



HAL
open science

Identification, quantification et caractérisation de l'ADN mitochondrial au cours de la polyarthrite rhumatoïde

Stéphane Mitrovic

► **To cite this version:**

Stéphane Mitrovic. Identification, quantification et caractérisation de l'ADN mitochondrial au cours de la polyarthrite rhumatoïde. Médecine humaine et pathologie. 2015. dumas-01165082

HAL Id: dumas-01165082

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01165082v1>

Submitted on 18 Jun 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Bordeaux
U.F.R. DES SCIENCES MEDICALES
N° 3009

Thèse pour l'obtention du
DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement

Le 31 mars 2015

Par

Stéphane MITROVIC

Né le 08 mars 1985 à Belgrade, Serbie

**Identification, quantification et caractérisation de l'ADN mitochondrial au cours de la
polyarthrite rhumatoïde**

Directeur de Thèse

Monsieur le Professeur Christophe RICHEZ

Rapporteur

Monsieur le Docteur Hang-Korng EA

Membres du Jury

Monsieur le Professeur Thierry SCHAEVERBEKE.....Président

Monsieur le Professeur Patrick BLANCO.....Juge

Monsieur le Docteur Pierre DUFFAU.....Juge

Monsieur le Docteur Benjamin FAUSTIN.....Juge

Année universitaire 2014-2015

REMERCIEMENTS

Au Professeur Thierry Schaeverbeke, pour sa confiance et son soutien tout au long de ces cinq dernières années, pour m'avoir donné l'opportunité de m'investir dans la vie et les travaux universitaires, ainsi qu'au sein de la Société Française de Rhumatologie ; pour ses qualités cliniques et pédagogiques exceptionnelles. Merci pour l'honneur et l'amitié qu'il me fait en ayant accepté de présider le Jury.

A mon Directeur de Thèse, le Professeur Christophe Richez, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail en soutenant ma candidature de Master 2, et pour son encadrement scientifique. Merci également de m'avoir permis, en tant que coordonnateur de DES, de m'investir dans la formation clinique des internes et des étudiants, ainsi que pour ses conseils, son soutien et son partage d'expérience sur le parcours hospitalier et universitaire.

Au Docteur Pierre Duffau, pour son encadrement scientifique et ses conseils, pour m'avoir transmis ses « astuces de paillasse », pour avoir été avec Christophe l'un des deux coordonnateurs principaux de ce projet.

Au Professeur Patrick Blanco pour être revenu des Etats-Unis avec une grande soif de « results », me poussant à me surpasser afin de mettre au point sur les dernières semaines la manipulation expérimentale sur le RANK-L. Pour son humour, notamment en me faisant croire quelques semaines avant la soutenance que celle-ci était reportée.

Au Docteur Benjamin Faustin, pour son aide dans l'approfondissement de mes connaissances du métabolisme mitochondrial, pour sa bonne humeur, pour son humour et les agréables moments passés en sa compagnie au CIRID.

Au Docteur Hang-Korng Ea, pour m'avoir fait l'honneur d'être mon Rapporteur, pour ses grandes qualités pédagogiques lors des enseignements théoriques du Master 2, et avec qui je me réjouis d'avance de travailler prochainement lors de mon stage d'inter-CHU à l'Hôpital Lariboisière.

A toute « l'équipe Blanco » :

- au Docteur Anne Contis pour avoir ouvert la voie à ce travail, pour sa disponibilité, pour toutes les heures passées à chercher ensemble des solutions, pour son amitié ;
- à Isabelle Douchet pour son aide, et notamment dans la mise au point des techniques de cytométrie en flux ;

- au Docteur Liliane Khoryati, pour ses grandes compétences scientifiques et humaines, pour avoir été mon « ange gardien » à la paillasse, toujours disponible pour m'aider et m'enseigner la rigueur dans la réalisation des manipulations expérimentales ; merci également pour son sens de l'esthétisme et sa maîtrise des logiciels informatiques qui lui ont permis avec brio d'adapter les trois figures de l'article que j'avais griffonnées sur un brouillon ; merci enfin pour son amitié.
- aux Docteurs Marie-Elise Truchetet et Cécile Contin-Bordes, pour leurs remarques constructives, leur rigueur scientifique et pour m'avoir permis de bénéficier de leur expérience ; à Jorge, pour sa bonne humeur brésilienne ; je lui souhaite tout le meilleur pour la suite, en espérant que tous ses rêves se réalisent.
- au Docteur Estibaliz Lazaro, pour sa bienveillance, ses grandes qualités pédagogiques et humaines ; je garderai également un excellent souvenir de mon passage au G2.

A Rodrigue Rossignol et à Julie Lavie, pour leur aide dans la réalisation la gamme d'ADN mitochondrial, sans laquelle ce projet n'aurait pas pu voir le jour.

Au Professeur Jean-François Moreau pour son amitié, et les longs moments passés à parler de la Science, de la Médecine, de l'Histoire, de la Philosophie... en un mot, de la Vie. Je lui souhaite un excellent périple en bicyclette le long du Beau Danube Bleu.

A mon compagnon « d'aquarium » Florent Guerville, pour son amitié. Je garderai un excellent souvenir de toutes nos discussions, de nos parties de ping-pong post-prandiales, des festivals de jazz, et de son fameux tiramisu. Je lui souhaite une bonne continuation tant sur le plan professionnel, que personnel avec sa délicieuse petite famille.

A toute l'équipe du CIRID :

- Sophie, pour sa disponibilité et sa dextérité pour couler un gel, « Tatie » Séverine pour ses taquineries bienveillantes, Vincent, fin gourmet, pour son aide informatique et en cytométrie, Myriam pour être Mimi, Xavier pour ses imitations entre 2 PCR, Sonia pour m'avoir laissé utiliser toute sa protéinase K, Santiago et Annie. Au Docteur Julie Dechanet-Merville pour sa gentillesse et sa bienveillance envers les étudiants.
- Avec une pensée particulière pour mes doctorantes et leur bienveillance : Jenny pour m'avoir permis de piquer régulièrement dans ses sachets de thé ; Camille pour m'avoir glissé discrètement des confiseries sur mon bureau lorsque mes journées étaient un peu trop longues ; Angela, la più bella ragazza, pour la force de son rire et ses cellules Jurkat ; Aya, pour sa gentillesse.

A Driss Farhi, pour m'avoir initié à la complexité de la Recherche Clinique et des protocoles lors de mon passage en Hôpital de Jour. Pour son amitié, et pour tous les moments agréables passés en sa compagnie et celle de sa délicieuse famille.

Au Docteur Adel Belazzoug, mon ami, mon frère, pour avoir partagé avec moi ses talents de clinicien et son Amour de la Rhumatologie, pour m'avoir laissé le battre au tennis mais pas au football. Un grand merci également à son épouse, le Docteur Fella Lamraoui, et à leurs deux magnifiques enfants, pour tous les beaux souvenirs qu'ils m'ont laissé.

A Sandrine, pour m'avoir avec Driss, permis d'approfondir ma connaissance en Recherche Clinique. Un grand merci également pour son amitié, et son immense aide lorsque j'avais organisé le Séminaire annuel de la Section des Rhumatologues en Formation de la Société Française de Rhumatologie. A Omar pour les agréables moments passés ensemble à l'Hôpital de Jour.

Au Docteur Mido Sabbagh, pour son amitié, pour son immense expérience clinique et sa passion pour notre spécialité. En espérant qu'un jour prochain la paix reviendra dans son pays, et qu'il pourra me faire visiter Alep.

A Edith Bruniquel, pour son amitié. A son époux Jérôme, et leur petit Raphaël, et pour tous les agréables moments passés en leur compagnie.

A toute l'équipe soignante du Service de Rhumatologie, de loin les meilleures infirmières, aides-soignantes et ASH qu'il m'ait été donné de voir. Je garderai d'excellents souvenirs de mon passage dans le service, ainsi que du magnifique T-Shirt « Rhumatos boy » qu'elles m'imprimèrent. A Madame Castaing, notre cadre de santé.

A mes très chères Annick et Françoise, pour leur gentillesse et leur sourire, et pour m'avoir ouvert des box de consultation afin de pouvoir travailler aux heures tardives.

Aux Docteurs Nadia Mehzen et Nicolas Poursac, pour leur gentillesse, leur disponibilité et leur bienveillance envers les internes.

A Thomas Barnetche, notre bio-expert, pour son initiation au monde des statistiques et à la gastronomie du pays basque.

Au Docteur Agnès Monnier, pour son sens clinique, son humour, son initiation à l'échographie et à la Rhumatologie. Au Docteur Stéphane Marcé, pour m'avoir enseigné l'adage, maintes fois vérifié que « la Rhumatologie mène à tout ». Je complèterais volontiers que « tout mène à la Rhumatologie ».

A mes co-internes du 4^e aile 1, pour leur sympathie et leur amitié lors des dernières semaines d'écriture de la thèse, et pour avoir accepté de servir de « cobayes » afin de me permettre de m'exercer à l'échographie ostéo-articulaire.

A Alexandre Duvignaud, à qui je souhaite une brillante carrière, pour m'avoir enseigné l'histioplasmosse américaine et d'autres raretés tropicales. A Hervé Dutronc, en espérant que notre travail sur les infections ostéo-articulaires à entérocoques aboutira à un joli papier.

A Martin Caudron, mon ami, mon frère, pour toutes ces longues années d'amitié, et pour toutes les fois où il m'a hébergé lorsque je venais à Paris en DU ou congrès. A mon ami Arnaud Cortet, qui passe sa thèse prochainement.

A Emmanuel, son épouse Anca, et leur deux enfants, pour leur amitié.

Enfin, je souhaiterais dédier cette thèse à ma famille :

A mes parents, Zoran et Mirjana, pour leur Amour et le mal qu'ils se sont donnés afin de permettre à leur fils de devenir médecin.

A mon frère, Serge, et ma sœur, Katarina, pour m'avoir supporté pendant toutes ces longues années d'études médicales. En espérant que ma sœur choisira le moment venu d'exercer la plus belle des spécialités qu'est la Rhumatologie.

A Katia.

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations	10
Résumé en français	11
Résumé en anglais	12
Sommaire de la Thèse	
I. Introduction	13
I-1-L'évolution des concepts fondateurs de l'immunologie.....	13
<i>I-1-1. Réaction vis à vis d'un organisme étranger</i>	13
<i>I-1-2. Le soi et le non-soi</i>	14
<i>I-1-3. Les marqueurs du soi et de la co-stimulation</i>	14
<i>I-1-4. L'hypothèse du non-soi infectieux de Janeway</i>	15
I-2- Le modèle Danger.....	16
<i>I-2-1. Le concept Danger</i>	16
<i>I-2-2. Classification des PRRs</i>	18
<i>I-2-3. Généralités sur les TLRs</i>	19
<i>I-2-4. Généralités sur les NLRs et l'inflammasome</i>	22
<i>I-2-5. Généralités sur les récepteurs RAGE</i>	24
I-3- L'ADN mt : un nouveau signal de Danger, voire une alarmine ?.....	25
<i>I-3-1. Origine et structure de l'ADN mt</i>	25
<i>I-3-2. ADN mt et inflammation</i>	27

A. Elévation de l'ADN mt extracellulaire en contexte inflammatoire.....	27
B. Rôle pro-inflammatoire de l'ADN mt.....	28
B.1 Modèles in vitro.....	28
B.2 Modèles animaux.....	28
C. Cibles de l'ADN mt et voies de signalisation intracellulaires.....	29
C.1 Ilôts CpG et TLR9 endosomaux.....	29
C.2 ADN mt oxydé et inflammasome	31
C.3 Régulation par la mitophagie.....	32
D. Autres DAMPs mitochondriaux associés à l'ADNmt.....	33
E. Sources et mécanismes de libération.....	35
F. Cellules cibles.....	36
I-3-2. L'ADN mt : une alarmine ?.....	36
I-4 Brefs rappels sur la physiopathologie de la PR.....	37
I-4-1. Phase de déclenchement.....	38
I-4-2. Phase d'inflammation.....	39
I-4-3. Phase de destruction articulaire.....	41
I-4-4. Le système RANK/RANKL.....	41
II. Hypothèses et objectifs de travail.....	43
III. Matériel et méthodes.....	44
III-1-Population étudiée et recueil des échantillons sanguins et articulaires.....	44
III-2-Analyse des échantillons par biologie moléculaire.....	45
III-2-1. Purification des liquides synoviaux et des plasmas.....	46
III-2-2. Analyse des échantillons par PCR qualitative.....	46

III-2-3. Analyse des échantillons par PCR quantitative.....	47
A. Etablissement de la gamme d'ADN mt.....	47
B. Protocole de qPCR pour quantifier l'ADN mt extracellulaire.....	48
C. Isolement des PNN sanguins et articulaires.....	48
D. Purification des PNN isolés et analyse en qPCR de leur contenu en ADN mt intracellulaire.....	49
III-3-Recherche de la présence de TFAM dans les LS par Western Blot.....	50
III-3-1. Dosage des protéines par méthode BCA (Bicinchoninic acid Assay).....	50
III-3-2. Réalisation des Western Blot anti-TFAM.....	50
III-4-Elisa 8-oxodG.....	51
III-5- Etude de l'expression de RANK-L par les PNN après incubation avec l'ADN mt..	52
III-5-1. Recueil d'ADN mt à partir de cellules JRT3.....	52
III-5-2. Isolement des PNN à partir de sang de donneurs d'hémochromatose.....	52
III-5-3. Mise en culture des PNN.....	52
III-5-4. Préparation des PNN pour analyse en cytométrie.....	53
III-6-Statistiques.....	53
IV Résultats	54
IV-1- Caractéristiques des patients étudiés.....	54
IV-2- Détection d'ADN mt extracellulaire dans les échantillons.....	57
IV-3- Quantification de l'ADN mt extracellulaire dans les échantillons.....	58
IV-4- Analyse de la corrélation entre l'activité de la PR et la quantité d'ADN mt extracellulaire.....	59
IV-5- ADN mt extracellulaire et autres caractéristiques de la population.....	63

IV-6- Le PNN source d'ADN mt extracellulaire dans la PR : analyse de son contenu intracellulaire.....	64
IV-7- Caractéristiques pro-inflammatoires de l'ADN mt.....	68
<i>IV-7-1. Recherche de la protéine pro-inflammatoire TFAM par Western-Blot.....</i>	<i>68</i>
<i>IV-7-2. Dosage du motif 8-oxodG par ELISA.....</i>	<i>70</i>
IV-8- L'incubation de PNN sanguins avec de l'ADN mt induit l'expression de RANK-L à leur surface cellulaire.....	73
V. Discussion.....	76
V-1- Identification et quantification de l'ADN mt extracellulaire dans la PR.....	76
V-2- Analyse entre la corrélation entre l'activité de la PR et la quantité d'ADN mt extracellulaire.....	76
V-3- Le PNN articulaire : source d'ADN mt extracellulaire dans la PR ?.....	77
V-4- Un phénomène non spécifique de la PR mais lié à l'inflammation ?.....	78
V-5- Recherche de la protéine inflammatoire TFAM dans le LS.....	79
V-6- Caractérisation de l'ADN mt : recherche du motif 8-oxodG.....	80
V-7- ADN mt et RANK-L : un lien physiopathologique direct ?.....	81
Bibliographie.....	84
Annexes.....	91
Ebauche d'article.....	94
Serment d'Hippocrate	117

Liste des abréviations :

8-oxodG : 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine
ADN mt : ADN mitochondrial
AM : arthrites microcristallines
Anti-CCP : anticorps anti-peptides citrullinés
CCA : chondrocalcinose articulaire
CpG: Cytosine phosphodiester bond Guanine
CRP : C- Reactive Protein
DAMPs : Danger Associated Molecular Patterns
DAS 28 : Disease Activity Score sur 28 articulations
dNTP : désoxyribonucléotides triphosphates
FR : Facteur Rhumatoïde
IL : interleukine
LPS : lipopolysaccharide
LS : liquide synovial
NaCl : chlorure de sodium
OA : arthrose
PAMPs : Pathogen Associated Molecular Patterns
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCR : Polymerase Chain Reaction
PNN: polynucléaire neutrophile
PR: polyarthrite rhumatoïde
PRR: Pattern Recognition Receptor
qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction
RANK : receptor activator of NFκ-B
RANK-L : receptor activator of NFκ-B ligand
TAE : Tris-Acétate-EDTA
TLR : Toll Like Receptor
TNF: Tumor Necrosis Factor
X-gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

Résumé

Introduction : L'ADN mitochondrial (ADN mt) présente de fortes homologies avec l'ADN bactérien. Plusieurs travaux récents suggèrent que cet ADN mt peut se comporter comme une alarmine, notamment en contexte inflammatoire.

Objectifs : Identifier et quantifier cet ADN mt dans le liquide synovial (LS) et le plasma de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR), et rechercher la présence de caractéristiques pro-inflammatoires. Etudier le rôle de l'ADN mt sur le système RANK/RANK-L.

Matériels et méthodes : Les plasmas et LS de patients atteints de PR et d'arthrose (OA) ont été obtenus auprès du service de Rhumatologie du CHU de Bordeaux dans le cadre de soins courants. Ils ont d'abord été purifiés sur colonnes, avant de rechercher et quantifier leur contenu en ADN mt extracellulaire par PCR quantitative (qPCR). Les polynucléaires neutrophiles (PNN) ont également été isolés à partir des mêmes échantillons et purifiés. Leur contenu en ADN mt intracellulaire a été évalué par qPCR. Nous avons recherché dans les LS par Western-Blot la protéine TFAM (mitochondrial transcription factor A), connue pour son association à l'ADN mt et son rôle pro-inflammatoire. La recherche d'oxydation excessive de l'ADN mt de PR par rapport aux témoins a été réalisée par la recherche de séquences pro-inflammatoires 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) en ELISA. Les PNN ont été incubés avec de l'ADN mt extrait de cellules JRT3, avant d'être passés en cytométrie de flux pour rechercher si la stimulation par l'ADN mt pouvait entraîner une augmentation de l'expression membranaire de RANK-L.

Résultats :

1) Les LS de PR (n=27) contiennent statistiquement plus de copies d'ADNmt que les LS d'arthroses (n=12) : moyenne +/- SD de 749147 copies/mL +/- 310 776 versus 5460 copies/mL +/- 4507, p=0,0007, test de Kruskal-Wallis. Ce taux moyen d'ADN mt extracellulaire était d'autant plus important que l'activité de la maladie était importante.

2) Les taux étaient statistiquement plus élevés dans les plasmas de PR (n=40) comparativement aux plasmas de témoins sains (n=15) : respectivement moyenne +/- SD de 124989 copies/mL +/- 25952 versus 24210 copies/mL +/- 11067, p=0,0237, test de Kruskal-Wallis.

3) Chez les sujets avec PR, le contenu intracellulaire en ADNmt, évalué par le ratio ADN mt/ADN nucléaire moyen, est 4,59 fois plus élevé à l'intérieur des PNN sanguins qu'à l'intérieur des PNN articulaires.

4) La protéine TFAM n'est retrouvée que de façon inconstante dans les LS de PR (6 sur 14), mais jamais dans les LS d'OA.

5) Nous n'avons pas mis en évidence d'augmentation du taux de 8-oxodG dans l'ADN de nos patients PR comparativement aux contrôles.

6) L'incubation de PNN sanguins avec de l'ADN mt induit l'expression de RANK-L à leur surface cellulaire.

Conclusion : Le LS de PR se caractérise par des taux augmentés d'ADN mt extracellulaire comparativement aux sujets arthrosiques. En revanche, les PNN du LS ont un taux d'ADN mt intracellulaire abaissé, suggérant que ces cellules pourraient être la source de l'ADN mt libéré dans l'articulation. L'ADN mt stimule l'expression membranaire de RANK-L à la surface des PNN, et pourrait ainsi contribuer directement à la physiopathologie de la PR.

Mots-Clés : polyarthrite rhumatoïde, ADN mitochondrial, DAMP, alarmine, polynucléaire neutrophile, RANK-L

Abstract

Introduction: Mitochondrial DNA (mtDNA) is very similar to bacterial DNA. Recent works suggest that this mtDNA could act like an alarmine, especially in inflammatory situations.

Objectives: To identify and quantify this mtDNA in synovial fluids (SF) and plasma of patients suffering from rheumatoid arthritis (RA), and to search proinflammatory characteristics. To study the putative role of mtDNA on the RANK/RANK-L system.

Material and Methods: The plasma and SF of patients suffering from osteoarthritis (OA) were collected from the Rheumatology department of the Teaching Hospital of Bordeaux, during current medical acts. The samples were first purified on special kits, before searching and quantifying extracellular mtDNA through quantitative PCR (qPCR). The polymorphonuclears (PMNs) were also isolated from the same samples and purified. We searched through Western-Blotting of the SF the mitochondrial transcription factor A (TFAM), well known for its association to mtDNA and its proinflammatory role. We searched an excessive oxidation of mtDNA in RA DNA samples compared to controls through ELISA quantification of proinflammatory 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG) motives. PMNs were incubated with mtDNA extracted from JRT3 cells, and were then analysed through flow-cytometry to check whether PMNs stimulation by mtDNA could up-regulate RANK-L expression on their membranes.

Results:

- 1) RA SF (n=27) contain statistically more mtDNA copies than OA SF (n=12): mean 749147 copies/mL +/- SD 310776 versus 5460 copies/mL +/- 4507, p=0,0007, Kruskal-Wallis test. The higher the disease activity was, the higher this mean extracellular mtDNA level was.
- 2) The levels were statistically higher in RA plasma (n=40) when compared to healthy donors plasma (n=15): respectively mean of 124989 copies/mL +/- 25952 versus 24210 copies/mL +/- 11067, p=0,0237, Kruskal-Wallis test.
- 3) In patients with RA, the intracellular mt DNA content, evaluated through mt DNA/ nuclear mean ration, was 4,59 times higher inside the blood PMN than inside the articular PMNs.
- 4) TFAM was inconstantly found in RA SF (6 out of 14), but never in OA SF.
- 5) There was no increased level of 8-oxo-dG in RA DNA when compared to healthy subjects.
- 6) The incubation of PMNs with mtDNA up-regulates RANK-L expression on the cellular membrane of these cells.

Conclusion: RA SF have higher levels of extracellular mt DNA compared to OA SF. On the contrary, SF PMNs have a decreased intracellular level of mtDNA, suggesting that those cells could be a source of mt DNA liberation in the joint. Mitochondrial DNA stimulates RANK-L expression on the cellular membrane of PMNs. Thus, mtDNA could directly contribute to RA physiopathology.

Key-words: rheumatoid arthritis, mitochondrial DNA, DAMP, alarmine, polymorphonuclear, RANK-L

I. Introduction

La polyarthrite rhumatoïde (PR) représente le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires chroniques (1). Elle est caractérisée par des synovites persistantes, la production d'auto-anticorps (facteurs rhumatoïdes et anticorps anti-peptides citrullinés) et de cytokines pro-inflammatoires (telles le TNF- α , l'IL-1 β , IL-6), cibles des biothérapies utilisées en routine dans la prise en charge des patients. L'origine de la réponse inflammatoire synoviale observée au cours de la PR reste mal connue même si l'apport des modèles animaux et la surreprésentation des polynucléaires neutrophiles (PNN) dans le liquide synovial (LS) laissent entrevoir un rôle primordial de la réponse immunitaire innée (2). S'il est aujourd'hui couramment admis que cette immunité innée fonctionne par reconnaissance de signaux de danger grâce à des récepteurs ancestraux appelés PPRs (Pattern Recognition Receptors), le système immunitaire a pendant des années été théorisé autrement.

Après de brefs rappels historiques sur l'évolution des concepts fondateurs de l'immunologie, nous nous attarderons à décrire le modèle Danger de Polly Matzinger. Puis, nous verrons que l'abondance de la littérature converge vers le fait que l'ADN mitochondrial (ADN mt) présente toutes les caractéristiques d'un signal de danger, voire d'une alarmine, capable d'activer le système immunitaire. Enfin, après avoir rappelé les principaux acteurs impliqués dans la physiopathologie de la PR, nous émettrons nos principaux objectifs et hypothèses de travail.

I-1- L'évolution des concepts fondateurs de l'immunologie

I-1-1. Réaction vis-à-vis d'un organisme étranger

On peut dater la naissance de l'immunologie moderne vers la fin du 19^{ème} siècle, lorsque Elie Metchnikoff (3) puis Paul Ehrlich (4) vont successivement décrire la phagocytose d'une bactérie par une cellule sanguine de la lignée blanche, un polynucléaire. Cette première description d'une réaction de défense cellulaire vis-à-vis d'un organisme

étranger, une bactérie, va sceller la conception initiale du système immunitaire : celui-ci sert à se protéger des éléments étrangers, c'est à dire des pathogènes.

I-1-2. Le soi et le non-soi

Cependant, la découverte du premier auto-anticorps par Erik Waaler en 1940 va bouleverser ce concept (5) : si des anticorps produits par l'organisme sont capables de reconnaître tout type d'antigène, y compris des auto-antigènes, comment se fait-il que nous ne développons pas systématiquement d'auto-immunité ? Un nouveau paradigme majeur va alors être décrit par Burnet : la nécessité de distinguer le soi du non-soi (6). Selon cette théorie, la réaction immunitaire est le fruit d'une discrimination entre le soi et le non-soi qui s'acquiert au début de la vie (7). Cette théorie va dominer le raisonnement immunologique pendant des décennies. L'idée de Burnet est qu'effectivement le système immunitaire est capable initialement de tout reconnaître, le soi et le non soi, mais que tout ce qui est présenté très précocement dans la vie au système immunitaire est assimilé au soi immunologique. Le système immunitaire tolère naturellement ce soi immunologique. La tolérance n'est pas un défaut de réponse : contrairement à l'immuno-déficience, elle est spécifique et s'accompagne d'une immunité secondaire. L'auto-immunité serait la conséquence d'un défaut de tolérance, par exemple une rupture de tolérance induite par un mimétisme moléculaire entre des épitopes bactériens et des épitopes du soi.

I-1-3. Les marqueurs du soi et de la costimulation

La découverte à la même époque des marqueurs du soi (le complexe majeur d'histocompatibilité) par Jean Dausset donnera du crédit à cette hypothèse (8), en montrant par la suite que, non seulement les groupes HLA sont un marqueur du soi, mais qu'ils participent directement à la réponse immunitaire en présentant l'antigène au lymphocyte. Un autre élément majeur semble confirmer cette théorie avec la description de la costimulation par Lafferty et Cunningham en 1974 (9) : la molécule HLA présente bien l'antigène au lymphocyte T qui reconnaît spécifiquement le couple formé par l'antigène et la molécule HLA (la réponse est dite restreinte à la molécule HLA) (10). Cependant, cette présentation ne suffit pas à déclencher une activation du lymphocyte T. Les lymphocytes T seraient constitutionnellement inactifs ; pour être activés, ils doivent recevoir un second

signal de costimulation (**figure 1**). Celui-ci n'intervient que si la cellule présentatrice d'antigène (CPA) est activée.

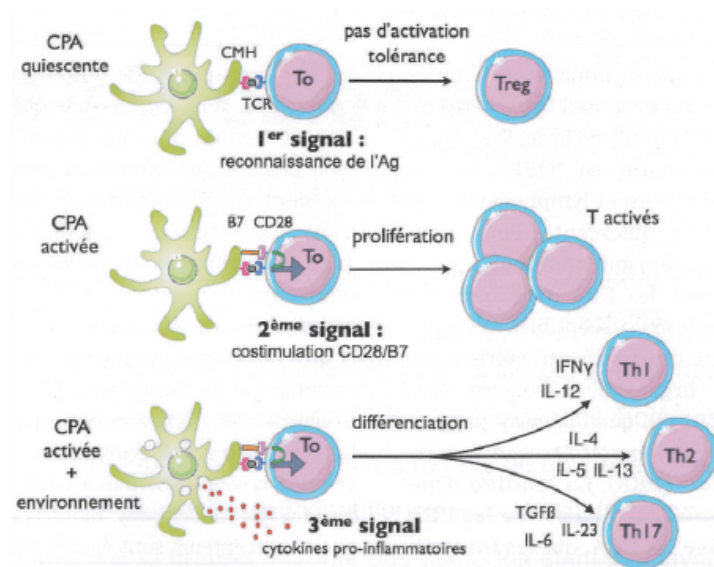


Figure 1 : La réponse immunitaire adaptative repose sur 3 signaux fournis par la cellule présentatrice d'antigène (cellule de l'immunité innée). Le signal 1 correspond à la reconnaissance d'un antigène spécifique par le récepteur du lymphocyte T (TCR), réponse restreinte à la molécule HLA qui présente l'antigène. Le signal 2 est fourni par des molécules de costimulation (B7-CD28) ; il est indispensable à l'activation du lymphocyte T ; l'absence du signal 2 aboutit à une tolérance de l'antigène. Le signal 3 est apporté par l'environnement cytokinique dans lequel s'opère l'activation du lymphocyte ; c'est lui qui déterminera l'orientation de la différenciation lymphocytaire vers un lymphocyte Th1, Th2 ou TH17 (d'après (11)).

Cette théorie de la réponse immunitaire reposant sur le principe de la discrimination du soi et du non-soi a cependant de nombreuses limites : tous les auto-antigènes ne sont pas présents dès le début de la vie. Comment expliquer que les bouleversements qui accompagnent la puberté ne s'accompagnent pas d'un rejet immunitaire ? Et puis quelle est la cause de l'activation des CPA à l'origine du second signal ?

I-1-4. L'hypothèse du non soi-infectieux de Janeway

C'est là qu'intervient une nouvelle théorie en 1989 : l'hypothèse du non-soi infectieux (12). Charles Janeway propose qu'à l'état de base, le système immunitaire est

« OFF » : macrophages, CPA et lymphocytes sont inactifs, quiescents. Pour assurer la discrimination entre soi et non-soi, les CPA expriment des récepteurs susceptibles de reconnaître des motifs caractéristiques des organismes éloignés comme les bactéries, appelés PRR (pattern-recognition receptors) (13). Ainsi, la fixation d'antigènes bactériens sur les PRR active les CPA, qui les internalisent et les chargent sur les molécules du CMH. Les CPAs activées expriment des molécules de co-stimulation pour activer les lymphocytes T.

Cette hypothèse séduisante a permis de poser les jalons de l'identification des différents PRR dont les TLR (Tolls-Like Receptors) ou les NLR (Nod-like receptors), que nous décrivons dans le paragraphe suivant. Elle explique élégamment comment les réponses immunitaires peuvent être induites par les agents infectieux, ou majorées par des adjuvants contenant des motifs microbiens. Cependant, ce modèle présente également de nombreuses limites, car il ne permet pas d'expliquer les réponses immunitaires observées dans les maladies auto-immunes, auto-inflammatoires ou allergiques. Il ne permet pas non plus d'expliquer les rejets de greffe et la réaction du greffon contre l'hôte. De même, comment expliquer la tolérance aux très nombreuses bactéries symbiotiques qui composent le microbiome ? Enfin, les TLR ne reconnaissent pas que des motifs étrangers, mais ont également des ligands endogènes (14) : Hsp70 et neurotoxine dérivée de l'éosinophile pour TLR2, des Heat-Shocks proteins (Hsp60 et Hsp70), le motif répété de type III de la fibronectine, des oligosaccharides d'acide hyaluronique, des fragments polysaccharidiques d'héparane sulfate et le fibrinogène pour TLR4. Le TLR9, quant à lui, est capable de reconnaître des fragments d'ADN hypométhylés riche en motif CG. L'ADN mitochondrial qui répond à ces caractéristiques pourrait donc se comporter comme un ligand endogène.

I-2- Le modèle Danger

I-2-1. Le concept Danger

En 1994, Polly Matzinger propose une hypothèse alternative au modèle du non-soi infectieux de Janeway pour expliquer l'activation du système immunitaire. Comme Janeway, Matzinger considère que la CPA est au cœur du déclenchement de la réponse. Mais alors que Janeway fait de l'identification de motifs infectieux l'élément moteur de l'activation de la cellule présentatrice, Matzinger propose que cette activation soit la

conséquence de la perception d'un danger, indépendamment de son origine étrangère ou endogène (15).

Selon le modèle Danger, les cellules présentatrices ne sont que des sentinelles réparties dans les tissus périphériques qui disposent de senseurs susceptibles de percevoir des lésions tissulaires et d'activer la réponse immunitaire lorsqu'elles captent des signaux danger émis par ces tissus. L'origine de la réponse immunitaire est déplacée de niveau. Si pour Janeway, la CPA est l'épicentre du système immunitaire, pour Matzinger la source de l'activation est le tissu dans lequel réside la cellule présentatrice. Le tissu lésé (par une infection, un traumatisme, un toxique...) émet des signaux Danger, des DAMPs (Danger Associated Molecular Patterns), et ce sont ces signaux de danger qui provoquent l'activation de la cellule présentatrice et qui la conduisent à exprimer des molécules de costimulation qui permettront l'activation de la réponse adaptative (16). Comme dans le modèle de Janeway, Matzinger suggère que le système immunitaire soit spontanément en position « OFF », ou tolérance, et qu'il soit nécessaire d'activer les cellules sentinelles que sont les cellules présentatrices pour déclencher une réaction de défense ; mais, pour elle, l'activation provient de signaux de détresses, émis par les cellules des tissus ou d'autres cellules de l'immunité innée (**figure 2**).

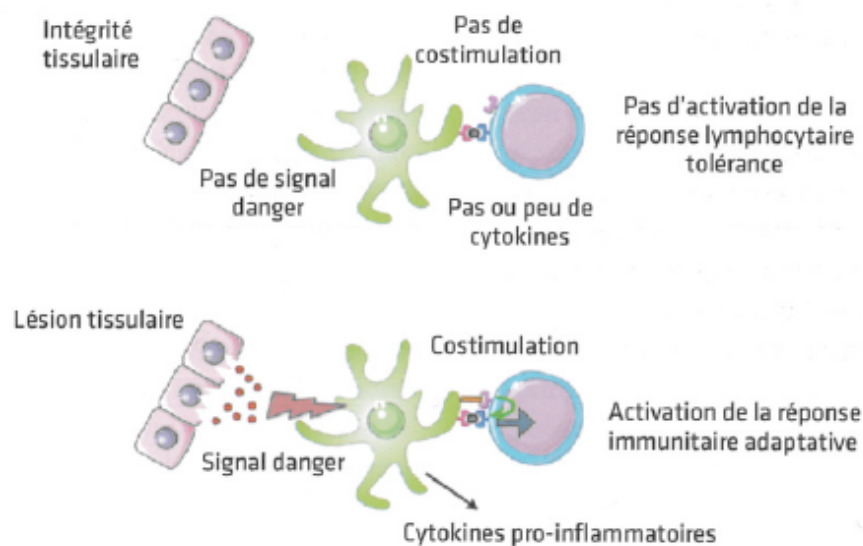


Figure 2 : schéma du modèle Danger de Polly Matzinger (d'après (11))

Un argument immunologique fort en faveur du modèle Danger de Matzinger consiste en ce que la réponse aux PAMPs varie en fonction de nombreux facteurs. La théorie de Janeway fait des PAMPs l'activateur principal du système immunitaire : ce modèle n'explique pas que la réponse immunitaire diffère selon que l'on ait affaire à un PAMP isolé, à des PAMPs multiples ou à une bactérie entière, selon qu'il s'agisse d'une bactérie morte ou vivante, d'un pathogène ou d'un commensal, ou encore pourquoi les vaccins antigéniques confèrent une immunité de moindre qualité qu'un contact avec un organisme vivant. Le modèle Danger explique beaucoup mieux toutes ces différences : dans tous les cas, le système immunitaire identifie un contact avec une particule étrangère, mais la réponse immunitaire ne sera sollicitée que si ce contact est associé à une lésion tissulaire ou signal de détresse qui témoigne de l'agression de l'organisme.

Parmi les principaux DAMPs, on retrouve : la protéine S100, les protéines du groupe HMGB1 (High Mobility Group Box 1), les heat shock protein, l'ATP, l'acide urique, ainsi que des ARN et ADN endogènes (17).

I-2-2. Classification des PRRs

La reconnaissance des PAMPs et DAMPs par les PRRs présents sur les cellules de l'immunité innée active des voies de signalisations intracellulaires qui permettent l'expression de molécules effectrices, dont les cytokines pro-inflammatoires, faisant le lien avec la réponse immunitaire adaptative spécifique. Parmi les PRR, on distingue deux sous-groupes (18):

- Les récepteurs qui induisent une phagocytose comme les récepteurs scavengers, les récepteurs du β -glucane ou encore les MBL (Mannan Binding Lectin) qui activent la voie lectine du complément.
- Les récepteurs qui n'induisent pas de phagocytose : les TLRs (Toll Like Receptors) et les NLR (Nucleotide Oligomerization Domain (NOD) Like Receptors). On retrouve également des récepteurs de description plus récentes, comme RAGE (pour receptor for advanced glycation end-products). (19)

I-2-3. Généralités sur les TLRs

Le nom de TLR vient de l'homologie avec une famille de molécule retrouvée chez la drosophile, dont le principal membre est Toll, identifié pour son rôle dans la réponse antifongique (20). Actuellement, la famille des TLRs est constituée de 10 récepteurs chez l'homme (**Figure 3, tableau 1**, (14,21)). Ils sont exprimés sur de nombreuses cellules du système immunitaire et plus particulièrement sur celles impliquées dans la première ligne de défense contre les pathogènes : les cellules dendritiques, les macrophages et les PNN. Les ligands des TLRs comprennent divers produits bactériens, viraux et fongiques, mais aussi certains ligands endogènes (22). Ainsi, le TLR2 reconnaît le peptidoglycane des cocci Gram positifs et le TLR4 interagit avec le lipopolysaccharide (LPS) des bacilles Gram négatifs mais aussi avec des DAMPs comme HMGB1 ou des heat shock protein (23).

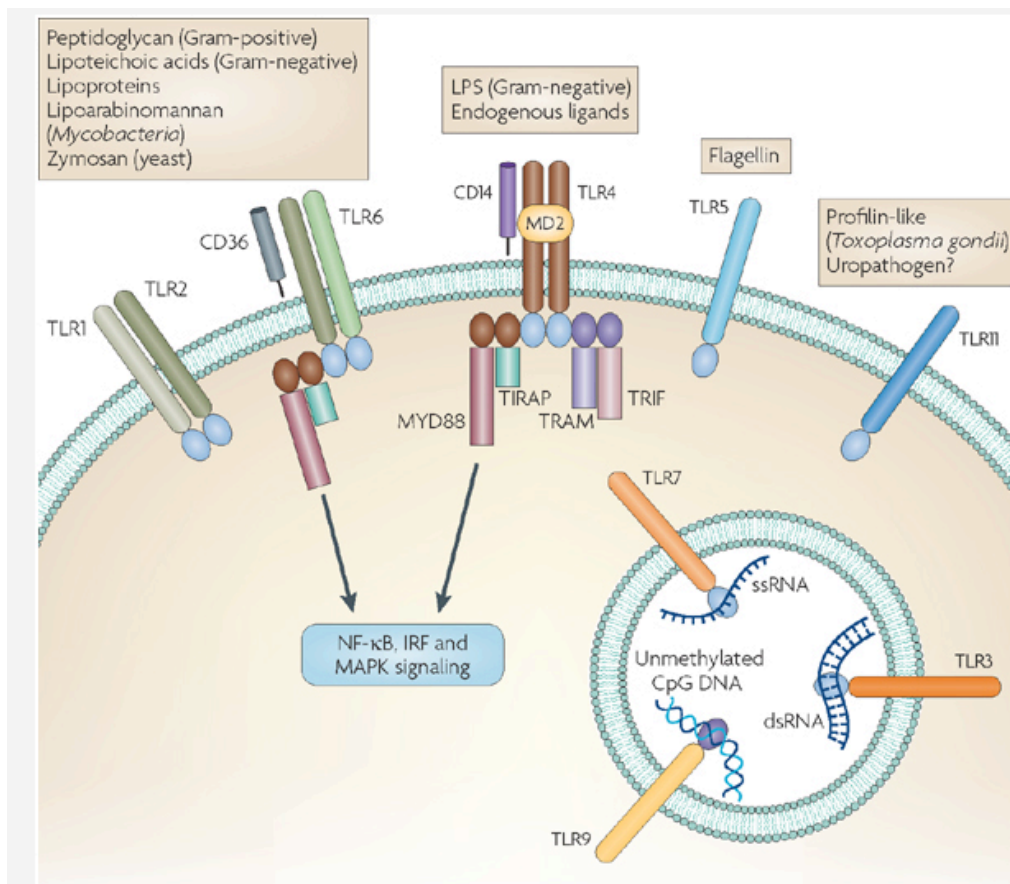


Figure 3 : les principaux TLR et leur ligand chez l'homme (d'après (21)) : les TLRs qui interagissent avec les ligands extracellulaires résident dans la membrane plasmique ; les TLRs qui fixent des ligands générés dans la cellule sont endosomaux. Certains TLRs forment des dimères avec d'autres TLRs ; TLR4 forme un homodimère

(et TLR5 pourrait le faire). D'autres TLRs peuvent fonctionner comme monomère, ou bien des partenaires dimériques qui doivent encore être découverts.

TLR	Ligands exogènes	Ligands endogènes	Produits synthétiques
TLR1	Triacyl des lipoprotéines	Inconnu	
TLR2	Lipoprotéines Peptidoglycane acides lipotéichoïques Lipoarabinomannane Glycosylphosphatidylinositol Phénolsoluble moduline Zymosan Glycolipides	HGMB1	
TLR3	ARN double brin viral	ARN double brin	Poly(I :C)
TLR4	LPS Taxol Glycoprotéines virales : • Protéine de fusion du VRS • Protéine d'enveloppe du MMTV	Cellules nécrotiques HSPs HMGB1 Fibronectine Composants de la matrice extracellulaire Acide gras Fibrinogène	MPLA
TLR5	Flagelline	Inconnu	
TLR6	Diacyl des lipoprotéines	Inconnu	
TLR7	ARN simple brin viral	ARN simple brin	Imidazoquinolines
TLR8	ARN simple brin viral	ARN simple brin	Imidazoquinolines
TLR9	ADN bactérien ou viral	ADN	
TLR11	Profiline	Inconnu	

Tableau 1 : les principaux TLRs chez l'homme et leurs ligands exogènes et endogènes (d'après (14)).

Si la majorité des TLRs sont exprimés à la surface cellulaire et interagissent avec l'environnement extra-cellulaire, les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont localisés dans le compartiment cytoplasmique au sein de l'endosome et reconnaissent des acides nucléiques (ARN double brin pour TLR3, ARN simple brin pour TLR 7 et 8 et îlots CpG d'ADN pour TLR9). Dans les conditions physiologiques, la localisation endosomale de ces TLRs permet d'éviter la reconnaissance de ligands acides nucléiques endogènes au profit d'acides nucléiques bactériens ou viraux (24). La localisation intracellulaire de ces TLRs nécessite donc l'internalisation et l'acheminement jusqu'au compartiment endolysosomal de leurs ligands respectifs. Ceci facilite l'accès des ADN et ARN microbiens aux TLRs. Toutefois, dans certaines situations pathologiques, des fragments d'acide nucléique du soi, couplés à des

molécules chaperonnes ou à des récepteurs peuvent être internalisés et responsables de complications auto-immunes.

La stimulation des TLRs par leurs ligands respectifs active des voies de signalisation intracellulaire utilisant des molécules partagées par les voies de signalisation du récepteur de l'IL-1. En effet, les TLRs sont composés de trois régions (25) :

- une région extra-cellulaire, riche en motifs structuraux appelés répétition riche en leucine (LRRs de leucin-rich repeats). Ces motifs sont responsables de la reconnaissance des pathogènes.

- une région transmembranaire

- une région cytoplasmique, intracellulaire, comprenant un domaine TIR pour Toll/IL-1 receptor. Ce nom fait référence à la similarité entre les domaines cytoplasmiques des TLR et la région comparable d'un récepteur pour l'IL-1. Ce domaine TIR possède trois régions, très conservées parmi tous les membres de la famille TLR, appelées boîtes 1, 2 et 3, qui servent de sites de liaison pour des protéines intracellulaires qui participent aux voies de transduction des signaux par les TLRs.

La reconnaissance de leurs ligands par les TLRs provoque leur hétéro- ou homodimérisation et l'activation de TIR qui va recruter des molécules adaptatrices. Parmi elles, on retrouve MyD88 (Myeloid Differentiation factor 88) et TRIF (Toll-interleukin-1-receptor-domain-containing adaptor-inducing interferon β) (26). Selon le TLR, l'activation intracellulaire passera par l'une et/ou l'autre. Pour TLR 4 par exemple, il existe une voie MyD88 dépendante, et une voie MyD88 indépendante (voie TRIF) : l'activation de MyD88 conduit à l'activation de la voie NF κ B (Nuclear factor κ B) et des MAP kinases conduisant à la transcription de gènes impliqués dans l'inflammation, la prolifération et la protection contre l'apoptose, alors que l'activation de TRIF conduit à l'expression des Interférons α et β impliqués dans la réponse antivirale (27). Pour TL7 et 9, l'activation passe exclusivement par la molécule adaptatrice MyD88, alors que pour TLR3, elle passe uniquement par TRIF. Les différentes cascades intracellulaires impliquées dans cette transduction sont décrites dans la **figure 4**.

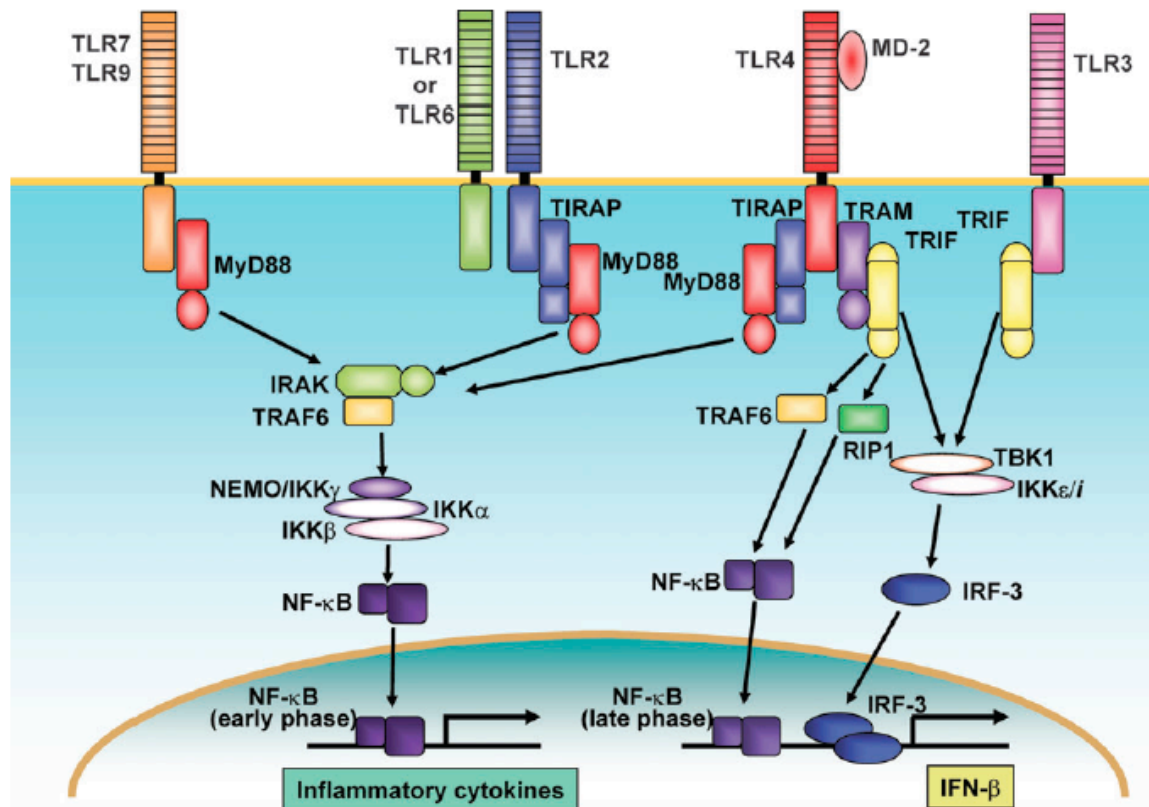


Figure 4 : voies de transduction du signal après reconnaissance par les TLRs de leur ligands respectifs (d'après (28)). La transduction du signal débute au niveau du domaine cytoplasmique TIR (Toll/IL-1 receptor). Une molécule adaptatrice, MyD88, s'associe au domaine TIR et va recruter la molécule IRAK. IRAK va ensuite activer TRAF6, conduisant à l'activation du complexe I κ B kinase (IKK), constitué de IKK α , IKK β et NEMO/IKK γ . Le complexe IKK va par la suite phosphoryler I κ B, conduisant à la translocation nucléaire de NF- κ B qui va induire l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Une autre molécule adaptatrice, TIRAP, est également impliquée dans la voie de transduction dépendante du MyD88 via TLR2 et 4. Pour TLR3 et TLR4, l'activation d'IRF-3 aboutissant à la transcription d'IFN- β passe par une voie indépendante de MyD88, grâce à une autre molécule adaptatrice, TRIF. Celle-ci va aboutir à l'activation de TRIF grâce à un jeu de phosphorylation par des kinases. TRAM est une autre molécule adaptatrice spécifique de la voie de transduction indépendante de MyD88/dépendante de TRIF du TLR4.

I-2-4. Généralités sur les NLRs et l'inflammasome

Les NLRs (Nod-like receptors, encore appelés NALP) sont des récepteurs cytosoliques de l'immunité innée. La structure de ces NLRs est commune : un domaine central (appelé NOD ou NBD pour Nucleotide Binding Domain) permettant la liaison aux nucléotides, un domaine C-terminal riche en motifs leucines répétés (LRRs) qui reconnaît les PAMPs et les DAMPs, et un domaine N-terminal de recrutement des caspases, appelé CARD

(caspase recruitment domain). Les protéines de type NOD reconnaissent des fragments de parois bactériennes comme le peptidoglycane et activent la voie NFκB (29).

Les membres de la famille NALP dont NALP 1, 3 et 12 peuvent former avec des protéines d'assemblage un complexe d'activation de la caspase 1, appelé inflammasome. Cet inflammasome a une place centrale dans le modèle Danger de Matzinger. L'inflammasome est un complexe multiprotéique composé d'une protéine NLR comme NALP, d'une molécule adaptatrice ASC (Apoptosis associated speck-like protein containing a CARD) et de la pro-caspase 1, enzyme qui clive la pro-IL1β et la pro-IL18 (30). L'assemblage de cet inflammasome est déclenché par la reconnaissance d'un signal Danger par le récepteur NLR, ce qui entraîne l'activation de la caspase 1 qui induit la transformation de la pro-IL-1β et de la pro-IL18 en IL-1β et IL-18 actives (**figure 5**) (31). Ces cytokines, et en particulier l'IL-1β, vont agir en véritable « booster » de la réaction inflammatoire : elle induit l'augmentation de l'expression des récepteurs des cytokines pro-inflammatoires par les cellules environnantes (qui deviennent ainsi réceptives aux cytokines pro-inflammatoires), et induit l'expression de molécules de co-stimulation qui permettront d'activer les cellules de l'immunité adaptative (TCD4+) (11).

Les signaux de Danger sont de natures très diverses : il peut s'agir de substances exogènes (toxines bactériennes, silice, aluminium...) ou de substances endogènes (protéines du choc thermique, nucléotides, radicaux libres oxygénés (*ROS* pour *reactive oxygen species* issues du *burst oxydatif*), influx d'ATP, flux extracellulaire de potassium...)(11). On retrouve également les cristaux d'urate de sodium ou de pyrophosphate de calcium, comme en témoigne l'implication désormais bien démontrée de l'inflammasome NLRP3 dans la physiopathologie des arthrites microcristallines (31). La **figure 5** souligne bien le concept de « priming » pour la stimulation de l'inflammasome, avec l'existence d'un premier et d'un deuxième signal.

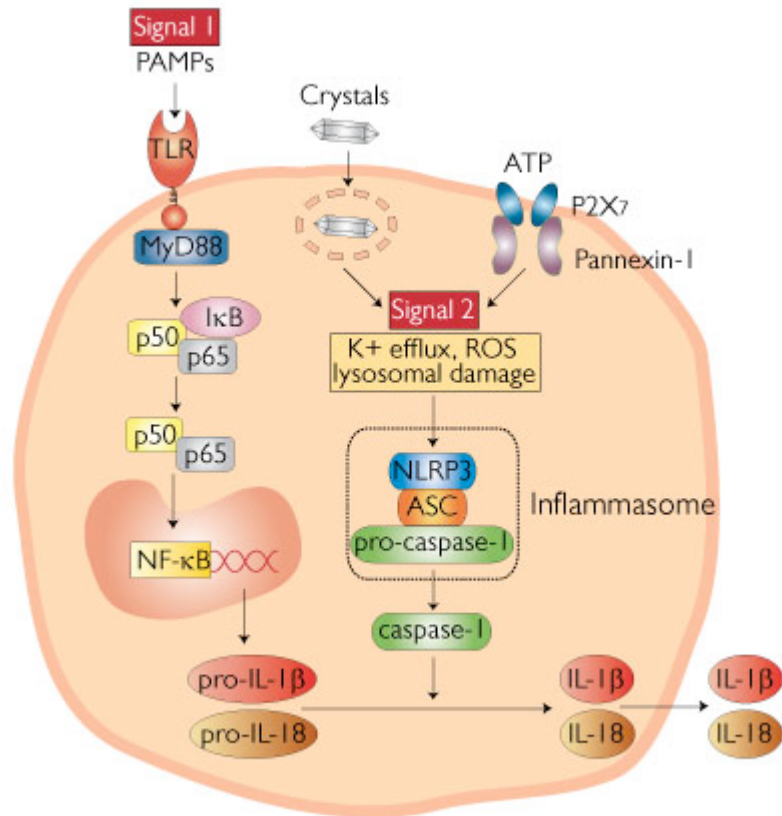


Figure 5 : schématisation du mode d'action de l'inflammasome (d'après (31)). Un premier signal, induit par exemple par la reconnaissance d'un PAMP par les TLRs, va aboutir par transduction en cascade intracellulaire à la transcription de gènes de cytokines pro-inflammatoires, dont les formes immatures de pro-IL-1 β et pro-IL-18. Un signal de Danger, correspondant au 2^{ème} signal, sera reconnu par NLRP3, recrutant la pro-caspase 1 et la protéine adaptatrice ASC, aboutissant à l'assemblage du complexe de l'inflammasome NLRP3. Ceci aboutit à la maturation de la caspase 1, qui clivera à son tour la pro-IL-1 β et la pro-IL-18 en IL-1 β et IL-18 matures.

I-2-5. Généralités sur les récepteurs RAGE

Un dernier récepteur de l'immunité innée important, comme nous le verrons plus bas, correspond au récepteurs RAGE (pour receptor for advanced glycation end-products). Il est codé par les gènes de la région du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe III, tout comme le TNF α ou la heat-shock protein 70. Ces ligands principaux sont les protéines du groupe HMGB1 (High mobility group box 1) et la protéine S100. Il existe deux formes principales de ce récepteur RAGE : une forme transmembranaire, qui interagira directement avec les kinases ERK1 et 2 (extracellular-signal-regulating-kinases), aboutissant à l'activation de la MAP-kinase (mitogen-activated protein kinase) p38 et du nuclear factor-kB, et une

forme soluble. Cette forme soluble de RAGE peut bloquer l'action des ligands de RAGE, y compris de HMGB1 (32).

I-3- L'ADN mt : un nouveau signal de Danger du système immunitaire, voire une alarmine ?

Plusieurs travaux ont identifié la présence d'ADN mitochondrial (ADN mt) dans le plasma en contexte inflammatoire (33–35). Les mécanismes par lesquels l'ADNmt contribue à la réponse inflammatoire sont multiples et encore mal connus (36). L'objectif de ce paragraphe est de dresser les arguments identifiant l'ADN mt libéré dans le milieu extra-cellulaire comme un nouveau signal de danger, voire une alarmine. A noter que la revue de la littérature résumée dans ce paragraphe a fait l'objet de l'écriture d'un article par nous-mêmes, qui sera prochainement soumis, et que le lecteur pourra retrouver en **annexe 3**.

I-3-1. Origine et structure de l'ADN mt

La mitochondrie est une organelle caractéristique des cellules eucaryotes (37). Elle est fondamentale pour la production énergétique d'ATP par les réactions de phosphorylation oxydative (37). Outre ce rôle métabolique indispensable, elle exerce également des fonctions immuno-modulatrices puisqu'elle participe à la régulation de la signalisation antivirale (38,39), facilite la réponse anti-bactérienne par la génération d'espèces réactives de l'oxygène (36,40), contribue à l'activation de la réponse immunitaire innée suivant le stress et la perte d'intégrité cellulaire (36), et enfin occupe une place importante dans le contrôle de la mort cellulaire par apoptose (40).

La mitochondrie a probablement évolué à partir d'une bactérie saprophyte ancestrale, devenue progressivement endosymbionte puis organelle (37). C'est pourquoi il n'est pas surprenant que le génome mitochondrial présente de fortes homologues avec l'ADN bactérien (36,37). Il est circulaire, mesure environ 16569 paires de bases, n'est pas protégé par des protéines histones et contient des motifs ADN CpG non méthylés, motifs peu retrouvés dans l'ADN génomique de cellules eucaryotes mais très présents dans le

génomique bactérien (**figure 6**). Cette ressemblance avec l'ADN bactérien pourrait ainsi conférer à l'ADN mt des propriétés immunogènes : le génome mitochondrial peut être reconnu par des récepteurs de l'immunité innée, comme TLR9 (41), qui est de localisation endosomale et qui reconnaît préférentiellement des dinucléotides cytosine-guanine (CpG) non méthylés de l'ADN bactérien (14).

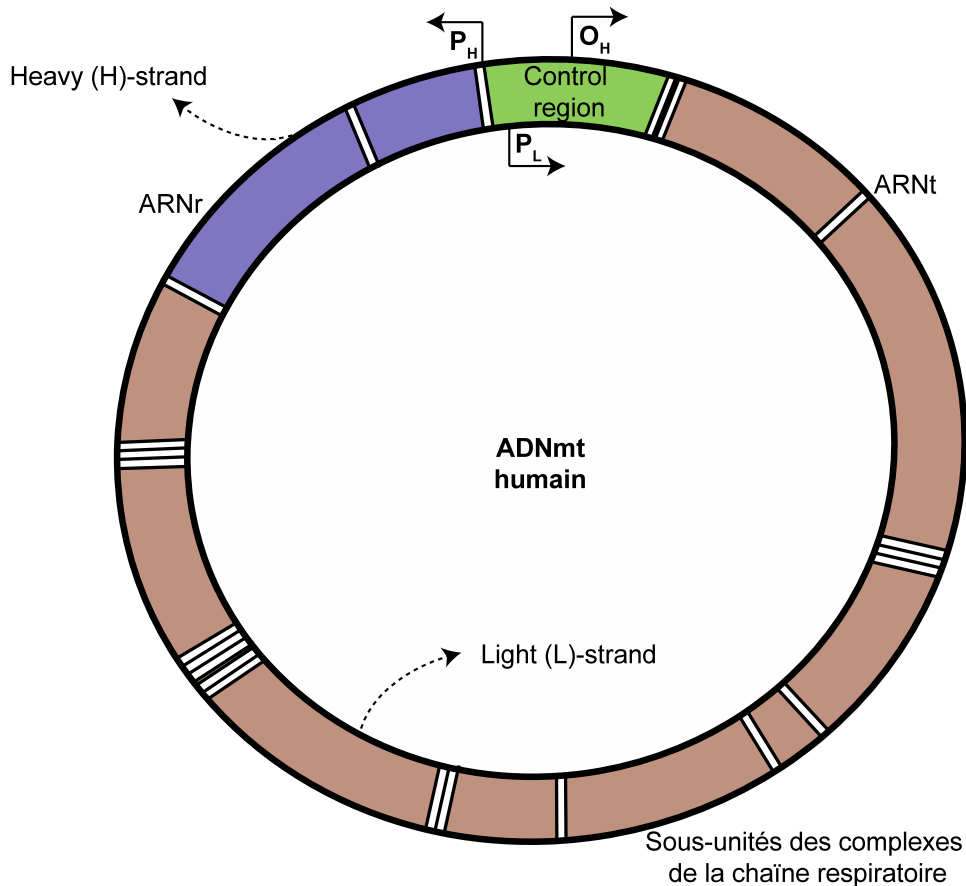


Figure 6 : représentation schématique du génome mitochondrial. Le génome mitochondrial mesure 16,5 kb, il est circulaire, composé d'un brin lourd et d'un brin léger et comporte 37 gènes : 13 gènes codant pour une partie des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire (*en marron*), 22 gènes codant pour des ARN de transfert (*en rose*) et 2 pour des ARN ribosomiaux (12S et 16S) (*en violet*) (42). Les protéines nécessaires à sa réplication et à sa transcription sont donc codées par des gènes nucléaires. L'origine de réplication du brin lourd, ou O_H (pour heavy-strand origin of replication), ainsi que les promoteurs du brin lourd (P_H) et léger (P_L) se situent au niveau de la région de contrôle (*en vert*). Noter que l'origine de réplication de la chaîne légère (O_L) est située à distance de la région de contrôle. Le facteur de transcription mitochondriale TFAM (mitochondrial transcription factor A) s'accroche entre les promoteurs. TFAM est très important dans l'initiation de la transcription et donc dans la réplication de l'ADNmt.

I-3-2. ADN mitochondrial et inflammation :

A. Élévation de l'ADN mt extracellulaire en contexte inflammatoire

De nombreux travaux ont identifié la présence d'ADN mt dans un contexte inflammatoire, et ce dans des pathologies bien différentes. En réanimation tout d'abord, on constate chez des patients polytraumatisés, avec défaillance multi-viscérale et porteurs d'une inflammation systémique de type SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) des taux d'ADN mt plasmatiques circulants 1000 fois supérieurs à ceux de sujets sains (43). Des études cliniques ultérieures ont permis d'établir la valeur pronostique précoce de cet ADN mt circulant chez des patients polytraumatisés, en sepsis sévère ou hospitalisés en service de soins intensifs, à l'image d'autres marqueurs biologiques comme les lactates ou la procalcitonine (44). Son élévation dès J1 et sa corrélation avec le score de sévérité clinique ISS (Injury Severity Score) pour les patients de réanimation semblent témoigner du risque d'évolution vers la défaillance multiviscérale ou le décès pour les sujets ayant les taux plasmatiques les plus élevés, sous réserve de faibles effectifs d'études (45,46). Une étude a déterminé, par régression logistique, que le taux plasmatique ADN mt à l'admission serait un facteur indépendant de fatalité : l'augmentation d'un ng/mL d'ADN mt dans le plasma induirait une augmentation de 0,7 % de la mortalité, ce qui en ferait un facteur prédictif plus puissant que le taux de lactates ou le score SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) (47).

Un autre exemple où des taux plasmatiques élevés d'ADN mt sont associés à l'état inflammatoire chronique est celui des cancers solides et des hémopathies : sein (48), testicule (49), ORL (il est alors détecté dans la salive des patients (50)), prostate (51) et lymphome malin non Hodgkiniens (52). Dans le cas de la prostate, il joue, là encore, le rôle de marqueur pronostique défavorable en terme de survie à 2 ans (34). Au cours de l'infection par le VIH, le taux d'ADN mt est corrélé au statut de l'infection et à la charge virale. Ainsi, les patients au stade aigu de l'infection ou qui ont une évolution prolongée sans traitement ont des taux d'ADN mt significativement plus élevés que les patients progressifs lents (35). La présence d'ADN mt est alors associée à un état inflammatoire chronique (53). Si toutes ces publications mettent en évidence l'association entre taux d'ADN mt plasmatiques élevés et inflammation, il est légitime de se poser la question suivante : cet ADN mt est-il la cause ou

la conséquence de l'inflammation ? Nous verrons dans le paragraphe suivant qu'il existe des arguments dans la littérature suggérant que l'ADN mt a des propriétés pro-inflammatoires.

En outre, si l'ADN mt extracellulaire circulant est plus souvent retrouvé dans le plasma de sujets souffrant de polyarthrite rhumatoïde, comparativement au plasma de sujets sains, on en retrouve également dans le liquide synovial des malades arthritiques (54). Toutefois, les auteurs n'ont pas quantifié les taux d'ADN mt dans cette pathologie, et de ce fait n'ont pu établir aucune corrélation avec les caractéristiques cliniques ou biologiques des patients.

B. Rôle pro-inflammatoire de l'ADN mt

Plusieurs études expérimentales *in vitro* et animales suggèrent un rôle fonctionnel direct et/ou indirect de l'ADN mt dans l'inflammation.

B.1. Modèles in vitro

Zhang *et al.* ont démontré que l'ADN mt est capable de recruter et d'activer les polynucléaires neutrophiles (PNN) en culture. En présence d'autres DAMPs mitochondriaux comme les formyl peptides, l'ADN mt induit la mobilisation calcique intracellulaire à l'intérieur des PNN et favorise leur dégranulation. Il stimule en outre la sécrétion d'IL-8 par les PNN, chimiokine chémoattractante pour les neutrophiles, favorisant leur recrutement sur le site de l'inflammation, mais aussi à distance, permettant la diffusion systémique de l'inflammation (43). L'incubation des PNN avec de l'ADN mt purifié stimule la sécrétion de métalloprotéinases (intervenant dans la migration tissulaire) par ces cellules, ce qui n'est pas le cas lorsqu'elles sont incubées avec de l'ADN nucléaire (55). La proximité structurale de l'ADN mt avec l'ADN bactérien, notamment sa richesse en motifs CpG, et d'autre part le fait que cette activation soit bloquée en présence de chloroquine, suggère une implication de la voie TLR9 endosomale (43,55). D'ailleurs, l'ADN mt favorise la phosphorylation des MAP kinases p38 à l'intérieur des PNN (55).

B.2. Modèles animaux

L'injection par voie intraveineuse d'ADN mt à un modèle murin génère des lésions inflammatoires systémiques, hépatiques et pulmonaires, caractérisées par un infiltrat neutrophilique précoce et une synthèse locale de cytokine pro-inflammatoire (TNF α puis IL6) (33,56). Un autre modèle chez le rat souligne que l'inflammation pulmonaire s'accompagne

d'un œdème et que la production de cytokines pro-inflammatoires induites par l'ADN mt est la conséquence d'une augmentation de l'expression pulmonaire de TLR9 et de la signalisation par la voie du NFkB (57).

Un modèle murin souligne le potentiel arthritogène de l'ADN mt. En effet, l'injection intra-articulaire dans le genou d'ADN mt purifié déclenche une poussée d'arthrite, ce qui n'est pas le cas lorsqu'on injecte de l'ADN nucléaire (58). La survenue de l'arthrite dans ce modèle est principalement médiée par les monocytes (puisque leur déplétion atténue l'inflammation synoviale), et dans une moindre mesure par les PNN. L'activation des monocytes fait intervenir la voie du NFkB avec pour conséquence la sécrétion locale de $\text{TNF}\alpha$ (58).

C. Cibles de l'ADN mt et voies de signalisations intracellulaires

C.1 Ilôt CpG et TLR9 endosomaux

Comme décrit ci-dessus, de nombreuses études suggèrent que les motifs CpG de l'ADN mt pourraient être reconnus par le TLR9 au sein des endosomes, et activer ensuite les cascades intracellulaires du NFkB ou des MAP kinases p38 (33,55,57,58)(**figure 7**). Cependant, d'autres mécanismes semblent concourir à la genèse de l'inflammation.

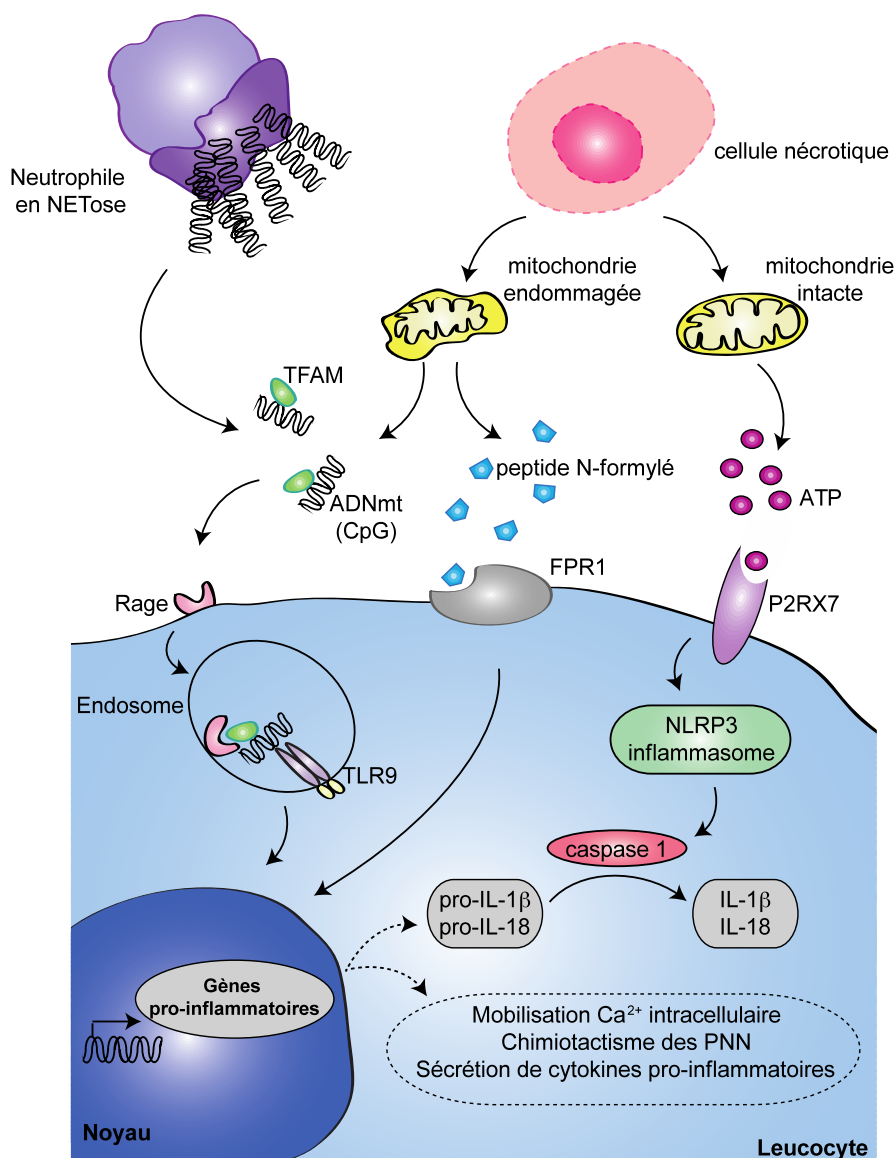


Figure 7 : Principaux DAMPs (Danger-Associated Molecular Patterns) mitochondriaux et leur mécanismes d'action sur la réponse inflammatoire : La souffrance cellulaire et la nécrose entraînent la libération de mitochondries dans l'espace extracellulaire, qui vont secondairement libérer des DAMPs mitochondriaux. La reconnaissance de ces derniers par des récepteurs spécifiques présents sur les cellules de l'immunité innée, tels les monocytes ou neutrophiles, va entraîner l'activation de ces cellules et la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. La reconnaissance de TFAM par les récepteurs RAGE favorise l'internalisation du complexe TFAM/ADNmt, sa translocation à l'endosome et la reconnaissance secondaire par les TLR9 des motifs CpG hypométhylés de l'ADNmt. Les peptides N-Formylés sont quant à eux reconnus par les récepteurs FPR1 (formyl peptide receptor 1). Les cellules nécrotiques peuvent également libérer des mitochondries intactes, qui vont sécréter de l'ATP. Celui-ci, une fois reconnu par les récepteurs purinergiques leucocytaires P2RX7, va agir comme second signal dans l'activation de l'inflammasome NLRP3, aboutissant à la maturation de l'IL-1 β et de l'IL-18. A noter que la libération de l'ADN mt n'est pas un processus uniquement lié à la nécrose cellulaire ; la NETose, voire la libération « telle une catapulte » sans mort cellulaire semblent impliquées.

C.2. ADNmt oxydé et inflammasome

En effet, du fait de sa localisation dans la matrice mitochondriale, l'ADN mt est une cible idéale des radicaux libres induits par des dysfonctionnements du métabolisme aérobie (59) et des oxydations phosphorylantes (60). L'ADN mt est ainsi nettement plus touché par ce stress oxydatif que l'ADN nucléaire (61), du fait de sa proximité par rapport à la chaîne respiratoire, de son manque d'histones, et de moindres systèmes de réparation, ce qui aboutit à une oxydation et/ou une fréquence de mutation accrue (62).

Les motifs oxydés sont immunogènes comme en témoignent l'apport de modèles animaux. Ainsi, il a été mis en évidence qu'un oligonucléotide dépourvu de motif CpG mais contenant un seul résidu 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) possédait des propriétés pro-inflammatoires *in vivo* (58), puisque son injection intra-articulaire entraînait une arthrite inflammatoire chez la souris. A contrario, l'injection d'un oligonucléotide de même séquence, mais dépourvu de motif 8-oxodG, ne reproduisait pas l'arthrite. En outre, Shimada *et al.* ont montré que l'ADN mt oxydé est capable d'activer dans le cytosol l'inflammasome NLRP3 (alors que l'ADN mt non oxydé activerait plutôt l'inflammasome AIM2), aboutissant ainsi à l'activation de la caspase 1 qui permet le clivage respectif de la pro-IL1 β et de la pro-IL18 en IL1 β et IL18 (63) (**figure 8**).

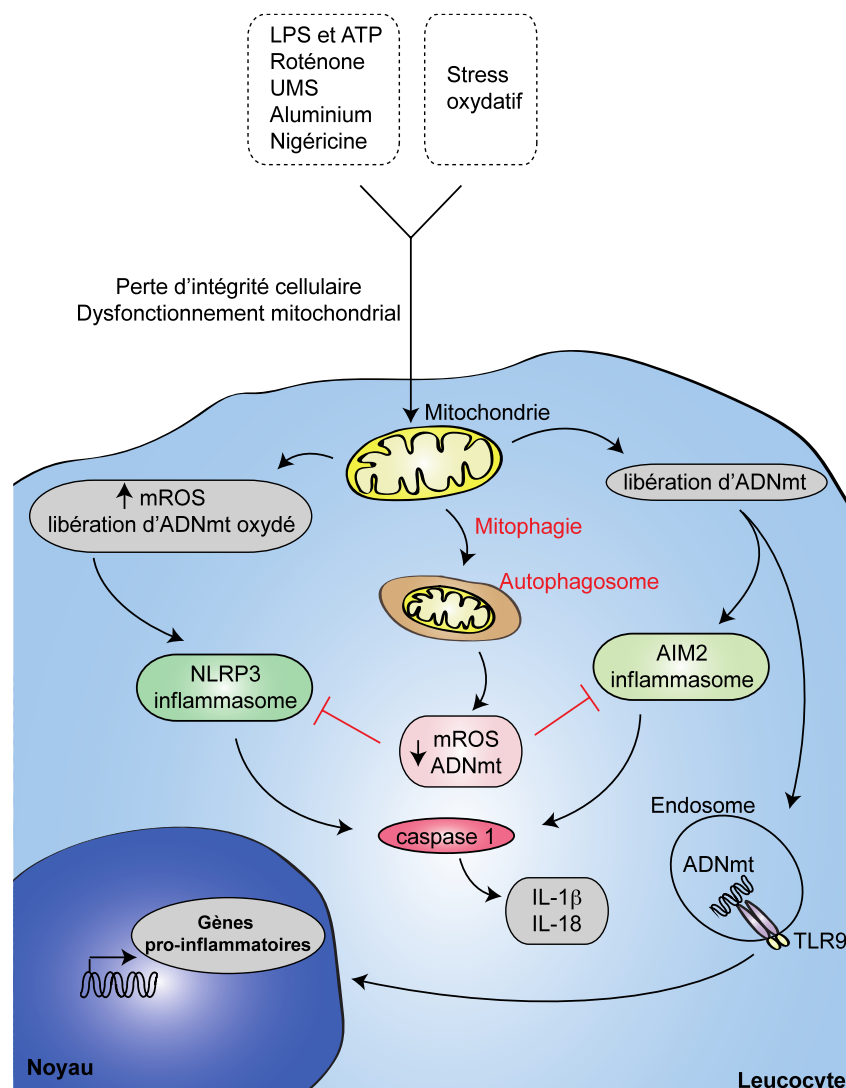


Figure 8 : Activation de l'inflammasome par l'ADN mt et régulation par la mitophagie : Le stress oxydatif et les activateurs de l'inflammasome (comme le lipopolysaccharide (LPS), l'ATP, la roténone, l'urate monosodique (UMS), l'aluminium ou la nigéricine) favorisent la dysfonction mitochondriale et la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ou mROS, pour mitochondrial Reactive Oxygen Species), qui vont venir oxyder et endommager l'ADN mt. Les mROS et l'ADN mt oxydé, qui s'est échappé dans le cytosol par les pores de la membrane mitochondriale externe, vont aller activer l'inflammasome NLRP3, aboutissant à la maturation du pro-IL1 β et de la pro-IL18 en IL1 β et IL18 par la caspase 1. L'ADNmt non oxydé activerait quant à lui préférentiellement l'inflammasome AIM2 (absent in melanoma 2). La mitophagie joue le rôle de « frein négatif », en dégradant les mitochondries, ce qui diminue de facto la quantité de mROS et d'ADNmt. A noter qu'une petite partie de l'ADN mt libéré dans le cytosol pourrait être acheminée vers les endosomes, où il serait reconnu via ses îlots CpG hypométhylés par les Toll-like Récepteurs 9 (TLR9).

C.3 Régulation par la mitophagie

Pour faire face à ces dommages oxydatifs, la cellule a mise en place un mécanisme protecteur d'autophagie des organites défailants appelé mitophagie. Ainsi, les mitochondries

endommagées sont englobées dans un autophagosome qui fusionne secondairement avec un lysosome où la présence de DNase II permettra la dégradation d'ADN mt (64). Lorsque le stress oxydatif est trop intense, le processus mitophagique peut-être dépassé et l'ADN mt peut s'échapper de l'autophagosome, et ainsi aller activer l'inflammasome NLRP3 (65). Cet ADN mt « échappé » peut également gagner secondairement l'endosome et activer la voie TLR9 et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (66) (**figure 8**). Un modèle murin d'insuffisance cardiaque sur poussée hypertensive souligne bien l'importance de ce mécanisme de régulation, en montrant que la déficience de cette mitophagie est impliquée dans la survenue de lésions inflammatoires. Des souris déficientes en DNase II, mimant un phénotype d'autophagie déficiente, développent dans les 10 jours suivants une poussée hypertensive majeure, une myocardite sévère puis une cardiopathie dilatée avec une mortalité accrue. L'infiltrat myocardique par des cellules inflammatoires et la surexpression locale de cytokines pro-inflammatoires s'associent à une augmentation des dépôts d'ADNmt dans les autophagosomes. Le blocage de TLR9 améliore le phénotype inflammatoire et la dysfonction myocardique, témoignant que la mitophagie déficiente favorise un état pro-inflammatoire au cours des poussées d'insuffisance cardiaque par l'interaction de TLR9 et de l'ADN mt (67).

Si la déficience de la mitophagie favorise l'activation des TLR9 et/ou de l'inflammasome NLRP 3, il est à noter que les ROS (Reactive Oxygen Species, espèces réactives de l'oxygène) stimulent directement l'ouverture des pores de la membrane mitochondriale externe, et donc la libération de l'ADN mt dans le cytosol (68) (**figure 8**).

D. Autres DAMPs mitochondriaux associés à l'ADN mt

De nombreux autres DAMPs d'origine mitochondriale contribuent à la réponse pro-inflammatoire, parallèlement à la reconnaissance de l'ADN mt (**tableau 2**). Les îlots CpG hypométhylés ne sont pas les seules caractéristiques que la mitochondrie partage avec la bactérie. Ainsi, les N-formyl peptides d'origine mitochondriale sont reconnus, tous comme leurs analogues bactériens, par des récepteurs spécifiques à la surface des PNN, les FPRs (pour Formyl Peptide Receptors) (69). Ceux-ci sont couplés à une protéine G, et cette reconnaissance entraîne une mobilisation calcique intracellulaire (33), l'activation des MAP kinases (33), la sécrétion de cytokines et chimiokines chémoattractantes (70), et la survenue du burst oxydatif (71).

Tableau 2 : Principaux DAMPs d'origine mitochondriale :

DAMP	Localisation du récepteur	Récepteur	Action inflammatoire	Références
ADN mt	Endosomal	TLR9	<ul style="list-style-type: none"> ○ Activation des monocytes et macrophages ○ Mobilisation calcique intracellulaire, dégranulation et chimiotactisme des PNN ○ Sécrétion de cytokines ○ Arthrite si injection intra-articulaire (souris) ○ Hépatite, inflammation pulmonaire ou systémique (choc) si injection intraveineuse (souris) 	(33, 55-58)
	Cytosolique	Inflammasome : AIM2 si non oxydé NLRP3 si oxydé	Activation de la caspase 1 et sécrétion de cytokines	(63, 65)
N-formyl peptides	Surface cellulaire	FPR1	<ul style="list-style-type: none"> ○ Activation des monocytes ○ Mobilisation calcique intracellulaire, dégranulation, burst oxydatif et chimiotactisme des PNN ○ Sécrétion de cytokines ○ Hépatite, inflammation pulmonaire ou systémique (choc) si injection intraveineuse (souris) 	(33, 69-71)
TFAM	Surface cellulaire	RAGE	<ul style="list-style-type: none"> ○ Facilite l'internalisation du complexe ADNmt/TFAM ○ Active les pDC et la synthèse de cytokines ○ Active les monocytes et la synthèse de cytokines 	(72,73)
ATP mitochondrial	Surface cellulaire	P2RX7	<ul style="list-style-type: none"> ○ Active via l'inflammasome NLRP3 la caspase 1 et la sécrétion de cytokines ○ Migration des neutrophiles si injection intra-péritonéales (souris) 	(73)
mROS	Cytosolique	Inflammasome NLRP3	Activation de la caspase 1 et sécrétion de cytokines	(65,75)

AIM2 : absent in melanoma 2; DAMP : Damage-Associated Molecular pattern; FPR1 : formyl-peptide receptor 1; mtDNA : mitochondrial DNA; mROS : mitochondrial reactive oxygen species; NLRP3 : NOD-, LRR- and pyrin domain-containing 3; P2RX7 : P2X purinoceptor 7; RAGE : Receptors for Advanced Glycation End Products ; TFAM : mitochondrial transcription factor A; TLR9 : Toll-like receptor 9.

Le mitochondrial transcription factor A (TFAM) est une protéine de fonction et de structure semblable à la protéine high-mobility-group box-1 (HMGB1). HMGB1 est lié à l'ADN nucléaire et joue, entre autres, le rôle de facteur de transcription de l'ADN génomique (76), alors que son « cousin » TFAM est associé à l'ADN mitochondrial (72). Les rôles de HMGB1 sont multiples : facteur de transcription nucléaire, rôle pro-angiogénique, DAMP, cytokine pro-inflammatoire libérée dans le milieu extracellulaire (76)... HMGB1 est en outre retrouvé en abondance dans les liquides synoviaux de polyarthrite rhumatoïde (77), et son injection intra-articulaire chez la souris induit une arthrite (78,79). Les rôles de TFAM quant à eux, commencent à être précisés. Lors de la nécrose cellulaire, l'ADN mt libéré dans le milieu extracellulaire reste lié à TFAM. La reconnaissance de ce dernier par les récepteurs RAGE (Receptors for Advanced Glycation End Products) présents à la surface des cellules présentatrice de l'antigène (CPA), et notamment des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), faciliterait l'internalisation du complexe ADNmt/TFAM au sein des pDC, et l'acheminement à l'endosome où l'ADN mt est secondairement reconnu par le TLR9, activant la cascade de signalisation intracellulaire aboutissant à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires comme l'interféron de type 1 (72). Une autre équipe a montré que la libération de TFAM par les cellules nécrotiques potentialisait la sécrétion d'IL8 induites par les peptides N-formylés par les monocytes (73).

Les autres DAMPs d'origine mitochondriale les plus étudiés sont l'ATP qui, via les récepteurs purinergiques P2RX7, joue le rôle de second signal dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 (74) ou les anions superoxydes mitochondriaux (65,75).

E. Sources et mécanismes de libération

Divers mécanismes dépendants ou non de la mort cellulaire ont été impliqués dans la libération d'ADN mt dans le milieu extracellulaire. Plusieurs travaux ont rapporté la libération d'ADN mt au cours de la nécrose (72), l'ADN mt étant par exemple libéré par les cellules musculaires lisses des tissus lésés lors d'un polytraumatisme. Pour d'autres, un type de mort cellulaire récemment décrit, la NETose, semble associé à la présence d'ADN mt extracellulaire. En effet, les PNN activés, via l'émission de NETs (Neutrophil Extracellular Traps) et plus spécifiquement grâce à leur contenu en ADN mt, participent à la réponse inflammatoire (80). Toutefois, la mort cellulaire ne semble pas indispensable à la libération d'ADN mt. Il a, par exemple, été montré que les polynucléaires éosinophiles

sont capables de libérer « telle une catapulte » de l'ADNmt dans le milieu extracellulaire suite à une stimulation par le LPS (lipopolysaccharide) (81)

F. Cellules cibles

Les cibles étudiées, ou du moins rapportées, dans la littérature semblent surtout être les cellules de l'immunité innée : cellules dendritiques (72), monocytes (58,73), polynucléaires neutrophiles (33,55,56)... Il est difficile de conclure à une absence d'effets ou de reconnaissance par les cellules de l'immunité adaptative devant le peu de données de la littérature. On rappellera simplement que dans le modèle murin de Collins, la déplétion en lymphocyte B ou T n'influe pas sur la sévérité de l'arthrite induite (cf. paragraphe 3.2.2, (58)).

I-3-3. L'ADN mt : une alarmine ?

A ce jour, les principales alarmines couramment admises (liste non exhaustive) sont : les défensines, les cathelicidines, les neurotoxines dérivées des éosinophiles, la lactoferrine, certaines protéines appartenant au groupe des « high-mobility group (HMG) proteins », la granulysine, l'ATP, l'histamine et probablement les membres de la famille des protéines S100, des heat-shock proteins, et de certains produits de dégradation de la matrice extracellulaire (par exemple le hyaluronan et l'héparane sulfate) (82).

Tous les signaux de Danger endogènes ne sont pas des alarmines. En effet, Oppenheim *et al.* ont décrit des critères précis permettant de classer un DAMP comme alarmine (83,84) : 1) les alarmines sont constitutionnellement stockées à l'intérieur des cellules ; 2) elles sont rapidement libérées après une mort non programmée, telle la nécrose, mais pas par les cellules apoptotiques ; 3) les cellules de l'immunité peuvent être capables dans certaines conditions de libérer ces alarmines sans mourir ; 4) elles ont souvent un rôle multifonctionnel, et une activité anti-microbienne ; 5) elles sont capables de recruter et d'activer les cellules de l'immunité innée, y compris les cellules dendritiques, via leurs récepteurs, et ainsi de stimuler directement et indirectement les réponses immunes innées et adaptatives ; 6) elles peuvent également dans certains cas favoriser la restauration du tissu lésé et de l'homéostasie.

Hormis pour le 6^{ème} critère, pour lequel nous n'avons à ce jour, faute d'étude, pas de réponse, les cinq autres critères semblent être satisfaits puisque l'ADN mt est stocké constitutivement à l'intérieur des cellules, il est libéré rapidement lors de la nécrose cellulaire (33,72), mais aussi de la NETose (80), voire est « catapulté » sans mort cellulaire dans certaines conditions (81). En outre, l'ADN mt a dans les NETs une activité anti-microbienne directe (80,81). Enfin, nous avons vu que l'ADNmt était capable d'activer une multitude de cellules : monocyte et macrophages, PNN, et cellules présentatrices d'antigènes professionnelles telles que les cellules dendritiques. Ainsi, l'ADN mt peut bel et bien être considéré comme une nouvelle alarmine du système immunitaire.

I - 4 - Brefs rappels sur la physiopathologie de la PR

Notre objectif ici n'est pas de détailler de façon exhaustive la physiopathologie de la PR, mais de seulement aborder les mécanismes permettant de mieux comprendre un éventuel rôle de l'ADNmt.

La polyarthrite rhumatoïde (PR) représente le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires chroniques avec une prévalence estimée à 0,8% (1). De façon schématique, l'immunopathologie de la PR peut être divisée en trois phases distinctes : une phase de déclenchement impliquant surtout l'immunité innée, une phase d'inflammation de la membrane synoviale impliquant plutôt l'immunité acquise et une phase de destruction articulaire (85).

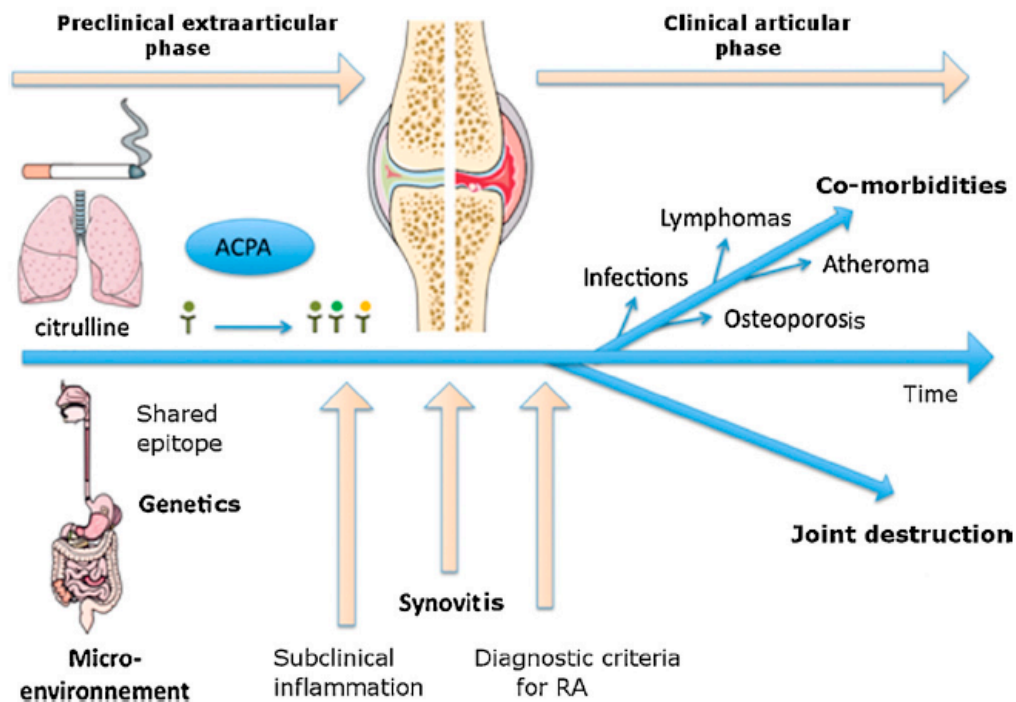


Figure 9 : l'histoire naturelle de la PR avec ses trois phases : phase pré-clinique de déclenchement où interviennent conjointement facteurs génétiques et environnementaux, phase clinique d'inflammation synoviale et phase tardive de destruction ostéo-articulaire associée à la survenue de co-morbidités (d'après (86)).

I-4-1. Phase de déclenchement

La phase de déclenchement est initiée par la conjonction de trois grands types de facteurs : génétiques, environnementaux et hormonaux. Ainsi, il existe une prédisposition génétique à la PR, comme en atteste le taux de concordance chez les jumeaux homozygotes atteints qui est en moyenne de 13 % (87). L'association génétique la plus forte est observée avec les gènes codant pour les molécules HLA (Human Leukocyte Antigen) de classe II et plus particulièrement avec les allèles HLA-DRB1*0401, DRB1*0404, DRB1*0101. Les molécules HLA codées par ces allèles présentent une séquence d'acides aminés commune située entre les positions 70 et 74 de la chaîne β , appelée épitope partagé, qui correspond au site impliqué dans la reconnaissance antigénique (88). Cet épitope partagé pourrait être au cœur de la réaction auto-immune médiée par les lymphocytes T et B. En effet, il est plus fréquemment retrouvé chez les patients atteints de PR ayant des taux élevés d'ACPA car la citrullination est à l'origine d'une augmentation de l'affinité des protéines citrullinées pour l'épitope partagé. Trois principaux modèles ont été proposés :

- l'épitope partagé pourrait reconnaître un peptide du soi et favoriser dans le thymus la persistance d'un clone de lymphocytes T autoréactifs par sélection clonale positive ; ce clone T autoréactif pourrait dans certaines conditions être activé et déclencher une réponse immunitaire spécifique contre ce peptide du soi ;

- l'épitope partagé se lierait spécifiquement avec l'antigène responsable de la PR ; une étude a montré une affinité de l'épitope partagé pour les peptides citrullinés (89) ;

- l'épitope partagé interagirait avec un peptide antigénique exogène mais ayant une structure voisine à un peptide du soi. C'est la théorie dite du « mimétisme moléculaire ».

L'implication de ces allèles dans la PR est également soulignée par l'association étroite entre ces allèles et la sévérité de la maladie. L'allèle DRB1*04 est pratiquement constamment retrouvé dans les PR avec destruction ostéo-articulaire précoce (90).

Concernant les facteurs environnementaux, deux semblent particulièrement impliqués de par leur rôle dans la citrullination : les infections et le tabagisme (91). Ainsi les périodontites à *Porphyromonas gingivalis* sont corrélées à la présence d'ACPA. Cette bactérie est porteuse de l'enzyme PAD4 qui peut citrulliner des peptides humains, la citrullination accrue favorisant la rupture de tolérance à l'égard de ce néo-antigène et l'émergence d'anticorps (92).

Enfin, la plus grande incidence de la PR chez la femme, avec un sex ratio de un homme pour quatre femmes, suggère une implication des hormones dans le déclenchement de la PR.

Lorsque tous ces facteurs sont réunis, s'ensuit une activation incontrôlée de la réponse innée et adaptative, ayant pour cible privilégiée la membrane synoviale.

I-4-2. Phase d'inflammation

L'inflammation de la synoviale implique de nombreux acteurs cellulaires et médiateurs solubles. Quatre types cellulaires sont au premier plan : les cellules présentatrices d'antigènes, les lymphocytes T et B et les synoviocytes (85).

Les macrophages, cellules dendritiques et PNN sont capables par leur molécule HLA de classe II de présenter l'antigène au lymphocyte T (93).

Les lymphocytes T sont recrutés à partir du sang périphérique, et migrent dans la synoviale pour s'organiser en agrégats qui ressemblent par leur morphologie à l'architecture folliculaire des ganglions lymphoïdes. Après avoir été activés par les cellules présentatrices d'antigène, via l'engagement de leur TCR (T Cell Receptor) et les molécules de co-stimulation, ils produisent des cytokines de type Th1 et de l'interleukine 17 qui activent les cellules résidentes : lymphocytes B, macrophages résidents, cellules endothéliales et fibroblastes (94). Celles-ci libèrent à leur tour des chimiokines et des molécules d'adhésion qui favorisent le recrutement de monocytes et de polynucléaires neutrophiles circulants.

Les lymphocytes B (LcB) jouent également un rôle important comme en témoigne l'efficacité du rituximab, anticorps monoclonal déplétant les LcB, dans la PR (95). Ils peuvent se comporter comme des cellules présentatrices d'antigène et activer ainsi les lymphocytes T. En outre, ils produisent les anticorps (FR, anticorps anti-noyaux et surtout ACPA) qui peuvent exercer un effet pathogène (96).

Toutefois, la cellule qui joue le rôle clé dans la pérennisation de l'inflammation est le synoviocyte. Il constitue le principal composant cellulaire de la couche bordante de la membrane synoviale et comprend deux types cellulaires : le synoviocyte fibroblastique et le synoviocyte macrophagique. Ce dernier, une fois activé par les lymphocytes, entretient la réaction inflammatoire en sécrétant deux types de médiateurs: des médiateurs préformés (tels que les prostaglandines, les leucotriènes, les radicaux libres et les enzymes contenues dans les granules et qui participent de façon importante à la destruction tissulaire) et des cytokines pro inflammatoires dont l'IL1 (Interleukine 1), le TNF α (Tumor necrosis factor α) et l'IL6, capables à leur tour d'induire la synthèse de la plupart des protéines de l'inflammation (85).

La persistance de cette réaction inflammatoire et l'accumulation de cellules et de cytokines dans la synoviale conduit à la phase ultime et irréversible de destruction ostéo-articulaire.

I-4-3. Phase de destruction ostéo-articulaire

Cette phase est donc la conséquence de la prolifération pseudo-tumorale des synoviocytes et de l'action des cytokines. En effet, l'efficacité des biothérapies en termes de réduction de destruction articulaire, souligne l'implication de ces médiateurs solubles (97,98). L'IL1 et le TNF α augmentent la synthèse de facteurs de croissance nécessaires à la prolifération de la synoviale, mais aussi la production par les synoviocytes de métalloprotéinases, de cathepsines et de collagénases, enzymes responsables de la dégradation des principaux composants du cartilage (85).

En outre, un autre élément occupe une place capitale dans la phase de destruction ostéo-articulaire : le système RANK/RANK-L.

I-4. Le système RANK/RANK-L

RANKL (Receptor Activator of NF κ B Ligand) est une molécule membranaire, exprimée à la surface des ostéoblastes mais aussi des lymphocytes B, des cellules endothéliales et des synoviocytes lorsqu'ils sont activés. Elle interagit avec son récepteur membranaire RANK présent à la surface des pré-ostéoclastes, active ces derniers qui se différencient en ostéoclastes, initiant le remodelage ostéo-articulaire (99). L'ostéoprotégérine est un récepteur soluble de RANK-L. La production de RANK-L est régulée par les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, le TNF- α et l'IL-17, mais également par la PTH ou la 1,25-OH-vitamine D (100), **figure 10**.

Deux travaux récents d'une équipe canadienne ont montrés que les PNN étaient également capables sous certaines conditions d'exprimer RANK-L à leur surface cellulaire. En présence d'un agoniste des TLR4, le lipopolysaccharide (LPS), les neutrophiles vont exprimer RANK-L et activer les ostéoclastes, contribuant ainsi à la destruction osseuse (101). De même, les PNN du sang de sujet souffrant de PR vont exprimer RANK-L s'ils sont incubés avec du liquide synovial (LS) de PR. En revanche, le LS d'arthrose n'induit pas cette surexpression (102). Ainsi, il existe une ou des molécule(s), à ce jour non identifiées, responsables de la surexpression de RANK-L à la surface des PNN, **figure 11**.

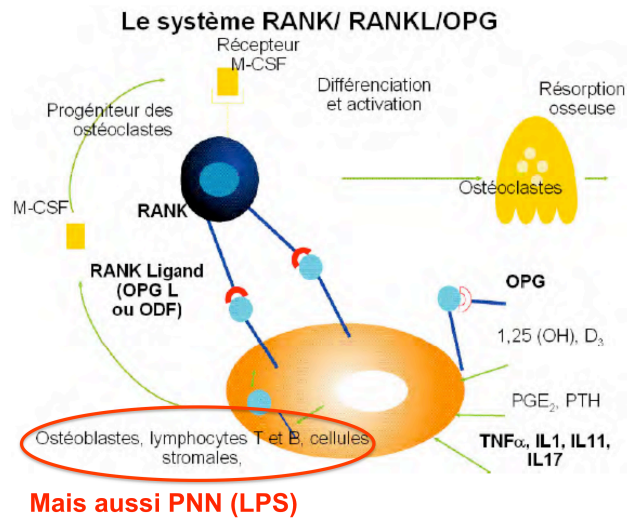


Figure 10 : représentation schématique du système RANK/RANK-L/Ostéoprotégérine. Noter que les PNN sont également capables, sous certaines conditions, d'exprimer RANK-L à leur surface, par exemple lorsqu'ils sont stimulés par du lipopolysaccharide (LPS). RANK : Receptor Activator of NFκB ; RANK-L : Receptor Activator of NFκB Ligand ; OPG : ostéoprotégérine ; M-CSF : Macrophage colony stimulating factor.

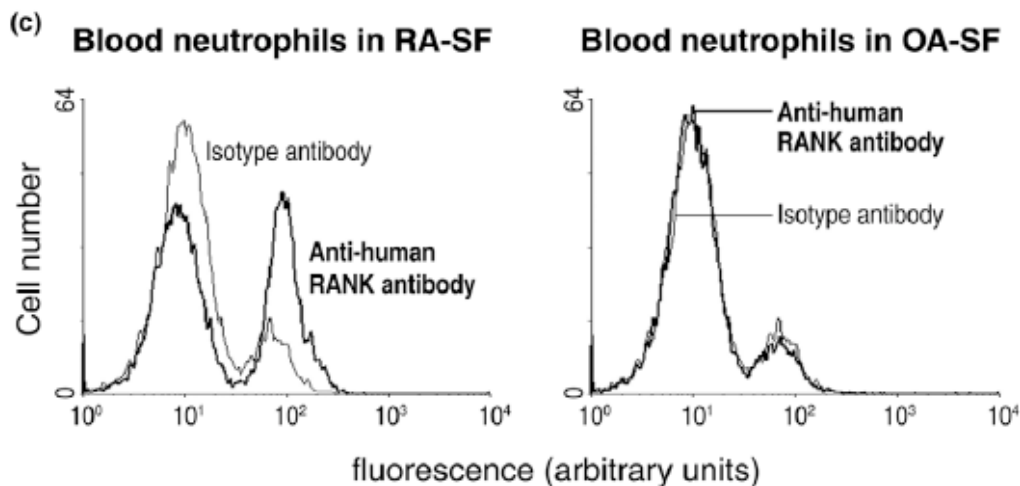


Figure 11 : les PNN du sang de PR expriment RANK-L s'ils sont incubés avec du LS de PR, à la différence du LS d'arthrose qui ne possède pas cette propriété. D'après (102).

II. Hypothèses et objectifs de travail :

De l'ADN mt a été identifié dans le LS et le plasma de patients atteints de PR. Il n'a en revanche jamais été quantifié. L'objectif principal de ce travail était de quantifier les taux d'ADN mt **extracellulaires** dans le LS et le plasma de patients atteints de PR, comparativement à des sujets contrôles, indemnes de toute pathologie inflammatoire.

Les objectifs secondaires étaient :

- De quantifier le contenu **intracellulaire** en ADN mt à l'intérieur des polynucléaires neutrophiles (PNN) sanguins et articulaires, chez les patients avec PR comparativement aux témoins indemnes de pathologie inflammatoire. En effet, les PNN pourraient être une source d'ADN mt **extracellulaire**, en le libérant à l'extérieur de la cellule dans l'articulation. De ce fait on s'attend à ce que le contenu en ADN mt **intracellulaire** à l'intérieur des PNN articulaires soit plus bas chez les patients avec PR.
- Cet ADN mt présenterait des caractéristiques (conformation, séquence, état d'oxydation, association à des protéines mitochondriales) qui lui confère des propriétés pro-inflammatoires. Nous avons cherché à préciser certaines de ces caractéristiques, en recherchant la protéine TFAM par Western-Blot au sein des liquides synoviaux de PR, et en étudiant l'état d'oxydation de l'ADN des patients avec PR comparativement aux témoins.
- L'ADN mt **extracellulaire** libéré dans le LS pourrait contribuer à la physiopathologie de la maladie, en augmentant l'expression cellulaire de RANK-L à la surface des PNN, contribuant ainsi à l'entretien de la phase de destruction articulaire.

III. Matériels et Méthodes

III-1- Population étudiée et recueil des échantillons sanguins et articulaires

Les échantillons sanguins et articulaires ont été recueillis entre juillet 2012 et novembre 2014 auprès du service de Rhumatologie du CHU de Bordeaux, après obtention du consentement éclairé des patients, dans le cadre de soins courants. Le protocole et les modalités de prélèvements ont été approuvés par le Comité de Protection des Personnes (CPP). Les LS sont issus de ponctions articulaires diagnostiques et thérapeutiques chez des patients en poussée de PR ou d'arthrose (pathologie articulaire dégénérative non inflammatoire).

Les prélèvements sanguins ont été réalisés chez des patients en poussée de leur PR ou chez des témoins sains. Afin de déterminer si nos hypothèses étaient spécifiques de la PR ou aspécifiques et transposables à d'autres types d'arthrites inflammatoires, nous avons également réalisé des prélèvements sanguins et articulaires chez des patients en poussée d'arthrite microcristalline (AM) : goutte ou chondrocalcinose articulaire (CCA).

Pour chaque patient, ont été colligés (lorsque disponibles) plusieurs paramètres cliniques et biologiques : âge, sexe, durée de la maladie, historique des traitements, taux de PNN sanguins et taux de C-Réactive Protéine (CRP) sanguine au moment du prélèvement, taux de Facteur Rhumatoïde (FR) et d'anticorps anti-peptides citrullinés (anti-CCP), analyse cytologique, biochimique, microcristalline et bactériologique des liquides articulaires, érosions radiographiques.

Afin d'évaluer l'activité de la PR, nous avons choisi comme critère objectif le score composite DAS 28 (basé sur la CRP, et non le score basé sur la vitesse de sédimentation, car les valeurs de celle-ci étaient moins souvent disponibles chez nos patients). Ce dernier recense trois paramètres cliniques (le nombre d'articulations douloureuses [ND] et le nombre d'articulations gonflées [NG] sur un total de 28 articulations, ainsi que l'évaluation de l'activité de la maladie par le malade [EVA]) et un paramètre biologique : la CRP, témoin de l'inflammation ($DAS\ 28 = 0,56 \times ND + 0,28 \times NG + 0,36 \times [CRP+1] + 0,014 \times EVA + 0,96$). Ce score, reconnu internationalement (103), permet de définir quatre stades d'activité de la PR :

- < 2,6 : PR en rémission
- entre 2,6 et 3,2 : activité faible de la PR
- entre 3,2 et 5,1 : activité modérée de la PR
- > 5,1 : activité forte de la PR (103,104).

Afin d'analyser le plasma, les prélèvements sanguins ont été centrifugés à 2 reprises à 2500g, 15 minutes à température ambiante avec récupération de 2/3 des surnageants. Le LS a également fait l'objet d'une double centrifugation (1600g pendant 5 minutes à température ambiante puis 16000g, 5 minutes, à température ambiante) pour s'affranchir de toute contamination cellulaire qui pourrait perturber l'interprétation des résultats de PCR (105). Les LS et plasma obtenus ont été stockés à -80°C jusqu'à utilisation. A partir de mars 2014, nous avons décidé d'ajouter systématiquement de l'inhibiteur de protéase (1/200, Protease Cocktail Inhibitor P8340, Sigma-Aldrich®) dans une partie des prélèvements de LS préalablement aliquotés, afin de prévenir la dégradation protéique en vue de la réalisation des Western Blot.

III-2- Analyse des échantillons par biologie moléculaire

La figure 10 reprend les différentes étapes de l'analyse des échantillons détaillées ci-dessous. Notez que deux types d'ADN mt ont été quantifiés : l'ADN mt **extracellulaire**, libéré dans le plasma ou le LS, et l'ADN mt **intracellulaire**, à l'intérieur des culots de PNN.

Pour une meilleure compréhension lors de la lecture de ce travail, nous précisons à chaque fois s'il s'agit de l'ADN **intra** ou **extracellulaire**.

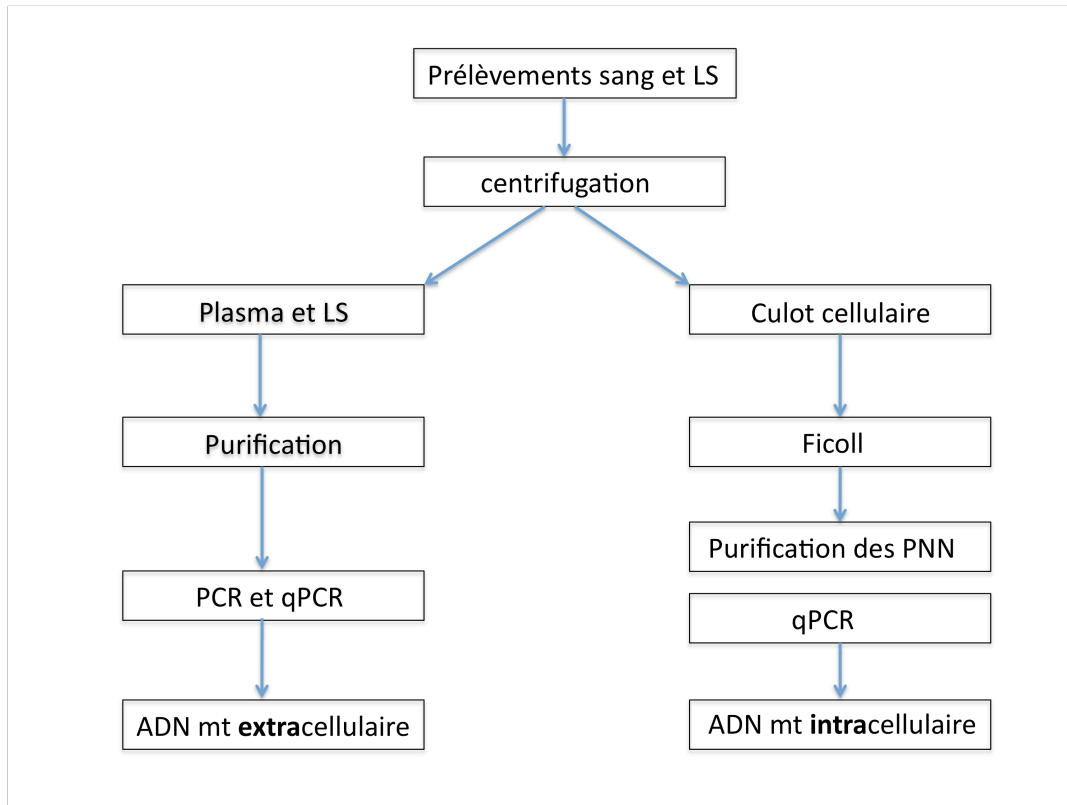


Figure 12 : figure récapitulative des différentes étapes de biologie moléculaire. PCR : polymérase chain reaction. qPCR : PCR quantitative.

III-2-1. Purification des liquides synoviaux et plasmas

Le contenu protéique élevé des échantillons, notamment la richesse en fibrine des LS, pouvant constituer un frein à la détection d'ADN mt par PCR, nous avons choisi de purifier sur colonnes (kit NucleoSpin® Tissue de Macherey Nagel) les LS et plasmas, afin de recueillir leur ADN total concentré. Les protéines sont lysées par des protéases. L'ADN est précipité par de l'éthanol sur une membrane de silice, lavé puis élué. Le protocole est détaillé dans l'**annexe 1**.

III-2-2. Analyse des échantillons par PCR qualitative

Lors de l'étude préliminaire à ce travail, afin de valider l'observation de la littérature quant à la présence d'ADN mt **extracellulaire** dans le LS et le plasma de PR, les échantillons

purifiés ont été analysés en PCR classique avec des amorces spécifiques d'ADN mt, reconnaissant le gène UUR codant pour l'ARN de transfert de la leucine :

mtF3212 : CACCCAAGAACAGGGTTTGT

mtR3319 : TGGCCATGGGTATGTTGTTAA (105)

Le protocole de ces PCR préliminaires ne figure pas ici mais est détaillé à titre informatif en **annexe 2**, dans la mesure où elles ont été réalisées par un autre membre de l'équipe (le Docteur Anne Contis).

III-2-3. Analyse des échantillons par PCR quantitative

A. Etablissement de la gamme d'ADN mt

Celle-ci a également été établie par le Docteur Contis, et ne sera donc pas détaillée ici. A titre informatif, nous avons utilisé un amplicon d'ADN mt obtenu par la PCR d'un de nos échantillons de LS de PR. Après avoir excisé au scalpel cet amplicon d'ADN mt du gel d'agarose, nous avons procédé à une ligation plasmidique de l'ADN en vue d'une transformation bactérienne pour amplification puis extraction plasmidique. La gamme étalon d'ADN mt a été établie conformément aux données de la littérature (105), et le séquençage, après extraction plasmidique, a permis de confirmer qu'il s'agissait bien de l'amplicon du gène UUR d'ADN mt (**figure 13**.)

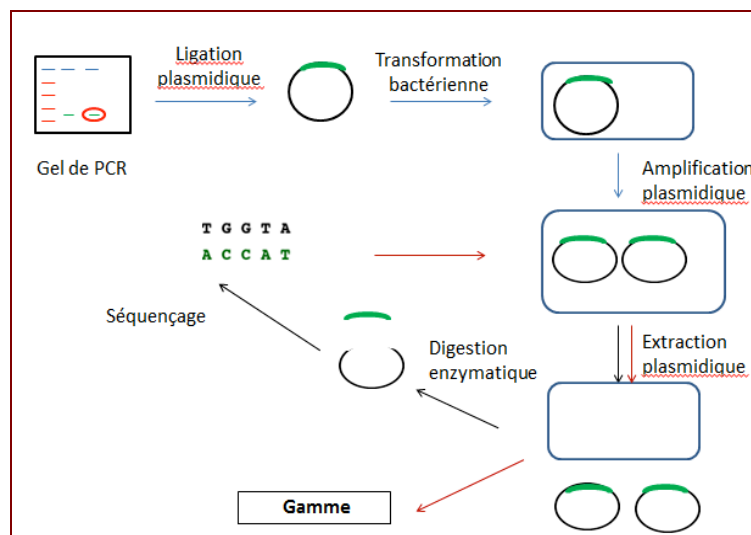


Figure 13: établissement de la gamme d'ADN mt (réalisée avant le début du Master 2)

B. Protocole de qPCR pour quantifier l'ADN mt extracellulaire

Nous avons utilisé les mêmes amorces d'ADN mt qu'en PCR classique (cf. paragraphe III-2-2). Le mix de qPCR contient pour un échantillon, 12,5 µl d'iQ SYBR Green Supermix® à 2X (concentration finale à 1X), 1,25 µl d'amorces reverse et forward à 10 µM (soit une concentration finale à 0,5µM) et 8µl d'eau pour un volume final de 23 µl. Dans une plaque pour qPCR sont déposés au fond des puits 2 µl des échantillons à tester auxquels sont ajoutés 23 µl de mix par puits. Les échantillons sont testés en triplicats, de même pour la gamme de 10⁶ à 10 copies/2µl. Après avoir rempli les puits, la plaque est centrifugée à 3000 rpm pendant 4 minutes. Le protocole de qPCR comporte une dénaturation initiale de 10 minutes à 95°C ; 40 cycles d'amplification avec une étape de dénaturation de 30 secondes à 95°C et une étape d'hybridation de 1 minute à 60°C ; un cycle de 2 minutes avec 1 minute de dénaturation à 95°C, 30 secondes d'hybridation à 55°C et 30 secondes d'élongation à 95°C pour déterminer le T_m (température de dissociation). Les résultats sont analysés par le logiciel Bio-Rad CFX Manager®.

C. Isolement des PNN sanguins et articulaires

Après transfert de l'échantillon sanguin dans un tube de 50 ml, une solution de Dextran 3%, de volume identique au sang, est ajoutée, afin d'obtenir une sédimentation des globules rouges. Au terme de 30 minutes d'incubation à température ambiante, le surnageant (plasma riche en leucocytes) est récupéré et centrifugé (10 minutes, 250g, 5°C). Le culot cellulaire obtenu est resuspendu dans un volume de NaCl 0,9% identique au volume de sang initial, puis déposé dans un tube de 50 ml, au-dessus d'une couche de 10 ml de Ficoll. Une centrifugation de 400g pendant 40 minutes à température ambiante, sans frein, permet au Ficoll de séparer les éléments figurés du sang en fonction de leur densité. Ainsi les globules rouges et PNN sédimentent au fond du tube, surmontés par le Ficoll puis par les PBMC (peripheral blood mononuclear cells) qui sont à l'interface Ficoll/plasma. Après avoir éliminé le plasma, les PBMC et la moitié du Ficoll, les PNN et hématies restantes sont soumis à une lyse hypotonique par l'ajout de 20 ml de NaCl 0,2% incubés dans la glace. Au terme de 30 secondes de lyse, l'isotonie est restaurée par l'ajout de 20 ml de NaCl 1,6% incubés dans la glace. Les cellules sont culotées par centrifugation (250g, 5°C, 6 minutes), puis lyse et centrifugation sont répétées pour éliminer les hématies résiduelles. Les PNN obtenus sont resuspendus dans 5 ml de NaCl 0,9% et comptés en cellule de Neubauer sous microscopie optique. A l'issue d'une nouvelle centrifugation identique à la précédente, ils sont dilués dans du milieu RPMI + 8% SVF pour obtenir une concentration à 1x10⁶ PNN/ml et aliquotés dans

des eppendorfs de 1 ml. Les PNN sont culotés par centrifugation (5000 rpm, 5 minutes) et congelés à sec à -80°C jusqu'à utilisation.

La pureté des PNN isolés est démontrée par analyse morphologique en microscopie optique par coloration Giemsa, en déposant 100µl de cellules par cytopspin sur une lame. Tous nos échantillons de PNN ont une pureté supérieure à 95% (**Figure 14**).

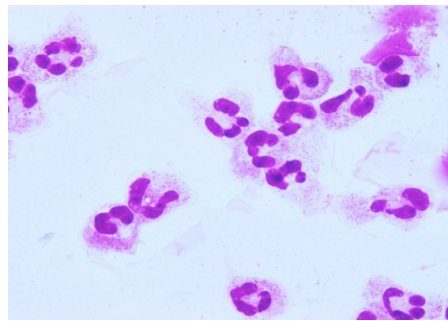


Figure 14 : PNN en coloration Giemsa

Le protocole appliqué aux PNN du LS est similaire à l'exception de l'étape de sédimentation des globules rouges par Dextran qui est inutile compte tenu de la faible teneur en hématies.

D. Purification des PNN isolés et analyse en qPCR de leur contenu en ADN mt intracellulaire

La technique de purification des PNN pour en extraire leur ADN intracellulaire est identique à la technique de purification des LS et plasma, faisant appel au kit NucleoSpin® Tissue de Macherey Nagel. L'étape de pré-lyse requiert néanmoins une incubation à 56°C avec le tampon de pré-lyse et la protéinase K, plus longue (3 heures) afin de pouvoir dissoudre complètement le culot de PNN.

Le protocole de qPCR est également superposable au précédent. Néanmoins, afin de comparer le contenu en ADN mt à un élément référent, le contenu en ADN nucléaire est également mesuré. Les amorces utilisées (18S1546F : TAGAGGGACAAGTGGCGTTC ; 18S1650R : CGCTGAGCCAGTCAGTGT) reconnaissent le gène codant pour l'ARN ribosomique 18s (106). Les résultats sont exprimés en ratio d'ADN mt/ ADN nucléaire. Ce

ratio permet d'évaluer approximativement le contenu en ADN mt **intracellulaire**, à l'intérieur de la cellule.

III-3-Recherche de la présence de TFAM dans les LS par Western Blot

III-3-1. Dosage des protéines par méthode BCA (Bicinchoninic acid Assay)

Afin de standardiser la quantité de protéines chargées dans chaque puits, nous avons déterminé au préalable la concentration protéique en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ pour chacun des liquides synoviaux (LS) par méthode BCA (Bicinchoninic acid Assay). Sur une plaque 96 puits à fond plat, nous avons réalisé une gamme de BSA (Bovine Serum Albumin, albumine de sérum bovin), à partir d'une ampoule de BSA commerciale (Protein Standard, Sigma-Aldrich®) dosée à $2\text{mg}/\text{mL}$, en débutant à $50\mu\text{g}$ et diluant de $\frac{1}{2}$ en $\frac{1}{2}$ en PBS (Phosphate Buffer Saline, tampon phosphate salin) dans les colonnes 1 et 2. Les échantillons ont tous été passés en « duplicate » ($1\mu\text{L}$ d'échantillon pour $49\mu\text{L}$ de PBS). $150\mu\text{L}$ de « working solution » (composée de 50 parts de réactif A [acide bicinchoninique] pour 1 part de réactif B [sulfate de cuivre]) sont ensuite ajoutés à chacun des puits et la plaque est mise 10 minutes à l'étuve à 37°C . La présence de protéines fait virer le réactif au violet foncé. La plaque est ensuite lue au spectrophotomètre à 570 nm , et la concentration protéique interprétée et calculée grâce au logiciel SkanIt Varioscanner®.

III-3-2. Réalisation des Western-Blot anti-TFAM :

Etant donnée la physiopathologie très différente entre l'arthrose d'une part, liquide mécanique pauvre en protéine, et les arthrites inflammatoires d'autre part, véritables exsudats riches en protéines, nous n'avons pas pu choisir de protéine endogène commune comme référence de la charge inter échantillon. En effet, la concentration articulaire aurait varié selon l'étiologie.

Pour pallier cela, nous avons ajouté une protéine exogène, la lactalbumine bovine (Sigma-Aldrich®) à chacun des échantillons chargés. Par conséquent, chaque échantillon a été chargé dans chacun des puits de la façon suivante : $200\mu\text{g}$ de protéines articulaires, $2,5\mu\text{g}$ de Lactalbumine, et $10\mu\text{L}$ de tampon de charge dénaturant et réducteur à 5X (associant tampon Tris, glycérol, SDS, β -mercaptoéthanol, et bleu de Coomassie), dans un volume total de 50

μ L. Le contrôle positif choisi pour l'anticorps TFAM (ab119684, Abcam®) est un lysat de cellules HeLA (charge : 30 μ g), conformément aux recommandations du fabricant. L'électrophorèse a été réalisée sur des gels SDS-PAGE (technique de Laemmli : gels de polyacrylamide contenant du dodécyl sulfate de sodium) coulés manuellement (gel de concentration à 4% et gel de migration à 12%), en laissant migrer 1h30 à 120V, dans du tampon de Laemmli. Le transfert a été réalisé sur une membrane de nitrocellulose Hybond C-Extra®, en milieu liquide (2heures à 120 mA). La membrane est ensuite bloquée 1 heure dans du tampon de blocage Odyssey®, avant d'être incubée sur la nuit à 4°C avec les anticorps primaires anti-TFAM (anticorps murin, dilution au 1/1000^e, ab 119684, Abcam®), anti-lactoglobuline (anticorps de lapin, dilution au 1/1000^e, ab112893, Abcam®) et anti-Beta-actine (anticorps murin, dilution au 1/1000^e, A5441, Sigma-Aldrich®), tous dilués dans du tampon Odyssey®. Le lendemain, la membrane est rincée avec du TBS (Tris Buffered Saline) tween 0,05% (3 lavages de 10 minutes), puis incubée une heure à l'obscurité avec les anticorps secondaires appropriés goat anti-mouse IRDye ® 800 CW (Licor®) et goat anti-rabbit IRDye ® 680 CW (Licor®), dilués au 1/10 000^e dans du tampon Odyssey®. Enfin la membrane est rincée 3 fois 10 minutes dans du TBS-Tween 0,05%, puis 2 fois 5 minutes dans du PBS à 1X à l'abri de la lumière, avant d'être analysée par lecture infrarouge grâce à la machine Odyssey® Fc Infrared Imaging System (Licor®).

III-4-Elisa 8 oxodG

Au total, ont été analysés 6 LS de PR, 6 LS d'arthrose, 5 lysats de culots de PNN du LS de PR, 5 lysats de culots de PNN du sang de témoins sains. Les éluats d'ADN obtenus grâce au kit d'extraction NucleoSpin® Tissue de Macherey Nagel (cf. III-2) ont été passés au Nanodrop® pour quantifier leur contenu en acides nucléiques. Puis, des Cations à 100x sont ajoutés à la solution d'ADN pour obtenir une concentration finale à 1X. 2 μ L de DNase I sont ensuite ajoutés pour chaque 50 μ g d'ADN, et après 1 heure d'incubation à 37 °C, 2 μ L de phosphatase alcaline sont ajoutés pour chaque 50 μ g d'ADN avant d'incuber 1 heure supplémentaire à 37°C. Les échantillons pré-traités sont ensuite congelés à - 20°C, avant d'être testés par l'ELISA commercial HT 8-oxo-dG ELISA KIT II (Trevigen®). Les concentrations en motif 8-oxo-dG sont obtenues par analyse spectrophotométrique grâce au logiciel SkanIt Varioskan®.

III-5-Etude de l'expression de RANK-L par les PNN après incubation avec l'ADN mt

III-5-1. Isolement d'ADN mt de cellules JRT3

Afin d'obtenir de l'ADN mt en grande quantité, celui-ci a été extrait à partir de cellules JRT3, riches en mitochondrie, grâce au kit ab 65321 d'abcam®. Ce kit permet de recueillir les mitochondries après lyse de la membrane plasmique (tampon de lyse et destruction mécanique) et centrifugation. Puis, les mitochondries sont lysées grâce à un tampon, et l'ADN mt est recueilli par précipitation à l'éthanol. La quantité d'acides nucléiques et leur pureté (ratio 260/280 nm) est ensuite analysée par Nanodrop®.

III-5-2. Isolement des PNN à partir de sang de donneurs d'hémochromatose

Les PNN ont été isolés à partir de poches de sang d'hémochromatoses fournies par l'Etablissement Français du Sang. Après une première étape de Dextran à 3% pour récupérer le plasma riche en globules blancs, les PNN sont ensuite isolés grâce au Ficoll. Trois étapes de lyses hypotoniques permettent de s'affranchir des globules rouges. Les culots de PNN sont ensuite resuspendus dans du RPMI + 8% SVF pour obtenir une concentration de $10 \cdot 10^6$ PNN/ml, soit $5 \cdot 10^6$ PNN/500 μ L.

III-5-2. Mise en culture des PNN

Dans une plaque de 24 puits, les PNN sont déposés à hauteur de $10 \cdot 10^6$ cellules/puits (soit 500 μ L des PNN précédemment resuspendus dans du RPMI + 8% SVF) + 500 μ L de milieu selon les différentes conditions (soit volume final de 1ml). Le milieu est composé de RPMI + 8% de SVF, avec du GM-CSF dilué à 50 ng/mL. En effet, le GM-CSF (Granulocyte macrophage colony stimulating factor) est un facteur de croissance connu pour prolonger la survie des PNN en culture, car ces cellules sont très fragiles in vitro (107). Les différentes conditions de culture comprenaient donc : a) le milieu avec GM-CSF seul ; b) le milieu (avec GM-CSF) et un agoniste du TLR9, le CpG B, de chez Invivogen ® (à une concentration de 10 μ g/mL) ; c) le milieu (avec GM-CSF) et de l'ADN mt isolé de JRT3 (à une concentration de 10 μ g/mL) ; d) le milieu (avec GM-CSF) et de l'ADN mt isolé de JRT3 (à une concentration de 10 μ g/mL) préalablement dégradé pendant 2 heures par une DNase (Deoxyribonuclease I from bovine pancreas de Sigma-Aldrich®). Les cellules sont ensuite incubées 18 heures à

37°C et 5% CO₂, avant d'être recueillie par centrifugation de la plaque (10 min, 1500 rpm, 9-9) : le surnageant est recueilli et congelé à - 20°C, et les cellules sont ensuite resuspendues dans du PBS.

Afin de rechercher un éventuel effet-dose de la quantité d'ADN mt sur l'expression membranaire de RANK-L par les PNN, nous avons réitéré l'expérience avec des doses croissantes d'ADN mt à 1 µg/mL, 10 µg/mL et 100 µg/mL.

III-5-3 Préparation des PNN pour analyse en cytométrie

Les cellules sont ensuite marquées par différents fluorochromes : 5 µL de CD 66-FITC (CD66 = marqueur de la lignée granuleuse ; FITC = Fluorescein isothiocyanate), 5 µL de RANKL-PE (PE= Phycoerythrine), et 2 µL de DAPI dilué au total au 1000^e (marqueur de mortalité cellulaire). Toutes les analyses ont été réalisées sur la machine BD FACSCANTO-II de chez BD Biosciences®. La stratégie de « gating » était la suivante : les PNN étaient d'abord « fenêtrés » sur les marqueurs de taille (FSC : forward scatter, et SSC : side scatter). Puis, les cellules vivantes (DAPI négatives) étaient sélectionnées si elles exprimaient le CD66. Enfin, nous avons regardé sur cette population le pourcentage de cellules exprimant le RANK-L.

III-6- Statistiques

Nous avons préalablement testé l'ensemble des effectifs par le test de Kolmogorov-Smirnov, pour vérifier s'ils suivaient une distribution gaussienne. Nous avons utilisé le test non paramétrique adapté aux échantillons non appariés de Mann Whitney (ou son équivalent de Kruskal-Wallis pour les analyses portant sur plus de deux groupes) pour rechercher l'existence d'une différence significative ($p < 0,05$) entre les échantillons testés, à partir du logiciel GraphPadPrism version 6®. Pour les échantillons appariés, nous avons utilisé un test t de Student lorsque la distribution était normale (ou son équivalent de Wilcoxon si la population n'était pas gaussienne). Les données sont exprimées en moyenne +/- écart-types à la moyenne. Pour analyser les corrélations nous avons utilisé un test de Pearson (ou un test de Spearman lorsque la population n'était pas Gaussienne), également adapté aux échantillons non appariés.

IV. Résultats

IV-1- Caractéristiques des patients inclus dans l'étude

Nous avons inclus 65 patients souffrant d'un rhumatisme inflammatoire et 27 sujets contrôles. Ils se répartissent de la façon suivante :

- 57 patients souffrant de PR dont nous avons pu analyser 67 échantillons comportant 40 échantillons de plasmas et 27 LS (dont 7 patients pour lesquels nous disposions à la fois des prélèvements sanguins et articulaires)
- 12 patients souffrant d'AM dont nous avons pu analyser 8 LS et 7 plasmas (dont 5 patients pour lesquels nous disposions en parallèle des prélèvements articulaires et sanguins)
- 12 patients souffrant d'arthrose dont nous n'avons obtenu que les LS
- 15 volontaires sains dont nous avons étudié le plasma.

Tous les patients souffrant de PR répondaient aux critères ACR/EULAR 2010. Pour les patients souffrant d'AM (goutte ou chondrocalcinose), le diagnostic était retenu devant la présence de microcristaux dans le LS.

Les caractéristiques clinico-biologiques des différents effectifs sont présentées dans le **tableau 3**. Il est à noter que tous les LS étudiés étaient stériles.

Le groupe de patients PR comportait une majorité de femmes (64,9%) avec un âge médian de 63 ans (30 à 85 ans). Seuls 5 patients (8,7%) étaient séronégatifs (facteur rhumatoïde et anti-CCP négatifs). La durée moyenne d'évolution de la maladie était de 9 ans avec une médiane de 3 lignes thérapeutiques. Six patients étaient naïfs de traitement, avec un diagnostic récent (inférieur à 1 an dans tous les cas). Il s'agissait majoritairement de patients avec une PR active puisque le DAS28 CRP médian était de 5,12, traduisant une activité forte de la maladie, érosive dans près de la moitié des cas (47,3%). Concernant les paramètres de l'inflammation, le nombre médian de PNN était normal à 5,79 G/L (1,27 à 23,8 G/L) avec une CRP médiane augmentée à 27,15 mg/L (0,2 à 188 mg/L). Cette inflammation systémique modérée contrastait avec l'inflammation synoviale. Les 27 LS obtenus étaient de nature inflammatoire avec une cellularité médiane de 15 000 éléments/mm³. Dans les 15 LS où la formule était réalisée (55,5% des prélèvements), les PNN prédominaient largement avec un nombre médian de 29 308/mm³ (80% des éléments).

Pour le groupe AM, le sex ratio était inversé avec 16,6% de femmes pour 83,4% d'hommes et l'effectif discrètement plus âgé (âge médian de 66 ans – 40 à 92 ans). En revanche, en dépit d'une cellularité médiane plus faible (7760 éléments dont 6518 PNN soit 92% des éléments), l'inflammation systémique était plus marquée avec un nombre médian de PNN à 7,02G/L (3,57 à 22,13) et surtout une CRP médiane très augmentée à 95,6 mg/L (31,5 à 271,9 mg/L).

A l'image du groupe PR, le groupe arthrose (OA) était majoritairement féminin (58,3%) avec un âge médian plus élevé à 74,5 ans. Comme attendu, les LS étaient de nature mécanique avec une cellularité médiane de 200 éléments/mm³, sans formule réalisable dans 80,3% des cas. Aucun stigmate d'inflammation biologique n'a été détecté (nombre médian de leucocytes à 4,19 G/L et CRP médiane à 2,4 mg/L).

Enfin, le groupe de volontaires sains était plus jeune que nos patients avec un âge médian de 28,5 ans, et un sex ratio conservé par rapport aux groupes PR et OA (60% de femmes pour 40% d'hommes).

	PR (n=57)	AM (n=11)	OA (n=12)	Sujets sains (n=15)
Age (ans)	63 (30 à 85)	66 (40 à 92)	74,5 (38 à 91)	28,5 (23 à 43)
Sex ratio	F 64,9% (n=37) H 35,1% (n=20)	F 16,6% (n=2) H 83,4% (n=10)	F 58,3% (n=7) H 41,7% (n=5)	F 60% (n=9) H 40% (n=6)
Nombre de PNN sanguins (G/L)	5,79 (1,27 à 23,8)	7,02 (3,57 à 22,13)	4,19 (3,01 à 6,65)	
CRP (mg/L)	27,15 (0,2 à 188)	108,9 (31,5 à 271,9)	2,4 (2 à 32,2)	
Nombre d'éléments dans le LS/mm ³	15000 (20 à 600000)	7760 (1200 à 210000)	200 (110 à 1910)	
Nombre de PNN dans le LS/mm ³	29308 (80% des éléments)	6518 (92% des éléments)		
DAS-28 CRP	5,12 (1,5 à 7,68)			
Présence de FR et/ou ACPA	91,3% (n=52)			
Présence de lésions érosives	47,3% (n= 27)			
Durée d'évolution de la maladie	9 ans (0,5 à 56)			
Traitement de fond antérieur §	89,5% (n= 51)			
Nombre de lignes de traitement	3 (0 à 8)			

Tableau 3 : Résumé des caractéristiques clinico-biologique des patients inclus dans l'étude (résultats exprimés en médiane, min/max). PR : polyarthrite rhumatoïde ; AM : arthrite microcristalline ; OA : ostéoarthritisme (arthrose).

§ comprenant au moins un DMARD (disease modifying anti-rheumatic drug : méthotrexate, léflunomide, salazopyrine ou sels d'or)

IV-2- Détection d'ADN mt extracellulaire dans les échantillons

La première étape de ce projet, préalable à ce travail, consistait à confirmer l'observation de la littérature [8], relative à la présence d'ADN mt **extracellulaire** dans le LS et le plasma de patients atteints de PR, dans le plasma de témoins sains et son absence dans le LS d'arthrose. Pour cela, ont été analysés par PCR classique : 10 échantillons de LS de PR, 3 LS d'arthrose, 5 plasmas de PR et 5 plasmas de témoins. Les PCR ont permis de confirmer la présence d'ADN mt **extracellulaire** dans l'intégralité des LS et plasmas de PR testés et dans les plasmas des témoins (sujets sains). Pour les LS d'arthrose, 2 des 3 échantillons sont revenus positifs, sans toutefois de signe de contamination de notre échantillon (le témoin négatif restant négatif), avec pour l'un d'eux, une intensité de bande identique à celle des LS de PR, ce qui n'avait pas été retrouvé dans la publication de *Hajizadeh* [9].

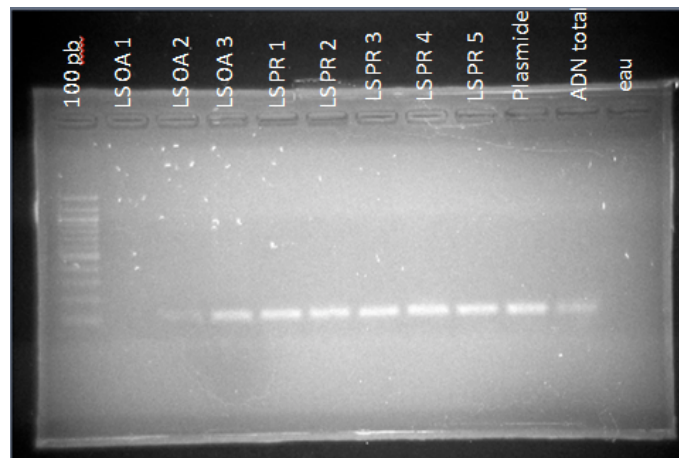


Figure 15 : PCR de LS purifiés de PR et d'arthrose (OA)

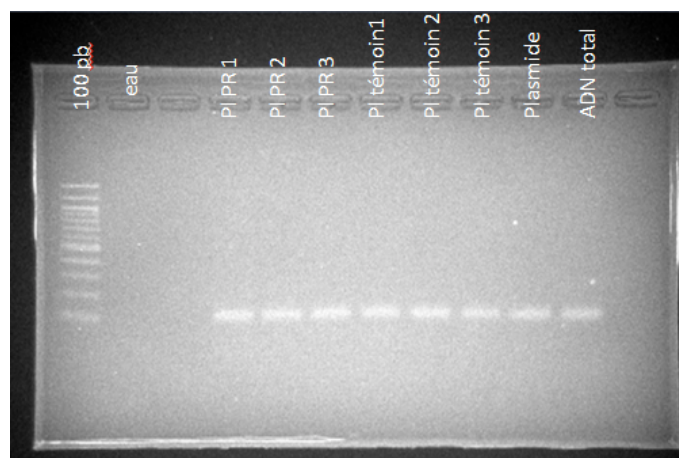


Figure 16 : PCR de plasma (PI) purifiés de PR et de témoin

La conclusion de ces PCR préliminaires est qu'il y a bien de l'ADN mt **extracellulaire** dans les plasmas et LS de PR, mais également dans les échantillons des témoins négatifs (arthrose et sang de sujet sains). Dès lors, la nécessité de quantifier l'ADN mt **extracellulaire** dans ces échantillons s'imposait, à la recherche d'une différence quantitative entre les patients et les témoins.

IV-3- Quantification de l'ADNmt extracellulaire dans les échantillons

Nous avons analysé par qPCR 47 LS (27 PR, 12 arthroses [*OA=osteoarthritis*] et 8 arthrites microcristallines [*AM*]), et 62 plasmas (40 PR, 15 témoins sains et 7 AM). Les résultats sont présentés dans la **Figure 17**. Les LS de PR contiennent statistiquement plus de copies d'ADN mt **extracellulaire** que les LS d'arthrose (moyenne de 749 147 copies/mL +/- 310 776 pour les PR contre 5460 copies/mL +/- 4507, $p=0,0007$, obtenu avec un test de Kruskal-Wallis, **figure 17 A**). Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre le nombre de copies d'ADN mt **extracellulaire** dans le LS de PR comparativement au LS d'AM (moyenne de 1 486 000 copies/mL +/- 468 318), mais la quantité d'ADN mt **extracellulaire** était significativement plus élevée dans le LS d'AM comparativement au LS d'arthrose ($p < 0,0001$).

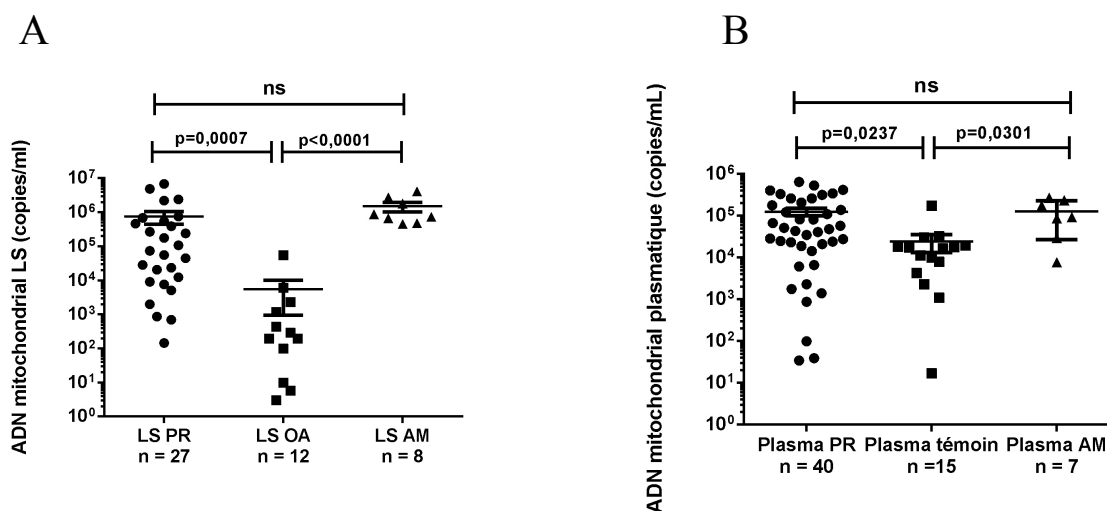


Figure 17 : Quantification comparative d'ADN mt extracellulaire : **A** : dans les LS de PR, d'arthroses (OA) et d'arthrites microcristallines (AM) ; **B** : dans les plasmas de PR, de sujets sains et d'AM.

En ce qui concerne les plasmas, les taux étaient statistiquement plus élevés dans les plasmas de PR et d'AM comparativement aux plasmas de sujets sains (avec des moyennes respectives de 124 989 copies/mL +/- 25 952, de 128 114 copies/mL +/- 38212 et de 24 210 copies/mL +/- 11067, avec $p < 0,05$, obtenu par un test de Kruskal-Wallis, **figure 17 B**). En revanche, la différence n'était pas statistiquement significative entre les plasmas de PR et d'AM.

Cependant, les résultats soulignent une hétérogénéité de la quantité d'ADN mt extracellulaire au sein du groupe PR, s'échelonnant de 0 à presque 7 millions de copies/mL dans le LS, et de 34 à plus de 600 000 copies/mL dans le plasma. Nous avons émis l'hypothèse que cette étonnante disparité pourrait être due à une différence d'activité de la maladie entre nos patients PR.

IV-4 Analyse de la corrélation entre l'activité de la PR et la quantité d'ADN mt extracellulaire

Nous avons analysé les dossiers cliniques des 27 PR dont sont issus les prélèvements articulaires. Nous avons pu déterminer le score DAS 28 chez 23 d'entre eux, et les répartir ainsi en trois sous-groupes, en fonction du niveau d'activité : 1 avait un score $< 3,2$ (activité

faible), 8 avaient un score compris entre 3,2 et 5,1 (activité modérée), et 14 un score > 5,1 (activité forte). La **figure 18** représente le nombre de copies d'ADN mt **extracellulaire** dans le LS selon les sous-groupes, et comparativement aux arthroses. A noter que le patient du groupe activité faible présentait en réalité une complication arthrosique secondaire à sa PR (liquide mécanique avec 20 éléments/mm³, sur une gonarthrose secondaire), et a par conséquent été exclu de l'analyse et n'est pas représenté sur la figure (il y avait d'ailleurs peu d'ADN mt dans son LS). Le taux moyen d'ADN mt **extracellulaire** dans le LS du groupe activité forte était significativement plus important par rapport au taux moyen dans le LS du groupe activité modérée (respectivement 1121000 copies/mL +/- 565949 contre 4259 copies/mL +/- 1813, p=0,0230), ou du groupe arthrose (5460 copies/mL +/- 4507, p=0,0003). En revanche, il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre le groupe activité modérée et le groupe arthrose (p>0,9999). Il n'y avait pas non plus de différence significative entre le taux moyen d'ADN mt **extracellulaire** dans les LS du groupe activité forte et le taux moyen d'ADN mt **extracellulaire** dans les LS d'AM (1486000 copies/mL +/- 468318, p>0,05).

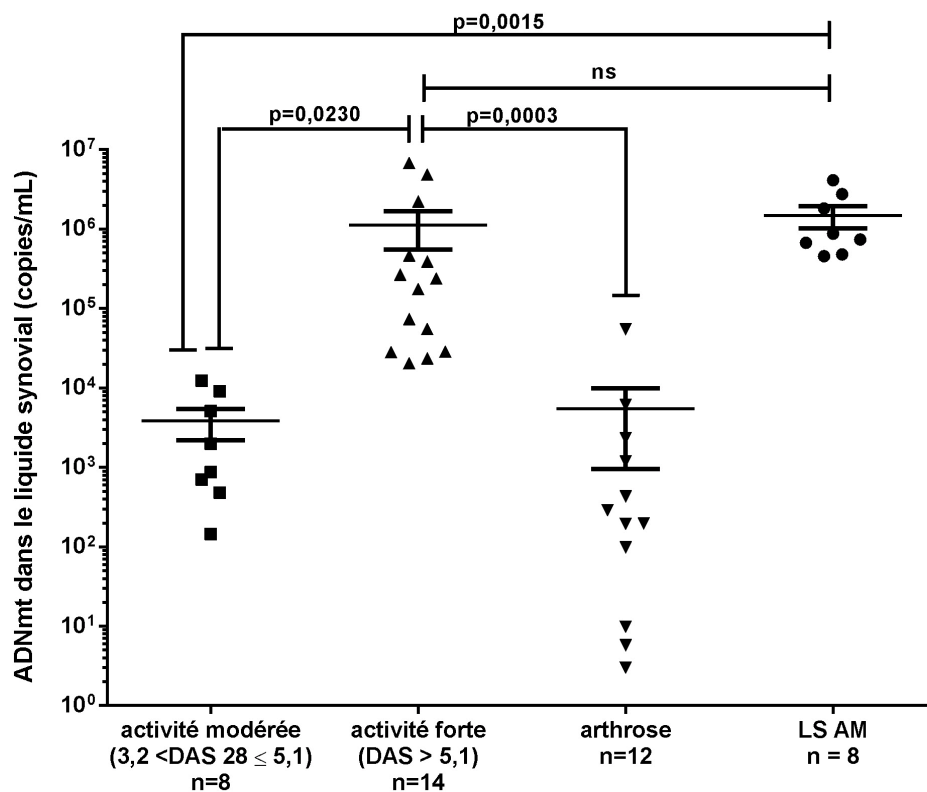


Figure 18 : Quantification de l'ADN mt **extracellulaire** présent dans les LS d'arthrose et de PR en fonction de l'activité de la maladie.

En ce qui concerne les dossiers cliniques des 40 PR dont sont issus les prélèvements sanguins, nous avons pu déterminer le score DAS 28 chez 39 d'entre eux. Neuf avaient une PR faiblement active, déterminée par un score DAS 28 < 3,2. Les 30 patients restants avaient un score DAS 28 supérieur à 3,2, ce qui définit une maladie active (**Figure 19**). Il n'y avait pas de différence statistiquement significative ($p>0,05$) entre les taux d'ADN mt **extracellulaire** dans le plasma des groupes PR actives, PR modérément actives et AM (taux moyens respectifs de 152 827 copies/mL, +/- 32866, de 43985 +/- 15521, et de 128 114 copies/mL, +/- 38 212). Le taux moyen d'ADN mt **extracellulaire** dans le plasma des sujets sains était de 24 210 copies/mL, +/- 11067, ce qui était significativement plus bas que le taux moyen d'ADN mt dans le plasma du groupe PR active ou du groupe AM. Cependant, la différence n'était pas significative avec les plasmas du groupe de PR modérément active ($P>0,9999$).

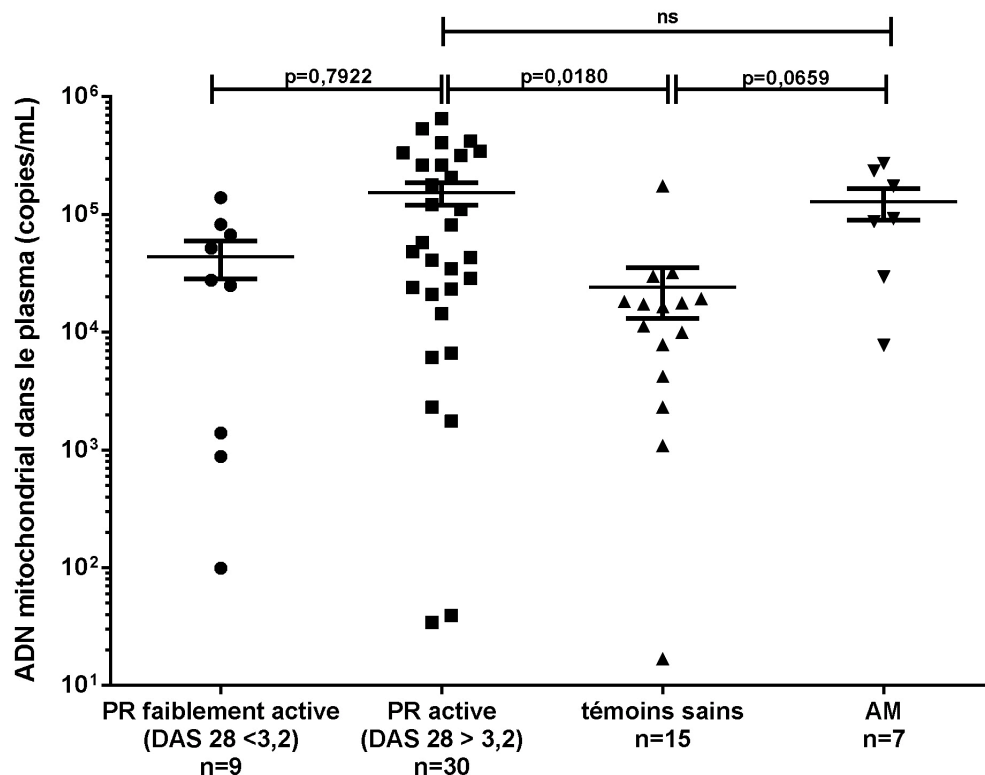


Figure 19 : Quantification de l'ADN mt **extracellulaire** présent dans les plasmas de témoins sains, d'arthrites microcristallines (AM) et de PR en fonction de l'activité de la maladie.

Etant donné que la quantité d'ADN mt **extracellulaire** dans le LS est plus importante dans le groupe fortement actif, nous avons recherché une corrélation mathématique entre le score DAS28 et le taux d'ADN mt **extracellulaire** du LS, par le test de Pearson. Il n'y avait pas de corrélation évidente (coefficient de corrélation à 0,2875, $p=0,1731$). Ce résultat, qui contraste en apparence avec ceux de la figure 8 qui montrait un taux d'ADN mt **extracellulaire** plus important dans les LS de PR actives, peut s'expliquer par le fait que le calcul du score DAS 28 fait appel à certains paramètres subjectifs (nombre d'articulations douloureuses, et surtout Echelle Visuelle Analogique (EVA) patient). En outre, il s'agit d'un score composite et il a été montré que le changement d'un point du score DAS 28 évolue plus lentement que chacun des paramètres le composant pris individuellement (108).

Ainsi, nous avons recherché une corrélation entre la quantité d'ADN mt **extracellulaire** dans le LS et un paramètre objectif et plus représentatif de l'inflammation. L'analyse de la corrélation entre les taux de CRP et d'ADN mt **extracellulaire** dans le LS par le test de Pearson montre une corrélation très forte (**figure 20 A.**), avec un coefficient à 0,8239 ($p<0,0001$). En revanche, nous n'avons pas trouvé de corrélation entre la CRP et le taux d'ADN mt **extracellulaire** plasmatique (coefficient à 0,1622, $p=0,3375$, **figure 20 B.**).

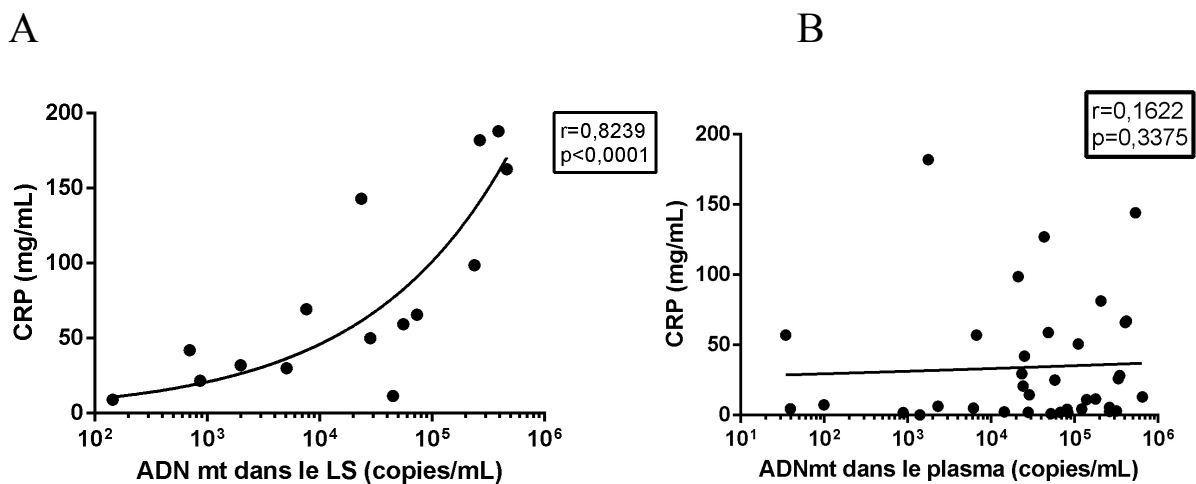


Figure 20 : Corrélation de la quantité d'ADN mt **extracellulaire** présente dans le LS (A) ou dans le plasma (B) de PR, en fonction du marqueur biologique d'inflammation CRP.

L'ADN mt **extracellulaire** libéré dans l'articulation semble donc représenter à la fois un marqueur de l'inflammation et un marqueur de l'activité de la maladie. Cela ne semble pas être le cas pour l'ADN mt **extracellulaire** plasmatique, bien que son taux soit significativement plus élevé chez les patients PR que les témoins sains.

IV-5- ADN mt extracellulaire et autres caractéristiques de la population

Une étude récente suggère que chez les populations âgées, en raison d'un remodelage du compartiment immuno-inflammatoire appelée « inflammaging », le taux d'ADN mt **extracellulaire** pourrait être plus élevé que chez les sujets jeunes (109). Afin d'écartier un éventuel biais lié à l'âge dans la mesure où l'âge médian des sujets témoins sains est bien plus bas que celui des trois autres groupes (cf. IV-1-, tableau 2), nous avons au sein de chaque groupe de patients rechercher une corrélation entre l'âge et le taux d'ADN mt **extracellulaire** dans le plasma ou le LS. Il n'y avait pas de corrélation retrouvée (corrélation respective entre l'âge et : a) le taux d'ADN mt extracellulaire dans le plasma des patients avec PR : coefficient de Spearman $r=0,2645$ avec $p=0,1369$; b) le taux d'ADN mt extracellulaire dans le LS des patients avec PR : $r= -0,01809$ avec $p=0,9316$; c) le taux d'ADN mt extracellulaire dans le LS de patients avec AM : $r=0,1429$ avec $p=0,7825$; d) le taux d'ADN mt extracellulaire dans le LS d'OA : $r= -0,09205$ avec $p=0,81$; e) le taux d'ADN mt extracellulaire dans le plasma des sujets sains : $r=0,1693$ avec $p=0,6147$).

Vingt-cinq des 27 patients (soit 92,6%) dont sont issus nos prélèvements articulaires étaient positifs pour les FR et les anti-CCP. Il n'y avait pas de corrélation entre le taux d'ADN mt **extracellulaire** dans le LS et le taux de FR (coefficient de Spearman $r= -0,04620$ avec $p=0,8119$) ou le taux d'anti-CCP (coefficient de Spearman $r= 0,04935$ avec $p=0,8318$).

Six patients seulement étant naïfs de traitement. Il était difficile d'étudier l'impact de la prise de médicament sur la présence d'ADN mt **extracellulaire**, ce d'autant que la nature des traitements était très hétérogène et le nombre élevé de lignes thérapeutiques (médiane à 3).

Le taux d'ADN mt **extracellulaire** articulaire ne semble pas associé au caractère érosif ou non de la maladie, puisqu'il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre

les patients non érosifs (n=5, taux moyen à 453539 +/- 440866 copies/ML) et les patients présentant une ou plus d'une érosion (n=16, taux moyen à 597368 +/- 321978 copies/mL, p=0,4269, obtenu avec un test de Mann-Whitney).

IV-6- Le PNN source d'ADNmt extracellulaire dans la PR

Le PNN représente le type cellulaire prédominant dans le liquide articulaire de PR. En raison de la quantité importante d'ADN mt **extracellulaire** retrouvée dans le LS de PR, nous avons naturellement émis l'hypothèse que le PNN constituait une des sources de l'ADN mt **extracellulaire** libéré dans l'articulation.

La **figure 21 A.** montre une forte corrélation entre le taux d'ADN mt **extracellulaire** articulaire et le nombre de PNN dans le liquide synovial, avec un coefficient de Spearman à 0,7525 (p=0,0017). En comparaison, il ne semble pas y avoir de corrélation entre le taux d'ADNmt **extracellulaire** plasmatique et le nombre de PNN sanguin (coefficient à 0,09441, p=0,5896, **figure 21 B.**)

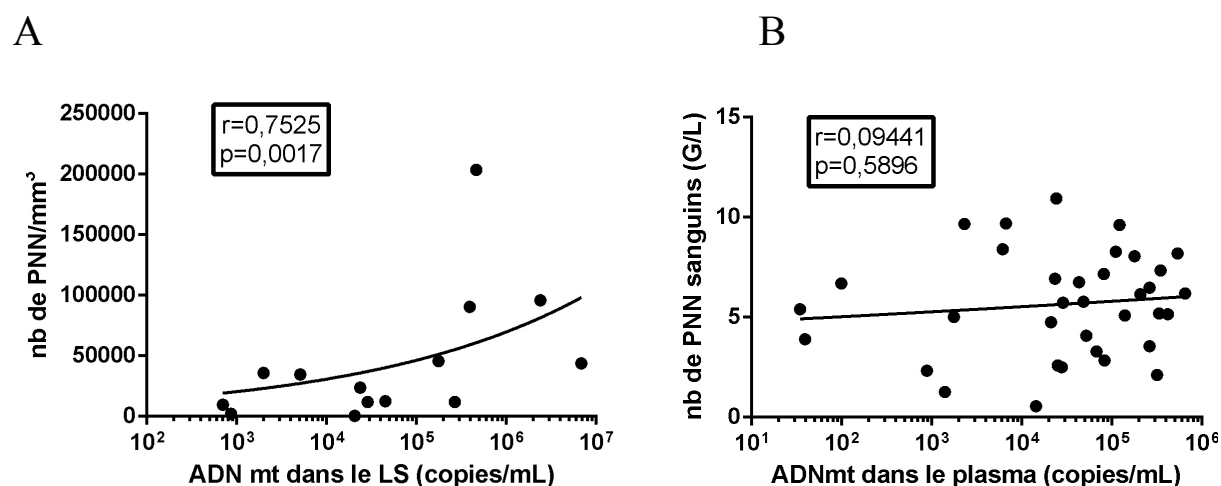


Figure 21 : **A :** corrélation entre la quantité d'ADN mt **extracellulaire** dans le LS et le nombre de PNN articulaires ; **B :** corrélation entre la quantité d'ADN mt **extracellulaire** dans le plasma et le nombre de PNN sanguins.

Afin de déterminer si le PNN de PR pouvait être la source d'ADN mt, nous avons voulu évaluer si le contenu en ADN mt **intracellulaire** était supérieur à celui des PNN de

sujets sains. Ainsi, nous avons analysé par qPCR le ratio ADN mt/ADN nucléaire dans les PNN sanguins de 40 PR et de 11 témoins, et dans les PNN articulaires de 9 PR (10⁶ PNN par échantillon) (**figure 22**). S'il n'existe pas de différence statistiquement significative entre les ratios ADN mt/ADN nucléaire de PNN sanguins de PR (ratio moyen à 23,73 +/- 4,14) et de sujets sains (ratio moyen à 16,14 +/- 2,74, $p > 0,9999$), il existe en revanche une différence statistiquement significative entre les PNN sanguins et articulaires de PR, ces derniers ayant un ratio nettement abaissé (ratio moyen à 6,324 +/- 1,674, $p = 0,0188$). Ceci pourrait être la conséquence d'une libération d'ADN mt en **extracellulaire** par les PNN articulaires ou d'un phénomène de dégradation des mitochondries (mitophagie).

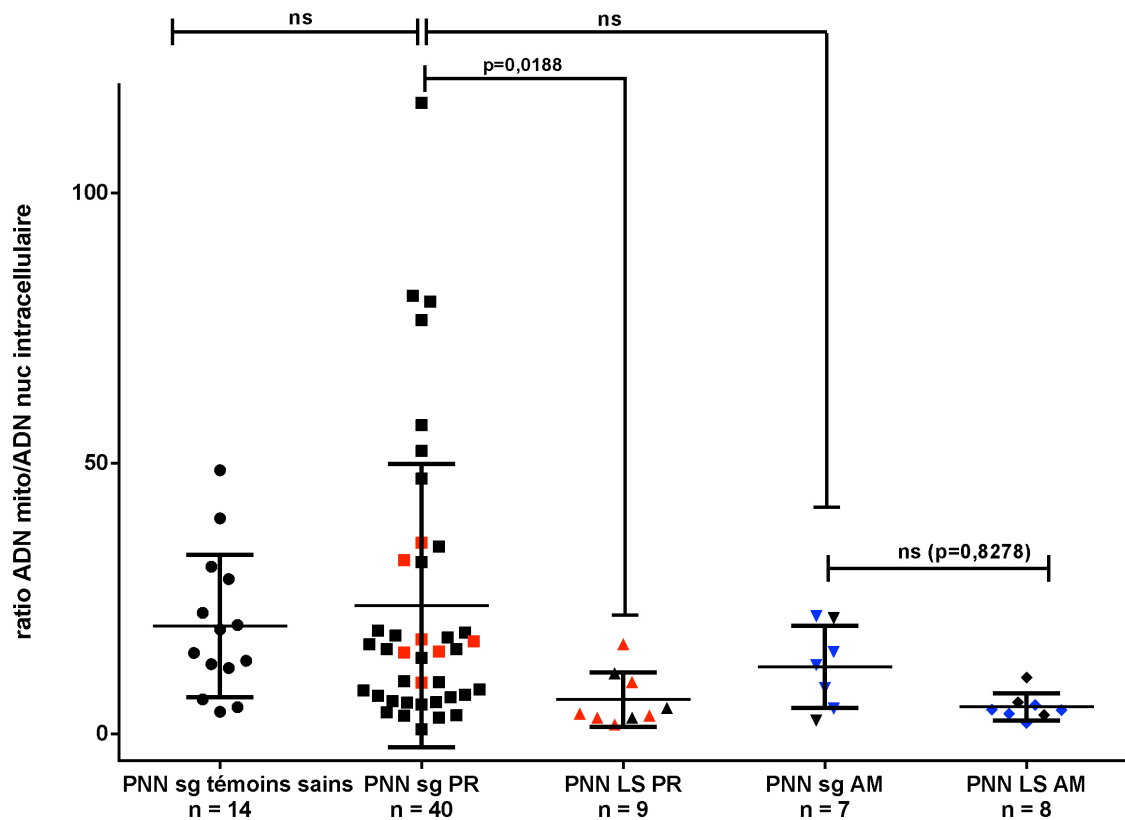


Figure 22 : Estimation du contenu en ADN mitochondrial **intracellulaire** du PNN par la détermination du ratio ADN mt/ ADN nucléaire dans les PNN sanguins de PR, de témoins sains et d'arthrites microcristallines (AM), et dans les PNN articulaires de PR et d'AM (*en rouge* : analyse de façon concomitante du contenu en ADN mt **intracellulaire** des PNN sanguins et des PNN articulaires chez les mêmes patients PR ; *en bleu* : analyse de façon concomitante du contenu en ADN mt des PNN sanguins et des PNN articulaires chez les mêmes patients AM).

Cette observation est étayée par l'étude de 7 patients pour lesquels nous avons pu analyser de façon concomitante le contenu en ADN mt **intracellulaire** des PNN sanguins et des PNN articulaires (**figure 22**, points rouges). Ces 7 patients ont un ratio ADN mt/ ADN nucléaire élevé dans leurs PNN sanguins (en moyenne à 24,47 +/- 6,140) mais un ratio presque 5 fois plus faible dans leurs PNN articulaires (en moyenne à 5,331 +/- 1,363). L'étude de ces valeurs appariées à l'aide d'un test t de Student témoigne que la différence est statistiquement significative ($p=0,0224$, **figure 23 A**). En outre, le ratio ADN mt/ADN nucléaire moyen (estimation du taux d'ADN mt **intracellulaire**) à l'intérieur des PNN sanguins est 4,59 fois plus élevé qu'à l'intérieur des PNN articulaires, et à contrario, on observe un taux d'ADN mt **extracellulaire** 4,36 fois plus important dans le LS que dans le plasma de ces mêmes patients. Ce rapport conservé d'environ 4,5 pourrait être un argument indirect en faveur d'une libération en extracellulaire de l'ADN mt par les PNN au sein de l'articulation : les PNN articulaires semblent « vider » leur ADN mt au sein de l'articulation (**figure 24**).

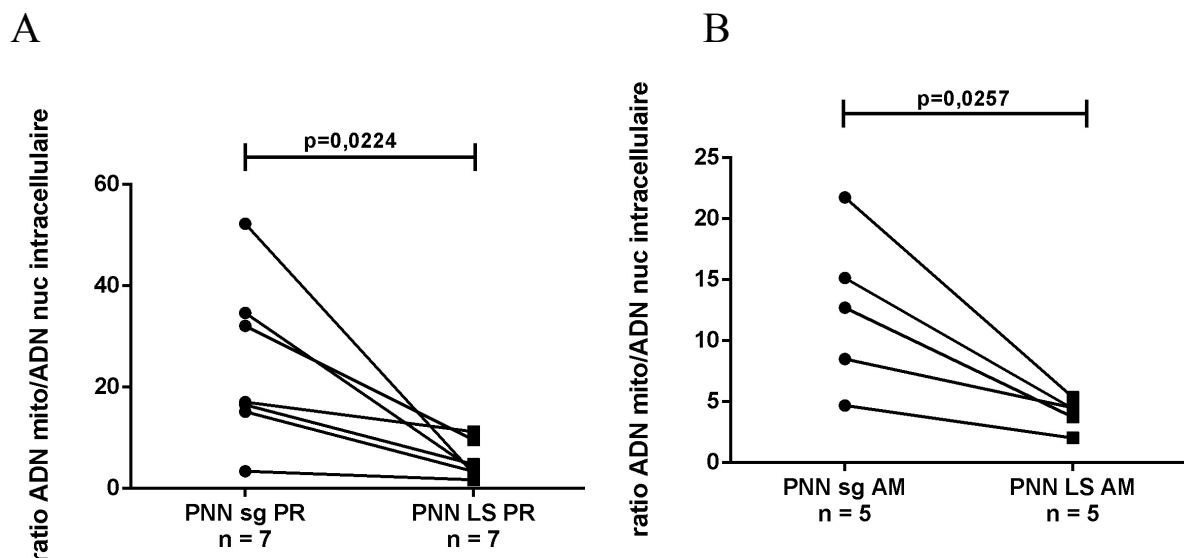
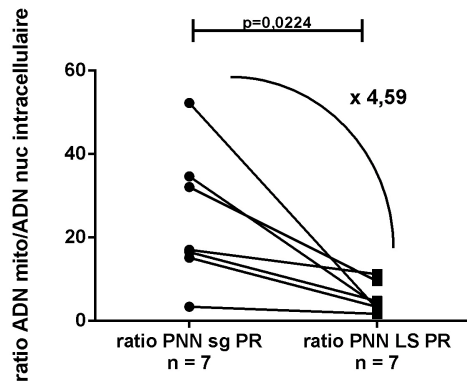


Figure 23 : évolution des ratios intracellulaires ADN mt/ADN nucléaires (estimation de l'ADNmt **intracellulaire**) entre les PNN sanguins et articulaires appariés pour chaque patient : dans la PR (**A**) et dans l'AM (**B**).

A



B

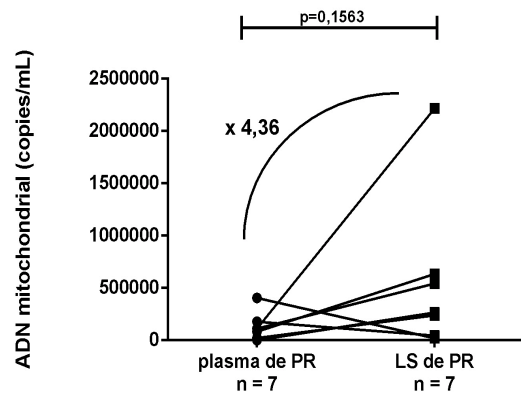


Figure 24 : **A** : évolution du ratio ADN mt/ ADN nucléaire **intracellulaire** des PNN sanguins et articulaires de PR. **B** : évolution du taux d'ADN mt **extracellulaire** à l'intérieur du plasma et du LS de PR. (test t de Student).

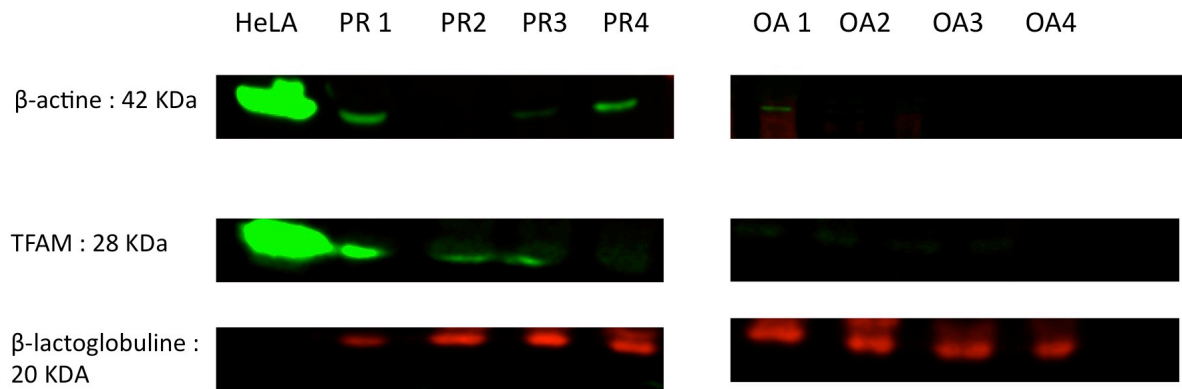
A noter que nous avons également analysés par qPCR le ratio ADN mt/ADN nucléaire dans les PNN sanguins de 7 AM (2 CCA et 5 gouttes) et les PNN articulaires de 8 AM (4 CCA et 4 gouttes) (10^6 PNN par échantillon). Là encore, les ratios des PNN sanguins d'AM semblent plus élevés que les ratios des PNN articulaires d'AM (respectivement, ratio moyen à $12,39 \pm 2,883$ et à $4,987 \pm 0,8835$), mais la différence n'est pas statistiquement significative ($p=0,8278$). Ceci pourrait s'expliquer par le faible effectif de nos patients avec AM. En effet, nous avons pu analyser de façon concomitante le contenu en ADN mt des PNN sanguins et des PNN articulaires de 5 patients (points bleus, **figure 22**). L'étude de ces valeurs appariées à l'aide d'un test t de Student témoigne que la différence est statistiquement significative ($p=0,0257$, obtenu avec un test t de Student, **figure 23 B**).

IV-7- Caractéristiques pro-inflammatoires de l'ADNmt :

IV-7-1. Recherche de la protéine pro-inflammatoire TFAM par Western-Blot

Conformément à nos hypothèses, nous avons cherché à savoir si cet ADN mt était associé à la présence dans le LS de la protéine pro-inflammatoire TFAM, et l'avons recherché pour cela par Western Blot. Nous avons également recherché la β -actine, composante cytosquelettique et marqueur de mort cellulaire. Quatorze LS de PR, 8 LS d'arthrose (**figure 25.A**) et 8 LS d'arthrite microcristalline (AM, **figure 25.B**) ont été testés. TFAM a été retrouvé de façon inconstante dans 6 LS de PR sur 14. Il est intéressant de remarquer que chez deux de ces patients (PR2 et PR3, figure 25 A), on retrouve la présence de TFAM dans le liquide articulaire et pas de β -actine, suggérant une libération spécifique sans mort cellulaire, comme ce qui a été décrit avec les polynucléaires éosinophiles qui seraient capables de « catapulter » l'ADN mt sans mourir (81). TFAM était retrouvé dans deux des huit LS d'AM testés. Concernant l'arthrose, TFAM n'était retrouvé chez aucun des patients testés, mais la β -actine non plus (sauf pour le patient OA 1, où on retrouvait une très faible bande), ce qui rend difficile l'interprétation.

A



B

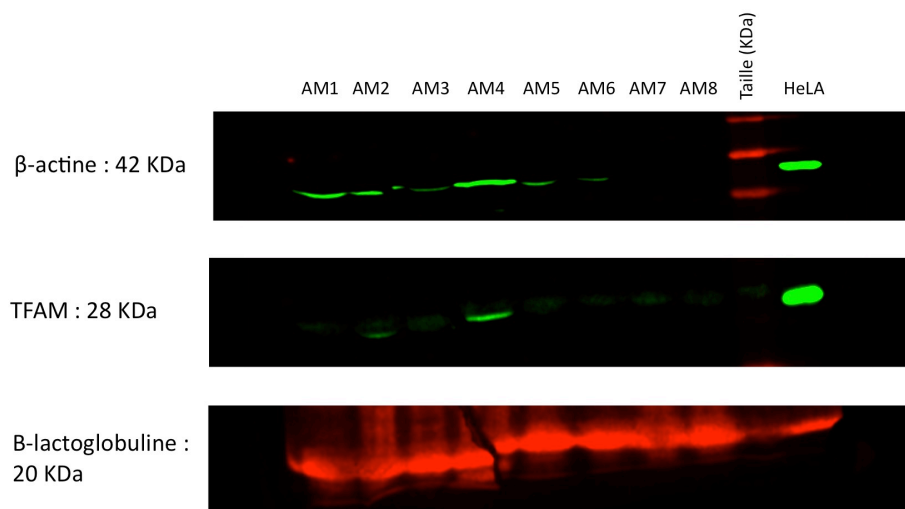


Figure 25 : Western Blot dans les LS de PR et d'arthrose (OA=osteoarthritis, arthrose) **(A)**, et dans les LS d'arthrites microcristallines (AM), **(B)**. Sont testés la protéine TFAM, le marqueur de mort cellulaire β -actine, et la β -lactoglobuline, protéine exogène utilisée comme contrôle de la charge (cf. matériel et méthodes). TFAM était retrouvé chez 6 des 14 LS de PR testés, 2 des 8 LS d'AM testés et 0 des 8 LS d'arthroses testés. Notez que pour deux patients PR (PR 2 et PR 3), on retrouvait TFAM dans le liquide articulaire et pas d'actine, suggérant une libération spécifique sans mort cellulaire.

IV-7-2. Dosage du motif 8oxodG par ELISA

Afin de vérifier si, conformément à ce qui est suggéré dans la littérature, la synoviale rhumatoïde est le siège d'un stress oxydatif majeur susceptible d'oxyder les bases de l'ADN (110,111), induisant l'apparition de motifs 8-oxodG possédant des propriétés immunogènes (58), nous avons réalisé un dosage par ELISA compétitif sur les éluats d'ADN total extraits par le kit Nucleospin Tissue de Macherey Nagel (cf. Matériel et méthodes). Nous avons voulu comparer deux conditions : d'abord l'ADN extracellulaire, expulsé dans le LS de PR, en prenant comme contrôle négatif l'ADN extracellulaire présent dans le LS d'arthrose. Puis, l'ADN intracellulaire, à l'intérieur des PNN du LS de PR, en prenant comme contrôle l'ADN à l'intérieur des PNN du sang de témoins sains (puisqu'il est impossible d'isoler des PNN articulaires chez le sujet sain à partir d'une ponction).

Il n'y avait pas de différence significative ($p > 0,05$) entre les taux moyens de motif 8-oxodG dans l'ADN total extracellulaire du LS de PR (taux moyen de 0,5678 ng/mL +/- 0,1001) et dans l'ADN total extracellulaire du LS d'arthrose (0,5408ng/mL, +/- 0,04221), ou entre les taux moyens de motif 8oxodG dans l'ADN total intracellulaire de lysats de PNN du liquide synovial de PR (0,5786 ng/mL +/- 0,08108) et dans l'ADN total intracellulaire de lysats de PNN sanguins de témoins sains (0,4260 ng/mL +/-0,009341), **figure 26 A et C**.

Cependant, la concentration initiale en acides nucléiques évaluée par Nanodrop® était différente dans chaque groupe d'échantillons, bien que statistiquement non significative (concentrations moyennes à 126,2 ng/ μ L +/- 68,36 pour les LS de PR, à 24,17 ng/ μ L +/- 8,822 pour les LS d'OA, à 180,1 ng/ μ L +/- 64,56 pour les PNN du LS de PR et à 84,36 ng/ μ L +/- 12,02 pour les PNN sanguins de témoins sains, $p > 0,05$). L'absence de différence statistiquement significative entre les taux de 8-oxodG de deux groupes différents peut en réalité correspondre à un ADN mt moins oxydé mais avec une quantité d'acides nucléiques plus importantes dans le premier groupe, et à une quantité d'acides nucléiques moins importante mais qualitativement plus oxydés dans le deuxième groupe. Pour limiter ce biais, nous avons corrigé le taux moyen de motif 8-oxodG dosé en ELISA en le rapportant à la concentration initiale en acide nucléique pour chaque échantillon. Nous avons ainsi obtenu un ratio Cm 8-oxodG/Cm ADN total (avec Cm=concentration massique en pg/mL). Il n'y avait

pas de différence statistiquement significative entre le rapport du groupe ADN total extracellulaire du LS de PR et d'OA (**figure 26 B**), ou entre les lysats de PNN du LS de PR et les lysats de PNN du sang de témoins sains (**figure 26 D**).

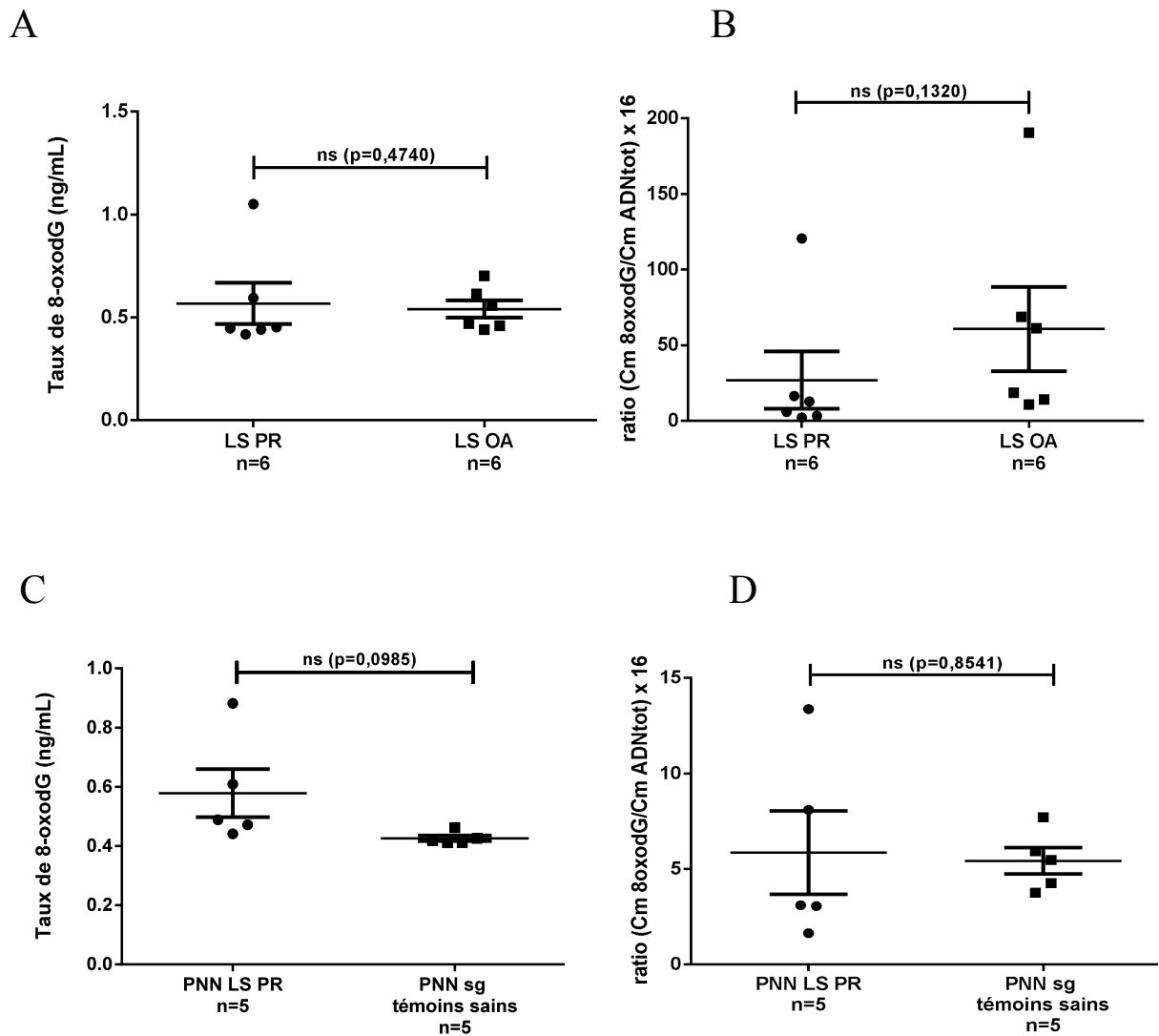


Figure 26: **A et C :** taux moyen de motifs 8-oxodG (ng/mL) mesuré en ELISA 8-oxodG sur l'ADN total extracellulaire extrait des surnageants de LS de PR et d'OA (*A*), ou sur l'ADN total intracellulaire extrait des lysats de PNN de LS de PR ou de sang de témoins sains (contrôle, *C*). **B et D :** normalisation par le ratio Cm 8oxodG/Cm ADN total, pour s'affranchir d'un éventuel biais lié à des concentrations en acides nucléiques initiales différentes entre les échantillons (*Cm* = concentration massique en pg/mL ; le ratio a été multiplié par 16 pour adapter les valeurs visuelles au graphique).

IV-8- L'incubation de PNN sanguins avec de l'ADN mt induit l'expression de RANK-L à leur surface cellulaire

L'incubation des PNN sanguins avec un agoniste TLR 9, l'ODN CpG B, induit l'expression de RANK-L à leur surface cellulaire. De même, l'incubation de ces cellules avec de l'ADNmt va induire l'up-regulation membranaire du RANK-L. Cet effet est annulé si l'ADN mt est préalablement dégradé par une DNase (**figure 27**).

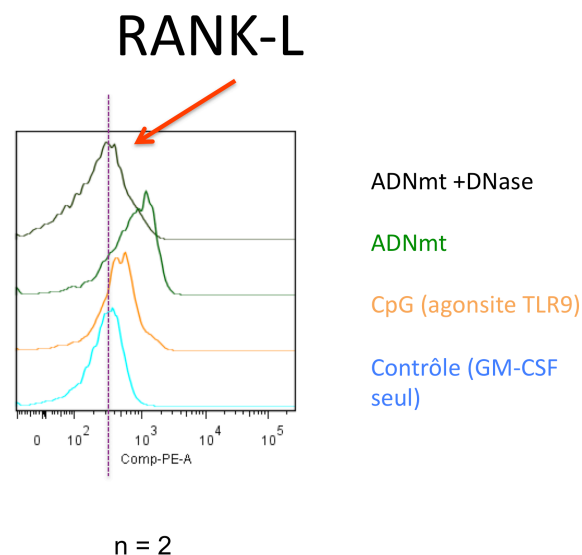


Figure 27 : l'incubation des PNN avec un agoniste TLR9, le CpG B, ou avec de l'ADN mt (à 10 μ g/mL) induit l'expression membranaire de RANK-L, comme en témoigne le décalage vers la droite de la courbe de fluorescence (en unités arbitraires ; PE = Phycoerythrine, fluorochrome utilisé pour marqué RANK-L). La dégradation préalable de l'ADN mt par une DNase avant d'incuber les cellules avec l'ADN mt dégradé annule cet effet, comme en témoigne le décalage vers la gauche de la courbe de fluorescence. La condition contrôle correspond au milieu RPMI+8% avec GM-CSF seul (cf. Matériel et Méthodes). Les résultats sont représentatifs de deux expériences (n=2).

L'analyse du pourcentage de cellules exprimant RANK-L selon le milieu utilisé pour l'incubation était le suivant : 8,6 % si stimulées par du GM-CSF seul, 18 % si stimulées par les îlots CpG et 13,8 % si stimulées par l'ADN mt (à 10 μ g/mL). Si l'ADN mt était

préalablement dégradé par une DNase avant d'être incubé avec les PNN, le taux d'expression membranaire du RANK-L par ces cellules chutait à 5,65 % (**figure 28**).

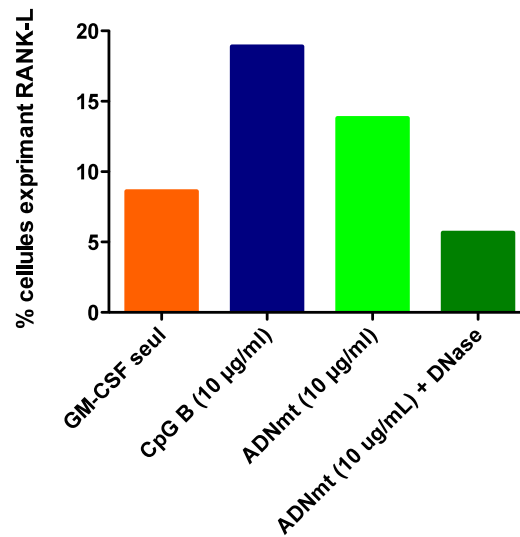


Figure 28 : pourcentage de PNN exprimant RANK-L après stimulation par du milieu RPMI + 8% de SVF avec du GM-CSF dilué à 50ng/mL (cf. Matériel et Méthodes) seul, ou avec en plus du CpG B à 10 µg/mL ou de l'ADN mt à 10 µg/mL. Lorsque l'ADN mt est préalablement dégradé par une DNase, le taux de cellules exprimant le RANK-L à leur membranes diminue fortement.

Afin de rechercher un éventuel effet-dose de la quantité d'ADN mt sur l'expression membranaire de RANK-L par les PNN, nous avons réitéré l'expérience avec des doses croissantes d'ADN mt à 1 µg/mL, 10 µg/mL et 100 µg/mL. La dose d'ADN mt ne semblait pas influencer sur le taux d'expression membranaire de RANK-L, témoignant d'un probable effet plateau (**figure 29**).

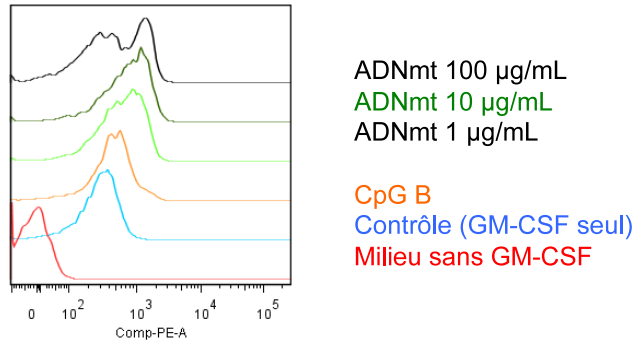


Figure 29 : recherche d'un éventuel effet-dose de la quantité d'ADN mt sur l'expression membranaire de RANK-L (fluorescence en unités arbitraires ; PE = Phycoerythrine, fluorochrome utilisé pour marqué RANK-L). Les différentes doses d'ADN mt utilisé ne semblent pas modifier le taux d'expression membranaire de RANK-L, témoignant d'un probable effet plateau dès 1 µg/mL. Notez qu'en l'absence de GM-CSF dans le milieu, la courbe de fluorescence est à 0, du fait d'une importante mortalité cellulaire, conformément à ce qui est décrit dans la littérature (107), car le GM-CSF permet d'augmenter la durée de vie des PNN in vitro (cf. Matériel et Méthodes).

V. Discussion

V-1- Identification et quantification de l'ADN mt dans la PR

Dans la première partie de ce travail, nous avons donc confirmé l'observation de la littérature (54,58) relative à la présence d'ADN mt extracellulaire dans les LS et plasmas de PR. Jusqu'alors dans la PR, à notre connaissance, cet ADN mt n'avait été évalué que par une approche semi-quantitative, fondée sur l'appréciation de l'intensité des bandes obtenues, par migration en gel d'agarose des produits de PCR (54). Notre approche a permis une quantification plus précise par PCR quantitative, en réalisant une gamme étalon.

V-2- Analyse de la corrélation entre l'activité de la PR et la quantité d'ADN mt extracellulaire

Dès lors, avec ces données objectives, il était plus facile d'évaluer la corrélation entre la quantité d'ADN mt **extracellulaire** et divers paramètres clinico-biologiques de l'activité de la maladie : score DAS28 ou CRP. Nos travaux ont d'abord permis de mettre en évidence un taux plus important d'ADN mt **extracellulaire** dans le LS des PR actives (score DAS28 > 5,1), comparativement aux LS des PR moins actives. De plus, il existe une corrélation forte entre la CRP et le taux d'ADN mt extracellulaire dans le LS de PR. Ainsi, le taux d'ADN mt **extracellulaire** articulaire pourrait être un reflet de l'activité et de l'inflammation systémique dans la PR. En revanche, nous n'avons pas mis en évidence de lien avec le taux d'anti-CCP ou de FR, ni d'association avec le caractère érosif de la maladie. S'il est vrai que notre effectif de patient sans érosion est faible, ces résultats ne sont toutefois pas surprenants, lorsque l'on sait que les érosions sont surtout corrélées à l'ancienneté de la maladie (112).

Nous n'avons pas trouvé de corrélation entre l'âge et le taux d'ADN mt **extracellulaire** plasmatique ou dans le LS. Ces résultats semblent être discordants avec le résultat d'une autre étude, qui suggère que le taux d'ADN mt **extracellulaire** plasmatique dans le sang de sujets âgés pourrait être supérieur à celui du sang de sujets jeunes du fait d'un remodelage du compartiment immuno-inflammatoire responsable d'une inflammation chronique physiologique appelée « inflammaging » (109). Cependant, ces résultats sont à nuancer car la différence décrite par les auteurs n'était pas statistiquement significative

($p=0,818$). Nous avons recherché une corrélation par le test de Spearman, car nous n'avons pas pu réaliser d'analyse en sous-groupes au sein de chacun des groupes PR, AM, OA ou sujets sains pour deux raisons. D'abord parce que les effectifs pour les trois derniers groupes étaient trop faibles. Ensuite parce que le « cut-off » où l'âge commence à véritablement influencer sur les taux d'ADN mt **extracellulaire** circulant est encore mal décrit dans la littérature. Dans l'étude de Jylhävä et al., les patients considérés comme « âgés » étaient bien plus vieux que dans notre étude, puisqu'ils avaient tous plus de 90 ans (109).

V-3- Le PNN articulaire : source d'ADN mt extracellulaire dans le LS de PR?

Dans la deuxième partie de ce projet, nous nous sommes focalisés sur l'origine de l'ADN mt **extracellulaire** quantifié dans le LS. En l'absence de littérature sur ce sujet, nous avons pris le parti d'étudier le PNN, qui représente le type cellulaire prédominant dans le liquide articulaire (entre 70 et 95% des cellules du LS), et d'évaluer indirectement son contenu mitochondrial par la mesure du ratio ADN mt/ADN nucléaire. Ce ratio est 4,59 fois plus important dans les PNN sanguins des PR actives que dans les PNN articulaires ($p=0,0224$), alors que l'on détecte près de 4,37 fois plus d'ADN mt dans le LS que dans le plasma. On pourrait dès lors proposer l'hypothèse que le PNN sanguin, une fois arrivé dans l'articulation, libère localement son ADN mt (**figure 30**). Toutefois, il reste à préciser les mécanismes de cette libération, qui pourrait faire intervenir des mécanismes de mort cellulaire (63) ou au contraire un phénomène de catapultage de l'ADN mt avec survie de la cellule, comme ce qui a été décrit avec les polynucléaires éosinophiles (81) ou même avec les neutrophiles, lors d'émissions de NETs (Neutrophil extracellular traps)(80).

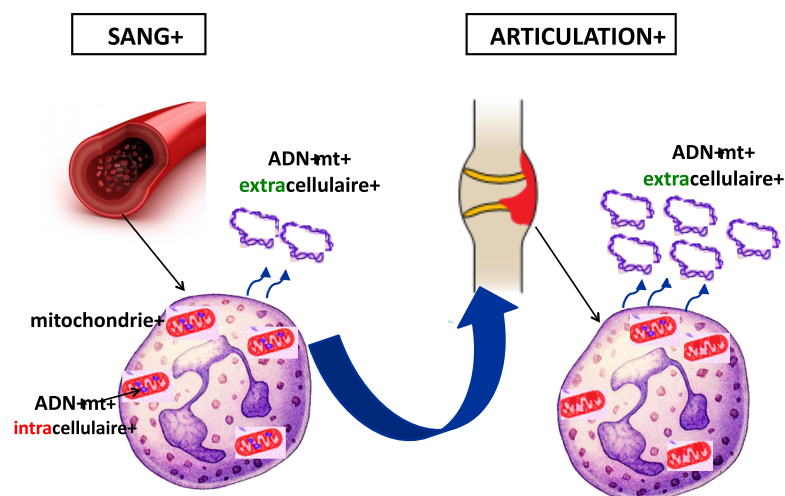


Figure 30 : Le PNN comme source de l'ADN mt **extracellulaire** libéré dans le liquide synovial lors des poussées de PR. Le PNN sanguin, une fois arrivé dans l'articulation, libérerait localement son ADN mt, comme en témoigne le contenu d'ADN mt **intra**cellulaire abaissé des PNN articulaires, comparativement au contenu d'ADN mt **intra**cellulaire des PNN sanguins.

V-4-Un phénomène non spécifique de la PR mais lié à l'inflammation?

Nous avons cherché à vérifier si les résultats que nous observions dans la PR étaient spécifiques de cette maladie, ou représentaient un phénomène aspécifique, lié plus globalement à l'inflammation (33–35,81), et de ce fait retrouvé dans d'autres type d'arthrites. Nous avons pris comme principal témoin l'arthrite microcristalline, affection rhumatismale particulièrement inflammatoire. Il est frappant de constater que nous retrouvons des résultats similaires entre ces deux pathologies : il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les taux d'ADN mt **extracellulaire** des LS de PR actives et d'AM, et l'on trouve des différences entre les ratios ADN mt/ADN nucléaires (reflet du contenu **intra**cellulaire en ADNmt) des PNN sanguins et articulaires similaires dans ces deux maladies. Ainsi, le phénomène de libération d'ADN mt **extracellulaire** dans l'articulation que nous avons observé dans la PR pourrait être un phénomène aspécifique, lié à l'inflammation en général, et donc également retrouvé dans l'AM ; ces résultats demandent à être confirmés par l'analyse de plus grands effectifs dans cette pathologie.

V-5- Recherche de la protéine pro-inflammatoire TFAM dans le LS

Comme détaillé dans l'introduction, TFAM est une protéine de fonction et de structure homologue à HMGB1 (72,113). A l'état d'homéostasie cellulaire, ces deux protéines sont liées à l'ADN (HMGB1 à l'ADN nucléaire, et TFAM à l'ADN mitochondrial), et agissent comme facteurs de transcription (72). Cependant, lors d'un stress cellulaire, ces protéines sont libérées, et agissent comme des signaux de danger (72). *Kokkola et al.* ont retrouvé par Western Blot puis par techniques immuno-histochimiques la présence de HMGB1 en abondance dans le liquide articulaire et dans le tissu synovial (77). Les auteurs ont montré que la neutralisation de HGMB1 par un anticorps monoclonal réduisait de façon significative l'inflammation et la destruction articulaire dans le modèle d'arthrite induite au collagène chez la souris (79), suggérant un rôle important de cette protéine dans l'initiation et l'entretien du processus inflammatoire. Si des données concernant le rôle de TFAM sont décrites dans le lupus érythémateux disséminé (72,114), en revanche, dans la PR, les données sont moins abondantes que pour HGMB1. C'est pourquoi nous l'avons recherché dans les LS de nos patients.

Nous avons retrouvé la présence de TFAM dans le LS de 6 patients souffrant de PR sur 14. A titre de comparaison, *Kokkola et al.* avaient retrouvé par Western Blot la présence de HGMB1 dans le LS de 14 patients souffrant de PR sur 15 (77). Nous n'avons pas retrouvé de TFAM dans le LS d'arthrose, ce qui est cohérent avec notre hypothèse : il est logique de ne pas retrouver de protéine pro-inflammatoire dans un liquide mécanique. Il est également intéressant de noter que TFAM est retrouvé dans le liquide articulaire (inflammatoire) de 2 arthrites microcristallines sur 8. En outre, chez deux patients souffrant de PR, on retrouve TFAM dans le liquide articulaire en l'absence de β -actine, suggérant une libération spécifique sans mort cellulaire (80,81). Toutefois, il faut considérer que la β -actine n'est sans doute pas un bon marqueur de mort, car elle pourrait rester dans la cellule morte. Ainsi, il eut été plus judicieux de tester également un facteur cytosolique type LDH, qui serait lui systématiquement libéré en cas de mort cellulaire. De même, le Western Blot n'est certainement pas une technique adaptée pour aboutir à ce genre de conclusion sur la viabilité cellulaire.

Le fait que TFAM soit retrouvé dans le LS de PR ne prouve pas pour autant qu'il reste accroché à l'ADN mt pour potentialiser son internalisation et son action inflammatoire,

comme cela a été suggéré précédemment (72). En effet, pour rechercher si TFAM reste associé à l'ADN mt lors de sa libération dans l'articulation, il aurait idéalement fallu copurifier cette protéine avec les nucléoïdes mitochondriaux, soit par co-immunoprécipitation, soit grâce à des ultra-centrifugations différentielles avant d'envoyer les échantillons pour analyse protéomique (115). Cependant, nous avons été limités par le coût et l'accessibilité de cette approche. Comme alternative, nous envisageons de doser TFAM en ELISA, et de rechercher si les taux de cette protéine sont corrélés avec les taux d'ADN mt dans le LS.

V-6- Caractérisation de l'ADN mt : recherche du motif 8-oxodG

Une autre caractéristique proinflammatoire décrite dans la littérature est l'existence d'oxydation de certaines bases : il a été montré que la présence d'un seul motif 8-oxodG permettait d'induire expérimentalement une arthrite (58). Lorsque la détérioration oxydative de l'ADN est excessive, la réparation n'est pas possible, et l'apoptose survient alors. Même si l'ADN nucléaire et l'ADN mt subissent des détériorations oxydatives (59), l'ADN mt est nettement plus touché que l'ADN nucléaire (61,62), du fait de sa proximité par rapport à la chaîne respiratoire, de son manque d'histones, et de moindres systèmes de réparation. En outre, la mitochondrie a une place capitale dans l'induction de l'apoptose en réponse à un stress oxydatif majeur (61,62). Une étude récente a montré que le stress oxydatif dans la PR altère non seulement l'ADN cellulaire, mais également les mécanismes de réparation de l'ADN (DNA mismatch repair system) (116), ce qui augmenterait la quantité globale d'adduits à l'ADN dans l'articulation et exacerberait la maladie.

Hajizadeh *et al.* ont montré que le taux de 8-oxodG dans le LS était un peu plus de deux fois supérieurs à celui dans le liquide articulaire de cadavres (54). Cependant, nous n'avons pas trouvé de différence entre les taux de 8-oxodG chez nos patients PR et les contrôles. Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer ces discordances. Premièrement, Hajizadeh *et al.* ont dosé le motif 8 oxodG directement dans le LS, sans tenir compte des différences en terme de quantité d'ADN mt entre les patients PR et leur témoins, chez qui ils ne détectaient pourtant pratiquement pas d'ADN mt (et pour cause, dans la mesure où il s'agissait de prélèvements post-mortem de témoins décédés, majoritairement lors d'accidents de la voie publique, et qui n'étaient ni arthritiques ni arthrosiques). Cette différence pourrait

être simplement liée à une quantité nettement plus grande d'ADN mt chez les patients PR, plutôt qu'à une oxydation plus importante de l'ADN de polyarthrite comparativement à l'ADN des témoins. Notre approche, en particulier la correction par les ratios Cm 8oxodG/Cm acides nucléiques, nous semble par conséquent méthodologiquement plus adaptée, car elle permet de s'affranchir de ce biais. Par ailleurs, s'il a été montré que, plus que l'ADN nucléaire, c'est surtout l'ADN mt qui est susceptible d'être la cible des ROS et donc de subir une oxydation des bases, des données récentes suggèrent que ce n'est pas l'ensemble de cet ADN mt qui est concerné, mais plus particulièrement la portion fragmentée (117). Or, nous avons réalisé notre ELISA sur de l'ADN total, et qui plus est, sur des quantités faibles d'acides nucléiques (en moyenne 50 ng/ μ L) ; il est possible que la différence d'oxydation entre les ADN soit trop faible pour être détectée de cette manière.

Deux autre technique ont fait leurs preuves pour la détection du motif 8-oxodG : la chromatographie en phase liquide à haute performance (117,118) ou le séquençage de l'ADN par des séquenceurs de troisième génération (119). Elles sont beaucoup plus sensibles que l'ELISA pour la détection de faibles quantités de ce motif, mais nous sommes limités par leur coût et leur accessibilité.

V-7- ADNmt et RANK-L : un rôle physiopathologique direct ?

L'incubation des PNN sanguins avec de l'ADN mt induit l'expression de RANK-L à leur surface cellulaire, même si ces résultats demandent à être confirmés par la reproduction de nouvelles expériences, car nous ne l'avons montré que sur deux manipulations expérimentales. Ainsi, l'ADN mt extracellulaire libéré dans l'articulation au cours de la PR, en induisant une up-regulation directe de RANK-L sur la membrane cellulaire des PNN, pourrait favoriser l'activation des ostéoclastes, contribuant ainsi directement à l'entretien de la destruction articulaire (101,102).

Cette stimulation de l'expression membranaire de RANK-L pourrait passer par la voie TLR9, comme en témoignent les résultats similaires obtenus par l'incubation des PNN avec le CpG B. Cependant, comme décrit en introduction, l'ADN mt pourrait également être reconnu via la voie de l'inflammasome NLRP 3 (63,65). Ainsi, pour préciser la ou les voie(s) par laquelle passe cette reconnaissance, il faudrait reproduire la manipulation expérimentale avec deux conditions supplémentaires : une avec un inhibiteur spécifique des TLR9, comme par

exemple l'ODN TTAGGG (ODN A151) de chez Invitrogen®, et l'autre avec un inhibiteur de l'inflammasome NLRP3, comme l'inhibiteur de la caspase 1 Z-YVAD-FMK de Enzo®.

Il faudrait également reproduire la manipulation expérimentale avec de l'ADN nucléaire, pour confirmer que c'est bien l'ADN mt qui est pro-arthritogène en stimulant l'expression membranaire de RANK-L, et non l'ADN nucléaire, à l'instar de ce qui a été fait *in vivo* chez la souris, chez qui l'injection intra-articulaire d'ADN mt mais pas d'ADN nucléaire induit une arthrite (58).

Nous souhaiterions confirmer ces résultats par une technique de biologie moléculaire, en recherchant les ARN messagers de RANK-L en RT-qPCR, dans les PNN incubés avec de l'ADN mt, à différents time-points.

Pour confirmer nos résultats obtenus *in vitro*, nous souhaitons également regarder *ex vivo*, en cytométrie de flux, si les PNN de l'articulation de patients avec poussée de PR expriment significativement plus de RANK-L membranaire comparativement aux témoins arthrosiques, mais aussi en fonction de l'activité de la maladie rhumatoïde. De même, nous comptons mesurer en ELISA les taux de RANK-L libre synoviaux, en vue de rechercher une corrélation avec les taux d'ADN mt extracellulaire libéré dans l'articulation.

Enfin, il serait souhaitable de vérifier si l'ADN mt stimule également l'expression membranaire de RANK-L lorsqu'on le fait incuber avec les autres types cellulaires impliqués dans la physiopathologie de la PR : macrophages, synoviocytes, et lymphocytes.

Il est tentant de faire un parallèle physiopathologique avec l'ensemble des arthrites érosives. Comme nous l'avons vu en introduction, la mitochondrie ayant probablement évolué à partir d'une bactérie, l'ADN mt pourrait être un nouveau DAMP, voire une alarmine. Ainsi, si dans l'arthrite septique la reconnaissance de l'ADN bactérien par TLR9 et/ou l'inflammasome (et du LPS par TLR4) stimulerait l'expression membranaire de RANK-L par les PNN, induisant secondairement une activation des ostéoclastes contribuant à la destruction osseuse, c'est l'ADN mt qui pourrait jouer ce rôle dans la PR et les arthrites microcristallines.

VI. Conclusion

Le liquide articulaire de PR se caractérise par des taux augmentés d'ADN mt **extracellulaire** comparativement aux sujets arthrosiques. Cet ADNmt **extracellulaire** libéré dans l'articulation semble donc être un reflet de l'inflammation, et un bio-marqueur de l'activité de la polyarthrite rhumatoïde. Les PNN du LS ont un taux d'ADN mt **intracellulaire** abaissé, suggérant que ces cellules pourraient être la source de l'ADN mt libéré dans l'articulation. Ce phénomène pourrait être non spécifique de la PR, mais lié plus globalement au processus inflammatoire, comme semblent témoigner les résultats chez nos patients AM. Ceci demande à être confirmé par l'analyse de plus grands effectifs dans cette pathologie.

Des études complémentaires sont nécessaires pour préciser les caractéristiques pro-inflammatoires de cet ADN mt, d'un point de vue structural mais également fonctionnel. Sur le plan structural, la protéine TFAM, connue pour son association à l'ADN mt et pour son rôle pro-inflammatoire, a été retrouvée dans le LS de 6 PR sur 14, et dans aucun LS d'arthrose. Des explorations supplémentaires sont nécessaires pour isoler l'ADN mt en vue de le séquencer et de rechercher une différence d'oxydation par rapport aux témoins, dans la mesure où nous n'avons pas réussi à mettre en évidence de différence par les techniques ELISA. Sur le plan fonctionnel, l'ADN mt extracellulaire semble stimuler l'expression membranaire de RANK-L à la surface des PNN, ce qui en ferait un élément nouveau dans la physiopathologie des érosions osseuses de la PR. Ces expériences demandent à être confirmées, notamment pour mieux comprendre les mécanismes de reconnaissance de l'ADN mt par les PNN (voie TLR9 et/ou inflammasome NLRP3), pour rechercher un effet similaire sur les autres types cellulaires impliqués dans la maladie (synoviocytes, macrophages, lymphocytes) et pour rechercher des arguments *ex vivo* en faveur de son rôle pro-arthritogène.

Enfin, nous avons vu en introduction que l'ADN mt présente presque toutes les caractéristiques d'une alarmine. Ainsi, nous comptons rechercher prochainement en ELISA si l'ADN mt, lorsqu'il est reconnu par les PNN de PR, peut stimuler la synthèse et la sécrétion de chimiokines (comme l'IL-8) et de cytokines pro-inflammatoires (comme le TNF α , l'IL-1, et l'IL-17).

Bibliographie

1. Guillemin F, Saraux A, Guggenbuhl P, Roux CH, Fardellone P, Le Bihan E, et al. Prevalence of rheumatoid arthritis in France: 2001. *Ann Rheum Dis.* oct 2005;64(10):1427-30.
2. Wipke BT, Allen PM. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 août 2001;167(3):1601-8.
3. Metchnikoff E. Leçons sur la pathologie comparée de l'inflammation. Bibliothèque annales de l'Institut Pasteur 1893; 7 : 348-57
4. Ehrlich P. Methodologische Beiträge zur Physiologie und Pathologie der verschiedenen Formen der Leukocyten. *Z Klin Med* 1880; 1 : 553-60
5. Waaler E. On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. 1939. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* mai 2007;115(5):422-38; discussion 439.
6. Burnet M. Auto-immune disease. II. Pathology of the immune response. *Br Med J.* 17 oct 1959;2(5154):720-5.
7. Burnet FM. Immunological recognition of self. *Science.* 3 févr 1961;133(3449):307-11.
8. Dausset J. [Iso-leuko-antibodies]. *Acta Haematol.* oct 1958;20(1-4):156-66.
9. Cunningham AJ, Lafferty KJ. Letter: Cellular proliferation can be an unreliable index of immune competence. *J Immunol Baltim Md* 1950. janv 1974;112(1):436-7.
10. Cunningham AJ, Lafferty KJ. A simple conservative explanation of the H-2 restriction of interactions between lymphocytes. *Scand J Immunol.* 1977;6(1-2):1-6.
11. Schaefferbeke T. Le modèle Danger : une nouvelle façon d'appréhender la réponse immunitaire. *Revue Rhumatos* 2012 Nov; 9 (92) : 387-407
12. Janeway CA. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1989;54 Pt 1:1-13.
13. Janeway CA. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today.* janv 1992;13(1):11-6.
14. Richez C, Blanco P, Rifkin I, Moreau J-F, Schaefferbeke T. Role for toll-like receptors in autoimmune disease: the example of systemic lupus erythematosus. *Jt Bone Spine Rev Rhum.* mars 2011;78(2):124-30.
15. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:991-1045.
16. Kersse K, Bertrand MJM, Lamkanfi M, Vandenabeele P. NOD-like receptors and the innate immune system: coping with danger, damage and death. *Cytokine Growth Factor Rev.* déc 2011;22(5-6):257-76.
17. Gierut A, Perlman H, Pope RM. Innate immunity and rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* mai 2010;36(2):271-96.
18. Medzhitov R, Janeway C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev.* févr 2000;173:89-97.

19. Chavakis T, Bierhaus A, Al-Fakhri N, Schneider D, Witte S, Linn T, et al. The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *J Exp Med*. 17 nov 2003;198(10):1507-15.
20. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 24 juill 1997;388(6640):394-7.
21. Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Toll-like receptors and cancer. *Nat Rev Cancer*. janv 2009;9(1):57-63.
22. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. mai 2010;11(5):373-84.
23. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*. déc 2010;10(12):826-37.
24. Blasius AL, Beutler B. Intracellular toll-like receptors. *Immunity*. 26 mars 2010;32(3):305-15.
25. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. juill 2004;4(7):499-511.
26. Kenny EF, O'Neill LAJ. Signalling adaptors used by Toll-like receptors: an update. *Cytokine*. sept 2008;43(3):342-9.
27. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol*. févr 2007;19(1):24-32.
28. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. janv 2005;17(1):1-14.
29. Kersse K, Bertrand MJM, Lamkanfi M, Vandenabeele P. NOD-like receptors and the innate immune system: coping with danger, damage and death. *Cytokine Growth Factor Rev*. déc 2011;22(5-6):257-76.
30. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*. août 2002;10(2):417-26.
31. Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 9 mars 2006;440(7081):237-41.
32. Ishihara K, Tsutsumi K, Kawane S, Nakajima M, Kasaoka T. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) directly binds to ERK by a D-domain-like docking site. *FEBS Lett*. 28 août 2003;550(1-3):107-13.
33. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*. 4 mars 2010;464(7285):104-7.
34. Mehra N, Penning M, Maas J, van Daal N, Giles RH, Voest EE. Circulating mitochondrial nucleic acids have prognostic value for survival in patients with advanced prostate cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 janv 2007;13(2 Pt 1):421-6.
35. Cossarizza A, Pinti M, Nasi M, Gibellini L, Manzini S, Roat E, et al. Increased plasma levels of extracellular mitochondrial DNA during HIV infection: a new role for mitochondrial damage-associated molecular patterns during inflammation. *Mitochondrion*. sept 2011;11(5):750-5.
36. West AP, Shadel GS, Ghosh S. Mitochondria in innate immune responses. *Nat Rev Immunol*. juin 2011;11(6):389-402.
37. Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*. 5 mars 1999;283(5407):1482-8.

38. Seth RB, Sun L, Ea C-K, Chen ZJ. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell*. 9 sept 2005;122(5):669-82.
39. Xu L-G, Wang Y-Y, Han K-J, Li L-Y, Zhai Z, Shu H-B. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell*. 16 sept 2005;19(6):727-40.
40. Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Mitochondria: master regulators of danger signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. déc 2012;13(12):780-8.
41. Arnoult D, Soares F, Tattoli I, Girardin SE. Mitochondria in innate immunity. *EMBO Rep*. sept 2011;12(9):901-10.
42. Wallace DC, Chalkia D. Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. oct 2013;3(10):a021220.
43. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*. 4 mars 2010;464(7285):104-7.
44. Nakahira K, Kyung S-Y, Rogers AJ, Gazourian L, Youn S, Massaro AF, et al. Circulating mitochondrial DNA in patients in the ICU as a marker of mortality: derivation and validation. *PLoS Med*. déc 2013;10(12):e1001577; discussion e1001577.
45. Simons JD, Lee Y-L, Mulekar S, Kuck JL, Brevard SB, Gonzalez RP, et al. Elevated levels of plasma mitochondrial DNA DAMPs are linked to clinical outcome in severely injured human subjects. *Ann Surg*. oct 2013;258(4):591-6; discussion 596-8.
46. Yamanouchi S, Kudo D, Yamada M, Miyagawa N, Furukawa H, Kushimoto S. Plasma mitochondrial DNA levels in patients with trauma and severe sepsis: time course and the association with clinical status. *J Crit Care*. déc 2013;28(6):1027-31.
47. Kung C-T, Hsiao S-Y, Tsai T-C, Su C-M, Chang W-N, Huang C-R, et al. Plasma nuclear and mitochondrial DNA levels as predictors of outcome in severe sepsis patients in the emergency room. *J Transl Med*. 2012;10:130.
48. Shen J, Platek M, Mahasneh A, Ambrosone CB, Zhao H. Mitochondrial copy number and risk of breast cancer: a pilot study. *Mitochondrion*. janv 2010;10(1):62-8.
49. Ellinger J, Albers P, Müller SC, von Ruecker A, Bastian PJ. Circulating mitochondrial DNA in the serum of patients with testicular germ cell cancer as a novel noninvasive diagnostic biomarker. *BJU Int*. juill 2009;104(1):48-52.
50. Jiang W-W, Masayeva B, Zahurak M, Carvalho AL, Rosenbaum E, Mambo E, et al. Increased mitochondrial DNA content in saliva associated with head and neck cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 avr 2005;11(7):2486-91.
51. Mizumachi T, Muskhelishvili L, Naito A, Furusawa J, Fan C-Y, Siegel ER, et al. Increased distributional variance of mitochondrial DNA content associated with prostate cancer cells as compared with normal prostate cells. *The Prostate*. 1 mars 2008;68(4):408-17.
52. Lan Q, Lim U, Liu C-S, Weinstein SJ, Chanock S, Bonner MR, et al. A prospective study of mitochondrial DNA copy number and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 15 nov 2008;112(10):4247-9.
53. Pinti M, Mussini C, Cossarizza A. Mitochondrial DNA: a proinflammatory « enemy from within » during HIV infection? *Cell Death Dis*. 2012;3:307.

54. Hajizadeh S, DeGroot J, TeKoppele JM, Tarkowski A, Collins LV. Extracellular mitochondrial DNA and oxidatively damaged DNA in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2003;5(5):R234-40.
55. Zhang Q, Itagaki K, Hauser CJ. Mitochondrial DNA is released by shock and activates neutrophils via p38 map kinase. *Shock Augusta Ga.* juill 2010;34(1):55-9.
56. Marques PE, Amaral SS, Pires DA, Nogueira LL, Soriani FM, Lima BHF, et al. Chemokines and mitochondrial products activate neutrophils to amplify organ injury during mouse acute liver failure. *Hepatology Baltim Md.* nov 2012;56(5):1971-82.
57. Zhang J-Z, Liu Z, Liu J, Ren J-X, Sun T-S. Mitochondrial DNA induces inflammation and increases TLR9/NF- κ B expression in lung tissue. *Int J Mol Med.* avr 2014;33(4):817-24.
58. Collins LV, Hajizadeh S, Holme E, Jonsson I-M, Tarkowski A. Endogenously oxidized mitochondrial DNA induces in vivo and in vitro inflammatory responses. *J Leukoc Biol.* juin 2004;75(6):995-1000.
59. Richter C, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A.* sept 1988;85(17):6465-7.
60. Yakes FM, Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 21 janv 1997;94(2):514-9.
61. Kowaltowski AJ, Vercesi AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* févr 1999;26(3-4):463-71.
62. Loeffler M, Kroemer G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res.* 10 avr 2000;256(1):19-26.
63. Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, Chen S, et al. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity.* 23 mars 2012;36(3):401-14.
64. Goldman SJ, Taylor R, Zhang Y, Jin S. Autophagy and the degradation of mitochondria. *Mitochondrion.* juin 2010;10(4):309-15.
65. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VAK, Lee S-J, Dolinay T, Lam HC, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol.* mars 2011;12(3):222-30.
66. Ding Z, Liu S, Wang X, Khaidakov M, Dai Y, Mehta JL. Oxidant stress in mitochondrial DNA damage, autophagy and inflammation in atherosclerosis. *Sci Rep.* 2013;3:1077.
67. Oka T, Hikoso S, Yamaguchi O, Taneike M, Takeda T, Tamai T, et al. Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. *Nature.* 10 mai 2012;485(7397):251-5.
68. Escames G, López LC, García JA, García-Corzo L, Ortiz F, Acuña-Castroviejo D. Mitochondrial DNA and inflammatory diseases. *Hum Genet.* févr 2012;131(2):161-73.
69. Rabiet M-J, Huet E, Boulay F. Human mitochondria-derived N-formylated peptides are novel agonists equally active on FPR and FPRL1, while *Listeria monocytogenes*-derived peptides preferentially activate FPR. *Eur J Immunol.* août 2005;35(8):2486-95.
70. Carp H. Mitochondrial N-formylmethionyl proteins as chemoattractants for neutrophils. *J Exp Med.* 1 janv 1982;155(1):264-75.

71. Raouf M, Zhang Q, Itagaki K, Hauser CJ. Mitochondrial peptides are potent immune activators that activate human neutrophils via FPR-1. *J Trauma*. juin 2010;68(6):1328–32; discussion 1332–4.
72. Julian MW, Shao G, Bao S, Knoell DL, Papenfuss TL, VanGundy ZC, et al. Mitochondrial transcription factor A serves as a danger signal by augmenting plasmacytoid dendritic cell responses to DNA. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 juill 2012;189(1):433–43.
73. Crouser ED, Shao G, Julian MW, Macre JE, Shadel GS, Tridandapani S, et al. Monocyte activation by necrotic cells is promoted by mitochondrial proteins and formyl peptide receptors. *Crit Care Med*. juin 2009;37(6):2000–9.
74. Iyer SS, Pulsikens WP, Sadler JJ, Butter LM, Teske GJ, Ulland TK, et al. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1 déc 2009;106(48):20388–93.
75. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*. 13 janv 2011;469(7329):221–5.
76. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol*. avr 2005;5(4):331–42.
77. Kokkola R, Sundberg E, Ulfgren A-K, Palmblad K, Li J, Wang H, et al. High mobility group box chromosomal protein 1: a novel proinflammatory mediator in synovitis. *Arthritis Rheum*. oct 2002;46(10):2598–603.
78. Andersson U, Erlandsson-Harris H. HMGB1 is a potent trigger of arthritis. *J Intern Med*. mars 2004;255(3):344–50.
79. Kokkola R, Li J, Sundberg E, Aveberger A-C, Palmblad K, Yang H, et al. Successful treatment of collagen-induced arthritis in mice and rats by targeting extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 activity. *Arthritis Rheum*. juill 2003;48(7):2052–8.
80. Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ*. nov 2009;16(11):1438–44.
81. Yousefi S, Gold JA, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, Kozlowski E, et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med*. sept 2008;14(9):949–53.
82. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*. janv 2007;81(1):1–5.
83. Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol*. août 2005;17(4):359–65.
84. Yang D, Tewary P, de la Rosa G, Wei F, Oppenheim JJ. The alarmin functions of high-mobility group proteins. *Biochim Biophys Acta*. févr 2010;1799(1-2):157–63.
85. Morel J, Miossec P, Combe B. Immunopathologie de la polyarthrite rhumatoïde. *EMC - Rhumatol-Orthopédie*. mai 2004;1(3):218–30.
86. Schaeferbeke T, Truchetet M-É, Richez C. When and where does rheumatoid arthritis begin? *Jt Bone Spine Rev Rhum*. déc 2012;79(6):550–4.
87. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum*. janv 2000;43(1):30–7.

88. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum. nov* 1987;30(11):1205-13.
89. Hill JA, Southwood S, Sette A, Jevnikar AM, Bell DA, Cairns E. Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1*0401 MHC class II molecule. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15 juill 2003;171(2):538-41.
90. Gough A, Faint J, Salmon M, Hassell A, Wordsworth P, Pilling D, et al. Genetic typing of patients with inflammatory arthritis at presentation can be used to predict outcome. *Arthritis Rheum. août* 1994;37(8):1166-70.
91. Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Källberg H, Bengtsson C, Grunewald J, et al. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum. janv* 2006;54(1):38-46.
92. Wegner N, Wait R, Sroka A, Eick S, Nguyen K-A, Lundberg K, et al. Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and α -enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum. sept* 2010;62(9):2662-72.
93. Lutzky V, Hannawi S, Thomas R. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Dendritic cells. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(4):219.
94. Panayi GS, Corrigan VM, Pitzalis C. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. The role of T cells and other beasts. *Rheum Dis Clin North Am.* mai 2001;27(2):317-34.
95. De Vita S, Zaja F, Sacco S, De Candia A, Fanin R, Ferraccioli G. Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis: evidence for a pathogenetic role of B cells. *Arthritis Rheum. août* 2002;46(8):2029-33.
96. Kim HJ, Berek C. B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2000;2(2):126-31.
97. Jiang Y, Genant HK, Watt I, Cobby M, Bresnihan B, Aitchison R, et al. A multicenter, double-blind, dose-ranging, randomized, placebo-controlled study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis: radiologic progression and correlation of Genant and Larsen scores. *Arthritis Rheum. mai* 2000;43(5):1001-9.
98. Genovese MC, Bathon JM, Martin RW, Fleischmann RM, Tesser JR, Schiff MH, et al. Etanercept versus methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis: two-year radiographic and clinical outcomes. *Arthritis Rheum. juin* 2002;46(6):1443-50.
99. Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med Berl Ger.* juin 2001;79(5-6):243-53.
100. Walsh MC, Choi Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Front Immunol.* 2014;5:511.
101. Chakravarti A, Raquil M-A, Tessier P, Poubelle PE. Surface RANKL of Toll-like receptor 4-stimulated human neutrophils activates osteoclastic bone resorption. *Blood.* 20 août 2009;114(8):1633-44.
102. Poubelle PE, Chakravarti A, Fernandes MJ, Doiron K, Marceau A-A. Differential expression of RANK, RANK-L, and osteoprotegerin by synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis and by healthy human blood neutrophils. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(2):R25.
103. Van der Heijde DM, van 't Hof M, van Riel PL, van de Putte LB. Validity of single variables and indices to measure disease activity in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* mars 1993;20(3):538-41.











104. Van der Heijde DM, van 't Hof M, van Riel PL, van de Putte LB. Development of a disease activity score based on judgment in clinical practice by rheumatologists. *J Rheumatol.* mars 1993;20(3):579-81.
105. Chiu RWK, Chan LYS, Lam NYL, Tsui NBY, Ng EKO, Rainer TH, et al. Quantitative analysis of circulating mitochondrial DNA in plasma. *Clin Chem.* mai 2003;49(5):719-26.
106. Gianotti TF, Sookoian S, Dieuzeide G, García SI, Gemma C, González CD, et al. A decreased mitochondrial DNA content is related to insulin resistance in adolescents. *Obes Silver Spring Md.* juill 2008;16(7):1591-5.
107. Brach MA, deVos S, Gruss HJ, Herrmann F. Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death. *Blood.* 1 déc 1992;80(11):2920-4.
108. Goekoop-Ruiterman YPM, de Vries-Bouwstra JK, Allaart CF, van Zeben D, Kerstens PJSM, Hazes JMW, et al. Clinical and radiographic outcomes of four different treatment strategies in patients with early rheumatoid arthritis (the BeSt study): a randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum.* nov 2005;52(11):3381-90.
109. Jylhävä J, Nevalainen T, Marttila S, Jylhä M, Hervonen A, Hurme M. Characterization of the role of distinct plasma cell-free DNA species in age-associated inflammation and frailty. *Aging Cell.* juin 2013;12(3):388-97.
110. Mapp PI, Grootveld MC, Blake DR. Hypoxia, oxidative stress and rheumatoid arthritis. *Br Med Bull.* avr 1995;51(2):419-36.
111. Tak PP, Zvaifler NJ, Green DR, Firestein GS. Rheumatoid arthritis and p53: how oxidative stress might alter the course of inflammatory diseases. *Immunol Today.* févr 2000;21(2):78-82.
112. Van der Heijde DM. Joint erosions and patients with early rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol.* nov 1995;34 Suppl 2:74-8.
113. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol.* avr 2005;5(4):331-42.
114. Lee H-T, Lin C-S, Lee C-S, Tsai C-Y, Wei Y-H. Increased 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in plasma and decreased mRNA expression of human 8-oxoguanine DNA glycosylase 1, anti-oxidant enzymes, mitochondrial biogenesis-related proteins and glycolytic enzymes in leucocytes in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* avr 2014;176(1):66-77.
115. He J, Cooper HM, Reyes A, Di Re M, Sembongi H, Litwin TR, et al. Mitochondrial nucleoid interacting proteins support mitochondrial protein synthesis. *Nucleic Acids Res.* juill 2012;40(13):6109-21.
116. Lee S-H, Chang DK, Goel A, Boland CR, Bugbee W, Boyle DL, et al. Microsatellite instability and suppressed DNA repair enzyme expression in rheumatoid arthritis. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 févr 2003;170(4):2214-20.
117. Suter M, Richter C. Fragmented mitochondrial DNA is the predominant carrier of oxidized DNA bases. *Biochemistry (Mosc).* 5 janv 1999;38(1):459-64.
118. Bashir S, Harris G, Denman MA, Blake DR, Winyard PG. Oxidative DNA damage and cellular sensitivity to oxidative stress in human autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis.* sept 1993;52(9):659-66.
119. Clark TA, Spittle KE, Turner SW, Korlach J. Direct detection and sequencing of damaged DNA bases. *Genome Integr.* 2011;2:10.

Annexes

Annexe 1 :

Le contenu protéique élevé des LS, notamment en fibrine, pouvant constituer un frein à une hybridation optimale des amorces sur l'ADN mt lors de la PCR, nous avons donc choisi de purifier sur colonnes (kit NucleoSpin® Tissue de Macherey Nagel) les LS et plasma, afin de recueillir leur ADN concentré. Pour les LS, 400µl sont d'abord soumis à une étape de pré-lyse nécessitant 25µl de protéinase K et 180µl de tampon T1 ainsi qu'une incubation d'une heure à 56°C ; puis à une étape de lyse par 200µl de tampon B3 avec incubation à 70°C pendant 15 minutes. L'ADN contenu dans l'échantillon est ensuite précipité par l'ajout de 210µl d'éthanol absolu. L'échantillon est transféré dans la colonne NucleoSpin® Tissue, puis centrifugé à 11000g pendant 1 minute afin de permettre à l'ADN de se fixer sur la membrane de silice de la colonne. Un premier lavage de la membrane de silice est réalisé par l'ajout de 500µl de tampon BW, afin d'éliminer toute contamination de l'ADN, suivi d'une centrifugation de 11000g, 1 minute. Puis vient un 2^{ème} lavage par 600µl de tampon B5, suivi d'une centrifugation de 11000g, 1 minute. La membrane de silice est ensuite séchée par une nouvelle centrifugation de 11000g, 1 minute afin d'enlever les traces résiduelles d'éthanol. La colonne est alors placée dans un eppendorf et l'ADN élué par l'ajout de 50µl d'eau préchauffée, suivi d'une centrifugation de 11000g, 1 minute. Le résultat de cette purification est évalué par la quantification d'ADN par spectrophotométrie (Nanodrop®).

Pour le plasma, en raison de l'absence d'un contenu élevé en fibrine, l'étape de pré-lyse n'est pas nécessaire. Les 25 µl de protéinase K sont ajoutés au tampon de lyse B3 et aux 400µl de plasma, puis incubés 15 minutes à 70°C. La suite du protocole est identique à celui du LS.

1	Prepare sample		Cut 25 mg into small pieces
2	Pre-lyse sample		180 μ L T1 25 μ L Proteinase K 66 °C, 1–3 h
3	Lyse sample		200 μ L B3 70 °C, 10 min
4	Adjust DNA binding conditions		210 μ L 96–100 % ethanol
5	Bind DNA	 	Load all 11,000 x g, 1 min
6	Wash silica membrane	 1 st and 2 nd 	1 st wash 500 μ L BW 2 nd wash 600 μ L B5 11,000 x g, 1 min
7	Dry silica membrane		11,000 x g, 1 min
8	Elute high pure DNA	 	100 μ L BE (70 °C) RT, 1 min 11,000 x g, 1 min

Récapitulatif des étapes de purification (extrait du manuel d'utilisateur du kit NucleoSpin® Tissue de Macherey Nagel)

Annexe 2 : protocole de PCR classique

Afin de valider l'observation de la littérature quant à la présence d'ADN mt dans le LS et le plasma de PR, nous avons réalisé sur quelques échantillons sanguins et articulaires purifiés des PCR avec des amorces spécifiques de l'ADN mt humain, reconnaissant le gène UUR codant pour l'ARN de transfert de la leucine. Le mix de PCR contient pour un échantillon, 2µl d'amorces « forward » et 2µl d'amorces « reverse » à la concentration de 10µM, 1µl de dNTPs (mélange des 4 désoxyribonucléotides triphosphates) à 5mM, 2µl de MgCl₂ à 2mM, 2,5 µL de tampon 10X, 0,2µL de Taq DNA polymérase (Roche®) et 12,8µL d'eau pour un volume total de 22,5µL.

Le protocole de PCR comporte une étape de dénaturation de 10 minutes à 95°C, puis 40 cycles d'amplification (30 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes d'hybridation à 60°C puis 30 secondes d'élongation à 72°C) suivis d'une d'élongation à 72°C de 7 minutes.

La révélation a été effectuée sur gel d'agarose à 2% par du bromure d'éthidium.

Annexe 3 : Ebauche d'article

Cette ébauche concerne l'article qui sera prochainement soumis, après modifications éventuelles, à la Revue du Rhumatisme.

L'ADN mitochondrial : un nouveau Signal de Danger du système immunitaire, voire une alarmine ? Une revue de la littérature.

Stéphane Mitrovic^{1,2,†}, Anne Contis^{1,3,†}, Liliane Khoryati¹, Benjamin Faustin¹, Patrick Blanco^{1,4}, Pierre Duffau^{1,3}, Christophe Richez^{1,2,*}

¹ CNRS UMR 5164, 146 rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France

² Service de Rhumatologie, CHU de Bordeaux, place Amélie-Raba-Léon, 33076 Bordeaux cedex, France

³ Service de Médecine Interne, CHU de Bordeaux, Hôpital Saint-André, 1 rue Jean Burguet, 33075 Bordeaux cedex, France

⁴ Laboratoire d'immunologie, CHU de Bordeaux, place Amélie-Raba-Léon, 33076 Bordeaux cedex, France

† Ces deux auteurs ont contribué de manière égale au travail

*Auteur correspondant. Service de Rhumatologie, CHU de Bordeaux, place Amélie-Raba-Léon, 33076 Bordeaux cedex, France.

Tel. : +33 556 795 556; fax : +33 556 796 084.

Adresse E-mail : christophe.richez@chu-bordeaux.fr

Résumé :

L'immunité innée repose sur la reconnaissance par des récepteurs spécifiques, les PRR (Pattern Recognition Receptors), de signaux de dangers ou DAMPS (Danger Associated Molecular Patterns). Cette grande famille regroupe non seulement des motifs microbiens exogènes, les PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns), mais également des ligands endogènes, libérés lors d'une souffrance cellulaire ou tissulaire. Parmi ces derniers a émergé il y a quelques années le concept « d'alarmine » : certaines molécules, stockées constitutivement à l'intérieur des cellules de l'immunité, peuvent être libérées rapidement pour alarmer le système immunitaire. Plusieurs travaux ont identifié la présence d'ADN mitochondrial (ADN mt) dans le plasma en contexte inflammatoire. Les mécanismes par lesquels l'ADN mt contribue à la réponse inflammatoire sont multiples et encore mal connus. Etant donnée l'origine phylogénétique de la mitochondrie, l'ADN mt présente de fortes homologues structurales avec l'ADN bactérien, ce qui en fait un ligand des TLR9 (Toll-like Receptors 9). Du fait de sa localisation mitochondriale, il est plus sujet aux oxydations excessives, et pourrait ainsi activer l'inflammasome NLRP3. Enfin, d'autres DAMPs mitochondriaux pourraient potentialiser son effet. L'objectif de cette revue de la littérature, est donc de dresser les arguments identifiant l'ADN mt libéré dans le milieu extra-cellulaire comme un nouveau signal de danger, et plus précisément comme une alarmine.

Mots clés : ADN mitochondrial, Danger-Associated Molecular Pattern, DAMP, alarmine

1. Introduction

Pendant des années, sous l'influence de Janeway, le système immunitaire avait été théorisé comme capable de distinguer le « soi » du « non-soi » (1). Ainsi, des motifs étrangers au soi, les PAMPS (Pathogen Associated Molecular Patterns) lorsqu'ils sont reconnus par des récepteurs spécifiques, les PRR (Pattern Recognition Receptors), induiraient une réponse immunologique. Cette hypothèse séduisante, qui a permis de poser les jalons de l'identification des différents PRR dont les TLR (Tolls-Like Receptors)(2,3), explique élégamment comment les réponses immunitaires peuvent être induites par les agents infectieux, ou majorées par des adjuvants contenant des motifs microbiens(4). Toutefois, ce modèle de Janeway présente de nombreuses limites, car il ne permet pas d'expliquer les réponses immunitaires observées dans les maladies auto-immunes, auto-inflammatoires ou allergiques (4,5).

Le modèle proposé par Matzinger (6), aujourd'hui couramment admis, fait de l'immunité innée la pierre angulaire de la réponse immunitaire, grâce à la reconnaissance par les PRR de signaux de dangers ou DAMPS (Danger Associated Molecular Patterns)(6-8). Cette grande famille regroupe non seulement des motifs microbiens exogènes, les PAMPs, mais également des ligands endogènes, libérés lors d'une souffrance cellulaire ou tissulaire (6,7,9). Parmi ces derniers, certains sont rapidement disponibles dans les tissus périphériques en situation de stress (par exemple une infection et/ou un traumatisme), et sont capables d'augmenter l'induction des réponses immunes innées et adaptatives, en favorisant le recrutement et la maturation des cellules présentatrices de l'antigène (CPA). Ainsi, certains auteurs font émerger le concept d'« alarmines » : ces molécules générées en réponse à un danger servent à alarmer le système immunitaire (9-11). Ces alarmines sont souvent constitutionnellement stockées à l'intérieur des cellules de l'immunité innée (granulocytes, CPA) en tant que composants des granulations, du cytoplasme ou du noyau (4). La synthèse et/ou la libération de ces alarmines peuvent également être favorisées par la présence de cytokines et de PAMPs en contexte inflammatoire. Elles sont rapidement libérées par la dégranulation et/ou la nécrose cellulaire en réponse à un danger, et peuvent également dans certains cas favoriser la restauration du tissu lésé (9).

Plusieurs travaux ont identifié la présence d'ADN mitochondrial (ADN mt) dans le plasma en contexte inflammatoire (12-14). Les mécanismes par lesquels l'ADNmt

contribue à la réponse inflammatoire sont multiples et encore mal connus (15). L'objectif de cette revue de la littérature est de dresser les arguments identifiant l'ADN mt libéré dans le milieu extra-cellulaire comme un nouveau signal de danger, voire une alarmine.

2. Origine et structure de l'ADN mt

La mitochondrie est une organelle caractéristique des cellules eucaryotes (16). Elle est fondamentale pour la production énergétique d'ATP par les réactions de phosphorylation oxydative (16). Outre ce rôle métabolique indispensable, elle exerce également des fonctions immuno-modulatrices puisqu'elle participe à la régulation de la signalisation antivirale (17,18), facilite la réponse anti-bactérienne par la génération d'espèces réactives de l'oxygène (15,19), contribue à l'activation de la réponse immunitaire innée suivant le stress et la perte d'intégrité cellulaire (15), et enfin occupe une place importante dans le contrôle de la mort cellulaire par apoptose (19).

La mitochondrie a probablement évolué à partir d'une bactérie saprophyte ancestrale, devenue progressivement endosymbionte puis organelle (16). C'est pourquoi il n'est pas surprenant que le génome mitochondrial présente de fortes homologues avec l'ADN bactérien (15,16). Il est circulaire, mesure environ 16569 paires de bases, n'est pas protégé par des protéines histones et contient des motifs ADN CpG (dinucléotides cytosine-guanine) non méthylés, motifs peu retrouvés dans l'ADN génomique de cellules eucaryotes mais très présents dans le génome bactérien (**figure 1**). Cette ressemblance avec l'ADN bactérien pourrait ainsi conférer à l'ADN mt des propriétés immunogènes : le génome mitochondrial peut être reconnu par des récepteurs de l'immunité innée, comme TLR9 (20), qui est de localisation endosomale et qui reconnaît préférentiellement des dinucléotides cytosine-guanine (CpG) non méthylés de l'ADN bactérien (8).

3. ADN mitochondrial et inflammation :

3.1 Élévation de l'ADN mt extracellulaire en contexte inflammatoire

De nombreux travaux ont identifié la présence d'ADN mt dans un contexte inflammatoire, et ce dans des pathologies bien différentes. En réanimation tout d'abord,

on constate chez des patients polytraumatisés, avec défaillance multi-viscérale et porteurs d'une inflammation systémique de type SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) des taux d'ADN mt plasmatiques circulants 1000 fois supérieurs à ceux de sujets sains (21). Des études cliniques ultérieures ont permis d'établir la valeur pronostique précoce de cet ADN mt circulant chez des patients polytraumatisés, en sepsis sévère ou hospitalisés en service de soins intensifs, à l'image d'autres marqueurs biologiques comme les lactates ou la procalcitonine (22). Son élévation dès J1 et sa corrélation avec le score de sévérité clinique ISS (Injury Severity Score) pour les patients de réanimation semblent témoigner du risque d'évolution vers la défaillance multiviscérale ou le décès pour les sujets ayant les taux plasmatiques les plus élevés, sous réserve de faibles effectifs d'études (23,24). Une étude a déterminé, par régression logistique, que le taux plasmatique ADN mt à l'admission serait un facteur indépendant de fatalité : l'augmentation d'un ng/mL d'ADN mt dans le plasma induirait une augmentation de 0,7 % de la mortalité, ce qui en ferait un facteur prédictif plus puissant que le taux de lactates ou le score SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) (25).

Un autre exemple où des taux plasmatiques élevés d'ADN mt sont associés à l'état inflammatoire chronique est celui des cancers solides et des hémopathies : sein (26), testicule (27), ORL (il est alors détecté dans la salive des patients (28)), prostate (29) et lymphome malin non Hodgkiniens (30). Dans le cas de la prostate, il joue, là encore, le rôle de marqueur pronostique défavorable en terme de survie à 2 ans (13). Au cours de l'infection par le VIH, le taux d'ADN mt est corrélé au statut de l'infection et à la charge virale. Ainsi, les patients au stade aigu de l'infection ou qui ont une évolution prolongée sans traitement ont des taux d'ADN mt significativement plus élevés que les patients progresseurs lents (14). La présence d'ADN mt est alors associée à un état inflammatoire chronique (31).

Si l'ADN mt extracellulaire circulant est plus souvent retrouvé dans le plasma de sujets souffrant de polyarthrite rhumatoïde, comparativement au plasma de sujets sains, on en retrouve également dans le liquide synovial des malades arthritiques (32). Toutefois, les auteurs n'ont pas quantifié les taux d'ADN mt dans cette pathologie, et de ce fait n'ont pu établir aucune corrélation avec les caractéristiques cliniques ou biologiques des patients.

3.2 Rôle pro-inflammatoire de l'ADN mt

Plusieurs études expérimentales *in vitro* et animales suggèrent un rôle fonctionnel direct et/ou indirect de l'ADN mt dans l'inflammation.

3.2.1 Modèles *in vitro*

Zhang et al. ont démontré que l'ADN mt est capable de recruter et d'activer les polynucléaires neutrophiles (PNN) en culture. En présence d'autres DAMPs mitochondriaux comme les formyl peptides, l'ADN mt induit la mobilisation calcique intracellulaire à l'intérieur des PNN et favorise leur dégranulation. Il stimule en outre la sécrétion d'IL-8 par les PNN, chimiokine chémoattractante pour les neutrophiles, favorisant leur recrutement sur le site de l'inflammation, mais aussi à distance, permettant la diffusion systémique de l'inflammation (21). L'incubation des PNN avec de l'ADN mt purifié stimule la sécrétion de métalloprotéinases (intervenant dans la migration tissulaire) par ces cellules, ce qui n'est pas le cas lorsqu'elles sont incubées avec de l'ADN nucléaire (33). La proximité structurale de l'ADN mt avec l'ADN bactérien, notamment sa richesse en motifs CpG, et d'autre part le fait que cette activation soit bloquée en présence de chloroquine, suggère une implication de la voie TLR9 endosomale (21,33). D'ailleurs, l'ADN mt favorise la phosphorylation des MAP kinases p38 à l'intérieur des PNN (33).

3.2.2 Modèles animaux

L'injection par voie intraveineuse d'ADN mt à un modèle murin génère des lésions inflammatoires systémiques, hépatiques et pulmonaires, caractérisées par un infiltrat neutrophilique précoce et une synthèse locale de cytokine pro-inflammatoire (TNF α puis IL6) (12,34). Un autre modèle chez le rat souligne que l'inflammation pulmonaire s'accompagne d'un œdème et que la production de cytokines pro-inflammatoires induites par l'ADN mt est la conséquence d'une augmentation de l'expression pulmonaire de TLR9 et de la signalisation par la voie du NF κ B (35).

Un modèle murin souligne le potentiel arthritogène de l'ADN mt. En effet, l'injection intra-articulaire dans le genou d'ADN mt purifié déclenche une poussée d'arthrite, ce qui n'est pas le cas lorsqu'on injecte de l'ADN nucléaire (36). La survenue de l'arthrite dans ce modèle est principalement médiée par les monocytes (puisque leur déplétion atténue l'inflammation synoviale), et dans une moindre mesure par les PNN.

L'activation des monocytes fait intervenir la voie du NFκB avec pour conséquence la sécrétion locale de TNFα (36).

3.3 Cibles de l'ADN mt et voies de signalisations intracellulaires

3.3.1 Ilôt CpG et TLR9 endosomaux

Comme décrit ci-dessus, de nombreuses études suggèrent que les motifs CpG de l'ADN mt pourraient être reconnus par le TLR9 au sein des endosomes, et activer ensuite les cascades intracellulaires du NFκB ou des MAP kinases p38 (12,33,35,36)(**figure 2**). Cependant, d'autres mécanismes semblent concourir à la genèse de l'inflammation.

3.3.2 ADNmt oxydé et inflammasome

En effet, du fait de sa localisation dans la matrice mitochondriale, l'ADN mt est une cible idéale des radicaux libres induits par des dysfonctionnements du métabolisme aérobie (37) et des oxydations phosphorylantes (38). L'ADN mt est ainsi nettement plus touché par ce stress oxydatif que l'ADN nucléaire (39), du fait de sa proximité par rapport à la chaîne respiratoire, de son manque d'histones, et de moindres systèmes de réparation. Ceci aboutit à une oxydation et/ou une fréquence de mutation accrue (40).

Les motifs oxydés sont immunogènes comme en témoignent l'apport de modèles animaux. Ainsi, il a été mis en évidence qu'un oligonucléotide dépourvu de motif CpG mais contenant un seul résidu 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) possédait des propriétés pro-inflammatoires *in vivo* (36), puisque son injection intra-articulaire entraînait une arthrite inflammatoire chez la souris. A contrario, l'injection d'un oligonucléotide de même séquence, mais dépourvu de motif 8-oxodG, ne reproduisait pas l'arthrite. En outre, Shimada et al. ont montré que l'ADN mt oxydé est capable d'activer dans le cytosol l'inflammasome NLRP3 (alors que l'ADN mt non oxydé activerait plutôt l'inflammasome AIM2), aboutissant ainsi à l'activation de la caspase 1 qui permet le clivage respectif de la pro-IL1β et de la pro-IL18 en IL1β et IL18 (41) (**figure 3**).

3.3.3 Régulation par la mitophagie

Pour faire face à ces dommages oxydatifs, la cellule a mise en place un mécanisme protecteur d'autophagie des organites défailants appelé mitophagie. Ainsi,

les mitochondries endommagées sont englobées dans un autophagosome qui fusionne secondairement avec un lysosome où la présence de DNase II permettra la dégradation d'ADN mt (42). Lorsque le stress oxydatif est trop intense, le processus mitophagique peut-être dépassé et l'ADN mt peut s'échapper de l'autophagosome, et ainsi aller activer l'inflammasome NLRP3 (43). Cet ADN mt « échappé » peut également gagner secondairement l'endosome et activer la voie TLR9 et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (44) (**figure 3**). Un modèle murin d'insuffisance cardiaque sur poussée hypertensive souligne bien l'importance de ce mécanisme de régulation, en montrant que la déficience de cette mitophagie est impliquée dans la survenue de lésions inflammatoires. Des souris déficientes en DNase II, mimant un phénotype d'autophagie déficiente, développent dans les 10 jours suivants une poussée hypertensive majeure, une myocardite sévère puis une cardiopathie dilatée avec une mortalité accrue. L'infiltrat myocardique par des cellules inflammatoires et la surexpression locale de cytokines pro-inflammatoires s'associent à une augmentation des dépôts d'ADNmt dans les autophagosomes. Le blocage de TLR9 améliore le phénotype inflammatoire et la dysfonction myocardique, témoignant que la mitophagie déficiente favorise un état pro-inflammatoire au cours des poussées d'insuffisance cardiaque par l'interaction de TLR9 et de l'ADN mt (45).

Si la déficience de la mitophagie favorise l'activation des TLR9 et/ou de l'inflammasome NLRP 3, il est à noter que les ROS (Reactive Oxygen Species, espèces réactives de l'oxygène) stimulent directement l'ouverture des pores de la membrane mitochondriale externe, et donc la libération de l'ADN mt dans le cytosol (46) (**figure 3**).

3.4 Autres DAMPs mitochondriaux associés à l'ADN mt

De nombreux autres DAMPs d'origine mitochondriale contribuent à la réponse pro-inflammatoire, parallèlement à la reconnaissance de l'ADN mt (**tableau 1, figure 2**). Les îlots CpG hypométhylés ne sont pas les seules caractéristiques que la mitochondrie partage avec la bactérie. Ainsi, les N-formyl peptides d'origine mitochondriale sont reconnus, tous comme leurs analogues bactériens, par des récepteurs spécifiques à la surface des PRR, les FPRs (pour Formyl Peptide Receptors)(47). Ceux-ci sont couplés à une protéine G, et cette reconnaissance entraîne une mobilisation calcique intracellulaire (12), l'activation des MAP kinases (12), la sécrétion de cytokines et chimiokines chémoattractantes (48), et la survenue du burst oxydatif (49).

Le mitochondrial transcription factor A (TFAM) est une protéine de fonction et de structure semblable à la protéine high-mobility-group box-1 (HMGB1). HMGB1 est lié à l'ADN nucléaire et joue, entre autres, le rôle de facteur de transcription de l'ADN génomique (50), alors que son « cousin » TFAM est associé à l'ADN mitochondrial (51). Les rôles de HMGB1 sont multiples : facteur de transcription nucléaire, rôle pro-angiogénique, DAMP, cytokine pro-inflammatoire libérée dans le milieu extracellulaire (50)... HMGB1 est en outre retrouvé en abondance dans les liquides synoviaux de polyarthrite rhumatoïde (52), et son injection intra-articulaire chez la souris induit une arthrite (53,54). Les rôles de TFAM quant à eux, commencent à être précisés. Lors de la nécrose cellulaire, l'ADN mt libéré dans le milieu extracellulaire reste lié à TFAM. La reconnaissance de ce dernier par les récepteurs RAGE (Receptors for Advanced Glycation End Products) présents à la surface des cellules présentatrice de l'antigène (CPA), et notamment des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), faciliterait l'internalisation du complexe ADNmt/TFAM au sein des pDC, et l'acheminement à l'endosome où l'ADN mt est secondairement reconnu par le TLR9, activant la cascade de signalisation intracellulaire aboutissant à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires comme l'interféron de type 1 (51) (**figure 2**). Une autre équipe a montré que la libération de TFAM par les cellules nécrotiques potentialisait la sécrétion d'IL8 induites par les peptides N-formylés par les monocytes (55).

Les autres DAMPs d'origine mitochondriale les plus étudiés sont l'ATP qui, via les récepteurs purinergiques P2RX7, joue le rôle de second signal dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 (56) ou les anions superoxydes mitochondriaux (43,57).

3.5 Sources et mécanismes de libération

Divers mécanismes dépendants ou non de la mort cellulaire ont été impliqués dans la libération d'ADN mt dans le milieu extracellulaire. Plusieurs travaux ont rapporté la libération d'ADN mt au cours de la nécrose (51), l'ADN mt étant par exemple libéré par les cellules musculaires lisses des tissus lésés lors d'un polytraumatisme. Pour d'autres, un type de mort cellulaire récemment décrit, la NETose, semble associé à la présence d'ADN mt extracellulaire. En effet, les PNN activés, via l'émission de NETs (Neutrophil Extracellular Traps) et plus spécifiquement grâce à leur contenu en ADN mt, participent à la réponse inflammatoire (58). Toutefois, la mort cellulaire ne semble pas indispensable à la

libération d'ADN mt. Il a, par exemple, été montré que les polynucléaires éosinophiles sont capables de libérer « telle une catapulte » de l'ADNmt dans le milieu extracellulaire suite à une stimulation par le LPS (lipopolysaccharide) (59).

3.6 Cellules cibles

Les cibles étudiées, ou du moins rapportées, dans la littérature semblent surtout être les cellules de l'immunité innée : cellules dendritiques (51), monocytes (36,55), polynucléaires neutrophiles (12,33,34)... Il est difficile de conclure à une absence d'effets ou de reconnaissance par les cellules de l'immunité adaptative devant le peu de données de la littérature. On rappellera simplement que dans le modèle murin de Collins, la déplétion en lymphocyte B ou T n'influeait pas sur la sévérité de l'arthrite induite (cf. paragraphe 3.2.2, (36)).

4. L'ADN mt : une alarmine ?

A ce jour, les principales alarmines couramment admises (liste non exhaustive) sont : les défensines, les cathelicidines, les neurotoxines dérivées des éosinophiles, la lactoferrine, certaines protéines appartenant au groupe des « high-mobility group (HMG) proteins », la granulysine, l'ATP, l'histamine et probablement les membres de la famille des protéines S100, des heat-shock proteins, et de certains produits de dégradation de la matrice extracellulaire (par exemple le hyaluronan et l'héparane sulfate) (9).

Tous les signaux de Danger endogènes ne sont pas des alarmines. En effet, Oppenheim et al. ont décrit des critères précis permettant de classer un DAMP comme alarmine (4,11) : 1) elles sont constitutionnellement stockées à l'intérieur des cellules ; 2) elles sont rapidement libérées après une mort non programmée, telle la nécrose, mais pas par les cellules apoptotiques ; 3) les cellules de l'immunité peuvent être capables dans certaines conditions de libérer les alarmines sans mourir ; 4) elles ont souvent un rôle multifonctionnel, et une activité anti-microbienne ; 5) elles sont capables de recruter et d'activer les cellules de l'immunité innée, y compris les cellules dendritiques, via leurs récepteurs, et ainsi de stimuler directement et indirectement les réponses immunes innées et adaptatives ; 6) elles peuvent également dans certains cas favoriser la restauration du tissu lésé et de l'homéostasie.

Hormis pour le 6^{ème} critère, pour lequel nous n'avons à ce jour, faute d'étude, pas de réponse, les cinq autres critères semblent être satisfaits puisque l'ADN mt est stocké constitutivement à l'intérieur des cellules, il est libéré rapidement lors de la nécrose cellulaire (12,51), mais aussi de la NETose (58), voire est « catapulté » sans mort cellulaire dans certaines conditions (59). En outre, l'ADN mt a dans les NETs une activité anti-microbienne directe (58,59). Enfin, nous avons vu que l'ADNmt était capable d'activer une multitude de cellules : monocyte et macrophages, PNN, et cellules présentatrices d'antigènes professionnelles telles que les cellules dendritiques. Ainsi, l'ADN mt peut bel et bien être considéré comme une nouvelle alarmine du système immunitaire.

5. Conclusion

Les publications de plus en plus nombreuses sur l'ADN mt permettent de mieux appréhender son implication dans la réponse immunitaire. Cette alarmine semble en effet impliquée dans de nombreuses maladies, en contribuant au déclenchement et à l'entretien de la réponse inflammatoire. Une meilleure connaissance des mécanismes de reconnaissance et d'action de cet ADN mt pourrait aboutir à terme au développement de nouvelles cibles thérapeutiques, à l'instar des molécules inhibant le TLR9 ou l'inflammasome. Il est à gager que de nouveaux travaux sur cette recherche d'actualité viendront bientôt compléter nos connaissances sur le sujet.

Déclaration d'intérêts :

Les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêt

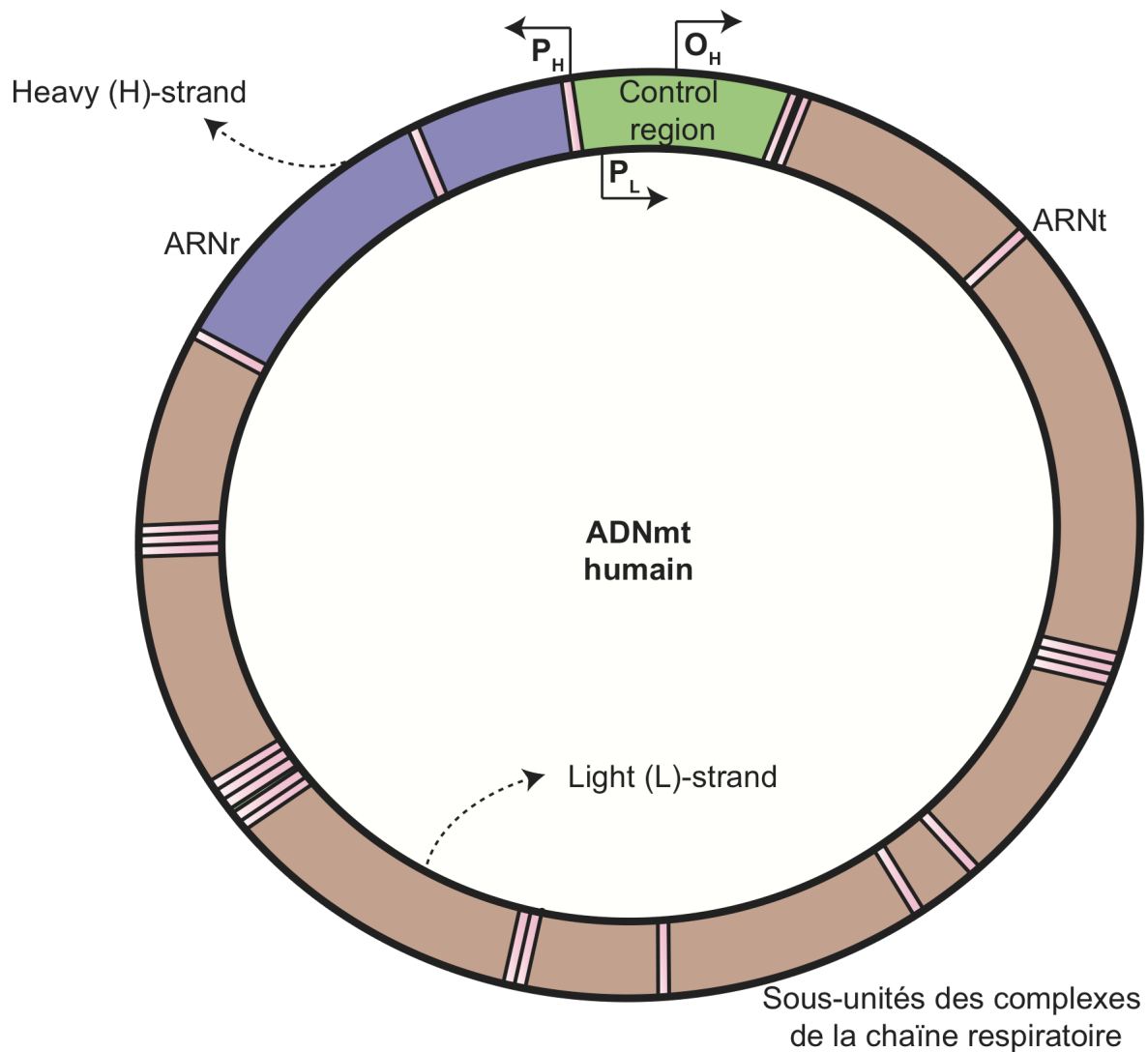


Figure 1 : représentation schématique du génome mitochondrial. Le génome mitochondrial mesure 16,5 kb, il est circulaire, composé d'un brin lourd et d'un brin léger et comporte 37 gènes : 13 gènes codant pour une partie des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire (*en marron*), 22 gènes codant pour des ARN de transfert (*en rose*) et 2 pour des ARN ribosomiaux (12S et 16S) (*en violet*) (60). Les protéines nécessaires à sa réplication et à sa transcription sont donc codées par des gènes nucléaires. L'origine de réplication du brin lourd, ou O_H (pour heavy-strand origin of replication), ainsi que les promoteurs du brin lourd (P_H) et léger (P_L) se situent au niveau de la région de contrôle (*en vert*). Noter que l'origine de réplication de la chaîne légère (O_L) est située à distance de la région de contrôle. Le facteur de transcription mitochondriale TFAM (mitochondrial transcription factor A) s'accroche entre les promoteurs. TFAM est très important dans l'initiation de la transcription et donc dans la réplication de l'ADNmt.

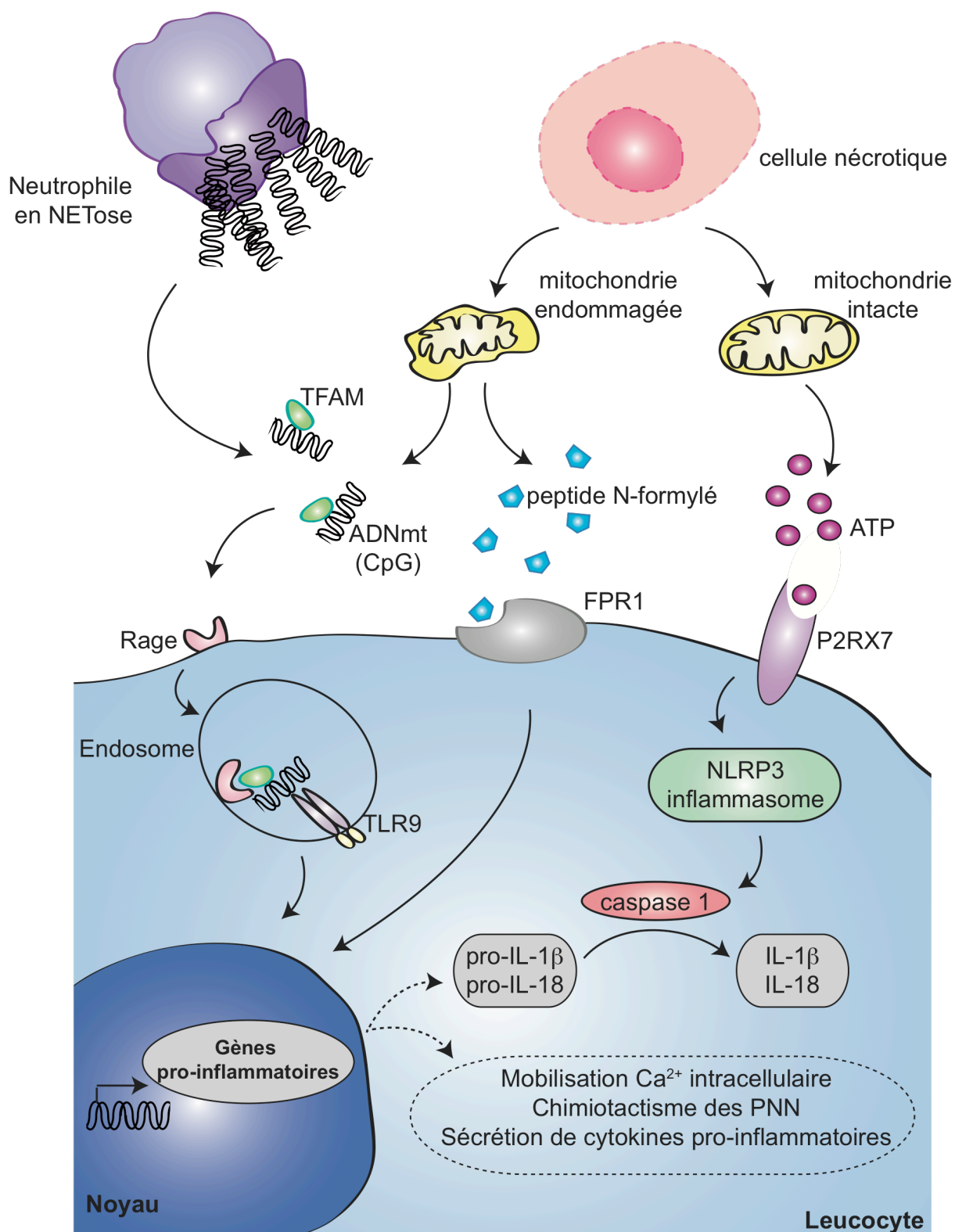


Figure 2: Principaux DAMPs (Danger-Associated Molecular Patterns) mitochondriaux et leur mécanisme d'action sur la réponse inflammatoire :

La souffrance cellulaire et la nécrose entraînent la libération de mitochondries dans l'espace extracellulaire, qui vont secondairement libérer des DAMPs mitochondriaux. La reconnaissance de ces derniers par des récepteurs spécifiques présents sur les cellules de l'immunité innée, tels les monocytes ou neutrophiles, va entraîner l'activation de ces

cellules et la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. La reconnaissance de TFAM par les récepteurs RAGE favorise l'internalisation du complexe TFAM/ADNmt, sa translocation à l'endosome et la reconnaissance secondaire par les TLR9 des motifs CpG hypométhylés de l'ADNmt. Les peptides N-Formylés sont quant à eux reconnus par les récepteurs FPR1 (formyl peptide receptor 1). Les cellules nécrotiques peuvent également libérer des mitochondries intactes, qui vont sécréter de l'ATP. Celui-ci, une fois reconnu par les récepteurs purinergiques leucocytaires P2RX7, va agir comme second signal dans l'activation de l'inflammasome NLRP3, aboutissant à la maturation de l'IL-1 β et de l'IL-18. A noter que la libération de l'ADN mt n'est pas un processus uniquement lié à la nécrose cellulaire; la NETose, voire la libération « telle une catapulte » sans mort cellulaire semblent impliquées.

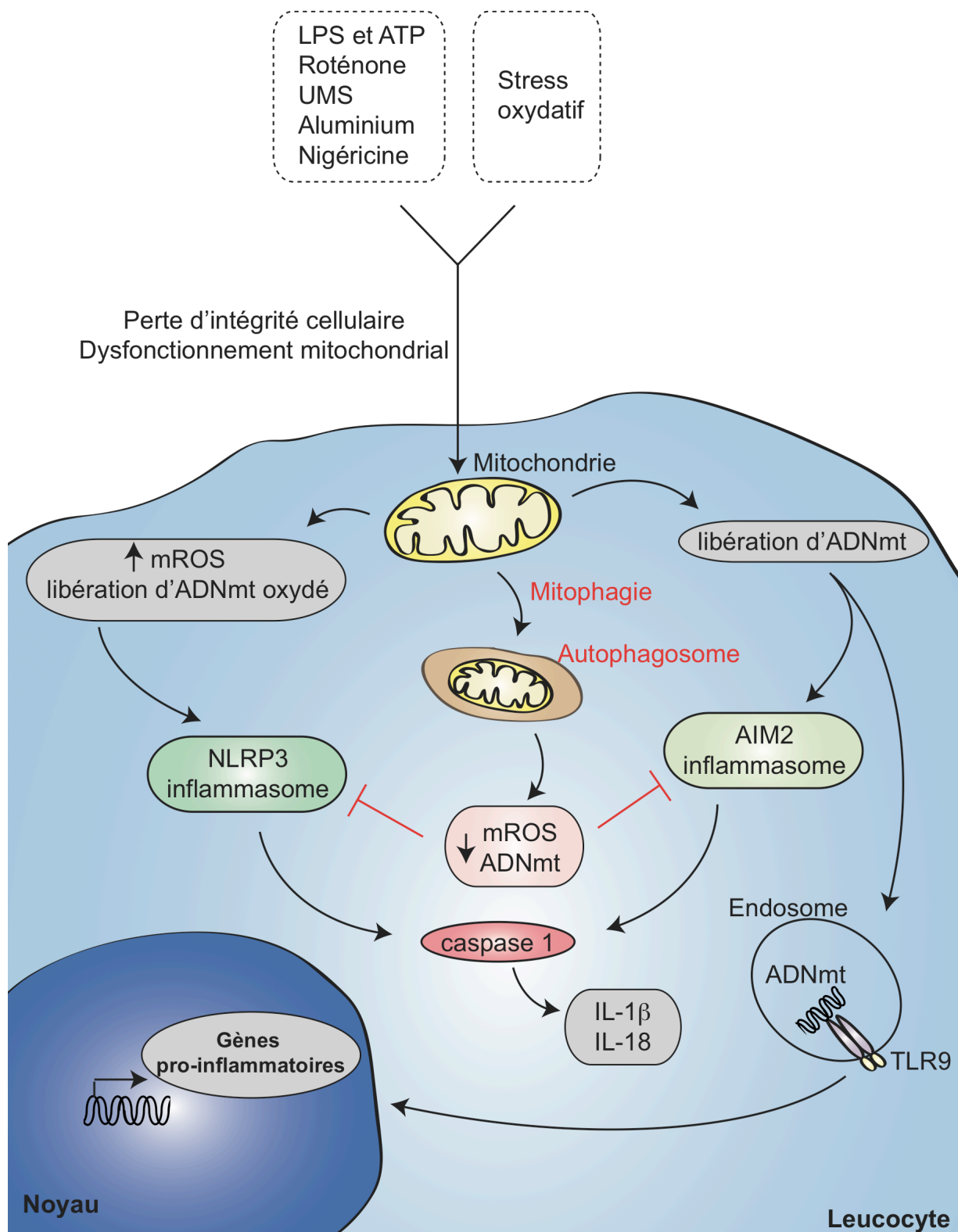


Figure 3 : Activation de l'inflammasome par l'ADN mt et régulation par la mitophagie :

Le stress oxydatif et les activateurs de l'inflammasome (comme le lipolysaccharide (LPS), l'ATP, la roténone, l'urate monosodique (UMS), l'aluminium ou la nigéricine)

favorisent la dysfonction mitochondriale et la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ou mROS, pour mitochondrial Reactive Oxygen Species), qui vont venir oxyder et endommager l'ADN mt. Les mROS et l'ADN mt oxydé, qui s'est échappé dans le cytosol par les pores de la membrane mitochondriale externe, vont aller activer l'inflammasome NLRP3, aboutissant à la maturation du pro-IL1 β et de la pro-IL18 en IL1 β et IL18 par la caspase 1. L'ADNmt non oxydé activerait quant à lui préférentiellement l'inflammasome AIM2 (absent in melanoma 2). La mitophagie joue le rôle de « frein négatif », en dégradant les mitochondries, ce qui diminue de facto la quantité de mROS et d'ADNmt. A noter qu'une petite partie de l'ADN mt libéré dans le cytosol pourrait être acheminée vers les endosomes, où il serait reconnu via ses îlots CpG hypométhylés par les Toll-like Récepteurs 9 (TLR9).

Tableau 1 : Principaux DAMPs d'origine mitochondriale :

DAMP	Localisation du récepteur	Récepteur	Action inflammatoire	Références
ADN mt	Endosomal	TLR9	<ul style="list-style-type: none"> ○ Activation des monocytes et macrophages ○ Mobilisation calcique intracellulaire, dégranulation et chimiotactisme des PNN ○ Sécrétion de cytokines ○ Arthrite si injection intra-articulaire (souris) ○ Hépatite, inflammation pulmonaire ou systémique (choc) si injection intraveineuse (souris) 	(12,33-36)
	Cytosolique	Inflammasome : AIM2 si non oxydé NLRP3 si oxydé	Activation de la caspase 1 et sécrétion de cytokines	(41,43)
N-formyl peptides	Surface cellulaire	FPR1	<ul style="list-style-type: none"> ○ Activation des monocytes ○ Mobilisation calcique intracellulaire, dégranulation, burst oxydatif et chimiotactisme des PNN ○ Sécrétion de cytokines ○ Hépatite, inflammation pulmonaire ou systémique (choc) si injection intraveineuse (souris) 	(12,47-49)
TFAM	Surface cellulaire	RAGE	<ul style="list-style-type: none"> ○ Facilite l'internalisation du complexe ADNmt/TFAM ○ Active les pDC et la synthèse de cytokines ○ Active les monocytes et la synthèse de cytokines 	(51,55)
ATP mitochondrial	Surface cellulaire	P2RX7	<ul style="list-style-type: none"> ○ Active via l'inflammasome NLRP3 la caspase 1 et la sécrétion de cytokines ○ Migration des neutrophiles si injection intra-péritonéales (souris) 	(56)
mROS	Cytosolique	Inflammasome NLRP3	Activation de la caspase 1 et sécrétion de cytokines	(43,57)

AIM2 : absent in melanoma 2; DAMP : Damage-Associated Molecular pattern; FPR1 : formyl-peptide receptor 1; mtDNA : mitochondrial DNA; mROS : mitochondrial reactive oxygen species; NLRP3 : NOD-, LRR- and pyrin domain-containing 3; P2RX7 : P2X purinoceptor 7; RAGE : Receptors for Advanced Glycation End Products; TFAM : mitochondrial transcription factor A; TLR9 : Toll-like receptor 9.

Bibliographie :

1. Janeway CA. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today*. janv 1992;13(1):11-6.
2. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 24 juill 1997;388(6640):394-7.
3. Imler JL, Hoffmann JA. Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell Biol*. juill 2001;11(7):304-11.
4. Yang D, Tewary P, de la Rosa G, Wei F, Oppenheim JJ. The alarmin functions of high-mobility group proteins. *Biochim Biophys Acta*. févr 2010;1799(1-2):157-63.
5. Yang D, Oppenheim JJ. Antimicrobial proteins act as « alarmins » in joint immune defense. *Arthritis Rheum*. nov 2004;50(11):3401-3.
6. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:991-1045.
7. Seong S-Y, Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol*. juin 2004;4(6):469-78.
8. Richez C, Blanco P, Rifkin I, Moreau J-F, Schaefferbeke T. Role for toll-like receptors in autoimmune disease: the example of systemic lupus erythematosus. *Jt Bone Spine Rev Rhum*. mars 2011;78(2):124-30.
9. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*. janv 2007;81(1):1-5.
10. Oppenheim JJ, Tewary P, de la Rosa G, Yang D. Alarmins initiate host defense. *Adv Exp Med Biol*. 2007;601:185-94.
11. Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol*. août 2005;17(4):359-65.
12. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*. 4 mars 2010;464(7285):104-7.
13. Mehra N, Penning M, Maas J, van Daal N, Giles RH, Voest EE. Circulating mitochondrial nucleic acids have prognostic value for survival in patients with advanced prostate cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 janv 2007;13(2 Pt 1):421-6.
14. Cossarizza A, Pinti M, Nasi M, Gibellini L, Manzini S, Roat E, et al. Increased plasma levels of extracellular mitochondrial DNA during HIV infection: a new role for

- mitochondrial damage-associated molecular patterns during inflammation. *Mitochondrion*. sept 2011;11(5):750-5.
15. West AP, Shadel GS, Ghosh S. Mitochondria in innate immune responses. *Nat Rev Immunol*. juin 2011;11(6):389-402.
 16. Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*. 5 mars 1999;283(5407):1482-8.
 17. Seth RB, Sun L, Ea C-K, Chen ZJ. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell*. 9 sept 2005;122(5):669-82.
 18. Xu L-G, Wang Y-Y, Han K-J, Li L-Y, Zhai Z, Shu H-B. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell*. 16 sept 2005;19(6):727-40.
 19. Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Mitochondria: master regulators of danger signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. déc 2012;13(12):780-8.
 20. Arnoult D, Soares F, Tattoli I, Girardin SE. Mitochondria in innate immunity. *EMBO Rep*. sept 2011;12(9):901-10.
 21. Zhang Q, Raouf M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*. 4 mars 2010;464(7285):104-7.
 22. Nakahira K, Kyung S-Y, Rogers AJ, Gazourian L, Youn S, Massaro AF, et al. Circulating mitochondrial DNA in patients in the ICU as a marker of mortality: derivation and validation. *PLoS Med*. déc 2013;10(12):e1001577; discussion e1001577.
 23. Simmons JD, Lee Y-L, Mulekar S, Kuck JL, Brevard SB, Gonzalez RP, et al. Elevated levels of plasma mitochondrial DNA DAMPs are linked to clinical outcome in severely injured human subjects. *Ann Surg*. oct 2013;258(4):591-6; discussion 596-8.
 24. Yamanouchi S, Kudo D, Yamada M, Miyagawa N, Furukawa H, Kushimoto S. Plasma mitochondrial DNA levels in patients with trauma and severe sepsis: time course and the association with clinical status. *J Crit Care*. déc 2013;28(6):1027-31.
 25. Kung C-T, Hsiao S-Y, Tsai T-C, Su C-M, Chang W-N, Huang C-R, et al. Plasma nuclear and mitochondrial DNA levels as predictors of outcome in severe sepsis patients in the emergency room. *J Transl Med*. 2012;10:130.
 26. Shen J, Platek M, Mahasneh A, Ambrosone CB, Zhao H. Mitochondrial copy number and risk of breast cancer: a pilot study. *Mitochondrion*. janv 2010;10(1):62-8.

27. Ellinger J, Albers P, Müller SC, von Ruecker A, Bastian PJ. Circulating mitochondrial DNA in the serum of patients with testicular germ cell cancer as a novel noninvasive diagnostic biomarker. *BJU Int.* juill 2009;104(1):48-52.
28. Jiang W-W, Masayeva B, Zahurak M, Carvalho AL, Rosenbaum E, Mambo E, et al. Increased mitochondrial DNA content in saliva associated with head and neck cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 avr 2005;11(7):2486-91.
29. Mizumachi T, Muskhelishvili L, Naito A, Furusawa J, Fan C-Y, Siegel ER, et al. Increased distributional variance of mitochondrial DNA content associated with prostate cancer cells as compared with normal prostate cells. *The Prostate.* 1 mars 2008;68(4):408-17.
30. Lan Q, Lim U, Liu C-S, Weinstein SJ, Chanock S, Bonner MR, et al. A prospective study of mitochondrial DNA copy number and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood.* 15 nov 2008;112(10):4247-9.
31. Pinti M, Mussini C, Cossarizza A. Mitochondrial DNA: a proinflammatory « enemy from within » during HIV infection? *Cell Death Dis.* 2012;3:307.
32. Hajizadeh S, DeGroot J, TeKoppele JM, Tarkowski A, Collins LV. Extracellular mitochondrial DNA and oxidatively damaged DNA in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2003;5(5):R234-40.
33. Zhang Q, Itagaki K, Hauser CJ. Mitochondrial DNA is released by shock and activates neutrophils via p38 map kinase. *Shock Augusta Ga.* juill 2010;34(1):55-9.
34. Marques PE, Amaral SS, Pires DA, Nogueira LL, Soriani FM, Lima BHF, et al. Chemokines and mitochondrial products activate neutrophils to amplify organ injury during mouse acute liver failure. *Hepatology Baltim Md.* nov 2012;56(5):1971-82.
35. Zhang J-Z, Liu Z, Liu J, Ren J-X, Sun T-S. Mitochondrial DNA induces inflammation and increases TLR9/NF- κ B expression in lung tissue. *Int J Mol Med.* avr 2014;33(4):817-24.
36. Collins LV, Hajizadeh S, Holme E, Jonsson I-M, Tarkowski A. Endogenously oxidized mitochondrial DNA induces in vivo and in vitro inflammatory responses. *J Leukoc Biol.* juin 2004;75(6):995-1000.
37. Richter C, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A.* sept 1988;85(17):6465-7.
38. Yakes FM, Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 21 janv 1997;94(2):514-9.
39. Kowaltowski AJ, Vercesi AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* févr 1999;26(3-4):463-71.

40. Loeffler M, Kroemer G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res.* 10 avr 2000;256(1):19-26.
41. Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, Chen S, et al. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity.* 23 mars 2012;36(3):401-14.
42. Goldman SJ, Taylor R, Zhang Y, Jin S. Autophagy and the degradation of mitochondria. *Mitochondrion.* juin 2010;10(4):309-15.
43. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VAK, Lee S-J, Dolinay T, Lam HC, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol.* mars 2011;12(3):222-30.
44. Ding Z, Liu S, Wang X, Khaidakov M, Dai Y, Mehta JL. Oxidant stress in mitochondrial DNA damage, autophagy and inflammation in atherosclerosis. *Sci Rep.* 2013;3:1077.
45. Oka T, Hikoso S, Yamaguchi O, Taneike M, Takeda T, Tamai T, et al. Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. *Nature.* 10 mai 2012;485(7397):251-5.
46. Escames G, López LC, García JA, García-Corzo L, Ortiz F, Acuña-Castroviejo D. Mitochondrial DNA and inflammatory diseases. *Hum Genet.* févr 2012;131(2):161-73.
47. Rabiet M-J, Huet E, Boulay F. Human mitochondria-derived N-formylated peptides are novel agonists equally active on FPR and FPRL1, while *Listeria monocytogenes*-derived peptides preferentially activate FPR. *Eur J Immunol.* août 2005;35(8):2486-95.
48. Carp H. Mitochondrial N-formylmethionyl proteins as chemoattractants for neutrophils. *J Exp Med.* 1 janv 1982;155(1):264-75.
49. Raouf M, Zhang Q, Itagaki K, Hauser CJ. Mitochondrial peptides are potent immune activators that activate human neutrophils via FPR-1. *J Trauma.* juin 2010;68(6):1328-32; discussion 1332-4.
50. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol.* avr 2005;5(4):331-42.
51. Julian MW, Shao G, Bao S, Knoell DL, Papenfuss TL, VanGundy ZC, et al. Mitochondrial transcription factor A serves as a danger signal by augmenting plasmacytoid dendritic cell responses to DNA. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 juill 2012;189(1):433-43.
52. Kokkola R, Sundberg E, Ulfgren A-K, Palmblad K, Li J, Wang H, et al. High mobility group box chromosomal protein 1: a novel proinflammatory mediator in synovitis. *Arthritis Rheum.* oct 2002;46(10):2598-603.

53. Andersson U, Erlandsson-Harris H. HMGB1 is a potent trigger of arthritis. *J Intern Med.* mars 2004;255(3):344-50.
54. Kokkola R, Li J, Sundberg E, Aveberger A-C, Palmblad K, Yang H, et al. Successful treatment of collagen-induced arthritis in mice and rats by targeting extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 activity. *Arthritis Rheum.* juill 2003;48(7):2052-8.
55. Crouser ED, Shao G, Julian MW, Macre JE, Shadel GS, Tridandapani S, et al. Monocyte activation by necrotic cells is promoted by mitochondrial proteins and formyl peptide receptors. *Crit Care Med.* juin 2009;37(6):2000-9.
56. Iyer SS, Pulskens WP, Sadler JJ, Butter LM, Teske GJ, Ulland TK, et al. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1 déc 2009;106(48):20388-93.
57. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature.* 13 janv 2011;469(7329):221-5.
58. Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* nov 2009;16(11):1438-44.
59. Yousefi S, Gold JA, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, Kozlowski E, et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med.* sept 2008;14(9):949-53.
60. Wallace DC, Chalkia D. Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* oct 2013;3(10):a021220.

SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle mes promesses ; que je sois déshonorée et méprisée si j'y manque.

