, Chiocchia G, et Breban M. 2012. « Proinflammatory Th17 Cells Are Expanded and Induced by Dendritic Cells in Spondylarthritis-Prone HLA-B27-Transgenic Rats ». *Arthritis and Rheumatism* 64 (1): 110-20.

Glocker MO, Guthke R, Kekow J, Thiesen HJ. 2006. « Rheumatoid Arthritis, a Complex Multifactorial Disease: On the Way toward Individualized Medicine ». *Medicinal Research Reviews* 26 (1): 63-87.

Glatigny S, Fert I, Blaton MA, Lories RJ, Araujo LM, Chiocchia G, Breban M. 2012. « Loss of Sex and Age Driven Differences in the Gut Microbiome Characterize Arthritis-Susceptible *0401 Mice but Not Arthritis-Resistant *0402 Mice ». *PLoS ONE* 7 (4).

Goto Y, Obata T, Kunisawa J, Sato S, Ivanov II, Lamichhane A, Takeyama N, Kamioka M, Sakamoto M, Matsuki T, Setoyama H, Imaoka A, Uematsu S, Akira S, Domino SE, Kulig P, Becher B, Renauld JC, Sasakawa C, Umesaki Y, Benno Y, Kiyono H. 2014. « Innate lymphoid cells regulate intestinal epithelial cell glycosylation ». *Science (New York, N.Y.)* 345 (6202): 1254009.

Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. 2014. « Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity ». *Annual Review of Immunology* 32: 659-702.

Grigat J, Soruri A, Forssmann U, Riggert J, Zwirner J. 2007. « Chemoattraction of Macrophages, T Lymphocytes, and Mast Cells Is Evolutionarily Conserved within the Human Alpha-Defensin Family ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179 (6): 3958-65.

Grindebacke H, Stenstad H, Quiding-Järbrink M, Waldenström J, Adlerberth I, Wold AE, Rudin A. 2009. « Dynamic Development of Homing Receptor Expression and Memory Cell Differentiation of Infant CD4⁺CD25^{high} Regulatory T Cells ». *The Journal of Immunology* 183 (7): 4360-70.

Guellec D, Milin M, Cornec D, Tobon GJ, Marhadour T, Jousse-Joulin S, Chiocchia G, Vittecoq O, Devauchelle-Pensec V, Saraux A. 2015. « Eosinophilia Predicts Poor Clinical Outcomes in Recent-Onset Arthritis: Results from the ESPOIR Cohort ». *RMD Open* 1 (1): e000070.

Günaltay S, Kumawat AK, Nyhlin N, Bohr J, Tysk C, Hultgren O, Hultgren Hörnquist E. 2015. « Enhanced Levels of Chemokines and Their Receptors in the Colon of Microscopic Colitis Patients Indicate Mixed Immune Cell Recruitment ». *Mediators of Inflammation* 2015: 132458.

Guo Z, Jang MH, Otani K, Bai Z, Umemoto E, Matsumoto M, Nishiyama M, Yamasaki M, Ueha S, Matsushima K, Hirata T, Miyasaka M. 2008. « CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells in the Small Intestinal Lamina Propria Show an Effector/Memory Phenotype ». *International Immunology* 20 (3): 307-15.

Ha J, Choi HS, Lee Y, Kwon HJ, Song YW, Kim HH. 2010. « CXC Chemokine Ligand 2 Induced by Receptor Activator of NF- κ B Ligand Enhances Osteoclastogenesis ». *The Journal of Immunology* 184 (9): 4717-24.

Haas CS, Martinez RJ, Attia N, Haines GK 3rd, Campbell PL, Koch AE. 2005. « Chemokine Receptor Expression in Rat Adjuvant-Induced Arthritis ». *Arthritis and Rheumatism* 52 (12): 3718-30.

Hacquard-Bouder C, Ittah M, Breban M. 2006. « Animal Models of HLA-B27-Associated Diseases: New Outcomes ». *Joint, Bone, Spine: Revue Du Rhumatisme* 73 (2): 132-38.

Hällgren R, Feltelius N, Svenson K, Venge P. 1985. « Eosinophil Involvement in Rheumatoid Arthritis as Reflected by Elevated Serum Levels of Eosinophil Cationic Protein ». *Clinical and Experimental Immunology* 59 (3): 539-46.

Halloran MM, Woods JM, Strieter RM, Szekanecz Z, Volin MV, Hosaka S, Haines GK 3rd, Kunkel SL, Burdick MD, Walz A, Koch AE. 1999. « The Role of an Epithelial Neutrophil-

Activating Peptide-78-like Protein in Rat Adjuvant-Induced Arthritis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 162 (12): 7492-7500.

Han GM, O'Neil-Andersen NJ, Zurier RB, Lawrence DA. 2008. « CD4⁺CD25^{high} T Cell Numbers Are Enriched in the Peripheral Blood of Patients with Rheumatoid Arthritis ». *Cellular Immunology* 253 (1-2): 92-101.

Hapfelmeier S, Lawson MA, Slack E, Kirundi JK, Stoel M, Heikenwalder M, Cahenzli J, Velykoredko Y, Balmer ML, Endt K, Geuking MB, Curtiss R 3rd, McCoy KD, Macpherson AJ. 2010. « Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses ». *Science (New York, N.Y.)* 328 (5986): 1705-9.

Haringman JJ, Smeets TJ, Reinders-Blankert P, Tak PP. 2006. « Chemokine and chemokine receptor expression in paired peripheral blood mononuclear cells and synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and reactive arthritis ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 65 (3): 294-300.

Hart AL, Ng SC, Mann E, Al-Hassi HO, Bernardo D, Knight SC. 2010. « Homing of Immune Cells: Role in Homeostasis and Intestinal Inflammation ». *Inflammatory Bowel Diseases* 16 (11): 1969-77.

Hartl D, Krauss-Etschmann S, Koller B, Hordijk PL, Kuijpers TW, Hoffmann F, Hector A, Eber E, Marcos V, Bittmann I, Eickelberg O, Griese M, Roos D. 2008. « Infiltrated Neutrophils Acquire Novel Chemokine Receptor Expression and Chemokine Responsiveness in Chronic Inflammatory Lung Diseases ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181 (11): 8053-67.

Hayashi H, Shibata K, Sakamoto M, Tomita S, Benno Y. 2007. « *Prevotella Copri* Sp. Nov. and *Prevotella Stercorea* Sp. Nov., Isolated from Human Faeces ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57 (Pt 5): 941-46.

He B, Xu W, Santini PA, Polydorides AD, Chiu A, Estrella J, Shan M, Chadburn A, Villanacci V, Plebani A, Knowles DM, Rescigno M, Cerutti A. 2007. « Intestinal Bacteria Trigger T Cell-Independent Immunoglobulin A(2) Class Switching by Inducing Epithelial-Cell Secretion of the Cytokine APRIL ». *Immunity* 26 (6): 812-26.

He Z, Wang F, Ma J, Sen S, Zhang J, Gwack Y, Zhou Y, Sun Z. 2016. « Ubiquitination of ROR γ t at Lysine 446 Limits Th17 Differentiation by Controlling Coactivator Recruitment ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 197 (4): 1148-58.

Henningham A, Barnett TC, Maamary PG, Walker MJ. 2012. « Pathogenesis of Group A Streptococcal Infections ». *Discovery Medicine* 13 (72): 329-42.

Hepworth MR, Fung TC, Masur SH, Kelsen JR, McConnell FM, Dubrot J, Withers DR, Hugues S, Farrar MA, Reith W, Eberl G, Baldassano RN, Laufer TM, Elson CO, Sonnenberg GF. 2015. « Group 3 innate lymphoid cells mediate intestinal selection of commensal bacteria-specific CD4⁺ T cells ». *Science (New York, N.Y.)* 348 (6238): 1031-35.

Hepworth MR, Monticelli LA, Fung TC, Ziegler CG, Grunberg S, Sinha R, Mantegazza AR, Ma HL, Crawford A, Angelosanto JM, Wherry EJ, Koni PA, Bushman FD, Elson

CO, Eberl G, Artis D, Sonnenberg GF. 2013. « Innate Lymphoid Cells Regulate CD4⁺ T Cell Responses to Intestinal Commensal Bacteria ». *Nature* 498 (7452): 113-17.

Hirota K, Yoshitomi H, Hashimoto M, Maeda S, Teradaira S, Sugimoto N, Yamaguchi T, Nomura T, Ito H, Nakamura T, Sakaguchi N, Sakaguchi S. 2007. « Preferential Recruitment of CCR6-Expressing Th17 Cells to Inflamed Joints via CCL20 in Rheumatoid Arthritis and Its Animal Model ». *The Journal of Experimental Medicine* 204 (12): 2803-12.

Hogan SP, Mishra A, Brandt EB, Royalty MP, Pope SM, Zimmermann N, Foster PS, Rothenberg ME. 2001. « A Pathological Function for Eotaxin and Eosinophils in Eosinophilic Gastrointestinal Inflammation ». *Nature Immunology* 2 (4): 353-60.

Hontecillas R, Bassaganya-Riera J. 2007. « Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Is Required for Regulatory CD4⁺ T Cell-Mediated Protection against Colitis ». *The Journal of Immunology* 178 (5): 2940-49.

Howson LJ, Salio M, Cerundolo V. 2015. « MR1-Restricted Mucosal-Associated Invariant T Cells and Their Activation during Infectious Diseases ». *Frontiers in Immunology* 6.

Hsu YH, Hsieh MS, Liang YC, Li CY, Sheu MT, Chou DT, Chen TF, Chen CH. 2004. « Production of the Chemokine Eotaxin-1 in Osteoarthritis and Its Role in Cartilage Degradation ». *Journal of Cellular Biochemistry* 93 (5): 929-39.

Huang FP, Platt N, Wykes M, Major JR, Powell TJ, Jenkins CD, MacPherson GG. 2000. « A Discrete Subpopulation of Dendritic Cells Transports Apoptotic Intestinal Epithelial Cells to T Cell Areas of Mesenteric Lymph Nodes ». *The Journal of Experimental Medicine* 191 (3): 435-44.

Huber S, Gagliani N, Esplugues E, O'Connor W Jr, Huber FJ, Chaudhry A, Kamanaka M, Kobayashi Y, Booth CJ, Rudensky AY, Roncarolo MG, Battaglia M, Flavell RA. 2011. « Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3⁻ and Foxp3⁺ regulatory CD4⁺ T cells in an interleukin-10 dependent manner ». *Immunity* 34 (4): 554-65.

Hughes CE, Nibbs RJB. 2018. « A Guide to Chemokines and Their Receptors ». *The FEBS Journal*, avril.

Human Microbiome Project Consortium. 2012. « Structure, Function and Diversity of the Healthy Human Microbiome ». *Nature* 486 (7402): 207.

Humbles AA, Lu B, Friend DS, Okinaga S, Lora J, Al-Garawi A, Martin TR, Gerard NP, Gerard C. 2002. « The murine CCR3 receptor regulates both the role of eosinophils and mast cells in allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (3): 1479-84.

Iho S, Yamamoto T, Takahashi T, Yamamoto S. 1999. « Oligodeoxynucleotides Containing Palindrome Sequences with Internal 5'-CpG-3' Act Directly on Human NK and Activated T Cells to Induce IFN-Gamma Production in Vitro ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 163 (7): 3642-52.

Ismail AS, Severson KM, Vaishnava S, Behrendt CL, Yu X, Benjamin JL, Ruhn KA, Hou B, DeFranco AL, Yarovinsky F, Hooper LV. 2011. « $\gamma\delta$ intraepithelial lymphocytes are

essential mediators of host–microbial homeostasis at the intestinal mucosal surface ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (21): 8743–48.

Ivanova D, Krempels R, Ryfe J, Weitzman K, Stephenson D, Gigley JP. 2014. « NK Cells in Mucosal Defense against Infection ». *BioMed Research International* 2014: 413982.

Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, Wei D, Goldfarb KC, Santee CA, Lynch SV, Tanoue T, Imaoka A, Itoh K, Takeda K, Umesaki Y, Honda K, Littman DR. 2009. « Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria ». *Cell* 139 (3): 485–98.

Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. 2006. « The Orphan Nuclear Receptor ROR γ Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells ». *Cell* 126 (6): 1121–33.

Iwamoto T, Okamoto H, Kobayashi S, Ikari K, Toyama Y, Tomatsu T, Kamatani N, Momohara S. 2007. « A role of monocyte chemoattractant protein-4 (MCP-4)/CCL13 from chondrocytes in rheumatoid arthritis ». *The FEBS Journal* 274 (18): 4904–12.

Iwanaga T, Shikichi M, Kitamura H, Yanase H, Nozawa-Inoue K. 2000. « Morphology and Functional Roles of Synoviocytes in the Joint ». *Archives of Histology and Cytology* 63 (1): 17–31.

Jagpal A, Curtis JR. 2018. « Gastrointestinal Perforations with Biologics in Patients with Rheumatoid Arthritis: Implications for Clinicians ». *Drug Safety*.

Jang MH, Sougawa N, Tanaka T, Hirata T, Hiroi T, Tohya K, Guo Z, Umemoto E, Ebisuno Y, Yang BG, Seoh JY, Lipp M, Kiyono H, Miyasaka M. 2006. « CCR7 Is Critically Important for Migration of Dendritic Cells in Intestinal Lamina Propria to Mesenteric Lymph Nodes ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 176 (2): 803–10.

Ji J, Shu D, Zheng M, Wang J, Luo C, Wang Y, Guo F, Zou X, Lv X, Li Y, Liu T, Qu H. 2016. « Microbial Metabolite Butyrate Facilitates M2 Macrophage Polarization and Function ». *Scientific Reports* 6: 24838.

Ji JD, Cheon H, Jun JB, Choi SJ, Kim YR, Lee YH, Kim TH, Chae IJ, Song GG, Yoo DH, Kim SY, Sohn J. 2001. « Effects of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma (PPAR-Gamma) on the Expression of Inflammatory Cytokines and Apoptosis Induction in Rheumatoid Synovial Fibroblasts and Monocytes ». *Journal of Autoimmunity* 17 (3): 215–21.

Jiao Z, Wang W, Jia R, Li J, You H, Chen L, Wang Y. 2007. « Accumulation of FoxP3-Expressing CD4+CD25+ T Cells with Distinct Chemokine Receptors in Synovial Fluid of Patients with Active Rheumatoid Arthritis ». *Scandinavian Journal of Rheumatology* 36 (6): 428–33.

Jiménez E, Fernández L, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Nueno-Palop C, Narbad A, Olivares M, Xaus J, Rodríguez JM. 2005. « Isolation of Commensal Bacteria from Umbilical Cord Blood of Healthy Neonates Born by Cesarean Section ». *Current Microbiology* 51 (4): 270–74.

Jinquan T, Jing C, Jacobi HH, Reimert CM, Millner A, Quan S, Hansen JB, Dissing S, Malling HJ, Skov PS, Poulsen LK. 2000. « CXCR3 Expression and Activation of Eosinophils: Role of IFN-Gamma-Inducible Protein-10 and Monokine Induced by IFN-Gamma ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 165 (3): 1548-56.

Jouzeau JY, Moulin D, Koufany M, Sebillaud S, Bianchi A, et Netter P. 2008. « Rôle des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR) en physiopathologie articulaire : intérêts et limites des agonistes ». *Journal de la Société de Biologie* 202 (4): 289-312.

Jung Y, Rothenberg ME. 2014. « Roles and Regulation of Gastrointestinal Eosinophils in Immunity and Disease ». *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 193 (3): 999-1005.

Jung Y, Wen T, Mingler MK, Caldwell JM, Wang YH, Chaplin DD, Lee EH, Jang MH, Woo SY, Seoh JY, Miyasaka M, Rothenberg ME. 2015. « IL-1 β in eosinophil-mediated small intestinal homeostasis and IgA production ». *Mucosal immunology* 8 (4): 930-42.

Kabat AM, Srinivasan N, Maloy KJ. 2014. « Modulation of Immune Development and Function by Intestinal Microbiota ». *Trends in Immunology* 35 (11): 507-17.

Kabeerdoss J, Sandhya P, Danda D. 2016. « Gut Inflammation and Microbiome in Spondyloarthritis ». *Rheumatology International* 36 (4): 457-68.

Kanbe K, Takagishi K, Chen Q. 2002. « Stimulation of Matrix Metalloprotease 3 Release from Human Chondrocytes by the Interaction of Stromal Cell-Derived Factor 1 and CXC Chemokine Receptor 4 ». *Arthritis and Rheumatism* 46 (1): 130-37.

Katschke KJ Jr, Rottman JB, Ruth JH, Qin S, Wu L, LaRosa G, Ponath P, Park CC, Pope RM, Koch AE. 2001. « Differential Expression of Chemokine Receptors on Peripheral Blood, Synovial Fluid, and Synovial Tissue Monocytes/Macrophages in Rheumatoid Arthritis ». *Arthritis and Rheumatism* 44 (5): 1022-32.

Kawashiri SY, Kawakami A, Iwamoto N, Fujikawa K, Aramaki T, Tamai M, Arima K, Kamachi M, Yamasaki S, Nakamura H, Tsurumoto T, Kono M, Shindo H, Ida H, Origuchi T, Eguchi K. 2009. « Proinflammatory Cytokines Synergistically Enhance the Production of Chemokine Ligand 20 (CCL20) from Rheumatoid Fibroblast-like Synovial Cells in Vitro and Serum CCL20 Is Reduced in Vivo by Biologic Disease-Modifying Antirheumatic Drugs ». *The Journal of Rheumatology* 36 (11): 2397-2402.

Kawahito Y, Kondo M, Tsubouchi Y, Hashiramoto A, Bishop-Bailey D, Inoue K, Kohno M, Yamada R, Hla T, Sano H. 2000. « 15-Deoxy-Delta(12,14)-PGJ(2) Induces Synoviocyte Apoptosis and Suppresses Adjuvant-Induced Arthritis in Rats ». *The Journal of Clinical Investigation* 106 (2): 189-97.

Kerr SW, Wolynec WW, Filipovic Z, Nodop SG, Braza F, Winquist RJ, Noonan TC. 1999. « Repeated Measurement of Intestinal Permeability as an Assessment of Colitis Severity in HLA-B27 Transgenic Rats ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 291 (2): 903-10.

- Kim** HR, Kim KW, Kim BM, Jung HG, Cho ML, Lee SH. 2014. « Reciprocal Activation of CD4⁺ T Cells and Synovial Fibroblasts by Stromal Cell-Derived Factor 1 Promotes RANKL Expression and Osteoclastogenesis in Rheumatoid Arthritis ». *Arthritis & Rheumatology* (Hoboken, N.J.) 66 (3): 538-48.
- Kim** KS, Hong SW, Han D, Yi J, Jung J, Yang BG, Lee JY, Lee M, Surh CD. 2016. « Dietary Antigens Limit Mucosal Immunity by Inducing Regulatory T Cells in the Small Intestine ». *Science* (New York, N.Y.) 351 (6275): 858-63.
- Kim** MS, Day CJ, Morrison NA. 2005. « MCP-1 Is Induced by Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand, Promotes Human Osteoclast Fusion, and Rescues Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor Suppression of Osteoclast Formation ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (16): 16163-69.
- Kim** SH, Cho BH, Kiyono H, Jang YS. 2017. « Microbiota-derived butyrate suppresses group 3 innate lymphoid cells in terminal ileal Peyer's patches ». *Scientific Reports* 7.
- Kindstedt** E, Holm CK, Sulniute R, Martinez-Carrasco I, Lundmark R, Lundberg P. 2017. « CCL11, a novel mediator of inflammatory bone resorption ». *Scientific Reports* 7 (juillet).
- Kjer-Nielsen** L, Patel O, Corbett AJ, Le Nours J, Meehan B, Liu L, Bhati M, Chen Z, Kostenko L, Reantragoon R, Williamson NA, Purcell AW, Dudek NL, McConville MJ, O'Hair RA, Khairallah GN, Godfrey DI, Fairlie DP, Rossjohn J, McCluskey J. 2012. « MR1 Presents Microbial Vitamin B Metabolites to MAIT Cells ». *Nature* 491 (7426): 717-23.
- Klareskog** L, Amara K, Malmström V. 2014. « Adaptive Immunity in Rheumatoid Arthritis: Anticitrulline and Other Antibodies in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis ». *Current Opinion in Rheumatology* 26 (1): 72-79.
- Klose** CSN, Flach M, Möhle L, Rogell L, Hoyler T, Ebert K, Fabiunke C, Pfeifer D, Sexl V, Fonseca-Pereira D, Domingues RG, Veiga-Fernandes H, Arnold SJ, Busslinger M, Dunay IR, Tanriver Y, Diefenbach A. 2014. « Differentiation of Type 1 ILCs from a Common Progenitor to All Helper-like Innate Lymphoid Cell Lineages ». *Cell* 157 (2): 340-56.
- Klose** CSN, Kiss EA, Schwierzeck V, Ebert K, Hoyler T, d'Hargues Y, Göppert N, Croxford AL, Waisman A, Tanriver Y, Diefenbach A. 2013. « A T-Bet Gradient Controls the Fate and Function of CCR6-ROR γ ⁺ Innate Lymphoid Cells ». *Nature* 494 (7436): 261-65.
- Klotz** L, Burgdorf S, Dani I, Saijo K, Flossdorf J, Huckle S, Alferink J, Nowak N, Beyer M, Mayer G, Langhans B, Klockgether T, Waisman A, Eberl G, Schultze J, Famulok M, Kolanus W, Glass C, Kurts C, Knolle PA. 2009. « The nuclear receptor PPAR γ selectively inhibits Th17 differentiation in a T cell-intrinsic fashion and suppresses CNS autoimmunity ». *The Journal of Experimental Medicine* 206 (10): 2079-89.
- Klotz** L, Huckle S, Thimm D, Classen S, Gaarz A, Schultze J, Edenhofer F, Kurts C, Klockgether T, Limmer A, Knolle P, Burgdorf S. 2009. « Increased Antigen Cross-Presentation but Impaired Cross-Priming after Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Is Mediated by up-Regulation of B7H1 ». *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 183 (1): 129-36.

Koch AE, Volin MV, Woods JM, Kunkel SL, Connors MA, Harlow LA, Woodruff DC, Burdick MD, Strieter RM. 2001. « Regulation of Angiogenesis by the C-X-C Chemokines Interleukin-8 and Epithelial Neutrophil Activating Peptide 78 in the Rheumatoid Joint ». *Arthritis and Rheumatism* 44 (1): 31-40.

Koch AE. 2005. « Chemokines and Their Receptors in Rheumatoid Arthritis: Future Targets? » *Arthritis and Rheumatism* 52 (3): 710-21.

Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, Angenent LT, Ley RE. 2011. « Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (Suppl 1): 4578-85.

Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, Angenent LT, Ley RE. al. 2016. « *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*-Induced Hypercitrullination Links Periodontal Infection to Autoimmunity in Rheumatoid Arthritis ». *Science Translational Medicine* 8 (369): 369ra176.

Kokkonen H, Söderström I, Rocklöv J, Hallmans G, Lejon K, Rantapää Dahlqvist S. 2010. « Up-Regulation of Cytokines and Chemokines Predates the Onset of Rheumatoid Arthritis ». *Arthritis and Rheumatism* 62 (2): 383-91.

Kopp ZA, Jain U, Van Limbergen J, Stadnyk AW. 2015. « Do Antimicrobial Peptides and Complement Collaborate in the Intestinal Mucosa? » *Frontiers in Immunology* 6.

Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jäger A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. 2007. « IL-21 Initiates an Alternative Pathway to Induce Proinflammatory T(H)17 Cells ». *Nature* 448 (7152): 484-87.

Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. 2009. « IL-17 and Th17 Cells ». *Annual Review of Immunology* 27: 485-517.

Korzenik J R. 2007. « Is Crohn's disease due to defective immunity? » *Gut* 56 (1): 2-5.

Koufany M, Chappard D, Netter P, Bastien C, Weryha G, Jouzeau JY, Moulin D. 2013. « The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Agonist Pioglitazone Preserves Bone Microarchitecture in Experimental Arthritis by Reducing the Interleukin-17-Dependent Osteoclastogenic Pathway ». *Arthritis and Rheumatism* 65 (12): 3084-95.

Koufany M, Jouzeau JY, Moulin D. 2014. « Fenofibrate vs Pioglitazone: Comparative Study of the Anti-Arthritic Potencies of PPAR-Alpha and PPAR-Gamma Agonists in Rat Adjuvant-Induced Arthritis ». *Bio-Medical Materials and Engineering* 24 (1 Suppl): 81-88.

Koufany M, Moulin D, Bianchi A, Muresan M, Sebillaud S, Netter P, Weryha G, Jouzeau JY. 2008. « Anti-Inflammatory Effect of Antidiabetic Thiazolidinediones Prevents Bone Resorption Rather than Cartilage Changes in Experimental Polyarthritis ». *Arthritis Research & Therapy* 10 (1): R6.

Krämer B, Goeser F, Lutz P, Glässner A, Boesecke C, Schwarze-Zander C, Kaczmarek D, Nischalke HD, Branchi V, Manekeller S, Hüneburg R, van Bremen T, Weismüller T, Strassburg CP, Rockstroh JK, Spengler U, Nattermann J. 2017. « Compartment-specific

distribution of human intestinal innate lymphoid cells is altered in HIV patients under effective therapy ». *PLoS Pathogens* 13 (5).

Krause P, Morris V, Greenbaum JA, Park Y, Bjoerheden U, Mikulski Z, Muffley T, Shui JW, Kim G, Cheroutre H, Liu YC, Peters B, Kronenberg M, Murai M. 2015. « IL-10-Producing Intestinal Macrophages Prevent Excessive Antibacterial Innate Immunity by Limiting IL-23 Synthesis ». *Nature Communications* 6 (mai): 7055.

Krebs CF, Paust HJ, Krohn S, Koyro T, Brix SR, Riedel JH, Bartsch P, Wiech T, Meyer-Schwesinger C, Huang J, Fischer N, Busch P, Mittrücker HW, Steinhoff U, Stockinger B, Perez LG, Wenzel UO, Janneck M, Steinmetz OM, Gagliani N, Stahl RAK, Huber S, Turner JE, Panzer U. 2016. « Autoimmune Renal Disease Is Exacerbated by S1P-Receptor-1-Dependent Intestinal Th17 Cell Migration to the Kidney ». *Immunity* 45 (5): 1078-92.

Krishnamurthy A, Joshua V, Haj Hensvold A, Jin T, Sun M, Vivar N, Ytterberg AJ, Engström M, Fernandes-Cerqueira C, Amara K, Magnusson M, Wigerblad G, Kato J, Jiménez-Andrade JM, Tyson K, Rapecki S, Lundberg K, Catrina SB, Jakobsson PJ, Svensson C, Malmström V, Klareskog L, Wähämaa H, Catrina AI. 2016. « Identification of a novel chemokine-dependent molecular mechanism underlying rheumatoid arthritis-associated autoantibody-mediated bone loss ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 75 (4): 721-29.

Kühl AA, Kakirman H, Janotta M, Dreher S, Cremer P, Pawlowski NN, Loddenkemper C, Heimesaat MM, Grollich K, Zeitz M, Farkas S, Hoffmann JC. 2007. « Aggravation of Different Types of Experimental Colitis by Depletion or Adhesion Blockade of Neutrophils ». *Gastroenterology* 133 (6): 1882-92.

Kulkarni N, Pathak M, Lal G. 2017. « Role of Chemokine Receptors and Intestinal Epithelial Cells in the Mucosal Inflammation and Tolerance ». *Journal of Leukocyte Biology* 101 (2): 377-94.

Kundu P, Ling TW, Korecka A, Li Y, D'Arienzo R, Bunte RM, Berger T, Arulampalam V, Chambon P, Mak TW, Wahli W, Pettersson S. 2014. « Absence of Intestinal PPAR γ Aggravates Acute Infectious Colitis in Mice through a Lipocalin-2-Dependent Pathway ». *PLoS Pathogens* 10 (1).

Kwak HB, Ha H, Kim HN, Lee JH, Kim HS, Lee S, Kim HM, Kim JY, Kim HH, Song YW, Lee ZH. 2008. « Reciprocal Cross-Talk between RANKL and Interferon-Gamma-Inducible Protein 10 Is Responsible for Bone-Erosive Experimental Arthritis ». *Arthritis and Rheumatism* 58 (5): 1332-42.

Kwak HB, Lee SW, Jin HM, Ha H, Lee SH, Takeshita S, Tanaka S, Kim HM, Kim HH, Lee ZH. 2005. « Monokine Induced by Interferon-Gamma Is Induced by Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand and Is Involved in Osteoclast Adhesion and Migration ». *Blood* 105 (7): 2963-69.

Lagier JC, Million M, Hugon P, Armougom F, Raoult D. 2012. « Human Gut Microbiota: Repertoire and Variations ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2.

- Laugisch** O, Wong A, Sroka A, Kantyka T, Koziel J, Neuhaus K, Sculean A, Venables PJ, Potempa J, Möller B, Eick S. 2016. « Citrullination in the Periodontium--a Possible Link between Periodontitis and Rheumatoid Arthritis ». *Clinical Oral Investigations* 20 (4): 675-83.
- LeBlanc** JG, Milani C, de Giori GS, Sesma F, van Sinderen D, Ventura M. 2013. « Bacteria as Vitamin Suppliers to Their Host: A Gut Microbiota Perspective ». *Current Opinion in Biotechnology* 24 (2): 160-68.
- Lee** EJ, Kwon JE, Park MJ, Jung KA, Kim DS, Kim EK, Lee SH, Choi JY, Park SH, Cho ML. 2017. « Ursodeoxycholic Acid Attenuates Experimental Autoimmune Arthritis by Targeting Th17 and Inducing PAMPK and Transcriptional Corepressor SMILE ». *Immunology Letters* 188 : 1-8.
- Lee** EY, Lee ZH, Song YW. 2009. « CXCL10 and Autoimmune Diseases ». *Autoimmunity Reviews* 8 (5): 379-83.
- Lee** J, Park C, Kim HJ, Lee YD, Lee ZH, Song YW, Kim HH. 2017. « Stimulation of Osteoclast Migration and Bone Resorption by C-C Chemokine Ligands 19 and 21 ». *Experimental & Molecular Medicine* 49 (7): e358.
- Lee** JH, Kim B, Jin WJ, Kim HH, Ha H, Lee ZH. 2017. « Pathogenic roles of CXCL10 signaling through CXCR3 and TLR4 in macrophages and T cells: relevance for arthritis ». *Arthritis Research & Therapy* 19.
- Lehman** TJ, Allen JB, Plotz PH, Wilder RL. 1983. « Polyarthritis in Rats Following the Systemic Injection of Lactobacillus Casei Cell Walls in Aqueous Suspension ». *Arthritis and Rheumatism* 26 (10): 1259-65.
- Lei** J, Hasegawa H, Matsumoto T, Yasukawa M. 2010. « Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α and γ Agonists Together with TGF- β Convert Human CD4+CD25- T Cells into Functional Foxp3+ Regulatory T Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 185 (12): 7186-98.
- Leipe** J, Grunke M, Dechant C, Reindl C, Kerzendorf U, Schulze-Koops H, Skapenko A. 2010. « Role of Th17 Cells in Human Autoimmune Arthritis ». *Arthritis and Rheumatism* 62 (10): 2876-85.
- Leirisalo-Repo** M. 2005. « Reactive Arthritis ». *Scandinavian Journal of Rheumatology* 34 (4): 251-59.
- Lewis** JD, Lichtenstein GR, Deren JJ, Sands BE, Hanauer SB, Katz JA, Lashner B, Present DH, Chuai S, Ellenberg JH, Nessel L, Wu GD; Rosiglitazone for Ulcerative Colitis Study Group. 2008. « Rosiglitazone for Active Ulcerative Colitis: A Randomized Placebo-Controlled Trial ». *Gastroenterology* 134 (3): 688-95.
- Li** N, Wei W, Yin F, Chen M, Ma TR, Wu Q, Zhou JR, Zheng SG, Han J. 2015. « The Abnormal Expression of CCR4 and CCR6 on Tregs in Rheumatoid Arthritis ». *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8 (9): 15043-53.
- Li** X, Kim KW, Cho ML, Ju JH, Kang CM, Oh HJ, Min JK, Lee SH, Park SH, Kim HY. 2010. « IL-23 Induces Receptor Activator of NF-KappaB Ligand Expression in Fibroblast-like

Synoviocytes via STAT3 and NF-KappaB Signal Pathways ». *Immunology Letters* 127 (2): 100-107.

Li XF, Sun YY, Bao J, Chen X, Li YH, Yang Y, Zhang L, Huang C, Wu BM, Meng XM, Li J. 2017. « Functional Role of PPAR- γ on the Proliferation and Migration of Fibroblast-like Synoviocytes in Rheumatoid Arthritis ». *Scientific Reports* 7 (1): 12671.

Lin P, Bach M, Asquith M, Lee AY, Akileswaran L, Stauffer P, Davin S, Pan Y, Cambronne ED, Dorris M, Debelius JW, Lauber CL, Ackermann G, Baeza YV, Gill T, Knight R, Colbert RA, Taurog JD, Van Gelder RN, Rosenbaum JT. 2014. « HLA-B27 and Human β 2-Microglobulin Affect the Gut Microbiota of Transgenic Rats ». *PLoS ONE* 9 (8).

Lin SC, Chen KH, Lin CH, Kuo CC, Ling QD, Chan CH. 2007. « The Quantitative Analysis of Peripheral Blood FOXP3-Expressing T Cells in Systemic Lupus Erythematosus and Rheumatoid Arthritis Patients ». *European Journal of Clinical Investigation* 37 (12): 987-96.

Lin TH, Tang CH, Wu K, Fong YC, Yang RS, Fu WM. 2011. « 15-Deoxy- Δ (12,14) - Prostaglandin-J2 and Ciglitazone Inhibit TNF- α -Induced Matrix Metalloproteinase 13 Production via the Antagonism of NF-KB Activation in Human Synovial Fibroblasts ». *Journal of Cellular Physiology* 226 (12): 3242-50.

Lindgren A, Yun CH, Lundgren A, Sjöling A, Ohman L, Svennerholm AM, Holmgren J, Lundin SB. 2010. « CD8- Natural Killer Cells Are Greatly Enriched in the Human Gastrointestinal Tract and Have the Capacity to Respond to Bacteria ». *Journal of Innate Immunity* 2 (3): 294-302.

Lisignoli G, Piacentini A, Cristino S, Grassi F, Cavallo C, Cattini L, Tonnarelli B, Manferdini C, Facchini A. 2007. « CCL20 Chemokine Induces Both Osteoblast Proliferation and Osteoclast Differentiation: Increased Levels of CCL20 Are Expressed in Subchondral Bone Tissue of Rheumatoid Arthritis Patients ». *Journal of Cellular Physiology* 210 (3): 798-806.

Liu X, Zhang H, Chang X, Shen J, Zheng W, Xu Y, Wang J, Gao W, He S. 2017. « Upregulated Expression of CCR3 in Rheumatoid Arthritis and CCR3-Dependent Activation of Fibroblast-like Synoviocytes ». *Cell Biology and Toxicology* 33 (1): 15-26.

Liu X, Zeng B, Zhang J, Li W, Mou F, Wang H, Zou Q, Zhong B, Wu L, Wei H, Fang Y. 2016. « Role of the Gut Microbiome in Modulating Arthritis Progression in Mice ». *Scientific Reports* 6: 30594.

Liu X, Zou Q, Zeng B, Fang Y, Wei H. 2013. « Analysis of Fecal Lactobacillus Community Structure in Patients with Early Rheumatoid Arthritis ». *Current Microbiology* 67 (2): 170-76.

Lombardi VC, Khaiboullina SF. 2014. « Plasmacytoid dendritic cells of the gut: Relevance to immunity and pathology ». *Clinical Immunology* 153 (1): 165-77.

Loonen LM, Stolte EH, Jaklofsky MT, Meijerink M, Dekker J, van Baarlen P, Wells JM. 2014. « REG3 γ -Deficient Mice Have Altered Mucus Distribution and Increased Mucosal Inflammatory Responses to the Microbiota and Enteric Pathogens in the Ileum ». *Mucosal Immunology* 7 (4): 939-47.

Lopetuso LR, Scaldaferri F, Pizarro TT. 2012. « Emerging Role of the Interleukin (IL)-33/ST2 Axis in Gut Mucosal Wound Healing and Fibrosis ». *Fibrogenesis & Tissue Repair* 5 (1): 18.

López-Cotarelo P, Gómez-Moreira C, Criado-García O, Sánchez L, Rodríguez-Fernández JL. 2017. « Beyond Chemoattraction: Multifunctionality of Chemokine Receptors in Leukocytes ». *Trends in Immunology* 38 (12): 927-41.

Lourido L, Blanco FJ, Ruiz-Romero C. 2017. « Defining the Proteomic Landscape of Rheumatoid Arthritis: Progress and Prospective Clinical Applications ». *Expert Review of Proteomics* 14 (5): 431-44.

Lubberts E, Koenders MI, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Coenen-de Roo CJ, Joosten LA, van den Berg WB. 2004. « Treatment with a Neutralizing Anti-Murine Interleukin-17 Antibody after the Onset of Collagen-Induced Arthritis Reduces Joint Inflammation, Cartilage Destruction, and Bone Erosion ». *Arthritis & Rheumatism* 50 (2): 650-59.

Lukovac S, Belzer C, Pellis L, Keijser BJ, de Vos WM, Montijn RC, Roeselers G. 2014. « Differential Modulation by *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* of Host Peripheral Lipid Metabolism and Histone Acetylation in Mouse Gut Organoids ». *mBio* 5 (4).

Luster AD, Alon R, von Andrian UH. 2005. « Immune Cell Migration in Inflammation: Present and Future Therapeutic Targets ». *Nature Immunology* 6 (12): 1182-90.

Mackley EC, Houston S, Marriott CL, Halford EE, Lucas B, Cerovic V, Filbey KJ, Maizels RM, Hepworth MR, Sonnenberg GF, Milling S, Withers DR. 2015. « CCR7-dependent trafficking of ROR γ ⁺ ILCs creates a unique microenvironment within mucosal draining lymph nodes ». *Nature Communications* 6 : 5862.

Macpherson AJ, Uhr T. 2004. « Compartmentalization of the Mucosal Immune Responses to Commensal Intestinal Bacteria ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1029 : 36-43.

Maeda Y, Kurakawa T, Umemoto E, Motooka D, Ito Y, Gotoh K, Hirota K, Matsushita M, Furuta Y, Narazaki M, Sakaguchi N, Kayama H, Nakamura S, Iida T, Saeki Y, Kumanogoh A, Sakaguchi S, Takeda K. 2016. « Dysbiosis Contributes to Arthritis Development via Activation of Autoreactive T Cells in the Intestine ». *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 68 (11): 2646-61.

Maier E, Anderson RC, Roy NC. 2014. « Understanding How Commensal Obligate Anaerobic Bacteria Regulate Immune Functions in the Large Intestine ». *Nutrients* 7 (1): 45-73.

Mäki-Ikola O, Hällgren R, Kanerud L, Feltelius N, Knutsson L, Granfors K. 1997. « Enhanced jejunal production of antibodies to *Klebsiella* and other Enterobacteria in patients with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 56 (7): 421-25.

Manousou P, Kolios G, Valatas V, Drygiannakis I, Bourikas L, Pyrovolaki K, Koutroubakis I, Papadaki HA, Kouroumalis E. 2010. « Increased Expression of Chemokine Receptor CCR3 and Its Ligands in Ulcerative Colitis: The Role of Colonic Epithelial Cells in in Vitro Studies ». *Clinical and Experimental Immunology* 162 (2): 337-47.

- Manzo** A, Vitolo B, Humby F, Caporali R, Jarrossay D, Dell'accio F, Ciardelli L, Uguccioni M, Montecucco C, Pitzalis C. 2008. « Mature Antigen-Experienced T Helper Cells Synthesize and Secrete the B Cell Chemoattractant CXCL13 in the Inflammatory Environment of the Rheumatoid Joint ». *Arthritis and Rheumatism* 58 (11): 3377-87.
- Marder** W, Khalatbari S, Myles JD, Hench R, Lustig S, Yalavarthi S, Parameswaran A, Brook RD, Kaplan MJ. 2013. « The Peroxisome Proliferator Activated Receptor- γ Pioglitazone Improves Vascular Function and Decreases Disease Activity in Patients with Rheumatoid Arthritis ». *Journal of the American Heart Association* 2 (6): e000441.
- Martínez-González** O, Cantero-Hinojosa J, Paule-Sastre P, Gómez-Magán JC, Salvatierra-Ríos D. 1994. « Intestinal Permeability in Patients with Ankylosing Spondylitis and Their Healthy Relatives ». *British Journal of Rheumatology* 33 (7): 644-47.
- Martinez-Martinez** RE, Abud-Mendoza C, Patiño-Marin N, Rizo-Rodríguez JC, Little JW, Loyola-Rodríguez JP. 2009. « Detection of Periodontal Bacterial DNA in Serum and Synovial Fluid in Refractory Rheumatoid Arthritis Patients ». *Journal of Clinical Periodontology* 36 (12): 1004-10.
- Maruotti** N, Grano M, Colucci S, d'Onofrio F, Cantatore FP. 2011. « Osteoclastogenesis and Arthritis ». *Clinical and Experimental Medicine* 11 (3): 137-45.
- Maslowski** KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D, Schilter HC, Rolph MS, Mackay F, Artis D, Xavier RJ, Teixeira MM, Mackay CR. 2009. « Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43 ». *Nature* 461 (7268): 1282-86.
- Masopust** D, Vezys V, Marzo AL, Lefrançois L. 2001. « Preferential Localization of Effector Memory Cells in Nonlymphoid Tissue ». *Science (New York, N.Y.)* 291 (5512): 2413-17.
- Masopust** D, Schenkel JM. 2013. « The Integration of T Cell Migration, Differentiation and Function ». *Nature Reviews Immunology* 13 (5): 309-20.
- Masterson** JC, McNamee EN, Fillon SA, Hosford L, Harris R, Fernando SD, Jedlicka P, Iwamoto R, Jacobsen E, Protheroe C, Eltzschig HK, Colgan SP, Arita M, Lee JJ, Furuta GT. 2015. « Eosinophil-Mediated Signalling Attenuates Inflammatory Responses in Experimental Colitis ». *Gut* 64 (8): 1236-47.
- Masterson** JC, McNamee EN, Jedlicka P, Fillon S, Ruybal J, Hosford L, Rivera-Nieves J, Lee JJ, Furuta GT. 2011. « CCR3 Blockade Attenuates Eosinophilic Ileitis and Associated Remodeling ». *The American Journal of Pathology* 179 (5): 2302-14.
- Matloubian** M, David A, Engel S, Ryan JE, Cyster JG. 2000. « A Transmembrane CXC Chemokine Is a Ligand for HIV-Coreceptor Bonzo ». *Nature Immunology* 1 (4): 298-304.
- Matsushima** K, Yuya Terashima Y, Toda E, Shand F, Ueha S. 2011. « Chemokines in Inflammatory and Immune Diseases ». *Inflammation and Regeneration* 31 (1): 11-22.
- Matthews** AN, Friend DS, Zimmermann N, Sarafi MN, Luster AD, Pearlman E, Wert SE, Rothenberg ME. 1998. « Eotaxin is required for the baseline level of tissue eosinophils ».

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95 (11): 6273-78.

Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL. 2008. « A Microbial Symbiosis Factor Prevents Intestinal Inflammatory Disease ». *Nature* 453 (7195): 620-25.

McDole JR, Wheeler LW, McDonald KG, Wang B, Konjufca V, Knoop KA, Newberry RD, Miller MJ. 2012. « Goblet Cells Deliver Luminal Antigen to CD103+ Dendritic Cells in the Small Intestine ». *Nature* 483 (7389): 345-49.

McInnes IB, Kavanaugh A, Gottlieb AB, Puig L, Rahman P, Ritchlin C, Brodmerkel C, Li S, Wang Y, Mendelsohn AM, Doyle MK; PSUMMIT 1 Study Group. 2013. « Efficacy and Safety of Ustekinumab in Patients with Active Psoriatic Arthritis: 1 Year Results of the Phase 3, Multicentre, Double-Blind, Placebo-Controlled PSUMMIT 1 Trial ». *Lancet (London, England)* 382 (9894): 780-89.

McInnes IB, Mease PJ, Kirkham B, Kavanaugh A, Ritchlin CT, Rahman P, van der Heijde D, Landewé R, Conaghan PG, Gottlieb AB, Richards H, Pricop L, Ligozio G, Patekar M, Mpofu S; FUTURE 2 Study Group. 2015. « Secukinumab, a Human Anti-Interleukin-17A Monoclonal Antibody, in Patients with Psoriatic Arthritis (FUTURE 2): A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial ». *Lancet (London, England)* 386 (9999): 1137-46.

Mease PJ, Genovese MC, Greenwald MW, Ritchlin CT, Beaulieu AD, Deodhar A, Newmark R, Feng J, Erond N, Nirula A. 2014. « Brodalumab, an Anti-IL17RA Monoclonal Antibody, in Psoriatic Arthritis ». *The New England Journal of Medicine* 370 (24): 2295-2306.

Melo-Gonzalez F, Hepworth MR. 2017. « Functional and phenotypic heterogeneity of group 3 innate lymphoid cells ». *Immunology* 150 (3): 265-75.

Mendez-Enriquez E, García-Zepeda EA. 2013. « The Multiple Faces of CCL13 in Immunity and Inflammation ». *Inflammopharmacology* 21 (6): 397-406.

Mercier FE, Ragu C, Scadden DT. 2011. « The bone marrow at the crossroads of blood and immunity ». *Nature reviews. Immunology* 12 (1): 49-60.

Mesin L, Di Niro R, Thompson KM, Lundin KE, Sollid LM. 2011. « Long-Lived Plasma Cells from Human Small Intestine Biopsies Secrete Immunoglobulins for Many Weeks in Vitro ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 187 (6): 2867-74.

Miller MC, Mayo KH. 2017. « Chemokines from a Structural Perspective ». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (10).

Miossec P, Kolls JK. 2012. « Targeting IL-17 and TH17 Cells in Chronic Inflammation ». *Nature Reviews Drug Discovery* 11 (10): 763-76.

Mirpuri J, Raetz M, Sturge CR, Wilhelm CL, Benson A, Savani RC, Hooper LV, Yarovinsky F. 2014. « Proteobacteria-Specific IgA Regulates Maturation of the Intestinal Microbiota ». *Gut Microbes* 5 (1): 28-39.

Mizuno M, Noto D, Kaga N, Chiba A, Miyake S. 2017. « The dual role of short fatty acid chains in the pathogenesis of autoimmune disease models ». *PLoS ONE* 12 (2).

Mohan K, Issekutz TB. 2007. « Blockade of Chemokine Receptor CXCR3 Inhibits T Cell Recruitment to Inflamed Joints and Decreases the Severity of Adjuvant Arthritis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179 (12): 8463-69.

Monticelli LA, Osborne LC, Noti M, Tran SV, Zaiss DM, Artis D. 2015. « IL-33 promotes an innate immune pathway of intestinal tissue protection dependent on amphiregulin-EGFR interactions ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (34): 10762-67.

Mortha A, Chudnovskiy A, Hashimoto D, Bogunovic M, Spencer SP, Belkaid Y, Merad M. 2014. « Microbiota-Dependent Crosstalk Between Macrophages and ILC3 Promotes Intestinal Homeostasis ». *Science (New York, N.Y.)* 343 (6178): 1249288.

Mueller NT, Bakacs E, Combellick J, Grigoryan Z, Dominguez-Bello MG. 2015. « The infant microbiome development: mom matters ». *Trends in molecular medicine* 21 (2): 109-17.

Mukherjee S, Hooper LV. 2015. « Antimicrobial Defense of the Intestine ». *Immunity* 42 (1): 28-39.

Mumy KL, Bien JD, Pazos MA, Gronert K, Hurley BP, McCormick BA. 2008. « Distinct Isoforms of Phospholipase A2 Mediate the Ability of Salmonella enterica Serotype Typhimurium and Shigella flexneri To Induce the Transepithelial Migration of Neutrophils ». *Infection and Immunity* 76 (8): 3614-27.

Murai M, Turovskaya O, Kim G, Madan R, Karp CL, Cheroutre H, Kronenberg M. 2009. « Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis ». *Nature immunology* 10 (11): 1178-84.

Nadkarni S, Mauri C, Ehrenstein MR. 2007. « Anti-TNF-Alpha Therapy Induces a Distinct Regulatory T Cell Population in Patients with Rheumatoid Arthritis via TGF-Beta ». *The Journal of Experimental Medicine* 204 (1): 33-39.

Nagashima R, Maeda K, Imai Y, Takahashi T. 1996. « Lamina Propria Macrophages in the Human Gastrointestinal Mucosa: Their Distribution, Immunohistological Phenotype, and Function ». *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 44 (7): 721-31.

Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y. 2003. « Suppression of Immune Induction of Collagen-Induced Arthritis in IL-17-Deficient Mice ». *The Journal of Immunology* 171 (11): 6173-77.

Nanki T, Hayashida K, El-Gabalawy HS, Suson S, Shi K, Girschick HJ, Yavuz S, Lipsky PE. 2000. « Stromal Cell-Derived Factor-1-CXC Chemokine Receptor 4 Interactions Play a Central Role in CD4+ T Cell Accumulation in Rheumatoid Arthritis Synovium ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 165 (11): 6590-98.

- Nanki** T, Nagasaka K, Hayashida K, Saita Y, Miyasaka N. 2001. « Chemokines Regulate IL-6 and IL-8 Production by Fibroblast-Like Synoviocytes from Patients with Rheumatoid Arthritis ». *The Journal of Immunology* 167 (9): 5381-85.
- Nanki** T, Shimaoka T, Hayashida K, Taniguchi K, Yonehara S, Miyasaka N. 2005. « Pathogenic Role of the CXCL16-CXCR6 Pathway in Rheumatoid Arthritis ». *Arthritis and Rheumatism* 52 (10): 3004-14.
- Nencioni** A, Grünebach F, Zobywalski A, Denzlinger C, Brugger W, Brossart P. 2002. « Dendritic Cell Immunogenicity Is Regulated by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ ». *The Journal of Immunology* 169 (3): 1228-35.
- Nepelska** M, de Wouters T, Jacouton E, Béguet-Crespel F, Lapaque N, Doré J, Arulampalam V, Blottière HM. 2017. « Commensal gut bacteria modulate phosphorylation-dependent PPAR γ transcriptional activity in human intestinal epithelial cells ». *Scientific Reports* 7.
- Neutra** MR, Mantis NJ, Frey A, Giannasca PJ. 1999. « The Composition and Function of M Cell Apical Membranes: Implications for Microbial Pathogenesis ». *Seminars in Immunology* 11 (3): 171-81.
- Newkirk** MM, Zbar A, Baron M, Manges AR. 2010. « Distinct Bacterial Colonization Patterns of Escherichia Coli Subtypes Associate with Rheumatoid Factor Status in Early Inflammatory Arthritis ». *Rheumatology (Oxford, England)* 49 (7): 1311-16.
- Nguyen** LT, Jacobs J, Mathis D, Benoist C. 2007. « Where FoxP3-Dependent Regulatory T Cells Impinge on the Development of Inflammatory Arthritis ». *Arthritis and Rheumatism* 56 (2): 509-20.
- Nibbs** RJ, Salcedo TW, Campbell JD, Yao XT, Li Y, Nardelli B, Olsen HS, Morris TS, Proudfoot AE, Patel VP, Graham GJ. 2000. « C-C Chemokine Receptor 3 Antagonism by the Beta-Chemokine Macrophage Inflammatory Protein 4, a Property Strongly Enhanced by an Amino-Terminal Alanine-Methionine Swap ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 164 (3): 1488-97.
- Nie** H, Zheng Y, Li R, Guo TB, He D, Fang L, Liu X, Xiao L, Chen X, Wan B, Chin YE, Zhang JZ. 2013. « Phosphorylation of FOXP3 Controls Regulatory T Cell Function and Is Inhibited by TNF- α in Rheumatoid Arthritis ». *Nature Medicine* 19 (3): 322-28.
- Nurieva** R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L, Schluns K, Tian Q, Watowich SS, Jetten AM, Dong C. 2007. « Essential Autocrine Regulation by IL-21 in the Generation of Inflammatory T Cells ». *Nature* 448 (7152): 480-83.
- Ogrendik** M. 2013. « Antibiotics for the treatment of rheumatoid arthritis ». *International Journal of General Medicine* 7 : 43-47.
- Ohnmacht** C, Voehringer D. 2009. « Basophil Effector Function and Homeostasis during Helminth Infection ». *Blood* 113 (12): 2816-25.
- Okada** T, Ngo VN, Ekland EH, Förster R, Lipp M, Littman DR, Cyster JG. 2002. « Chemokine Requirements for B Cell Entry to Lymph Nodes and Peyer's Patches ». *The Journal of Experimental Medicine* 196 (1): 65-75.

Omenetti S, Pizarro TT. 2015. « The Treg/Th17 Axis: A Dynamic Balance Regulated by the Gut Microbiome ». *Frontiers in Immunology* 6: 639.

Ormseth MJ, Oeser AM, Cunningham A, Bian A, Shintani A, Solus J, Tanner S, Stein CM. 2013. « Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Agonist Effect on Rheumatoid Arthritis: A Randomized Controlled Trial ». *Arthritis Research & Therapy* 15 (5): R110.

Pablos JL, Santiago B, Galindo M, Torres C, Brehmer MT, Blanco FJ, García-Lázaro FJ. 2003. « Synovocyte-Derived CXCL12 Is Displayed on Endothelium and Induces Angiogenesis in Rheumatoid Arthritis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 170 (4): 2147-52.

Palma A, Sainaghi PP, Amoroso A, Fresu LG, Avanzi G, Pirisi M, Brunelleschi S. 2012. « Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Expression in Monocytes/Macrophages from Rheumatoid Arthritis Patients: Relation to Disease Activity and Therapy Efficacy-a Pilot Study ». *Rheumatology (Oxford, England)* 51 (11): 1942-52.

Paquet J, Goebel JC, Delaunay C, Pinzano A, Grossin L, Cournil-Henrionnet C, Gillet P, Netter P, Jouzeau JY, Moulin D. 2012. « Cytokines Profiling by Multiplex Analysis in Experimental Arthritis: Which Pathophysiological Relevance for Articular versus Systemic Mediators? » *Arthritis Research & Therapy* 14 (2): R60.

Park MJ, Lee SH, Kim EK, Lee EJ, Baek JA, Park SH, Kwok SK, Cho ML. 2018. « Interleukin-10 Produced by Myeloid-Derived Suppressor Cells Is Critical for the Induction of Tregs and Attenuation of Rheumatoid Inflammation in Mice ». *Scientific Reports* 8 (1): 3753.

Patel DD, Zachariah JP, Whichard LP. 2001. « CXCR3 and CCR5 Ligands in Rheumatoid Arthritis Synovium ». *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 98 (1): 39-45.

Pavkova Goldbergova M, Lipkova J, Pavek N, Gatterova J, Vasku A, Soucek M, Nemec P. 2012. « RANTES, MCP-1 Chemokines and Factors Describing Rheumatoid Arthritis ». *Molecular Immunology* 52 (3-4): 273-78.

Persson EK, Uronen-Hansson H, Semmrich M, Rivollier A, Hägerbrand K, Marsal J, Gudjonsson S, Håkansson U, Reizis B, Kotarsky K, Agace WW. 2013. « IRF4 Transcription-Factor-Dependent CD103(+)CD11b(+) Dendritic Cells Drive Mucosal T Helper 17 Cell Differentiation ». *Immunity* 38 (5): 958-69.

Petry A, Weitnauer M, Görlach A. 2010. « Receptor Activation of NADPH Oxidases ». *Antioxidants & Redox Signaling* 13 (4): 467-87.

Peyrin-Biroulet L, Beisner J, Wang G, Nuding S, Oommen ST, Kelly D, Parmentier-Decrucq E, Dessein R, Merour E, Chavatte P, Grandjean T, Bressenot A, Desreumaux P, Colombel JF, Desvergne B, Stange EF, Wehkamp J, Chamaillard M. 2010. « Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation is required for maintenance of innate antimicrobial immunity in the colon ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (19): 8772-77.

Pfeifle R, Rothe T, Ipseiz N, Scherer HU, Culemann S, Harre U, Ackermann JA, Seefried M, Kleyer A, Uderhardt S, Haugg B, Hueber AJ, Daum P, Heidkamp GF, Ge C, Böhm S, Lux A, Schuh W, Magorivska I, Nandakumar KS, Lönnblom E, Becker C, Dudziak D, Wuhrer

M, Rombouts Y, Koeleman CA, Toes R, Winkler TH, Holmdahl R, Herrmann M, Blüml S, Nimmerjahn F, Schett G, Krönke G. 2017. « Regulation of Autoantibody Activity by the IL-23-TH17 Axis Determines the Onset of Autoimmune Disease ». *Nature Immunology* 18 (1): 104-13.

Pham TA, Clare S, Goulding D, Arasteh JM, Stares MD, Browne HP, Keane JA, Page AJ, Kumasaka N, Kane L, Mottram L, Harcourt K, Hale C, Arends MJ, Gaffney DJ; Sanger Mouse Genetics Project, Dougan G, Lawley TD. 2014. « Epithelial IL-22RA1-Mediated Fucosylation Promotes Intestinal Colonization Resistance to an Opportunistic Pathogen ». *Cell Host & Microbe* 16 (4): 504-16.

Philipson CW, Bassaganya-Riera J, Viladomiu M, Pedragosa M, Guarrant RL, Roche JK, Hontecillas R. 2013. « The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ in Immune Responses to Enteraggregative Escherichia Coli Infection ». *PloS One* 8 (2): e57812.

Pianta A, Arvikar SL, Strle K, Drouin EE, Wang Q, Costello CE, Steere AC. 2017. « Two rheumatoid arthritis-specific autoantigens correlate microbial immunity with autoimmune responses in joints ». *The Journal of Clinical Investigation* 127 (8): 2946-56.

Pompei A, Cordisco L, Amaretti A, Zanoni S, Matteuzzi D, Rossi M. 2007. « Folate Production by Bifidobacteria as a Potential Probiotic Property ». *Applied and Environmental Microbiology* 73 (1): 179-85.

Ponath PD, Qin S, Post TW, Wang J, Wu L, Gerard NP, Newman W, Gerard C, Mackay CR. 1996. « Molecular Cloning and Characterization of a Human Eotaxin Receptor Expressed Selectively on Eosinophils. » *Journal of Experimental Medicine* 183 (6): 2437-48.

Prakken B, Ellen Wehrens, van Wijk F. 2013. « Editorial: Quality or Quantity? Unraveling the Role of Treg Cells in Rheumatoid Arthritis ». *Arthritis and Rheumatism* 65 (3): 552-54.

Price KS, Friend DS, Mellor EA, De Jesus N, Watts GF, Boyce JA. 2003. « CC Chemokine Receptor 3 Mobilizes to the Surface of Human Mast Cells and Potentiates Immunoglobulin E-Dependent Generation of Interleukin 13 ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 28 (4): 420-27.

Puccetti A, Dolcino M, Tinazzi E, Moretta F, D'Angelo S, Olivieri I, Lunardi C. 2017. « Antibodies Directed against a Peptide Epitope of a Klebsiella Pneumoniae-Derived Protein Are Present in Ankylosing Spondylitis ». *PloS One* 12 (1): e0171073.

Qin S, Rottman JB, Myers P, Kassam N, Weinblatt M, Loetscher M, Koch AE, Moser B, Mackay CR. 1998. « The Chemokine Receptors CXCR3 and CCR5 Mark Subsets of T Cells Associated with Certain Inflammatory Reactions ». *The Journal of Clinical Investigation* 101 (4): 746-54.

Raffatellu M, George MD, Akiyama Y, Hornsby MJ, Nuccio SP, Paixao TA, Butler BP, Chu H, Santos RL, Berger T, Mak TW, Tsolis RM, Bevins CL, Solnick JV, Dandekar S, Bäumlér AJ. 2009. « Lipocalin-2 resistance of Salmonella enterica serotype Typhimurium confers an advantage during life in the inflamed intestine ». *Cell host & microbe* 5 (5): 476-86.

Rajilić-Stojanović M, de Vos WM. 2014. « The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota ». *FEMS Microbiology Reviews* 38 (5): 996-1047.

Ramirez GA, Yacoub MR, Ripa M, Mannina D, Cariddi A, Saporiti N, Ciceri F, Castagna A, Colombo G, Dagna L. 2018. « Eosinophils from Physiology to Disease: A Comprehensive Review ». *BioMed Research International* 2018.

Ranganathan V, Gracey E, Brown MA, Inman RD, Haroon N. 2017. « Pathogenesis of Ankylosing Spondylitis - Recent Advances and Future Directions ». *Nature Reviews. Rheumatology* 13 (6): 359-67.

Rashid T, Jayakumar KS, Binder A, Ellis S, Cunningham P, Ebringer A. 2007. « Rheumatoid Arthritis Patients Have Elevated Antibodies to Cross-Reactive and Non Cross-Reactive Antigens from Proteus Microbes ». *Clinical and Experimental Rheumatology* 25 (2): 259-67.

Rashid T, Ebringer A. 2007. « Ankylosing Spondylitis Is Linked to Klebsiella-the Evidence ». *Clinical Rheumatology* 26 (6): 858-64.

Rashid T, Ebringer A. 2012. « Autoimmunity in Rheumatic Diseases Is Induced by Microbial Infections via Crossreactivity or Molecular Mimicry ». *Autoimmune Diseases* 2012.

Reddy, Raju C., Venkata R. Narala, Venkateshwar G. Keshamouni, Jami E. Milam, Michael W. Newstead, et Theodore J. Standiford. 2008. « Sepsis-induced inhibition of neutrophil chemotaxis is mediated by activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ ». *Blood* 112 (10): 4250-58.

Reddy RC, Narala VR, Keshamouni VG, Milam JE, Newstead MW, Standiford TJ. 2000. « Germ-Free Mice Do Not Develop Ankylosing Entesopathy, a Spontaneous Joint Disease ». *Human Immunology* 61 (6): 555-58.

Rehaume LM, Mondot S, Aguirre de Cárcer D, Velasco J, Benham H, Hasnain SZ, Bowman J, Ruutu M, Hansbro PM, McGuckin MA, Morrison M, Thomas R. 2014. « ZAP-70 Genotype Disrupts the Relationship between Microbiota and Host, Leading to Spondyloarthritis and Ileitis in SKG Mice ». *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 66 (10): 2780-92.

Ren D, Collingwood TN, Rebar EJ, Wolffe AP, Camp HS. 2002. « PPAR γ knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPAR γ 2 but not PPAR γ 1 reactivates adipogenesis ». *Genes & Development* 16 (1): 27-32.

Ribet D, Cossart P. 2015. « How Bacterial Pathogens Colonize Their Hosts and Invade Deeper Tissues ». *Microbes and Infection* 17 (3): 173-83.

Río-Martínez del P, Navarro-Compán V, Díaz-Miguel C, Almodóvar R, Mulero J, De Miguel E; Esperanza Group. 2016. « Similarities and Differences between Patients Fulfilling Axial and Peripheral ASAS Criteria for Spondyloarthritis: Results from the Esperanza Cohort ». *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 45 (4): 400-403.

Ritchlin C, Rahman P, Kavanaugh A, McInnes IB, Puig L, Li S, Wang Y, Shen YK, Doyle MK, Mendelsohn AM, Gottlieb AB; PSUMMIT 2 Study Group. 2014. « Efficacy and Safety of the Anti-IL-12/23 P40 Monoclonal Antibody, Ustekinumab, in Patients with Active Psoriatic Arthritis despite Conventional Non-Biological and Biological Anti-Tumour Necrosis Factor

Therapy: 6-Month and 1-Year Results of the Phase 3, Multicentre, Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomised PSUMMIT 2 Trial ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 73 (6): 990-99.

Rogier R, Ederveen THA, Boekhorst J, Wopereis H, Scher JU, Manasson J, Frambach SJCM, Knol J, Garssen J, van der Kraan PM, Koenders MI, van den Berg WB, van Hijum SAFT, Abdollahi-Roodsaz S. 2017. « Aberrant intestinal microbiota due to IL-1 receptor antagonist deficiency promotes IL-17- and TLR4-dependent arthritis ». *Microbiome* 5.

Rogier R, Evans-Marin H, Manasson J, van der Kraan PM, Walgreen B, Helsen MM, van den Bersselaar LA, van de Loo FA, van Lent PL, Abramson SB, van den Berg WB, Koenders MI, Scher JU, Abdollahi-Roodsaz S. 2017. « Alteration of the Intestinal Microbiome Characterizes Preclinical Inflammatory Arthritis in Mice and Its Modulation Attenuates Established Arthritis ». *Scientific Reports* 7 (1): 15613.

Romagnani P, De Paulis A, Beltrame C, Annunziato F, Dente V, Maggi E, Romagnani S, Marone G. 1999. « Tryptase-Chymase Double-Positive Human Mast Cells Express the Eotaxin Receptor CCR3 and Are Attracted by CCR3-Binding Chemokines ». *The American Journal of Pathology* 155 (4): 1195-1204.

Roncarolo MG, Gregori S, Bacchetta R, Battaglia M. 2014. « Tr1 Cells and the Counter-Regulation of Immunity: Natural Mechanisms and Therapeutic Applications ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 380: 39-68.

Roon van JA, Hartgring SA, van der Wurff-Jacobs KM, Bijlsma JW, Lafeber FP. 2010. « Numbers of CD25+Foxp3+ T Cells That Lack the IL-7 Receptor Are Increased Intrarticularly and Have Impaired Suppressive Function in RA Patients ». *Rheumatology (Oxford, England)* 49 (11): 2084-89.

Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM. 1999. « PPAR Gamma Is Required for the Differentiation of Adipose Tissue in Vivo and in Vitro ». *Molecular Cell* 4 (4): 611-17.

Rosen ED, Spiegelman BM. 2001. « PPARgamma: A Nuclear Regulator of Metabolism, Differentiation, and Cell Growth ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (41): 37731-34.

Roşu A, Mărgăritescu C, Stepan A, Muşetescu A, Ene M. 2012. « IL-17 Patterns in Synovium, Serum and Synovial Fluid from Treatment-Naïve, Early Rheumatoid Arthritis Patients ». *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 53 (1): 73-80.

Rudwaleit M, Jurik AG, Hermann KG, Landewé R, van der Heijde D, Baraliakos X, Marzo-Ortega H, Ostergaard M, Braun J, Sieper J. 2009. « Defining Active Sacroiliitis on Magnetic Resonance Imaging (MRI) for Classification of Axial Spondyloarthritis: A Consensual Approach by the ASAS/OMERACT MRI Group ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 68 (10): 1520-27.

Rump L, Matthey DL, Kehoe O, Middleton J. 2017. « An Initial Investigation into Endothelial CC Chemokine Expression in the Human Rheumatoid Synovium ». *Cytokine* 97: 133-40.

Ruutu M, Thomas G, Steck R, Degli-Esposti MA, Zinkernagel MS, Alexander K, Velasco J, Strutton G, Tran A, Benham H, Rehaume L, Wilson RJ, Kikly K, Davies J, Pettit AR, Brown

MA, McGuckin MA, Thomas R. 2012. « β -Glucan Triggers Spondylarthritis and Crohn's Disease-like Ileitis in SKG Mice ». *Arthritis and Rheumatism* 64 (7): 2211-22.

Rysnik O, McHugh K, van Duivenvoorde L, van Tok M, Taurog J, Kollnberger S, Baeten D, Bowness P. 2016. « Data showing non-conventional HLA-B27 expression in axial joints and gut tissue from B27 transgenic rats, and in frozen and paraffin-fixed synovial SpA tissue ». *Data in Brief* 9 : 100-111.

Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, Nomura T, Tagami T, Yamazaki S, Sakihama T, Matsutani T, Negishi I, Nakatsuru S, Sakaguchi S. 2003. « Altered Thymic T-Cell Selection Due to a Mutation of the ZAP-70 Gene Causes Autoimmune Arthritis in Mice ». *Nature* 426 (6965): 454-60.

Sakkas LI, Daoussis D, Liossis SN, Bogdanos DP. 2017. « The Infectious Basis of ACPA-Positive Rheumatoid Arthritis ». *Frontiers in Microbiology* 8: 1853.

Salmi M, Adams DH, Trivedi P, Hänninen A, Jalkanen S. 2015. « Chapter 90 - Systemic Manifestations of Mucosal Diseases: Trafficking of Gut Immune Cells to Joint, Liver, and Pancreas ». In *Mucosal Immunology (Fourth Edition)*, édité par Jiri Mestecky, Warren Strober, Michael W. Russell, Brian L. Kelsall, Hilde Cheroutre, et Bart N. Lambrecht, 1749-59. Boston: Academic Press.

Sánchez-Hidalgo M, Martín AR, Villegas I, Alarcón De La Lastra C. 2005. « Rosiglitazone, an Agonist of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma, Reduces Chronic Colonic Inflammation in Rats ». *Biochemical Pharmacology* 69 (12): 1733-44.

Sandhya P, Danda D, Sharma D, Scaria V. 2016. « Does the Buck Stop with the Bugs?: An Overview of Microbial Dysbiosis in Rheumatoid Arthritis ». *International Journal of Rheumatic Diseases* 19 (1): 8-20.

Sano T, Huang W, Hall JA, Yang Y, Chen A, Gavzy SJ, Lee JY, Ziel JW, Miraldi ER, Domingos AI, Bonneau R, Littman DR. 2015. « An IL-23R/IL-22 Circuit Regulates Epithelial Serum Amyloid A to Promote Local Effector Th17 Responses ». *Cell* 163 (2): 381-93.

Santos F, Vera JL, Lamosa P, de Valdez GF, de Vos WM, Santos H, Sesma F, Hugenholtz J. 2007. « Pseudovitamin B 12 Is the Corrino Produced by *Lactobacillus Reuteri* CRL1098 under Anaerobic Conditions ». *FEBS Letters* 581 (25): 4865-70.

Sartor RB. 2008. « Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases ». *Gastroenterology* 134 (2): 577-94.

Sato K, Takahashi N, Kato T, Matsuda Y, Yokoji M, Yamada M, Nakajima T, Kondo N, Endo N, Yamamoto R, Noiri Y, Ohno H, Yamazaki K 2017. « Aggravation of Collagen-Induced Arthritis by Orally Administered *Porphyromonas Gingivalis* through Modulation of the Gut Microbiota and Gut Immune System ». *Scientific Reports* 7 (1): 6955.

Satoh-Takayama N, Serafini N, Verrier T, Rekiki A, Renauld JC, Frankel G, Di Santo JP. 2014. « The Chemokine Receptor CXCR6 Controls the Functional Topography of Interleukin-22 Producing Intestinal Innate Lymphoid Cells ». *Immunity* 41 (5): 776-88.

Sawa S, Cherrier M, Lochner M, Satoh-Takayama N, Fehling HJ, Langa F, Di Santo JP, Eberl G. 2010. « Lineage Relationship Analysis of ROR γ t⁺ Innate Lymphoid Cells ». *Science* 330 (6004): 665-69.

Sawai H, Park YW, He X, Goronzy JJ, Weyand CM. 2007. « Fractalkine Mediates T Cell-Dependent Proliferation of Synovial Fibroblasts in Rheumatoid Arthritis ». *Arthritis and Rheumatism* 56 (10): 3215-25.

Scher JU, Abramson SB. 2011. « The microbiome and rheumatoid arthritis ». *Nature Reviews. Rheumatology* 7 (10): 569-78.

Scher JU, Szczesnak A, Longman RS, Segata N, Ubeda C, Bielski C, Rostron T, Cerundolo V, Pamer EG, Abramson SB, Huttenhower C, Littman DR. 2013. « Expansion of intestinal Prevotella copri correlates with enhanced susceptibility to arthritis ». *eLife* 2.

Schiraldi M, Raucci A, Muñoz LM, Livoti E, Celona B, Venereau E, Apuzzo T, De Marchis F, Pedotti M, Bachi A, Thelen M, Varani L, Mellado M, Proudfoot A, Bianchi ME, Uguccioni M. 2012. « HMGB1 Promotes Recruitment of Inflammatory Cells to Damaged Tissues by Forming a Complex with CXCL12 and Signaling via CXCR4 ». *The Journal of Experimental Medicine* 209 (3): 551-63.

Schlenk J, Lorenz HM, Haas JP, Herrmann M, Hohenberger G, Kalden JR, Röllinghoff M, Beuscher HU. 2005. « Extravasation into Synovial Tissue Induces CCL20 MRNA Expression in Polymorphonuclear Neutrophils of Patients with Rheumatoid Arthritis ». *The Journal of Rheumatology* 32 (12): 2291-98.

Schwab M, Reynders V, Ulrich S, Zahn N, Stein J, Schröder O. 2006. « PPAR γ Is a Key Target of Butyrate-Induced Caspase-3 Activation in the Colorectal Cancer Cell Line Caco-2 ». *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death* 11 (10): 1801-11.

Schwimmbeck PL, Yu DT, Oldstone MB. 1987. « Autoantibodies to HLA B27 in the Sera of HLA B27 Patients with Ankylosing Spondylitis and Reiter's Syndrome. Molecular Mimicry with Klebsiella Pneumoniae as Potential Mechanism of Autoimmune Disease ». *The Journal of Experimental Medicine* 166 (1): 173-81.

Seo GY, Jang YS, Kim J, Choe J, Han HJ, Lee JM, Kang SH, Rhee KJ, Park SR, Kim WS, Kim PH. 2014. « Retinoic Acid Acts as a Selective Human IgA Switch Factor ». *Human Immunology* 75 (8): 923-29.

Serbina NV, Pamer EG. 2006. « Monocyte Emigration from Bone Marrow during Bacterial Infection Requires Signals Mediated by Chemokine Receptor CCR2 ». *Nature Immunology* 7 (3): 311-17.

Seth S, Oberdörfer L, Hyde R, Hoff K, Thies V, Worbs T, Schmitz S, Förster R. 2011. « CCR7 Essentially Contributes to the Homing of Plasmacytoid Dendritic Cells to Lymph Nodes under Steady-State as Well as Inflammatory Conditions ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186 (6): 3364-72.

Shahin D, Toraby EE, Abdel-Malek H, Boshra V, Elsamanoudy AZ, Shaheen D. 2011. « Effect of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Agonist (Pioglitazone) and

Methotrexate on Disease Activity in Rheumatoid Arthritis (Experimental and Clinical Study) ». *Clinical Medicine Insights. Arthritis and Musculoskeletal Disorders* 4: 1-10.

Shan ZZ, Masuko-Hongo K, Dai SM, Nakamura H, Kato T, Nishioka K. 2004. « A Potential Role of 15-Deoxy-Delta(12,14)-Prostaglandin J2 for Induction of Human Articular Chondrocyte Apoptosis in Arthritis ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (36): 37939-50.

Shao YY, Wang L, Hicks DG, Tarr S, Ballock RT. 2005. « Expression and Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Growth Plate Chondrocytes ». *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society* 23 (5): 1139-45.

Sharma R, Kaundal RK, Sharma SS. 2009. « Amelioration of Pulmonary Dysfunction and Neutrophilic Inflammation by PPAR Gamma Agonist in LPS-Exposed Guinea Pigs ». *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 22 (3): 183-89.

Shi J, Aono S, Lu W, Ouellette AJ, Hu X, Ji Y, Wang L, Lenz S, van Ginkel FW, Liles M, Dykstra C, Morrison EE, Elson CO. 2007. « A Novel Role for Defensins in Intestinal Homeostasis: Regulation of IL-1beta Secretion ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179 (2): 1245-53.

Shikichi M, Kitamura HP, Yanase H, Konno A, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T. 1999. « Three-Dimensional Ultrastructure of Synoviocytes in the Horse Joint as Revealed by the Scanning Electron Microscope ». *Archives of Histology and Cytology* 62 (3): 219-29.

Shin NR, Whon TW, Bae JW. 2015. « Proteobacteria: Microbial Signature of Dysbiosis in Gut Microbiota ». *Trends in Biotechnology* 33 (9): 496-503.

Shiojiri T, Wada K, Nakajima A, Katayama K, Shibuya A, Kudo C, Kadowaki T, Mayumi T, Yura Y, Kamisaki Y. 2002. « PPAR Gamma Ligands Inhibit Nitrotyrosine Formation and Inflammatory Mediator Expressions in Adjuvant-Induced Rheumatoid Arthritis Mice ». *European Journal of Pharmacology* 448 (2-3): 231-38.

Shivashankar R, Loftus EV Jr, Tremaine WJ, Bongartz T, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Matteson EL. 2012. « Incidence of Spondyloarthropathy in Patients with Crohn's Disease: A Population-Based Study ». *The Journal of Rheumatology* 39 (11): 2148-52.

Simoni Y, Fehlings M, Kløverpris HN, McGovern N, Koo SL, Loh CY, Lim S, Kurioka A, Fergusson JR, Tang CL, Kam MH, Dennis K, Lim TKH, Fui ACY, Hoong CW, Chan JKY, Curotto de Lafaille M, Narayanan S, Baig S, Shabeer M, Toh SES, Tan HKK, Anicete R, Tan EH, Takano A, Klenerman P, Leslie A, Tan DSW, Tan IB, Ginhoux F, Newell EW. 2017. « Human Innate Lymphoid Cell Subsets Possess Tissue-Type Based Heterogeneity in Phenotype and Frequency ». *Immunity* 46 (1): 148-61.

Sinkorová Z, Capková J, Niederlová J, Stepánková R, Sinkora J. 2008. « Commensal Intestinal Bacterial Strains Trigger Ankylosing Enthesopathy of the Ankle in Inbred B10.BR (H-2(k)) Male Mice ». *Human Immunology* 69 (12): 845-50.

Smith PD, Smythies LE, Shen R, Greenwell-Wild T, Gliozzi M, Wahl SM. 2011. « Intestinal Macrophages and Response to Microbial Encroachment ». *Mucosal immunology* 4 (1).

Smythies LE, Shen R, Bimczok D, Novak L, Clements RH, Eckhoff DE, Bouchard P, George MD, Hu WK, Dandekar S, Smith PD. 2010. « Inflammation Anergy in Human Intestinal Macrophages Is Due to Smad-Induced IkappaBalpha Expression and NF-KappaB Inactivation ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (25): 19593-604.

Sofi F, Parrey A, Ahmad M. 2017. « Eosinophilia in rheumatoid arthritis patients and its relation to disease activity: A single center experience from Kashmir, India ». *The Egyptian Rheumatologist* 39 (2): 65-67.

Somasundaram R, Nuij VJ, van der Woude CJ, Kuipers EJ, Peppelenbosch MP, Fuhler GM. 2013. « Peripheral Neutrophil Functions and Cell Signalling in Crohn's Disease ». *PloS One* 8 (12): e84521.

Song DJ, Shim MH, Lee N, Yoo Y, Choung JT. 2017. « CCR3 Monoclonal Antibody Inhibits Eosinophilic Inflammation and Mucosal Injury in a Mouse Model of Eosinophilic Gastroenteritis ». *Allergy, Asthma & Immunology Research* 9 (4): 360-67.

Sonnenberg GF, Monticelli LA, Alenghat T, Fung TC, Hutnick NA, Kunisawa J, Shibata N, Grunberg S, Sinha R, Zahm AM, Tardif MR, Sathaliyawala T, Kubota M, Farber DL, Collman RG, Shaked A, Fouser LA, Weiner DB, Tessier PA, Friedman JR, Kiyono H, Bushman FD, Chang KM, Artis D. 2012. « Innate Lymphoid Cells Promote Anatomical Containment of Lymphoid-Resident Commensal Bacteria ». *Science (New York, N.Y.)* 336 (6086): 1321-25.

Sonnenberg GF, Monticelli LA, Elloso MM, Fouser LA, Artis D. 2011. « CD4(+) Lymphoid Tissue-Inducer Cells Promote Innate Immunity in the Gut ». *Immunity* 34 (1): 122-34.

Sørensen NB, Nielsen HL, Varming K, Nielsen H. 2013. « Neutrophil Activation by *Campylobacter Concisus* ». *Gut Pathogens* 5 (1): 17.

Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, Koyasu S, Locksley RM, McKenzie AN, Mebius RE, Powrie F, Vivier E. 2013. « Innate Lymphoid Cells--a Proposal for Uniform Nomenclature ». *Nature Reviews. Immunology* 13 (2): 145-49.

Stoll ML, Kumar R, Morrow CD, Lefkowitz EJ, Cui X, Genin A, Cron RQ, Elson CO. 2014. « Altered microbiota associated with abnormal humoral immune responses to commensal organisms in enthesitis-related arthritis ». *Arthritis Research & Therapy* 16 (6).

Stout MJ, Conlon B, Landeau M, Lee I, Bower C, Zhao Q, Roehl KA, Nelson DM, Macones GA, Mysorekar IU. 2013. « Identification of Intracellular Bacteria in the Basal Plate of the Human Placenta in Term and Preterm Gestations ». *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 208 (3): 226.e1-7.

Strand V, Betts KA, Mittal M, Song J, Skup M, Joshi A. 2017. « Comparative Effectiveness of Adalimumab versus Secukinumab for the Treatment of Psoriatic Arthritis: A Matching-Adjusted Indirect Comparison ». *Rheumatology and Therapy* 4 (2): 349-62.

Strand V, Kimberly R, Isaacs JD. 2007. « Biologic Therapies in Rheumatology: Lessons Learned, Future Directions ». *Nature Reviews. Drug Discovery* 6 (1): 75-92.

Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Van Damme J, Walz A, Marriott D, Chan SY, Rocznia S, Shanafelt AB. 1995. « The Functional Role of the ELR Motif in CXC Chemokine-Mediated Angiogenesis ». *The Journal of Biological Chemistry* 270 (45): 27348-57.

Sucur A, Jajic Z, Artukovic M, Matijasevic MI, Anic B, Flegar D, Markotic A, Kelava T, Ivcevic S, Kovacic N, Katavic V, Grcevic D. 2017. « Chemokine Signals Are Crucial for Enhanced Homing and Differentiation of Circulating Osteoclast Progenitor Cells ». *Arthritis Research & Therapy* 19 (1): 142.

Sugawara R, Lee EJ, Jang MS, Jeun EJ, Hong CP, Kim JH, Park A, Yun CH, Hong SW, Kim YM, Seoh JY, Jung Y, Surh CD, Miyasaka M, Yang BG, Jang MH. 2016. « Small Intestinal Eosinophils Regulate Th17 Cells by Producing IL-1 Receptor Antagonist ». *The Journal of Experimental Medicine* 213 (4): 555-67.

Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, Belkaid Y. 2007. « Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid ». *The Journal of Experimental Medicine* 204 (8): 1775-85.

Sun G, Hou Y, Gong W, Liu S, Li J, Yuan Y, Zhang D, Chen Q, Yan X. 2018. « Adoptive Induced Antigen-Specific Treg Cells Reverse Inflammation in Collagen-Induced Arthritis Mouse Model ». *Inflammation* 41 (2): 485-95.

Sun M, He C, Cong Y, Liu Z. 2015. « Regulatory Immune Cells in Regulation of Intestinal Inflammatory Response to Microbiota ». *Mucosal Immunology* 8 (5): 969-78.

Sun X, Feng X, Tan W, Lin N, Hua M, Wei Y, Wang F, Li N, Zhang M. 2015. « Adiponectin exacerbates collagen-induced arthritis via enhancing Th17 response and prompting RANKL expression ». *Scientific Reports* 5

Sun Z, Unutmaz D, Zou YR, Sunshine MJ, Pierani A, Brenner-Morton S, Mebius RE, Littman DR. 2000. « Requirement for RORgamma in Thymocyte Survival and Lymphoid Organ Development ». *Science (New York, N.Y.)* 288 (5475): 2369-73.

Suratt BT, Petty JM, Young SK, Malcolm KC, Lieber JG, Nick JA, Gonzalo JA, Henson PM, Worthen GS. 2004. « Role of the CXCR4/SDF-1 Chemokine Axis in Circulating Neutrophil Homeostasis ». *Blood* 104 (2): 565-71.

Syversen SW, Goll GL, Haavardsholm EA, Bøyesen P, Lea T, Kvien TK. 2008. « A High Serum Level of Eotaxin (CCL 11) Is Associated with Less Radiographic Progression in Early Rheumatoid Arthritis Patients ». *Arthritis Research & Therapy* 10 (2): R28.

Szatmari I, Rajnavolgyi E, Nagy L. 2006. « PPARgamma, a Lipid-Activated Transcription Factor as a Regulator of Dendritic Cell Function ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1088 : 207-18.

Szekanecz Z, Koch AE. 2016. « Successes and Failures of Chemokine-Pathway Targeting in Rheumatoid Arthritis ». *Nature Reviews. Rheumatology* 12 (1): 5-13.

Szekanecz Z, Vegvari A, Szabo Z, Koch AE. 2010. « Chemokines and chemokine receptors in arthritis ». *Frontiers in bioscience (Scholar edition)* 2: 153-67.

Széles L, Töröcsik D, Nagy L. 2007. « PPARgamma in Immunity and Inflammation: Cell Types and Diseases ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1771 (8): 1014-30.

Takabatake Y, Sugiyama T, Kohara H, Matsusaka T, Kurihara H, Koni PA, Nagasawa Y, Hamano T, Matsui I, Kawada N, Imai E, Nagasawa T, Rakugi H, Isaka Y. 2009. « The CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 Axis Is Essential for the Development of Renal Vasculature ». *Journal of the American Society of Nephrology* 20 (8): 1714-23.

Takaki A, Arinobu Y, Irino K, Tsuzuki H, Ota Y, Oroji D, Ayano M, Kimoto Y, Mitoma H, Akahoshi M, Niro H, Tsukamoto H, Horiuchi T, Akashi K. 2016. « Functiona and quantitative changes of CCR6+ type3 innate lymphoid cells in murine collagen-induced arthritis ». Abstract in *America College of Rheumatology*.

Talayero P, Mancebo E, Calvo-Pulido J, Rodríguez-Muñoz S, Bernardo I, Laguna-Goya R, Cano-Romero FL, García-Sesma A, Loinaz C, Jiménez C, Justo I, Paz-Artal E. 2016. « Innate Lymphoid Cells Groups 1 and 3 in the Epithelial Compartment of Functional Human Intestinal Allografts ». *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 16 (1): 72-82.

Talbot J, Bianchini FJ, Nascimento DC, Oliveira RD, Souto FO, Pinto LG, Peres RS, Silva JR, Almeida SC, Louzada-Junior P, Cunha TM, Cunha FQ, Alves-Filho JC. 2015. « CCR2 Expression in Neutrophils Plays a Critical Role in Their Migration Into the Joints in Rheumatoid Arthritis ». *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 67 (7): 1751-59.

Taurog JD, Richardson JA, Croft JT, Simmons WA, Zhou M, Fernández-Sueiro JL, Balish E, Hammer RE. 1994. « The Germfree State Prevents Development of Gut and Joint Inflammatory Disease in HLA-B27 Transgenic Rats ». *The Journal of Experimental Medicine* 180 (6): 2359-64.

Taurog JD, Chhabra A, Colbert RA. 2016. « Ankylosing Spondylitis and Axial Spondyloarthritis ». *The New England Journal of Medicine* 374 (26): 2563-74.

Tay CH. 1999. « Eosinophilic Arthritis ». *Rheumatology* 38 (12): 1188-94.

Teng F, Felix KM, Bradley CP, Naskar D, Ma H, Raslan WA, Wu HJ. 2017. « The impact of age and gut microbiota on Th17 and Tfh cells in K/BxN autoimmune arthritis ». *Arthritis Research & Therapy* 19.

Tezuka H, Abe Y, Asano J, Sato T, Liu J, Iwata M, Ohteki T. 2011. « Prominent Role for Plasmacytoid Dendritic Cells in Mucosal T Cell-Independent IgA Induction ». *Immunity* 34 (2): 247-57.

Tezuka H, Abe Y, Iwata M, Takeuchi H, Ishikawa H, Matsushita M, Shiohara T, Akira S, Ohteki T. 2007. « Regulation of IgA Production by Naturally Occurring TNF/INOS-Producing Dendritic Cells ». *Nature* 448 (7156): 929-33.

Tomas J, Mulet C, Saffarian A, Cavin JB, Ducroc R, Regnault B, Kun Tan C, Duszka K, Burcelin R, Wahli W, Sansonetti PJ, Pédrón T. 2016. « High-fat diet modifies the PPAR-γ

pathway leading to disruption of microbial and physiological ecosystem in murine small intestine ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (40): E5934-43.

Tong B, Dou Y, Wang T, Yu J, Wu X, Lu Q, Chou G, Wang Z, Kong L, Dai Y, Xia Y. 2015. « Norisoboldine Ameliorates Collagen-Induced Arthritis through Regulating the Balance between Th17 and Regulatory T Cells in Gut-Associated Lymphoid Tissues ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 282 (1): 90-99.

Tong B, Yu J, Wang T, Dou Y, Wu X, Kong L, Dai Y, Xia Y. 2015. « Sinomenine Suppresses Collagen-Induced Arthritis by Reciprocal Modulation of Regulatory T Cells and Th17 Cells in Gut-Associated Lymphoid Tissues ». *Molecular Immunology* 65 (1): 94-103.

Topping DL, Clifton PM. 2001. « Short-Chain Fatty Acids and Human Colonic Function: Roles of Resistant Starch and Nonstarch Polysaccharides ». *Physiological Reviews* 81 (3): 1031-64.

Totoson P, Maguin-Gaté K, Nappey M, Wendling D, Demougeot C. 2016. « Endothelial Dysfunction in Rheumatoid Arthritis: Mechanistic Insights and Correlation with Circulating Markers of Systemic Inflammation ». *PLoS ONE* 11 (1).

Tsuji M, Suzuki K, Kitamura H, Maruya M, Kinoshita K, Ivanov II, Itoh K, Littman DR, Fagarasan S. 2008. « Requirement for Lymphoid Tissue-Inducer Cells in Isolated Follicle Formation and T Cell-Independent Immunoglobulin A Generation in the Gut ». *Immunity* 29 (2): 261-71.

Turner JE, Stockinger B, Helmby H. 2013. « IL-22 Mediates Goblet Cell Hyperplasia and Worm Expulsion in Intestinal Helminth Infection ». *PLoS Pathogens* 9 (10).

Uematsu S, Fujimoto K, Jang MH, Yang BG, Jung YJ, Nishiyama M, Sato S, Tsujimura T, Yamamoto M, Yokota Y, Kiyono H, Miyasaka M, Ishii KJ, Akira S. 2008. « Regulation of Humoral and Cellular Gut Immunity by Lamina Propria Dendritic Cells Expressing Toll-like Receptor 5 ». *Nature Immunology* 9 (7): 769-76.

Uguccioni M, Mackay CR, Ochensberger B, Loetscher P, Rhis S, LaRosa GJ, Rao P, Ponath PD, Baggiolini M, Dahinden CA. 1997. « High Expression of the Chemokine Receptor CCR3 in Human Blood Basophils. Role in Activation by Eotaxin, MCP-4, and Other Chemokines ». *The Journal of Clinical Investigation* 100 (5): 1137-43.

Vahtovuo J, Munukka E, Korkeamäki M, Luukkainen R, Toivanen P. 2008. « Fecal Microbiota in Early Rheumatoid Arthritis ». *The Journal of Rheumatology* 35 (8): 1500-1505.

Van Kaer L, Wu L. 2018. « Therapeutic Potential of Invariant Natural Killer T Cells in Autoimmunity ». *Frontiers in Immunology* 9.

Vázquez-Triñanes C, Sopeña B, González-González L, Díaz R, Rivera A, Freire M, Martínez-Vázquez C. 2013. « Synovial Fluid Eosinophilia: A Case Series with a Long Follow-up and Literature Review ». *Rheumatology (Oxford, England)* 52 (2): 346-51.

Veiga-Fernandes H, Coles MC, Foster KE, Patel A, Williams A, Natarajan D, Barlow A, Pachnis V, Kioussis D. 2007. « Tyrosine Kinase Receptor RET Is a Key Regulator of Peyer's Patch Organogenesis ». *Nature* 446 (7135): 547-51.

Vieira AT, Fagundes CT, Alessandri AL, Castor MG, Guabiraba R, Borges VO, Silveira KD, Vieira EL, Gonçalves JL, Silva TA, Deruaz M, Proudfoot AE, Sousa LP, Teixeira MM. 2009. « Treatment with a Novel Chemokine-Binding Protein or Eosinophil Lineage-Ablation Protects Mice from Experimental Colitis ». *The American Journal of Pathology* 175 (6): 2382-91.

Vital M, Howe AC, Tiedje JM. 2014. « Revealing the Bacterial Butyrate Synthesis Pathways by Analyzing (Meta)Genomic Data ». *MBio* 5 (2): e00889-14.

Vlasselaer van P, Punnonen J, de Vries JE. 1992. « Transforming Growth Factor-Beta Directs IgA Switching in Human B Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 148 (7): 2062-67.

Wächtershäuser A, Loitsch SM, Stein J. 2000. « PPAR-Gamma Is Selectively Upregulated in Caco-2 Cells by Butyrate ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 272 (2): 380-85.

Waddell A, Ahrens R, Steinbrecher K, Donovan B, Rothenberg ME, Munitz A, Hogan SP. 2011. « Colonic eosinophilic inflammation in experimental colitis is mediated by Ly6Chigh CCR2+ inflammatory monocyte/macrophage-derived CCL11 ». *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 186 (10): 5993-6003.

Walker LS, Sansom DM. 2015. « Confusing signals: Recent progress in CTLA-4 biology ». *Trends in Immunology* 36 (2): 63-70.

Wang C, Kang SG, Lee J, Sun Z, Kim CH. 2009. « The Roles of CCR6 in Migration of Th17 Cells and Regulation of Effector T-Cell Balance in the Gut ». *Mucosal Immunology* 2 (2): 173-83.

Wang C, Kang SG, Lee JH, Kim CH. 2009. « CCR6 Regulates the Migration and Effector Function of Th17 Cells in the Gut (96.2) ». *The Journal of Immunology* 182 (1 Supplement): 96.2-96.2.

Wang J, Zhao Q. 2017. « Expression of CCR3, SOX5 and LC3 in Patients with Elderly Onset Rheumatoid Arthritis and the Clinical Significance ». *Experimental and Therapeutic Medicine* 14 (4): 3573-76.

Wang L, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Blunder M, Liu X, Malainer C, Blazevic T, Schwaiger S, Rollinger JM, Heiss EH, Schuster D, Kopp B, Bauer R, Stuppner H, Dirsch VM, Atanasov AG. 2014. « Natural Product Agonists of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR γ): A Review ». *Biochemical Pharmacology* 92 (1): 73-89.

Wang T, Sun X, Zhao J, Zhang J, Zhu H, Li C, Gao N, Jia Y, Xu D, Huang FP, Li N, Lu L, Li ZG. 2015. « Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis Showed Increased Plasticity toward Th17 but Retained Suppressive Function in Peripheral Blood ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 74 (6): 1293-1301.

Wang Y, Cui L, Gonsiorek W, Min SH, Anilkumar G, Rosenblum S, Kozlowski J, Lundell D, Fine JS, Grant EP. 2009. « CCR2 and CXCR4 Regulate Peripheral Blood Monocyte Pharmacodynamics and Link to Efficacy in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis ». *Journal of Inflammation (London, England)* 6 (novembre): 32.

Watanabe T, Kukita T, Kukita A, Wada N, Toh K, Nagata K, Nomiyama H, Iijima T. 2004. « Direct Stimulation of Osteoclastogenesis by MIP-1 α : Evidence Obtained from Studies Using RAW264 Cell Clone Highly Responsive to RANKL ». *The Journal of Endocrinology* 180 (1): 193-201.

Wegner N, Wait R, Sroka A, Eick S, Nguyen KA, Lundberg K, Kinloch A, Culshaw S, Potempa J, Venables PJ. 2010. « Peptidylarginine Deiminase from *Porphyromonas Gingivalis* Citrullinates Human Fibrinogen and α -Enolase: Implications for Autoimmunity in Rheumatoid Arthritis ». *Arthritis and Rheumatism* 62 (9): 2662-72.

Wei JC, Liu Y, Tsou HK, van der Horst-Bruinsma IE. 2015. « Spine and Rheumatic Diseases ». *BioMed Research International* 2015.

Welsh J, Avakian H, Cowling P, Ebringer A, Wooley P, Panayi G, Ebringer R. 1980. « Ankylosing spondylitis, HLA-B27 and Klebsiella. I. Cross-reactivity studies with rabbit antisera. » *British journal of experimental pathology* 61 (1): 85-91.

Wendland M, Czeloth N, Mach N, Malissen B, Kremmer E, Pabst O, Förster R. 2007. « CCR9 is a homing receptor for plasmacytoid dendritic cells to the small intestine ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (15): 6347-52.

Wermers JD, McNamee EN, Wurbel MA, Jedlicka P, Rivera-Nieves J. 2011. « The Chemokine Receptor CCR9 Is Required for the T-Cell-Mediated Regulation of Chronic Ileitis in Mice ». *Gastroenterology* 140 (5): 1526-1535.e3.

White GE, Iqbal AJ, Greaves DR. 2013. « CC Chemokine Receptors and Chronic Inflammation--Therapeutic Opportunities and Pharmacological Challenges ». *Pharmacological Reviews* 65 (1): 47-89.

Williams IR. 2004. « Chemokine Receptors and Leukocyte Trafficking in the Mucosal Immune System ». *Immunologic Research* 29 (1-3): 283-92.

Wilson C, Ebringer A, Ahmadi K, Wrigglesworth J, Tiwana H, Fielder M, Binder A, Ettelaie C, Cunningham P, Joannou C. 1995. « Shared Amino Acid Sequences between Major Histocompatibility Complex Class II Glycoproteins, Type XI Collagen and *Proteus Mirabilis* in Rheumatoid Arthritis ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 54 (3): 216-20.

Wright HL, Moots RJ, Edwards SW. 2014. « The Multifactorial Role of Neutrophils in Rheumatoid Arthritis ». *Nature Reviews Rheumatology* 10 (10): 593-601.

Wu HJ, Ivanov II, Darce J, Hattori K, Shima T, Umesaki Y, Littman DR, Benoist C, Mathis D. 2010. « Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells ». *Immunity* 32 (6): 815-27.

- Wu** X, He B, Liu J, Feng H, Ma Y, Li D, Guo B, Liang C, Dang L, Wang L, Tian J, Zhu H, Xiao L, Lu C, Lu A, Zhang G 2016. « Molecular Insight into Gut Microbiota and Rheumatoid Arthritis ». *International Journal of Molecular Sciences* 17 (3): 431.
- Xuan** W, Feng X, Qian C, Peng L, Shi Y, Xu L, Wang F, Tan W. 2017. « Osteoclast Differentiation Gene Expression Profiling Reveals Chemokine CCL4 Mediates RANKL-induced Osteoclast Migration and Invasion via PI3K Pathway ». *Cell Biochemistry and Function* 35 (3): 171-77.
- Yago** T, Nanke Y, Kawamoto M, Furuya T, Kobashigawa T, Kamatani N, Kotake S. 2007. « IL-23 Induces Human Osteoclastogenesis via IL-17 in Vitro, and Anti-IL-23 Antibody Attenuates Collagen-Induced Arthritis in Rats ». *Arthritis Research & Therapy* 9 (5): R96.
- Yamasaki** S, Nakashima T, Kawakami A, Miyashita T, Ida H, Migita K, Nakata K, Eguchi K. 2002. « Functional Changes in Rheumatoid Fibroblast-like Synovial Cells through Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma-Mediated Signalling Pathway ». *Clinical and Experimental Immunology* 129 (2): 379-84.
- Yanagihara** Y, Kajiwarra K, Basaki Y, Ikizawa K, Ebisawa M, Ra C, Tachimoto H, Saito H. 1998. « Cultured Basophils but Not Cultured Mast Cells Induce Human IgE Synthesis in B Cells after Immunologic Stimulation ». *Clinical and Experimental Immunology* 111 (1): 136-43.
- Yang** D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ. 1999. « Beta-Defensins: Linking Innate and Adaptive Immunity through Dendritic and T Cell CCR6 ». *Science (New York, N.Y.)* 286 (5439): 525-28.
- Yang** F, Wang D, Li Y, Sang L, Zhu J, Wang J, Wei B, Lu C, Sun X. 2017. « Th1/Th2 Balance and Th17/Treg-Mediated Immunity in relation to Murine Resistance to Dextran Sulfate-Induced Colitis ». *Journal of Immunology Research* 2017.
- Yang** M, Mailhot G, MacKay CA, Mason-Savas A, Aubin J, Odgren PR. 2006. « Chemokine and Chemokine Receptor Expression during Colony Stimulating Factor-1-Induced Osteoclast Differentiation in the Toothless Osteopetrotic Rat: A Key Role for CCL9 (MIP-1gamma) in Osteoclastogenesis in Vivo and in Vitro ». *Blood* 107 (6): 2262-70.
- Yang** XY, Wang LH, Chen T, Hodge DR, Resau JH, DaSilva L, Farrar WL. 2000. « Activation of Human T Lymphocytes Is Inhibited by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPARgamma) Agonists. PPARgamma Co-Association with Transcription Factor NFAT ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (7): 4541-44.
- Yang** Y, Hu X, Cheng L, Tang W, Zhao W, Yang Y, Zuo J. 2017. « Periplocoside A Ameliorated Type II Collagen-Induced Arthritis in Mice via Regulation of the Balance of Th17/Treg Cells ». *International Immunopharmacology* 44 (mars): 43-52.
- Yoshida** K, Korchynskiy O, Tak PP, Isozaki T, Ruth JH, Campbell PL, Baeten DL, Gerlag DM, Amin MA, Koch AE. 2014. « Citrullination of Epithelial Neutrophil-Activating Peptide 78/CXCL5 Results in Conversion from a Non-Monocyte-Recruiting Chemokine to a

Monocyte-Recruiting Chemokine ». *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 66 (10): 2716-27.

Yoshitomi H, Sakaguchi N, Kobayashi K, Brown GD, Tagami T, Sakihama T, Hirota K, Tanaka S, Nomura T, Miki I, Gordon S, Akira S, Nakamura T, Sakaguchi S. 2005. « A role for fungal β -glucans and their receptor Dectin-1 in the induction of autoimmune arthritis in genetically susceptible mice ». *The Journal of Experimental Medicine* 201 (6): 949-60.

Zaura E, Nicu EA, Krom BP, Keijser BJ. 2014. « Acquiring and maintaining a normal oral microbiome: current perspective ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4.

Zeng H, et Chi H. 2015. « Metabolic control of regulatory T cell development and function ». *Trends in immunology* 36 (1): 3-12.

Zhang K, Guo Y, Ge Z, Zhang Z, Da Y, Li W, Zhang Z, Xue Z, Li Y, Ren Y, Jia L, Chan KH, Yang F, Yan J, Yao Z, Xu A, Zhang R. 2017. « Adiponectin Suppresses T Helper 17 Cell Differentiation and Limits Autoimmune CNS Inflammation via the SIRT1/PPAR γ /ROR γ t Pathway ». *Molecular Neurobiology* 54 (7): 4908-20.

Zhang L, Li YG, Li YH, Qi L, Liu XG, Yuan CZ, Hu NW, Ma DX, Li ZF, Yang Q, Li W, Li JM. 2012. « Increased Frequencies of Th22 Cells as Well as Th17 Cells in the Peripheral Blood of Patients with Ankylosing Spondylitis and Rheumatoid Arthritis ». *PloS One* 7 (4): e31000.

Zhang L, Zhu M, Li M, Du Y, Duan S, Huang Y, Lu Y, Zhang J, Wang T, Fu F. 2017. « Ginsenoside Rg1 Attenuates Adjuvant-Induced Arthritis in Rats via Modulation of PPAR- γ /NF-KB Signal Pathway ». *Oncotarget* 8 (33): 55384-93.

Zhang X, Zhang D, Jia H, Feng Q, Wang D, Liang D, Wu X, Li J, Tang L, Li Y, Lan Z, Chen B, Li Y, Zhong H, Xie H, Jie Z, Chen W, Tang S, Xu X, Wang X, Cai X, Liu S, Xia Y, Li J, Qiao X, Al-Aama JY, Chen H, Wang L, Wu QJ, Zhang F, Zheng W, Li Y, Zhang M, Luo G, Xue W, Xiao L, Li J, Chen W, Xu X, Yin Y, Yang H, Wang J, Kristiansen K, Liu L, Li T, Huang Q, Li Y, Wang J. 2015. « The Oral and Gut Microbiomes Are Perturbed in Rheumatoid Arthritis and Partly Normalized after Treatment ». *Nature Medicine* 21 (8): 895-905.

Zhebrun DA, Totolyan AA, Maslyanskii AL, Titov AG, Patrukhin AP, Kostareva AA, Gol'tseva IS. 2014. « Synthesis of Some CC Chemokines and Their Receptors in the Synovium in Rheumatoid Arthritis ». *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 158 (2): 192-96.

Zhou GX, Liu ZJ. 2017. « Potential Roles of Neutrophils in Regulating Intestinal Mucosal Inflammation of Inflammatory Bowel Disease ». *Journal of Digestive Diseases* 18 (9): 495-503.

Zhou L, Littman DR. 2009. « Transcriptional regulatory networks in Th17 cell differentiation ». *Current opinion in immunology* 21 (2): 146-52.

Ziarek JJ, Kleist AB, London N, Raveh B, Montpas N, Bonnetterre J, St-Onge G, DiCosmo-Ponticello CJ, Koplinski CA, Roy I, Stephens B, Thelen S, Veldkamp CT, Coffman FD, Cohen MC, Dwinell MB, Thelen M, Peterson FC, Heveker N, Volkman BF. 2017. « Structural Basis

for Chemokine Recognition by a G Protein–coupled Receptor and Implications for Receptor Activation ». *Sci. Signal.* 10 (471): eaah5756.

Zlotnik A, Yoshie O. 2012. « The Chemokine Superfamily Revisited ». *Immunity* 36 (5): 705-16.

Annexe n°1

Publications en rapport avec le
travail de thèse

Publication 1

**Experimental colitis delays and reduces the severity
of collagen-induced arthritis in mice**

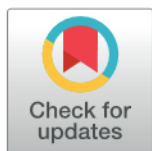
RESEARCH ARTICLE

Experimental colitis delays and reduces the severity of collagen-induced arthritis in mice

Julie Hablot¹, Laurent Peyrin-Biroulet^{2,3}, Tunay Kokten², Reine El Omar¹, Patrick Netter¹, Claire Bastien⁴, Jean-Yves Jouzeau¹, Harry Sokol^{5,6,7}, David Moulin^{1,8*}

1 IMoPA, UMR7365 CNRS-Université de Lorraine, Vandœuvre Les Nancy, France, **2** NGERE, UMR_S954 INSERM-Université de Lorraine, Vandœuvre Les Nancy, France, **3** Service d'hépatogastroentérologie, CHRU de Nancy, Vandœuvre Les Nancy, France, **4** Service d'anatomopathologie, CHRU de Nancy, Vandœuvre Les Nancy, France, **5** Department of Gastroenterology, Saint Antoine Hospital, Paris, France, **6** Sorbonne University—UPMC Université Paris 06, INSERM ERL 1157, Avenir Team Gut Microbiota and Immunity, UMR 7203 CNRS, Saint-Antoine Hospital, AP-HP, Paris, France, **7** Micalis Institute, UMR INRA—AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France, **8** CHRU de Nancy, Contrat d'interface, Vandœuvre Les Nancy, France

* david.moulin@univ-lorraine.fr



Abstract

Amongst extraintestinal manifestations (EIM) occurring in IBD patients, rheumatologic manifestations are the most frequent. Understanding the relationships between arthritis and colitis is a prerequisite to improving the management of these patients. Microbiota of patients with IBD or rheumatologic diseases, like spondyloarthritis (SpA) is modified compared to healthy individual. Thus, we have evaluated the impact of colitis in the development of arthritis in mice and we have analyzed microbiota changes. Collagen-induced arthritis (CIA) was induced at day 0 in DBA1 mice exposed or not to Dextran Sodium Sulfate (DSS) to induce colitis between day 14 and day 21. Animals were monitored regularly for arthritis and colitis severity (clinical score, hindpaw edema). Fecal microbiota was studied by 16S rRNA deep sequencing at critical time points (D14, D14, D21 & D41). At day 41, histological scoring of the intestines and ankles were performed at the end of experiment. Induction of colitis slightly delayed arthritis onset (2 ± 1 days of delay) and reduced its severity (5.75 ± 1.62 in arthritis only group vs 4.00 ± 1.48 in arthritis + colitis group ($p = 0.02$ at day 28) macroscopically and histologically. In contrast, colitis severity was not influenced by arthritis development. Induction of colitis promoted a modification of microbiota composition and a decrease of α -diversity. Fecal microbiota composition was different between “colitis” and “arthritis + colitis” groups during colitis development. Interestingly a milder decrease of bacterial diversity in the “arthritis+colitis” group was observed. Concomitant experimental colitis protects mice against collagen-induced arthritis and this is associated with changes in gut microbiome composition.

OPEN ACCESS

Citation: Hablot J, Peyrin-Biroulet L, Kokten T, El Omar R, Netter P, Bastien C, et al. (2017) Experimental colitis delays and reduces the severity of collagen-induced arthritis in mice. PLoS ONE 12 (9): e0184624. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184624>

Editor: Mathias Chamailard, "INSERM", FRANCE

Received: June 6, 2017

Accepted: August 28, 2017

Published: September 19, 2017

Copyright: © 2017 Hablot et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work has been partly funded by Fondation Arthritis Courtin, Société Française de Rhumatologie and Région Grand Est.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Inflammatory bowel diseases (IBD) affecting over 1 million individuals in the USA and 2.5 million in Europe [1]. The two main IBD are Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC).

IBD are characterized by a chronic inflammation of intestinal mucosa. Patients with IBD, known to be systemic disorders, are likely to develop extraintestinal manifestations (EIMs). EIMs have a prevalence rate ranging from 6% to 47%. Approximately one third of IBD patients will develop EIMs in the course of their disease [2–4]. In a cohort study of 950 IBD patients, 43% of CD patients and 31% of UC patients had EIMs [5]. The prevalence of EIMs is higher in CD compared to UC [5,6]. The development of one EIM appears to increase the risk of developing another EIM [7]. The treatment of EIM in IBD patients remains challenging in clinical practice and often requires the use of biologics raising both safety and cost issues. Joint involvement (Spondyloarthritis SpA) is the most common EIM in patients with IBD, with a prevalence ranging between 17% and 39% [8]. This comorbidity can be very disabling and is associated with a more severe disease course in IBD patients [5].

Two main types of rheumatism can be associated with IBD: *peripheral arthritis* such as synovitis and/or dactylitis and/or enthesopathy and *axial involvement* [9]. Two subtypes categorize the peripheral arthritis: type 1, the pauci-articular form, generally running parallel to the intestinal disease, is acute and self-limiting; and type 2, the polyarticular form, running independently from IBD, with symptoms lasting for months or years [10].

Evidence from experimental and clinical studies have implicated gut microbiota in both IBD and SpA pathophysiology [11]. Decrease of the diversity of bacteria, has been observed in experimental and clinical situations for IBD [12] and SpA [13]. This dysbiosis is thought to promote an imbalance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cells in gastrointestinal tract. Induction of colitis with dextran sodium sulfate (DSS) in mice, promotes changes in the gut microbiota diversity [14], and involves immune system [15]. HLA-B27 transgenic rats, a SpA model, have a different microbiota compared to the non-transgenic rats [16,17]. These transgenic rats spontaneously not only develop a SpA but also a colitis representing human disease. In collagen-induced arthritis (CIA) model in mice, a disturbance of gut microbiota modifies the severity of disease [18].

The reciprocal influence of colitis and arthritis is unknown. We evaluated for the first time, the impact of experimental colitis in the development of collagen-induced arthritis in mice and the associated gut microbiota changes.

Materials and methods

Induction of colitis and arthritis

The protocol was developed according to local and international recommendations and all experiments were monitored by the staff of the animal facility, which was authorized (agreement # 154-547-025) local ethics committee (CEMLEA Comité d'éthique en Matière d'Expérimentation Animale). Surgery and necropsy were performed under ketamine/acepromazine anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering. Collagen-induced arthritis was induced in 7-weeks old DBA/1 male mice (Janvier Labs). At day 0, animals were sensitized at the basis of the tail by intradermal injection of 100µl of type II bovine collagen (CII, MDbio-products) suspension at 2mg/ml and emulsified in complete Freund's adjuvant (CFA). At day 21, a booster ip injection of 100µl collagen II mixture at 1mg/ml, was performed. Colitis was induced by administration of 3% DSS (Colitis grade MW 36-50kDa) (MPBiomedicals) in drinking water for 7 days. Animals were housed in groups of five in solid-bottomed plastic cages with access to tap water and standard rodent pelleted chow (Scientific Animal Food & Engineering A04) *ad libitum*. Three experimental groups were studied: CIA alone (referred as arthritis), DSS colitis alone (referred as colitis), and CIA in animals exposed to DSS during arthritis development (referred as arthritis + colitis). One group of DBA/1 mice was used as control. Study design is summarized on Fig 1A.

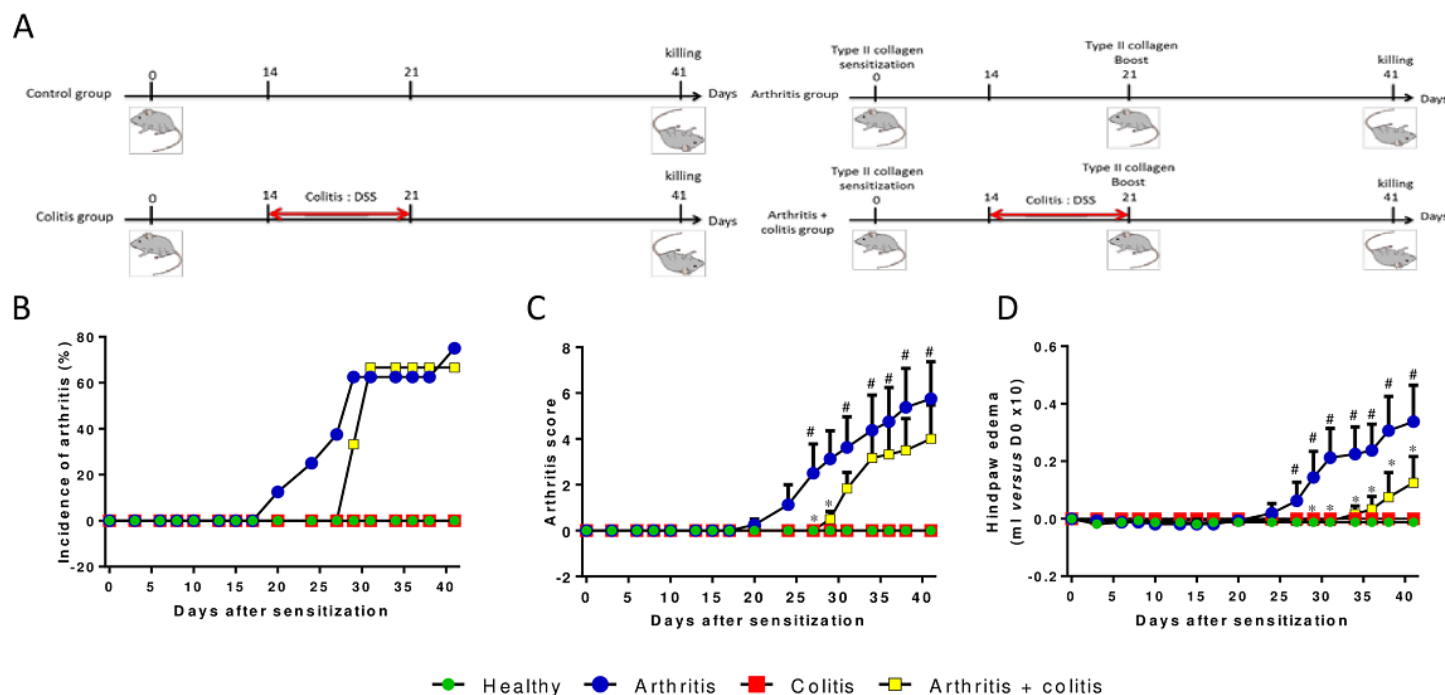


Fig 1. Colitis occurrence reduces arthritis severity. (A) Schematic representation of study design. Incidence of arthritis has been monitored (B) and clinical parameters, arthritis score (C) and hindpaws volume (D), have been measured in control, arthritic, colitic or arthritic and colitic mice (N = 8 by group). Arthritis was induced by injection of CII (200 μ g) at D0 at the basis of the tail and a boost of 100 μ g CII was performed at D21 by intra-peritoneal injection. Colitis was induced by oral intake of 3% DSS in drinking water from D14 to D21. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. # $P < 0.05$ arthritis group *versus* control group. * $P < 0.05$ arthritis + colitis group *versus* arthritis group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184624.g001>

Clinical assessment of arthritis

Mice were weighed daily. The severity of arthritis was evaluated every day on each paw with a score from 0 to 4, for a maximal score of 16 by animal (0 = normal joint, 1 = moderate redness and slight swelling or swelling of one or two digits, 2 = moderate redness and moderate paw swelling or swelling more than three digits, 3 = redness and swelling from tarsal joints to meta-tarsal joints, 4 = severe redness and severe swelling of the entire paw).

Hindpaw swelling was measured at the same time by plethysmography. Paw volume determined prior to disease induction was used as the baseline.

Histological assessment of arthritis

The development of arthritis was analyzed by histological assessment. Mice were killed by cervical dislocation and hindpaws were dissected then fixed in 4% formalin (Labonord). Hindpaws were further decalcified in 10% EDTA for 1 month and embedded in paraffin blocks. Five μ m-thick tissue sections were cut and two stainings were performed, hematoxylin, eosin and safran and toluidine blue. Histological examination was carried out blindly by three independent observers. Synovium from ankle joint was graded on a scale of 0 to 3 (with 0 = normal and 3 = major changes) for synovocyte hyperplasia (depth of lining layer) and tissue cell infiltration. Cartilage degradation was graded from 0 = fully stained cartilage, 1 = destained cartilage, 2 = destained cartilage with synovial cells invasion to 3 = complete loss of cartilage. The following morphologic criteria have been used for bone erosion: 0 = normal, 1 = mild loss of cortical bone at few sites, 2 = moderate loss of cortical and trabecular bone and 3 = marked loss of bone at many sites.

For each group, 8 sections were graded at different fields to provide representative samples of the whole joint. Mean scores have been determined from the different sections of the individual animals allowing the calculation of composite scores for the different experimental groups.

Measurement of mediator expression by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

At necropsy, forepaws of mice were preserved in trizol™ then were frozen at -80°C until use. Forepaws were grinded with homogenizer-disperser tool (Ultra-turrax, IKA) in 3ml of trizol. Samples were centrifuged at 12,000g for 10min at 4°C and 200μl of chloroform per milliliter of trizol™ were added to the supernatant. Samples were centrifuged at 12000g for 15min at 4°C, 500μl of isopropanol per milliliter of trizol™ were added to the aqueous phase before incubation overnight at -20°C. RNAs were pelleted by centrifugation at 12000g for 10min and were washed twice with 70% ethanol. Finally, RNAs were taken up in water.

Reverse transcription was performed with 2μg of RNA, 4μl of RT buffer, 2μl of dNTP at 5mM, 2μl of DTT at 100mM, 1μl of hexa primers at 0,2μg/μl and 1μl of M-MLV at 200u/μl (Invitrogen). Samples were incubated at 37°C for 1h30 and at 95°C for 5min.

For PCR, samples were diluted to one-tenth for S29, chosen as a housekeeping gene, and one-fifth for genes of interest (TNFα, IL-1β, iNOS), respectively. PCR was performed with 5μl of samples, 10μl of SYBR, 1μl of each primer at 10μM and 3μl of water. Sequences of primers are listed in [S1 Table](#).

Gut microbiota analysis

Feces were freshly harvested then frozen at -80°C until use.

Fecal DNA extraction. Genomic DNA was extracted from 200 mg of feces as previously described [19]. Following microbial lysis involving both mechanical and chemical steps, nucleic acids were precipitated via isopropanol for 10 minutes at room temperature, followed by incubation for 15 minutes on ice and centrifugation for 30 minutes at 15,000 g and 4°C. Pellets were suspended in 112 μL of phosphate buffer and 12 μL of potassium acetate. After the RNase treatment and DNA precipitation, nucleic acids were recovered via centrifugation at 15,000 g and 4°C for 30 minutes. The DNA pellet was suspended in 100 μL of TE buffer.

16S rRNA gene sequencing. A 16S rRNA gene fragment comprising the V3 and V4 hypervariable regions (16S (sense) 5′ -TACGGRAGGCAGCAG-3′ and (antisense) 5′ -CTAC CNGGGTATCTAAT-3′) was amplified using an optimized and standardized 16S-amplicon-library preparation protocol (Metabio, GenoScreen, Lille, France) as recently described [20]. Briefly, 16S rRNA gene PCR was performed using 5 ng genomic DNA according to the manufacturer's protocol (Metabio) using 192 bar-coded primers (Metabio MiSeq Primers) at final concentrations of 0.2 μM and an annealing temperature of 50°C for 30 cycles. The PCR products were purified using an Agencourt AMPure XP-PCR Purification system (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), quantified according to the manufacturer's protocol, and multiplexed at equal concentrations. Sequencing was performed using a 300-bp paired-end sequencing protocol on an Illumina MiSeq platform (Illumina, San Diego, CA, USA) at GenoScreen, Lille, France as described previously [20].

Processing of sequences. The sequences were demultiplexed, quality-filtered using the 'quantitative insights into microbial ecology' (QIIME, version 1.9.1) software package, and the forward and reverse Illumina reads were joined using the fastq-join method (<http://code.google/p/ea-utils>). The sequences were assigned to OTUs using the UCLUST algorithm [21] with a 97% threshold of pairwise identity and classified taxonomically using the Greengenes

reference database [22]. Rarefaction was performed (25,000 sequences per sample) and used to compare the abundances of OTUs across samples.

Principal component analyses (PCA) of the Unweighted Unifrac distance with each sample colored according to the disease phenotype were built and used to assess the variation between experimental groups. The number of observed species, as well as the Shannon, Simpson and Chao1 diversity indexes were calculated using rarefied data (depth = 25,000 sequences/sample) and used to characterize species diversity in a community. Differential analysis was performed using the linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) pipeline [23].

Statistics

Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Arthritis score and histological grading were analysed with the Kruskal-Wallis test, using StatView™ version 5.0 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). All other data were compared by analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni *post-hoc* test. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results

Colitis dampened collagen-induced arthritis severity

No sign of arthritis was observed in control and “colitis” groups. In the “arthritis” group, the first arthritis symptoms were observed by day 20 whereas arthritis developed 8 days later in the “arthritis + colitis” group. (Fig 1B). Arthritis severity was moderate with a maximum mean clinical score of 5.8 ± 1.6 in the “arthritis” group vs 4.0 ± 1.5 in the “arthritis + colitis” group (Fig 1C). Hindpaw edema increased gradually from day 24 to day 41 in the “arthritis” group, whereas oedema occurred by day 34 in the “arthritis + colitis” group and remained significantly less severe (Fig 1D).

These observations were confirmed by joint histological analysis at necropsy (Fig 2A). As expected, ankles of mice showed no sign of inflammation or cartilage degradation in control and colitis groups, whereas 80% of ankles of mice in “arthritis” group vs 40% in “arthritis + colitis group” were arthritic. Inflammation (synovial hyperplasia and cell infiltration) (Fig 2Ac), and joint structural damages (cartilage degradation (Fig 2Ad) and bone infiltration), were more severe in the arthritis group compared to “arthritis + colitis” group.

The expression of the proinflammatory cytokines TNF α and IL-1 β and iNOS gene (chosen as a marker of chronic inflammation) in the forepaws showed an increase in the “arthritis” group whereas no significant changes were observed in the “arthritis + colitis” group.

Colitis severity was not affected by arthritis

In “control” and “arthritis” groups, no clinical sign of colitis was detected (S1 Fig). In “colitis” and in “arthritis + colitis” groups, mice developed colitis between day 15 and day 27 with a peak at day 20. No statistical significant difference was observed between these two groups (S1A and S1B Fig).

Fecal lipocalin 2, a sensitive and broadly dynamic non-invasive biomarker for intestinal inflammation was measured at the indicated time points. Basal levels of fecal lipocalin-2 were observed in “control” and “arthritis” groups. As expected colitis caused an increase of fecal lipocalin-2 in “colitis” and in “arthritis + colitis” groups (S3 Fig). Colon length was reduced in DSS induced group (S1C Fig). At day 41, the expression of inflammatory genes in colon were similar in all groups and no difference was observed between “colitis” group and “arthritis + colitis” group. (S2 Fig). Colitis was observed histologically in both “colitis” and “arthritis + colitis” group without statistical differences in severity (S1E and S1F Fig).

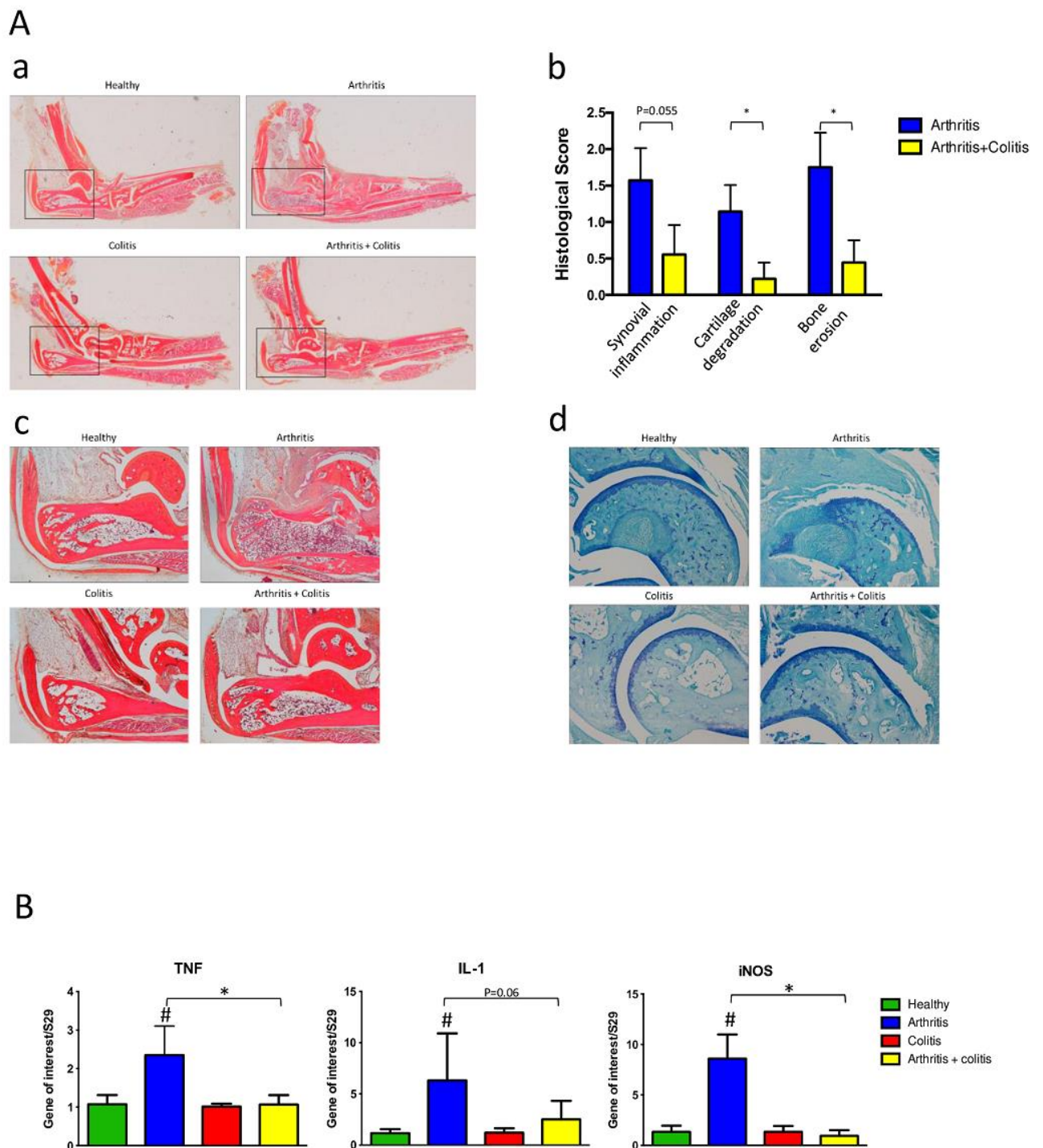


Fig 2. Analysis of joint inflammation and structural articular degradation in mice. Analyses were performed 41 days after arthritis sensitization and/or 27 days after colitis induction (N = 8 by group). (Aa) Macroscopic examination of ankle inflammation (Ab), histological grading of synovium infiltration and hyperplasia, cartilage degradation and bone erosion, (Ac) representative picture of ankles section (HES staining, X4 magnification) (Ad) representative sections of articular cartilage (toluidine blue staining, X10 magnification). (B) Measurement inflammatory cytokines and inflammation marker in forepaws (n = 5 by group) on day 41 by real time PCR. Data are expressed as mean $\pm$ SEM, # $P < 0.05$ arthritis group versus control group, * $P < 0.05$ arthritis + colitis group versus arthritis group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184624.g002>

Changes in gut microbiota

Induction of colitis caused changes in fecal microbiota composition. Principal components analysis of beta diversity showed significant differences between “colitis” and “arthritis + colitis” groups compared with “control” and “arthritis” groups at days 21, 30 and 41 (Fig 3A). Induction of arthritis did not modify bacterial α -diversity. This parameter was significantly lower in “colitis” group compared with “arthritis + colitis” group at day 21 (Fig 3B). Fecal microbiota composition was different between “colitis” and “arthritis + colitis” groups, and notably at day 21 (Fig 4A and 4B). At this time point, several taxa belonging to Firmicutes phylum were more present in “arthritis + colitis” group compared to “colitis” group. This was the case for *Lactobacillus* genera, and *Lachnospiraceae* family. Conversely, *Gemella* genera in the Firmicutes phylum and *Pseudomonadaceae* family in the Proteobacteria phylum, were less represented in “arthritis + colitis” group compared to “colitis” group.

At day 21 and 30, fecal microbiota composition was different between “arthritis” and “arthritis + colitis” groups (Table 1 and Fig 4C). Several taxa belonging to Firmicutes phylum were decreased in “arthritis” group compared to “arthritis + colitis” group such as *Ruminococcus gnavus* and *Desulfovibrionaceae* family, belonging to Proteobacteria phylum.

At day 30 and 41, α -diversity was similar between “arthritis + colitis” group and “arthritis” group and β -diversity did not show any significant difference (Fig 3A and 3B). However, at these time points, few differences were observed in fecal microbiota composition between these two groups (S3 Fig). At day 30, only *Ruminococcus* genera (Firmicutes phylum), and particularly *R. gnavus* species, was more present in “arthritis + colitis” group compared to “arthritis” group. At day 41, in addition to *Ruminococcus*, *Blautia* and *Gemellaceae* (belonging to Firmicutes phylum) were more represented in “arthritis + colitis” group compared to “arthritis” group.

Discussion

IBD is a systemic condition and can be accompanied by extraintestinal manifestations (EIMs) [24]. Articular manifestations are the most frequent EIM; between 17% and 39% of patients with IBD have a spondyloarthritis (SpA) [25]. Understanding the mechanisms underlying the development of such complication in IBD is a prerequisite to improving their management and remains an unmet need for these patients. Herein we show that experimental colitis could affect arthritis development in mice. Indeed, induction of colitis delayed arthritis onset and reduced its severity. We observed a lower arthritis score and edema in arthritis + colitis group compared to arthritis group. In contrast, colitis severity was not strongly influenced by arthritis development. This is, to our best knowledge, the first example of a transorgan effect in experimental IBD.

In healthy adult, gut microbiota is relatively stable and plays a key role in homeostasis of the organism [26,27]. Human and mouse gut microbiota appear to be composed mainly of bacteria from the Firmicutes and Bacteroidetes phyla [28–30]. Several studies showed that gut microbiota is involved in inflammatory and metabolic diseases [26,27] among which IBD and rheumatologic diseases.

Many groups worldwide have pointed out the IBD-associated dysbiosis, which is characterized by a lower biodiversity, a decreased level of some Firmicutes such as *Faecalibacterium prausnitzii* [31] and an increased level of Proteobacteria such as *Escherichia coli* [32]. This imbalance in microbiota composition might have functional consequences as some decreased bacteria such as *F. prausnitzii* have been shown to exhibit anti-inflammatory effects [33], whereas other bacteria such as *E. coli* have pro-inflammatory effects [34]. As previously observed, fecal microbiota of mice with DSS-induced colitis was characterized by a decreased

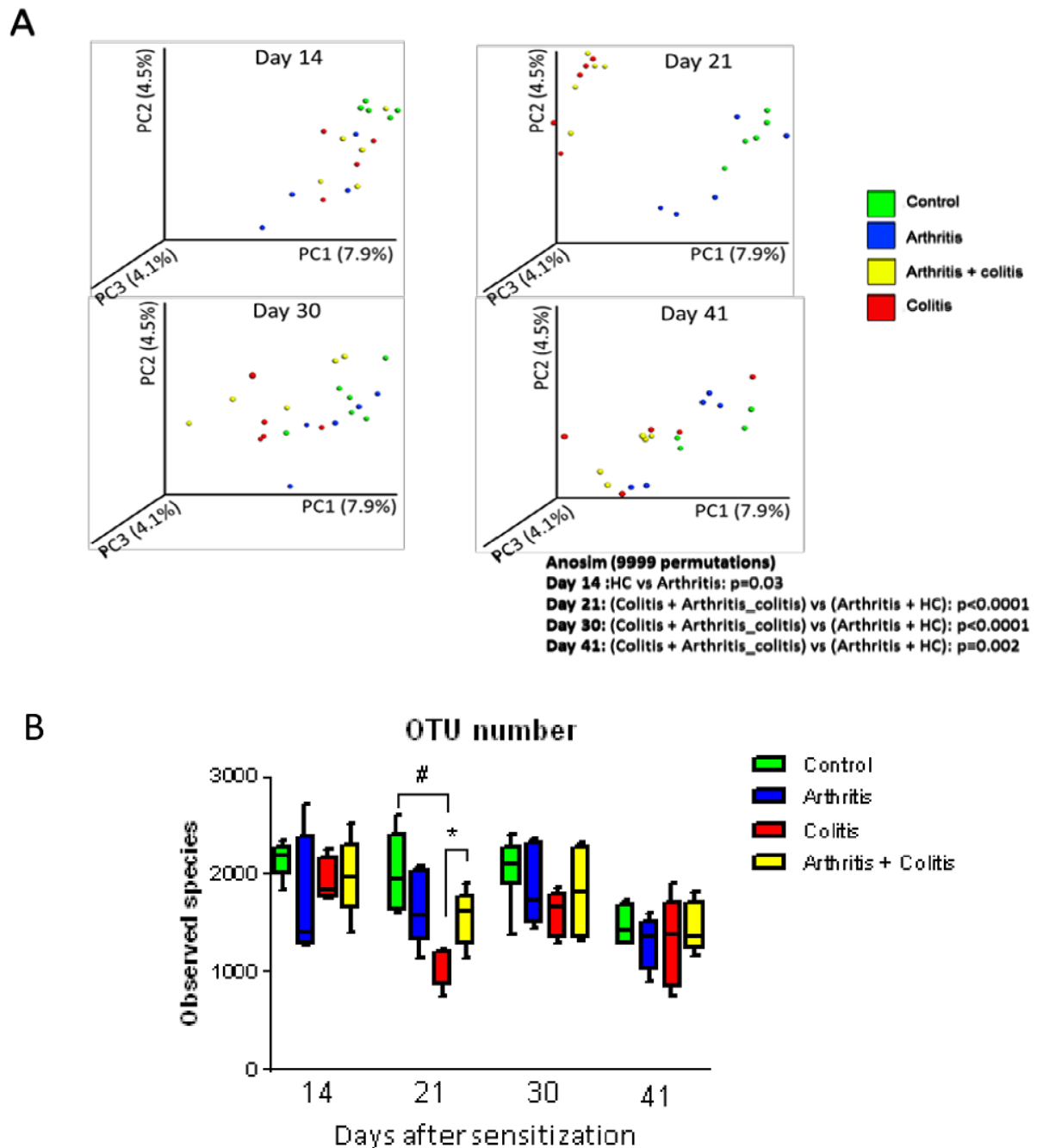


Fig 3. Diversity of fecal microbiota of control, arthritic, colitic or arthritic and colitic mice (N = 5) at days 14 (before induction of colitis), 21 (during colitis), 30 (after colitis) and 41 (after colitis). Arthritis was induced by injection of CII (200µg) at D0 at the basis of the tail and a boost of 100µg CII was performed at D21 by intraperitoneal injection. Colitis was induced by oral intake of 3% DSS in drinking water from D14 to D 21. (A) Representation of β -diversity of fecal microbiota. (B) Representation of α -diversity. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. # $P<0.05$ colitis group *versus* control group. * $P<0.05$ arthritis + colitis group *versus* colitis group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184624.g003>

diversity and changes in microbiota composition. As expected, DSS-induced colitis provoked an increase in the Bacteroidetes over Firmicutes ratio whereas no changes in Proteobacteria phylum was observed [29].

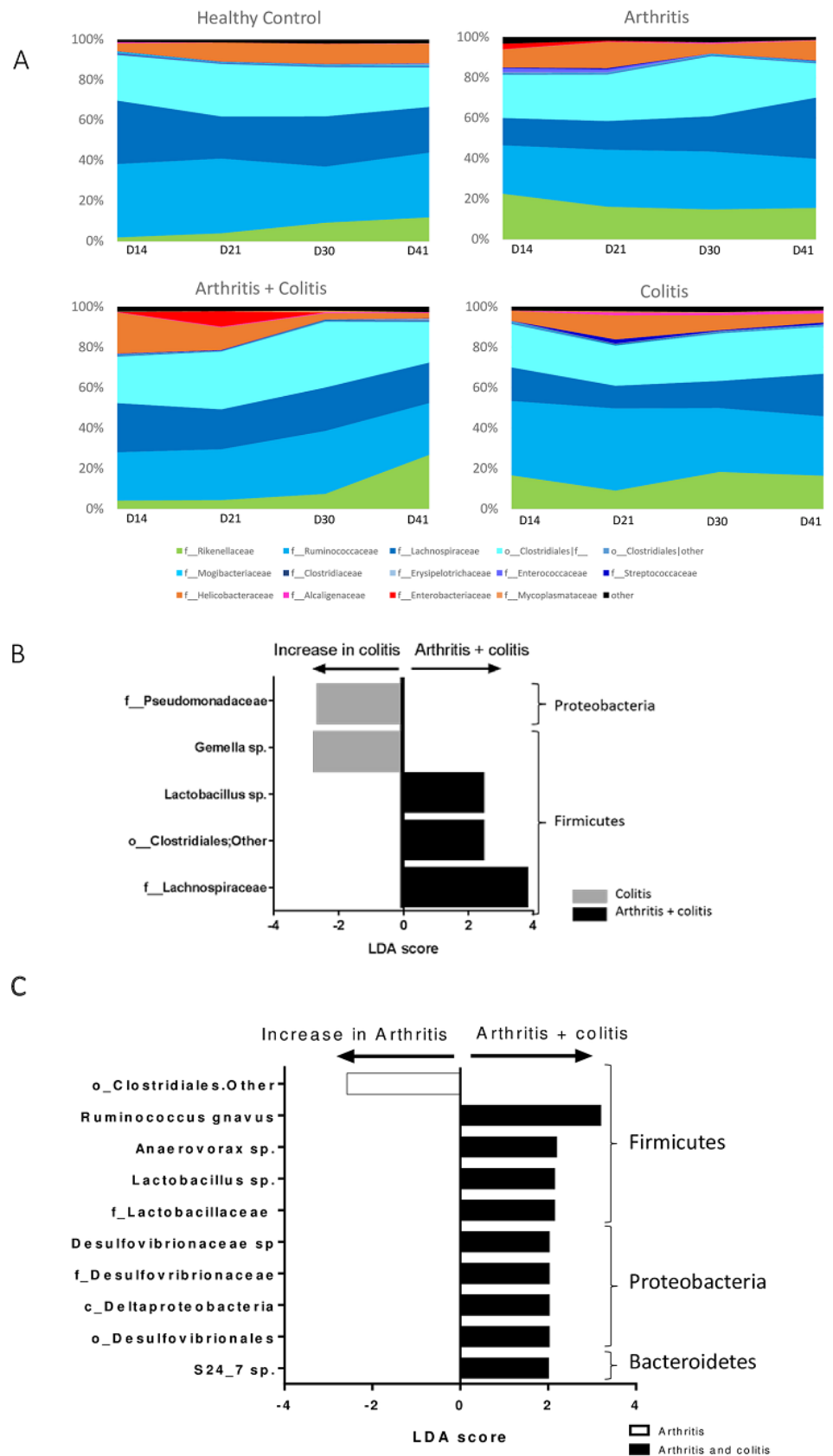


Fig 4. Composition of fecal microbiota in this model. (A) Composition of fecal microbiota (Family level) of control, arthritic, colitic or arthritic and colitic mice (N = 5) at days 14 (before induction of colitis), 21 (during colitis), 30 (after colitis) and 41 (after colitis). (B) Differential analysis between colitis and colitis + arthritis groups at day 21. (C) Differential analysis between arthritis and colitis + arthritis groups at day 21.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184624.g004>

Gut microbiota has several effects on immune cells both within and beyond the gut and could thus play a role in the development of extraintestinal manifestations. There are many recent arguments supporting the role of gut microbiota in the pathogenesis of rheumatic disease (reviewed in [35]).

Majority of microbiota and studies in rheumatic diseases have focused on rheumatoid arthritis, the microbiota of SpA remains largely unknown. Stebbings *et al.* determined the faecal microbiota composition of 15 SpA patients and 15 matched controls using molecular method allowing the identification of few specific bacterial groups [36]. They demonstrated a significantly higher proportion of sulphatereducing bacteria in faecal samples from ankylosing spondylitis (AS) patients compared with samples from controls. More recently, Costello *et al.* showed evidence for a discrete microbial signature in the terminal ileum of patients with axial form of SpA compared with healthy control subjects using the 16rRNA gene sequencing method [37]. The microbial composition was demonstrated to correlate with disease status. Importantly, of the 7 families of microbes with differences in abundance within the SpA patients' microbiome, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, and *Prevotellaceae* were strongly associated with colitis and CD, (n = 9 patients and 9 healthy matched controls). However, larger studies are required to define the individual bacterial species involved.

Collagen-induced arthritis (CIA) shares many similarities with human rheumatoid arthritis. Indeed the two major characteristics of the CIA model—breach of tolerance and generation of auto—antibodies toward self and collagen—make CIA the gold standard in vivo model for RA studies, but not for spondyloarthritis. IBD associated arthritis is considered by rheumatologist as spondyloarthritis. The lack of reliable inducible model of SpA in mice [38], or the fact that articular inflammation is concomitantly associated with intestinal inflammation in spontaneous SpA models lead us to choose the CIA model to decipher the impact of digestive inflammation on joint disease and vice versa.

Gut microbiota play an important role in development of inflammatory arthritis in human and in animal models [39], in particular in CIA. During arthritis development, fecal microbiota was different between CIA-susceptible mice and CIA-resistant [40]. Partial depletion of microbiota with antibiotic has been shown to modify the severity of arthritis in this model [18]. Herein, we observed that microbiota composition of mice with arthritis and colitis is different from mice with colitis only. Firmicutes phylum is mainly affects; *Lactobacillus* genus and Clostridiales order are more present in mice with arthritis and colitis compared to mice with colitis alone. Several studies showed that species from *Lactobacillus* are beneficial in DSS-induced colitis [41,42]. Thereby, *Lactobacillus* sp increase in arthritis + colitis group might play a role in the subclinical improvement as observed by the decrease in fecal lipocalin-2 level.

Composition of fecal microbiota was also different between arthritis and arthritis + colitis groups. At arthritis and colitis onset, we observed that Lactobacillaceae, and notably

Table 1. Comparison of β -diversity between “arthritis + colitis” versus “arthritis” alone group. Anosim 9,999 permutations.

	D14	D21	D30	D41
p value	0.177	0.0085	0.015	0.064

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184624.t001>

Lactobacillus, *Ruminococcus gnavus* belonging to Lachnospiraceae and S24_7 species belonging to Bacteroidales were more present in mice with arthritis and colitis compared to arthritis group. Interestingly, these groups of bacteria had been shown to be more present in mice with higher susceptibility to arthritis development [40]. Thus, we might hypothesize that colitis has altered the gut microbiota of these mice and thus delayed the appearance of “pro-arthritisogenic” bacteria. In a very recent report, Breban and collaborators revealed specific dysbiosis in SpA patient distinctive from dysbiosis found in RA patients and evidence an increase in *Ruminococcus gnavus* that appears specific for SpA and a marker of disease activity, further highlighting the clinical relevance of our findings.

Taken together our results demonstrate that concomitant experimental colitis protects mice against collagen-induced arthritis and this is associated with changes in gut microbiome composition. Some limitations of this study should be considered. Other mechanisms than microbiota changes may contribute to arthritis protection by colitis in this model. We cannot exclude that DSS-induced colitis could induce a “titration” of the immune system (in terms of immune cell mobilization and/or polarization) towards gut inflammation preventing articular disease occurrence. Our data on microbiota are preliminary and would require fecal transplantation experiments to establish a causal link. In this regard, it would be interesting to investigate the distribution of mucosal and systemic Th17 in this model. Indeed IL-17 contributes to both arthritis and colitis in experimental model and in human [43]. In physiological conditions, Th17 cells are involved in extracellular pathogens defence and act more specifically in the mucosal firewall [44]. Indeed, in basal conditions most Th17 cells are found in the gastro-intestinal tract (lamina propria) and develop from signals that are derived from the microbiota. Further investigations studying microbiota composition changes and concomitant variation in Th17 abundance in articular and mucosal compartment during colitis and/or arthritis could pave the way for new therapeutic strategies in EIM related IBD treatment through manipulation of the gut microbiota (probiotics, prebiotics for example).

Supporting information

S1 Table. Primers used to measure gene expression in colon and forepaws of mice.
(DOCX)

S1 Text. Supplementary materials and methods.
(DOCX)

S1 Fig. Evaluation of gut inflammation in mice (N = 8). Follow-up of colitis score (A), body-weight gain (B), fecal lipocalin-2 by ELISA (C) and colons length on day 41 (D) Histological findings (E) and scoring (F) in the four studied groups. Arthritis was induced by intradermal injection of CII at D0 and a boost was performed at D21 by intra-peritoneal injection of CII. Arthritis was induced by injection of CII (200µg) at D0 at the basis of the tail and a boost of 100µg CII was performed at D21 by intra-peritoneal injection. Colitis was induced by oral intake of 3% DSS in drinking water from D14 to D 21. Data are expressed as mean ± SEM, # P<0.05 colitis group versus control group. * P<0.05 arthritis + colitis group versus colitis group.
(TIFF)

S2 Fig. Assessment of intestinal inflammatory by measurement of KC (CXCL1) (A) and TNFα (B) expression at day 41 in the colon of control, arthritic, colitic or arthritic and colitic mice (N = 5 per group). Arthritis was induced by intradermal injection of CII at D0 and a boost was performed at D21 by intra-peritoneal injection of CII. Arthritis was induced by injection of CII (200µg) at D0 at the basis of the tail and a boost of 100µg CII was performed at

D21 by intraperitoneal injection. Colitis was induced by oral intake of 3% DSS in drinking water from D14 to D 21. Expression of cytokines was analyzed by real time PCR. Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

(TIFF)

S3 Fig. Composition of fecal microbiota in this model. (A) Differential analysis between arthritis and colitis + arthritis groups at day 30. (B) Differential analysis between arthritis and colitis + arthritis groups at day 41.

(TIFF)

Author Contributions

Conceptualization: Laurent Peyrin-Biroulet, Jean-Yves Jouzeau, Harry Sokol, David Moulin.

Data curation: Julie Hablot, Tunay Kokten, Reine El Omar, Claire Bastien, David Moulin.

Formal analysis: Claire Bastien, Harry Sokol.

Funding acquisition: Laurent Peyrin-Biroulet, David Moulin.

Methodology: Julie Hablot, Tunay Kokten, Reine El Omar, David Moulin.

Project administration: Patrick Netter, Jean-Yves Jouzeau.

Resources: Julie Hablot, Reine El Omar.

Supervision: Laurent Peyrin-Biroulet, Jean-Yves Jouzeau, Harry Sokol, David Moulin.

Writing – original draft: Julie Hablot, Reine El Omar, David Moulin.

Writing – review & editing: Laurent Peyrin-Biroulet, Patrick Netter, Jean-Yves Jouzeau, Harry Sokol, David Moulin.

References

1. Kaplan GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015; 12: 720–727. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.150> PMID: 26323879
2. Barrie A, Regueiro M. Biologic therapy in the management of extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2007; 13: 1424–1429. <https://doi.org/10.1002/ibd.20196> PMID: 17567879
3. Ardizzone S, Puttini PS, Cassinotti A, Porro GB. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Digestive and Liver Disease*. 2008; 40: S253–S259. [https://doi.org/10.1016/S1590-8658\(08\)60534-4](https://doi.org/10.1016/S1590-8658(08)60534-4) PMID: 18598997
4. Veloso FT. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: do they influence treatment and outcome? *World J Gastroenterol*. 2011; 17: 2702–2707. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i22.2702> PMID: 21734777
5. Vavricka SR, Brun L, Ballabeni P, Pittet V, Prinz Vavricka BM, Zeitz J, et al. Frequency and Risk Factors for Extraintestinal Manifestations in the Swiss Inflammatory Bowel Disease Cohort. *Am J Gastroenterol*. 2010; 106: 110–119. <https://doi.org/10.1038/ajg.2010.343> PMID: 20808297
6. Vind I, Riis L, Jess T, Knudsen E, Pedersen N, Elkjaer M, et al. Increasing Incidences of Inflammatory Bowel Disease and Decreasing Surgery Rates in Copenhagen City and County, 2003–2005: A Population-Based Study from the Danish Crohn Colitis Database. *Am J Gastroenterol*. 2006; 101: 1274–1282. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00552.x> PMID: 16771949
7. Monsén U, Sorstad J, HELLERS G, Johansson C. Extracolonic diagnoses in ulcerative colitis: an epidemiological study. *Am J Gastroenterol*. 1990; 85: 711–716. PMID: 2353691
8. Peluso R, Manguso F, Vitiello M, Iervolino S, Di Minno MND. Management of arthropathy in inflammatory bowel diseases. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*. 2015; 6: 65–77. <https://doi.org/10.1177/2040622314563929> PMID: 25729557

9. Peluso R, Di Minno MND, Iervolino S, Manguso F, Tramontano G, Ambrosino P, et al. Enteropathic Spondyloarthritis: From Diagnosis to Treatment. *Clinical and Developmental Immunology*. 2013; 2013: 1–12. <https://doi.org/10.1155/2013/631408> PMID: [23690825](#)
10. Orchard TR, Wordsworth BP, Jewell DP. Peripheral arthropathies in inflammatory bowel disease: their articular distribution and natural history. *Gut*. 1998; 42: 387–391. <https://doi.org/10.1136/gut.42.3.387> PMID: [9577346](#)
11. Faecal microbiota study reveals specific dysbiosis in spondyloarthritis. 2017; 76: 1614–1622. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-211064> PMID: [28606969](#)
12. Petersen C, Round JL. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cellular Microbiology*. 2014; 16: 1024–1033. <https://doi.org/10.1111/cmi.12308> PMID: [24798552](#)
13. Gill T, Asquith M, Rosenbaum JT, Colbert RA. The intestinal microbiome in spondyloarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2015; 27: 319–325. <https://doi.org/10.1097/BOR.000000000000187> PMID: [26002022](#)
14. Nagalingam NA, Kao JY, Young VB. Microbial ecology of the murine gut associated with the development of dextran sodium sulfate-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2011; 17: 917–926. <https://doi.org/10.1002/ibd.21462> PMID: [21391286](#)
15. Zheng B, van Bergenhenegouwen J, Overbeek S, van de Kant HJG, Garssen J, Folkerts G, et al. Bifidobacterium breve attenuates murine dextran sodium sulfate-induced colitis and increases regulatory T cell responses. *Fuss IJ, editor. PLoS ONE*. 2014; 9: e95441. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095441> PMID: [24787575](#)
16. Asquith M, Stauffer P, Davin S, Mitchell C, Lin MDPH P, Rosenbaum JT. Perturbed mucosal immunity and dysbiosis accompany clinical disease in a rat model of spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2016; n/a–n/a. <https://doi.org/10.1002/art.39681> PMID: [26992013](#)
17. Role of Gut Inflammation in Altering the Monocyte Compartment and Its Osteoclastogenic Potential in HLA-B27-Transgenic Rats. 2017; 63: 1099. <https://doi.org/10.1002/art.40154> PMID: [28511292](#)
18. Dorożyńska I, Majewska-Szczepanik M, Marcińska K, Szczepanik M. Partial depletion of natural gut flora by antibiotic aggravates collagen induced arthritis (CIA) in mice. *Pharmacol Rep*. 2014; 66: 250–255. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2013.09.007> PMID: [24911078](#)
19. Sokol H, Leducq V, Aschard H, Pham H- P, Jegou S, Landman C, et al. Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut*. 2016; gutjnl–2015–310746. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310746> PMID: [26843508](#)
20. Lamas B, Richard ML, Leducq V, Pham H- P, Michel M-L, da Costa G, et al. CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nat Med. Nature Research*; 2016; 22: 598–605. <https://doi.org/10.1038/nm.4102> PMID: [27158904](#)
21. Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. 2010; 26: 2460–2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461> PMID: [20709691](#)
22. McDonald D, Price MN, Goodrich J, Nawrocki EP, DeSantis TZ, Probst A, et al. An improved Green-Genes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J*. 2012; 6: 610–618. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.139> PMID: [22134646](#)
23. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol. BioMed Central*; 2011; 12: R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60> PMID: [21702898](#)
24. Vavricka SR, Schoepfer A, Scharl M, Lakatos PL, Navarini A, Rogler G. Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2015; 21: 1982–1992. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000392> PMID: [26154136](#)
25. Gionchetti P, Calabrese C, Rizzello F. Inflammatory Bowel Diseases and Spondyloarthropathies. *J Rheumatol Suppl*. 2015; 93: 21–23. <https://doi.org/10.3899/jrheum.150628> PMID: [26523049](#)
26. Schroeder BO, Bäckhed F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat Med*. 2016; 22: 1079–1089. <https://doi.org/10.1038/nm.4185> PMID: [27711063](#)
27. Koboziev I, Reinoso Webb C, Furr KL, Grisham MB. Role of the enteric microbiota in intestinal homeostasis and inflammation. *Free Radic Biol Med*. 2014; 68: 122–133. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.008> PMID: [24275541](#)
28. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005; 308: 1635–1638. <https://doi.org/10.1126/science.1110591> PMID: [15831718](#)
29. Yeom Y, Kim B-S, Kim S-J, Kim Y. Sasa quelpaertensis leaf extract regulates microbial dysbiosis by modulating the composition and diversity of the microbiota in dextran sulfate sodium-induced colitis mice. *BMC Complement Altern Med*. 2016; 16: 481. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1456-7> PMID: [27884149](#)

30. Munyaka PM, Rabbi MF, Khafipour E, Ghia J-E. Acute dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis promotes gut microbial dysbiosis in mice. *J Basic Microbiol*. 2016; 56: 986–998. <https://doi.org/10.1002/jobm.201500726> PMID: [27112251](#)
31. Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, et al. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis*. 2009; 15: 1183–1189. <https://doi.org/10.1002/ibd.20903> PMID: [19235886](#)
32. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward DV, et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol*. 2012; 13: R79. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-9-r79> PMID: [23013615](#)
33. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux J-J, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA. National Acad Sciences*; 2008; 105: 16731–16736. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105> PMID: [18936492](#)
34. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser A-L, Barnich N, et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2004; 127: 412–421. PMID: [15300573](#)
35. Scher JU, Littman DR, Abramson SB. Review: Microbiome in Inflammatory Arthritis and Human Rheumatic Diseases. 2015; 68: 35–45. <https://doi.org/10.1002/art.39259> PMID: [26331579](#)
36. Stebbings S, Munro K, Simon MA, Tannock G, Highton J, Harmsen H, et al. Comparison of the faecal microflora of patients with ankylosing spondylitis and controls using molecular methods of analysis. *Rheumatology (Oxford)*. 2002; 41: 1395–1401.
37. Costello M- E, Ciccio F, Willner D, Warrington N, Robinson PC, Gardiner B, et al. Intestinal dysbiosis in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheumatol*. 2014; 67: 686–691. <https://doi.org/10.1002/art.38967> PMID: [25417597](#)
38. Vieira-Sousa E, van Duivenvoorde LM, Fonseca JE, Lories RJ, Baeten DL. Review: Animal Models as a Tool to Dissect Pivotal Pathways Driving Spondyloarthritis. *Arthritis & Rheumatology*. 2015; 67: 2813–2827. <https://doi.org/10.1002/art.39282> PMID: [26215401](#)
39. Brusca SB, Abramson SB, Scher JU. Microbiome and mucosal inflammation as extra-articular triggers for rheumatoid arthritis and autoimmunity. *Curr Opin Rheumatol*. 2014; 26: 101–107. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000008> PMID: [24247114](#)
40. Liu X, Zeng B, Zhang J, Li W, Mou F, Wang H, et al. Role of the Gut Microbiome in Modulating Arthritis Progression in Mice. *Sci Rep*. 2016; 6: 30594. <https://doi.org/10.1038/srep30594> PMID: [27481047](#)
41. Chen L, Zou Y, Peng J, Lu F, Yin Y, Li F, et al. *Lactobacillus acidophilus* suppresses colitis-associated activation of the IL-23/Th17 axis. *Journal of Immunology Research*. 2015; 2015: 909514–10. <https://doi.org/10.1155/2015/909514> PMID: [25973440](#)
42. Ahl D, Liu H, Schreiber O, Roos S, Phillipson M, Holm L. *Lactobacillus reuteri* increases mucus thickness and ameliorates dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Acta Physiol (Oxf)*. 2016; 217: 300–310. <https://doi.org/10.1111/apha.12695> PMID: [27096537](#)
43. Targeting Th17 cells in autoimmune diseases. 2014; 35: 493–500. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.07.006> PMID: [25131183](#)
44. Belkaid Y, Hand TW. Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. *Cell*. Elsevier Inc; 2014; 157: 121–141. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.011> PMID: [24679531](#)

Publication 2

**CCR-3 inhibition by a small molecule antagonist
reduces collagen-induced arthritis severity**

CCR-3 inhibition by a small molecule antagonist reduces collagen-induced arthritis severity

Julie HABLOT¹, Alexandre MARIOTTE², Meriem KOUFANY¹, Claire BASTIEN³, Patrick NETTER¹, Pascal REBOUL¹, Philippe GEORGEL², Laurent PEYRIN-BIROULET⁴, Jean-Yves JOUZEAU^{1*}, David MOULIN^{1,5*}.

¹Ingénierie Moléculaire & Physiopathologie Articulaire (IMoPA), UMR7365 CNRS UL - 54505 Vandœuvre Les Nancy, France.

²Immuno-Rhumatologie Moléculaire (IRM), UMR_S1109 INSERM-UDS, 67085 Strasbourg, France.

³Department of Pathology, CHU de Nancy, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

⁴Nutrition Génomique & Exposition aux Risques Environnementaux (NGERE), UMR_1256 INSERM-UL - 54505 Vandœuvre lès Nancy, France.

⁵CHU de Nancy, Contrat d'interface, Nancy, F-54035, France.

* JYJ and DM contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to david.moulin@univ-lorraine.fr

INTRODUCTION

Chemokines are key pathophysiological mediators in the early phase of arthritis. Eotaxin and RANTES, two chemokines considered as putative therapeutic target in arthritis, are ligands of CCR-3 (CC Chemokine Receptor 3). GW766994, a potent and selective antagonist of CCR-3 has been developed in asthma treatment and more recently tested in choroidal neovascularization experimental model.

OBJECTIVE

The aim of the study was to investigate the effect of CCR-3 blockade using GW766994 on the development of collagen-induced arthritis (CIA) in mice.

MATERIEL AND METHODS

CIA was induced in DBA/1J male mice by ID injection of 100µg of bovine type II collagen in CFA at the basis of the tail, with a booster injection of 50µg by day 21. Mice were treated daily from day 15, with 10mg/kg of GW766994 ip. Mice were regularly weighed and arthritis severity was evaluated by macroscopic clinical scoring and by hindpaw oedema measurement by plethysmography. At day 39, histological analysis was performed on ankle joints after HES and safranin-O fast green staining. Blood was collected and serum levels of IL-6 were measured by cytokine bead array technology and anti-type II collagen antibody titer was measured by ELISA.

RESULTS

CCR3 blockade by GW766994 delayed and reduced arthritis incidence and severity as demonstrated by clinical parameters (arthritis score of 8.3 ± 1.6 in vehicle-treated mice vs 3.7 ± 1.2 in GW766994-treated mice at day 39) Histological analyzes indicated that GW766994 reduced synovial proliferation and limited cartilage degradation in arthritic joints. Blood level of IL-6 and anti-type II collagen antibodies were reduced in mice treated with antagonist of CCR-3 compared to untreated arthritic mice.

CONCLUSION

Thus, our study shows that CCR-3 has an important role in arthritis development and designates it as a potential therapeutic target.

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease involving persistent and erosive arthritis in multiple joints and systemic bone loss. Arthritic joints are characterized by the presence of a synovial pannus resulting from the proliferation of fibroblast-like synoviocytes and infiltration by immune cells, which leads to cartilage degradation, bone erosion and loss, with subsequent abnormal remodeling. [1]. Immune cells are recruited by chemotaxis that involves mainly the binding of chemokines to their receptors. Chemokines, a subfamily of chemotactic cytokines, are low-molecular weight proteins [2]. They are divided into four classes depending on the number of amino acids separating their conserved cysteines: C, CC, CXC and CX3C. The CC class is composed of 27 proteins, from CCL1 to CCL28 (CCL9 and CCL10 being the same protein). These chemokines activate several receptors composed of 7 trans-membrane domains coupled to G-proteins. Ten receptors exist (CCR1-CCR10) with some overlap between chemokines for their binding. Upon receptor binding, chemokines contribute to several physiological processes including immune and inflammatory responses, cell proliferation and differentiation. However, chemokines, and especially CCR3 ligands, are also thought to play a pathological role in inflammatory diseases such as asthma, age-related macular degeneration (AMD) and arthritis [3]. CCR-3 has several ligands comprising chemokines of the eotaxin subfamily (CCL11, CCL24 and CCL26) and RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted). This receptor is expressed on several immune cells such as eosinophils [4], basophils [5], mast cells [6] and activated T helper type 2 (Th2) cells [7]. By binding to CCR-3, ligands promote the migration of one or more cell type to the site of inflammation and several studies have shown that this receptor-ligand system plays a key role in articular diseases. On one hand, CCR-3 is overexpressed in the synovium of patients with RA [3], particularly on monocytes [8]. On the other hand, human articular chondrocytes stimulated with the pro-inflammatory cytokine IL-1 β , expressed very high levels of RANTES [9] and eotaxin-1 [10], which participated in cartilage matrix degradation and chronic inflammation. *In vivo*, in the adjuvant-induced arthritis model, CCR-3 contributed to the initial recruitment of leukocytes into the synovial tissue [11] whereas inhibition of eotaxin-2, a CCR3 ligand, by a specific antibody, decreased the severity of the disease [12]. Furthermore, we showed previously in antigen-induced arthritis in rat that the chemokines RANTES and eotaxin were secreted very early in inflamed joints [13]. Taken together, these data underline that CCR3 activation is an early event during arthritis course and suggest that CCR3 blockade may have some therapeutic relevance to inflammatory joint diseases. In the

present study, we took advantage of the selective CCR-3 antagonist GW766994, which was administered previously in patients with asthma without adverse events [14], to evaluate the effect of CCR-3 inhibition on the severity of collagen-induced arthritis in mouse.

Materials and methods

Mice

All animal procedures were approved by the ethics committee of Lorraine (CELMEA-2013-0003). For CIA, 7-weeks old DBA/1 male mice were purchased from Janvier Labs. Each group comprised 9 animals. CIA experiment was repeated twice. Mice were maintained per group of 4 to 5 in solid bottomed plastic cages in a room with temperature set at $22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ and under a 12h/12h light/dark cycle. Mice were used after an adaptation period of 7 days. Mice had free access to tap water and standard pelleted chow during housing and experiment.

Induction of collagen arthritis and treatment regimen

Collagen-induced arthritis (CIA) was induced in 7-weeks old DBA/1 male mice as shown in figure 1. Briefly, at day 0, arthritis was induced by an intradermal injection of 100 μl of 2mg/ml type II bovine collagen (Mdbioproducts) emulsified in complete Freund's adjuvant (CFA) at the base of the tail. At day 21, a booster intra-peritoneal injection of 100 μl of 1mg/ml type II collagen in incomplete Freund's adjuvant was performed. From day 15, arthritic mice were randomized into two groups. In one group, the CCR-3 antagonist GW766994 dissolved in NaCl 0.9% was administered daily at a concentration of 10mg/kg—(group CIA + 10mg/kg/d GW766994). In the second group, animals received NaCl 0.9% only (group CIA controls). Treatment was administered by intra-peritoneal injection. An additional group of normal mice was used as a control (group Healthy).

Clinical assessment of arthritis

Mice were weighed daily and the severity of arthritis was evaluated three times per week on each paw with a score ranging from 0 to 4, for a maximal score of 16 by animal (0 = normal joint, 1 = moderate redness and slight swelling or swelling of one or two digits, 2 = moderate redness and moderate paw swelling or swelling more than three digits, 3 = redness and swelling from tarsal joints to metatarsal joints, 4 = severe redness and severe swelling of the entire paw). Severity of arthritis was quantified by measuring hindpaw swelling by plethysmography, three times a week. Mean volume of paws determined prior to disease induction (day 0) was used as the baseline. Data are expressed as the difference in ml between the mean hindpaw volumes measured on day of assessment and baseline.

Histological assessment of joint inflammation, bone erosion and cartilage destruction.

Mice were killed by cervical dislocation 39 days after arthritis induction. Hindpaws were dissected and fixed in 4% formalin (Labonord), then decalcified in 10% EDTA for 1 month before embedding in paraffin blocks. Five µm-thick tissue sections were cut and two stainings were performed: hematoxylin, eosin and saffron and safranin O - fast green. Histological examination was performed by two independent observers who were blind to the treatment group and the severity of arthritis was assessed as previously described.

Immunohistochemistry analysis of arthritis ankle

Ankle sections obtained as described in the previous sections were incubated in pH=6 citrate buffered solution (Dako) during 6 hours at 70°C. After washing in water and phosphate buffered saline (PBS), slides were incubated for 10 minutes in 3% hydrogen peroxide then for 20 minutes in horse serum (Impress kit, Vector/Vectastain) and then overnight at 4°C with CCR3 monoclonal antibody diluted 1/1000 (Abcam). After washing in PBS, slides were covered for 30 minutes with secondary antibodies conjugated to a micropolymer containing horseradish peroxidase (ImmPRESS kit; Vector) and then washed in PBS. Staining was developed with AEC permanent (Diagomics). Novocastra). All slides were counterstained for 10 seconds with Harris' hematoxylin (RAL). Analysis of sections was performed by 2 pathologists who were blinded with regard to the treatment.

Measurement of mediator expression by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

At necropsy, forepaws of mice were preserved in trizol™ then were frozen at -80°C until use. Forepaws were grinded with homogenizer-disperser tool (Ultra-turrax, IKA) in 3ml of trizol. Samples were centrifuged at 12,000g for 10min at 4°C and 200µl of chloroform per milliliter of trizol™ were added to the supernatant. Samples were centrifuged at 12000g for 15min at 4°C, 500µl of isopropanol per milliliter of trizol™ were added to the aqueous phase before incubation overnight at -20°C. RNAs were pelleted by centrifugation at 12000g for 10min and were washed twice with 70% ethanol. Finally, RNAs were taken up in water.

Reverse transcription was performed with 2µg of RNA, 4µl of RT buffer, 2µl of dNTP at 5mM, 2µl of DTT at 100mM, 1µl of hexa primers at 0,2µg/µl and 1µl of M-MLV at 200u/µl (Invitrogen). Samples were incubated at 37°C for 1h30 and at 95°C for 5min.

For PCR, samples were diluted to one-tenth for S29, chosen as a housekeeping gene, and one-fifth for genes of interest (iNOS, IL-1β, IL-17A), respectively. PCR was performed with 5µl of samples, 10µl of SYBR, 1µl of each primer at 10µM and 3µl of water. Sequences of primers are listed in S1 Table.

Measurement of cytokines and anti-type 2 collagen antibodies levels in plasma

At killing, blood of mice was sampled in heparinized tubes by intra-cardiac puncture. Samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes and plasma were stored at -80°C until analysis. Cytokines levels were determined using the Bioplex Pro™ Th17 relevant mouse cytokine group I 6-Plex beads assay (Biorad) according to manufacturer's instructions. Lower limit of quantification (LLOQ) were 0.8 pg/ml for IL-6, 2 pg/ml for IFNγ, 2.7 pg/ml for IL-17A, 3 pg/ml for IL-10, 5.8 pg/ml for TNFα and 10.4 pg/ml for IL-1β respectively (manufacturer's data). Anti-type II collagen antibodies were analyzed using a commercially available mouse assay kit (Chondrex Inc.) according to manufacturer's instructions. The standard curve ranged from 0.25 to 16 units/ml (manufacturer's data). Samples (5 per group) were diluted appropriately to generate a signal in the respective dose-response curves.

FACS analysis of popliteal lymph node

Popliteal LN were meshed on 40µm cell strainer in high-glucose DMEM. After washing et counting, 1.10^6 LN cells were incubated with Zombie Aqua Fixable Viability Kit (Biolegend) for 15 minutes. After washing in PBS 1% BSA (Euromedex), Fc receptors were blocked using anti CD16/32 (Biolegend) for 15 minutes before extracellular staining (CD45, CD4, CD3, CD19, CD127, CD25 accordingly to the panels described in Table S2) for additional 15 minutes. After washing in PBS/BSA, cells were incubated overnight at 4°C in fixation buffer (ebiosciences), then wash twice in permeabilization buffer (ebiosciences). Cells were then incubated for 1h with either anti-RORγt or anti-FoxP3 (ebiosciences). After washing twice in perm buffer, cells were analyzed on Gallios cytometer (Beckman Coulter) using Kaluza software.

Statistical analysis

Data are expressed as mean $\pm$ SEM of at least 5 values. Analysis was performed by ANOVA followed by Fischer PLSD post-hoc test for quantitative values or Kruskal-Wallis test for clinical and histological scores. $P < 0.05$ was considered as significant and referred as * in the figures.

Results and Discussion

GW766994 is a potent and selective CCR3 antagonist

In the present study, we investigated the effect of the CCR-3 antagonist, GW766994, on collagen-induced arthritis in mouse. Numerous small molecule CCR3 antagonists have been developed by pharmaceutical companies and several have entered clinical trials without successful launching. Possible explanations include some species-specificity in CCR3 blockade, the ability of antagonists to affect additional pharmacological targets (other chemokines receptors, dopamine or serotonin receptors, ether-a-go-go related gene (hERG)), poor pharmacokinetics properties (limited oral bioavailability, inhibitory potency on CYP 2D6), and insufficient efficacy in allergy trials [15]. GW766994 is an orally bioavailable [16] amino-methyl-morpholine derivative able to inhibit CCR3 in the nanomolar range with a good selectivity over alternate targets and no significant inhibition of P-450 cytochromes [17], which has led to its clinical development until phase III trial [14]. Previous PK/PD studies in a choroidal neovascularization age-related macular degeneration (CNV/AMD) rodent model showed that an intraperitoneal dose of 8mg/kg blocked more than 99% of CCR3 receptors after 8 hours and 11% after 24 hours (Patent WO 2013079696 A1). As the oral bioavailability of GW766994 varies between species [15] we decided to deliver it intra-peritoneally. The dose of 10mg/kg/d was chosen to obtain a consistent CCR3 blockade and accordingly to dose-response study (data not shown). Treatment was begun by day 15, and after the initial immunological spreading of the disease, to avoid any crosstalk effects with sensitization against native collagen type II.

CCR3 blockade alleviates Collagen-induced Arthritis severity

Eotaxin and its cognate receptor CCR3 are modulators of the migration of eosinophils both physiologically to the gut and to points of allergen challenge in a pathological context. As a consequence, CCR3^{-/-} mice have a reduced number of eosinophils in the intestine [18] and do not recruit eosinophils to the skin after repeated epicutaneous sensitization [19]. In the present work we showed that GW766994 reduced the number of eosinophils in the skin of arthritic mice (supplemental figure 1) supporting that CCR3 blockade was effective in our experimental conditions. The level of the pro-inflammatory cytokine IL-6, chosen as reproducible biomarker of arthritis severity [20] and systemic inflammation, was reduced by 68% on day 39 in the GW766994 group (246.6 ± 96.7 in CIA controls group vs 77.3 ± 19.5 in CIA+GW766994

group) (Figure 2). This demonstrates that administration of the CCR-3 antagonist reduced systemic inflammation, even if no significant differences were observed for the other cytokines of the panel tested (data not shown). Moreover, GW766994 significantly decreased antibody titer against mouse collagen type II (58432 ± 16311 units/ml in CIA controls group vs 12746 ± 4037 units/ml in CIA+GW766994 group) (Figure 2), which correlates with the development and severity of arthritis in this [21]. As the treatment was not given from day of sensitization, this result strongly supports an efficient anti-arthritic effect.

In our experimental conditions, GW766994 delayed the onset of arthritis (Figure 3) and decreased its severity. Thus, GW766994 significantly reduced arthritis score from 8.3 ± 1.6 on day 39 in animals receiving NaCl 0.9% to 3.7 ± 1.2 in animals treated with the molecule. Consistent with its anti-arthritic effect and the lack of toxicity of the dose regimen used, GW766994 tended to reduce the loss in body-weight gain of arthritic animals over study duration (Figure 4). Hindpaw edema also showed a 45% decrease by GW766994 treatment on day 39 (0.4 ± 0.1 ml in CIA controls group vs 0.2 ± 0.1 ml in CIA+GW766994 group) (Figure 5). Noteworthy, the anti-arthritic effect was even more pronounced from day 31 to 37 when arthritis incidence was similar between the GW766994-treated and -untreated groups.

GW766994 reduces joint structural damages

Histological examination of the ankle joints confirmed that the CCR3 antagonist reduced significantly hyperplasia of the synovial lining (3.3 ± 0.4 in CIA controls group vs 1.2 ± 0.4 in CIA+GW766994 group) and synovium infiltration by immune cells (3.2 ± 0.4 in CIA controls group vs 1.3 ± 0.4 in CIA+GW766994 group) compared to vehicle-treated mice (Figure 6). Treatment with GW766994 also reduced cartilage degradation (2.2 ± 0.4 in CIA controls group vs 0.3 ± 0.2 in CIA+GW766994 group), as illustrated by the rescue of proteoglycan loss (Figure 6). Finally, GW-766994 decreased bone erosion at the bone-synovium junction (3.5 ± 0.3 in CIA controls group vs 1.3 ± 0.4 in CIA+GW766994 group) (Figure 6). Taken together, these data clearly demonstrate that the CCR3 antagonist GW766994 has an anti-inflammatory and anti-arthritic effect in the collagen-induced arthritis model in mice. RT-PCR analyses confirmed that GW766994 reduced inflammatory mediators (iNOS, IL-1 β et IL-17A) expression (Figure 7A) and extracellular matrix degrading enzymes MMP3, MMP13 et ADAMTS4 in arthritic forepaw (Figure 7B).

CCR3 blockade reduces articular infiltration of immune cells

FACS analysis revealed that GW-766994 treatment limited Th17, ILC3 et T_{reg} lymphocytes populations in popliteal lymph node ($32.4 \times 10^3 \pm 9.5 \times 10^3$ in CIA control vs $3.5 \times 10^3 \pm 1.0 \times 10^3$ Th17 in CIA + GW766994 group, $24.8 \times 10^4 \pm 3.3 \times 10^4$ in CIA controls vs $6.7 \times 10^4 \pm 1.2 \times 10^4$ ILC3 in CIA + GW766994, $73.5 \times 10^3 \pm 7.0 \times 10^3$ in CIA controls vs $26.3 \times 10^3 \pm 10.8 \times 10^3$ T_{reg} in CIA + GW766994 group). Anti-CCR3 immunohistochemical staining of ankles demonstrated high infiltration of CCR3 positive cells in arthritic joints. As expected GW766994 reduced the infiltration of CCR3 positive cells (Figure 9) GW766994 reduced also CCR3 mRNA expression (32.0 ± 11.7 in CIA controls vs 4.1 ± 3.0 CIA + GW766994 group). Of interest, histological examination by two independent pathologist indicated that CCR3- infiltrated cells were mainly neutrophils.

Chemokine receptor as potential therapeutic targets in human RA

Chemokines are known to be key actors of cell migration during the arthritic process [22] [23] and several CCR antagonists have been tested in the clinics or experimental arthritis. Thus, the CCR1 antagonist CCX354-C, which targets migration of monocytes and macrophages to synovial tissue, exhibited evidence of clinical activity in RA patients [24]. The CCR9 antagonist, CCX8037, reduced the severity of collagen-induced arthritis in mice and inhibited the migration of splenocytes from arthritic mice into the synovium of naive mice [25]. In contrast, the blockade of CCR2 or CCR5, which are also expressed on monocytes, was ineffective on chemotaxis induced either by CCL2/MCP-1 (CCR2 ligand), CCL5/RANTES (CCR1 and CCR5 ligand), or by a mix of 5 RA synovial fluids [26]. These data underline that the selective blockade of chemokines receptors is not necessarily sufficient to prevent cell migration into the joints and translate into an anti-arthritic effect. CCR3 is present on monocytes but also on others immune cells like eosinophils, basophils and mast cells [4], with eosinophils being the most expressing ones. As these immune cells contribute individually or collectively to joint inflammation and can degranulate in response to CCR3 activation [27], the blockade of CCR3 may be a relevant pharmacological option. We show here that a pharmacological CCR3 antagonist decreased experimental synovitis with a reduced infiltration of the synovium by immune cells. Such anti-inflammatory effect into the joints resulted in a less severe degradation of joint tissues and a decreased systemic inflammation. Noteworthy, a similar effect was observed in another experimental arthritis model, the KBxN serum model (supplemental figure

2), suggesting that the therapeutic potency of GW766994 deserves to be explored beyond asthma and allergic rhinitis, possibly in inflammatory joint diseases.

Conclusion

Taken together the present results demonstrate that CCR-3 has an important role in experimental arthritis development and designate CCR-3 as a potential therapeutic target for rheumatic diseases.

Acknowledgments

The authors thank Dr Roselyne Bidault (Laboratoire GlaxoSmithKline, France) for providing GW766994 and for helpful discussion. This study was support by grants of the Fondation Arthritis Courtin and the Région Lorraine.

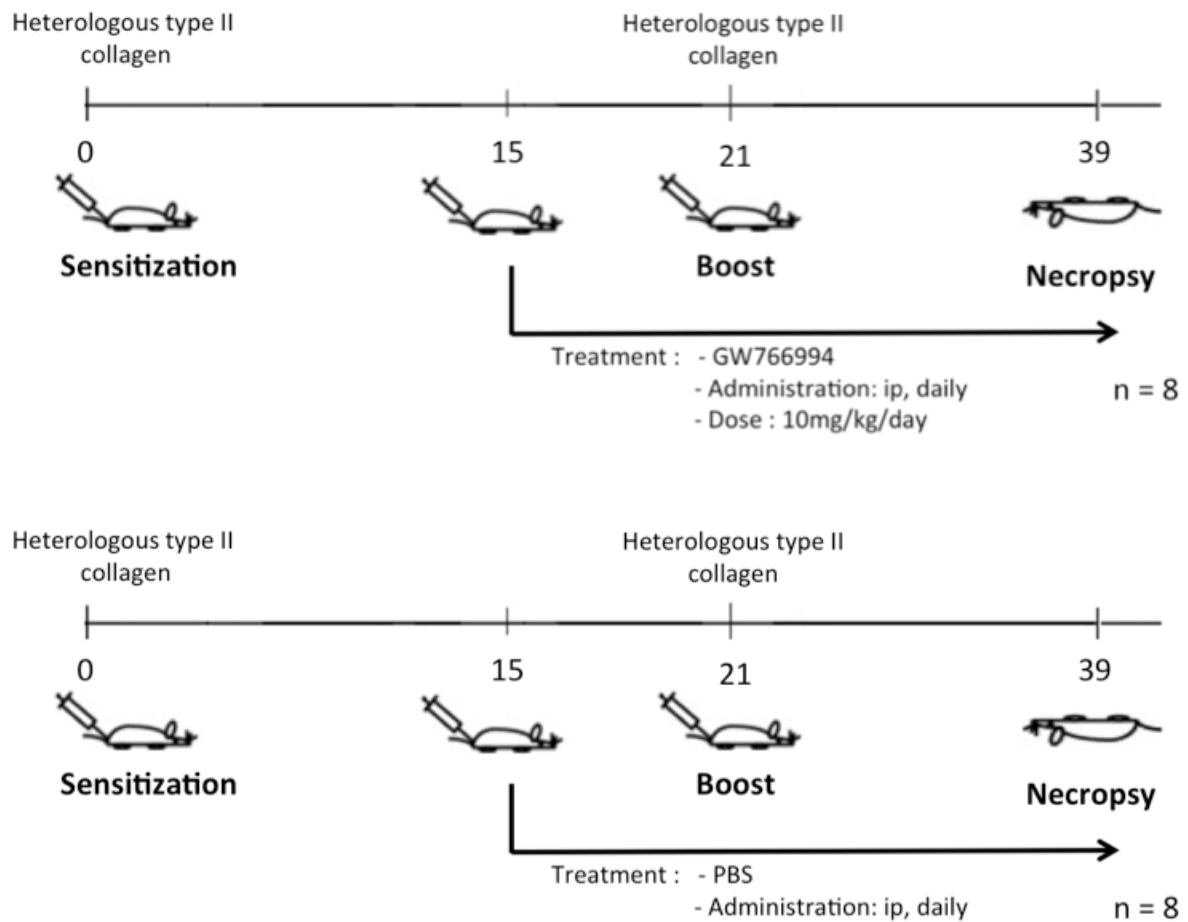


Figure 1 : Study design of collagen-induced arthritis and treatment. Mice are sensitized at day 0 by intradermal injection of bovine type II collagen in complete Freund adjuvant. At day 21, a booster intraperitoneal injection of type II collagen was performed. From day 15, treated mice received 10mg/kg/day of CCR-3 antagonist daily to the necropsy and CIA control group received vehicle only (PBS). An additional group of normal mice was used as a control (group Healthy)

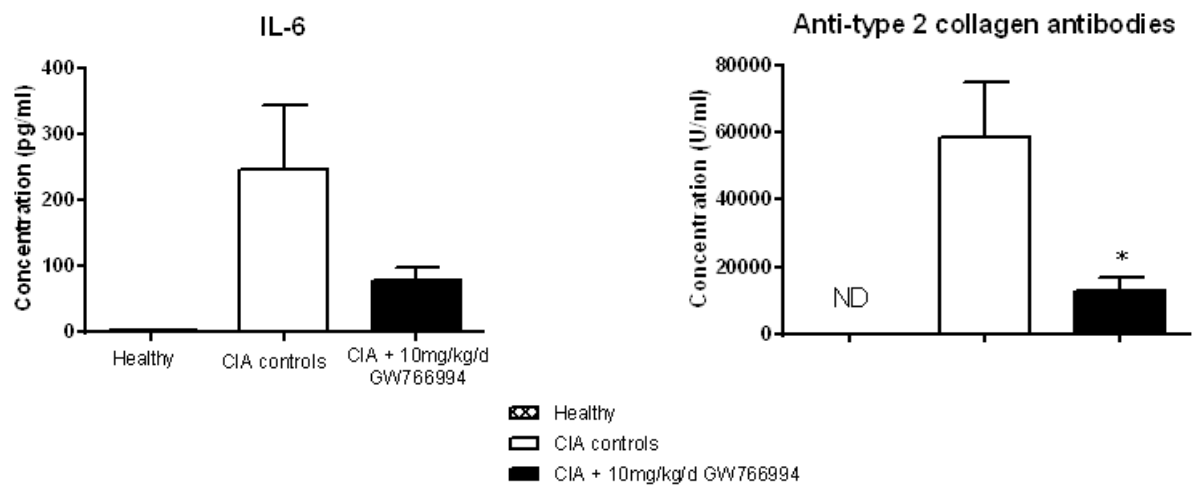


Figure 2 : Cytokine IL-6 (A) and anti-collagen 2 antibodies measurement in serum of arthritic and arthritic treated with GW766994 mice, 39 days after induction of arthritis (n = 5). Data are expressed as means $\pm$ SEM.

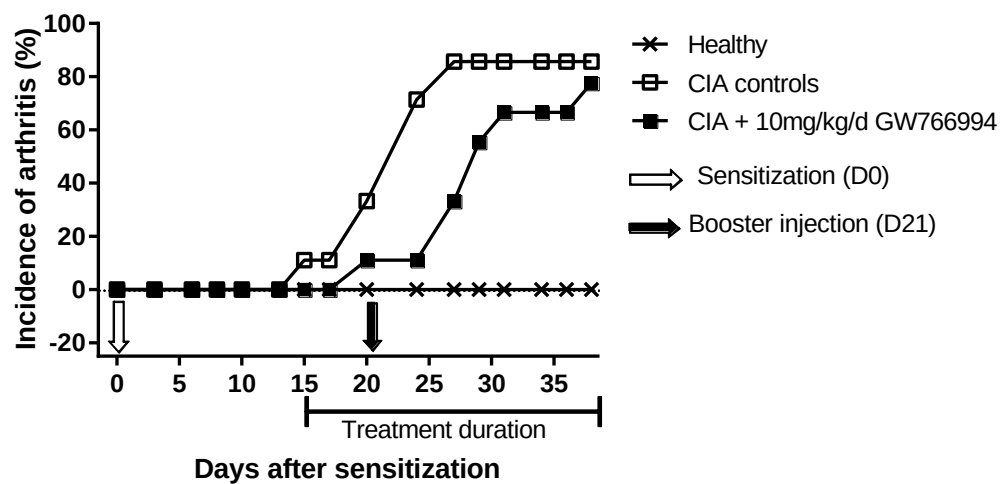


Figure 3 : Incidence of arthritis in healthy, arthritic and arthritic treated with GW766994 mice (n = 9) after induction of arthritis. Arthritis was induced by intradermal injection of CII at D0 and a boost was performed at D21 by intraperitoneal injection of CII. Administration of GW766994 starts at D15.

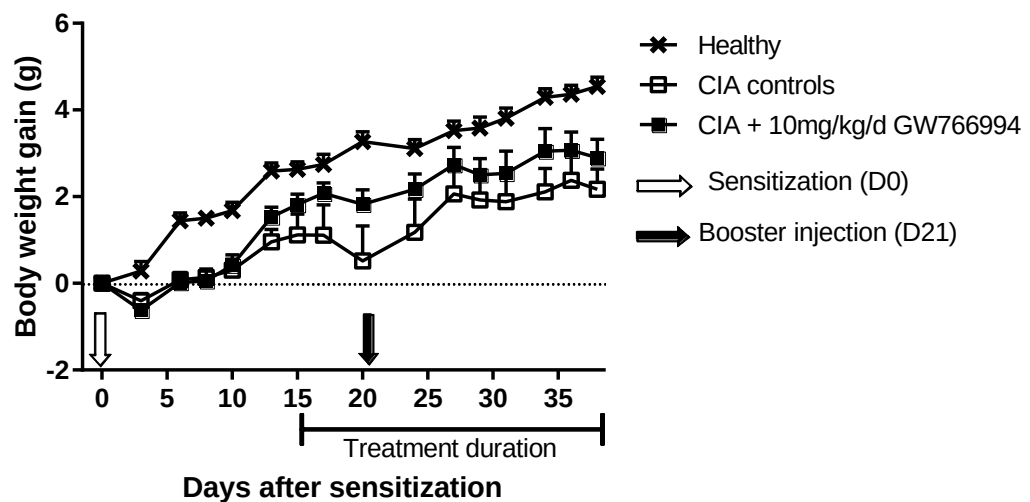


Figure 4 : Modulation of body weight gain in healthy, arthritic and arthritic treated with GW766994 mice (n = 9) after induction of arthritis. Arthritis was induced by intradermal injection of CII at D0 and a boost was performed at D21 by intraperitoneal injection of CII. Administration of GW766994 starts at D15. Data are expressed as means $\pm$ SEM.

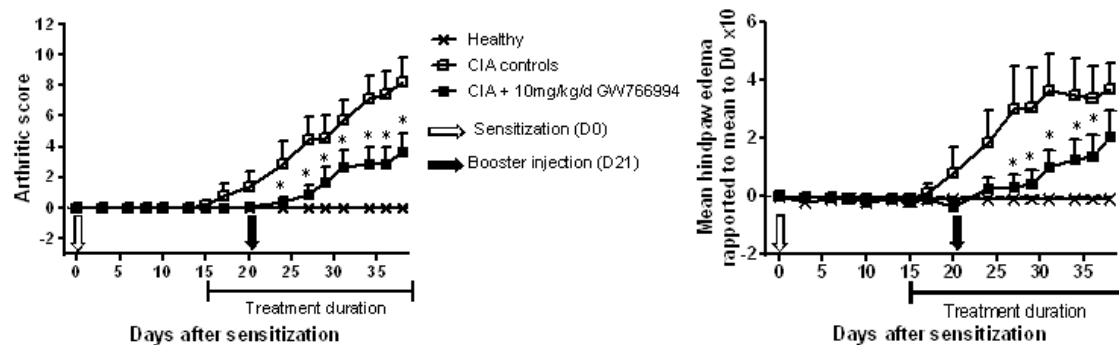


Figure 5 : Severity of arthritis in healthy, arthritic and arthritic treated with GW766994 mice ($n = 9$) was recorded by clinical arthritis score (A) and quantified by measuring of paw swelling (B). Arthritis was induced by intradermal injection of CII at D0 and a boost was performed at D21 by intraperitoneal injection of CII. Administration of GW766994 starts at D15. Data are expressed as means $\pm$ SEM.

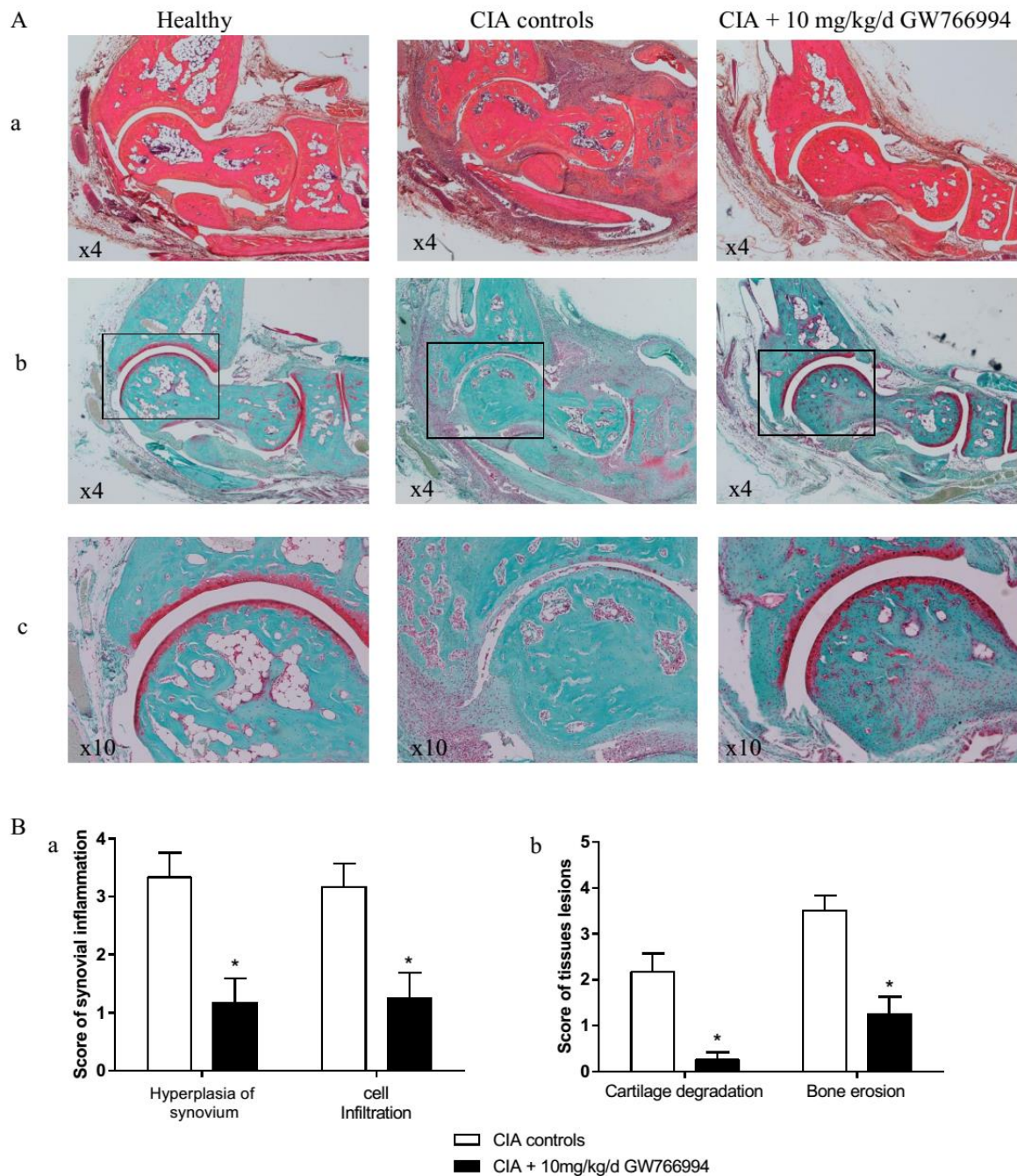


Figure 6 : Analysis of inflammation and cartilage degradation in ankles in arthritic and arthritic treated with GW766994 mice, 39 days after induction of arthritis (n = 3). (A) Representative photography of inflammation (a) and cartilage degradation (b-c) on joint sections and (B) histological scoring of inflammation severity (a) and cartilage degradation and bone erosion (b). Data are expressed as means $\pm$ SEM.

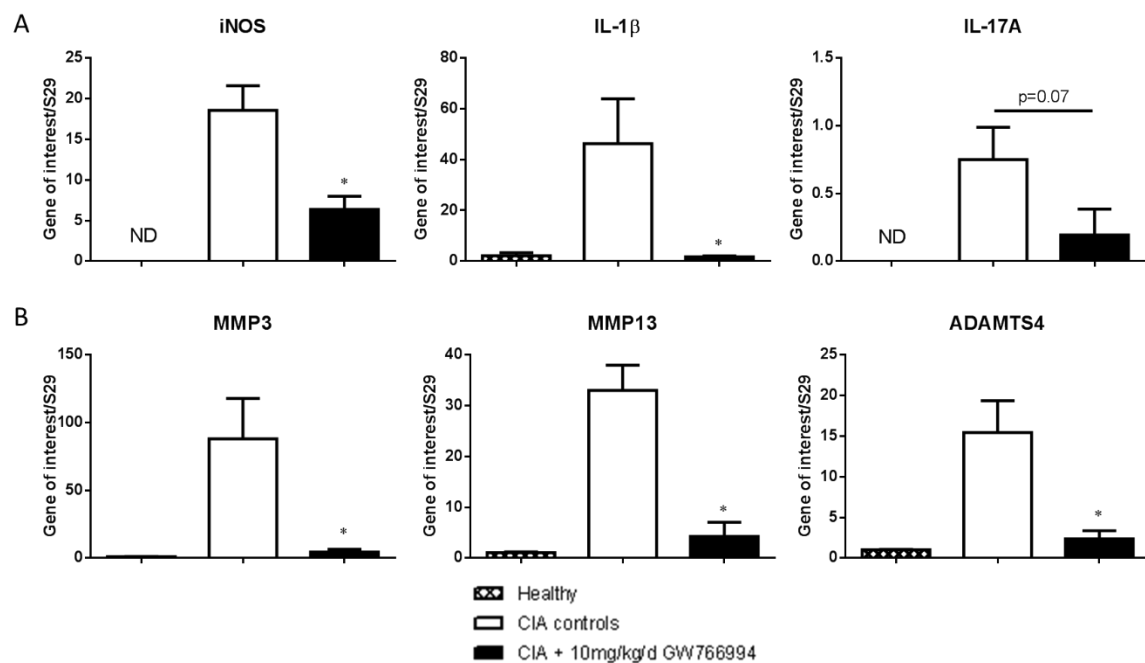


Figure 7 : Expression of inflammatory mediators (A) and of extracellular matrix degrading enzymes (B) in forepaw of naive, arthritic and GW766994-treated arthritic mice, 39 days after arthritis induction (n=8). Data are expressed as means $\pm$ SEM.

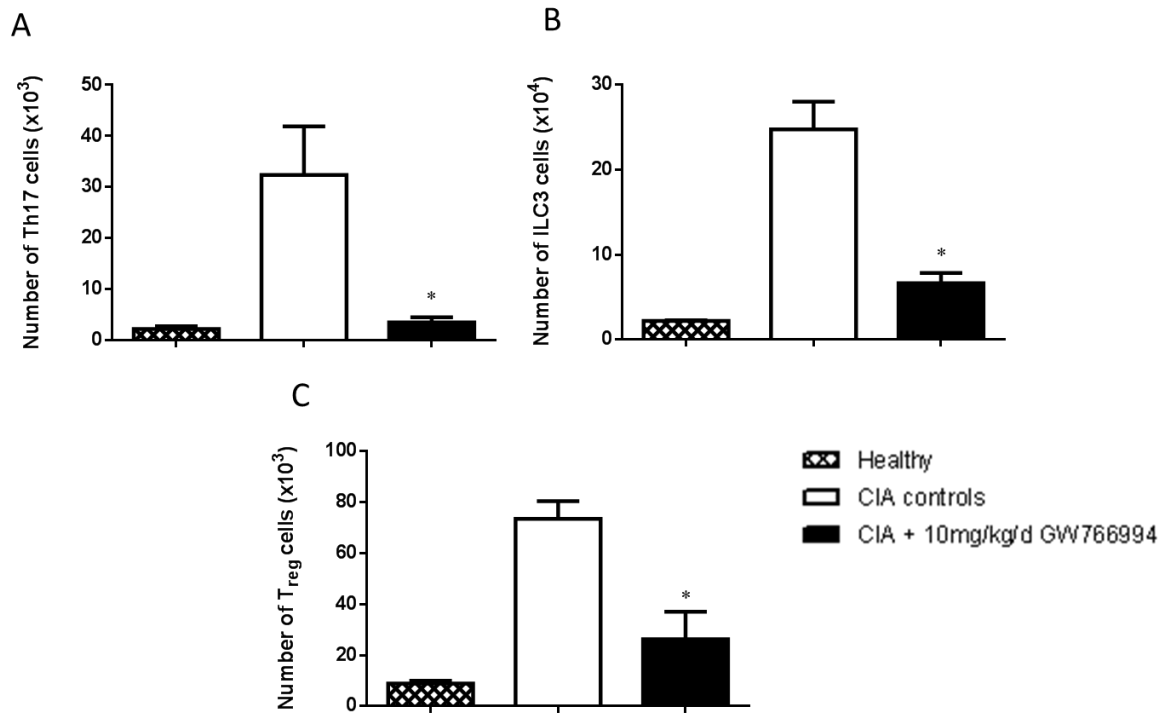


Figure 8 : Analysis of lymphocytes populations in popliteal lymph node of naive, arthritic and GW766994-treated arthritic mice, 39 days after arthritis induction of healthy Th17 (A), ILC3 (B) et T_{reg} (C) (n=3). Data are expressed as means $\pm$ SEM.

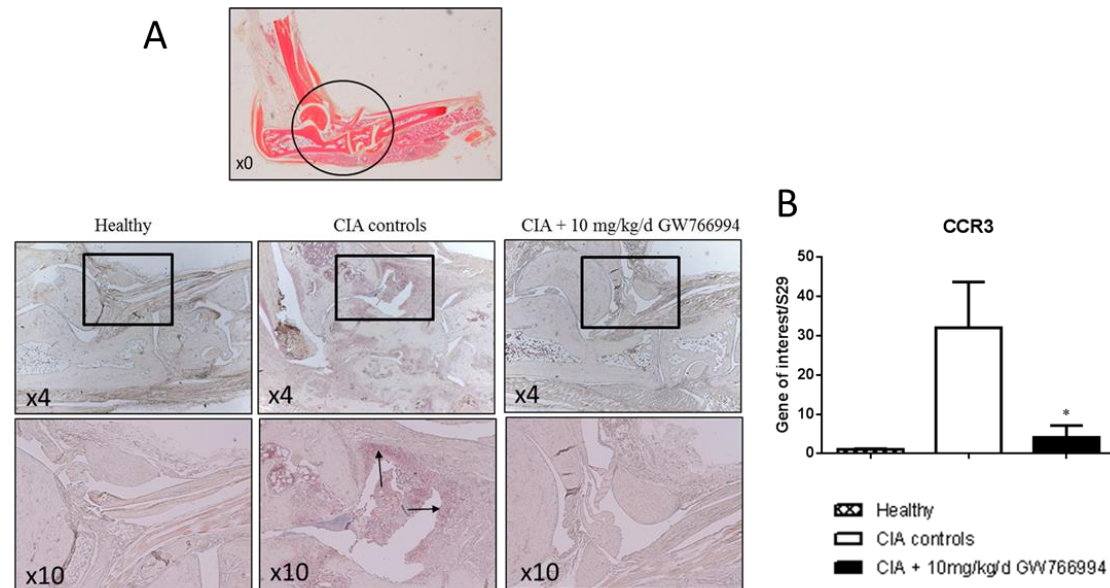


Figure 9 : Expression of CCR3 in ankle of naive, arthritic and GW766994-treated arthritic mice measured by immunohistochemistry (A) and by RT-PCR (B), 39 days after arthritis induction (n=4). Data are expressed as means $\pm$ SEM.

References

1. G. R. Burmester, E. Feist, and T. Dörner, *Nature Reviews Rheumatology* **10**, 77 (2013).
2. H. Kokkonen, I. Soderstrom, J. Rocklov, G. Hallmans, K. Lejon, and S. Rantapaa Dahlqvist, *Arthritis Rheum.* **62**, 383 (n.d.).
3. D. A. Zhebrun, A. A. Totolyan, A. L. Maslyanskii, A. G. Titov, A. P. Patrukhin, A. A. Kostareva, and I. S. Gol'tseva, *Bull. Exp. Biol. Med.* **158**, 192 (2014).
4. P. D. Ponath, S. Qin, T. W. Post, J. Wang, L. Wu, N. P. Gerard, W. Newman, C. Gerard, and C. R. Mackay, *J. Exp. Med.* **183**, 2437 (1996).
5. M. Uguccioni, C. R. Mackay, B. Ochensberger, P. Loetscher, S. Rhis, G. J. LaRosa, P. Rao, P. D. Ponath, M. Baggiolini, and C. A. Dahinden, *J. Clin. Invest.* **100**, 1137 (1997).
6. P. Romagnani, A. De Paulis, C. Beltrame, F. Annunziato, V. Dente, E. Maggi, S. Romagnani, and G. Marone, *Am. J. Pathol.* **155**, 1195 (1999).
7. F. Sallusto, C. R. Mackay, and A. Lanzavecchia, *Science* **277**, 2005 (1997).
8. K. J. Katschke, J. B. Rottman, J. H. Ruth, S. Qin, L. Wu, G. LaRosa, P. Ponath, C. C. Park, R. M. Pope, and A. E. Koch, *Arthritis Rheum.* **44**, 1022 (2001).
9. N. Alaaeddine, T. Olee, S. Hashimoto, L. Creighton-Achermann, and M. Lotz, *Arthritis Rheum.* **44**, 1633 (2001).
10. Y.-H. Hsu, M.-S. Hsieh, Y.-C. Liang, C.-Y. Li, M.-T. Sheu, D.-T. Chou, T.-F. Chen, and C.-H. Chen, *J. Cell. Biochem.* **93**, 929 (2004).
11. C. S. Haas, R. J. Martinez, N. Attia, G. K. 3. Haines, P. L. Campbell, and A. E. Koch, *Arthritis Rheum.* **52**, 3718 (2005).
12. J. N. Ablin, M. Entin-Meer, V. Aloush, S. Oren, O. Elkayam, J. George, and I. Barshack, *Clin. Exp. Immunol.* **161**, 276 (2010).
13. J. Paquet, J.-C. Goebel, C. Delaunay, A. Pinzano, L. Grossin, C. Cournil-Henrionnet, P. Gillet, P. Netter, J.-Y. Jouzeau, and D. Moulin, *Arthritis Res. Ther.* **14**, R60 (2012).
14. H. Neighbour, L.-P. Boulet, C. Lemiére, R. Sehmi, R. Leigh, A. R. Sousa, J. Martin, N. Dallow, J. Gilbert, A. Allen, D. Hall, and P. Nair, *Clin. Exp. Allergy* **44**, 508 (2014).
15. L. I. Willems and A. P. Ijzerman, *Med Res Rev* **30**, 778 (2010).
16. A. Curaj, M. Staudt, R. Fatu, A. O. Kraaijeveld, J. Jankowski, E. A. L. Biessen, E. A. Liehn, Institute for Molecular Cardiovascular Research, University Hospital Aachen, Germany, *Discoveries* **3**, e45 (2015).
17. S. Hodgson, S. Charlton, and P. Warne, in *Drug News Perspect.* (2004), pp. 335–338.
18. A. A. Humbles, B. Lu, D. S. Friend, S. Okinaga, J. Lora, A. Al-Garawi, T. R. Martin, N. P. Gerard, and C. Gerard, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 1479 (2002).
19. W. Ma, P. J. Bryce, A. A. Humbles, D. Laouini, A. Yalcindag, H. Alenius, D. S. Friend, H. C. Oettgen, C. Gerard, and R. S. Geha, *J. Clin. Invest.* **109**, 621 (2002).
20. J. C. Leisten, W. A. Gaarde, and W. Scholz, *Clin. Immunol. Immunopathol.* **56**, 108 (1990).
21. K. Yanaba, Y. Hamaguchi, G. M. Venturi, D. A. Steeber, E. W. St Clair, and T. F. Tedder, *The Journal of Immunology* **179**, 1369 (2007).
22. P. J. Koelink, S. A. Overbeek, S. Braber, P. de Kruijf, G. Folkerts, M. J. Smit, and A. D. Kraneveld, *Pharmacol. Ther.* **133**, 1 (2012).
23. Z. Szekanecz, A. Vegvari, Z. Szabo, and A. E. Koch, *Front Biosci (Schol Ed)* **2**, 153 (2010).
24. P. P. Tak, A. Balanescu, V. Tseluyko, S. Bojin, E. Drescher, D. Dairaghi, S. Miao, V. Marchesin, J. Jaen, T. J. Schall, and P. Bekker, *Ann. Rheum. Dis.* **72**, 337 (2013).
25. W. Yokoyama, H. Kohsaka, K. Kaneko, M. Walters, A. Takayasu, S. Fukuda, C. Miyabe, Y. Miyabe, P. E. Love, N. Nakamoto, T. Kanai, K. Watanabe-Imai, T. T. Charvat, M. E. Penfold, J. Jaen, T. J. Schall, M. Harigai, N. Miyasaka, and T. Nanki, *Arthritis Res. Ther.* **16**, 445 (2014).

26. M. C. Lebre, C. E. Vergunst, I. Y. K. Choi, S. Aarrass, A. S. F. Oliveira, T. Wyant, R. Horuk, K. A. Reedquist, and P. P. Tak, PLoS ONE **6**, e21772 (2011).
27. T. Fujisawa, Y. Kato, H. Nagase, J. Atsuta, A. Terada, K. Iguchi, H. Kamiya, Y. Morita, M. Kitaura, H. Kawasaki, O. Yoshie, and K. Hirai, Journal of Allergy and Clinical Immunology **106**, 507 (2000).

Supplementary data

Materials and methods

S1 table

Gene	Forward	Reverse
S29	GGA-GTC-ACC-CAC-GGA-AGT-T	GCC-TAT-GTC-CTT-CGC-GTA-CT
IL-1 β	TGT-GAA-ATG-CCA-CCT-TTT-GA	GTG-CTC-ATG-TCC-TCA-TCC-TG
iNOS	CCT-TGG-TGA-AGG-GAC-TGA-GC	CAA-CGT-TCT-CCG-TTC-TCT-TGC
IL-17A	GGA-CTC-TCC-ACC-GCA-ATG-AA	TTT-CCC-TCC-GCA-TTG-ACA-CA
CCR3	TGA-TGT-TTA-CTA-CCT-GAC-TGG-TG	TGC-CAT-TCT-ACT-TGT-CTC-TGG-T

S2 table

Panel used for ILC3 detection CD45 ⁺ CD19 ⁻ CD3 ⁻ CD127 ⁺ ROR γ t ⁺				
Protein	Fluorochrome	Host	Isotype	Provider
CD45	BV421	Rat	IgGb, kappa	BioLegend
CD19	APC	Rat	IgG2a, kappa	BioLegend
CD127	PerCP-eFluor710	Rat	IgG2b	eBioscience
CD3	APCFire750	Rat	IgG2b, kappa	BioLegend
ROR γ t	PE	Rat	IgG2a	eBioscience
Panel used for Th17 detection CD45 ⁺ CD19 ⁻ CD3 ⁺ CD4 ⁺ ROR γ t ⁺				
CD45	BV421	Rat	IgGb, kappa	BioLegend
CD19	APC	Rat	IgG2a, kappa	BioLegend
CD3	APCFire750	Rat	IgG2b, kappa	BioLegend
CD4	FITC	Rat	IgG2a, kappa	BioLegend
ROR γ t	PE	Rat	IgG2a	eBioscience
Panel used for T _{reg} detection CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺				
CD45	BV421	Rat	IgGb, kappa	BioLegend
CD3	APCFire750	Rat	IgG2b, kappa	BioLegend
CD4	FITC	Rat	IgG2a, kappa	BioLegend
CD25	APC	Rat	IgG1, lambda	BioLegend
FoxP3	PE	Mouse	IgG1, kappa	BioLegend

K/BxN arthritis model

Arthritis was induced by injection of serum derived from K/BxN mice. 11-weeks old Balb/c mice were injected intraperitoneally with 120µl of serum at day 0. At day 2, mice received a second injection carried out with the same procedure. Mice were divided into 2 groups of 6 animals. One group received antagonist of CCR-3 daily from J0 at a concentration of 10mg/kg/d (Arthritis + 10mg/kg/d GW766994 group). NaCl 0.9% was administered to the second group (Arthritis controls group). Treatment was administered by intraperitoneal injection.

Supplementary results

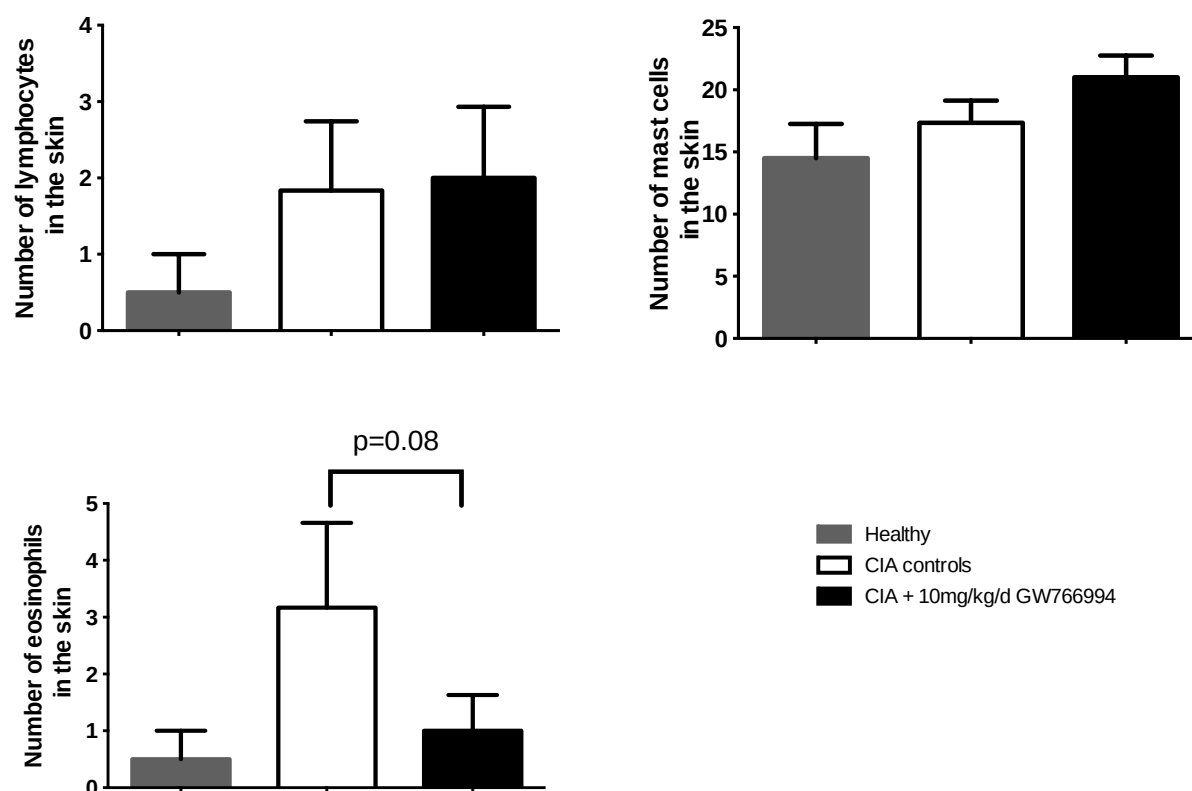


Figure S1 : Analysis of leukocyte populations in the skin of CIA arthritic mice treated or not with GW766994, 39 days after induction of arthritis (n = 6). Skin sections were stained using hematoxylin, eosin and analyzed by a pathologist blind for treatment. Data are expressed as means $\pm$ SEM.

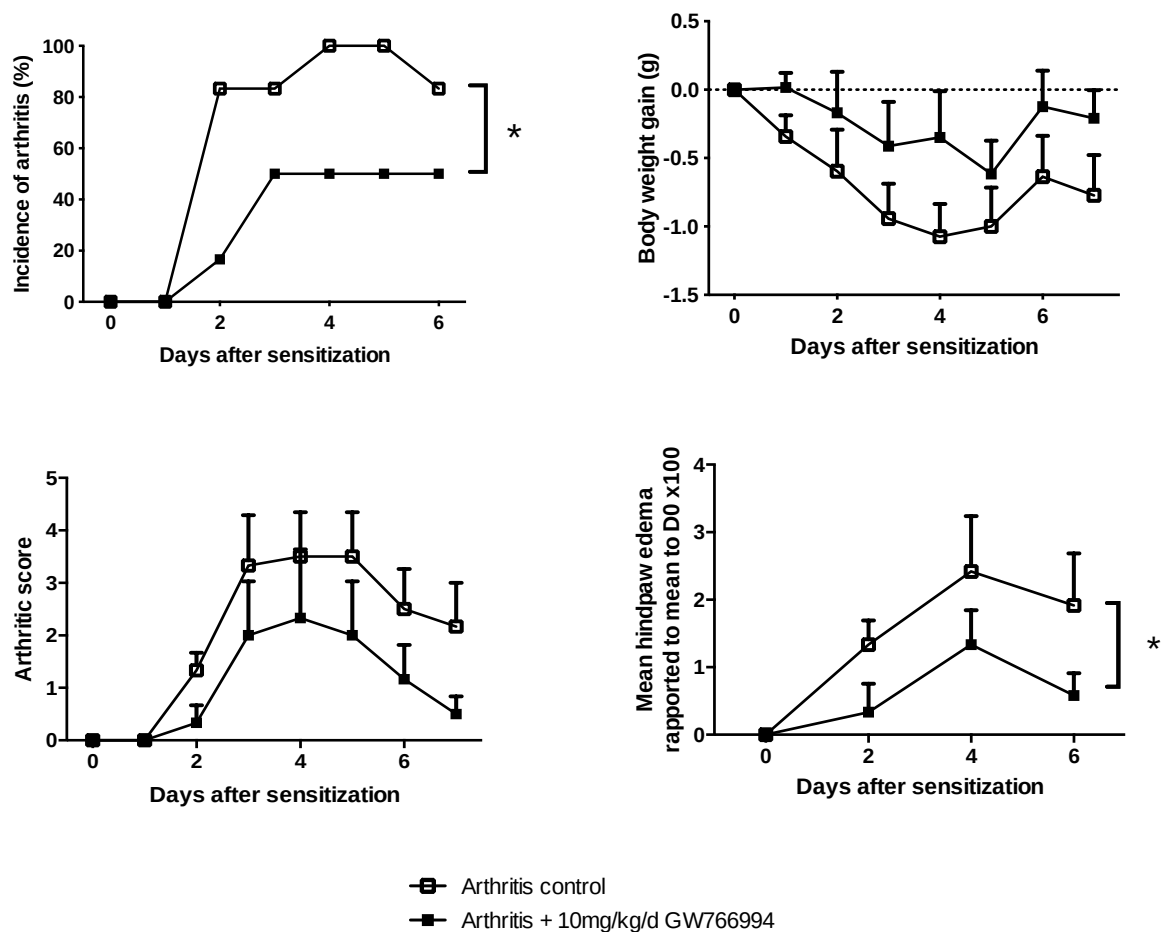


Figure S2 : Incidence of arthritis in arthritic and arthritic treated with GW766994 mice (n = 6). Arthritis was induced by intraperitoneal injection of serum derived from K/BxN mice at D0 and D2. Administration of GW766994 starts at D0. Incidence of arthritis (A). Modulation of body weight gain (B). Severity of arthritis recorded by clinical arthritis score (C) and quantified by measuring of paw swelling (D). Data are expressed as means $\pm$ SEM.

Annexe n°2

Contribution à des publications
en parallèle du travail de thèse

Publication

Association between rheumatoid arthritis and systemic mastocytosis: a case report and literature review.

Association between rheumatoid arthritis and systemic mastocytosis: a case report and literature review

Ichraq Latar¹ · Meriem Koufany¹ · Julie Hablot¹ · Damien Loeuille² · Patrick Netter¹ · Jean-Yves Jouzeau¹ · Isabelle Chary-Valckenaere² · David Moulin^{1,3}

Received: 18 July 2016 / Accepted: 24 July 2016

© International League of Associations for Rheumatology (ILAR) 2016

Abstract Classically, mast cells (MC) are considered as important actors of the innate immune response playing a pivotal role in IgE-mediated allergic and antiparasite responses. In the last two decades, many experimental evidences demonstrated that these hematopoietic-derived cells present in both connective and mucosal tissues are also key modulators of the adaptive immune response and could contribute to autoimmune disease notably in rheumatoid arthritis (RA). Recently, Bader-Meunier et al. reported a series of 31 patients suffering from inflammatory joint diseases associated with mastocytosis, suggesting that mastocytosis was associated with a higher prevalence in spondyloarthritis. We discuss here the possible link between chronic inflammatory arthritis and mastocytosis through the report of a clinical case describing a patient developing RA after a long history of mastocytosis. Of great interest, antihistamine treatment alone was sufficient to treat RA in this patient.

Keywords Mast cells · Mastocytosis · Osteoporosis · Rheumatoid arthritis

Case report

Our patient is a Caucasian male aged 78 years. His past medical history included a chronic obstructive pulmonary disease that led the patient to smoking cessation in 1975 (30 pack-year). In 1999, the patient was admitted to a rheumatology department for multiple recurrent bone fractures (vertebral compression fracture, pelvis, acetabulum, ribs, feet, left hip bone, sternum) associated with urticaria pigmentosa. Diagnosis of bone and cutaneous mastocytosis was established after bone and skin biopsy analysis. Furthermore, DEXA analysis of bone mineral density revealed major osteoporosis (T-score at -4.1 on the lumbar spine and -2.6 on the hip).

Since establishment of the diagnosis, the patient had received bisphosphonates (injectable pamidronate for 2 years, then oral alendronate) associated with vitamin D (400 UI/day) and calcium (1 g/day) supplementation. He was also prescribed a daily oral intake of selective H1 receptor antagonist (cetirizine 10 mg bid). After 2 years of anti-osteoporotic treatment, the patient did not present any new fractures and showed an improvement of bone mineral density with stable and normal values leading to bisphosphonates discontinuation in 2010. In the meantime, the patient decided to stop antihistamine treatment on his own in 2005.

In June 2012, mastocytosis flared up with severe cutaneous signs and a new lumbar spine fracture. High tryptase levels (>20 µg/L), indicative of systemic mastocytosis, were found at this time. The patient underwent L5 vertebroplasty, and antihistamine treatment was reintroduced (cetirizine 10 mg/day). Six months later, he was admitted to our hospital with

Ichraq Latar and Meriem Koufany contributed equally to this work. Isabelle Chary-Valckenaere and David Moulin contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10067-016-3368-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ David Moulin
david.moulin@univ-lorraine.fr

¹ UMR 7365 IMoPA CNRS-Université de Lorraine, Biopôle de l'Université de Lorraine, Campus biologie-santé, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy cedex, France

² Department of Rheumatology, Nancy University Hospital, 54511 Vandœuvre-lès-Nancy, France

³ Nancy, University Hospital, CHU de Nancy, Contrat d'interface, Nancy F-54035, France

joint pain and swelling of hands, inflammatory pain of the shoulder and pelvic girdles.

Blood tests showed persistent high levels of tryptase (52 µg/L) raising the question of patient good compliance to cetirizine treatment. Elevated C-reactive protein (66 mg/L) and accelerated erythrocyte sedimentation rate (46 mm at the first hour) were found. ACPA were present at a high titer (>250 UI/L) whereas HLA-B27 status was negative. At follow-up, X-ray imaging and ultrasonography showed active inflammatory and erosive polyarthritis. Rheumatoid factors, initially negative, became positive in September 2013 (RF-IgM, 46 UI/L). Clinical presentation was consistent with RA diagnosis according to ACR-EULAR 2010 criteria [1], as other causes of chronic inflammatory arthritis were eliminated. Methotrexate was contraindicated by pulmonary disorders and the presence of non hypermetabolic lung nodules. He was prescribed cortisone 7.5 mg/day (0.1 mg/kg), associated with pain-killers (tramadol hydrochloride LP 100 mg and acetaminophen 1 g) on demand and received compliance recommendations for regular intake of cetirizine 10 mg/day.

Corticosteroids were progressively decreased then stopped after 3 months and mastocytosis and RA remained inactive (DAS28 at 2.3 and tryptase levels <20 µg/L), during the three following years under antihistamine treatment alone. The last examination, performed in June 2016, confirmed none evolutive intracarpal, interphalangeal, and metacarpophalangeal radiographic lesions without active synovitis.

Discussion

Mastocytosis and mast cells

This patient suffered from mastocytosis diagnosed 15 years ago. Mastocytosis is a disorder characterized by mast cell proliferation and accumulation within various organs. Mastocytosis is generally classified into two major types, the cutaneous mastocytosis (CM) corresponding to the accumulation of MC only in skin and the systemic mastocytosis (SM) where the accumulation is occurring in one or more organs, each could be subdivided in a total of seven different categories [2]. Little is known about mastocytosis etiology; however, abnormal mast cell activation/survival or proliferation is most commonly associated with auto-activating mutation on the tyrosine kinase receptor c-KIT [3].

Three types of CM are identified, urticaria pigmentosa, diffuse CM, and mastocytoma of the skin, usually affecting people in childhood. The most frequent form of CM is urticaria pigmentosa characterized by yellow-brown macules located at the trunk or extremities of the body. Diffuse CM is more severe and it manifests by blisters and bullae.

SM is divided into indolent SM (ISM), SM with an associated hematopoietic non-mast cell lineage disease, aggressive SM, and mast cell leukemia (MCL).

Patients affected by ISM present skin lesions, similar to urticaria pigmentosa, and bone marrow infiltration [4]. The aggressive form of mastocytosis is associated with an important infiltration of tissues, and MCL is characterized by infiltration with atypical or immature mast cells (MCs) in organs and bone marrow.

Organ infiltration by MCs can lead to organomegaly, impairment, or loss of organ function.

The different forms of mastocytosis depend on the type of MCs involved and the type and the quantity of mediators released. The evolution of CM into SM, like in our patient, is known and correlates with MCs proliferation in bones and organs [5].

MCs are derived from hematopoietic stem cells. They circulate in the blood to migrate to vascularized tissues where they mature under cytokine control, particularly the stem cell factor. They contain several mediators, i.e., histamine, proteases, cytokines, chemokines, growth factors, arachidonic acid metabolites, and reactive oxygen, and nitrogen species. All these mediators can be secreted by MCs after degranulation and are involved in different functions of MCs [6].

MCs can be subdivided according to their serine protease expression (tryptase or chymase only, or both tryptase and chymase) [7] or to staining characteristics of their granules and localization (connective tissue MC possesses safranin-positive granules whereas mucosal mast cells are safranin-negative) [8].

MCs can be activated by many stimuli, via the high-affinity immunoglobulin E (IgE) receptor (FcεRI) in allergic response, after IgE cross-linking which triggers Lyn and Syk kinase cascade [9]. Pathogens such as bacteria and viruses can result in direct MC activation through pattern recognition receptor. Other activators are cytokines, chemokines, immunoglobulin G via Fcγ receptor [2].

Once activated, MCs are considered as a double-edged sword. In innate and acquired immunity, MCs are known to act rapidly via toll-like receptors, complement receptors and Fc receptors, and activate neutrophils, dendritic cells, and T cells, thanks to their mediators. MCs can also phagocytose bacteria and protect against viruses by the recruitment of T cells and natural killer cells [10]. Another function of MCs is their role in host defense against parasites, via IgE response [11].

Although MCs have protective effects, an abnormal activation can promote inflammatory disorders. They are mostly described for their role in anaphylaxis and allergic response by hypersensitivity reactions via IgE binding [12]. Accumulation of MCs mediators in airway smooth muscle are correlated with asthma activity [13]. Moreover, evidence from their overabundant representation/activity in intestine is amply described in inflammatory bowel disease (Crohn's disease or ulcerative colitis) and irritable bowel [7].

More controversially, MCs may also play a role in cancer by promoting growth of tumors via angiogenic factors [7].

Mastocytosis and osteoporosis

Osteoporosis and vertebral fracture are frequent in patients with systemic mastocytosis with respectively 31 and 17 % in a cohort of 75 adult patients [14]. The pathogenesis of mastocytosis-related osteoporosis is not fully understood, but relapse of mediators by mast cells within bone marrow is thought to be central. Histamine acts directly on osteoclasts by promoting osteoclast formation directly through paracrine action on the precursors and indirectly through increased osteoblasts secretion of RANKL [15]. Moreover, heparin and bone-resorptive cytokines (IL-1, IL-6, TNF α) are known to play a role in osteoclast activation by mast cells [16].

Histomorphometric studies performed in systemic mastocytosis patients have revealed an increased number of osteoclasts due to presence of mast cells, leading to osteoporosis. [17].

Multiple bone fracture associated with high tryptase levels indicated that our patient was suffering from mastocytosis and mastocytosis-induced osteoporosis. Treatment with bisphosphonates and vitamin D supplementation in association with antihistaminergic drugs leads to absence of bone complication during 10 years with normal BMD values. Such beneficial effects of bisphosphonate treatment in a patient suffering from osteoporosis secondary to mastocytosis were already reported [14, 16, 18–21]. Our patient underwent a vertebroplasty after traumatic spinal fracture only 2 years after bisphosphonates cessation but 7 years after patient quit antihistamine treatment.

Six months later, our patient presented signs of inflammatory joint disease; blood tests and medical imaging led to the diagnosis of rheumatoid arthritis according to ACR/EULAR 2010 rheumatoid arthritis criteria [22].

Mast cells and rheumatoid arthritis

Clinical implication of MCs in inflammatory arthritis is not yet well defined but has been established in several studies. Increased density of MCs in synovial tissues is found in patients with RA when compared to osteoarthritis (OA) and normal-joint patients, density of mast cells correlated positively with disease severity index and swollen joint counts [23]. RA-associated mast cell hyperplasia is associated with changes in mast cell subset regarding their protease expression. In normal synovium, tryptase, and chymase, double-positive mast cells (MC_{TC}) are mainly found. In early inflammatory rheumatoid arthritis, specific expansion of tryptase-only positive mast cells (MC_T) is observed followed by increases of MC_{TC} in established or chronic disease [24, 25].

Mast cell-specific mediators such as histamine and tryptase are elevated in synovial fluid from RA patients [26]. Mast

cells are also the main IL-17-producing cells in synovium of established RA and spondyloarthritic patient [27] contributing to synovial inflammation [28].

Several MC activation pathways have been described in RA. In addition to toll-like receptors (TLR2, 4, and endosomal TLRs) or cytokines-mediated (IL-3, IL-4, and the more recently studied IL-33 [29]) activation, Suurmond et al. recently demonstrated that MCs could be activated by ACPA immune complex in a citrulline-dependent manner through cross-linking Fc γ RIIA [30]. Mast cells can also interact directly with T cell, contributing to T cell subset expansion [31] or activation [32] but also changing their own phenotype [33].

It is plausible that MCs response in RA results from integrated signals of multiple activation pathways contributing to the chronicity of disease.

Consequences of MC activation could easily be linked to pathogenesis of RA. Indeed, once activated (by ACPA for instance), MCs produce a large amount of IL-8, a potent activator of neutrophil chemotaxis [30]. MCs can also produce IL-1 β , TNF α , and IL-17, all responsible for synovial fibroblast activation and deleterious consequences on cartilage. Finally, MCs are thought to be partly responsible for drastic tissue remodeling occurring in RA. MCs are often found in the vicinity of blood synovial vessels, and MC mediators (VEGF, tryptase, chymase) are known to be potent angiogenic factors [34]. Matrix metalloproteinase (MMPs) secretion and osteoclast activation responsible for cartilage breakdown and bone erosion, two hallmarks of RA, could be considered as consequences of MC mediators' release. As mentioned above, MCs could activate synovial fibroblasts but also induce MMP release by chondrocyte. Moreover, tryptase is recognized as a potent activator of MMPs [35]. Mechanisms explaining systemic mastocytosis-associated osteoporosis are supposed to be identical in RA, possibly though a direct effect of histamine on osteoclasts [36].

Association between MCs and inflammatory arthritis can lead to new considerations in inflammatory arthritis therapy. Recently, Bader-Meunier et al. reported the association between mastocytosis and spondyloarthritis in a series of 31 patients. They conclude that mastocytosis was associated with a higher prevalence of SpA and that TNF inhibitors were well tolerated in these patients [37]. On the other hand, inhibiting the c-kit receptor by imatinib decreased MC numbers in rheumatoid synovium extracted from patients [38], whereas sulfasalazine, a drug used to treat peripheral SpA, was proven to have an effect on MCs [28]. In our case, antihistamine and symptomatic treatment were sufficient to manage arthritis progression while controlling MCs activity.

Conclusion

Patients with mastocytosis should be closely monitored for rheumatoid arthritis or other autoimmune diseases. One

should also consider that cases of mastocytosis-associated autoimmune disease are underestimated since signs and symptoms of mastocytosis are unspecific and overlap with many other diseases; correct diagnosis may be difficult and is often made later than first symptoms [4].

This case report and the literature provide data in favor of a possible development of autoimmune disease secondary to mastocytosis. Therapeutic management of these patients should take into account both mastocytosis and inflammatory arthritis.

Acknowledgments Study design was performed by ICV and DM; study conduct, IL and MK; data collection, ICV and DL; drafting the manuscript, IL, MK, JH, and DM; revising the manuscript content, MK, DL, PN, JYJ, ICV, and DM; approving the final version of the manuscript, IL, MK, JH, DL, PN, JYJ, ICV, and DM; DM and ICV takes responsibility for the integrity of the data analysis.

Compliance with ethical standards

Disclosures None.

References

1. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. (2010) 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 69:1580–1588. doi:10.1136/ard.2010.138461
2. Theoharides TC, Valent P, Akin C (2015) Mast cells, mastocytosis, and related disorders. *N Engl J Med* 373:163–172. doi:10.1056/NEJMr1409760
3. Cruse G, Metcalfe DD, Olivera A (2014) Functional deregulation of KIT: link to mast cell proliferative diseases and other neoplasms. *Immunol Allergy Clin N Am* 34:219–237. doi:10.1016/j.iac.2014.01.002
4. Magliacane D, Parente R, Triggiani M (2014) Current concepts on diagnosis and treatment of mastocytosis. *Transl Med UniSa* 8:65–74
5. Golkar L, Bernhard JD (1997) Mastocytosis. *Lancet* 349:1379–1385. doi:10.1016/S0140-6736(96)07056-0
6. DeBruin EJ, Gold M, Lo BC, et al. (2015) Mast cells in human health and disease. *Methods Mol Biol* 1220:93–119. doi:10.1007/978-1-4939-1568-2_7
7. Moon TC, St Laurent CD, Morris KE, et al. (2010) Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. *Mucosal Immunol* 3:111–128. doi:10.1038/mi.2009.136
8. Gurish MF, Boyce JA (2006) Mast cells: ontogeny, homing, and recruitment of a unique innate effector cell. *J Allergy Clin Immunol* 117:1285–1291. doi:10.1016/j.jaci.2006.04.017
9. Kalesnikoff J, Galli SJ (2008) New developments in mast cell biology. *Nat Immunol* 9:1215–1223. doi:10.1038/ni.f216
10. Urb M, Sheppard DC (2012) The role of mast cells in the defence against pathogens. *PLoS Pathog* 8:e1002619. doi:10.1371/journal.ppat.1002619
11. Abraham SN, St John AL (2010) Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol* 10:440–452. doi:10.1038/nri2782
12. Galli SJ, Tsai M (2012) IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med* 18:693–704. doi:10.1038/nm.2755
13. Cruse G, Bradding P (2015) Mast cells in airway diseases and interstitial lung disease. *Eur J Pharmacol*. doi:10.1016/j.ejphar.2015.04.046
14. Barete S, Assous N, de Gennes C, et al. (2010) Systemic mastocytosis and bone involvement in a cohort of 75 patients. *Ann Rheum Dis* 69:1838–1841. doi:10.1136/ard.2009.124511
15. Biosse-Duplan M, Baroukh B, Dy M, et al. (2009) Histamine promotes osteoclastogenesis through the differential expression of histamine receptors on osteoclasts and osteoblasts. *Am J Pathol* 174:1426–1434. doi:10.2353/ajpath.2009.080871
16. Rossini M, Zanotti R, Viapiana O, et al. (2014) Zoledronic acid in osteoporosis secondary to mastocytosis. *Am J Med* 127:1127.e1–1127.e4. doi:10.1016/j.amjmed.2014.06.015
17. Guillaume N, Desoutter J, Chandresis O, et al. (2013) Bone complications of mastocytosis: a link between clinical and biological characteristics. *Am J Med* 126:75.e1–75.e7. doi:10.1016/j.amjmed.2012.07.018
18. Laroche M, Livideanu C, Paul C, Cantagrel A (2011) Interferon alpha and pamidronate in osteoporosis with fracture secondary to mastocytosis. *Am J Med* 124:776–778. doi:10.1016/j.amjmed.2011.02.038
19. Marshall A, Kavanagh RT, Crisp AJ (1997) The effect of pamidronate on lumbar spine bone density and pain in osteoporosis secondary to systemic mastocytosis. *Br J Rheumatol* 36:393–396
20. Brumsen C, Hamdy NAT, Papapoulos SE (2002) Osteoporosis and bone marrow mastocytosis: dissociation of skeletal responses and mast cell activity during long-term bisphosphonate therapy. *J Bone Miner Res* 17:567–569. doi:10.1359/jbmr.2002.17.4.567
21. Lim AYN, Ostor AJK, Love S, Crisp AJ (2005) Systemic mastocytosis: a rare cause of osteoporosis and its response to bisphosphonate treatment. *Ann Rheum Dis* 64:965–966. doi:10.1136/ard.2004.029116
22. Kay J, Upchurch KS (2012) ACR/EULAR 2010 rheumatoid arthritis classification criteria. *Rheumatology* 51(Suppl 6):vi5–vi9. doi:10.1093/rheumatology/kes279
23. Gotis-Graham I, McNeil HP (1997) Mast cell responses in rheumatoid synovium. Association of the MCTC subset with matrix turnover and clinical progression. *Arthritis Rheum* 40:479–489
24. McNeil HP, Gotis-Graham I (2000) Human mast cell subsets—distinct functions in inflammation? *Inflamm Res* 49:3–7
25. Olsson N, Ulfgren AK, Nilsson G (2001) Demonstration of mast cell chemotactic activity in synovial fluid from rheumatoid patients. *Ann Rheum Dis* 60:187–193. doi:10.1136/ard.60.3.187
26. Buckley MG, Walters C, Wong WM, et al. (1997) Mast cell activation in arthritis: detection of alpha- and beta-tryptase, histamine and eosinophil cationic protein in synovial fluid. *Clin Sci* 93:363–370
27. Hueber AJ, Asquith DL, Miller AM, et al. (2010) Mast cells express IL-17 A in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol* 184:3336–3340. doi:10.4049/jimmunol.0903566
28. Noordenbos T, Yermenko N, Gofita I, et al. (2012) Interleukin-17-positive mast cells contribute to synovial inflammation in spondylarthritis. *Arthritis Rheum* 64:99–109. doi:10.1002/art.33396
29. Moulin D, Donzé O, Talabot-Ayer D, et al. (2007) Interleukin (IL)-33 induces the release of pro-inflammatory mediators by mast cells. *Cytokine* 40:216–225. doi:10.1016/j.cyto.2007.09.013
30. Suurmond J, Rivellese F, Dorjée AL, et al. (2014) Toll-like receptor triggering augments activation of human mast cells by anti-citrullinated protein antibodies. *Ann Rheum Dis*. doi:10.1136/annrheumdis-2014-205562
31. Suurmond J, van Heemst J, van Heiningen J, et al. (2013) Communication between human mast cells and CD4(+) T cells through antigen-dependent interactions. *Eur J Immunol* 43:1758–1768. doi:10.1002/eji.201243058
32. Nakae S, Suto H, Kakurai M, et al. (2005) Mast cells enhance T cell activation: importance of mast cell-derived TNF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:6467–6472. doi:10.1073/pnas.0501912102

33. Baram D, Vaday GG, Salamon P, et al. (2001) Human mast cells release metalloproteinase-9 on contact with activated T cells: juxtacrine regulation by TNF- α . *J Immunol* 167:4008–4016
34. Suurmond J, van der Velden D, Kuiper J, et al. (2015) Mast cells in rheumatic disease. *Eur J Pharmacol*. doi:10.1016/j.ejphar.2015.03.085
35. Magarinos NJ, Bryant KJ, Fosang AJ, et al. (2013) Mast cell-restricted, tetramer-forming tryptases induce aggrecanolytic activity in articular cartilage by activating matrix metalloproteinase-3 and -13 zymogens. *J Immunol* 191:1404–1412. doi:10.4049/jimmunol.1300856
36. Seitz S, Barvencik F, Koehne T, et al. (2013) Increased osteoblast and osteoclast indices in individuals with systemic mastocytosis. *Osteoporos Int* 24:2325–2334. doi:10.1007/s00198-013-2305-x
37. Bader-Meunier B, Livideanu CB, Larroche C, et al. (2014) Association of mastocytosis with inflammatory joint diseases: a series of 31 patients. *Semin Arthritis Rheum* 44:362–365. doi:10.1016/j.semarthrit.2014.05.016
38. Eklund KK (2007) Mast cells in the pathogenesis of rheumatic diseases and as potential targets for anti-rheumatic therapy. *Immunol Rev* 217:38–52. doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00504.x

Publication

TREM-1 Inhibition Restores Impaired Autophagy Activity and Reduces Colitis in Mice.

TREM-1 inhibition restores impaired autophagy activity and reduces colitis in mice

Short title: TREM-1 inhibition, autophagy and colitis

Tunay Kökten,^a Sébastien Gibot,^{b,c} Patricia Lepage,^d Silvia D'Alessio,^e Julie Hablot,^f Ndeye-Coumba Ndiaye,^a Hélène Busby-Venner,^g Céline Monot,^d Benjamin Garnier,^h David Moulin,^f Jean-Yves Jouzeau,^f Franck Hansmannel,^a Silvio Danese,^e Jean-Louis Guéant,^a Sylviane Muller,^h Laurent Peyrin-Biroulet^{a,i}

^a INSERM U954, Faculté de Médecine, Nutrition Génétique et exposition aux risques environnementaux (NGERE), Université de Lorraine, F-54505 Vandœuvre-Lès-Nancy cedex, France.

^b INSERM U1116, Faculté de Médecine, Université de Lorraine, F-54505 Vandœuvre-Lès-Nancy cedex, France.

^c Service de Réanimation Médicale, Hôpital Central, F-54035 Nancy, France.

^d Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, F-78350 Jouy-en-Josas, France.

^e Department of Gastrointestinal Immunopathology, Humanitas Clinical and Research Center and Department of Medical Biotechnologies and Translational Medicine, University of Milan, Milan, Italy.

^f CNRS UMR 7365, Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA), Université de Lorraine, Biopôle de l'Université de Lorraine, F-54505 Vandœuvre-Lès-Nancy cedex, France.

^g Département d'anatomie et cytologie pathologiques, Centre Hospitalier Universitaire Nancy-Brabois, F-54511 Vandœuvre-Lès-Nancy cedex, France.

^h CNRS UPR3572, Immunopathologie et chimie thérapeutique/Laboratory of excellence Medalis ; Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, F-67084 Strasbourg, France.

ⁱ Département d'Hépatogastroentérologie, Centre Hospitalier Universitaire Nancy-Brabois, F-54511 Vandœuvre-Lès-Nancy cedex, France.

Correspondence to

Prof. Laurent Peyrin-Biroulet, MD, PhD

INSERM U954-NGERE

Bâtiment C, 2ème étage,

9 Avenue de la Forêt de Haye

BP 50184

F-54505 Vandœuvre-Lès-Nancy

France

Phone: +33 372 746 126

Fax +33 383 153 633

Email: peyrinbiroulet@gmail.com

Abstract

Background and aims: Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 [TREM-1] is known to amplify inflammation in several diseases. Autophagy and endoplasmic reticulum [ER] stress, which activates the unfolded protein response [UPR] are closely linked and defects in these pathways contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease [IBD]. Both autophagy and UPR are deeply involved in host-microbiota interactions for the clearance of intracellular pathogens thus contributing to dysbiosis. We investigated whether inhibition of TREM-1 would prevent aberrant inflammation by modulating autophagy, ER stress and preventing dysbiosis.

Methods: Experimental mouse model of colitis was caused by dextran sulfate sodium treatment. TREM-1 was inhibited, either pharmacologically by LR12 peptide or genetically with *Trem-1* knock-out [KO] mice. Colon tissues and fecal pellets of control and colitic mice were used. Levels of macroautophagy, chaperone-mediated autophagy [CMA], and UPR proteins were evaluated by western blotting. The composition of the intestinal microbiota was assessed by *MiSeq* sequencing in both LR12-treated and KO animals.

Results: We confirmed that inhibition of TREM-1 attenuates the severity of colitis at clinically, endoscopically and histologically levels. We observed an increase in macroautophagy [ATG1/ULK-1, ATG13, ATG5, ATG16L1, and MAP1LC3-I/II] and in CMA [HSPA8 and HSP90AA1] while there was a decrease in the UPR [PERK, IRE-1 α and ATF-6 α] protein expression levels in TREM-1 inhibited colitic mice. TREM-1 inhibition prevented dysbiosis.

Conclusions: TREM-1 may represent a novel drug target for the treatment of IBD by modulating autophagy activity and ER stress.

Keywords

TREM-1, autophagy, inflammation, endoplasmic reticulum stress, endoscopy, inflammatory bowel disease, innovative therapy, dysbiosis, LR12 peptide, peptide-based therapy, animal models of IBD.

1. Introduction

Inflammatory bowel disease [IBD] is a chronic, remitting-relapsing inflammatory disorder that encompasses ulcerative colitis [UC] and Crohn's disease [CD].^{1,2}

Autophagy [a typical example of a genetically mediated pathway] is abnormal in IBD.³⁻⁵ There are three major autophagy pathways [microautophagy, macroautophagy and chaperone-mediated autophagy [CMA]] that differ for their mode of cargo delivery to the lysosome.⁶ Autophagy and endoplasmic reticulum [ER] stress are closely linked in the pathogenesis of IBD.⁷⁻¹⁰ ER stress is caused by the accumulation of unfolded and/or misfolded proteins in the ER arising from either primary [genetic] or secondary [environmental] factors.^{11,12} The ER stress activates the unfolded protein response [UPR] to resolve the protein folding defect and to restore cellular homeostasis. The UPR is a major inducer of autophagy to compensate the ER stress in the intestinal epithelium.^{9,13} Impaired autophagy can also promote ER stress with its downstream consequences.¹⁴ Both autophagy and UPR play important roles in intestinal homeostasis, particularly for host-microbiota interactions at the epithelial surface of the intestine in the context of IBD.^{10,15-18} During infection, microbe-associated molecular patterns [MAMPs] are detected by a family of proteins called pattern recognition receptors [PRRs] located within host cells. PRRs involved in autophagy include the Nod-like receptors [NLRs] and Toll-like receptors [TLRs].¹⁹ NLRs and TLRs in macrophages as well as other innate immune cells are closely associated with autophagy, which is highly related to the mediation of innate immune response in the context of IBD.^{20,21} The bacterial microbiota in IBD has been extensively investigated, and several groups have observed bacterial dysbiosis characterized primarily by low levels of biodiversity.²²⁻²⁴ Defects in autophagy affects several aspects of the intestinal innate and acquired inflammatory responses [including abnormalities in antigen presentation, cytokine production and bacterial clearance] that may skew the commensal composition and lead to colitis-inducing dysbiosis.^{25,26}

The triggering receptor expressed on myeloid cells [TREM] family of cell-surface receptors has recently emerged as a potential modulator of the inflammatory response.²⁷ One of the components of this family, TREM-1 is constitutively expressed on most monocytes/macrophages and neutrophils, and is upregulated by a variety of stimuli, including TLR ligands [e.g. lipopolysaccharide [LPS]], lipoteichoic acid [LTA] and pro-inflammatory cytokines [e.g. tumor necrosis factor- α [TNF α]]. TREM-1's one or more natural specific ligands have not yet been identified.²⁸⁻³⁰ Several studies have showed that TREM-1 expression is upregulated during acute inflammation or in chronic intestinal inflammatory disorders.^{28,31-36} Although TREM-1 is generally not expressed by macrophages in the healthy intestine, it is significantly upregulated in mucosal lesions in mouse models of colitis and in patients with IBD.³⁴ Previous studies have shown that TLRs activation leads to upregulation of TREM-1 expression in a myeloid differentiation factor 88 [MyD88]-dependent manner.^{37,38}

TREM-1 has also a synergistic effect on the production of pro-inflammatory mediators induced by nucleotide-binding oligomerization domain-1 and 2 [NOD1 and NOD2] ligands.^{39,40} The potential impact of TREM-1 on autophagy activity is unknown.

The potential link between TREM-1 expression, autophagy activity, ER stress/UPR and intestinal dysbiosis in IBD has never been investigated. In the present study, we first confirmed that TREM-1 inhibition [using the non-IBD related LR12 peptide] attenuated the severity of experimental colitis. We found that inhibition of TREM-1 restores impaired autophagy, reduced ER stress/UPR and re-establishes homeostasis of the gut microbiota.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

2.1.1. *In vivo* experiments were performed as recommended by the US National Committee on Ethics Reflection Experiment [described in the Guide for Care and Use of Laboratory Animals, NIH, MD, 1985]. The experiments were performed on 25 adult male C57BL/6 mice [Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France] and 10 adult male *Trem-1* knock-out [TREM-1 KO] C57BL/6 mice [INSERM U1116, Inotrem Laboratory, Nancy, France], all aged between 7 and 9 weeks. The animals were housed at 22–23°C, with a 12h/12h light/dark cycle, and *ad libitum* access to food and water.

2.1.2. In the TREM-1 inhibition experiments with administration of LR12 peptide, three groups of C57BL/6 mice were constituted: [i] healthy mice without LR12 peptide [DSS(-)/LR12(-); n=5]; [ii] mice treated with DSS without LR12 peptide [DSS(+)/LR12(-); n=5] and [iii] mice treated with DSS and LR12 peptide [DSS(+)/LR12(+); n=5].

2.1.3. In the experiments involving *Trem-1* KO mice, four groups of animals were constituted: [i] littermate C57BL/6 wild-type mice without DSS [DSS(-)/WT; n=5]; [ii] *Trem-1* KO mice without DSS [DSS(-)/TREM-1 KO; n=5]; [iii] littermate C57BL/6 wild-type mice treated with DSS [DSS(+)/WT; n=5] and [iv] *Trem-1* KO mice treated with DSS [DSS(+)/TREM-1 KO; n=5].

2.2. Induction of colitis, treatment with TREM-1 inhibitory peptide and assessment of disease activity index

2.2.1. Colitis was induced by administration of 3% dextran sulfate sodium [DSS, molecular weight 36,000–50,000, MP Biomedical, Strasbourg, France] dissolved in water for 5 days. DSS was replaced thereafter by normal drinking water for another 5 days.

2.2.2. TREM-1 inhibitory peptide or the vehicle alone, used as control, were administered intraperitoneally 2 days before colitis induction and then once daily until the last day of DSS administration [see experimental layout in Figure 1A], at a concentration of 10 mg/kg in 200 μ L of saline. This dose was chosen after having performed dose-response experiments [supplementary Figure S1]. The LR12 peptide corresponds to a 12-amino-acid [aa] residues-long sequence from TLT-1's extracellular domain [LQEEDTGEYGCV], and was chemically

synthesized [Pepscan Presto BV, Lelystad, The Netherlands] as a C-terminally amidated peptide.

2.2.3. Bodyweight, physical condition, stool consistency, water/food consumption and the presence of gross and occult blood in excreta and at the anus were determined daily. The DAI was also calculated daily by scoring bodyweight loss, stool consistency and blood in the stool on a 0 to 4 scale.⁴¹ The overall index corresponded to the weight loss, stool consistency and rectal bleeding scores divided by three, and thus ranged from 0 to 4.

2.3. Collection of colon tissue and fecal samples

Ten days after the initiation of colitis with DSS, the mice were sacrificed by decapitation. The colon was quickly removed, opened along its length and gently washed in PBS [2.7 mmol/L KCl, 140 mmol/L NaCl, 6.8 mmol/L Na₂HPO₄·2H₂O, 1.5 mmol/L KH₂PO₄, pH 7.4]. For histological assessment samples were fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde solution and embedded in paraffin. For protein extractions samples were frozen in liquid nitrogen [-196°C] and stored at -80°C. For the gut microbiota analysis, whole fecal pellets were collected daily in sterile tubes and immediately frozen at -80°C until analysis.

2.4. Histological assessment and scoring

Colitis was histologically assessed on 5 µm sections stained with hematoxylin-eosin-saffron [HES] stain. The histological colitis score was calculated blindly by an expert pathologist [Dr. Hélène Busby-Venner], as previously described.⁴²

2.5. Endoscopic assessment and scoring

Endoscopy was performed on the last day of the study, just before the mice were sacrificed [Figures 1A and 3A]. Prior to the endoscopic procedure, mice were anaesthetized by isoflurane inhalation. The distal colon [3 cm] and the rectum were examined using a rigid Storz Hopkins II miniendoscope [length: 30 cm; diameter: 2 mm; Storz, Tuttlingen, Germany] coupled to a basic Coloview system [with a xenon 175 light source and an Endovision SLB Telecam; Storz]. Air was insufflated via a 9-French gauge over-tube and a custom, low-pressure pump with manual flow regulation [Rena Air 200; Rena, Meythet, France]. All images were displayed on a computer monitor and recorded with video capture software [Studio Movie Board Plus from Pinnacle, Menlo Park, CA]. The endoscopy score was calculated from three subscores: the vascular pattern [scored from 1 to 3], bleeding [scored from 1 to 4] and erosions/ulcers [scored from 1 to 4] as previously described.⁴³

2.6. Western blot analysis

Total protein was extracted from the frozen colon samples by lysing homogenized tissue in a radioimmunoprecipitation assay [RIPA] buffer [0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate [SDS] and 1% NP-40] supplemented with protease inhibitors [Roche Diagnostics, Mannheim, Germany]. Protein was then quantified using the bicinchoninic acid assay method.

For each mouse, a total of 20 µg of protein was transferred to a 0.45 µm polyvinylidene fluoride [PVDF] or 0.45 µm nitrocellulose membrane following electrophoretic separation on

a denaturing acrylamide gel. The membrane was blocked with 5% w/v non-fat powdered milk or 5% w/v bovine serum albumin [BSA] diluted in Tris-buffered saline with 0.1% v/v Tween[®] 20 [TBST] for 1h at room temperature. The PVDF or nitrocellulose membranes were then incubated overnight at 4°C with various primary antibodies diluted in either 5% w/v non-fat powdered milk or 5% w/v BSA, TBST [supplementary Figure S2]. After washing in TBST, the appropriate HRP-conjugated secondary antibody was added and the membrane was incubated for 1h at room temperature [supplementary Figure S2]. After further washing in TBST, the proteins were detected using an ECL or ECL PLUS kit [Amersham, Velizy-Villacoublay, France]. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [GAPDH] was used as an internal reference control.

2.7. Enzyme-linked immunosorbent assay [ELISA] for analysis of soluble TREM-1 [sTREM-1]

At the time of animal sacrifice, whole blood from each mouse was collected into heparinized tubes. These tubes were centrifuged at 3,000 g for 10 min at 4°C to collect the supernatants, which were stored at -80°C until use. Plasma concentration of sTREM-1 was determined by a sandwich ELISA technique using the Quantikine kit assay [RnD Systems, Minneapolis, MN, USA] according to the manufacturers' instructions. Briefly, samples were incubated with a monoclonal antibody specific for TREM-1 pre-coated onto the wells of a microplate. Following a wash, to eliminate the unbound substances, an enzyme-linked polyclonal antibody specific for TREM-1 was added to the wells. After washing away the unbound conjugate, a substrate solution was added to the wells. Colour development was stopped and optical density of each well was determined within 30 min using a microplate reader [Sunrise, Tecan, Männedorf, Switzerland] set to 450 nm, with a wavelength correction set to 540 nm. All measurements were performed in duplicate and the sTREM-1 concentration was expressed in pg/ml.

2.8. Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction

Total RNA was purified from the frozen colon samples with the RNeasy Lipid Tissue kit following the recommendation of Qiagen [Courtaboeuf, France], which includes treatment with DNase. To check for possible DNA contamination of the RNA samples, reactions were also performed in the absence of Omniscript RT enzyme [Qiagen]. Reverse transcription was performed using PrimeScript[™] RT Master Mix [TAKARA Bio, USA] according to the manufacturer's recommendations with 200 ng of RNA in a 10 µL reaction volume. PCR was then carried out from 2 µL of cDNA with SYBR[®] Premix Ex Taq[™] [Tli RNaseH Plus] [TAKARA Bio, USA] according to the manufacturer's recommendations in a 20 µL reaction volume, with reverse and forward primers at a concentration of 0.2 µM. Specific amplifications were performed using the following primers: TREM-1, forward 5'-CTGTGCGTGTTCCTTTGTC-3' and reverse 5'-CTTCCCGTCTGGTAGTCT-3'. Quantification was performed with RNA polymerase II [Pol II] as an internal standard with the following primers: forward 5'-AGCAAGCGGTTCCAGAGAAG-3' and reverse 5'-TCCCGAACAACACTGACATATCTCA-3'. Temperature cycling for TREM-1 was 30 s at 95°C followed by 40 cycles consisting of 95°C for 5 s and 59°C for 30 s. Temperature cycling for

RNA polymerase II was 30 s at 95°C followed by 40 cycles consisting of 95°C for 5 s and 60°C for 30 s. Results were expressed as arbitrary units by calculating the ratio of crossing points of amplification curves of TREM-1 and internal standard by using the $\delta\delta C_t$ method.

2.9. Microbiota analysis

2.9.1 For the pharmacologically [with LR12 peptide treatment] inhibition of TREM-1, total DNA was extracted from three pooled fecal pellets from each group of mice [day 0 to day 10; n=33 samples], in accordance with a previously validated protocol.⁴⁴ For microbiota analysis by MiSeq sequencing, the V3-V4 region [519F-785R] of the 16S rRNA gene was amplified with the primer pair S-DBact-0341-b-S-17/S-D-Bact-0785-a-A-21.⁴⁵ The following quality filters were applied: minimum length=300 base pairs [bp], maximum length=600bp and minimum quality threshold=20. This filtering yielded an average [range] of 25600 reads/samples [14,553-35,490] for further analysis. High-quality reads were pooled, checked for chimeras [using uchime⁴⁶], and grouped into operational taxonomic units [OTUs] [based on a 97% similarity threshold] using USEARCH 8.0.⁴⁷ Singletons and OTUs representing less than 0.02% of the total number of reads were removed, and the phylogenetic affiliation of each OTU was assessed with Ribosomal Database Project's taxonomy⁴⁸ from the phylum level to the species level. The mean [range] number of detected OTUs per sample was 324 [170-404].

2.9.2. In the experiments involving *Trem-1* KO mice, similar methods were applied but total DNA was extracted from individual fecal pellets of each mouse from the four groups of animals at baseline [before DSS treatment] and at day 10 [after DSS treatment] [n=37 samples]. Following MiSeq sequencing of the V3-V4 region of the 16S rRNA gene, yielding 2,143,457 raw reads, quality filtering was applied [minimum length=200bp, maximum length=600bp and minimum quality threshold=20] and an average [range] of 11,560 reads/samples [7,560-18,495] was kept for further analysis. The mean [range] number of detected OTUs per sample was 599 [131-798].

DNA sequence reads from this study have been submitted to the NCBI under the Bioproject ID PRJNXXXXX and are available from the Sequence Read Archive [Biosamples accession numbers SAMXXXXXXX-SAMXXXXXXX].

2.10. Statistical analysis

A two-tailed Student *t* test was used to compare two groups and a one-way analysis of variance [ANOVA] was used to compare three or more groups. Bonferroni or Tamhane *post hoc* tests were applied, depending on the homogeneity of the variance. The threshold for statistical significance was set to $p < 0.05$. The statistical language R was used for data visualization and to perform abundance-based principal component analysis [PCA] and inter-class PCA associated with Monte-Carlo rank testing on the bacterial genera.

3. Results

3.1. Inhibition of TREM-1 by LR12 peptide prevents colonic inflammation in experimental colitis.

Previous studies using a 17-aa residues long TREM-1 antagonistic peptide [LP17] have shown that inhibition of TREM-1 decreases inflammation in DSS-induced experimental colitis.^{34,35} Here, as TREM-1 antagonist we used a shorter, potentially less antigenic peptide [LR12] with five aa residues deleted at the C-terminal. DSS-induced colitic mice were treated either LR12 peptide or vehicle [referred to respectively as DSS(+)/LR12(+) and DSS(+)/LR12(-) treatments] and 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid [TNBS]-induced colitic mice were treated either LR12 peptide or scrambled [Sc] LR12 peptide [referred to respectively as DSS(+) // LR12(+) and DSS(+) // ScLR12(+) treatments] [Figure 1 and supplementary Figure S3, respectively]. Peptide treatments starting from 2 days before and until the end of the DSS administration [Figure 1A] or until day 3 after TNBS administration at day 0 [supplementary Figure S3A]. LR12 peptide significantly attenuated the expression of TREM-1 *in vivo* [supplementary Figure S4]. We first confirmed that TREM-1 inhibition can indeed reduce intestinal inflammation after the onset of colitis.

Results showed that during the course of colitis the percentage of bodyweight loss [a typical sign of acute disease] was significantly reduced in DSS(+)/LR12(+) mice than in DSS(+)/LR12(-) animals [up to ~12% and ~30% of the initial bodyweight, respectively; $p=0.001$] [Figure 1B]. The disease activity index [DAI], that remained null for the DSS(-)/LR12(-) healthy group, was remarkably lower in DSS(+)/LR12(+) mice in comparison with the DSS(+)/LR12(-) group [$p<0.001$] [Figure 1C]. Similar protective effect of LR12 peptide on the clinical course of colitis was observed in TNBS-induced acute colitis [supplementary Figure S3B and C]. At the end of the protocol at day 10, we performed colonoscopy in all the experimental groups. While the DSS(-)/LR12(-) healthy group revealed a normal vascular pattern with clearly defined capillary trees and the absence of bleeding, erosions or ulcers, the DSS(+)/LR12(-) group presented a completely obliterated vascular network, with visible blood in the lumen, and fibrin-covered ulcers which resulted in a significantly increased endoscopical score [$p<0.001$] [Figure 1D]. In contrast, the colon of DSS(+)/LR12(+) mice closely resembled that of healthy animals, with a regular vascular pattern, a translucent mucosa and no signs of ulcerations or liquid blood [Figure 1D], thus leading to a reduced endoscopical score when compared to the DSS(+)/LR12(-) group [$p<0.001$]. Similar beneficial effect exerted by LR12 peptide was observed at the histological level. In fact, histopathological analysis of colon biopsies collected at day 10 revealed marked damage to the crypt architecture, with inflammatory cell infiltration, severe ulceration, and a loss of mucosal secretion in DSS(+)/LR12(-) mice [Figure 1E]. The mean percentages of tissue occupied by different inflammatory cell subtypes was calculated for each group. The colon of

DSS(+)/LR12(-) mice revealed a higher inflammatory infiltrate with 13% of polymorphonuclear neutrophils [PMNs], 15% of macrophages, 70% of lymphocytes, 2% of plasmocytes and 0% of mastocytes, when compared with DSS(-)/LR12(-) healthy group which presented 5% of PMNs, 8% of macrophages, 78% of lymphocytes, 8% of plasmocytes and 1% of mastocytes. Treatment with LR12 peptide was associated with significantly less mucosal damage, as assessed by the histological scores [$p<0.001$] [Figure 1E], and a decrease in inflammatory infiltrate that represented by 8% of PMNs, 7% of macrophages, 79% of lymphocytes, 5% of plasmocytes and 1% of mastocytes. Notably, colonic expression levels of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β and IL-6 that are known to be increased in this acute model of colitis,⁴⁹ were significantly reduced in the DSS(+)/LR12(+) group [$p<0.001$ for TNF- α and IL-6 and $p=0.022$ for IL-1 β], when compared with DSS(+)/LR12(-) animals, as shown by western blot analysis [Figure 1F]. Overall, these results indicate that *in vivo* TREM-1 inhibition by LR12 peptide attenuates inflammation and tissue damage in acute colitis.

3.2. Inhibition of TREM-1 by LR12 peptide restores impaired autophagy activity during experimental colitis.

The relationship between TREM-1 and autophagy has never been characterized. To examine whether and how inhibition of TREM-1 by LR12 peptide regulates autophagy pathways during the acute phase of experimental colitis, we analyzed by western blot analysis the colonic expression of various macroautophagy and CMA proteins at day 10 [Figure 2A and B]. The expression of mTOR, known to be a negative regulator of autophagy,⁵⁰ was remarkably high in the DSS(+)/LR12(-) group, relative to healthy DSS(-)/LR12(-) mice. LR12 peptide treatment was found to significantly reduce the expression of mTOR as assessed by densitometric quantification [$p<0.001$] [Figure 2A]. This finding suggests that TREM-1 may regulate autophagy activity during DSS-induced colitis *via* mTOR signaling. With regard to macroautophagy, the expression of proteins like ATG1/ULK-1 and ATG13, involved in the initiation of autophagosome formation,⁵¹ and ATG5, ATG16L1 and MAP1LC3-I/II, involved in the membrane elongation and expansion of the forming autophagosome,⁵² was significantly reduced in the DSS(+)/LR12(-) mice when compared with the healthy DSS(-)/LR12(-) group [Figure 2A]. Interestingly, treatment of colitic mice with LR12 peptide was able to rescue in a significantly manner the expression of these proteins at basal levels [Figure 2A; $p\leq 0.017$ for the DSS(+)/LR12(+) group versus DSS(+)/LR12(-) animals] suggesting that in terms of macroautophagy, TREM-1 is involved in early and later phases of autophagosome formation under inflammatory conditions. Conversion from MAP1LC3-I to MAP1LC3-II status, judged by the MAP1LC3-II/MAP1LC3-I ratio, has been extensively used as a marker of macroautophagy activation.^{53,54} We observed that, the MAP1LC3-II/MAP1LC3-I ratio was significantly higher in DSS(+)/LR12(+) mice than in the DSS(+)/LR12(-) group [$p=0.017$], confirming that TREM-1 controls macroautophagy activation during experimental colitis [Figure 2A].

With regard to CMA, we observed reduced expression levels of HSPA8 protein, involved in the substrate targeting and the regulation of the dynamics of the CMA translocation

complex,⁵⁵ in the colon of DSS(+)/LR12(-) mice versus DSS(-)/LR12(-) animals. However, inhibition of TREM-1 by LR12 peptide was able to increase the amount of HSPA8 protein at basal levels, similar to those observed in healthy animals [Figure 2B]. The expression levels of HSP90AA1, another protein involved in CMA and which is in coordination with HSPA8,⁵⁵ were comparable in the DSS(-)/LR12(-) and DSS(+)/LR12(-) groups. In contrast, the amount of this protein was remarkably higher in DSS(+)/LR12(+) mice [$p<0.001$], suggesting that TREM-1 plays a role in the modulation of CMA activation during DSS-induced experimental colitis [Figure 2B]. Altogether, these results suggest that [i] both macroautophagy and CMA are impaired in experimental colitis and [ii] the inhibition of TREM-1 by treatment with LR12 peptide can restore the activity of these two forms of autophagy.

3.3. Inhibition of TREM-1 by LR12 peptide reduces endoplasmic reticulum [ER] stress and induces unfolded protein response [UPR] during experimental colitis.

Another signaling pathway that has also emerged in IBD pathophysiology is the UPR, which is induced by ER stress.^{11,56} The UPR and autophagy are directly intimately intertwined and are deeply involved in IBD pathogenesis.⁵⁷⁻⁵⁹ The relationship between the UPR, autophagy and TREM-1 is unknown. To examine whether and how inhibition of TREM-1 by LR12 peptide regulates the ER stress and induced UPR during the acute phase of experimental colitis, we analyzed by western blot analysis the colonic expression of the three ER stress sensor proteins [e.g. inositol-requiring transmembrane kinase endonuclease-1 α [IRE-1 α], protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase [PERK] and activating transcription factor-6 α [ATF-6 α]], that initiate the UPR, at day 10 [Figure 3A and B]. The expression of these three proteins sensors on the ER membrane [PERK, IRE-1 α , and ATF-6 α] and also their active forms [p-PERK and p-IRE-1 α] was remarkably high in the DSS(+)/LR12(-) group, relative to healthy DSS(-)/LR12(-) mice [Figure 3A] as assessed by densitometric quantification which show the activity of PERK and IRE-1 α judged by p-PERK/PERK and p-IRE-1 α /IRE-1 α ratios respectively, and an increase of ATF-6 α expression [Figure 3B]. Interestingly, treatment of colitic mice with LR12 peptide was able to statistically reduce the expression of these proteins [p-PERK, PERK, p-IRE-1 α , IRE-1 α , and ATF-6 α] and their activity [p-PERK/PERK and p-IRE-1 α /IRE-1 α ratios] at basal levels [Figure 3A and B; $p<0.001$ for the DSS(+)/LR12(+) group versus DSS(+)/LR12(-) animals]. Altogether, these results suggest that [i] the ER stress-induced UPR occurs in DSS-induced experimental colitis and activates PERK, IRE-1 α , and ATF-6 α and [ii] the inhibition of TREM-1 by treatment with LR12 peptide can reduce this ER stress and also induces UPR.

3.4. Genetically deletion of TREM-1 in mice prevents colonic inflammation in acute colitis.

To confirm the protective effect of TREM-1 inhibition, we studied DSS-induced colitis in littermates TREM-1 wild-type [WT] and knock-out [TREM-1 KO] mice [Figure 4A]. Results

showed that DSS(+)/TREM-1 KO mice are protected from colitis, when compared to DSS(+)/WT animals; this was observed both in terms of percentage of body weight loss [Figure 4B; up to ~30% for WT and ~12% for TREM-1 KO of the initial body weight, $p<0.001$], and DAI scores [Figure 4C; $p<0.001$]. Endoscopic analysis of the colon of WT and TREM-1 KO mice without DSS revealed a healthy mucosa with normal vascular pattern, and no visible blood in both groups, with no significant differences [Figure 4D, left panel]. On the contrary, upon DSS exposure, while WT mice showed an intricate vascular pattern, several ulcerations and mucosal damage, the endoscopic pattern of TREM-1 KO mice resulted more similar to that of healthy mice [Figure 4D, left panel]. The endoscopic scores reflected these observations; in fact, DSS-treated WT mice had a significantly increased score than colitic TREM-1 KO [$p=0.002$] [Figure 4D, right panel]. Histopathological analysis revealed damage to the crypt architecture, higher inflammatory cell infiltration [represented by 30% of PMNs, 27% of macrophages, 42% of lymphocytes, 1% of plasmocytes, and 0% of mastocytes], and severe ulceration in DSS(+)/WT mice. In contrast, DSS(+)/TREM-1 KO animals showed a significantly attenuated histological score, associated with reduced mucosal damage and lower immune cell infiltration [represented by 3% of PMNs, 8% of macrophages, 88% of lymphocytes, 1% of plasmocytes, and 0% of mastocytes] similar to that observed in both WT and TREM-1 KO healthy mice [Figure 4E]. Moreover, colitic TREM-1 KO mice displayed reduced expression levels of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , IL-1 β and IL-6, when compared to colitic WT mice, as demonstrated by western blot densitometric analyses [Figure 4F; $p=0.001$ for TNF- α and $p<0.001$ for IL-1 β and IL-6]. Overall, these findings confirmed what observed with the LR12 peptide treatment, thus further highlighting a key role of TREM-1 in acute phase of colitis and the therapeutic potential of TREM-1 inhibition in IBD.

3.5. TREM-1 deletion restores impaired autophagy activity during experimental colitis.

Western blot and densitometric analyses of the above-mentioned macroautophagy- and CMA-related proteins were performed in WT and TREM-1 KO mice, both under steady-state [no DSS] and inflammatory conditions [DSS administration]. mTOR expression was remarkably higher in DSS(+)/WT mice, in comparison with both healthy WT and TREM-1 KO mice. On the contrary, TREM-1 deletion displayed significantly reduced mTOR expression [$p<0.001$], when compared to colitic WT mice [Figure 5A], thus confirming what observed with LR12 peptide treatment. In terms of macroautophagy, while we found the expression levels of ATG1/ULK-1, ATG13, and MAP1LC3-I/II lower in DSS(+)/WT mice than in the two WT and TREM-1 KO healthy groups, the amount of these proteins was restored at the basal levels in DSS(+)/TREM-1 KO animals, thus resulting significantly higher in this group than in DSS(+)/WT mice [$p\leq 0.001$] [Figure 5A]. Moreover, as observed for the LR12 peptide treatment, the MAP1LC3-II/MAP1LC3-I ratio was significantly higher in the DSS(+)/TREM-1 KO animals than in the DSS(+)/WT mice [$p=0.001$], thus suggesting that TREM-1 controls macroautophagy activation in the acute phase of experimental colitis [Figure 5A].

With regard to CMA, expression levels of HSPA8 and HSP90AA1 proteins were lower in the DSS(-)/TREM-1 KO mice than in the DSS(-)/WT group. However, while expression of these two proteins were lower in the DSS(+)/WT mice than in either of the two control healthy groups, amount of both HSPA8 and HSP90AA1 was significantly increased in DSS(+)/TREM-1 KO animals than in the DSS(+)/WT group [Figure 5B; $p=0.014$ for HSPA8 and $p=0.04$ for HSP90AA1], suggesting that not only ligands binding to TREM-1 are necessary to control CMA activation in a setting of experimental colitis, but that TREM-1 *per se* is a key modulator of these processes.

3.6. Deletion of TREM-1 in mice reduces endoplasmic reticulum [ER] stress and induces unfolded protein response [UPR] in acute colitis.

Western blot and densitometric analyses of the above-mentioned ER stress and UPR sensors-related proteins were performed in WT and TREM-1 KO mice, both under steady-state [no DSS] and inflammatory conditions [DSS administration]. The expression of the three proteins sensors on the ER membrane [PERK, IRE-1 α , and ATF-6 α] and also their active forms [p-PERK and p-IRE-1 α] was remarkably higher in DSS(+)/WT mice, in comparison with both healthy WT and TREM-1 KO mice [Figure 6A] as assessed by densitometric quantification which show the activity of PERK and IRE-1 α judged by p-PERK/PERK and p-IRE-1 α /IRE-1 α ratios respectively, and an increase of ATF-6 α expression [Figure 6B]. On the contrary, TREM-1 deletion displayed a significantly reduced expression of these proteins [p-PERK, PERK, p-IRE-1 α , IRE-1 α , and ATF-6 α] and activity [p-PERK/PERK and p-IRE-1 α /IRE-1 α ratios] at basal levels [$p<0.001$], when compared to colitic WT mice [Figure 6A and B], thus confirming what was observed with LR12 peptide treatment [see above]. Moreover, as observed for the LR12 peptide treatment, the p-PERK/PERK and p-IRE-1 α /IRE-1 α ratios were significantly lower in the DSS(+)/TREM-1 KO animals than in the DSS(+)/WT mice [$p<0.001$], thus confirming that TREM-1 modulate the ER stress and induced UPR activation in the acute phase of experimental colitis [Figure 6A and B].

3.7. Inhibition of TREM-1, either pharmacologically by LR12 peptide or genetically in TREM-1 KO mice, prevents disease-related changes in intestinal microbiota during acute colitis.

Dysbiosis of the gut microbiota aggravates intestinal inflammation in IBD.⁶⁰ To investigate whether inhibition of TREM-1 by LR12 peptide could modulate this dysbiosis, we analyzed the operational taxonomic units [OTUs] richness and the taxonomic composition of the bacterial community in fecal pellets from three groups of mice: DSS(-)/LR12(-),

DSS(+)/LR12(-), and DSS(+)/LR12(+). Although DSS treatment was associated with low microbial richness at day 10 [Figure 7A], the richness in colitic mice receiving LR12 peptide [observed OTUs: 282] was closer to that found in the control group [observed OTUs: 335] [Figure 7A]. The DSS treatment had the greatest effect on the Bacteroidetes [Figure 7B], and was associated with low proportions of bacteria from the Porphyromonadaceae family [unclassified species and the genus *Barnesiella*] and the *Prevotella* genus. In contrast, DSS treatment was associated with elevated proportions of bacteria from the genera *Enterobacter*, *Bacteroides* and [to a lesser extent] *Lactobacillus* [Figure 7B]. LR12 peptide treatment was linked with relatively greater percentages of Lachnospiraceae [*Clostridium* XIVa and unclassified species] and more importantly, appeared to be able to counter the relative increase in the proportions of *Enterobacter*, *Bacteroides* and *Lactobacillus* genera. Similarly, in the genetically-deleted TREM-1 mouse model, gut microbial richness and diversity were less affected by DSS treatment than in WT animals [Figure 8A]. While DSS treatment was associated with increased proportions of bacteria from the *Escherichia/Shigella*, *Parabacteroides* and *Bacteroides* genera in WT mice, dysbiosis of these specific bacterial taxa was again countered in TREM-1 KO mice, together with an increased in relative abundance of unclassified Lachnospiraceae and *Barnesiella* [Figure 8B]. Moreover, gut microbiota overall composition from healthy TREM-1 KO mice significantly differed when compared to healthy WT mice [supplementary Figure S5A; Monte-Carlo $p=0.008$]. More specifically, 31 genera significantly differed between WT and TREM-1 KO groups, 12 being over-represented in KO mice [supplementary Figure S5B]. While *Bacteroides* was significantly more abundant in healthy TREM-1 KO mice, *Prevotella* and *Alistipes* were over-represented in healthy WT mice.

4. Discussion

There is a growing body of evidence suggesting that TREM-1 is involved in the pathogenesis of IBD.^{34–36} To the best of our knowledge, the current study is the first to have investigated the relationship between TREM-1, autophagy activity, ER stress and intestinal microbial dysbiosis in experimental colitis. Our data confirmed that inhibition of TREM-1 by an antagonistic peptide substantially attenuates inflammatory responses and counters disease exacerbation in experimental colitis, as observed in previous studies of a 17-aa residues long TREM-1 antagonistic peptide [LP17].^{34,35} In line with these previous studies, our results showed a decrease in inflammatory cell infiltration and IL-6 expression, suggesting that monocytes and macrophages were the main cells responsible for the reduced signs of inflammation in the colon of TREM-1 inhibited mice.^{34,35} Indeed, monocytes and macrophages represent the most important sources of IL-6 at inflammatory sites.⁶¹ Unlike previous reports we used a shorter, potentially less antigenic peptide [LR12] with five aa that were deleted at the C-terminal. TREM-1 belongs to the immunoglobulin superfamily and is part of a gene cluster encoding several TREMs and TREM-like molecules that share structural elements but have a low degree of amino acid homology.⁶² For example, the TREM gene cluster also includes TREM-like transcript-1 [TLT-1]. The latter is abundant but is specific

for the platelet and megakaryocyte lineage. Crystallographic studies have revealed structural similarities between TLT-1 and TREM-1, which suggests that the two proteins interact.⁶³ Indeed, it was recently shown that TLT-1 and a TLT-1-derived peptide [LR12] exhibit anti-inflammatory properties by dampening TREM-1 signaling, and thus behave as naturally occurring TREM-1 inhibitors. Here, based on several independent approaches [western blot analysis of colonic TREM-1 protein expression, ELISA analysis of secretion of sTREM-1 in plasma and quantitative RT-PCR of colonic TREM-1 mRNA expression], we demonstrated the effectiveness of the LR12 peptide in the inhibition of TREM-1 during experimental colitis. LR12's inhibition of TREM-1 signaling derives from the peptide's ability to bind to the TREM-1 ligand.⁶⁴ The same study also demonstrated that LR12 peptide modulates the inflammatory cascade triggered by infection *in vivo*, and thus inhibits hyper-responsiveness, organ damage, and death during experimental sepsis in mice.⁶⁴ However, blocking TREM-1 signaling by daily administration of TREM-1 antagonistic peptide in chronic disease models may fail to allow for the possibility that the as-yet unidentified TREM-1 ligand may signal through alternative receptors. Several potential ligands of TREM-1 have been investigated in various diseases,⁶⁵ but to our best knowledge there is no specific ligand of this receptor. To avoid this drawback and to confirm our results for LR12 peptide treatment, we performed the same experiments in *Trem-1* KO mice. Similar results were observed in the two different mouse models - thus emphasizing the LR12 peptide's therapeutic potential in IBD.

Autophagy plays a compensatory role to the UPR to reduce ER stress induced in the pathogenesis of IBD.^{10,17,18} Defects in autophagy [due to autophagy gene mutations and/or microbial antagonism] may trigger the pathogenesis of IBD, impair the antibacterial response and thus weaken the host's ability to control bacterial infection and chronic inflammation.^{3,66,67} In line with these data, our results show that macroautophagy and CMA are strongly impaired in experimental colitis. The observed increase in the expression of mTOR [a protein known to downregulate autophagy] in this setting suggests that the impairment in autophagy may be due to defective initiation. We noted a decrease in the expression levels of [i] macroautophagy proteins [such as ATG13 and ATG1/ULK-1] involved in the initiation of autophagosome formation, [ii] macroautophagy proteins [such as ATG16L1 and MAP1LC3-I/II] involved in membrane elongation and expansion of the forming autophagosome, and [iii] proteins involved in CMA [such as HSPA8 and HSP90AA1]. These results strongly support our initial hypothesis. Our results indicate that inhibition of TREM-1, either pharmacologically by LR12 peptide or genetically with TREM-1 KO mice, can promote the activity of both macroautophagy and CMA in experimental colitis. The lower mTOR expression level in LR12-treated and *Trem-1* KO colitic mice, suggests that TREM-1 inhibition may enhance the onset of autophagy by promoting mTOR downregulation. Indeed, we observed increases in the expression of proteins involved in both macroautophagy [ATG13, ATG1/ULK-1, ATG16L1, ATG5, and MAP1LC3-I/II] and CMA [HSPA8 and HSP90AA1]. As previously observed for other PRRs [NLRs and TLRs],⁶⁸ our results demonstrate that TREM-1 is involved in autophagy. TREM-1 expression and activity are closely linked with the activities of both TLRs and NLRs. It has been shown that TLR activation leads to upregulation of TREM-1 expression in a MyD88-dependent manner.^{37,38}

Following LPS stimulation of neutrophils, TREM-1 was found to be recruited to macrophage-lipid rafts and co-localized with TLR4.⁶⁹ Simultaneous activation of TREM-1 and TLR4 leads to synergistic production of pro-inflammatory mediators.⁷⁰ On the other hand, very little is known concerning TREM-1 and NLRs interactions. Previous studies reported that TREM-1 has a synergistic effect on the production of pro-inflammatory mediators induced by NOD1 and NOD2 ligands.^{39,40} Mechanistically, TREM-1 activation can lead to enhanced NOD2 expression, NF- κ B activation and cytokine production such as IL-1 β and IL-6.³⁹ These literature data showed that TREM-1 is strongly linked to other PRRs involved in autophagy, thus strongly supporting our findings.

Evidence of unresolved ER stress and an activated UPR in intestinal epithelial cells [IECs] has been reported in both forms of IBD [UC and CD].^{7,71} Our present results show that the UPR is strongly increased in DSS-induced experimental colitis. The observed increase in the activities of PERK and IRE-1 α and in the expression level of ATF-6 α [the three canonical sensors of ER stress] in this setting suggests that the ER stress occurs in colitic mice. It is well known that the UPR in response to ER stress is a major inducer of autophagy.^{9,13} On the contrary, our data indicate that both macroautophagy and CMA are impaired in these colitic mice. However, not only ER stress may induce autophagy, but *vice versa*, impaired autophagy can also promote ER stress.¹⁴ Yang *et al.* have reported that suppression of ATG7 [a protein involved in autophagosome formation] in the liver leads to increased ER stress [with its downstream consequences], while restoration of ATG7 expression dampens ER stress.¹⁴ The increased UPR observed in colitic mice is probably the consequence of colitis-induced ER stress but may also be caused by the impaired autophagy in these mice. The effect of TREM-1 inhibition on the ER stress has never been investigated. Our results indicate that inhibition of TREM-1, either pharmacologically by LR12 peptide or genetically in TREM-1 KO mice, can decrease the activities of PERK and IRE-1 α and also the expression level of ATF-6 α , suggests that TREM-1 inhibition may reduce the ER stress in DSS-induced experimental colitis. Interestingly, our results show that the impaired activity of both macroautophagy and CMA were restored in LR12-treated and TREM-1 KO colitic mice. In agreement with our hypothesis, impaired autophagy promotes the ER stress [with its downstream consequences], but the restoration of the autophagy activity by TREM-1 inhibition compensate the UPR to reduce ER stress in colitic mice. These observations provide strong support with regard to the previous studies, which described that the autophagy plays an important compensatory role in the context of ER stress and also that both autophagy and the UPR are deeply involved in innate immune mechanisms to maintain mucosal homeostasis. Collectively, these findings appear particularly relevant for host-microbiota interactions at the epithelial surface of the intestine during the pathogenesis of IBD.^{10,15–18}

Previous studies have shown that the presence of a functional autophagy pathway in the intestinal epithelium is essential for counteracting intestinal dysbiosis and bacterial infection. This is because autophagy controls the secretion of antimicrobial proteins and limits their dissemination.^{25,72} The healthy gastrointestinal microbiome is dominated by the phyla Firmicutes and Bacteroidetes, and, to a lesser degree, by the phyla Proteobacteria and

Actinobacteria.⁷³ Bacterial biodiversity is low in both CD and UC, each featuring distinct microbial perturbations and sites of tissue damage.²⁴ Bacterial dysbiosis is characterized by low biodiversity, abnormally low numbers of certain Firmicutes and abnormally high numbers of mucosa-adherent Proteobacteria.^{22–24} It is well known that different commensal bacteria induce distinct types of colitis in *IL-10-KO* mice.^{60,74} A mono-association study [in which various bacterial strains were inoculated singly into germ-free *IL-10-KO* mice] demonstrated that [i] *E. coli* induced cecal inflammation, [ii] *Enterococcus faecalis* induced distal colitis, [iii] *Pseudomonas fluorescens* did not cause colitis, and [iv] the rodent gut commensal *Helicobacter hepaticus* exacerbated colitis in this model.^{60,74} Hence changes in the composition of the gut microbiota can cause distinct intestinal immune responses - even in a host with a uniform genetic background. This suggests that dysbiosis can modulate the immune response in the gut. Here, we confirmed that DSS-induced experimental colitis is associated with low bacterial diversity and a shift towards a higher proportion of *Enterobacter*. Our data also indicate that inhibition of TREM-1, either pharmacologically by LR12 peptide or genetically in TREM-1 KO mice, might prevent the intestinal microbiota changes associated with experimental colitis, both by maintaining bacterial richness and limiting the number of *Enterobacter* to levels observed in non-colitic mice. This outcome may result from the enhanced autophagy activity derived from the inhibition of TREM-1 in colitic mice.

Clearly, future research must further focus on the link between colitis protection and changes in the microbiota, and on the characterization of the mechanisms that lead to increased autophagy activity upon TREM-1 inhibition.

In summary, we first confirmed that the administration of LR12 peptide [known to modulate the TREM-1 pathway] exerts a strong protective effect against DSS-induced colitis in the mouse. Furthermore, we bring evidence that blocking TREM-1 upon the induction of experimental colitis compensates for the defect in autophagy activity and may have prevents dysbiosis of the intestinal microbiota. These results collectively suggest that TREM-1 plays a key role in the control of autophagy activity in acute phase of colitis, with a consequent effect on dysbiosis. These results further argue for a role for TREM-1 in IBD pathogenesis. Altogether, these findings reinforce the idea that TREM-1 may constitute a drug target of choice in the treatment of chronic inflammatory diseases and autophagy disorders. We are confident that this promising strategy will be evaluated in patients with IBD in due course.

Funding

This work was funded in parts by the *Centre National de la Recherche Scientifique* [CNRS] and the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* [INSERM] and also by grants from the *Association François Aupetit*, the *Ligue Contre le Cancer*, the *Département d'Hépatogastroentérologie* at Nancy-Brabois University Medical Center, and the *Région Grand-Est*.

Acknowledgments and Author Contributions

We thank the staff at the ZIEL Core Facility Microbiome/NGS at the Technical University in Munich [especially Dr. Ilias Lagkouravdos and Dr. Thomas Clavel] for assistance with 16S rRNA gene amplicon sequencing with the TREM-1 inhibition experiments. We also thank the Genotoul Get-PlaGe sequencing platform for assistance with 16S rRNA gene amplicon sequencing with the genetically deleted TREM-1 experiments. We are grateful to the INRA MIGALE bioinformatics platform [<http://migale.jouy.inra.fr>] for providing computational resources.

LPB had the initial concept and managed the study. TK, CM, BG and JH collected the data. SG provided the LR12 peptide and *Trem-1* knock-out mice. PL provided the microbiota analyses data and expertise. HBV provided the histological data and histopathological expertise. NCN conducted the statistical analyses. TK and LPB wrote the initial draft of the manuscript. FH, DM, JYJ, SD'A, SD, JLG, SM, and LPB were involved in analysis and interpretation of data, drafting and critical revision of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Conflict of Interest

The authors have no conflict of interest to declare.

References

1. Ungaro R., Mehandru S., Allen PB., Peyrin-Biroulet L., Colombel J-F. Ulcerative colitis. *Lancet Lond Engl* 2016. Doi: 10.1016/S0140-6736(16)32126-2.
2. Torres J., Mehandru S., Colombel J-F., Peyrin-Biroulet L. Crohn's disease. *Lancet Lond Engl* 2016. Doi: 10.1016/S0140-6736(16)31711-1.
3. Hampe J., Franke A., Rosenstiel P., Till A., Teuber M., Huse K., et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* 2007;**39**(2):207–11. Doi: 10.1038/ng1954.
4. Karantanos T., Gazouli M. Inflammatory bowel disease: recent advances on genetics and innate immunity. *Ann Gastroenterol Q Publ Hell Soc Gastroenterol* 2011;**24**(3):164–72.
5. Tschurtschenthaler M., Adolph TE., Ashcroft JW., Niederreiter L., Bharti R., Saveljeva S., et al. Defective ATG16L1-mediated removal of IRE1 α drives Crohn's disease-like ileitis. *J Exp Med* 2017. Doi: 10.1084/jem.20160791.
6. Saitoh T., Akira S. Regulation of innate immune responses by autophagy-related proteins. *J Cell Biol* 2010;**189**(6):925–35. Doi: 10.1083/jcb.201002021.
7. Kaser A., Lee A-H., Franke A., Glickman JN., Zeissig S., Tilg H., et al. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* 2008;**134**(5):743–56. Doi: 10.1016/j.cell.2008.07.021.
8. Hisamatsu T., Kanai T., Mikami Y., Yoneno K., Matsuoka K., Hibi T. Immune aspects of the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Pharmacol Ther* 2013;**137**(3):283–97. Doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.10.008.

9. Shimodaira Y., Takahashi S., Kinouchi Y., Endo K., Shiga H., Kakuta Y., et al. Modulation of endoplasmic reticulum (ER) stress-induced autophagy by C/EBP homologous protein (CHOP) and inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α) in human colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;**445**(2):524–33. Doi: 10.1016/j.bbrc.2014.02.054.
10. Hosomi S., Kaser A., Blumberg RS. Role of endoplasmic reticulum stress and autophagy as interlinking pathways in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2015;**31**(1):81–8. Doi: 10.1097/MOG.0000000000000144.
11. Kaser A., Martínez-Naves E., Blumberg RS. Endoplasmic reticulum stress: implications for inflammatory bowel disease pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol* 2010;**26**(4):318–26. Doi: 10.1097/MOG.0b013e32833a9ff1.
12. Kaser A., Adolph TE., Blumberg RS. The unfolded protein response and gastrointestinal disease. *Semin Immunopathol* 2013;**35**(3):307–19. Doi: 10.1007/s00281-013-0377-5.
13. Li J., Ni M., Lee B., Barron E., Hinton DR., Lee AS. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells. *Cell Death Differ* 2008;**15**(9):1460–71. Doi: 10.1038/cdd.2008.81.
14. Yang L., Li P., Fu S., Calay ES., Hotamisligil GS. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metab* 2010;**11**(6):467–78. Doi: 10.1016/j.cmet.2010.04.005.
15. Martinon F., Chen X., Lee A-H., Glimcher LH. TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nat Immunol* 2010;**11**(5):411–8. Doi: 10.1038/ni.1857.
16. Richardson CE., Kooistra T., Kim DH. An essential role for XBP-1 in host protection against immune activation in *C. elegans*. *Nature* 2010;**463**(7284):1092–5. Doi: 10.1038/nature08762.
17. Fritz T., Niederreiter L., Adolph T., Blumberg RS., Kaser A. Crohn's disease: NOD2, autophagy and ER stress converge. *Gut* 2011;**60**(11):1580–8. Doi: 10.1136/gut.2009.206466.
18. Luo K., Cao SS. Endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cell function and inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Res Pract* 2015;**2015**:328791. Doi: 10.1155/2015/328791.
19. Delgado M., Singh S., De Haro S., Master S., Ponpuak M., Dinkins C., et al. Autophagy and pattern recognition receptors in innate immunity. *Immunol Rev* 2009;**227**(1):189–202. Doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00725.x.
20. Hugot JP., Chamaillard M., Zouali H., Lesage S., Cézard JP., Belaiche J., et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;**411**(6837):599–603. Doi: 10.1038/35079107.
21. Ogura Y., Bonen DK., Inohara N., Nicolae DL., Chen FF., Ramos R., et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;**411**(6837):603–6. Doi: 10.1038/35079114.
22. Sokol H., Seksik P., Furet JP., Firmesse O., Nion-Larmurier I., Beaugerie L., et al. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 2009;**15**(8):1183–9. Doi: 10.1002/ibd.20903.
23. Willing BP., Dicksved J., Halfvarson J., Andersson AF., Lucio M., Zheng Z., et al. A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. *Gastroenterology* 2010;**139**(6):1844–1854.e1. Doi: 10.1053/j.gastro.2010.08.049.
24. Morgan XC., Tickle TL., Sokol H., Gevers D., Devaney KL., Ward DV., et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol* 2012;**13**(9):R79. Doi: 10.1186/gb-2012-13-9-r79.
25. Scharl M., Rogler G. Inflammatory bowel disease: dysfunction of autophagy? *Dig Dis Basel Switz* 2012;**30 Suppl 3**:12–9. Doi: 10.1159/000342588.

26. Cario E. Commensal-innate immune miscommunication in IBD pathogenesis. *Dig Dis Basel Switz* 2012;**30**(4):334–40. Doi: 10.1159/000338120.
27. Ford JW., McVicar DW. TREM and TREM-like receptors in inflammation and disease. *Curr Opin Immunol* 2009;**21**(1):38–46. Doi: 10.1016/j.coi.2009.01.009.
28. Bouchon A., Facchetti F., Weigand MA., Colonna M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* 2001;**410**(6832):1103–7. Doi: 10.1038/35074114.
29. Schenk M., Bouchon A., Birrer S., Colonna M., Mueller C. Macrophages expressing triggering receptor expressed on myeloid cells-1 are underrepresented in the human intestine. *J Immunol Baltim Md 1950* 2005;**174**(1):517–24.
30. Derive M., Boufenger A., Bouazza Y., Groubatch F., Alauzet C., Barraud D., et al. Effects of a TREM-like transcript 1-derived peptide during hypodynamic septic shock in pigs. *Shock Augusta Ga* 2013;**39**(2):176–82. Doi: 10.1097/SHK.0b013e31827bcdfb.
31. Bouchon A., Dietrich J., Colonna M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J Immunol Baltim Md 1950* 2000;**164**(10):4991–5.
32. Gibot S., Kolopp-Sarda M-N., Béné M-C., Bollaert P-E., Lozniewski A., Mory F., et al. A soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 modulates the inflammatory response in murine sepsis. *J Exp Med* 2004;**200**(11):1419–26. Doi: 10.1084/jem.20040708.
33. Gibot S., Massin F., Le Renard P., Béné MC., Faure GC., Bollaert P-E., et al. Surface and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1: expression patterns in murine sepsis. *Crit Care Med* 2005;**33**(8):1787–93.
34. Schenk M., Bouchon A., Seibold F., Mueller C. TREM-1-expressing intestinal macrophages crucially amplify chronic inflammation in experimental colitis and inflammatory bowel diseases. *J Clin Invest* 2007;**117**(10):3097–106. Doi: 10.1172/JCI30602.
35. Zhou J., Chai F., Lu G., Hang G., Chen C., Chen X., et al. TREM-1 inhibition attenuates inflammation and tumor within the colon. *Int Immunopharmacol* 2013;**17**(2):155–61. Doi: 10.1016/j.intimp.2013.06.009.
36. Genua M., Rutella S., Correale C., Danese S. The triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM) in inflammatory bowel disease pathogenesis. *J Transl Med* 2014;**12**:293. Doi: 10.1186/s12967-014-0293-z.
37. Gibot S., Le Renard P-E., Bollaert P-E., Kolopp-Sarda M-N., Béné M-C., Faure GC., et al. Surface triggering receptor expressed on myeloid cells 1 expression patterns in septic shock. *Intensive Care Med* 2005;**31**(4):594–7. Doi: 10.1007/s00134-005-2572-x.
38. Tammaro A., Kers J., Emal D., Stroo I., Teske GJD., Butter LM., et al. Effect of TREM-1 blockade and single nucleotide variants in experimental renal injury and kidney transplantation. *Sci Rep* 2016;**6**:38275. Doi: 10.1038/srep38275.
39. Netea MG., Azam T., Ferwerda G., Girardin SE., Kim S-H., Dinarello CA. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) amplifies the signals induced by the NACHT-LRR (NLR) pattern recognition receptors. *J Leukoc Biol* 2006;**80**(6):1454–61. Doi: 10.1189/jlb.1205758.
40. Prüfer S., Weber M., Sasca D., Teschner D., Wölfel C., Stein P., et al. Distinct signaling cascades of TREM-1, TLR and NLR in neutrophils and monocytic cells. *J Innate Immun* 2014;**6**(3):339–52. Doi: 10.1159/000355892.
41. Murthy SN., Cooper HS., Shim H., Shah RS., Ibrahim SA., Sedergran DJ. Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporin. *Dig Dis Sci* 1993;**38**(9):1722–34.
42. Riley SA., Mani V., Goodman MJ., Dutt S., Herd ME. Microscopic activity in ulcerative colitis: what does it mean? *Gut* 1991;**32**(2):174–8.
43. Travis SPL., Schnell D., Krzeski P., Abreu MT., Altman DG., Colombel J-F., et al. Developing an instrument to assess the endoscopic severity of ulcerative colitis: the Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS). *Gut* 2012;**61**(4):535–42. Doi: 10.1136/gutjnl-2011-300486.

44. Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf KS., Manichanh C., et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010;**464**(7285):59–65. Doi: 10.1038/nature08821.
45. Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M., et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* 2013;**41**(1):e1. Doi: 10.1093/nar/gks808.
46. Edgar RC., Haas BJ., Clemente JC., Quince C., Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinforma Oxf Engl* 2011;**27**(16):2194–200. Doi: 10.1093/bioinformatics/btr381.
47. Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinforma Oxf Engl* 2010;**26**(19):2460–1. Doi: 10.1093/bioinformatics/btq461.
48. Wang Q., Garrity GM., Tiedje JM., Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 2007;**73**(16):5261–7. Doi: 10.1128/AEM.00062-07.
49. Schenk M., Bouchon A., Seibold F., Mueller C. TREM-1—expressing intestinal macrophages crucially amplify chronic inflammation in experimental colitis and inflammatory bowel diseases. *J Clin Invest* 2007;**117**(10):3097–106. Doi: 10.1172/JCI30602.
50. Levine B., Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 2004;**6**(4):463–77.
51. Kim YC., Guan K-L. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *J Clin Invest* 2015;**125**(1):25–32. Doi: 10.1172/JCI73939.
52. Fujita N., Itoh T., Omori H., Fukuda M., Noda T., Yoshimori T. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol Biol Cell* 2008;**19**(5):2092–100. Doi: 10.1091/mbc.E07-12-1257.
53. Zhao J., Li Z., Wang M., Zhang Z., Ma H., Chang J., et al. Manipulation of autophagy by HCMV infection is involved in mTOR and influences the replication of virus. *Acta Biochim Biophys Sin* 2013;**45**(11):979–81. Doi: 10.1093/abbs/gmt102.
54. Beale R., Wise H., Stuart A., Ravenhill BJ., Digard P., Randow F. A LC3-interacting motif in the influenza A virus M2 protein is required to subvert autophagy and maintain virion stability. *Cell Host Microbe* 2014;**15**(2):239–47. Doi: 10.1016/j.chom.2014.01.006.
55. Macri C., Wang F., Tasset I., Schall N., Page N., Briand J-P., et al. Modulation of deregulated chaperone-mediated autophagy by a phosphopeptide. *Autophagy* 2015;**11**(3):472–86. Doi: 10.1080/15548627.2015.1017179.
56. Kaser A., Blumberg RS. Endoplasmic reticulum stress in the intestinal epithelium and inflammatory bowel disease. *Semin Immunol* 2009;**21**(3):156–63. Doi: 10.1016/j.smim.2009.01.001.
57. Verfaillie T., Salazar M., Velasco G., Agostinis P. Linking ER Stress to Autophagy: Potential Implications for Cancer Therapy. *Int J Cell Biol* 2010;**2010**:930509. Doi: 10.1155/2010/930509.
58. He C., Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 2009;**43**:67–93. Doi: 10.1146/annurev-genet-102808-114910.
59. Yorimitsu T., Nair U., Yang Z., Klionsky DJ. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *J Biol Chem* 2006;**281**(40):30299–304. Doi: 10.1074/jbc.M607007200.
60. Matsuoka K., Kanai T. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Semin Immunopathol* 2015;**37**(1):47–55. Doi: 10.1007/s00281-014-0454-4.
61. Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther* 2006;**8 Suppl 2**:S3. Doi: 10.1186/ar1917.
62. Bouchon A., Cella M., Grierson HL., Cohen JL., Colonna M. Activation of NK cell-mediated cytotoxicity by a SAP-independent receptor of the CD2 family. *J Immunol Baltim Md 1950* 2001;**167**(10):5517–21.

63. Gattis JL, Washington AV, Chisholm MM, Quigley L, Szyk A, McVicar DW, et al. The structure of the extracellular domain of triggering receptor expressed on myeloid cells like transcript-1 and evidence for a naturally occurring soluble fragment. *J Biol Chem* 2006;**281**(19):13396–403. Doi: 10.1074/jbc.M600489200.
64. Derive M, Bouazza Y, Sennoun N, Marchionni S, Quigley L, Washington V, et al. Soluble TREM-like transcript-1 regulates leukocyte activation and controls microbial sepsis. *J Immunol Baltim Md 1950* 2012;**188**(11):5585–92. Doi: 10.4049/jimmunol.1102674.
65. Tammaro A, Derive M, Gibot S, Leemans JC, Florquin S, Dessing MC. TREM-1 and its potential ligands in non-infectious diseases: from biology to clinical perspectives. *Pharmacol Ther* 2017. Doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.043.
66. Roberts RL, Hollis-Moffatt JE, Gearry RB, Kennedy MA, Barclay ML, Merriman TR. Confirmation of association of IRGM and NCF4 with ileal Crohn's disease in a population-based cohort. *Genes Immun* 2008;**9**(6):561–5. Doi: 10.1038/gene.2008.49.
67. Henckaerts L, Cleynen I, Brinar M, John JM, Van Steen K, Rutgeerts P, et al. Genetic variation in the autophagy gene ULK1 and risk of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2011;**17**(6):1392–7. Doi: 10.1002/ibd.21486.
68. Delgado MA, Elmaoued RA, Davis AS, Kyei G, Deretic V. Toll-like receptors control autophagy. *EMBO J* 2008;**27**(7):1110–21. Doi: 10.1038/emboj.2008.31.
69. Fortin CF, Lesur O, Fulop T. Effects of TREM-1 activation in human neutrophils: activation of signaling pathways, recruitment into lipid rafts and association with TLR4. *Int Immunol* 2007;**19**(1):41–50. Doi: 10.1093/intimm/dxl119.
70. Tessarz AS, Cerwenka A. The TREM-1/DAP12 pathway. *Immunol Lett* 2008;**116**(2):111–6. Doi: 10.1016/j.imlet.2007.11.021.
71. Tréton X, Pédruzzi E, Cazals-Hatem D, Grodet A, Panis Y, Groyer A, et al. Altered endoplasmic reticulum stress affects translation in inactive colon tissue from patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2011;**141**(3):1024–35. Doi: 10.1053/j.gastro.2011.05.033.
72. Benjamin JL, Sumpter R, Levine B, Hooper LV. Intestinal epithelial autophagy is essential for host defense against invasive bacteria. *Cell Host Microbe* 2013;**13**(6):723–34. Doi: 10.1016/j.chom.2013.05.004.
73. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005;**308**(5728):1635–8. Doi: 10.1126/science.1110591.
74. Kim SC, Tonkonogy SL, Albright CA, Tsang J, Balish EJ, Braun J, et al. Variable phenotypes of enterocolitis in interleukin 10-deficient mice monoassociated with two different commensal bacteria. *Gastroenterology* 2005;**128**(4):891–906.

Figures legends

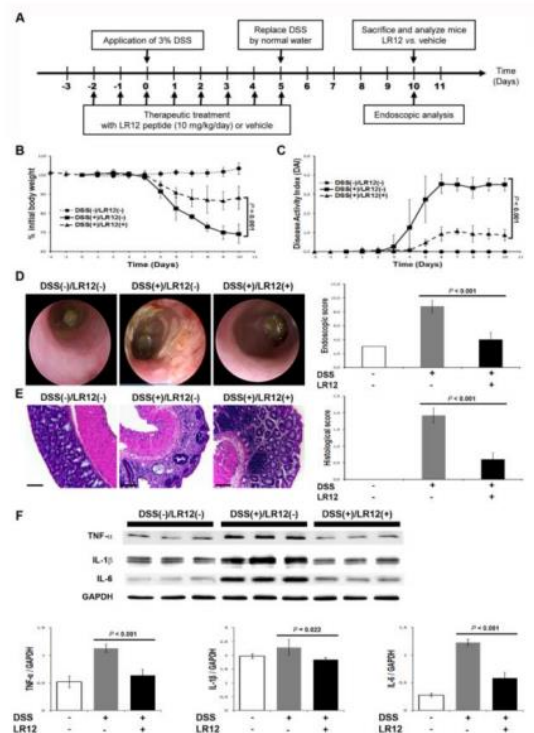
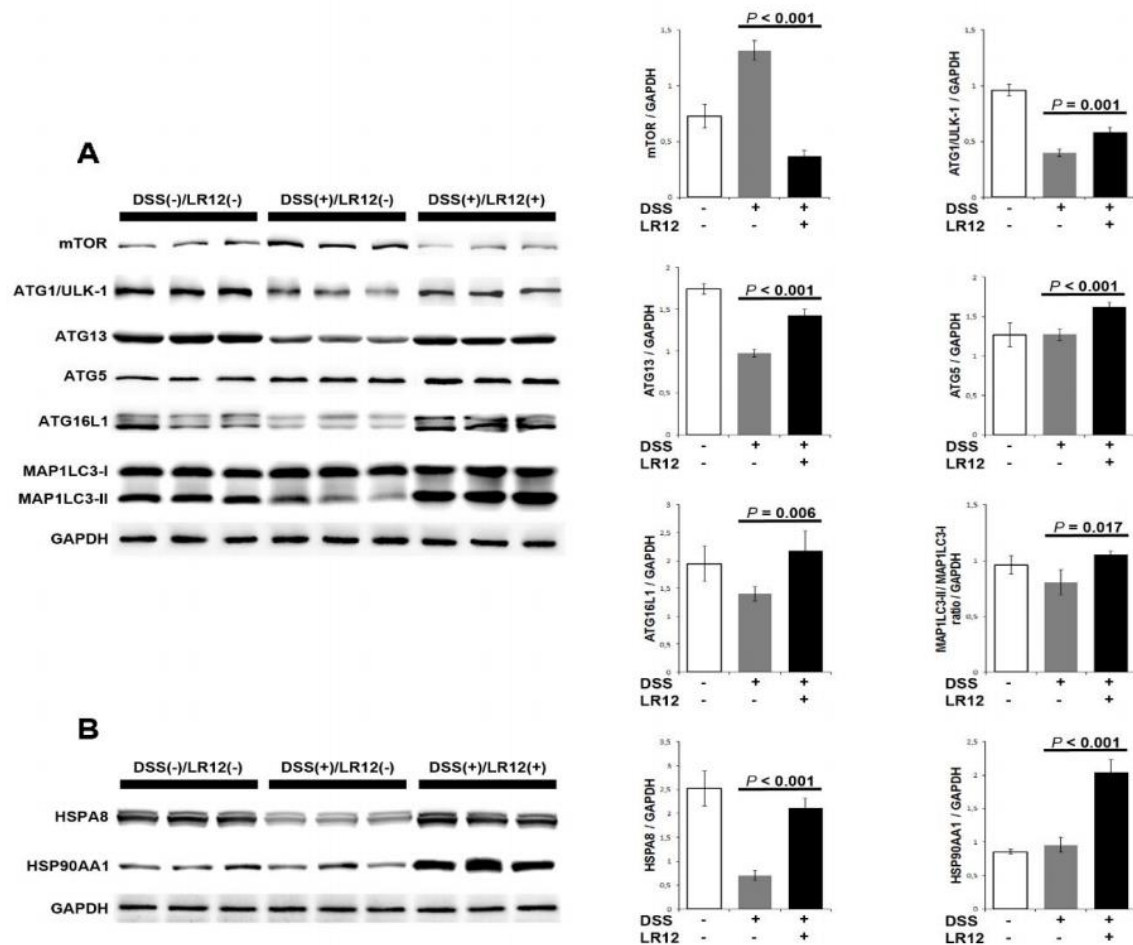


Figure 1.

Inhibition of TREM-1 by LR12 peptide prevents colonic inflammation in experimental colitis. [A] Experimental design for pharmacological inhibition of TREM-1 [by LR12 peptide treatment]. [B] Bodyweight was monitored daily, and bodyweight loss [as a percentage of initial bodyweight] was calculated for each animal in the three groups of mice: [DSS(-)/LR12(-), DSS(+)/LR12(-), and DSS(+)/LR12(+); n=5 for each group]. [C] The disease activity index [DAI] for the three groups of mice was determined as described in the Methods. [D] Representative, colonoscopy images and endoscopy scores on day 10 for the three groups of mice. [E] Representative, HES-stained colonic tissue sections and histological scores on day 10 were presented for the three groups of mice. Scale bar: 200 μ m. [F] Western blot analyzes of TNF- α [25 kDa], IL-1 β [35 kDa] and IL-6 [23 kDa] in colon samples from the three groups of mice on day 10. GAPDH [37 kDa] served as loading control. Densitometric quantification [mean values $\pm$ SD normalized against GAPDH are shown for each protein] evidences an effect of LR12 peptide on inflammation in experimental colitis. All data are quoted as the mean $\pm$ SD. All *p* values are from two-tailed Student's *t* tests.

**Figure 2.**

Inhibition of TREM-1 by LR12 peptide restores impaired autophagy activity during experimental colitis. [A] Western blots of macroautophagy proteins mTOR [240 kDa], ATG1/ULK-1 [130 kDa], ATG13 [45 kDa], ATG5 [55 kDa], ATG16L1 [68 kDa], MAP1LC3-I [16 kDa], and MAP1LC3-II [14 kDa], with densitometric quantification [mean values $\pm$ SD normalized against GAPDH]. [B] Western blots of chaperone-mediated autophagy [CMA] proteins HSPA8 [70 kDa] and HSP90AA1 [90 kDa], with densitometric quantification [mean values $\pm$ SD normalized against GAPDH]. The colonic samples were obtained from three groups of mice [DSS(-)/LR12(-), DSS(+)/LR12(-), and DSS(+)/LR12(+); n=5 for each group] on day 10. GAPDH [37 kDa] served as a loading control. All data are quoted as the mean $\pm$ SD. All *p* values are from two-tailed Student's *t* tests.

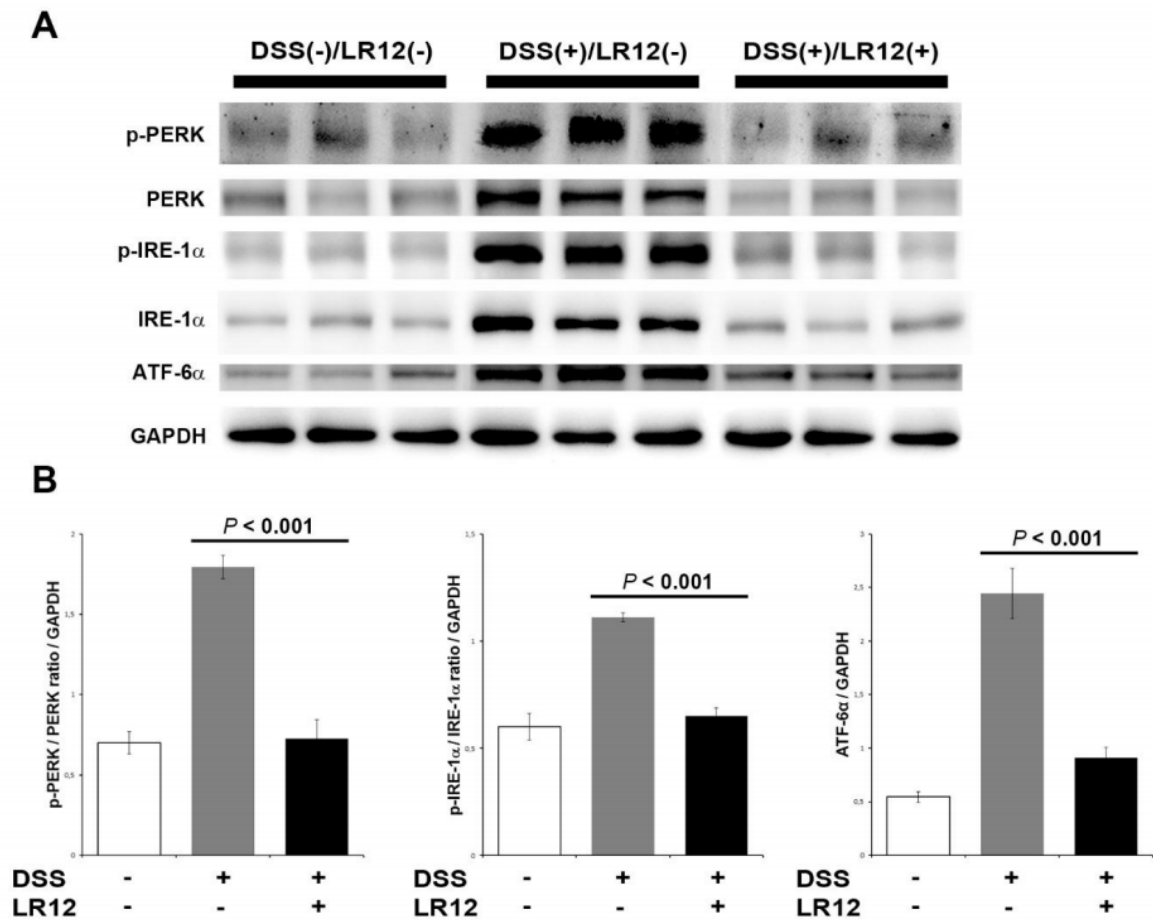


Figure 3.

Inhibition of TREM-1 by LR12 peptide reduces endoplasmic reticulum [ER] stress and induced unfolded protein response [UPR] during experimental colitis. [A] Western blot analyzes of PERK [140 kDa], phosphorylated-PERK [p-PERK] [170 kDa], IRE-1α [130 kDa], phosphorylated-IRE-1α [p-IRE-1α] [110 kDa] and ATF-6α [90 kDa] in colon samples from the three groups of mice [DSS(-)/LR12(-), DSS(+)/LR12(-), and DSS(+)/LR12(+); n=5 for each group] on day 10. GAPDH [37 kDa] served as loading control. **[B]** Densitometric quantification of PERK activity [p-PERK/PERK ratio], IRE-1α activity [p-IRE-1α/IRE-1α ratio], and ATF-6α expression [mean values ± SD normalized against GAPDH are shown for each protein] evidences an effect of LR12 peptide on ER stress and UPR elements in DSS-induced experimental colitis. All data are quoted as the mean ± SD. All *p* values are from two-tailed Student's *t* tests.

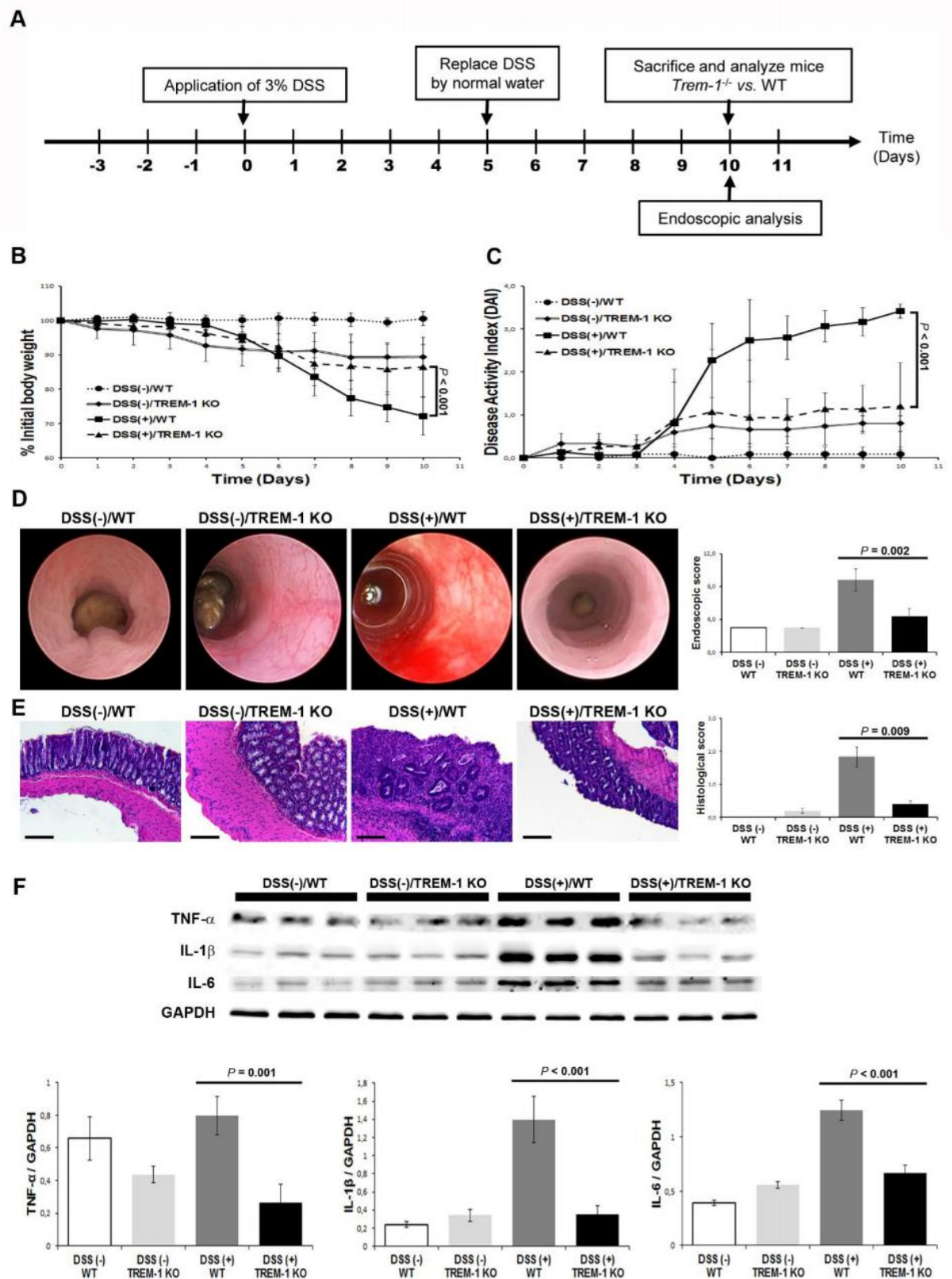


Figure 4.

Deletion of TREM-1 in mice prevents colonic inflammation in the DSS-induced model of acute colitis. [A] Experimental design for genetical inhibition of TREM-1 [with *Trem-1* KO

mice]. **[B]** Bodyweight was monitored daily, and weight loss [as a percent of initial bodyweight] for each mouse was calculated in the four groups: DSS(-)/WT, DSS(-)/TREM-1 KO, DSS(+)/WT, and DSS(+)/TREM-1 KO; $n=5$ for each group. **[C]** The disease activity index [DAI] for the four groups of mice was determined as described in Methods. **[D]** Representative colonoscopy images and endoscopy scores on day 10, for the four groups of mice. **[E]** Representative HES-stained colonic tissue sections and histological score on day 10 for the four groups of mice. Scale bar: 200 μm . **[F]** Western blot analyses of $\text{TNF-}\alpha$ [25 kDa], $\text{IL-1}\beta$ [35 kDa] and IL-6 [23 kDa] in colon samples from the four groups of mice on day 10. GAPDH [37 kDa] served as a loading control. Densitometric quantification [mean values $\pm$ SD, normalized against GAPDH] of each protein revealed the effects of a lack of TREM-1 on inflammation in experimental colitis. All data are quoted as the mean $\pm$ SD. The reported p values are from two-tailed Student t tests or [when a one-way ANOVA was significant] *post hoc* tests.

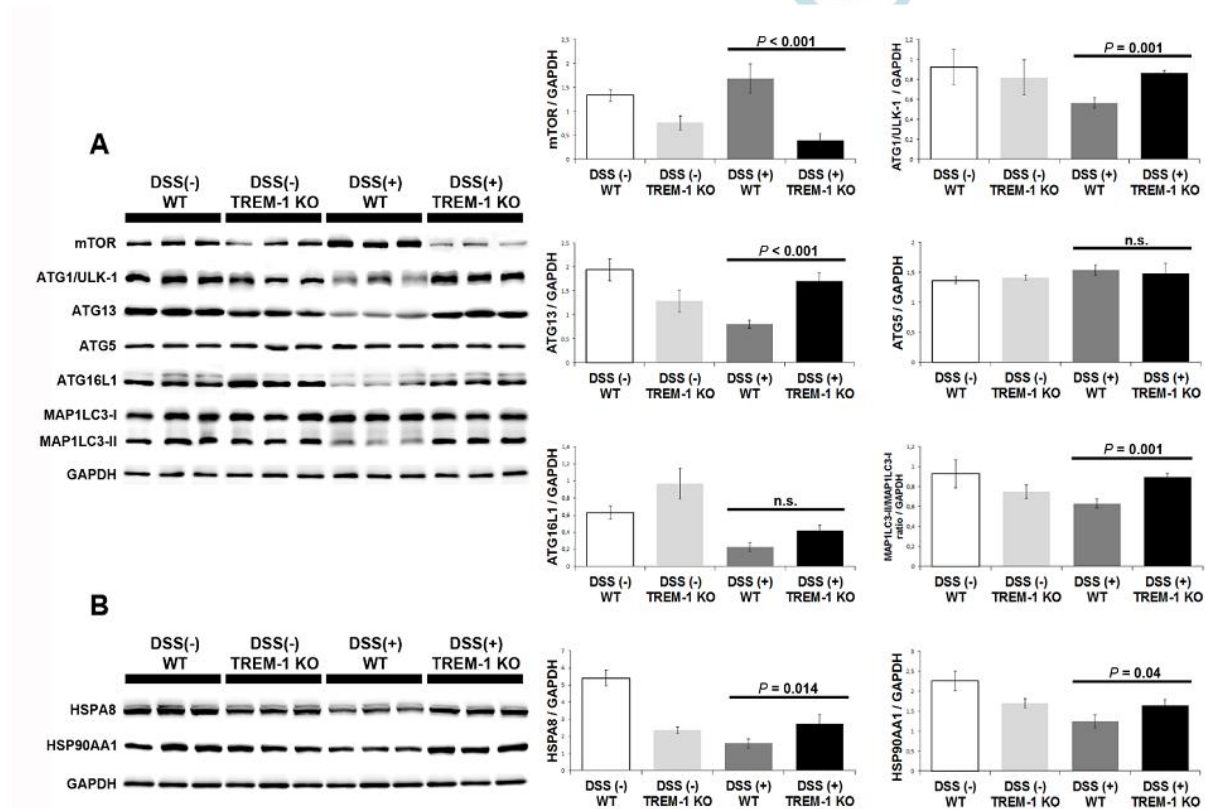


Figure 5.

TREM-1 deletion restores impaired autophagy activity during experimental colitis. [A] Western blots of macroautophagy proteins mTOR [240 kDa], ATG1/ULK-1 [130 kDa], ATG13 [45 kDa], ATG5 [55 kDa], ATG16L1 [68 kDa], MAP1LC3-I [16 kDa], and MAP1LC3-II [14 kDa], with densitometric quantification analysis [mean $\pm$ SD values, normalized against GAPDH] for each protein. **[B]** Western blots of chaperone-mediated autophagy [CMA] proteins HSPA8 [70 kDa] and HSP90AA1 [90 kDa], with densitometric quantification analysis [mean $\pm$ SD values, normalized against GAPDH] for each protein. The

colonic samples were obtained from four groups of mice [DSS(-)/WT, DSS(-)/TREM-1 KO, DSS(+)/WT and DSS(+)/TREM-1 KO; n=5 for each group] on day 10. GAPDH [37 kDa] served as a loading control. All data are quoted as the mean $\pm$ SD. The reported *p* values are from *post hoc* tests [when the one-way ANOVA was significant].

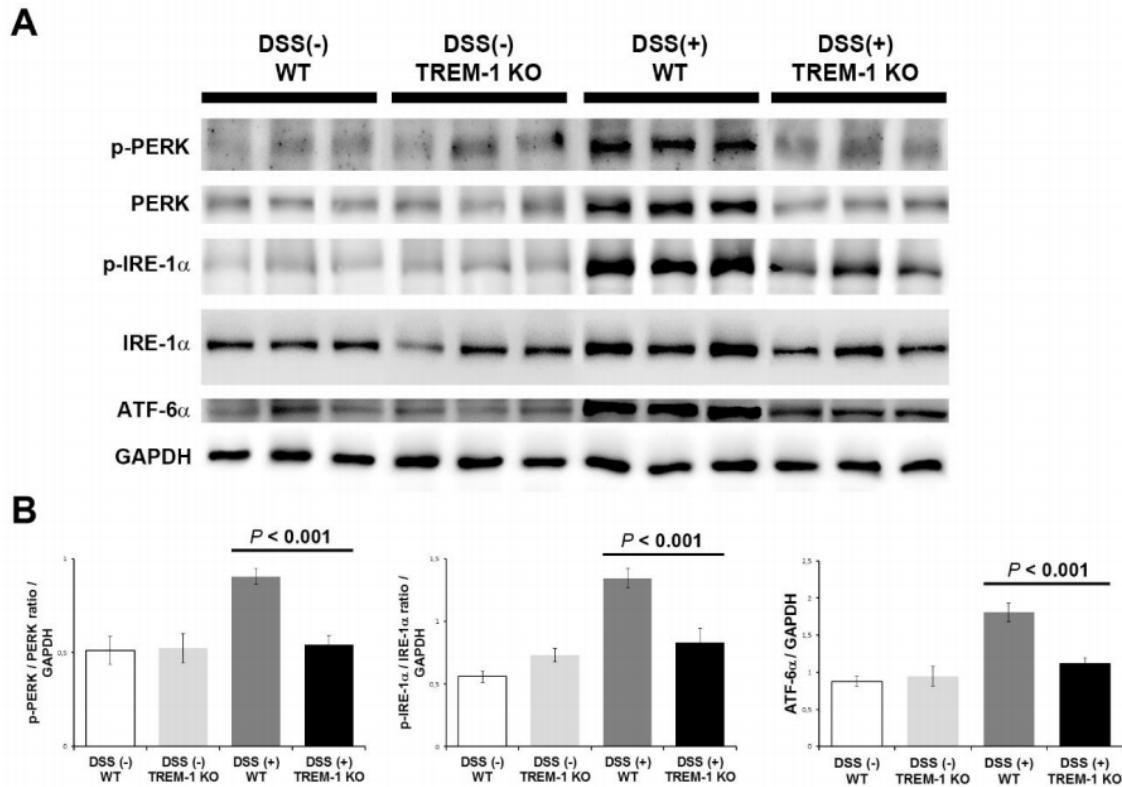


Figure 6.

Deletion of TREM-1 in mice reduces endoplasmic reticulum [ER] stress and induced unfolded protein response [UPR] in the DSS-induced model of acute colitis. [A] Western blot analyzes of PERK [140 kDa], phosphorylated-PERK [p-PERK] [170 kDa], IRE-1 α [130 kDa], phosphorylated-IRE-1 α [p-IRE-1 α] [110 kDa] and ATF-6 α [90 kDa] in colon samples from four groups of mice [DSS(-)/WT, DSS(-)/TREM-1 KO, DSS(+)/WT and DSS(+)/TREM-1 KO; n=5 for each group] on day 10. GAPDH [37 kDa] served as loading control. **[B]** Densitometric quantification of PERK activity [p-PERK/PERK ratio], IRE-1 α activity [p-IRE-1 α /IRE-1 α ratio], and ATF-6 α expression [mean values $\pm$ SD normalized against GAPDH] are shown for each protein] revealed the effects of a lack of TREM-1 on ER stress and UPR elements in experimental colitis. All data are quoted as the mean $\pm$ SD. The reported *p* values are from two-tailed Student *t* tests or [when a one-way ANOVA was significant] *post hoc* tests.

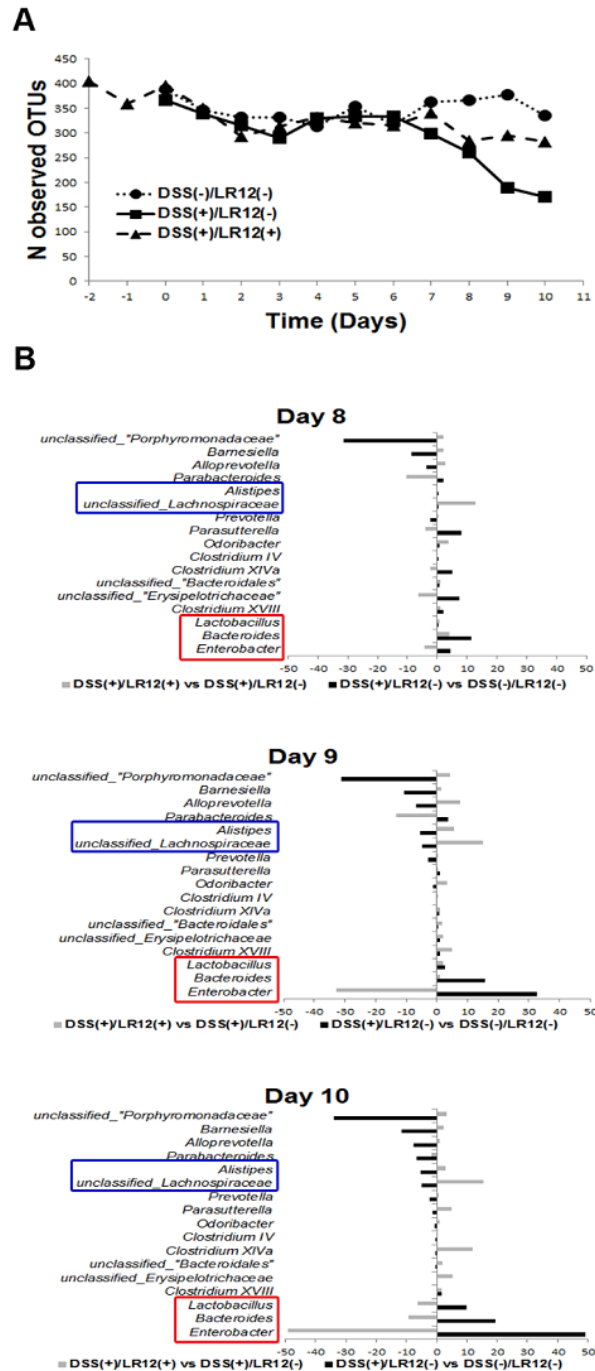


Figure 7.

LR12 peptide treatment prevents disease-related changes in intestinal microbiota during DSS-induced acute colitis. [A] Operational taxonomic units [OTUs] richness of gut microbiota in the murine colon was monitored daily in three groups of mice: DSS(-)/LR12(-), DSS(+)/LR12(-), and DSS(+)/LR12(+). [B] Taxonomic composition of the bacterial community at the genus level in fecal pellets from the three groups of mice on days 8, 9 and 10. For each genus, differences were calculated as follows: [percentage in the DSS(+)/LR12(-) group] – [percentage in the DSS(-)/LR12(-) group] and [percentage in the DSS(+)/LR12(+) group] – [percentage in the DSS(+)/LR12(-) group].

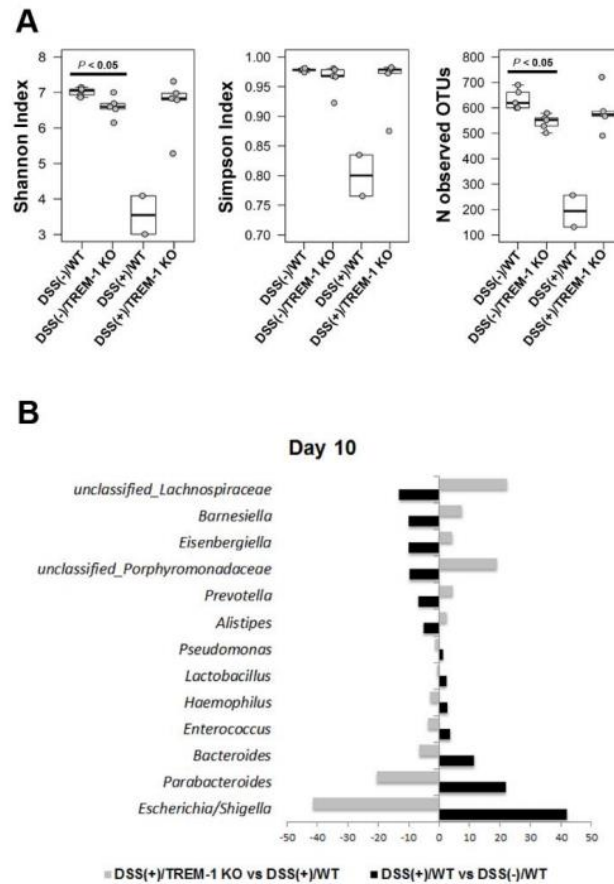


Figure 8.

Deletion of TREM-1 in mice prevents disease-related changes in intestinal microbiota during DSS-induced acute colitis. [A] Diversity and richness of gut microbiota in the murine colon was assessed by Shannon Index, Simpson index and number of observed operational taxonomic units [OTUs] in four groups of mice at Day 10: DSS(-)/WT, DSS(-)/TREM-1 KO, DSS(+)/WT and DSS(+)/TREM-1 KO. [B] Taxonomic composition of the bacterial community at the genus level in fecal pellets from the four groups of mice at day 10. For each genus, differences were calculated as follows: [percentage in the DSS(+)/WT group] – [percentage in the DSS(-)/WT group] and [percentage in the DSS(-)/TREM-1 KO] – [percentage in the DSS(+)/WT group]. The reported p values are from two-tailed Student t tests.

Lettre à l'éditeur

**Zinc-Alpha-2-Glycoprotein in Inflammatory Bowel
Disease.**

Zinc-Alpha-2-Glycoprotein in Inflammatory Bowel Disease

To the Editors,

Zinc-Alpha-2-Glycoprotein (ZAG), a 40 kDa soluble protein present in various body fluids (serum, urine, seminal fluid, saliva, and milk), controls adipose tissue mobilization in the context of cachexia.¹⁻³ Inflammatory Bowel Diseases (IBD), including Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), have been historically associated with cachexia and malnutrition. Furthermore, a recent connection between ZAG and Th17 lymphocyte, a subpopulation of adaptive immune cell involved in both mucosal homeostatic microbial protection and IBD occurring inflammation has been made, suggesting a vicious cycle worsening inflammation and metabolic disorder in systemic inflammatory disease.⁴ We thus explored the potential role of ZAG in IBD.

We first measured serum levels of ZAG using ELISA in IBD patients, UC (n = 70) and CD (n = 109), enrolled in the "Nancy IBD cohort" and healthy controls (n = 105). ZAG levels are significantly increased in patients with UC ($31.4 \pm 8 \mu\text{g/ml}$ vs $27.6 \pm 3.8 \mu\text{g/ml}$; $P = 0.0019$), whereas no statistical difference is observed in patients with CD ($28.2 \pm 6.5 \mu\text{g/ml}$) (Fig. 1A). This prompted us to look in the animal model of colitis. We thus induced dextran sodium sulfate (DSS) colitis in ZAG^{-/-} mice (n = 12) and wild-type animals (n = 11). Severity of colitis, measured by disease activity score (Fig. 1B), daily fecal lipocalin2 dosage (not shown), and final histological examination (not shown) revealed no difference between wild-type and ZAG deficient mice.

Published online 23 April 2018 in
academic.oup.com/ibdjournal

© 2018 Crohn's & Colitis Foundation.

Published by Oxford University Press.

All rights reserved. For permissions,
please e-mail: journals.permissions@oup.com.

doi: 10.1093/ibd/izy120

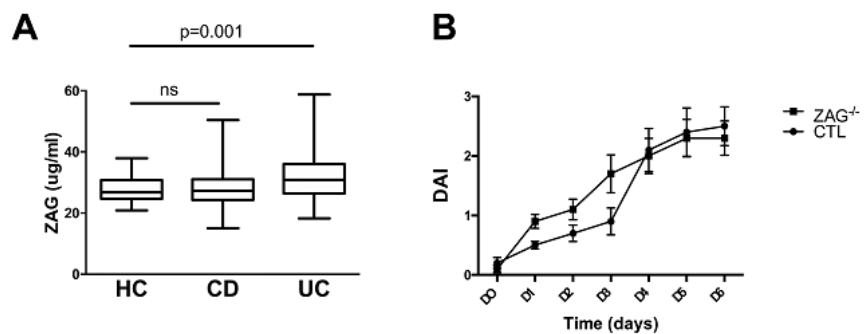


FIGURE 1. A, ZAG protein level is elevated in UC patients. Plasmatic levels of ZAG were measured by ELISA in UC (n = 70), CD (n = 109), and healthy controls (n = 105). **B, DSS occurrence and severity is not altered in ZAG deficient mice.** DSS Colitis was induced by administration of 3% DSS (Colitis grade MW 36-50kDa) (MPBiomedicals) in drinking water for 6 days in control and ZAG deficient mice. Daily, the severity of colitis was evaluated by the disease activity index (DAI). The DAI was calculated with the body weight loss (0 = no weight loss, 1 = 0%-5% weight loss, 2 = 5%-10% weight loss, 3 = 10%-20% weight loss, 4 = more than 20% weight loss); feces consistency (0 = normal, 2 = loose stools, 4 = diarrhea); and the presence of blood in the feces (0 = negative, 2 = positive, 4 = important presence of blood in the feces).

Taken together, these data suggest that ZAG might only reflect inflammation occurring in patients with UC, as animal data are not in favor of a direct role in IBD pathophysiology.

Véronique Rolli, PhD,*

Cécile Macquin, MSc,*

Tunay Kokten, PhD,†

Julie Hablot, MSc,‡

Ndeye-Coumba Ndiaye, PhD,†

Patrick Netter, MD, PhD,‡

Seiamak Bahram, MD, PhD,*

Jean-Yves Jouzeau, PharmD,

PhD,‡ Laurent Peyrin-Biroulet,

MD, PhD,† Philippe Georgel,

PhD,*§ and David Moulin,

PhD*,§,¶

*Immunorhumatologie
Moléculaire, UMR_S 1109,
Strasbourg, France; †NGERE, UMR_

S954 INSERM-Université de Lorraine,
Vandœuvre Les Nancy, France;

‡IMoPA, UMR7365 CNRS-Université
de Lorraine, Vandœuvre Les Nancy,

France; §CHRU de Nancy, Contrat
d'interface, Vandœuvre Les Nancy,
France

Supported by: This work was supported partly by the French PIA project « Lorraine Université d'Excellence », reference ANR-15-IDEX-04-LUE; INSERM UMR_S 1109 and Institut Universitaire de France. ¶These authors contributed equally to this work.

Conflicts of Interest: Authors have no conflict of interest to declare.

Address correspondence to: Philippe Georgel, PhD, Immunorhumatologie Moléculaire, INSERM UMR_S 1109 Université de Strasbourg, Centre de Recherche d'Immunologie et d'Hématologie, 1 Place de l'Hôpital, 67085 Strasbourg France. E-mail: pgeorgel@unistra.fr

REFERENCES

- Hassan MI, Waheed A, Yadav S, et al. Zinc alpha 2-glycoprotein: a multidisciplinary protein. *Mol Cancer Res*. 2008;6:892-906.
- Rolli V, Radosavljevic M, Astier V, et al. Lipolysis is altered in MHC class I zinc-alpha(2)-glycoprotein deficient mice. *FEBS Lett*. 2007;581:394-400.
- Balaz M, Ukropcova B, Kurdiova T, et al. Adipokine zinc-α2-glycoprotein regulated by growth hormone and linked to insulin sensitivity. *Obesity (Silver Spring)*. 2015;23:322-8.
- Na HS, Kwon JE, Lee SH, et al. Th17 and IL-17 cause acceleration of inflammation and fat loss by inducing α2-glycoprotein 1 (AZGP1) in rheumatoid arthritis with high-fat diet. *Am J Pathol*. 2017;187:1049-58.

Résumé

De nombreuses cellules immunitaires appartenant à l'immunité de type 3 (en particulier Th17 et ILC3) sont localisées dans *la lamina propria* de l'intestin. Les micro-organismes du microbiote stimulent constamment le système immunitaire afin de le maintenir en veille face à de potentiels agents infectieux, tout en ayant une tolérance pour les micro-organismes commensaux (Rôle de « pare-feu »). Plusieurs études récentes ont démontré des anomalies du microbiote intestinal (ou dysbiose) dans les rhumatismes inflammatoires chroniques. Ceci suggère une dérégulation de l'immunité mucosale digestive dans la survenue de l'inflammation articulaire. En effet, certaines cellules de l'immunité mucosale après activation au contact du microbiote, pourraient migrer vers les sites articulaires, impliquant notamment des récepteurs aux chimiokines. Le facteur de transcription ROR γ t dont l'expression est indispensable à la différenciation des cellules de l'immunité de type 3, peut être régulé négativement par le récepteur nucléaire PPAR γ .

A l'aide de modèle murins, nous avons étudié la conséquence de l'invalidation de PPAR γ et de l'inhibition du récepteur aux chimiokines CCR3 sur les relations entre sphère digestive et articulaire.

Dans un premier temps, nous avons montré que l'induction d'une colite expérimentale au cours du développement d'une arthrite induite au collagène modifie le microbiote intestinal, retarde l'apparition et diminue la sévérité des lésions articulaires. Nous avons ensuite démontré que les souris déficientes pour le récepteur PPAR γ développent spontanément une inflammation articulaire associées à des anomalies dans la répartition des cellules immunitaires de type 3 de la muqueuse intestinale. Ces souris sont dysbiotiques avec une flore enrichie notamment en entérobactéries anaérobies facultatives, mais non-arthritogène après transfert fécal. Enfin, nous démontrons que l'inhibition du récepteur CCR3 au cours du développement d'une arthrite au collagène retarde et diminue la sévérité de la pathologie et altère la répartition des populations leucocytaires au sein des articulations et de la muqueuse intestinale.

Mots clé : Arthrite, Immunité, microbiote, PPAR γ , CCR3

Abstract

Numerous type 3 immune cells (Th17 and ILC3) are physiologically located in lamina propria of the intestine. Microbial agents within the gut shape the immune system to make it efficient against threats but peaceful with commensals. Recent studies demonstrated changes in gut microbiota composition (dysbiosis) in chronic inflammatory rheumatism. These results suggest a role for mucosal immunity alteration in articular inflammation occurrence. Indeed, some type 3 immune cells once activated by microbiota, are thought to migrate to joints, involving notably chemokines receptors. Transcription factor ROR γ t, the master regulator of type 3 immune cells, could be negatively regulated by nuclear receptor PPAR γ .

Using experimental murine models, we studied the consequence of PPAR γ deficiency and consequence of the chemokine receptor CCR3 inhibition on the joint-gut axis.

Firstly, we demonstrated that experimental colitis induces microbiota changes, delays and reduces collagen-induced arthritis severity. Secondly, we showed that PPAR γ deficient mice display spontaneous joint inflammation associated with abnormal type 3 distribution within the gut. Dysbiosis with enrichment in facultative anaerobic Enterobacteriaceae was found in these mice. Fecal microbiota transfer demonstrated this microbiota is non-arthritogenic. Finally, we demonstrated that CCR3 inhibition has profound anti-arthritic potencies associated with changes in leukocytes distribution within the joint-gut axis.

Keywords: Arthritis, Immunity, Microbiota, PPAR γ , CCR3

