



Efficacité thérapeutique du composé phosphorylcholine-tuftsine dans un modèle murin de lupus

Mathilde Marie Versini

► To cite this version:

Mathilde Marie Versini. Efficacité thérapeutique du composé phosphorylcholine-tuftsine dans un modèle murin de lupus. Médecine humaine et pathologie. 2014. dumas-01207891

HAL Id: dumas-01207891

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01207891>

Submitted on 1 Oct 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 NICE-SOPHIA-ANTIPOLIS

UFR MÉDECINE

THÈSE

Pour l'obtention du titre de

Docteur en Médecine

Présentée et soutenue par

VERSINI Mathilde Marie

***EFFICACITÉ THÉRAPEUTIQUE DU COMPOSÉ
PHOSPHORYLCHOLINE - TUFTSIN
DANS UN MODÈLE MURIN DE LUPUS***

*THERAPEUTIC EFFICACY OF
PHOSPHORYLCHOLINE – TUFTSIN COMPOUND
IN A LUPUS MOUSE MODEL*

Soutenue le 27 octobre 2014
Devant la commission d'examen composée de :

Pr. Jean-Gabriel FUZIBET
Pr. Thierry PASSERON
Pr. Eric ROSENTHAL
Pr. Yehuda SHOENFELD

*Président du Jury
Assesseur
Assesseur
Directeur de Thèse*

UNIVERSITÉ DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS

FACULTÉ DE MÉDECINE

Liste des professeurs au **1er novembre 2014** à la Faculté de Médecine de Nice

Doyen

M. BAQUÉ Patrick

Assesseurs

M. ESNAULT Vincent

M. CARLES Michel

Mme BREUIL Véronique

Conservateur de la bibliothèque

M. SCALABRE Grégory

Chef des services administratifs

Mme CALLEA Isabelle

Doyens Honoraires

M. AYRAUD Noël

M. RAMPAL Patrick

M. BENCHIMOL Daniel

Professeurs Honoraires

M. BALAS Daniel

M. BLAIVE Bruno

M. BOQUET Patrice

M. BOURGEON André

M. BOUTTÉ Patrick

M. BRUNETON Jean-Noël

Mme BUSSIERE Françoise

M. CHATEL Marcel

M. COUSSEMENT Alain

M. DAR COURT Guy

M. DELMONT Jean

M. DEMARD François

M. DOLISI Claude

M. FREYCHET Pierre

M. GÉRARD Jean-Pierre

M. GILLET Jean-Yves

M. GRELLIER Patrick

M. HARTER Michel

M. INGLES AKIS Jean-André

M. LALANNE Claude-Michel

M. LAMBERT Jean-Claude

M. LAZDUNSKI Michel

M. LEFEBVRE Jean-Claude

M. LE BAS Pierre

M. LE FICHOUX Yves

M. LOUBIERE Robert

M. MARIANI Roger

M. MASSEYEFF René

M. MATTEI Mathieu

M. MOUIEL Jean

Mme MYQUEL Martine

M. OLLIER Amédée

M. ORTONNE Jean-Paul

M. SCHNEIDER Maurice

M. TOUBOL Jacques

M. TRAN Dinh Khiem

M. ZIEGLER Gérard

M.C.A. Honoraire

Mlle ALLINE Madeleine

M.C.U. Honoraires

M. ARNOLD Jacques
 M. BASTERIS Bernard
 Mlle CHICHMANIAN Rose-Marie
 M. EMILIOZZI Roméo
 M. GASTAUD Marcel
 M. GIRARD-PIPAU Fernand
 M. GIUDICELLI Jean
 M. MAGNÉ Jacques
 Mme MEMRAN Nadine
 M. MENGUAL Raymond
 M. POIRÉE Jean-Claude
 Mme ROURE Marie-Claire

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. AMIEL Jean	Urologie (52.04)
M. BENCHIMOL Daniel	Chirurgie Générale (53.02)
M. BOILEAU Pascal	Chirurgie Orthopédique et
Traumatologie (50.02)	
M. DARCOURT Jacques	Biophysique et Médecine Nucléaire
(43.01)	
M. DESNUELLE Claude	Biologie Cellulaire (44.03)
Mme EULLER-ZIEGLER Liana	Rhumatologie (50.01)
M. FENICHEL Patrick	Biologie du Développement et de la
Reproduction (54.05)	
M. FUZIBET Jean-Gabriel	Médecine Interne (53.01)
M. GASTAUD Pierre	Ophtalmologie (55.02)
M. GILSON Éric	Biologie Cellulaire (44.03)
M. GRIMAUD Dominique	Anesthésiologie et Réanimation
Chirurgicale (48.01)	
M. HASSEN KHODJA Reda	Chirurgie Vasculaire (51.04)
M. HÉBUTERNE Xavier	Nutrition (44.04)
M. HOFMAN Paul	Anatomie et Cytologie Pathologiques
(42.03)	
M. LACOUR Jean-Philippe	Dermato-Vénéréologie (50.03)
Mme LEBRETON Élisabeth	Chirurgie Plastique, Reconstructrice
et Esthétique (50.04)	
M. MICHIELS Jean-François	Anatomie et Cytologie Pathologiques
(42.03)	
M. MOUROUX Jérôme	Chirurgie Thoracique et
Cardiovasculaire (51.03)	
M. PAQUIS Philippe	Neurochirurgie (49.02)
M. PRINGUEY Dominique	Psychiatrie d'Adultes (49.03)
M. QUATREHOMME Gérald	Médecine Légale et Droit de la Santé
(46.03)	
M. ROBERT Philippe	Psychiatrie d'Adultes (49.03)
M. SANTINI Joseph	O.R.L. (55.01)
M. THYSS Antoine	Cancérologie, Radiothérapie (47.02)
M. VAN OBBERGHEN Emmanuel	Biochimie et Biologie Moléculaire
(44.01)	

PROFESSEURS PREMIERE CLASSE

M. BAQUE Patrick (42.01)	Anatomie – Chirurgie Générale
M. BATT Michel	Chirurgie Vasculaire (51.04)
M. BÉRARD Étienne	Pédiatrie (54.01)
M. BERNARDIN Gilles	Réanimation Médicale (48.02)
M. BONGAIN André	Gynécologie-Obstétrique (54.03)
Mme CRENESSE Dominique	Physiologie (44.02)
M. DE PERETTI Fernand (42.01)	Anatomie-Chirurgie Orthopédique
M. DRICI Milou-Daniel	Pharmacologie Clinique (48.03)
M. ESNAULT Vincent	Néphrologie (52-03)
M. FERRARI Émile	Cardiologie (51.02)
M. GIBELIN Pierre	Cardiologie (51.02)
M. GUGENHEIM Jean	Chirurgie Digestive (52.02)
Mme ICHAI Carole Chirurgicale (48.01)	Anesthésiologie et Réanimation
M. LONJON Michel	Neurochirurgie (49.02)
M. MARQUETTE Charles-Hugo	Pneumologie (51.01)
M. MARTY Pierre	Parasitologie et Mycologie (45.02)
M. MOUNIER Nicolas	Cancérologie, Radiothérapie (47.02)
M. PADOVANI Bernard (43.02)	Radiologie et Imagerie Médicale
M. PAQUIS Philippe	Neurochirurgie (49.02)
Mme PAQUIS Véronique	Génétique (47.04)
M. RAUCOULES-AIMÉ Marc Chirurgicale (48.01)	Anesthésie et Réanimation
Mme RAYNAUD Dominique	Hématologie (47.01)
M. ROSENTHAL Eric	Médecine Interne (53.01)
M. SCHNEIDER Stéphane	Nutrition (44.04)
M. THOMAS	Neurologie (49.01)
M. TRAN Albert	Hépatogastro-entérologie (52.01)

PROFESSEURS DEUXIEME CLASSE

M. ALBERTINI Marc	Pédiatrie (54.01)
Mme ASKENAZY-GITTARD Florence	Pédopsychiatrie (49.04)
M. BAHADORAN Philippe	Cytologie et Histologie (42.02)
M. BARRANGER Emmanuel	Gynécologie Obstétrique (54.03)
M. BENIZRI Emmanuel	Chirurgie Générale (53.02)
Mme BLANC-PEDEUTOUR Florence	Cancérologie – Génétique (47.02)
M. BREAUD Jean	Chirurgie Infantile (54-02)
Mlle BREUIL Véronique	Rhumatologie (50.01)
M. CANIVET Bertrand	Médecine Interne (53.01)
M. CARLES Michel	Anesthésiologie Réanimation (48.01)
M. CASSUTO Jill-Patrice	Hématologie et Transfusion (47.01)
M. CHEVALLIER Patrick (43.02)	Radiologie et Imagerie Médicale
Mme CHINETTI Guilia (44.01)	Biochimie-Biologie Moléculaire
M. DUMONTIER Christian	Chirurgie plastique
M. FERRERO Jean-Marc	Cancérologie ; Radiothérapie (47.02)
M. FOURNIER Jean-Paul	Thérapeutique (48-04)

M. FREDENRICH Alexandre	Endocrinologie, Diabète et Maladies métaboliques (54.04)
Mlle GIORDANENGO Valérie	Bactériologie-Virologie (45.01)
M. GUÉRIN Olivier	Gériatrie (48.04)
M. HANNOUN-LEVI Jean-Michel	Cancérologie ; Radiothérapie (47.02)
M. IANNELLI Antonio	Chirurgie Digestive (52.02)
M. JOURDAN Jacques	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire (51.03)
M. LEVRAUT Jacques	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
M. PASSERON Thierry	Dermato-Vénéréologie (50-03)
M. PICHE Thierry	Gastro-entérologie (52.01)
M. PRADIER Christian	Épidémiologie, Économie de la Santé et Prévention (46.01)
M. ROGER Pierre-Marie	Maladies Infectieuses ; Maladies Tropicales (45.03)
M. ROHRLICH Pierre	Pédiatrie (54.01)
M. RUIMY Raymond	Bactériologie-virologie (45.01)
Mme SACCONI Sabrina	Neurologie (49.01)
M. SADOUL Jean-Louis	Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques (54.04)
M. STACCINI Pascal	Biostatistiques et Informatique Médicale (46.04)
M. THOMAS Pierre	Neurologie (49.01)
M. TROJANI Christophe	Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (50.02)
M. VENISSAC Nicolas	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire (51.03)

PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS

M. SAUTRON Jean-Baptiste	Médecine Générale
--------------------------	-------------------

MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme ALUNNI-PERRET Véronique	Médecine Légale et Droit de la Santé (46.03)
M. AMBROSETTI Damien	Cytologie et Histologie (42.02)
Mme BANNWARTH Sylvie	Génétique (47.04)
M. BENOLIEL José	Biophysique et Médecine Nucléaire (43.01)
Mme BERNARD-POMIER Ghislaine	Immunologie (47.03)
Mme BUREL-VANDENBOS Fanny	Anatomie et Cytologie pathologiques (42.03)
M. DELOTTE Jérôme	Gynécologie-Obstétrique (54.03)
M. DOGLIO Alain	Bactériologie-Virologie (45.01)
M. FOSSE Thierry	Bactériologie-Virologie-Hygiène (45.01)
M. GARRAFFO Rodolphe	Pharmacologie Fondamentale (48.03)
Mme GIOVANNINI-CHAMI Lisa	Pédiatrie (54.01)
Mme HINAULT Charlotte	Biochimie et biologie moléculaire (44.01)
Mlle LANDRAUD Luce	Bactériologie-Virologie (45.01)
Mme LEGROS Laurence	Hématologie et Transfusion (47.01)
Mme MAGNIÉ Marie-Noëlle	Physiologie (44.02)

Mme	MOCERI Pamela	Cardiologie (51.02)
Mme	MUSSO-LASSALLE Sandra (42.03)	Anatomie et Cytologie pathologiques
M.	NAÏMI Mourad (44.01)	Biochimie et Biologie moléculaire
M.	PHILIP Patrick	Cytologie et Histologie (42.02)
Mme	POMARES Christelle	Parasitologie et mycologie (45.02)
Mlle	PULCINI Céline Tropicales (45.03)	Maladies Infectieuses ; Maladies
M.	ROUX Christian	Rhumatologie (50.01)
M.	TESTA Jean et Prévention (46.01)	Épidémiologie Économie de la Santé
M.	TOULON Pierre	Hématologie et Transfusion (47.01)

PROFESSEURS ASSOCIÉS

M.	HOFLIGER Philippe	Médecine Générale
Mme	POURRAT Isabelle	Médecine Générale
M.	PRENTKI Marc	Biochimie et Biologie Moléculaire

MAITRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS

Mme	CHATTI Kaouthar	Biophysique et Médecine Nucléaire
M.	DARMON David	Médecine Générale
M.	GARDON Gilles	Médecine Générale
Mme	MONNIER Brigitte	Médecine Générale
M.	PAPA Michel	Médecine Générale

PROFESSEURS CONVENTIONNÉS DE L'UNIVERSITÉ

M.	BERTRAND François	Médecine Interne
M.	BROCKER Patrice	Médecine Interne Option Gériatrie
M.	CHEVALLIER Daniel	Urologie
Mme	FOURNIER-MEHOUAS Manuella	Médecine Physique et Réadaptation
M.	QUARANTA Jean-François	Santé Publique

À Monsieur le Professeur Jean-Gabriel Fuzibet,

Monsieur et Cher Maître,

Merci de me faire l'honneur de présider ce jury.

Je tiens particulièrement à vous remercier pour le soutien indéfectible que vous m'avez apporté tout au long de mon internat. Vous avez toujours été disponible à mon égard et j'ai trouvé en vous les encouragements et les conseils dont j'avais besoin. Vous m'avez transmis durant toutes ces années votre savoir et votre passion pour la Médecine Interne, et m'avez permis de découvrir et de me passionner pour cette belle spécialité. Je vous remercie d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir guidée pas à pas et soutenue de manière inconditionnelle dans mes choix et mes projets. Je vous en suis infiniment reconnaissante.

À Monsieur le Professeur Eric Rosenthal,

Monsieur et Cher Maître,

Merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je souhaite sincèrement vous remercier pour m'avoir accompagnée et soutenue durant toutes mes années d'internat. Vous m'avez transmis avec enthousiasme votre expérience et votre passion pour la Médecine Interne. Merci pour la disponibilité dont vous avez fait toujours preuve à mon égard, mais aussi pour votre appui tout au long de mon parcours. Merci surtout de votre grande implication et votre soutien sans faille dans l'organisation de mon séjour dans le Zabudowicz Center for Autoimmune Diseases. Cette expérience unique n'aurait pu voir le jour sans vous. Ce travail vous doit énormément et je vous en suis extrêmement reconnaissante.

To Professeur Jean-Gabriel Fuzibet,

Dear Sir and Master,

Thank you to do me the honor to chair this jury.

I especially want to thank you for the continuing support you have given me throughout my internship. You have always been available to me and I found in you the encouragement and guidance I needed. During all these years you transmitted me your knowledge and your passion for Internal Medicine and you allowed me to discover and to be passionate about this great speciality. Thank you for always believing in me, for having guided me step by step and for unconditionally supporting me in my choices and my projects. I am infinitely grateful.

To Professeur Eric Rosenthal,

Dear Sir and Master,

Thank you for agreeing to be part of this jury.

I sincerely want to thank you for having accompanied and supported me in all my years of internship. You transmitted to me with enthusiasm your experience and passion for Internal Medicine. Thank you for the availability you have always shown towards me, but also for your support throughout my career. Thank you especially for your involvement and your continued support in organizing my stay in the Zabłudowicz Center for Autoimmune Diseases. This unique experience could not have happened without you. This work immensely owe to you and I am extremely grateful.

À Monsieur le Professeur Thierry Passeron,

Monsieur et Cher Maître,

Merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Vous êtes de ces rares personnes que j'ai rencontrées et qui m'ont profondément marquées dans mon parcours. J'ai eu la grande chance et l'honneur de pouvoir travailler à vos côtés il y a maintenant quatre ans, et j'ai été marquée et impressionnée par quelqu'un de passionné, curieux de tout en médecine bien au-delà de sa spécialité, conjuguant avec enthousiasme la recherche fondamentale et la médecine clinique. Je vous remercie de m'avoir fait partager cette passion ainsi que d'avoir toujours été disponible pour de précieux conseils. J'espère que dans le futur j'aurai la chance de travailler avec vous sur des projets communs.

À Monsieur le Professeur Yehuda Shoenfeld,

Monsieur et Cher Maître,

Merci d'avoir accepté de diriger cette thèse.

Je vous remercie de l'honneur immense que vous m'avez fait m'accueillant avec tant de chaleur et de gentillesse dans votre Centre. Cela a été pour moi une expérience unique et inoubliable. Je vous remercie de m'avoir fait découvrir avec autant d'enthousiasme votre pays et votre culture que votre passion pour la médecine. Merci d'avoir partagé avec moi votre savoir et votre inépuisable désir d'apprendre. Merci pour vos encouragements qui m'ont portée tout au long de ces six mois et des opportunités que vous m'avez offertes. Pour tout cela je vous remercie du fond du cœur, et j'espère que nous travaillerons encore de nombreuses années ensemble.

To Professeur Thierry Passeron,

Dear Sir and Master,

Thank you for agreeing to be part of this jury.

You are one of those few people I have met who have deeply influenced me in my career. I had the great opportunity and honor to work with you there four years ago, and I was marked and impressed by someone passionate, curious about everything in medicine well beyond its specialty, combining enthusiastically basic research with clinical medicine. I want to thank you for sharing this passion with me and for always being available for advice. I hope that in the future I will have the chance to work with you on joint projects.

To Professeur Yehuda Shoenfeld,

Dear Sir and Master,

Thank you for agreeing to direct this thesis.

I want to thank you for the great honor you did to me in welcoming me with such warmth and kindness in your Center. This was for me a unique and unforgettable experience. Thank you for making me discover as enthusiastically your country and your culture that your passion for medicine. Thank you for sharing with me your knowledge and inexhaustible desire to learn. Thank you for your encouragement that carried me throughout these six months and the opportunities you have provided me. For that I thank you from my heart, and I hope we still work together for many years.

À Madame le Professeur Miri Blank,

Je souhaite vous remercier très chaleureusement pour m'avoir donné la chance et l'opportunité de rejoindre et de participer à ce projet expérimental passionnant. Vous êtes une personne exceptionnelle que je n'oublierai pas. Je vous remercie de la grande patience et de la disponibilité dont vous avez toujours fait preuve pour partager tout votre savoir, et prendre le temps de discuter avec passion autant de la science que des feuilles d'automne. J'ai été touchée par votre immense gentillesse et toutes vos attentions dans ce quotidien de dur labeur. Aucun bureau ne sera jamais aussi bien que celui que j'ai eu le bonheur d'avoir pendant six mois en face du votre.

To Professeur Miri Blank,

I wish to thank you most warmly for giving me the chance and the opportunity to join and participate in this exciting experimental project. You are an exceptional person that I will not forget. Thank you for the great patience and availability you have always been to share all your knowledge and take the time to talk with passion, as much science as autumn leaves. I was touched by your immense kindness and all your attention in this daily hard work. No office will never be as well as the one I have had the happiness to get six months in front of yours.

À Pierre-Yves,

Mon amour, sans toi je ne serai pas celle que je suis aujourd'hui. Je te dois tout et plus encore. Tu as toujours été là pour moi, tu as toujours cru en moi. Tu m'as donné la force et l'énergie d'avancer dans chaque épreuve, et tu as traversé avec moi les plus beaux comme les plus durs moments. J'admire infiniment l'homme que j'ai découvert, le médecin exceptionnel que tu es, ta passion pour la médecine que tu m'as transmise et que nous partageons jour après jour. Tu m'as communiqué cette curiosité sans cesse attisée, ce plaisir d'apprendre et de découvrir, cet amour de la science et de la clinique qui te caractérisent et qui m'ont toujours impressionnée en toi. Tu es toute ma vie. Je t'aime.

À mes parents,

Sans vous rien de tout cela n'aurait été possible. Je n'ai pas de mots suffisamment forts pour remercier de tout ce que vous m'avez donné. Vous m'avez portée avec force et amour tout au long de ma vie et de mes études, m'avez soutenue et accompagnée dans chacun de mes choix sans jamais douter en me donnant toujours toute votre confiance. Vous avez su être là à chaque instant pour m'aider à avancer dans les moments les plus difficiles, toujours avec un amour infini. Je vous aime plus que tout.

À mes frères,

Vous avez toujours été là pour moi, pour veiller sur moi et m'encourager de tout votre cœur dans tous les moments importants de ma vie. Vous êtes les frères les plus merveilleux dont on puisse rêver, vous êtes une partie de moi, je vous aime.

À toute ma famille,

Merci de votre soutien et d'avoir toujours cru en moi. Merci à mes grand-mères d'avoir toujours été si fières de moi. Je dédie ce travail à mes grands-pères adorés qui nous ont quittés, et seront toujours dans mon cœur.

To Pierre-Yves,

My love, without you I would not be who I am today. I owe you everything and more. You have always been there for me, you always believed in me. You gave me the strength and energy to move forward in every hardship, and you've been through with me the most beautiful as the hardest moments. I greatly admire the man I have discovered, the exceptional doctor that you are, your passion for medicine that you transmitted me and that we share every day. You have given me this curiosity constantly heightened, this love of learning and discovering, love of science and clinical medicine that characterize you and have always impressed me in you. You are all my life. I love you.

To my parents,

Without you none of this would have been possible. I do not have words strong enough to thank you for all that you gave me. You carried me with strength and love throughout my life and my studies, supported me in all my choices and my projects without doubt always giving me all your trust. You were present at every moment to help me move forward even in harder moments, always with infinite love. I love you more than anything.

To my brothers,

You have always been there for me, watch over me and encourage me with all your heart in all the important moments of my life. You are the most wonderful brother anyone could ask for, you're a part of me, I love you.

To all my family,

Thank you for your support and for always believing in me. Thank you to my grandmothers have always been so proud of me. I dedicate this work to my beloved grandfathers who have left us, and will always be in my heart.

À Pierre et Josie,

Vous m'avez ouvert les bras et accueillie comme votre fille. Merci de tout l'amour et toute la tendresse que vous me donnez, merci de votre soutien et d'être présents dans les tous les instants importants de notre vie. Vous êtes une seconde famille pour moi. Je vous remercie de tout mon cœur.

À mes amis,

Laure, merci d'être un rayon de soleil et de toujours me faire rire et me soutenir lorsque j'en ai besoin.

Maria, Giorgia, Gali, Dana, Nina, Tomer, Zipi, Sara, Boris, Smada, Nancy Pnina, Itzik, et tous les autres, merci d'avoir partagé tous les beaux moments de cette expérience israélienne. Merci d'avoir été là pour moi lorsque j'en avais besoin. J'espère que la vie nous réunira à nouveau.

Maria, tu es une fille extraordinaire de courage et de volonté. Merci de ton immense gentillesse et ta générosité, et d'avoir été là à chaque instant. J'espère qu'un jour tu viendra chez moi te remémorer le français !

Giorgia, merci pour ta bonne humeur, ta joie de vivre pendant ces quelques mois que j'ai eu la chance de partager en coloc avec toi.

Tomer, ton sourire et ta gentillesse infinie ont éclairé nos dures journées !

Dana, malgré le peu de fois où tu as réussi à me sortir le nez de mes papiers, j'ai été heureuse d'avoir la chance de rencontrer une personne aussi gentille et généreuse, et j'espère de tout mon cœur que nos chemins se croiseront à nouveau.

Nadia, Caroline, Flo, Mag, Jo, et pardon pour tous ceux que je vais oublier de citer. Merci pour tous les beaux moments partagés pendant toutes nos années d'études, des rires au larmes, merci pour vos encouragements et votre écoute.

Domi, Isabelle, merci de tout mon cœur pour votre douceur et votre gentillesse.

To Pierre and Josie,

You have welcomed me as your daughter. Thank you for all the love and tenderness you give me thank you for your support and be present in all the important moment of our lifes. You are a second family to me. Thank you with all my heart.

To my friends,

Laure, thank you for being a ray of sunshine and always make me laugh and support me when I need it.

Maria Giorgia, Gali, Dana, Nina, Tomer, Zipi, Sara, Boris, Smada, Nancy, Pnina, Itzik, and all the other, thank you for sharing all the beautiful moments of this Israeli experience. Thank you for being there for me when I needed it. I hope that life will bring us together again.

Maria, you're a wonderful girl full of courage and will. Thank you for your great kindness and generosity, and for being there every moment. I hope someday you will come to my home to remember the French!

Giorgia, thank you for your good mood, your joy of living during those few months I've had the chance to share in roommate with you. Tomer, your smile and your infinite kindness have illuminated our hard days!

Dana, despite the short time that you managed to get me out of my papers, I was happy to have the chance to meet someone as kind and generous, and I hope with all my heart that our ways will cross again.

Nadia, Caroline, Flo, Mag, Jo, and forgiveness for everyone I'm forgetting to mention. Thank you for all the beautiful moments shared during all our years of study, laughter to tears, thank you for your encouragement and listening.

Domi, Isabelle, thank you with all my heart for your gentleness and kindness.

À toutes les personnes du Zabłudowicz Center for Autoimmune Diseases,

Merci à toute les belles personnes que j'ai eu la chance de rencontrer et qui ont fait de ces six mois une expérience inoubliable.

Aux médecins du CHU de Nice,

A tous ceux qui m'ont marquée au cours de ces années de formation, qui m'ont transmis avec passion leur savoir, et qui ont contribué à faire de moi le médecin que je suis aujourd'hui.

Au Pr Lacour, Pr Breuil, Pr Mounier, Dr Marcq, Dr Castela, Dr Rossignol, Dr Quinsat, Dr Albert, Dr Flory, Dr Danin, Dr Cua, Dr Bernard, Dr Giacchero, Dr Hyvernats, Dr Vinti, Dr Karsenti, Dr Mannone, et pardon à ceux que j'oublie...

***Aux membres de l'Association des Amis de la Faculté de Médecine de Nice,
A l'Association France-Israël,***

Merci pour votre soutien sans lequel je n'aurais pas pu réaliser cette extraordinaire expérience en Israël.

To everyone in the Zabudowicz Center for Autoimmune Diseases,

Thanks to all the beautiful people I have had the chance to meet and made these six months an unforgettable experience.

To physicians from University Hospital of Nice,

To all those who have influenced me during those formative years, who transmitted me their knowledge with passion, and who contributed to make me the doctor I am today.

Pr Lacour, Pr Breuil, Pr Mounier, Dr Marcq, Dr Castela, Dr Rossignol, Dr Quinsat, Dr Albert, Dr Flory, Dr Danin, Dr Cua, Dr Bernard, Dr Giaccherio Dr. Hyvernat Dr. Vinti, Dr Karsenti, Dr Mannone,...and forgiveness to those I forget.

To members of the Association of Friends of the Faculty of Medicine of Nice,

To the France-Israel Association,

Thank you for your support without which I would not have made this extraordinary experience in Israel.

TABLE DES MATIÈRES

ABRÉVIATIONS	17
RÉSUMÉ	19
I – INTRODUCTION	20
1. Naissance de l’Hypothèse de l’Hygiène	20
1.1 – L’épidémie des maladies inflammatoires chroniques dans le monde occidental	20
1.2 – Rôle des facteurs environnementaux.....	21
1.3 – Infections et autoimmunité	21
1.4 – Naissance d’un concept	22
1.5 – Données épidémiologiques	23
2. Physiopathologie de l’Hypothèse de l’Hygiène.....	27
2.1 – Qui sont les acteurs de l’Hypothèse de l’Hygiène ?	27
2.2 – Évolution de notre environnement microbien dans le monde occidental	29
2.3 – Mécanismes d’immunomodulation par des agents infectieux : à propos des helminthes	31
2.3.1 – Les lymphocytes T.....	32
2.3.2 – Les cellules dendritiques.....	34
2.3.3 – Les lymphocytes B-régulateurs	36
2.3.4 – Les cellules immunitaires innées	37
2.3.5 – La régulation du microbiote intestinal.....	39

TABLE OF CONTENTS

ABBREVIATIONS	17
ABSTRACT	19
I – INTRODUCTION	20
1. Birth of the Hygiene Hypothesis	20
1.1 – The epidemic of chronic inflammatory diseases in the Western world	20
1.2 – Role of environmental factors.....	21
1.3 – Infections and autoimmunity	21
1.4 – Emergence of a concept	22
1.5 – Epidemiological data	23
2. Pathophysiology of the Hygiene Hypothesis	27
2.1 – Who are the actors in the Hygiene Hypothesis ?	27
2.2 – Evolution of our microbial environment in the Western world	29
2.3 – Mechanisms of immunomodulation by infectious agents : about helminthes	31
2.3.1 – <i>T-lymphocytes</i>	32
2.3.2 – <i>Dendritic cells</i>	34
2.3.3 – <i>B-regulatory cells</i>	36
2.3.4 – <i>Innate immune cells</i>	37
2.3.5 – <i>Regulation of intestinal microbiota</i>	39

3. ‘Preuve de concept’ de l’Hypothèse de l’Hygiène – Les thérapies dérivées des helminthes	41
3.1 – Les maladies inflammatoires chroniques de l’intestin (MICI)	42
3.2 – La sclérose en plaques (SEP).....	44
3.3 – La polyarthrite rhumatoïde (PR).....	47
3.4 – Le diabète de type-1 (DT1).....	49
3.5 – Autres maladies autoimmunes	51
4. Le lupus érythémateux disséminé.....	52
4.1 – Un challenge thérapeutique	52
4.2 – Lupus et infections parasitaires	53
5. Le composé Tuftsin-Phosphorylcholine (TPC)	55
5.1 – La phosphorylcholine (PC).....	55
5.2 – La Tuftsin (T)	57
 II – MATÉRIELS et MÉTHODES	 59
1. Souris et design de l’expérience	59
2. Mesure de la protéinurie	59
3. Analyse histologique des reins	60
4. Mesure des taux sériques d’anticorps anti-ADNdb	60
5. PCR quantitative en temps réel	61
6. Production de cytokines par les splénocytes	61
7. Analyse des lymphocytes T-régulateurs par cytométrie en flux	62
8. Analyse statistique.....	62

3. ‘Proof of concept’ of the Hygiene Hypothesis – Helminth-derived therapies	41
3.1 – Inflammatory bowel disease (IBD)	42
3.2 – Multiple sclerosis (MS)	44
3.3 – Rheumatoid arthritis (RA)	47
3.4 – Type-1 diabetes (T1D)	49
3.5 – Other autoimmune diseases	51
4. Systemic lupus erythematosus	52
4.1 – A therapeutic challenge	52
4.2 – Lupus and parasitic infections	53
5. Tuftsin-Phosphorylcholine compound (TPC)	55
5.1 – Phosphorylcholine (PC)	55
5.2 – Tuftsin (T)	57
 II – MATERIALS and METHODS	 59
1. Mice and experimental design	59
2. Measurement of proteinuria	59
3. Kidneys histological analysis	60
4. Measurement of serum anti-dsDNA antibodies	60
5. Quantitative real-time PCR	61
6. Cytokines production by splenocytes	61
7. T-regulatory lymphocytes analysis by flow cytometry	62
8. Statistical analysis	62

III – RÉSULTATS	63
1. Atténuation significative de la néphrite lupique chez la souris NZBxW/F1 traitée par TPC	63
2. Le TPC atténue la glomérulonéphrite lupique en modulant le profil cytokinique	67
3. Effets du TPC sur les lymphocytes T-régulateurs	71
4. Taux circulants d'anticorps anti-ADNdb	73
5. Le TPC prolonge la durée de vie des souris lupiques	74
III – DISCUSSION	75
IV – CONCLUSION	89
RÉFÉRENCES	91
ANNEXES	117
ANNEXE-1 – Table 1	118
ANNEXE-2 – Classification 2003 de l'International Society of Nephrology/Renal pathology Society (ISN/RPS) des glomérulonéphrites lupiques	120
ANNEXE-3 – Article Soumis	122
SERMENT d'HIPPOCRATE	148

III – RESULTS	63
1. Significant attenuation of lupus nephritis in TPC-treated NZBxW/F1 mice	63
2. TPC attenuates lupus glomerulonephritis by modulating cytokine profile	67
3. Effects of TPC on T-regulatory cells	71
4. Titers of circulating anti-dsDNA antibodies	73
5. TPC prolongs survival time in lupus mice	74
III – DISCUSSION	75
IV – CONCLUSION	89
REFERENCES	91
ANNEXES	117
ANNEXE-1 – Table 1	118
ANNEXE-2 – International Society of Nephrology/Renal pathology Society (ISN/RPS) 2003 classification of lupus nephritis	120
ANNEXE-3 – Article Soumis	122
HIPPOCRATE OATH	148

TABLES et FIGURES

INTRODUCTION

Figure A : Effets immunorégulateurs des helminthes sur le système immunitaire	40
--	----

RÉSULTATS

Figure 1a : Effets du TPC sur le développement de la glomérulonéphrite chez la souris lupique NZBxW/F1. Protéinurie.....	64
Figure 1b : Effets du TPC sur le développement de la glomérulonéphrite chez la souris lupique NZBxW/F1. Analyse histologique	66
Figure 2a : Mesure par RT-PCR de l'expression des cytokines	68
Figure 2b : Mesure par ELISA des niveaux de sécrétion des cytokines.....	70
Figure 3a : Etude des lymphocytes T-régulateurs en cytométrie en flux	72
Figure 3b : Pourcentage de lymphocytes T-régulateurs dans chaque groupe de souris.....	72
Figure 4 : Taux circulants d'anticorps anti-ADNdb	73
Figure 5 : Survie des souris lupiques au cours du temps.....	74

ANNEXE-1

Table 1 : Etudes expérimentales et cliniques des thérapies dérivées d'helminthes dans les maladies auto-immunes.....	118
---	-----

TABLES and FIGURES

INTRODUCTION

Figure A : Immunoregulatory effects of helminthes on the immune system.	40
---	----

RESULTS

Figure 1a : TPC effects on glomerulonephritis development in NZBxW/F1 lupus prone mice. Proteinuria.	64
Figure 1b : TPC effects on glomerulonephritis development in NZBxW/F1 lupus prone mice. Histological analysis.	66
Figure 2a : Analysis by RT-PCR of cytokines expression	68
Figure 2b : Analysis by ELISA of cytokines secretory levels	70
Figure 3a : Analysis of T-regulatory cells by flow cytometry.....	72
Figure 3b : Percentage of T-regulatory cells in each group of mice	72
Figure 4 : Titers of circulating anti-dsDNA antibodies	73
Figure 5 : Survival of lupus prone mice over time	74

ANNEXE-1

Table 1 : Experimental and clinical studies of helminth-derived therapies in autoimmune diseases.....	118
--	-----

ABRÉVIATIONS

ADNdb : ADN double brin
 AIC: Arthrite Induite au Collagène
 Breg: Lymphocytes B-régulateurs
 BSA : Bovine Serum Albumin
 CD: Cellules Dendritiques
 CDAI: Crohn's Disease Activity Index
 CI : Complexes Immuns
 CLI: Cellules Lymphoïdes Innées
 CLR: C-type Lectin Receptors
 DT1 : Diabète de Type-1
 DNBS: Dinitrobenzene Sulphonic acid
 DSS: Dextran-Sodium-Sulfate
 EAE: Encéphalite Autoimmune Expérimentale
 ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
 ES: Excrétion-Sécrétion (produits d')

FACS : Fluorescence Activated Cell Sorted
 FOXP3 : Forkhead Box P3
 HH : Hypothèse de l'Hygiène
 IFN: Interféron
 IL: Interleukine
 iNOS: Oxyde Nitrique Synthase inductible
 IRM: Imagerie par Résonance Magnétique
 LED : Lupus Erythémateux Disséminé
 LB : Lymphocytes B
 LT : Lymphocytes T
 MAI : Maladie Auto-Immune
 MC : Maladie de Crohn
 MICI : Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin
 NKT cells: Cellules T Natural Killer
 NOD: Non-Obese Diabetic
 NZBxW/F1: (New Zealand Black x New Zealand White) F1
 PAS : Periodic Acid Schiff

ABBREVIATIONS

Breg cells: B-regulatory cells
BSA : Bovine Serum Albumin
CD: Crohn's Disease
CDAI: Crohn's Disease Activity Index
CIA: Collagen-Induced Arthritis
CLR: C-type Lectin Receptors
CNS: Central Nervous System
DC: Dendritic Cells
DNBS: Dinitrobenzene Sulphonic acid
dsDNA: double-stranded DNA
DSS: Dextran-Sodium-Sulfate
EAE: Experimental Autoimmune Encephalitis
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ES: Excretory-Secretory
FACS : Fluorescence Activated Cell Sorted
FOXP3 : Forkhead Box P3
HH: Hygiene Hypothesis
IBD: Inflammatory Bowel Disease
IC: Immune Complex
IFN: Interferon
IL: Interleukin
ILC: Innate Lymphoid Cells
iNOS: inducible Nitric Oxide Synthase
MRI: Magnetic Resonance Imaging
MS: Multiple Sclerosis
NKT cells: Natural Killer T-cells
NOD: Non-Obese Diabetic
NZBxW/F1: (New Zealand Black x New Zealand White) F1
PAS : Periodic Acid Schiff
PBS : Phosphate Buffered Saline
PC: Phosphorylcholine
PPR: Pattern Recognition Receptors

PBS : Phosphate Buffered Saline
PC: Phosphorylcholine
PNN : Polynucléaires Neutrophiles
PPR: Pattern Recognition Receptors
PR : Polyarthrite Rhumatoïde
RCH : Rectocolite Hémorragique
SLE: Systemic Lupus Erythematosus
RT-PCR : Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SEP : Sclérose En Plaques
SEA: Soluble Egg Antigen
SNC : Système Nerveux Central
T : Tuftsin
TGF: Transforming Growth Factor
Th: Lymphocytes T-helper
TNBS: Trinitrobenzene Sulphonic acid
TNF: Tumor Necrosis Factor
TLR: Toll-Like Receptor
TPC : Tuftsin-Phosphorylcholine
Treg: Lymphocytes T-régulateurs
TSHR: Thyroid Stimulating Hormone Receptor
TSO: *Trichuris suis* ova
UCDAI: Ulcerative Colitis Disease Activity Index

RA: Rheumatoid Arthritis
RRMS: Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis
RT-PCR : Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SEA: Soluble Egg Antigen
T: Tuftsin
T1D: Type-1 Diabetes
TGF: Transforming Growth Factor
Th cells: T-helper cells
TNBS: Trinitrobenzene Sulphonic acid
TNF: Tumor Necrosis Factor
TLR: Toll-Like Receptor
TPC : Tuftsin-Phosphorylcholine
Treg cells: T-regulatory cells
TSHR: Thyroid Stimulating Hormone Receptor
TSO: *Trichuris suis* ova
UC: Ulcerative Colitis
UCDAI: Ulcerative Colitis Disease Activity Index
US: United States

RÉSUMÉ

Contexte: Dans les zones où les helminthiases sont communes, les maladies auto-immunes sont rares. Cette observation a donné lieu à l'Hypothèse de l'Hygiène, affirmant que certains agents infectieux incluant les helminthes exercent des effets immunomodulateurs protecteurs. L'utilisation de traitements dérivés des helminthes a permis une amélioration clinique et immunologique dans des modèles expérimentaux et des études cliniques de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, de sclérose en plaques, de polyarthrite rhumatoïde et de diabète de type-1. La phosphorylcholine (PC) est l'un des produits d'helminthes à l'origine de leurs propriétés tolérogènes. Nous avons étudié le potentiel thérapeutique du composé tuftsin-PC (TPC) dans un modèle expérimental murin de lupus.

Méthodes: Les souris prédisposées au lupus NZBxW/F1 ont reçu par voie sous-cutanée le TPC (5µg/1ml) trois fois par semaine à partir de l'âge de 14 semaines. Les auto-anticorps ont été testés par ELISA, les lymphocytes T-régulateurs par FACS, les cytokines par RT-PCR et par ELISA DuoSet. La glomérulonéphrite a été évaluée par la présence d'une protéinurie, par étude histologique des reins avec coloration PAS, et par la recherche de dépôts d'immunoglobulines dans le mésangium par immunofluorescence.

Résultats: Le TPC a atténué le développement de la glomérulonéphrite chez les souris lupiques, comme en témoigne la diminution de la protéinurie, la réduction des lésions histologiques rénales et des dépôts d'immunoglobulines dans le mésangium. Par ailleurs, le TPC a permis d'augmenter la sécrétion de TGF-β et d'IL-10 et d'inhiber la production d'IFN-γ et d'IL-17. Une amélioration significative des taux de lymphocytes T-régulateurs CD4+CD25+FOXP3+ a été documentée.

Conclusion: Le TPC a montré son efficacité en freinant le développement du lupus dans un modèle expérimental murin. Cet effet est lié à une modulation de la réponse immune conduisant à une baisse des cytokines pro-inflammatoires et à une hausse des cytokines anti-inflammatoires ainsi que des lymphocytes T-régulateurs. Nos résultats proposent une nouvelle forme d'immunothérapie pour les patients lupiques.

ABSTRACT

Background: In areas where helminthic infections are common, autoimmune diseases are rare. This observation gave rise to the so called Hygiene Hypothesis, claiming that some infectious agent including helminthes exhibit immunoregulatory protective effects. Treatment with helminthes derivatives improved clinical and immunological findings of inflammatory bowel disease, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis and type-1 diabetes both in human and animal models. Phosphorylcholine (PC) is one of the helminth products responsible for their tolerogenic properties. We aimed to investigate the therapeutic potential of tuftsin-PC (TPC) compound in an experimental mouse model of lupus.

Methods: NZBxW/F1 lupus prone mice received subcutaneously TPC (5µg/1ml) three times a week starting at 14 weeks age. Autoantibodies were tested by ELISA, T-regulatory-cells by FACS, cytokines by RT-PCR and by ELISA duoset. Glomerulonephritis was addressed by the presence of proteinuria, histological analysis of kidneys with PAS staining and search for immunoglobulin deposition in the mesangium by immunofluorescence.

Results: TPC attenuated the development of glomerulonephritis in lupus prone mice, as demonstrated by decreased proteinuria, reduced renal histological lesions and immunoglobulin deposition in the mesangium. TPC enhanced the secretion of TGF-β and IL-10 and inhibited IFN-γ and IL-17 production. Significant enhancement of CD4+CD25+FOXP3+ T-regulatory cells rates was documented.

Conclusion: TPC hampered lupus development in lupus prone mice. This effect is related to an immune response modulation with decreased pro-inflammatory cytokines and higher anti-inflammatory cytokines as well as T-regulatory cells levels. Our results propose a new form of immunotherapy for lupus patients.

I – INTRODUCTION

1. Naissance de l'Hypothèse de l'Hygiène

1.1 – L'épidémie des maladies inflammatoires chroniques dans le monde occidental

Depuis plusieurs décennies, les pays occidentaux sont confrontés à une incidence croissante des maladies auto-immunes (MAI) et allergiques (1–6). Ainsi aux États-Unis, la prévalence de l'asthme chez les enfants a augmenté de 38% entre 1980 et 2003. De même, cette hausse a atteint respectivement 56% et 59% chez les enfants écossais et australiens entre 1964 et 1990 (1). En ce qui concerne les MAI, l'incidence des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) s'est majorée au cours des 50 dernières années atteignant 8-14/100 000 personnes pour la rectocolite hémorragique (RCH) et 6-15/100 000 personnes pour la maladie de Crohn (MC) (4). De même, l'augmentation annuelle de l'incidence du diabète de type-1 (DT1) variait de 2,9% à 5,4% par an selon les pays au cours de la période 1989-2003 (3). En outre, le nombre de personnes vivant avec la sclérose en plaques (SEP) dans le monde a grimpé de 2,1 millions en 2008 à 2,3 millions en 2013 (6). Ces quelques exemples illustrent le problème majeur de santé publique posé aujourd'hui par ce qui est désormais considéré comme une épidémie de maladies inflammatoires chroniques dans les pays industrialisés.

I – INTRODUCTION

1. Birth of the Hygiene Hypothesis

1.1 – The epidemic of chronic inflammatory diseases in the Western world

For several decades, Western countries are facing an increasing incidence of allergic and autoimmune disorders (1–6). Thus in United States (US), the prevalence of asthma in children has increased by 38% between 1980 and 2003. Similarly, this rise has reached 56% and 59% between 1964 and 1990 in Scottish and Australian children respectively (1). Regarding autoimmune diseases, the incidence of inflammatory bowel disease (IBD) has risen in the past 50 years up to 8-14/100,000 persons for ulcerative colitis (UC) and 6-15/100,000 persons for Crohn's disease (CD) (4). Likewise, the annual increase of type-1 diabetes (T1D) ranged from 2.9% to 5.4% per year according to the countries during the 1989-2003 period (3). Also, the number of people living with multiple sclerosis (MS) worldwide has climbed from 2.1 millions in 2008 to 2.3 millions in 2013 (6). Quoted here are only few examples illustrating the major public health problem posed nowadays by this epidemic.

1.2 – Rôle des facteurs environnementaux

Les maladies immuno-médiées sont considérées comme étant le résultat d'une interaction complexe entre un terrain génétique prédisposant, une dérégulation du système immunitaire et l'action de facteurs environnementaux (7,8). Étant donné que la base génétique n'a pas subi de changements majeurs en quelques décennies, les facteurs environnementaux sont fortement soupçonnés d'être responsables de la hausse récente observée. En particulier, la carence en vitamine D (9), le tabac (10), la pollution de l'air (11), les adjuvants (12) et l'obésité (13) ont été incriminés dans la pathogenèse et la hausse récente de prévalence des MAI. Par ailleurs, les infections ont également largement été démontrées comme jouant un rôle crucial dans la survenue de l'auto-immunité (14).

1.3 – Infections et auto-immunité

La capacité des agents infectieux à moduler le système immunitaire est depuis longtemps une énigme fascinante. Pendant près d'un demi-siècle, les infections ont été reconnues comme des facteurs déclenchant des phénomènes auto-immuns. Les agents viraux tels que le virus d'Epstein-Barr (EBV), le cytomégalovirus (CMV) et le parvovirus B19, ainsi que de nombreuses bactéries et parasites ont été associés à la présence d'une grande variété d'auto-anticorps circulants et contribuent à la pathogenèse des MAI (14,15). Ainsi, les infections parasitaires peuvent promouvoir l'auto-immunité par divers mécanismes, tels que le mimétisme moléculaire d'épitopes parasitaires, la modification des antigènes de l'hôte, l'activation et l'expansion de clones lymphocytaires B auto-réactifs, ainsi que la manipulation du réseau idiotypique (16).

1.2 – Role of environmental factors

Immune-mediated conditions are thought to result from a complex interplay between genetic predisposition, immune dysregulation and environmental factors (7,8). Since genetic basis has not undergone any major changes in few decades, environmental factors are highly suspected to be responsible for this recent outbreak. Especially, vitamin D deficiency (9), tobacco (10), air pollution (11), adjuvants (12), and obesity (13) have been incriminated in the pathogenesis and the recent rise in chronic inflammatory disorders. Together with these factors, infections are widely demonstrated to play a critical role in autoimmunity (14).

1.3 – Infections and autoimmunity

The ability of infectious agents to modulate the immune system has long been a fascinating enigma. For almost half a century, infections have been widely demonstrated to act as triggering factors of autoimmune response. Viral agents such as Epstein-Barr virus (EBV), cytomegalovirus (CMV) and parvovirus B19, as well as numerous bacteria and parasites have been associated with the presence of a wide variety of autoantibodies and found to contribute to the pathogenesis of autoimmune diseases (14,15). Thus parasitic infections have been shown to promote autoimmunity by various mechanisms including molecular mimicry of parasitic epitopes, alteration of host antigens, polyclonal activation and expansion of autoreactive B-cell clones, as well as manipulation of the idiotypic network (16).

Dans le même temps, il est devenu de plus en plus évident que les micro-organismes infectieux peuvent exercer un effet immunomodulateur et immunosuppresseur sur le système immunitaire, protégeant ainsi l'hôte contre la survenue de maladies à médiation immunitaire, en particulier les allergies et les MAI. Les changements qui ont accompagné la récente modernisation dans les pays occidentaux, tels que la migration des zones rurales vers les zones urbaines, l'amélioration des conditions sanitaires, l'accès à l'eau potable, le contrôle de la production alimentaire, ou encore les campagnes de vaccination, ont réduit les contacts avec certains micro-organismes ancestraux avec lesquels les mammifères ont coexisté et co-évolué depuis des millénaires (17).

1.4 – Naissance d'un concept

De là est né le concept de l'Hypothèse de l'Hygiène (HH): il postule que la moindre exposition à ces agents infectieux immunorégulateurs - appelés "Vieux Amis" par Rook (18) - dans les pays industrialisés en raison de l'amélioration des conditions sanitaires aurait augmenté la réactivité immunitaire et ainsi favorisé le développement de troubles inflammatoires chroniques, contribuant à leur hausse récente (19).

Cette théorie a été initialement suggérée par Greenwood (20) il y a près d'un demi-siècle lorsque celui-ci rapportait une plus faible prévalence des MAI dans la population Nigériane. En conséquence, il suggéra un effet immunomodulateur de multiples infections parasitaires depuis l'enfance. Il confirma plus tard ses observations en démontrant que l'infection de différentes souches de souris prédisposées à développer des MAI avec le parasite du paludisme du rongeur *Plasmodium berghei* empêchait l'apparition de la maladie (21). La corrélation inverse qui existe entre la diminution spectaculaire des infections dans les pays industrialisés liée à une meilleure hygiène, et l'augmentation concomitante des maladies à médiation immunitaire, a finalement été clarifiée par Strachan en 1989 (22).

At the same time, it became increasingly evident that infectious microorganisms could also exert an immunomodulatory and immunodepressant action on the immune system, resulting in a protective effect for the host against immune-mediated conditions such as allergies and autoimmune diseases. The changes that have accompanied the recent modernization in Western countries, such as migration from rural to urban areas, improved sanitation, access to clean water, control of food production, or even vaccination campaigns have reduced contacts with these ancestral microorganisms with which mammals coexisted and co-evolved for millennia (17).

1.4 – Emergence of a concept

Hence the Hygiene Hypothesis (HH) concept emerged: it postulates that the reduced exposure to these immunoregulatory infectious agents - called “Old Friends” by Rook (18) - in industrialized countries due to improvement in sanitary conditions would increase immune reactivity and thus promote the development of chronic inflammatory disorders, contributing to their recent rise (19).

This theory was first suggested by Greenwood (20) nearly half a century ago when reporting a lower prevalence of autoimmune diseases in Nigerians. Therefore, he suggested an immunomodulatory effect of multiple parasitic infections since childhood. He later confirmed his observations by demonstrating that infection of different strains of mice prone to develop autoimmune diseases with the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei* prevented the occurrence of the disease (21). The inverse correlation between the dramatic decrease in infections in industrialized countries related to better hygiene, and the concomitant increase in immune-mediated diseases, was finally clarified by Strachan in 1989 (22).

En effet, en suivant pendant 23 ans une cohorte de plus de 17 000 enfants nés en 1958, il observa une relation inverse entre le nombre de frères et sœurs plus âgés dans un foyer et la prévalence de la rhinite allergique, concluant que les infections au cours de l'enfance pourraient prévenir la survenue ultérieure d'allergies. Selon Strachan, une exposition réduite à ces infections de l'enfance pourrait donc favoriser les maladies atopiques. Ces observations ont conduit à la naissance d'un nouveau paradigme sur le rôle des agents infectieux dans les troubles immunitaires. Depuis lors, l'HH a été largement alimentée par des données épidémiologiques, expérimentales et cliniques.

1.5 – Données épidémiologiques

L'HH telle que formulée par Strachan il y a un quart de siècle (22) était à l'origine restreinte aux troubles allergiques. Il affirmait que leur hausse récente dans les pays occidentaux était favorisée par une moindre exposition aux micro-organismes suite à l'amélioration des conditions d'hygiène. Depuis ces premières observations, de nombreuses données épidémiologiques ont permis de renforcer cette théorie, tout d'abord sur les allergies puis s'étendant aux MAI.

Concernant les allergies, de nombreuses études ont analysé leur prévalence en fonction des conditions de vie. L'observation initiale de Strachan (22) démontrant une corrélation inverse entre la taille de la fratrie et le risque ultérieur d'allergies a depuis été reproduite dans de multiples études menées dans les pays développés (23–26). En outre, Strachan *et al* (27) ont récemment confirmé dans une large étude internationale incluant plus de 500 000 enfants dans 52 pays, l'association inverse qui existe entre le risque de développer une rhinite allergique ou de l'eczéma et le nombre total de frères et sœurs au sein d'un foyer, cette association étant plus forte dans les pays les plus riches.

Indeed, by following for 23 years a cohort of more than 17,000 children born in 1958, he observed an inverse relationship between the number of older siblings in the household and the prevalence of hay fever, therefore concluding that allergies could be prevented by infections in early childhood. According to Strachan, a lower exposure to these infections might promote atopic diseases. These observations have led to the birth of a new paradigm on the role of infectious agents in immune disorders. Since then, the HH has been widely powered by epidemiological, experimental and clinical data.

1.5 – Epidemiological data

The HH as formulated by Strachan a quarter century ago (22) originally focused on allergic diseases. It claimed that their recent rise in Western countries was promoted by reduced exposure to microorganisms due to improved hygiene conditions. Since these early observations, many epidemiological data have been reinforcing this theory, first on allergic disorders and then extending to autoimmune diseases.

Regarding allergic diseases, a number of studies have investigated their prevalence according to living conditions. First, the initial observation of Strachan (22) demonstrating an inverse correlation between the sibship size and the subsequent risk of allergy has since been widely replicated in a large number of studies in affluent countries (23–26). Moreover, Strachan *et al* (27) recently confirmed in a broad international study involving more than 500,000 children in 52 countries the inverse association between the risk of developing hay fever or eczema and the total number of siblings, this association being stronger in more affluent countries.

Par ailleurs, la présence d'animaux domestiques dans le foyer a également été liée à une diminution de la prévalence des allergies. En effet, dans une récente méta-analyse regroupant 36 publications, Pelucchi *et al* (28) ont rapporté un effet favorable de l'exposition aux animaux, en particulier aux chiens, sur le risque de dermatite atopique chez les nourrissons et les enfants. De même, les moins bonnes conditions de vie en Allemagne de l'Est qu'en Allemagne de l'Ouest ont été associées à une moindre survenue de maladies atopiques (29). Par la suite, la prévalence de l'atopie a connu une augmentation chez les enfants nés en Allemagne de l'Est après la réunification de l'Allemagne en 1990 (30). D'autres facteurs tels que la faible consommation d'antibiotiques (31,32) et le fait de grandir dans des zones rurales ont également été associés à une prévalence moindre des maladies allergiques (33,34).

Dans les pays en voie de développement, une relation inverse a été observée entre la prévalence des infections parasitaires en particulier des helminthiases, et le risque d'allergies. Par exemple, en Equateur (35), au Gabon (36) et au Brésil (37), les helminthiases ont montré un effet protecteur sur les tests allergologiques de réactivité cutanée. Inversement, le traitement antihelminthique d'enfants chroniquement infectés au Gabon (36), au Venezuela (38) et au Vietnam (39) entraînait une réactivité accrue aux tests.

L'HH a par la suite été étendue aux MAI (19), l'effet protecteur des agents infectieux, en particulier des parasites, ayant été suggéré dans plusieurs études épidémiologiques. Comme cela avait été observé dans l'allergie, le nombre de frères et sœurs a également été inversement corrélé avec le risque de SEP (40,41).

Otherwise, pet ownership has also been linked with a decreased prevalence of allergic diseases. In a recent meta-analysis including 36 publications, Pelucchi *et al* (28) reported a favorable effect of exposure to pets, especially to dogs, on the risk of atopic dermatitis in infants or children. Similarly, worst living standards in Eastern Germany compared with Western Germany were associated with a reduced occurrence of atopic diseases (29). Thereafter, the prevalence of atopy experienced an increase in Eastern Germany children born after the reunification of Germany in 1990 (30). Equally, other lifestyle factors including low antibiotics consumption (31,32) and to grow up in rural areas were associated with a diminished prevalence of allergic diseases (33,34).

In developing countries, an inverse relationship was also observed between the prevalence of parasitic infections especially helminthiasis, and the risk of allergic diseases. For example, in Ecuador (35), Gabon (36) and Brazil (37), helminth infections were shown to have a protective effect on allergic reactivity. Conversely, anti-helminthic treatment of chronically infected children in Gabon (36), Venezuela (38) and Vietnam (39) resulted in increased atopic reactivity.

The HH was later extended to autoimmune diseases (19) when the protective effect of infectious agents especially parasites against autoimmune diseases was suggested through various epidemiological studies. As previously reported for allergies, the number of siblings has been shown to correlate inversely the risk of MS (40,41).

En outre, en Sardaigne, les données épidémiologiques et immunogénétiques (42–45) relient l'éradication du paludisme il y a 50 ans avec l'augmentation concomitante de la SEP. Il a été suggéré que la forte pression de sélection génétique de la malaria au cours des siècles aurait conduit à la sélection de polymorphismes et de génotypes conférant une résistance au *Plasmodium falciparum*, l'agent causal du paludisme. Ces polymorphismes entraînent une réactivité immunitaire accrue nécessaire pour lutter contre le paludisme. Dès lors que le microorganisme immunorégulateur a été éradiqué, ces variants génétiques ont conduit à une inflammation excessive et sont devenus des facteurs de susceptibilité pour les troubles inflammatoires chroniques, en particulier la SEP.

La région de la Carélie est également d'un grand intérêt pour étudier l'influence du mode de vie et des infections sur le risque de troubles dysimmunitaires. Cette région est divisée en une zone finlandaise, caractérisée par des normes élevées d'hygiène, et une zone russe, ayant une hygiène moindre et un taux élevé d'infections. Tandis que la Carélie finlandaise maintient l'une des plus fortes prévalences de MAI et allergiques, la prévalence en Carélie russe est beaucoup plus faible, bien que le patrimoine génétique soit le même. Par exemple, l'incidence du DT1 est six fois plus élevée dans la zone finlandaise par rapport à la Carélie russe. Le grand écart dans les taux d'infections entre les deux régions est fortement suspecté de contribuer à cette différence (46,47).

Par ailleurs, face à la prévalence croissante des MICI aux États-Unis contrastant avec la baisse concomitante des helminthiases, Weinstock *et al* ont étendu le concept de l'HH aux MICI (48). Cette observation épidémiologique a depuis lors été confirmée dans d'autres parties du monde. Ainsi en Afrique sub-saharienne où l'infestation par des helminthes est fréquente, l'incidence et la prévalence des MICI sont faibles. Cela ne peut pas être expliqué par des facteurs génétiques puisque dans les populations noires des États-Unis et du Royaume-Uni, l'incidence des MICI se rapproche de celle des populations blanches (49).

Furthermore, in the Italian island of Sardinia, several epidemiological and immunogenetic evidences (42–45) link malaria eradication 50 years ago with the concomitant increase of MS. It is assumed that the strong genetic selective pressure of malaria along the centuries have led to the selection of polymorphisms and genotypes conferring resistance to *Plasmodium falciparum*, the causative agent of malaria. These polymorphisms are responsible for increased immune reactivity required to control malaria. As soon as the immunoregulatory organism has been withdrawn of the environment by modern lifestyle, these genetic variants led to excessive inflammation and became susceptibility factors for chronic inflammatory disorders, especially MS.

The Karelia region is also of great interest to investigate the influence of lifestyle and infections on the risk of immune-mediated disorders. This region is divided into a Finnish area, characterized by high standards of hygiene, and a Russian area, with poorer hygiene and an increased rate of infections. Finnish Karelian maintains one of the highest prevalence of autoimmune and allergic diseases, while Russian Karelian prevalence is far lower although the genetic background is the same. For example, the incidence of T1D is six-fold higher in Finland compared to the adjacent Karelian republic of Russia, the wide gap in infection rates between the two regions being strongly suspected to contribute to this difference (46,47).

Subsequently, Weinstock *et al* (48) expanded the HH to IBD based on the increasing prevalence of IBD in the US contrasting with the declining prevalence of helminthes. This observation has since been confirmed in other parts of the world. In sub-Saharan Africa where helminthic infestation is frequent, low incidence and prevalence of IBD is observed. This cannot be explained by genetic factors due to the fact that in black populations of US and United Kingdom the incidence of IBD is approaching that of the white populations (49).

De plus, les études de migration ont montré que les descendants d'immigrés provenant d'un pays avec une faible incidence acquièrent la même incidence que le pays d'accueil, comme illustré dans le DT1 (50,51) et la SEP (52,53). De même, la prévalence du lupus érythémateux disséminé (LED) est plus élevée chez les Afro-Américains par rapport aux Africains (54).

Enfin de façon intéressante, en Inde, une étude cas-témoins a montré qu'aucun des patients présentant une polyarthrite rhumatoïde (PR) n'était positif pour l'antigène circulant filaire par contraste avec 40% des contrôles sains (55).

Ces données épidémiologiques et bien d'autres ont renforcé le paradigme selon lequel les agents infectieux peuvent conférer un effet protecteur contre les maladies inflammatoires chroniques. Il est cependant intéressant d'essayer d'analyser et d'éclaircir les mécanismes sous-tendant cette théorie.

Moreover, migration studies have shown that descendants of immigrants coming from a country with a low incidence acquire the same incidence as the host country, as illustrated in T1D (50,51) and MS (52,53). Similarly, the prevalence of systemic lupus erythematosus (SLE) was found to be much higher in African Americans compared to West Africans (54).

Interestingly, a case-control study in India showed that none of the patients with rheumatoid arthritis (RA) were positive for circulating filarial antigen by contrast with 40% of healthy controls (55).

These epidemiological data and other reinforced the paradigm that infectious agents may confer a protective effect against chronic inflammatory diseases. Therefore, it is interesting to unravel and clarify the mechanisms of this theory.

2. Physiopathologie de l'Hypothèse de l'Hygiène

2.1 – Qui sont les acteurs de l'Hypothèse de l'Hygiène?

Le terme *Hygiène* de l'HH fait référence à tous les changements dans notre mode de vie correspondant à l'*Occidentalisation* et aboutissant à une meilleure hygiène à différents niveaux. Ces évolutions ont affecté notamment notre espace de vie, la préparation des aliments, l'accès à l'eau potable et les soins médicaux et thérapeutiques, et ont ainsi conduit à de profonds changements dans notre environnement microbien. En conséquence, au-delà des concepts généraux d'*Hygiène* et d'*Occidentalisation*, il est essentiel de comprendre et de clarifier exactement quels germes la modernisation a éliminé de notre «microbiome» (c'est à dire, les microbes avec lesquels nous sommes en contact). En effet selon l'HH, ce serait la disparition de ces microorganismes de notre environnement, nous privant de leurs propriétés immunomodulatrices, qui aurait contribué à la récente épidémie de maladies inflammatoires dans les pays occidentaux.

L'évolution de notre environnement microbien à travers les millénaires a été élégamment analysée par Rook (18,56) qui se réfère à ces organismes comme les "Anciens Amis". Selon lui, les microorganismes pertinents ayant un rôle immunorégulateur probable sont ceux qui faisaient partie de notre environnement naturel et avec qui nous avons co-évolué et vécu en contact étroit depuis des périodes aussi éloignées que le Paléolithique, jusqu'à il y a quelques décennies, lorsque notre société était encore en grande partie rurale, vivant dans des fermes et en contact avec les animaux (57). Jusqu'à présent, nous avons accepté et toléré ces organismes dans notre corps, cohabitant dans une relative harmonie avec eux, ces derniers étant finalement largement éradiqués de notre environnement moderne urbanisé.

2. Pathophysiology of the Hygiene Hypothesis

2.1 – Who are the actors in the Hygiene Hypothesis?

The term *Hygiene* of the HH refers to all changes in our lifestyle corresponding to *Westernization* and resulting in greater hygiene at different levels. These developments have affected in particular our living space, food preparation, access to clean water and medical and therapeutic care, and thereby have led to profound changes in our microbial environment. Therefore, beyond these general concepts of *Hygiene* and *Westernization*, it is critical to understand and clarify exactly which germs the recent modernization has removed from our 'microbiome' (i.e., microbes we are in contact with). Consistent with the HH, it would be the disappearance of these organisms from our environment, depriving us of their immunomodulatory properties that would have contributed to the recent outbreak of immune-mediated disorders in Western countries.

The evolution of our microbial environment through the millennia was elegantly analyzed by Rook (18,56) who refers to these organisms as "Old Friends". According to him, the relevant microorganisms with a probable immunoregulatory role are those that were part of our natural environment and with which we co-evolved and lived in close contact since periods as far away as the Paleolithic until a few decades ago, when our society was still largely rural, living on farms and in contact with animals (57). So far, we accepted and tolerated these organisms in our body, cohabiting in relative harmony with them, the latter being ultimately largely removed from our modern urbanized environment.

Considérant cela, sont donc principalement concernés les helminthes et les microbes acquis par transmission oro-fécale ou qui peuvent induire un état de porteur asymptomatique (hépatite A, mycobactéries, *Toxoplasma*, *Helicobacter pylori*), ainsi que ceux qui composent la flore commensale (cutanée, intestinale, oro-pharyngée, génito-urinaire) et la flore de l'environnement (présents dans la boue, l'eau, le sol, les plantes, les animaux).

Les infections communes de l'enfance ont souvent été considérées comme faisant partie des microbes pertinents dans l'HH. Cependant, la plupart des virus de l'enfance comme la rougeole, les oreillons et la varicelle ne sont pas protecteurs contre les maladies inflammatoires chroniques (24,58,59), et peuvent même en être des facteurs déclenchant (60). Contrairement à d'autres micro-organismes mentionnés ci-dessus, ceux-ci n'ont pas pacifiquement co-évolué avec nous, car soit ils ont un effet nocif qui peut tuer l'hôte, soit ils induisent une forte réponse immunitaire. Appelés par Rook « infections des foules » (56), ces virus ont besoin de grandes populations et de contacts étroits pour persister, mais n'exercent pas de rôle bénéfique dans notre organisme et donc, contrairement à d'autres microbes, n'ont pas co-habité avec nous.

In view of this, are primarily concerned helminthes and microbes acquired by oro-fecal transmission or that can induce an asymptomatic carrier state (hepatitis A virus, *Mycobacteria*, *Toxoplasma*, *Helicobacter pylori*) as well as those composing the commensal flora (cutaneous, intestinal, oro-pharyngeal, genito-urinary) and the environmental flora (present in mud, water, soil, plants, animals).

Common infections of childhood were often considered as part of the relevant microbes in the HH. However, most of childhood viruses such as measles, mumps and chicken pox are most frequently not protective against chronic inflammatory disorders (24,58,59), and often trigger them (60). Unlike other previously mentioned microorganisms, these do not have peacefully co-evolved with us, as they either have a harmful effect that can kill the host, or induce a strong immune response. Called by Rook “crowd infections” (56), these viruses require large populations and close contacts to persist but do not exert beneficial role in our organism and therefore unlike other microbes did not co-lived with us.

2.2 – Évolution de notre environnement microbien dans le monde occidental

Il est intéressant d'essayer de comprendre quelles évolutions dans notre mode de vie occidental ont conduit en quelques décennies à changer radicalement nos contacts avec ces microorganismes ancestraux. Tout d'abord, l'urbanisation et la migration des populations vers les villes, ainsi que les mesures de santé publique telles que le contrôle de la production alimentaire et de la qualité de l'eau, les progrès en matière d'assainissement et de soins de santé ont considérablement réduit ou presque éradiqué certaines infections dans les pays occidentaux, en particulier les helminthiases (61,62), le paludisme, les infections mycobactériennes (63) et l'hépatite A. Comme nous l'avons indiqué précédemment (voir §I-1.5), les données épidémiologiques ont inversement corrélié l'éradication de certaines de ces infections, en particulier les helminthiases et le paludisme avec une augmentation de la prévalence des MAI dans les pays occidentaux.

Par ailleurs, la composition de notre microbiote intestinal dépend fortement de l'environnement, principalement de nos contacts microbiens, ainsi que de nombreux autres facteurs pouvant le moduler. Il a été démontré que le microbiote intestinal jouait un rôle essentiel dans la régulation de la réponse immunitaire (64–66). Ainsi, tout facteur provoquant un déséquilibre de ce microbiote peut affecter l'équilibre de notre système immunitaire et ainsi favoriser le développement de maladies inflammatoires chroniques (67–69). Par conséquent, la migration des populations des zones rurales en contact avec les animaux et la flore de l'environnement vers des zones urbaines plus aseptisées a affecté la diversité de notre flore (70,71), ce qui favorise probablement les troubles auto-immuns.

2.2 – Evolution of our microbial environment in the Western world

It is of interest to attempt to understand what developments in our lifestyle have led to dramatically change our contacts with these ancestral organisms in a few decades. First, urbanization and migration of populations to the cities, as well as public health measures such as control of food production and water quality, advances in sanitation and health care have significantly reduced or almost eradicated some infections in Western countries, particularly helminthic infections (61,62), malaria, mycobacterial infections (63) and hepatitis A. As we previously reported (see §I-1.5), epidemiological data have inversely correlated the eradication of some of these infections especially helminthiasis and malaria, with an increase in the prevalence of immune-mediated diseases in Western countries.

Otherwise, the composition of our gut microbiota strongly depends on our environment, mainly on our microbial contacts as well as many other factors that can modulate it. It has been demonstrated that the gut microbiota plays a critical role in regulating immune response (64–66). Thus any factor causing a dysregulation of the microbiota can affect the balance of our immune system and thereby promote the development of chronic inflammatory diseases (67–69). Hence, population migration from rural areas in contact with animals and environmental flora to more sanitized urban areas has affected the diversity of the microbiota (70,71), thereby likely favoring immune-mediated disorders.

Fait intéressant, plusieurs études (72–74) ont suggéré que l'effet protecteur de larges fratries ou des animaux domestiques sur les maladies atopiques rapporté dans les études épidémiologiques (voir §I-1.5) pourrait être en partie lié à une augmentation de la diversité et de la richesse du microbiote intestinal. Cela expliquerait les observations pionnières rapportées par Strachan (22) sur l'effet protecteur d'un grand nombre de frères et sœurs au sein d'un foyer sur la survenue de troubles allergiques. De même, le régime alimentaire occidental (75–78), l'utilisation généralisée d'antibiotiques (79,80) et la naissance par césarienne (81), sont des facteurs bien établis perturbant le microbiote intestinal. Plusieurs études ont démontré que l'exposition aux antibiotiques à un âge précoce peut provoquer une dysbiose intestinale et ainsi augmenter le risque de troubles allergiques ultérieurs (32,82,83). En outre, la naissance par césarienne a été associée à un risque plus élevé d'asthme (84), de DT1 (85), de SEP (86) et de maladie cœliaque (87,88).

Interestingly, several studies (72–74) have suggested that the protective effect of large family or owning animals on atopic diseases reported in epidemiological studies (see §I-1.5) could be partially related to an increase in gut microbiota diversity and richness. This may explain the pioneering observations reported by Strachan (22) on the protective effect of a large number of siblings on the occurrence of allergic disorders. Similarly, Western diet (75–78), widespread use of antibiotics (79,80) and birth by caesarean section (81) are well-established factors disrupting intestinal microbiota. Several studies have demonstrated that exposure to antibiotics at an early age may cause dysbiosis increasing the risk of subsequent allergic disorders (32,82,83). In addition, caesarean birth has been associated with a higher risk of asthma (84), T1D (85), MS (86) and celiac disease (87,88).

2.3 – Mécanismes d'immunomodulation par des agents infectieux: à propos des helminthes

Les helminthes sont des vers parasites eucaryotes. En 2008, il a été estimé qu'environ 37% de la population mondiale était infectée par les helminthes principalement dans les pays en voie de développement, les helminthiases étant désormais rares dans les pays industrialisés (62). La classification des helminthes est basée sur de nombreux facteurs, incluant la morphologie externe et interne de l'œuf, de la larve et du ver adulte. Ces parasites sont divisés en deux principales classes: les Plathelminthes (vers plats), comprenant les trématodes (douves) et les cestodes (ténias), et les Némathelminthes incluant uniquement les nématodes (vers ronds) (89). Les helminthes vivent le plus souvent dans le tractus gastro-intestinal de leur hôte, mais peuvent aussi coloniser d'autres organes. Il est à noter que les helminthes ont co-évolué avec leur hôte depuis des millénaires. Leur but n'est pas de tuer leur hôte mais de survivre aussi longtemps que possible en créant un état de tolérance. Pour ce faire, les helminthes sont capables par divers mécanismes de moduler finement le système immunitaire de l'hôte afin d'éviter une activation pouvant conduire à leur élimination, tout en ne causant d'immunosuppression trop profonde pour prévenir le décès hôte par une infection. Cette immunomodulation, en évitant une activation excessive du système immunitaire, contribue à protéger l'hôte contre les maladies inflammatoires chroniques.

De nombreuses études sur des modèles murins de MAI ont mis en lumière les mécanismes complexes par lesquels les helminthes entravent la réponse immunitaire de l'hôte. Cela inclut la promotion d'une différenciation de type T-helper-2 (Th2) et l'inhibition des réponses Th1/Th17, l'amplification des populations de lymphocytes T-régulateurs (Treg), B-régulateurs (Breg), et des macrophages de type-2, l'orientation des cellules dendritiques (CD) vers un phénotype « tolérogène », la régulation négative des cellules lymphoïdes innées (CLI) de type-2, et la modulation de la flore intestinale (18,90–94). Les effets immunorégulateurs des helminthes sont illustrés sur la Figure A (page 40)

2.3 – Mechanisms of immunomodulation by infectious agents: about helminthes

Helminthes are eukaryotic parasitic worms. In 2008, it was estimated that about 37% of the world population was infected with helminthes mainly in developing countries, helminthiasis now being scarce in industrialized countries (62). Helminthes' classification is based on numerous factors including external and internal morphology of egg, larval and adult stages. These parasites are divided into two phyla: Platyhelminthes (flatworms) including both trematodes (flukes) and cestodes (tapeworms), and Nematelminthes including only one class, namely nematodes (roundworms) (89). Helminthes most frequently live in the gastrointestinal tract of their host, but may also colonize other organs. It is worth noting that helminthes have co-evolved with their host for millennia. Their goal is not to kill their host but to survive as long as possible by creating a state of tolerance. To achieve this, helminthes are able by various mechanisms to finely modulate the immune system of the host to prevent an activation that may lead to their elimination, while not causing too deep immunosuppression to prevent the host dies from infection. This immunomodulation, by avoiding an excessive activation of the immune system contributes to protect the host against inflammatory disorders.

Numerous studies in animal models have highlighted the intricate mechanisms by which helminthes hamper the host's immune response. This includes promotion of T-helper-2 (Th2) and inhibition of Th1/Th17 differentiation, amplification of T-regulatory (Treg) cells, B-regulatory (Breg) cells, and type 2-macrophages, orientation of dendritic cells (DC) towards a tolerogenic phenotype, downregulation of type-2 innate lymphoid cells (ILC-2) and modulation of the gut microbiota (18,90–94). Helminthes' immunoregulatory effects are illustrated in Figure A (page 40).

2.3.1 – Les lymphocytes T

Les lymphocytes T (LT) naïfs peuvent se différencier soit en LT-helper (Th) soit en LT-régulateurs (Treg). En ce qui concerne les LTh, l'ancien modèle opposait deux réponses principales, les réponses de type Th1 et de type Th2, s'inhibant réciproquement (95). Ainsi, la réponse Th1, particulièrement impliquée dans la pathogenèse des MAI, est associée à l'expansion des LTh1 et à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, incluant l'interleukine (IL-6), l'IL-12, l'interféron (IFN)- γ et le Tumor Necrosis Factor (TNF)- α . A l'inverse, la réponse Th2 joue un rôle central dans les troubles atopiques et est caractérisée par l'expansion des mastocytes, des éosinophiles et par des taux augmentés d'IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 et d'IgE (96).

La vision originale, issue de travaux analysant des modèles murins de MAI infectés par des helminthes (97), suggérait que les helminthes agissaient sur la balance Th1/Th2 en favorisant la réponse Th2 et en inhibant la polarisation Th1, ayant pour résultat un effet protecteur contre les MAI Th1-médiées. Cependant, cette conception ne permettait pas d'expliquer l'épidémiologie de l'HH montrant un effet protecteur des helminthes également contre les maladies allergiques. En effet, en encourageant une différenciation Th2, les helminthes devraient augmenter les troubles atopiques.

Ainsi, il est devenu de plus en plus évident que d'autres acteurs cellulaires étaient impliqués dans la régulation immunitaire médiée par les helminthes. C'est le cas des lymphocytes Th17 et Treg. Les LTh17 sont un sous-type de LTh récemment défini sécrétant principalement l'IL-17, et dont le rôle dans les MAI a été largement documenté (98,99). Les LTreg (100), pour leur part, sont capables de contrôler à la fois les réponses allergiques Th2-médiées (101) et les troubles inflammatoires à médiation Th1/Th17, et ce principalement par la sécrétion d'IL-10 et de TGF- β (102).

2.3.1 – *T-cells*

Naïve T-cells may differentiate into either T-helper (Th) or T-regulatory (Treg) cells. Regarding T-helper cells, the old paradigm opposed two main responses, Th1 and Th2-type responses, down-regulating each other (95). Thus Th1 response is demonstrated to be particularly involved in the pathogenesis of autoimmune diseases and is associated with expansion of Th1-cells as well as secretion of pro-inflammatory cytokines including interleukin (IL)-6, IL-12, interferon (IFN)- γ and tumor necrosis factor (TNF)- α . Conversely, Th2 response plays a central role in atopic disorders and is characterized by expansion of mast cells, eosinophil and increased levels of IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 and IgE (96).

The original vision derived from experiments in mouse models of autoimmune diseases infected with helminthes (97) suggested that helminthes were acting on Th1/Th2 balance by promoting Th2 and inhibiting Th1 polarization, resulting in a protective effect against Th1-mediated autoimmune diseases. However, this conception did not explain the epidemiology of the HH showing a protective effect of helminthes also with regard to allergic diseases. Indeed by promoting a Th2 differentiation, helminthes should thereby increase atopic disorders.

Therefore, it has become increasingly obvious that other cellular actors were involved in immunoregulation mediated by helminthes. This is the case of both Th17 and Treg cells. Th17 cells are a recently-defined subset of T-helper cells primarily secreting IL-17 and whose role in autoimmune diseases has been widely documented (98,99). Treg cells (100), for their part, have been found to control both Th2-mediated allergy (101) and Th1/Th17-mediated inflammatory disorders, mainly through the secretion of IL-10 and TGF- β (102).

Ainsi, de nombreuses données expérimentales ont montré que les helminthes sont capables de moduler la réponse immunitaire de l'hôte en inhibant la différenciation Th1/Th17 (103–107), en promouvant une polarisation de type Th2 (103,105,106,108–113) et en augmentant la prolifération des LTreg et leur sécrétion d'IL-10 et de TGF- β (103,106,109,112,114), résultant en un contrôle global de l'ensemble des réponses Th1/Th2/Th17 (91). La modulation du phénotype des LT contribue donc à l'effet protecteur des parasites à la fois contre les maladies allergiques et auto-immunes.

Par exemple, l'infection de rats Dark Agouti prédisposés à développer une encéphalite auto-immune expérimentale (EAE), le modèle animal de SEP le plus couramment utilisé, avant l'induction de la maladie avec le nématode *Trichinella spiralis* (*T. spiralis*) (103) réduit les manifestations cliniques et histologiques de la maladie. Cela s'accompagne d'une régulation négative des cytokines de type Th1 (IFN- γ) et Th17 (IL-17) et d'une augmentation des cytokines Th2/Treg (IL-4, IL-10), ainsi que de la prolifération des LTreg. En outre, le transfert de LT spléniques de rats infectés par *T. spiralis* chez des rats EAE non infectés conduit à une amélioration de l'EAE et, dans certains cas, à la protection contre le développement de la maladie. De même, l'un des produits d'excrétion-sécrétion (ES) du nématode filaire du rongeur *Acanthocheilonema vitae* (*A. vitae*), l'ES-62, est capable chez la souris d'inhiber la survenue et d'atténuer la sévérité et la progression de l'arthrite induite par le collagène (AIC), un modèle animal de polyarthrite rhumatoïde (PR). Cet effet est associé à une réduction de la sécrétion des cytokines Th1 et Th17 (TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-17) (107,113). L'infection par *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*) réduit également de manière significative la gravité de l'AIC chez la souris en diminuant les cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , TNF- α et IL-17A) et en augmentant les cytokines de type Th2/Treg (IL-4, IL-10) (106).

Therefore, many experiments have demonstrated that helminthes are able to modulate the host's immune response by inhibiting Th17 differentiation (103–107), promoting Th2 relative to Th1 polarization (103,105,106,108–113), and chiefly by enhancing Treg cells proliferation and secretion of IL-10 and TGF- β (103–106,109–112,114), resulting in an overall control of Th1/Th2/Th17 responses (91). The modulation of T-cells profile contributes to the protective effect of parasites both against allergic and autoimmune diseases.

For example, prior infection of Dark Agouti rats prone to develop experimental autoimmune encephalitis (EAE), the most commonly used animal model of MS, with the nematode *Trichinella spiralis* (*T. spiralis*) (103) reduced clinical and histological manifestations of the disease. It was accompanied by a down-regulation of Th1 (IFN- γ) and Th17 cytokines (IL-17) and an up-regulation of Th2/Treg cytokines (IL-4, IL-10) as well as Treg cells proliferation. Moreover, transfer of splenic T-cells from *T. spiralis*-infected rats into non-infected EAE rats led to an improvement of EAE and in some cases protected from disease development. Similarly, the excretory-secretory (ES) product of the rodent filarial nematode *Acanthocheilonema vitae* (*A. vitae*), namely ES-62, was found to suppress collagen-induced arthritis (CIA) severity and progression in mice by inhibiting Th1 and Th17-associated cytokines (TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-17) (107,113). *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*) infection also significantly reduced the severity of mice CIA by lowering pro-inflammatory cytokines (IFN- γ , TNF- α and IL-17A) and rising Th2/Treg cytokines (IL-4, IL-10) (106).

2.3.2 – Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (CD) sont reconnues pour être un lien essentiel entre le système immunitaire inné et adaptatif. Leur fonction principale est de capter, traiter puis présenter l'antigène aux LT. Les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (Pattern Recognition Receptors, PRR), incluant les Toll-like receptors (TLR) et les récepteurs lectine de type C (C-type lectin receptors, CLR) sont particulièrement importants pour ce processus (115). L'état d'activation des CD est crucial dans la polarisation des LT (116). Ainsi, les CD peuvent adopter un phénotype «tolérogène» (opposé au phénotype « immunogène ») capable d'initier des réponses Th2 et Treg (117). Ces CD tolérogènes se sont révélées essentielles dans la prévention de l'auto-immunité (115). Les helminthes sont capables de moduler la signalisation des CD pour diriger leur différenciation vers un phénotype tolérogène (115,118). Cette modulation est en partie médiée par la liaison et la reconnaissance d'épitopes parasitaires par les TLR et CLR (119). Dans le modèle d'EAE des rats Dark Agouti décrit ci-dessus (voir §I-2.3.1), les auteurs ont reproduit les résultats bénéfiques obtenus avec l'infection par *T. spiralis* (103) en injectant, 7 jours avant l'induction de l'EAE, des CD de rats non infectés stimulées avec des produits d'ES de larves enkystées musculaire de *T. spiralis* (ES-L1) (120). Les CD stimulées par l'ES-L1 sont ainsi capables d'augmenter la population de LTreg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, la sécrétion d'IL-4, d'IL-10 et de TGF- β , et de réduire les productions d'IFN- γ et d'IL-17.

2.3.2 – Dendritic cells

Dendritic cells (DC) are recognized to be a pivotal link between the innate and adaptive immune system. Their main function is to capture, process and present antigen to T-cells. Pattern recognition receptors (PRR), including Toll-like receptor (TLR) and C-type lectin receptors (CLR) families, are particularly important to this process (115). The activation status of DC is crucial in T-cells polarization (116). Thus, DC may adopt a "tolerogenic" phenotype opposing "immunogenic" phenotype, able to initiate Th2 and Treg responses (117). These tolerogenic DC have been shown to be essential in the prevention of autoimmunity (115). Helminthes products are able to modulate DC signaling to direct their differentiation toward a tolerogenic phenotype (115,118). This modulation is partly mediated by the binding and recognition of parasitic products by TLR and CLR (119). In the Dark Agouti rats model of EAE reported above, the authors reproduced the beneficial results obtained with *T. spiralis* infection (103) by injecting non-infected rats with DC stimulated with ES products released from encysted muscle larvae of *T. spiralis* (ES-L1) 7 days before EAE induction (120). ES-L1-stimulated DC increased CD4+CD25+Foxp3+ Treg cells population as well as IL-4, IL-10 and TGF- β production, and decreased IFN- γ and IL-17 levels.

Par ailleurs, deux études (121,122) ont utilisé un modèle murin de MICI Rag (les souris Rag n'ont pas de LT et de LB fonctionnels) où les animaux sont réinjectés avec des LT IL-10^{-/-} ; l'IL-10 étant une cytokine immunorégulatrice clé, les souris IL-10^{-/-} déficientes développent une colite chronique spontanée. Dans ces études, *Heligmosomoides polygyrus* (*H. polygyrus*), un helminthe intestinal, a été capable de prévenir l'inflammation intestinale, soit par l'infection directe des souris (121), soit par le transfert de CD de souris infectées aux souris Rag LT IL-10^{-/-} non infectées (122). Ainsi, *H. polygyrus* exerce son effet protecteur contre la MICI en modifiant la fonction des CD vers un phénotype tolérogène. Les CD tolérogènes exposées à *H. polygyrus* rendent les LT hyporéactifs et inhibent les réponses IFN- γ /IL-17.

Otherwise, two studies (121,122) used a Rag IBD mice model (Rag mice lack functional T- and B-cells) where animals are reconstituted with IL-10^{-/-} T-cells; IL-10 being a key immunoregulatory cytokine, IL-10^{-/-} deficient mice develop spontaneous chronic colitis. In these studies *Heligmosomoides polygyrus* (*H. polygyrus*), an intestinal helminth, was demonstrated to prevent and reverse intestinal inflammation, either by direct infection of IBD mice (121) or by transfer of DC from infected-mice to IBD mice (122). Thereby, *H. polygyrus* was shown to mediate IBD protection by altering DC function in a regulatory phenotype. *H. polygyrus*-exposed tolerogenic DC rendered T-cells hyporesponsive and inhibited IFN- γ /IL-17 responses.

2.3.3 – Les lymphocytes B régulateurs

En outre, les helminthes peuvent favoriser la prolifération des lymphocytes Breg (123,124). En plus des lymphocytes B (LB) conventionnels responsables de l'activation des LT et de la production d'anticorps, un sous-type spécifique de LB a été récemment mis en évidence. Les lymphocytes Breg sont capables de réguler négativement la réponse immunitaire grâce à la production de cytokines régulatrices, en particulier de l'IL-10, et par des interactions directes avec les LT pathogènes. La fonction de régulation de ces cellules Breg a depuis été démontrée dans diverses pathologies dont les MAI (125,126).

Chez les souris, le produit d'ES d'*A. vitae* ES-62, en plus de moduler la réponse des LT comme décrit ci-dessus (voir §I-2.3.1), est capable de restaurer les taux de lymphocytes Breg sécréteurs d'IL-10, tout en diminuant l'infiltration des plasmocytes dans les articulations (127). De même, la génération de cellules Breg par les helminthes a été rapportée dans des modèles murins de SEP (128) et de MCI (129). Fait intéressant, Correale *et al* (130) ont démontré que des patients atteints de SEP infectés par des helminthes créaient une population de cellules Breg produisant de grandes quantités d'IL-10 ainsi que des facteurs neurotrophiques impliqués dans la croissance et le développement des neurones. Ces patients présentaient une activité clinique et radiologique de la SEP nettement réduite par rapport aux patients non infectés.

2.3.3 – B-regulatory cells

Moreover, helminthes may promote the proliferation of Breg cells (123,124). Besides conventional B-lymphocytes responsible for T-cells activation and antibody production, a specific subset of B-cells has recently been highlighted (131). Breg cells have been shown to negatively regulate immune response by producing regulatory cytokines, mainly IL-10, and through direct interaction with pathogenic T-cells. The regulatory function of Breg cells has since been demonstrated in various pathological conditions including autoimmune diseases (125,126,132). In CIA mice, the ES product of *A. vitae* ES-62, in addition to modulate T-cells response as described above, is able to restore IL-10-producing Breg cells levels while decreasing plasma cells infiltration in the joints (127). Similarly, the generation of Breg cells by helminthes was reported in MS (128) and IBD (129) mice models. Interestingly, Correale *et al* (130) demonstrated that helminth-infected MS patients created a Breg cells population producing high amounts of IL-10 as well as neurotrophic factors involved in the growth and development of neurons. These patients exhibited significantly lower clinical and radiological disease activity when compared with non-infected patients.

2.3.4 – Les cellules immunitaires innées

Outre la modulation des LT, des CD et des lymphocytes Breg, les helminthes exercent également leurs effets immunomodulateurs en manipulant les cellules immunitaires innées, en particulier en promouvant les macrophages alternatifs ou macrophages de type-M2 et les cellules lymphoïdes innées de type 2 (CL12).

En réponse à divers stimuli, les macrophages peuvent subir une activation classique de type M1 (stimulée par les ligands des TLR ou l'IFN- γ) ou de type M2 (stimulée par l'axe IL-4/IL-13). Les macrophages M2, contrairement aux macrophages M1, ont une faible expression de l'IL-12, une forte expression de l'IL-10, du TGF- β et de l'arginase-1, et ont des fonctions anti-inflammatoires et immunosuppressives (133). Ainsi, l'utilisation de souris ayant des macrophages IL-4R $^{-/-}$ (134) a montré que la génération de macrophages M2 étaient essentielle pour la survie des souris au cours de la schistosomiase en inhibant la réponse Th1. De même, l'infection à *Litomosoides sigmodontis* (*L. sigmodontis*) chez la souris entraîne le recrutement d'une population de macrophages M2 F4/80 $^{+}$ activés alternativement qui inhibe puissamment la prolifération antigène-spécifique des LT CD4 $^{+}$ (135). De plus, la cystatine de type-1 dérivée de la douve du foie *Clonorchis sinensis* (*C. sinensis*) réduit de manière significative l'inflammation intestinale par le recrutement de macrophages IL-10-sécrétant dans le modèle murin de colite dextran-sodium-sulfate (DSS)-induite (136).

2.3.4 – Innate immune cells

Besides modulating T-cells, DC and Breg cells, helminthes were also shown to produce their immunomodulatory effects by manipulating innate immune cells, especially by promoting alternatively activated or M2-macrophages and type 2-innate lymphoid cells (ILC2).

In response to diverse stimuli, macrophages may undergo classical M1 activation (stimulated by TLR ligands or IFN- γ) or alternative M2 polarization (stimulated by IL-4/IL-13 axis). M2-macrophages unlike M1-macrophages have low expression of IL-12, high expression of IL-10, TGF- β and arginase-1, and exhibit anti-inflammatory and immunosuppressive functions (133). Thus, by using a mice model with IL-4R-/- macrophages (134) it was shown that generation of M2 macrophages is essential for mice survival during schistosomiasis through their inhibitory effects on Th1 response. Also, *Litomosoides sigmodontis* (*L. sigmodontis*) infection in mice recruited a F4/80+ population of alternatively activated macrophages that potently inhibited Ag-specific CD4+ T-cells proliferation (135). Moreover, the type-1 cystatin derived from the liver fluke *Clonorchis sinensis* (*C. sinensis*) significantly reduced intestinal inflammation by recruiting IL-10-secreting macrophages in a dextran-sodium-sulfate (DSS)-induced colitis mice model (136).

Les CLI sont une population de lymphocytes récemment décrits qui n'ont pas de marqueurs de la lignée B ou T. Ils ont été divisées en trois sous-types: les CLI-1 qui sécrètent de l'IFN- γ , les CLI-2 qui sécrètent de l'IL-5 et de l'IL-13 et les CLI-3 qui sécrètent de l'IL-17 et de l'IL-22. Les CLI sont impliqués dans la réponse immunitaire anti-helminthique de l'hôte et dans le déclenchement de la réponse allergique. Les cytokines IL-25, IL-33, et la lymphopoïétine stromale thymique (thymic stromal lymphopoietin, TSLP) conduisent à l'expansion des CLI-2 (137,138). Les effets immunomodulateurs des helminthes sur ce sous-type cellulaire restent à éclaircir. Cependant, McSorley *et al* (139) ont récemment mis en évidence l'effet immunomodulateur potentiel des helminthes sur les CLI dans un modèle murin d'allergie respiratoire. Les produits d'ES d'*H. polygyrus* inhibent la réponse CLI-2 en bloquant la sécrétion d'IL-33, abolissant ainsi la réponse à l'allergène. D'autres études seront nécessaires pour clarifier le rôle de ces cellules immunitaires innées dans l'effet protecteur induit par les helminthes.

ILC are a recently described population of lymphocytes that lack B- or T-cell lineage markers and have been divided into three subtypes: ILC-1 that secrete IFN- γ , ILC-2 that secrete IL-5 and IL-13 and ILC-3 that secrete IL-17 and IL-22. ILC play a role in anti-helminthic host protective immunity and are able to initiate allergy. IL-25, IL-33 and thymic stromal lymphopoietin (TSLP) have been shown to drive ILC-2 expansion (137,138). The immunomodulatory effects of helminthes on this cell subtype remain unclear. However, McSorley *et al* (139) recently highlighted the potential immunomodulatory effect of helminthes on ILC in an airway allergy mice model. *H. polygyrus* ES products were found to suppress ILC-2 response by blocking IL-33 secretion, thereby abolishing allergic response to allergen. Further studies are needed to clarify the role of these innate immune cells in the protective effect induced by helminthes.

2.3.5 – La régulation du microbiote intestinal

Enfin, les helminthes peuvent moduler la composition bactérienne de la flore intestinale, favorisant la croissance des micro-organismes intestinaux généralement considérés comme «probiotiques» (140,141). Comme mentionné ci-dessus (voir §I-2.2), le microbiote intestinal joue un rôle essentiel dans la régulation du système immunitaire (64–66), et une perturbation de son équilibre peut favoriser le développement de MAI (67–69). Par conséquent, en maintenant l'équilibre du microbiote, les helminthes contribuent à prévenir l'apparition de maladies à médiation immunitaire.

Les mécanismes par lesquels certains micro-organismes peuvent manipuler la réponse immunitaire de l'hôte pour assurer leur propre survie sont complexes et intriqués. Des études complémentaires seront nécessaires pour les spécifier. Cependant, il est probable que les stratégies immunomodulatrices mises en jeu dépendent à la fois de l'agent pathogène impliqué et de facteurs liés à l'hôte tels que le terrain génétique ou le microenvironnement local. En attendant, les propriétés immunomodulatrices exceptionnelles de ces micro-organismes, en particulier des helminthes qui sont les mieux caractérisées à ce jour, ont conduit à leur application avec succès dans les MAI, à la fois sur des modèles animaux et dans des essais cliniques. Cela permet de conforter l'HH et ouvre la voie à un nouveau potentiel thérapeutique.

2.3.5 – Regulation of intestinal microbiota

Additionally, helminthes may modulate the bacterial composition of intestinal flora, promoting the growth of gut microorganisms typically considered to be “probiotics” (140,141). As mentioned above, the microbiome plays an essential role in regulating the immune system (64–66), and disrupting the balance of the gut microbiome may promote the development of autoimmune diseases (67–69). Therefore, by maintaining the microbiome balance, helminthes likely contribute to prevent the occurrence of immune-mediated disorders.

The mechanisms whereby some microorganisms can manipulate the host's immune response to ensure their own survival are complex and interlinked, and will need to be specified in further studies. However, it is likely that immunomodulatory strategies depend on both the pathogen involved and host factors such as genetic background and local microenvironment. Meanwhile, the exceptional immunomodulatory properties of these microorganisms particularly helminthes which are best characterized to date, led to their successful application in autoimmune diseases in both animal models and clinical trials, thereby providing evidence of the HH and opening the way to a broad therapeutic potential

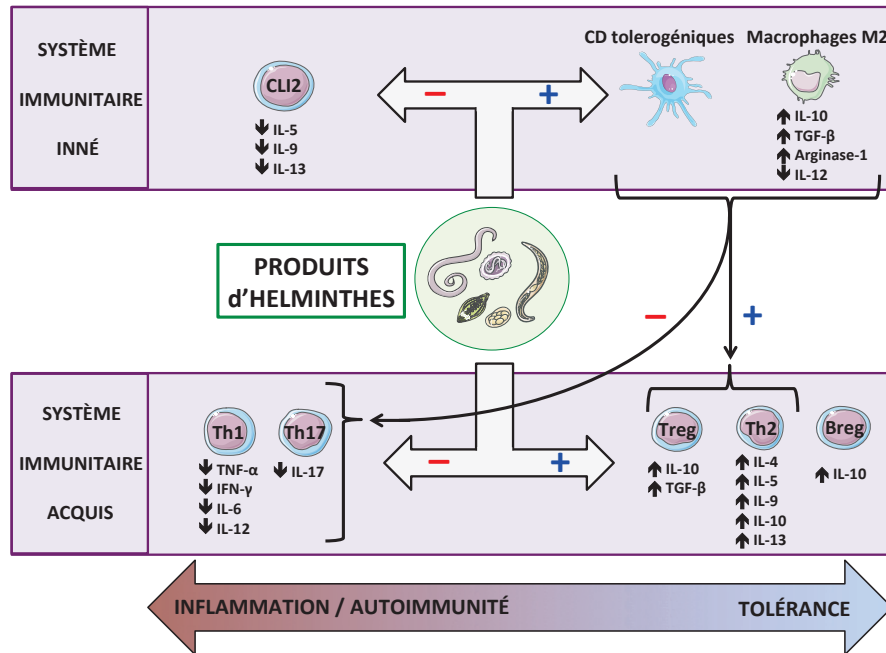


Figure A: Effets immunorégulateurs des helminthes sur le système

immunitaire. Les helminthes exercent leur action immunorégulatrice en modulant à la fois les cellules de l'immunité innée et adaptative. En ce qui concerne les LT, les helminthes favorisent une réponse de type Th2 et inhibent la différenciation Th1/Th17, entraînant une augmentation des cytokines de type Th2 (IL4, IL5, IL9, IL10, IL13) et une diminution des cytokines Th1/Th17 (TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-12, IL-17). En outre, les helminthes augmentent la prolifération des LTreg, ces derniers entravant la polarisation Th1/Th2/Th17 principalement par la sécrétion d'IL-10 et de TGF-β. Les helminthes promeuvent également un phénotype régulateur des LB, des CD et des macrophages. Les CD tolérantes et les macrophages régulateurs M2 contribuent à passer d'un profil Th1/Th17 à un profil Th2/Treg. Enfin, ces parasites peuvent entraver la prolifération des CLI-2, un sous-type de cellules immunitaires innées responsables de la réponse allergique. Par ces effets, les helminthes créent un environnement tolérant afin d'assurer leur propre survie et par ce faire, protègent l'hôte contre les MAI en limitant les phénomènes inflammatoires et auto-immuns.

Abréviations: Breg: Lymphocytes B-régulateurs – CD: Cellules dendritiques – CLI2: Cellules lymphoïdes innées de type 2 – IFN: Interféron – IL: Interleukine – TGF: Transforming Growth Factor – Th: Lymphocytes T-helper – TNF: Tumor Necrosis Factor – Treg: Lymphocytes T-régulateurs.

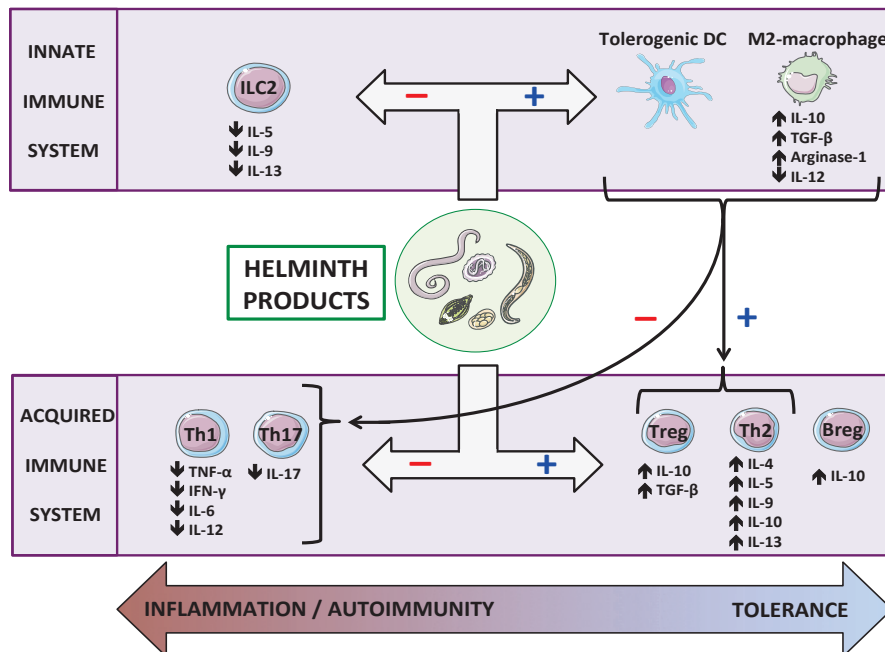


Figure A: Immunoregulatory effects of helminthes on the immune system. Helminthes exert their immunoregulatory actions by modulating cells of both the innate and adaptive immune system. Regarding T-cells, helminthes may promote a Th2-type response and down-regulate Th1/Th17 differentiation, leading to increased Th2-type cytokines (IL4, IL5, IL9, IL10, IL13) and decreased Th1/Th17-type cytokines (TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-12, IL-17) secretion. Furthermore, worms' products enhance Treg cells proliferation, the latter hampering Th1/Th2/Th17 polarization mainly through the secretion of IL-10 and TGF-β. Helminthes also promote a regulatory phenotype of B-cells, DC and macrophages. Both tolerogenic DC and regulatory M2-macrophages contribute to switch from a Th1/Th17 to a Th2/Treg profile. Finally, these parasites may hamper the proliferation of ILC-2, a subset of innate immune cells responsible for allergic response. Thereby, helminthes create a tolerant environment ensuring their own survival but also protecting the host from immune-mediated conditions by limiting excessive inflammatory and autoimmune phenomena.

Abbreviations: Breg: B-regulatory cells – DC: Dendritic Cells – IFN: Interferon – IL: Interleukin – ILC2: Type-2 Innate lymphoid cells – TGF: Transforming Growth Factor – Th: T-helper cells – TNF: Tumor Necrosis Factor – Treg: T-regulatory cells.

3. '*Preuve de concept*' de l'Hypothèse de l'Hygiène

Les thérapies dérivées des helminthes

La reconnaissance des vastes propriétés immunomodulatrices de nombreux microorganismes de notre environnement en particulier des helminthes, initialement suggérées dans l'HH et depuis lors largement démontrées, a conduit dans les années 1990 à leur application thérapeutique dans des modèles expérimentaux et des études cliniques de plusieurs MAI, en particulier les MICI, la SEP, la PR, le DT1, la maladie cœliaque, la maladie de Basedow et le psoriasis. Diverses espèces d'helminthes et approches ont été expérimentées: la colonisation par les larves d'helminthes, l'administration orale d'œufs d'helminthes, et l'utilisation d'antigènes dérivés des helminthes. Les thérapies dérivées des helminthes, nous le détaillerons par la suite, ont permis à la fois dans les modèles animaux et les essais cliniques, de prévenir ou retarder l'apparition et réduire la gravité des MAI. Ces expériences sont résumées dans la Table 1 (Annexe-1, page 118).

3. '*Proof of concept*' of the Hygiene Hypothesis

Helminth-derived therapies

The recognition of the extensive immunoregulatory properties of numerous microorganisms from our environment especially helminthes, initially suggested in the HH and since then widely demonstrated, led in the 1990s to their therapeutic application in experimental models and clinical studies of several immune-mediated conditions, including IBD, MS, RA, T1D, celiac disease, Grave's disease and psoriasis. Various species of helminthes and approaches were experimented: colonization by helminthes larvae, oral administration of helminthes ova, and use of antigens derived from helminthes. Helminth-derived therapies, as will be detailed below, were found both in animal models and clinical trials to prevent or delay the onset, and reduce the severity of autoimmune diseases. These experiments are summarized in Table 1 (Annexe-1, page 118).

3.1 – Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)

De solides données expérimentales utilisant les helminthes dans différents modèles murins de colite ont suggéré leur bénéfice dans le traitement des MICI (121,122,136,142–149).

Ainsi, l'exposition aux antigènes solubles des œufs (soluble eggs antigen, SEA) (143) ou aux cercaires (144,146) de *S. mansoni* atténue de manière significative les colites trinitrobenzene sulfonique acid (TNBS) ou DSS-induites (141) chez la souris, grâce à la majoration des taux d'IL-4 et d'IL-10, la baisse des niveaux d'IFN- γ (143,144), ou par l'induction de macrophages F4/80+ (146).

De même, l'infection de souris avec soit des cercaires (142), soit des antigènes (148) de *T. spiralis* avant l'induction d'une colite à dinitrobenzene sulfonique acid (DNBS) réduit sa sévérité. Cette observation a été corrélée avec une production accrue d'IL-4, d'IL-13 et de TGF- β , et une inhibition de l'IFN- γ , l'IL-1 β , de l'activité myéloperoxydase (MPO) et de l'expression de l'oxyde nitrique synthase inductible (inducible nitric oxide synthase, iNOS).

De même, *H. polygyrus* (121,122), *Hymenoleptis diminuta* (*H. diminuta*) (145), *Schistosoma japonicum* (*S. japonicum*) (147) et *C. sinensis* (136) ont été capables d'atténuer ou de totalement prévenir la survenue de colite dans des modèles Rag avec transfert de LT IL-10-/-, DNBS-, TNBS- et DSS-induit respectivement, par des mécanismes incluant la promotion de cellules Treg, de cytokines de type Th2 (IL-4, IL-5, IL-10), de CD tolérogènes et de macrophages M2, ainsi que l'inhibition des sécrétions d'IFN- γ et d'IL-17.

Ces résultats encourageants ont conduit à la mise en place d'essais cliniques (150–153) évaluant l'innocuité et le potentiel thérapeutique des helminthes dans les MICI, principalement des œufs de *Trichuris suis* (*T. suis*) (*T. suis* ova, TSO).

3.1 – Inflammatory bowel disease (IBD)

Strong experimental data using helminthes in various murine models of colitis have suggested the benefit of helminth therapy in IBD (121,122,136,142–149).

Thus *S. mansoni* soluble egg antigen (SEA) (143) or cercariae (144,146) exposure were shown to significantly attenuate trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS)-induced (143,144) or DSS-induced (146) colitis in mice by enhancing IL-4 and IL-10 expression, decreasing INF- γ levels (143,144) or through induction of F4/80+ macrophages (146).

Infection of mice with either *T. spiralis* cercariae (142) or antigens (148) prior to dinitrobenzene sulphonic acid (DNBS)-colitis induction reduced its severity and was correlated with higher IL-4, IL-13 and TGF- β production and down-regulation of IFN- γ , IL-1 β , myeloperoxidase (MPO) activity and inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression.

Similarly, *H. polygyrus* (121,122), *Hymenoleptis diminuta* (*H. diminuta*) (145), *Schistosoma japonicum* (*S. japonicum*) (147) and *C. sinensis* (136) were found to attenuate or prevent Rag IL-10-/- T-cell transfer model of colitis, DNBS-, TNBS- and DSS-induced colitis respectively, through mechanisms including promotion of Treg cells, Th2-cytokines (IL-4, IL-5, IL-10), tolerogenic DC, M2-macrophages as well as inhibition of IFN- γ and IL-17 secretion.

These encouraging results have led to conduct several clinical trials (150–153) evaluating the safety and therapeutic potential of helminth therapy, mainly *Trichuris suis* (*T. suis*) ova (TSO) in IBD patients.

T. suis est un trichocéphale du porc capable de coloniser un hôte humain pour une courte période de temps. Après une étude initiale (150) suggérant que les TSO administrés par voie orale pourraient être un traitement sûr et efficace des MICI, Summers *et al* ont mené deux essais (151,152), respectivement une étude ouverte chez 29 patients souffrant d'une MC active, définie par un index d'activité de la maladie (Crohn Disease Activity Index, CDAI) ≥ 220 (151), et un essai randomisé en double aveugle contrôlé *versus* placebo chez 54 patients atteints de RCH active, définie par un indice d'activité (Ulcerative Disease Activity Index, UCDAI) ≥ 4 (152). Tous les patients ayant une MC ont ingéré 2,500 TSO toutes les 3 semaines pendant 24 semaines; les patients ayant une RCH ont reçu soit 2,500 TSO soit un placebo par voie orale toutes les 2 semaines pendant 12 semaines. À la fin des études, 79,3% des patients avec une MC ont répondu (diminution du CDAI >100 points ou CDAI <150) et 72,4% ont été mis en rémission (CDAI <150). Concernant la RCH, bien que les taux de rémission entre les deux groupes n'étaient pas significativement différents, l'index UCDAI s'est amélioré chez 43,3% des patients avec un traitement par TSO contre 16,7% sous placebo. Dans les deux études, aucun effet secondaire n'a été rapporté. Bien que les mécanismes immunorégulateurs de *T. suis* n'aient pas été étudiés dans ces essais, il est probable que cela implique notamment la modulation des populations Th1, Th2, Th17 et Treg, comme suggéré dans les modèles murins.

En octobre 2013, l'étude clinique de phase 2 TRUST-I (154) évaluait un traitement par TSO (7,500 TSO toutes les 2 semaines pendant 12 semaines) par rapport au placebo chez 250 patients ayant une MC modérée à sévère. L'objectif principal (diminution du CDAI de 100 points) et le principal objectif secondaire (CDAI <150) n'ont pas été atteints. Malgré ces résultats décevants, les auteurs suggèrent, d'après l'analyse en sous-groupes, que l'efficacité des TSO pourrait être plus élevée chez les patients les plus sévères (CDAI >290). Par ailleurs, plusieurs études cliniques utilisant les TSO dans les MICI sont prévues (études listées dans (94,155)). De plus, l'ankylostome *Necator americanus* (*N. americanus*) est proposé comme alternative à *T. suis*, étant plus simple d'utilisation grâce à des effets plus durables (156), et apparaissant bien toléré (157).

T. suis is a pig whipworm able to colonize a human host only for a short period of time. Following an initial study (150) suggesting that TSO given orally could be a safe and effective treatment of IBD, Summers *et al* conducted two trials (151,152), respectively an open-label study in 29 patients suffering from active CD as defined by a Crohn's Disease Activity Index (CDAI) ≥ 220 (151), and a randomized double blind placebo-controlled trial in 54 patients with active UC, defined by an Ulcerative Disease Activity Index (UCDAI) ≥ 4 (152). All CD patients ingested 2,500 TSO every 3 weeks for 24 weeks; UC received either 2,500 TSO or placebo orally at 2-weeks intervals for 12 weeks. At the conclusion of the studies, 79.3% CD patients responded (decrease in CDAI > 100 points or CDAI < 150) and 72.4% remitted (CDAI < 150). Regarding UC patients, although remission rates between the two groups were not significantly different, improvement of the UCDAI occurred in 43.3% patients with ova treatment compared with 16.7% given placebo. In both studies no side effects were reported. Although *T. suis* immunoregulatory mechanisms were not studied in these trials, it is assumed that it notably involves a modulation of Th1, Th2, Treg and Th17 subsets as suggested in murine models.

In October 2013, the TRUST-I phase 2 clinical trial (154) evaluating TSO treatment (7,500 ova every 2 weeks for 12 weeks) *versus* placebo in 250 moderate-to-severe CD patients failed to reach its primary (100-point CDAI decrease) and key secondary (achieving CDAI < 150) endpoints. Despite these discouraging results, the authors assume, according to subgroups analysis, that the effectiveness of TSO could be higher in severe patients (CDAI > 290). Several clinical trials using TSO in IBD patients are provided (listed in (94,155)). Furthermore, the human hookworm *Necator americanus* (*N. americanus*) is suggested as an alternative to *T. suis* since it is easier to use due to longer-lasting effects (156) and it appears to be well tolerated (157).

3.2 – La sclérose en plaques (SEP)

De nombreuses études (103,105,120,128,158–164) menées chez des souris atteintes d'EAE, le modèle animal principal de SEP, ont mis en évidence l'intérêt des thérapies dérivées d'helminthes dans cette maladie. En effet, le traitement préalable des souris avant l'induction de l'EAE avec soit des œufs (161), des cercaires (159) ou des antigènes (163) de *S. mansoni* a conduit à une réduction significative de l'incidence et de la gravité de la maladie mesurée par des scores cliniques et par l'inflammation du système nerveux central (SNC). Cet effet protecteur a été associé à une diminution de l'IL-12, du TNF- α et de l'IFN- γ , et à une production accrue d'IL-4, d'IL-10 et de TGF- β . Il est intéressant de noter chez les souris infectées une augmentation de l'infiltration du SNC par des LT sécréteurs d'IL-4 spécifiques du neuroantigène et une diminution des infiltrats de macrophages et de LT CD4+. De même, le prétraitement de rats Dark Agouti avec des produits d'ES de *T. spiralis* (ES-L1) (103,164) avant l'induction de l'EAE améliore la gravité clinique et histologique de l'EAE d'une manière dose-dépendante. Les mécanismes impliquent une inhibition des cytokines Th1 et Th17 (IFN- γ , IL-17) et une promotion des cytokines de type Th2 (IL-4, IL-10) et du TGF- β ainsi qu'une expansion des cellules Treg. De plus, le transfert de cellules T spléniques de rats infectés par *T. spiralis* chez des rats EAE reproduit dans certains cas la protection contre le développement de la maladie. Comme indiqué précédemment (voir §I-2.3.2), l'injection 7 jours avant l'induction de l'EAE de CD stimulées avec le produit de *T. spiralis* ES-L1 (120) a également permis d'améliorer la maladie en augmentant le nombre de LTreg et les niveaux de sécrétion de l'IL-4, l'IL-10 et du TGF- β , et en baissant ceux de l'IFN- γ et de l'IL-17, tant au niveau systémique que dans les organes cibles.

Par ailleurs, plusieurs études ont démontré l'intérêt des infections à *H. polygyrus* (128), *Trichinella pseudospiralis* (*T. pseudospiralis*) (105), *S. japonicum* (165), *Fasciola hepatica* (*F. hepatica*) (162) et *Taenia crassiceps* (*T. crassiceps*) (160) pour prévenir ou retarder l'apparition, et améliorer la gravité de l'EAE.

3.2 – Multiple sclerosis (MS)

Many studies (103,105,120,128,158–164) conducted in EAE mice, the main animal model of MS, have highlighted the interest of helminth-derived therapies in this disease. Indeed, prior treatment of mice before EAE induction with either *S. mansoni* ova (161), cercariae (159) or antigen (163) significantly reduced the incidence as well as the severity of EAE as measured by clinical scores and central nervous system (CNS) inflammation. This protective effect was associated with decreased IL-12, IFN- γ , TNF- α production and higher IL-4, IL-10 and TGF- β levels in periphery. It is of interest to note that increased IL-4 producing neuroantigen-specific T-cells and reduced macrophages and CD4+ T-cells infiltration was observed in the CNS of infected mice as compared to controls. Similarly, pretreatment of EAE Dark Agouti rats with *T. spiralis* ES products (ES-L1) (103,164) ameliorated the clinical and histological severity of induced EAE in a dose-dependent way. The mechanisms involved an inhibition of Th1 and Th17-cytokines (IFN- γ , IL-17) and a promotion of Th2-cytokines (IL-4, IL-10) and TGF- β , as well as the induction of Treg cells. Transfer of splenic T-cells from *T. spiralis*-infected rats into EAE rats reproduced in some cases protection from disease development. As previously reported (see §I-2.3.2), injection of DC stimulated with *T. spiralis* ES-L1 products 7 days before EAE induction (120) was also found to ameliorate EAE by increasing IL-4, IL-10, TGF- β and Treg levels and decreasing IFN- γ and IL-17 production both at a systemic level and in target organs.

Otherwise, several studies have demonstrated the benefit of *H. polygyrus* (128), *Trichinella pseudospiralis* (*T. pseudospiralis*) (105), *S. japonicum* (165), *Fasciola hepatica* (*F. hepatica*) (162) and *Taenia crassiceps* (*T. crassiceps*) (160) infections to prevent or delay the onset and improve EAE severity.

Ces effets résultent de l'inhibition des réponses Th1 et Th17, de la diminution des sécrétions d'IFN- γ , TNF- α , IL-6 et IL-17 avec une réduction de l'infiltrat inflammatoire du SNC, d'une production accrue de cytokines de type Th2 (IL-4, IL-10) et d'une hausse de la prolifération des Breg, Treg, macrophages M2 et CD tolérogènes.

À ce jour peu d'études ont évalué le potentiel thérapeutique des helminthes chez des patients atteints de SEP. Les observations les plus pertinentes ont été rapportées par Correale *et al* (130,166,167) à travers plusieurs études prospectives comparant une série de 12 patients atteints de SEP naturellement infectés par différentes espèces d'helminthes (*Hymenolepis nanan*, *Trichuris trichura*, *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis* et *Enterobius vermicularis*) avec 12 patients ayant une SEP, non-infectés, ainsi qu'avec des sujets infectés sans SEP et des sujets sains. Les auteurs ont évalué les caractéristiques cliniques, radiologiques et immunologiques de chaque groupe de patients avec un suivi de 4,6 ans étendu à 7,5 ans dans un rapport ultérieur. Au cours de la période initiale de 4,6 ans (166), les patients ayant une SEP infectés ont présenté un nombre significativement plus faible de rechutes, des scores d'invalidité réduits et une activité moindre de la maladie à l'IRM par rapport aux sujets non infectés. Les patients infectés présentaient des niveaux plus faibles d'IL-12 et d'IFN- γ et accrus d'IL-10 et de TGF- β . En outre, le nombre de LTreg et de lymphocytes Breg sécrétant de l'IL-10 était significativement augmenté chez les patients parasités par rapport aux autres groupes (130). Fait intéressant, ces cellules Breg produisaient également de plus grandes quantités de Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) et Nerve Growth Factor (NGF), ayant potentiellement un rôle neuroprotecteur sur le SNC (127). Le traitement anti-helminthique administré chez 4 des 12 patients en raison de symptômes gastro-intestinaux (167) a conduit à une élévation significative de l'activité clinique et radiologique de la SEP et des taux d'IFN- γ et d'IL-12 de même qu'à une baisse des LTreg, du TGF- β et de l'IL-10, visibles trois mois après l'introduction du traitement anti-helminthique.

These effects result from inhibition of Th1- and Th17-responses with lower IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17 secretion, reduction of CNS inflammatory infiltrate, enhanced Th2-cytokines production (IL-4, IL-10), and proliferation of Breg, Treg, M2-macrophages and tolerogenic DC populations.

To date few studies have evaluated the therapeutic potential of helminthes in MS patients. The most noteworthy observations were reported by Correale *et al* (130,166,167) through several prospective studies comparing a series of 12 patients with MS naturally infected with different species of helminthes (*Hymenoleptis nanan*, *Trichuris trichura*, *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis* and *Enterobius vermicularis*) with 12 non-infected MS patients as well as with infected patients without MS and healthy subjects. The authors assessed the clinical, radiological and immunological characteristics of each group of patients with a 4.6-year follow-up extended to 7.5 years in a later report. During the initial 4.6-year follow-up period (166), parasite-infected MS patients showed significantly lower number of relapses, reduced disability scores, and lower Magnetic Resonance Imaging (MRI) activity compared to uninfected MS subjects. Infected patients showed higher IL-10 and TGF- β and lower IL-12 and IFN- γ secreting cells levels. Moreover, Treg and IL-10-secreting Breg cells were significantly increased in parasite-infected patients compared to other groups (130). Interestingly, these Breg cells were also found to produce greater amounts of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and Nerve Growth Factor (NGF) raising the possibility that these cells may exert a neuroprotective effect on the CNS (130). Anti-helminthic treatment of 4 of the 12 patients administrated due to gastrointestinal symptoms (167) led to significant rise in clinical and radiological MS activities and in the number of IFN- γ and IL-12 producing cells together with a fall in the levels of Treg cells and TGF- β and IL-10-secreting cells that became evident 3 months after anti-helminthic treatment began.

Une étude de tolérance de phase 1 (phase 1 Helminthes-induced Immunomodulatory Therapy – HINT-1) (168) inoculant 2,500 TSO par voie orale toutes les 2 semaines pendant 3 mois chez 5 patients présentant une SEP rémittente a rapporté de légers effets secondaires gastro-intestinaux. Le nombre moyen de nouvelles lésions en IRM est passé de 6,6 à l'inclusion à 2,0 après 3 mois d'administration des TSO et est remonté à 5,8 2 mois après la fin du traitement. Compte tenu de ces résultats encourageants, plusieurs essais cliniques sont déjà en cours ou prévus, y compris une extension de HINT-1 ainsi que de nombreuses études évaluant les TSO ou l'ankylostome *N. americanus* administré par voie cutanée en traitement de la SEP (études listées dans (94,155,169)).

A safety phase-1 study (phase 1 Helminthes-induced Immunomodulatory Therapy – HINT-1) (168) inoculating 2,500 TSO orally every 2 weeks for 3 months in 5 relapsing-remitting MS (RRMS) patients reported mild gastrointestinal side effects. The mean number of new MRI lesions fell from 6.6 at baseline to 2.0 after 3 months of TSO administration and rose again to 5.8 at 2 months after the end of the study. In view of these encouraging results, several clinical trials are already underway or planned, including an extension of HINT-1 as well as numerous studies evaluating TSO or dermally-administrated hookworm *N. americanus* as therapies in MS patients (listed in (94,155,169)).

3.3 – La polyarthrite rhumatoïde (PR)

Plusieurs thérapies dérivées d'helminthes ont été expérimentées dans des modèles murins de PR, la glycoprotéine de filaire ES-62 étant la mieux caractérisée (170). Cependant à ce jour, aucune molécule d'helminthe n'a fait l'objet d'essais cliniques dans la PR.

L'ES-62 est une glycoprotéine tétramérique contenant de la phosphorylcholine (PC) sécrétée par le nématode filaire du rongeur *A. vitae*, et décrite pour la première fois en 1989 (171). Il y a maintenant dix ans, cette glycoprotéine a été utilisée avec succès sur un modèle murin de PR réduisant de façon significative la survenue, la sévérité et la progression de l'AIC chez la souris DBA/1 (113). Depuis lors, les mécanismes de protection de l'ES-62 dans ce modèle murin ont été spécifiés par Harnett *et al* au travers de plusieurs expériences (107,127,172–174).

Ainsi, l'ES-62 inhibe les réponses Th1 et Th17, entraînant une diminution des taux d'IFN- γ , TNF- α , IL-6 et IL-17 à la fois dans les ganglions lymphatiques et les articulations des souris. En ce qui concerne la réponse Th-17, l'ES-62 inhibe la production d'IL-17 à la fois par les cellules innées (LT $\gamma\delta$) et adaptatives (LTh17), par des mécanismes CD-dépendants et indépendants (107). Il diminue la production d'anticorps IgG2a spécifiques du collagène et réduit l'activation, la prolifération et l'infiltration dans les articulations des cellules B effectrices, en particulier des plasmocytes (127). Inversement, l'ES-62 accroît la production d'IL-10 par les splénocytes et rétablit les taux de cellules Breg productrices d'IL-10 (127). L'IL-22 présente une double fonction au cours de l'AIC. En effet, tandis qu'elle exerce un effet pathogène au cours de la phase d'initiation, l'IL-22 contribue à résoudre l'inflammation et les lésions articulaires lorsque la maladie est établie. L'exposition à l'ES-62 *in vivo* supprime le pic précoce d'IL-22 puis induit une forte expression dans un second temps, les taux sériques d'IL-22 étant alors corrélés inversement avec les scores articulaires (173). Enfin, l'ES-62 est capable de moduler les CD pour promouvoir une réponse de type Th2.

3.3 – Rheumatoid arthritis (RA)

Several helminthic products with immunomodulatory properties have been experienced in mice models of RA, the filarial-derived glycoprotein ES-62 being the best characterized (170). However so far no helminth-derived molecule have been used in RA clinical trials.

ES-62 is a tetrameric phosphorylcholine (PC)-containing glycoprotein secreted by the rodent filarial nematode *A. vitae* first described in 1989 (171). A decade ago, this glycoprotein has been demonstrated to significantly reduce the initiation, severity and progression of CIA in DBA/1 mice, a murine model of RA (113). Since then, its protective mechanisms in CIA mice have been specified by Harnett *et al* through several experiments (107,127,172–174).

Thus ES-62 inhibits Th1- and Th17-responses resulting in decreased levels of IFN- γ , TNF- α , IL-6 and IL-17 both in draining lymph nodes and joints of CIA animals. Regarding Th-17 response, ES-62 down-regulates IL-17 production by both innate ($\gamma\delta$ T cells) and adaptive (Th17 CD4⁺ cells) cells via DC-dependent and independent mechanisms (107). It decreases collagen-specific IgG2a antibodies production and reduces effector B-cells, particularly plasma cells, activation, proliferation and joints infiltration (127). Conversely, ES-62 was found to up-regulate IL-10 production by splenocytes and to restore IL-10-producing Breg cells levels in CIA mice (127). IL-22 plays a dual role in CIA, being pathogenic during the initiation phase while acting to resolve inflammation and joint damage during established disease. Exposure to ES-62 in vivo suppressed the early peak of IL-22 but induced strong expression at later time points, serum levels of IL-22 correlating inversely with articular scores (173). Finally, ES-62 is also able to modulate DC to promote a Th2-response.

De façon intéressante, la plupart des actions anti-inflammatoires de l'ES-62 au cours de l'AIC ont été attribuées à son fragment PC (172). En effet, la molécule ES-62 ainsi qu'un conjugué de PC-ovalbumine ont tous deux permis de réduire la gravité de l'AIC en inhibant la production de cytokines Th1, tandis qu'une forme recombinante d'ES-62 sans PC n'a eu aucun effet sur la progression de l'AIC. Les actions anti-inflammatoires de ES-62 ont été perdues avec le composé sans PC à la fois dans les modèles animaux d'AIC et sur les tissus synoviaux de patients atteints de PR. En outre, un analogue de la PC contenant de la sulfone (11a) a été conçu et a démontré son efficacité en protégeant les souris DBA/1 contre le développement de l'AIC (174).

En dehors du produit de sécrétion d'*A. vitae*, plusieurs helminthes, notamment *S. mansoni* (106), *H. diminuta* (175), *F. hepatica* (176), *S. japonicum* (177), *H. polygyrus* et *Nippostrongylus brasiliensis* (178) ont empêché efficacement le développement d'arthrite dans des modèles murins de PR par l'inhibition de la sécrétion de cytokines Th1/Th17, l'induction de CD tolérogènes et la promotion de la prolifération des cellules Treg.

Interestingly, most of the anti-inflammatory actions of ES-62 in CIA have been shown to be related to its PC moiety (172). Indeed, the whole ES-62 molecule and a PC-ovalbumine conjugate successfully reduced the disease severity by suppressing Th1-cytokines production while a PC-free recombinant form of ES-62 failed to prevent CIA progression. Both in CIA animal models and synovial tissues from patients with RA, the anti-inflammatory actions of ES-62 were lost without the PC compound. Furthermore, a sulfone-containing PC analogue (11a) was designed and demonstrated to be effective in protecting DBA/1 mice from developing CIA (174). Apart from *A. vitae* secretory product, several helminthes, including *S. mansoni* (106), *H. diminuta* (175), *F. hepatica* (176), *S. japonicum* (177), *H. polygyrus* and *Nippostrongylus brasiliensis* (178), have been demonstrated to effectively prevent RA-like disease in mice models through inhibition of Th1/Th17 cytokines secretion, induction of tolerogenic DC and promotion of Treg cells proliferation.

3.4 – Le diabète de type-1 (DT1)

Aucun essai clinique utilisant des thérapies dérivées d'helminthes n'a jusqu'ici été mené chez des patients ayant un DT1. Cependant, un grand nombre de données expérimentales issues des souris Non-Obese Diabetic (NOD) (108–112,114,179–182), le modèle murin de DT1, suggèrent l'efficacité thérapeutique des helminthes en particulier en ce qui concerne *S. mansoni* (110–112,179,180).

Cooke *et al* (179) furent les premiers à mettre en lumière l'efficacité de l'infection à *S. mansoni* comme traitement préventif chez les souris NOD. En effet, l'infection avec des cercaires ou des SEA de *S. mansoni* réduisait significativement l'incidence spontanée du diabète et empêchait la commutation de classe IgM à IgG des auto-anticorps anti-insuline normalement observée dans la plupart des souris NOD à l'approche du diabète patent.

Les auteurs reproduisirent par la suite cet effet protecteur dans une série d'expériences en en spécifiant les mécanismes (110–112,180). Les SEA de *S. mansoni* lorsqu'ils sont administrés à des souris âgées de 4 semaines préviennent totalement l'apparition du DT1 (110). Il a été montré une expansion des cellules Treg TGF- β -dépendante, ainsi que des cellules Th2 s'accompagnant d'une augmentation de la sécrétion d'IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13. En outre, les LT de souris traitées par SEA présentent une capacité réduite à transférer le diabète à des souris NOD-DICS (déficit immunitaire combiné sévère). Les souris NOD sont connues pour avoir un déficit en cellules NKT V alpha 14i, l'expansion de cette population prévenant l'apparition du diabète (183). Les SEA de *S. mansoni* augmentent le nombre de cellules NKT V alpha 14i. Ils induisent également une modulation des CD, qui sécrètent plus d'IL-10 et moins d'IL-12. Récemment ω -1, l'une des deux glycoprotéines majeures sécrétées par les œufs de *S. mansoni*, a été montrée être à l'origine de ses effets (112).

3.4 – Type-1 diabetes (T1D)

No clinical trial using helminth-derived therapies has so far been conducted in T1D patients. However, a large body of experimental data from Non-Obese Diabetic (NOD) mice (108–112,114,179–182), the murine model of T1D, suggest their effectiveness especially regarding *S. mansoni* (110–112,179,180).

Cooke *et al* (179) were the first to suggest the interest of *S. mansoni* infection as a preventive treatment in NOD mice. Infection with *S. mansoni* cercariae or SEA significantly reduced the spontaneous incidence of diabetes and prevented the class switch from IgM to IgG anti-insulin autoantibodies normally seen in most NOD mice as they approach overt diabetes. They subsequently reproduced this protective effect in a series of experiments by specifying its mechanisms (110–112,180). *S. mansoni* SEA completely prevented the occurrence of T1D when injected to 4-week old NOD mice (110). It was shown to expand Treg cells in a TGF- β dependent manner and Th2 cells with increased secretion of IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13. Moreover, T-cells from SEA-treated mice exhibited reduced ability to transfer diabetes to NOD-SCID (severe combined immunodeficiency) recipients. NOD mice are known to have deficiency in V alpha 14i NKT cells, the expansion of this population preventing diabetes onset (183). *S. mansoni* SEA increased the number of V alpha 14i NKT cells. It also induced functional changes in DC, found to secrete more IL-10 and less IL-12. Recently ω -1, one of the two major glycoproteins secreted by *S. mansoni* ova, was demonstrated to be responsible for its effects (112).

Plusieurs études ont également mis en évidence l'efficacité d'*H. polygyrus* (108,181), *T. spiralis* (108), *L. sigmodontis* (109,114), et d'un antigène recombinant (rDiAg) de *Dirofilaria immitis* (*D. immitis*) (182) pour prévenir l'apparition du diabète chez la souris NOD, notamment en provoquant une réponse de type Th2 et en promouvant la prolifération des cellules Treg, empêchant ainsi considérablement le développement de l'insulite pancréatique.

Several studies also evidenced the efficacy of *H. polygyrus* (108,181), *T. spiralis* (108), *L. sigmodontis* (109,114), and *Dirofilaria immitis* (*D. immitis*) recombinant antigen (rDiAg) (182) to completely prevent the occurrence of diabetes in NOD mice especially by eliciting a Th2-type response and promoting the proliferation of Treg cells, thereby markedly inhibiting pancreatic insulinitis.

3.5 – Autres maladies auto-immunes

Les données expérimentales et cliniques évaluant la thérapie par les helminthes dans d'autres conditions inflammatoires chroniques sont rares.

En ce qui concerne la maladie cœliaque, une étude contrôlée contre placebo en double aveugle (184) a étudié les effets d'inoculations cutanées de *N. americanus* chez 10 patients comparé à 10 patients non-infectés. Les vaccinations avec 15 larves de troisième stade ont été réalisées aux semaines 0 et 12, et un test oral au gluten de cinq jours a été entrepris à la semaine 20. Aucune diminution significative de la gravité des symptômes n'a été observée chez les sujets infectés par rapport aux patients non infectés. Toutefois, les données immunologiques de l'essai clinique analysées dans une étude ultérieure (185) ont montré une inhibition des réponses Th1 et Th17 dans le duodénum des patients infectés par l'ankylostome avec une diminution de la production d'IFN- γ et d'IL-17A. Les auteurs ont émis l'hypothèse que la dose d'ankylostome utilisée dans l'essai pourrait être insuffisante pour réprimer efficacement la maladie.

Dans la maladie de Basedow, l'utilisation prophylactique de produits de *S. mansoni* dans un modèle murin avant l'induction de la maladie a empêché son développement par une polarisation Th2 (186). Cet effet était associé à une diminution des anticorps anti-TSHR (Thyroid Stimulating Hormone Receptor) de la sous-classe IgG2a et des taux d'IFN- γ , ainsi qu'à une augmentation de la prolifération des LTreg.

Enfin, une étude (187) réalisée sur le modèle murin de psoriasis fsn/fsn a démontré l'efficacité d'un traitement sous-cutané utilisant un glycanes de *S. mansoni* (LNFPIII) pour prévenir l'apparition des lésions psoriasiques cutanées. Les cellules cutanées provenant de souris traitées par LNFPIII sécrétaient des quantités moindres d'IFN- γ et des taux plus élevés d'IL-13 par rapport aux souris témoins, objectivant un déplacement vers une réponse de type Th2. Par ailleurs, il faut noter que plusieurs essais cliniques utilisant les TSO sont prévus dans le psoriasis (94,155).

3.5 – Other immune-mediated diseases

Experimental and clinical data evaluating helminth therapy in other chronic inflammatory conditions are scarce. Regarding celiac disease, a double-blinded placebo-controlled study (184) explored the effects of *N. americanus* cutaneous inoculations in 10 patients compared with 10 non-infected patients. Inoculations of 15 third-stage larvae were performed at week-0 and -12, and a five-day oral gluten challenge was undertaken at week-20. No significant reduction in symptoms severity was seen in infected subjects compared to non-infected patients. However, immunological data from the clinical trial analyzed in a subsequent study (185) found that basal Th1- and Th17-responses were inhibited in the duodenum of hookworm-infected patients with decreased IFN- γ and IL-17A production. The authors hypothesized that the infective dose of hookworms used in the trial may be insufficient to effectively suppress the immunopathology of celiac disease.

In Grave's disease, prophylactic use of *S. mansoni* products homogenate in a mouse model prior to disease induction prevented its development by a Th2 polarization (186). It was associated with decreased IgG2a subclass anti-TSHR (Thyroid Stimulating Hormone Receptor) antibodies production, lower IFN- γ levels and enhanced Treg proliferation.

Finally, one experiment (187) conducted on the fsn/fsn mouse model of psoriasis demonstrated the efficacy of subcutaneous *S. mansoni* LNFPIII glycan treatment to prevent the appearance of psoriatic skin lesions as compared with control mice. Skin cells from LNFPIII-treated mice secreted lower amounts of IFN- γ and increased levels of IL-13, evidencing a shift toward a Th2-type response. Meanwhile, it is to note that several clinical trials using TSO are planned in psoriasis (94,155).

4. Le lupus érythémateux disséminé

4.1 – Un challenge thérapeutique

Le lupus érythémateux disséminé (LED) est une MAI chronique caractérisée par une atteinte multi-viscérale, allant de manifestations relativement bénignes à des complications graves voire mortelles telles que la néphropathie lupique (classification), les atteintes neuropsychiatriques et cardiaques, associée à un vaste profil d'auto-anticorps (188). Le LED est présent dans le monde entier, bien que l'incidence et la prévalence divergent selon les zones géographiques, respectivement de 1 à 20/100 000 et de 20 à 200/100 000 habitants, les femmes étant neuf fois plus affectées que les hommes (189). Malgré que la survie 5 ans après le diagnostic du LED ait augmenté de <50% dans les années 1950 à environ 95% dans les études les plus récentes (190–192), tous les pays n'ont pas profité de manière égale de cette amélioration du pronostic, la probabilité de survie étant significativement plus faible dans de nombreux pays en voie de développement. Les ratios standardisés de mortalité (standardized mortality ratios, SMR) pour les patients atteints de LED restent 2 à 4 fois plus élevés par rapport à la population générale et le taux de mortalité est 2 à 3 fois plus élevé dans certains groupes ethniques (189). Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires qui sous-tendent la pathogénie des MAI a conduit à la mise au point de nouveaux traitements biologiques ciblés, venant s'ajouter à l'arsenal des anciennes drogues immunosuppressives (193). Néanmoins les thérapies existantes, en dépit d'être efficaces pour contrôler l'activité de la maladie, offrent rarement une rémission à long terme. De plus la toxicité médicamenteuse contribue largement à la morbidité et à la mortalité constatées dans cette maladie.

Par conséquent, il apparaît nécessaire de développer de nouvelles approches thérapeutiques dans le LED. Dans cette quête de nouvelles stratégies, les thérapies dérivées des helminthes offrent un potentiel prometteur.

4. Systemic lupus erythematosus

4.1 – A therapeutic challenge

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune disorder characterized by a multisystem organ involvement ranging from relatively mild manifestations to severe or life-threatening complications, such as lupus nephritis, neuropsychiatric disorders and cardiac involvement, associated with a wide profile of autoantibodies (188). SLE affects people worldwide, though the incidence and prevalence may diverge according to the countries from 1 to 20/100,000 and from 20 to 200/100,000 respectively, with women being affected nine times as much as men (189). Despite the probability of surviving 5 years after diagnosis of SLE has increased from < 50% in the 1950s to about 95% in the most recent studies (190–192), all countries have not shared equally in this improved prognosis, with significantly lower survival probabilities in many developing countries. The standardized mortality ratios (SMR) for SLE patients remain 2–4-fold higher compared to the general population, with death rate 2–3-fold higher in some ethnic groups (189). Improved understanding of the molecular mechanisms underlying the pathogenesis of autoimmune diseases has led to the development of new-targeted biological treatments adding to the arsenal of old immunosuppressive drugs (193). Nevertheless, existing therapies for SLE, despite being effective in suppressing disease activity, rarely offer long-term remission. Moreover medication-related toxicity contributes to morbidity and mortality of this disease.

Therefore, there is a need for novel approaches in SLE. In the quest for new therapeutic strategies, helminth-derived therapies offer promising potentials.

4.2 – Lupus et infections parasitaires

A ce jour, aucune étude clinique n'a évalué les thérapies dérivées des helminthes dans le traitement du LED. Toutefois, certaines données de la littérature suggèrent un effet bénéfique des infections parasitaires dans le LED.

Greenwood fut le premier il y a près d'un demi siècle à corrélérer une moindre incidence de plusieurs MAI au Nigéria, dont le LED, avec la fréquence accrue des infections parasitaires dans ce pays, suggérant un effet protecteur des parasites sur les désordres inflammatoires chroniques (20). Il confirma par la suite ses observations en démontrant que l'infection du modèle de souris lupique (New Zealand Black x New Zealand White/F1) (NZBxW/F1) avec le parasite du paludisme du rongeur *Plasmodium berghei* prévenait l'apparition de la maladie (21).

L'effet protecteur de la malaria sur le développement du LED a depuis été étayé à la fois par des données épidémiologiques, montrant une faible prévalence du LED dans les zones d'endémie du paludisme (194–196), et sur différents modèles murins de LED (197,198).

En 2004, Chen *et al* (199) montrent chez la souris lupique NZBxW/F1 un effet protecteur de l'infection à *Toxoplasma gondii*. En effet, les souris infectées présentent une réduction significative de la sévérité de la néphrite lupique ainsi qu'une espérance de vie prolongée. Cet effet s'accompagne d'une diminution des taux d'auto-anticorps anti-ADN et des cytokines de type Th1 et Th2 (IFN- γ et IL-10).

Récemment, une étude (200) a pour la première fois analysé les effets de l'infection de souris lupiques MRL/lpr par un helminthe, le trematode *S. mansoni*. Les résultats ont montré une modification complète du phénotype de la glomérulonéphrite lupique, évoluant d'une forme diffuse proliférative sévère Th1-médiée vers une forme membraneuse Th2-médiée de meilleur pronostic chez les souris infectées. Cet effet s'accompagnait d'une modulation du profil cytokinique favorisant une réponse de type Th2, avec des niveaux augmentés notamment d'IL-4, IL-5, IL-10, et TGF- β .

4.2 – Lupus and parasitic infections

To date no clinical study has evaluated helminth-derived therapy in the treatment of SLE. However, some literature data suggest a beneficial effect of parasitic infections in SLE.

Greenwood was the first to correlate almost half a century ago a lower incidence of several autoimmune diseases including SLE in Nigeria with the increased frequency of parasitic infections in this country, suggesting a protective effect of parasites on chronic inflammatory disorders (20). He later confirmed his observations by demonstrating that infection of the NZBxW/F1 (New Zealand Black x New Zealand White/F1) lupus mice model with the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei* prevented the occurrence of the disease (21).

The protective effect of malaria on the development of SLE has since been supported by both epidemiological data showing a low prevalence of SLE in malaria endemic areas (194–196) and experimental data from various lupus murine models (197,198).

In 2004, Chen *et al* (199) demonstrate in NZBxW/F1 lupus prone mice a protective effect of *Toxoplasma gondii* infection. Indeed, infected mice show a major decrease in lupus nephritis severity as well as extended life expectancy. This effect is accompanied by a reduction in anti-DNA autoantibodies rates and in Th1 and Th2 cytokines production (IFN- γ and IL-10).

A recent study (200) analyzed for the first time the effects of MRL/lpr lupus mice infection with an helminth, that is the trematode *S. mansoni*. The infection completely changed the phenotype of glomerulonephritis in MRL/lpr mice, switching from a severe diffuse proliferative Th1-mediated pattern towards a membranous Th2-mediated nephritis associated with better prognosis in infected mice. This effect was associated with a modulation of cytokine profile shifting Th balance from Th1 to Th2 response, with increased levels of IL-4, IL-5, IL-10, and TGF- β .

Ces données encourageantes, ainsi que le large faisceau d'études cliniques et expérimentales démontrant l'intérêt des thérapies dérivées des helminthes dans les MAI nous ont amenés à évaluer les effets du TPC (Tuftsin-Phosphorylcholine), un composé - que nous détaillerons plus loin - à base de tuftsin (T) et d'un dérivé d'helminthe, la phosphorylcholine (PC) dans le modèle murin de lupus NZBxW/F1.

Le modèle de souris NZBxW/F1 est le plus ancien modèle de LED. Les souris développent un phénotype sévère comparable à celui des patients atteints de LED, avec des adénopathies, une splénomégalie, des auto-anticorps antinucléaires élevés incluant des anticorps anti-ADNdb (ADN double brin) de type IgG, et une glomérulonéphrite avec dépôts de complexes immuns se manifestant à 5-6 mois d'âge et conduisant à une insuffisance rénale et au décès à l'âge de 10-12 mois (201).

These encouraging data and the broad cluster of clinical and experimental studies demonstrating the benefits of helminth-derived therapies in autoimmune diseases led us to evaluate the effects of TPC (tuftsin-Phosphorylcholine), a compound - detailed later - containing tuftsin (T) together with phosphorylcholine (PC), a helminth-derivative, in the NZBxW/F1 mouse model of lupus.

The NZBxW/F1 mice we used is the oldest classical model of SLE. It develops severe lupus-like phenotype comparable to that of SLE patients, with lymphadenopathies, splenomegaly, elevated serum antinuclear autoantibodies including anti-dsDNA (double stranded DNA) IgG, and immune complex-mediated glomerulonephritis that becomes apparent at 5-6 months of age, leading to kidney failure and death at 10–12 months of age (201).

5. Le composé Tuftsin-Phosphorylcholine (TPC)

Notre étude vise à évaluer une nouvelle approche thérapeutique qui repose sur un dérivé d'helminthe, la phosphorylcholine (PC), combiné à un adjuvant naturel, la tuftsin (T).

5.1 – La phosphorylcholine (PC)

Depuis plusieurs années, les avancées scientifiques ont permis l'identification de certains des composants des helminthes actifs sur le système immunitaire, notamment les produits d'excrétion-sécrétion (ES) produits par les helminthes (202).

Il y a vingt ans, Harnett *et al* décrivaient l'ES-62 (171), une glycoprotéine sécrétée par un nématode du rongeur, *Acanthocheilonema vitae*, ainsi que ses nombreuses propriétés immunomodulatrices anti-inflammatoires (203,204). La première utilisation de l'ES-62 en 2003 (113) sur un modèle murin de PR, l'AIC de la souris DBA/1, a permis une réduction majeure de l'incidence de la maladie, mais également de sa sévérité et de sa progression lors de stades plus avancés. Des études ultérieures (107,127,173) ont confirmé ces résultats en précisant les mécanismes impliqués (voir §I-3.3). Cela inclut une diminution des réponses Th1/Th17, réduisant les sécrétions d'IFN- γ , TNF- α , IL-6 et IL-17 (107), et la modulation de la production d'IL-22 au cours de la maladie (173). Par ailleurs, on observe une inhibition de l'activation, la prolifération, la production d'IgG2a et l'infiltration articulaire des cellules B effectrices, en particulier des plasmocytes (127). Inversement, l'ES-62 favorise la production d'IL-10, et la différenciation des cellules Breg productrices d'IL-10 (127) et des CD tolérogènes (205,206).

5. Tuftsin-Phosphorylcholine compound (TPC)

Our current study aims to investigate a novel therapeutic approach based on a helminth derivative, namely phosphorylcholine (PC), combined with a natural adjuvant, that is tuftsin (T).

5.1 – Phosphorylcholine (PC)

For several years, scientific progresses have led to the identification of some of the helminthes' components active on the immune system, including excretory-secretory (ES) helminth products (202).

Twenty years ago, Harnett *et al* described ES-62 (171), a glycoprotein secreted by the rodent nematode *Acanthocheilonema vitae*, and its numerous anti-inflammatory immunomodulating properties (203,204). The first application of ES-62 in 2003 (113) in the DBA/1 RA mouse model resulted in a dramatic reduction in incidence as well as severity and progression of the CIA. Subsequent studies (107,127,173) confirmed these results by specifying the mechanisms involved (see §I-3.3). It includes a reduction in Th1/Th17 responses resulting in reduced secretion of IFN- γ , TNF- α , IL-6 and IL-17 (105) and modulation of IL-22 production during the disease. Furthermore, an inhibition of effector B-cells activation, proliferation, IgG2a production and articular infiltration is reported, especially regarding plasma cells. Conversely, ES-62 promotes the production of IL-10, and differentiation of IL-10-producing Breg cells and tolerogenic DC.

Il a été récemment établi (172,206) que les effets immunosuppresseurs de l'ES-62 sont liés à la PC qui l'entoure et qui est fixée de façon covalente par des *N*-glycanes. En effet, la PC conjuguée à l'albumine ou même seule peut reproduire les résultats obtenus avec l'ES-62. Appuyant cette observation, Harnett *et al* (174) ont retrouvé en 2013 les effets bénéfiques précédemment constatés avec l'ES-62 sur les souris DBA/1 grâce à un analogue synthétique de la PC sulfoné (11a).

A noter que l'ES-62 n'est pas produit uniquement par *A. vitae*, mais a des homologues proches sécrétés par d'autres nématodes filaires tels que *Brugia malaya*, *Brugia pahangi*, *Onchocerca volvulus* et *Loa-Loa*; cependant il n'est pas trouvé chez les nématodes libres (207).

La PC a été détectée pour la première en 1967 dans la bactérie à Gram positif *Streptococcus pneumoniae* (208). Depuis lors, la PC est largement reconnue comme étant un composant associé aux hydrates de carbone de nombreux agents pathogènes procaryotes et eucaryotes (209,210), ainsi qu'un constituant ubiquitaire des phospholipides des membranes cellulaires. Dans ce dernier cas, la PC est exposée lorsque les phospholipides sont oxydés sur les cellules apoptotiques, ou sur les phospholipides générés par l'oxydation des LDL (low density lipoproteins). Chez les nématodes, la PC peut être liée à des glycolipides ou à des glycoprotéines (211). Lorsqu'elle est liée aux antigènes de parasites, la PC possède de vastes propriétés immunomodulatrices permettant au nématode de manipuler le système immunitaire et donc de faciliter sa survie dans l'hôte parasite (211,212). Ainsi, la PC associée à l'ES-62, en plus de ses effets rapportés dans l'AIC, est capable de moduler les voies de signalisation des lymphocytes B et T, désensibilisant les voies du BCR et du TCR, d'orienter le développement des CD et des macrophages vers un phénotype régulateur, et d'inhiber la dégranulation des mastocytes (206,207,213–219).

Moreover, it has recently been demonstrated (172,206) that ES-62 immunosuppressive effects are related to its surrounding PC moieties that are covalently attached via *N*-type glycans to the molecule. Indeed, PC conjugated to albumin or even PC alone may mimic the results obtained with ES-62. Supporting this observation is the recent study of Harnett *et al* in 2013 (174) replicating the benefic effects previously found with ES-62 on DBA/1 mice with a synthetic sulfone-containing PC-analogue (11a).

It is noteworthy that ES-62 is not only produced by *A. vitae* but has close homologues secreted by other filarial nematodes such as *Brugia malaya*, *Brugia pahangi*, *Onchocerca volvulus* and *Loa-Loa*; however, it is not found in free-living nematodes (207).

PC was first detected in 1967 in the Gram-positive bacterium *Streptococcus pneumoniae* (208). Since then, PC is widely recognized as a carbohydrate-associated component of a wide variety of prokaryotic and eukaryotic pathogens (209,210), as well as an ubiquitous component of phospholipids constituting cell membranes. In the latter case, PC is exposed when phospholipids are oxidized on apoptotic cells, or on phospholipids generated by the oxidation of LDL (low density lipoprotein). In nematodes, PC has been found attached to both glycolipids and glycoproteins (211). Attached to parasite's antigens, PC exhibits broad immunomodulatory properties, rendering the filarial nematodes capable of manipulating the host's immune system and hence to aid their survival in the parasitized host (211,212). Thus, PC associated with ES-62, in addition to its effects reported in CIA was found to interfere with signaling pathways of B and T lymphocytes therefore desensitizing BCR/TCR signaling, to direct the development of DC and macrophages toward a regulatory phenotype, to promote proliferation of Treg cells and to inhibit mast cells degranulation (206,207,213–219).

L'ensemble de ces données nous a conduits à examiner le potentiel protecteur d'un composé à base de PC sur le développement du LED dans un modèle expérimental. Comme la PC est un composé naturel et une petite molécule naturelle non immunogène, nous l'avons conjuguée à la tuftsin, un adjuvant naturel du soi, et ainsi créé la molécule TPC (Tuftsin-PhosphorylCholine).

5.2 – La tuftsin (T)

La tuftsin (T) est un tétrapeptide immunostimulant physiologique naturel (Thr-Lys-Pro-Arg) initialement décrit par Najjar et Nishioka à l'Université de Tufts en 1970 (220). Elle est produite par clivage enzymatique du domaine Fc de la chaîne lourde d'IgG dans la rate (221).

La T est un composé possédant un large spectre d'activités biologiques. Elle promeut principalement l'activité phagocytaire des monocytes, macrophages et polynucléaires neutrophiles (PNN), mais exerce aussi des actions tumoricides et anti-microbiennes. Ainsi un déficit en T, héréditaire ou post-splénectomie, augmente la susceptibilité aux infections notamment à *Haemophilus influenza*, *Pneumococci*, *Meningococci* et *Salmonella* (222). Par ailleurs, la T et les peptides T-like possèdent d'autres effets immunostimulants, notamment en favorisant la migration, le chimiotactisme et la présentation antigénique des monocytes, macrophages et PNN. La T module également la réponse des LT en favorisant un profil de type Th2 et l'expansion des cellules Treg.

De façon intéressante, ces effets ont été observés *in vitro* sur des monocytes issus de patients ayant un LED (223), et *in vivo* dans des modèles murins de PR (224) et de SEP (225,226). Ainsi, la T et ses analogues ont augmenté significativement le chimiotactisme, la migration et l'activité phagocytaire de monocytes issus de patients lupiques, ces fonctions étant altérées au cours du LED (223). Au cours de l'EAE, la T améliore l'évolution clinique de la maladie en favorisant le passage d'une réponse de type Th1 (TNF- α) vers une réponse Th2 (IL-10), ainsi que l'expansion des cellules Treg (225).

Taken together, these data impelled us to examine the protective potential of PC-based compound on SLE development in an experimental model. Since PC is a small non-immunogenic natural molecule, we conjugated it to tuftsin, a self-natural adjuvant, and coined the molecule TPC (Tuftsin-PhosphorylCholine).

5.2 –Tuftsin (T)

Tuftsin (T) is a natural physiological immunostimulating tetrapeptide (Thr-Lys-Pro-Arg) initially described by Najjar and Nishioka at Tufts University in 1970 (220). It is produced by enzymatic cleavage of the Fc-domain of the heavy chain of IgG in the spleen (221).

T is a compound with a wide spectrum of biological activities. It mainly promotes phagocytic activity of monocytes, macrophages and neutrophils, and also exerts tumoricidal and anti-microbial actions. Thus its deficiency, either hereditary or following splenectomy, leads to increased susceptibility to infections caused by *Haemophilus influenza*, *Pneumococci*, *Meningococci* and *Salmonella* (222).

Moreover, T and T-like peptides exhibit other immunostimulatory effects, including increased migration, chemotaxis and antigen presentation of monocytes, macrophages and neutrophils. It also modulates T-cell response promoting a Th2 profile as well as expansion of Treg cells. Interestingly, these effects have been observed *in vitro* on monocytes derived from SLE patients (223), and *in vivo* in experimental model of RA (224) and MS (225,226). Thus, T and its analogues significantly increased defective chemotaxis, migration and phagocytosis of monocytes from SLE patients (223). During EAE, T improves clinical course of the disease by promoting a switch from a Th1 (TNF- α) to a Th2 response (IL-10), as well as cell expansion of Treg cells (225).

Par ailleurs, la T a été utilisée comme adjuvant dans des vaccins de nouvelle génération potentialisant l'immunogénicité de la molécule associée et ainsi les réponses cellulaires (227–230).

Dans notre étude les propriétés de stimulation de la phagocytose de la T ont un intérêt supplémentaire car il est démontré que l'un des principaux mécanismes physiopathologiques du LED implique une dérégulation de la clairance des déchets apoptotiques liée un défaut de phagocytose (231).

OBJECTIF DE L'ÉTUDE

En nous basant sur les vastes effets immunomodulateurs de la PC, nous avons élaboré une nouvelle molécule chimérique, constituée par la PC associée à la T comme adjuvant naturel. Puis nous avons évalué son intérêt thérapeutique en utilisant un modèle expérimental de LED, la souris NZBxW/F1.

Moreover, T has been used as an adjuvant in new generation vaccines potentiating immunogenicity of the associated molecule and thus cellular responses (227–230).

In our study T phagocytosis stimulatory properties is of additional interest since it has been demonstrated that one of the main pathophysiological mechanisms in SLE involves dysregulation of apoptotic debris clearance due to defective phagocytosis (231).

OBJECTIVE OF THE STUDY

Based on the immunomodulatory importance of PC, we constructed a novel chimeric molecule comprised with PC together with natural adjuvant T. Then we aimed to assess its therapeutic value by using a lupus experimental model, namely the NZBxW/F1 mice model.

II - MATÉRIELS et MÉTHODES

1. Souris et design de l'expérience

Les souris lupiques NZBxW/F1 âgées de 14-15 semaines ont été achetées auprès de Harlan-Netherlands. Les souris ont été maintenues dans un établissement d'hébergement des animaux conventionnel dans des cages à ventilation individuelle dans le Sheba Medical Center (Israël). Toutes les expériences ont été approuvées et exécutées selon les protocoles de la commission d'éthique du ministère israélien de la Santé No.696/11.

Les groupes de souris suivants ont été traités avec 5 µg/souris par voie sous-cutanée trois fois par semaine (N=15 pour chaque groupe) :

- **Tuftsine-Phosphorylcholine (TPC)** (synthétisé par le Professeur Fridkin, Département de chimie organique de l'Institut Weizmann des Sciences, Rehovot, Israël),
- **Phosphorylcholine (PC)** (Sigma-Aldrich L-4391 St Louis, MO, USA),
- **Tuftsine (T)** (synthèse peptidique GLS, Shanghai, Chine),
- **Phosphate Buffered Saline (PBS)** comme contrôle.

Le traitement a commencé à la semaine 14 avant que les manifestations cliniques ne soient observées.

2. Mesure de la protéinurie

Les urines ont été testées chaque semaine pour la protéinurie par un test semi-quantitatif en utilisant les bandelettes Bayer Multistix (Bayer, Fernwald, Allemagne). Les résultats ont été interprétés selon les instructions du fabricant. En bref, des échantillons d'urine ont été classés 0-4+, correspondant aux concentrations approximatives suivantes de protéines: 0 = négatif ou trace, 1+ = 30 mg/dl, 2+ = 100 mg/dl, 3+ = 300 mg/dl et 4+ ≥ 2000 mg/dl. La présence d'une néphropathie a été définie semi-quantitativement comme la présence d'une protéinurie de 100 à 300 mg/dl.

II - MATERIALS and METHODS

1. Mice and experimental design

Female lupus prone NZBxW/F1 mice at ages 14-15 weeks were purchased from Harlan-Netherland. The mice were maintained in a conventional animal housing facility at Sheba Medical Center Israel and kept in individually ventilated cages. All experiments were approved and executed according to the protocols of the Ethical Committee of the Israeli Ministry of Health no.696/11.

The following groups of mice were treated with 5 µg/mouse subcutaneously three times a week (N=15 for each group):

- **Tuftsine-Phosphorylcholine (TPC)** (Synthesized by Professor Fridkin, Department of Organic Chemistry, Weizmann Institute for Sciences, Rehovot, Israel),
- **Phosphorylcholine (PC)** (Sigma-Aldrich L-4391 St Louis, MO, USA),
- **Tuftsine (T)** (GLS peptide synthesis, Shanghai, China),
- **Phosphate Buffered Saline (PBS)** as a vehicle.

The treatment started at week 14 before clinical findings were observed.

2. Measurement of proteinuria

Urine was tested every week for proteinuria by a standard semi-quantitative test using Bayer Multistix dipsticks (Bayer, Fernwald, Germany). Results were graded according to the manufacturer's instructions. Briefly, urine samples were graded 0-4+, corresponding to the following approximate protein concentrations: 0 = negative or trace, 1+ = 30 mg/dl, 2+ = 100 mg/dl, 3+ = 300 mg/dl and 4+ = ≥2000 mg/dl. Nephritis was defined semi-quantitatively as the presence of 100-300 mg/dl of proteinuria.

3. Analyse histologique des reins

Les reins ont été obtenus à partir de souris sacrifiées à 30 semaines (N=5) et ont été inclus en paraffine. La présence d'une glomérulonéphrite a été attestée par une coloration histologique (Periodic Acid Schiff, PAS).

Pour la détection de dépôts d'immunoglobulines, des sections de paraffine ont été incubées avec des anticorps anti-IgG de souris conjugués au FITC (Jackson).

Toutes les évaluations histo-pathologiques ont été réalisées par un pathologiste et classifiées selon la Classification 2003 de l'International Society of Nephrology/Renal Pathology Society (ISN/RPS) des glomérulonéphrites lupiques (232) (Annexe-2, page 120).

4. Mesure des taux sériques d'anticorps anti-ADNdb

Les taux sériques d'anticorps anti-ADN double brin (db) ont été mesurés par ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

En bref, les plaques ELISA ont été coatées successivement avec de la poly-L-lysine (50 µg/ml dans de l'eau), l'ADNdb à 2,5 µg/ml dans du Tris-Buffered Saline (TBS) et le poly-L-glutamate (50 µg/ml).

Après avoir bloqué les plaques avec du Bovine Serum Albumine (BSA) à 3%, le sérum de souris dilué au 1:200 dans du BSA 1% a été appliqué sur les plaques coatées, et incubé pendant 2 heures à température ambiante.

Les anticorps fixés ont été détectés en utilisant un anticorps de chèvre dirigé contre la fraction Fc des IgG de souris, conjugué à la phosphatase alcaline (H+L) (Jackson), dilué au 1:5000 en BSA 1%, suivi par le substrat approprié, le P-nitro-phényl-phosphate (Sigma, St Louis, MO, USA).

Les données ont été lues par un lecteur ELISA Titertrek à 405 nm avec un filtre de référence à 620 nm.

3. Kidneys histological analysis

Kidneys were obtained from mice sacrificed at 30 weeks (N=5) and were paraffin-embedded. The pathology of glomerulonephritis was exemplified by histological staining (Periodic Acid Schiff, PAS).

For detection of immunoglobulin deposits, paraffin-embedded sections were incubated with FITC-conjugated anti-mouse-IgG (Jackson).

A pathologist performed all histopathological evaluations, and classification was made according to the International Society of Nephrology/Renal Pathology Society (ISN/RPS) 2003 classification of lupus nephritis (232) (Annexe-2, page 120).

4. Measurement of serum anti-dsDNA antibodies

The titers of anti-dsDNA autoantibodies were measured by ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Briefly, ELISA plates were coated sequentially with poly-L-lysine (50 µg/ml in water), dsDNA 2.5 µg/ml in Tris-Buffered Saline (TBS) and poly-L-glutamate (50 µg/ml).

After blocking the plates with 3% Bovine Serum Albumin (BSA), mice sera diluted 1:200 in 1% BSA was applied to the coated plates and incubated for 2 hours at room temperature.

Bound antibodies were detected by using alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse Fc IgG (H+L) (Jackson) diluted 1:5,000 in BSA 1%, followed by appropriate substrate P-nitro-phenyl-phosphate (Sigma, St Louis, MO, USA).

Data were read by a Titertrek ELISA reader at 405 nm filter/620 nm reference filter.

5. PCR quantitative en temps réel

Les niveaux d'ARNm de l'IFN- γ et du TGF- β ont été analysés par RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) en temps réel en utilisant le LightCycler (Roche, Mannheim, Allemagne).

L'ARN total a été isolé à partir des splénocytes, et une transcription inverse a permis d'obtenir l'ADN complémentaire (ADNc), en utilisant la transcriptase inverse dérivée du virus de la leucémie murine de Moloney (Promega Inc. Wisconsin, États-Unis).

L'ADNc résultant a été soumis à une RT-PCR en temps réel en présence d'amorces spécifiques, selon les instructions du fabricant. En bref, un volume réactionnel de 20 μ l contenait 3mM de MgCl₂, le mix LightCycler HotStart DNA SYBR Green I (Roche), des paires d'amorces spécifiques, et 5 μ l d'ADNc. L'expression relative de l'IFN- γ et du TGF- β a été normalisée avec la β -actine.

6. Production de cytokines par les splénocytes

Les splénocytes (5×10^6 cellules par puit) provenant des souris traitées par TPC, T, PC et PBS ont été cultivées pendant 48h ou 72h en présence de 5 μ g/ml de TPC, PC ou T et testées par DuoSet ELISA (systèmes de R&D Minneapolis, MN, USA).

Les niveaux de cytokines ont été déterminés par ELISA sandwich, réalisé selon les instructions du fabricant. Pour la détection du TGF- β , les plaques ont été coatées avec un TGF- β chimère recombinant humain sRII/Fc (R&D Systems). Les surnageants ont été ajoutés après l'activation du TGF- β latent en TGF- β 1 immunoréactif. Puis un anticorps anti-TGF- β 1 humain biotinylé a été ajouté et le test a été développé selon les instructions du fabricant (R&D Systems).

5. Quantitative real-time PCR

The mRNA levels of IFN- γ and TGF- β were analyzed by real-time RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) by using LightCycler (Roche, Mannheim, Germany).

Total RNA was isolated from splenocytes, and was reverse-transcribed to prepare complementary DNA (cDNA) by using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega Inc. Wisconsin, USA).

The resulting cDNA was subjected to real-time RT-PCR in the presence of specific primers, according to the manufacturer's instructions. Briefly, a 20 μ l reaction volume contained 3mM MgCl₂, LightCycler HotStart DNA SYBR Green I mix (Roche), specific primer pairs, and 5 μ l of cDNA. The relative expression of IFN- γ and TGF- β were normalized to β -actin levels.

6. Cytokine production by splenocytes

Splenocytes (5×10^6 cells per well) originated from TPC, T, PC and PBS treated mice were cultured for 48 hours or 72 hours in the presence of 5 μ g/ml TPC, PC or T and tested by duoset (R&D systems Minneapolis, MN, USA).

The cytokine levels were determined by sandwich ELISA, performed according to the manufacturers' instructions. For the detection of TGF- β , the plates were coated with a recombinant human TGF- β sRII/Fc chimera (R&D Systems). Supernatants were added after activation of latent TGF- β to immunoreactive TGF- β 1, a biotinylated anti-human TGF- β 1 antibody was added thereafter, and the assay was developed according to the manufacturer's instructions (R&D Systems).

7. Analyse des lymphocytes T-régulateurs par cytométrie en flux

Les splénocytes isolés ont été incubés avec des anticorps anti-CD4+FITC anti-CD25+APC et anti-FOXP3+PE (eBioscience, San-Diego, États-Unis) et analysés par cytométrie en flux (Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS) avec des fenêtres ajustées pour inclure toutes les cellules et exclure les débris (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New York, USA).

Pour la coloration intracellulaire de FOXP3, les cellules ont été pré-incubées avec une solution de fixation, lavées et remises en suspension dans une solution de perméabilisation (Serotec, Oxford, Royaume-Uni) puis colorées pour FOXP3. La fenêtre était sur les LT CD4+.

8. Analyse statistique

Les données sont exprimées avec la moyenne $\pm$ DS (Déviation standard). L'analyse statistique a été réalisée avec une analyse de variance (ANOVA) suivie d'un test t de Student pour la comparaison entre groupes. Les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives.

7. T-regulatory lymphocytes analysis by flow cytometry

Isolated splenocytes were incubated with the relevant antibodies anti-CD4⁺FITC anti-CD25⁺APC and anti-FOXP3⁺PE (eBioscience, San-Diego, USA) and analyzed by flow cytometry (Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), with forward and side scatter gates adjusted to include all cells and to exclude debris (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NY, USA).

For intracellular staining of FOXP3, the cells were pre-incubated with a fixation solution, washed, and resuspended in permeabilization solution (Serotec, Oxford, UK) and stained for FOXP3. The gating was on the CD4⁺ T cells.

8. Statistical Analysis

The data are expressed as the mean $\pm$ SD (Standard Deviation). Statistical analysis was performed with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student's t-test for comparison between groups. *P*-values < 0.05 were considered to be significant.

III - RÉSULTATS

1. Atténuation significative de la néphrite lupique chez la souris NZBxW/F1 traitée par TPC

Pour examiner l'effet protecteur potentiel du TPC, les souris lupiques femelles NZBxW/F1 ont été traitées par voie sous-cutanée à partir de la 14^{ème} semaine soit par TPC, PC, T, ou PBS en contrôle, dans un protocole prophylactique avant l'apparition des signes cliniques du lupus (n=15 par groupe).

Comme le montre la Figure 1a (page 64), à l'âge de 30 semaines, 72% des souris injectées avec du PBS ont développé une protéinurie supérieure à 100 mg/dl contre 21% des souris du groupe de TPC. Les souris traitées par TPC ont une protéinurie significativement diminuée par rapport aux souris ayant reçu la T, la PC et le PBS (respectivement $p<0,03$ $p<0,02$, $p<0,001$).

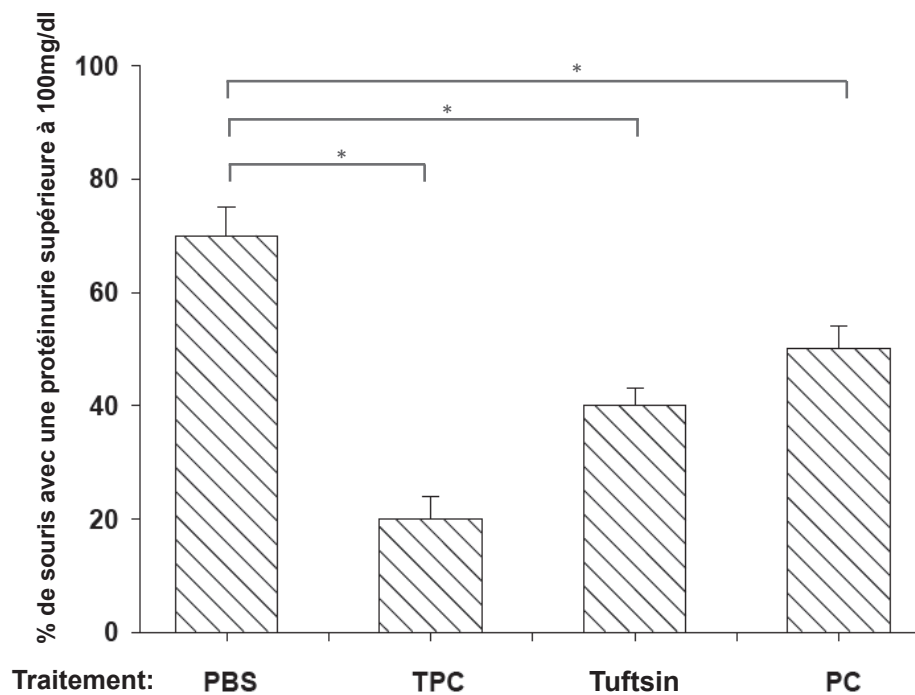
III - RESULTS

1. Significant attenuation of lupus nephritis in TPC-treated NZBxW/F1 mice

To examine the potential protective effect of TPC, female NZBxW/F1 lupus prone mice received subcutaneously TPC, PC, T, or PBS as control in a prophylactic protocol starting at week 14, before the clinical onset of lupus (n=15 per group).

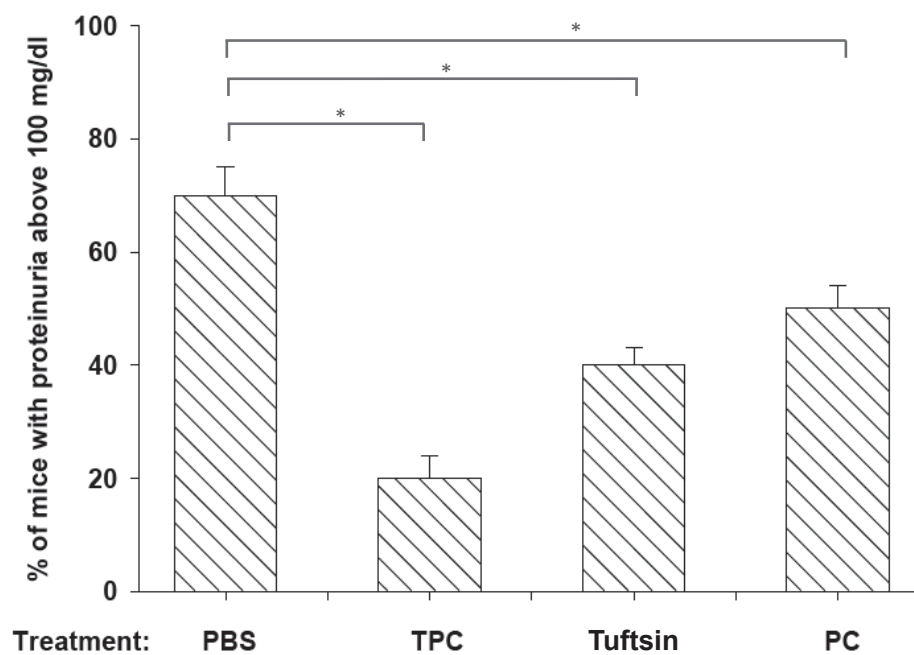
As illustrated in Figure 1a (page 64), at the age of 30 weeks, 72% of the PBS-injected mice developed proteinuria above 100 mg/dl compared to only 21% of the TPC-injected group. TPC-treated mice showed a significantly reduced proteinuria as compared with control mice that received PC, T and PBS ($p<0.03$, $p<0.02$, $p<0.001$ respectively).

Figure 1a: Effets du TPC sur le développement de la glomérulonéphrite chez la souris lupique NZBxW/F1. Protéinurie.



Pourcentage de souris ayant une protéinurie supérieure à 100 mg/dl à l'âge de 30 semaines, dans chaque groupe de souris (n=15 par groupe), traitées soit par tuftsin-phosphorylcholine (TPC), tuftsin (T), phosphorylcholine (PC) ou PBS en contrôle. * : $p < 0,05$

Figure 1a: TPC effects on glomerulonephritis development in NZBxW/F1 lupus prone mice. Proteinuria.



Percentage of mice with proteinuria above 100 mg/dl at the age of 30 weeks in each group of mice (n=15 per group), receiving either tuftsin-phosphorylcholine (TPC), tuftsin (T), phosphorylcholine (PC) or PBS as a control. * : $p < 0.05$

À l'âge de 30 semaines, l'analyse histologique des reins a été effectuée par la coloration PAS, et la recherche de dépôts de complexes immuns (CI) dans le mésangium a été évaluée par immunofluorescence (Figure 1b, page 66).

Les sections de rein des groupes de souris traitées par PBS et PC (Figure 1b, A et D) ont montré une néphrite lupique diffuse de classe-IV de la classification ISN/RPS 2003, avec formation de croissants. La PC a eu un effet modéré mais non significatif sur le dépôt de CI.

Les traitements par TPC et T (Figure 1b, B et C) ont permis une atténuation de l'atteinte rénale avec une glomérulonéphrite lupique mésangiale proliférative de classe-II, correspondant à la présence d'une prolifération cellulaire et de dépôts de CI mésangiaux. Il faut noter que l'infiltration et les dépôts de CI étaient plus importants dans le groupe de souris traitées par T par rapport au groupe traité par TPC.

En résumé, le traitement des souris lupiques par TPC a entraîné une réduction significative de l'atteinte rénale, objectivée par la protéinurie et l'analyse histologique. La T exerce également un effet protecteur avec toutefois une efficacité moindre par rapport au TPC. Inversement, le traitement par PC seule a eu un effet modéré sur la protéinurie et aucun effet sur l'atteinte histologique.

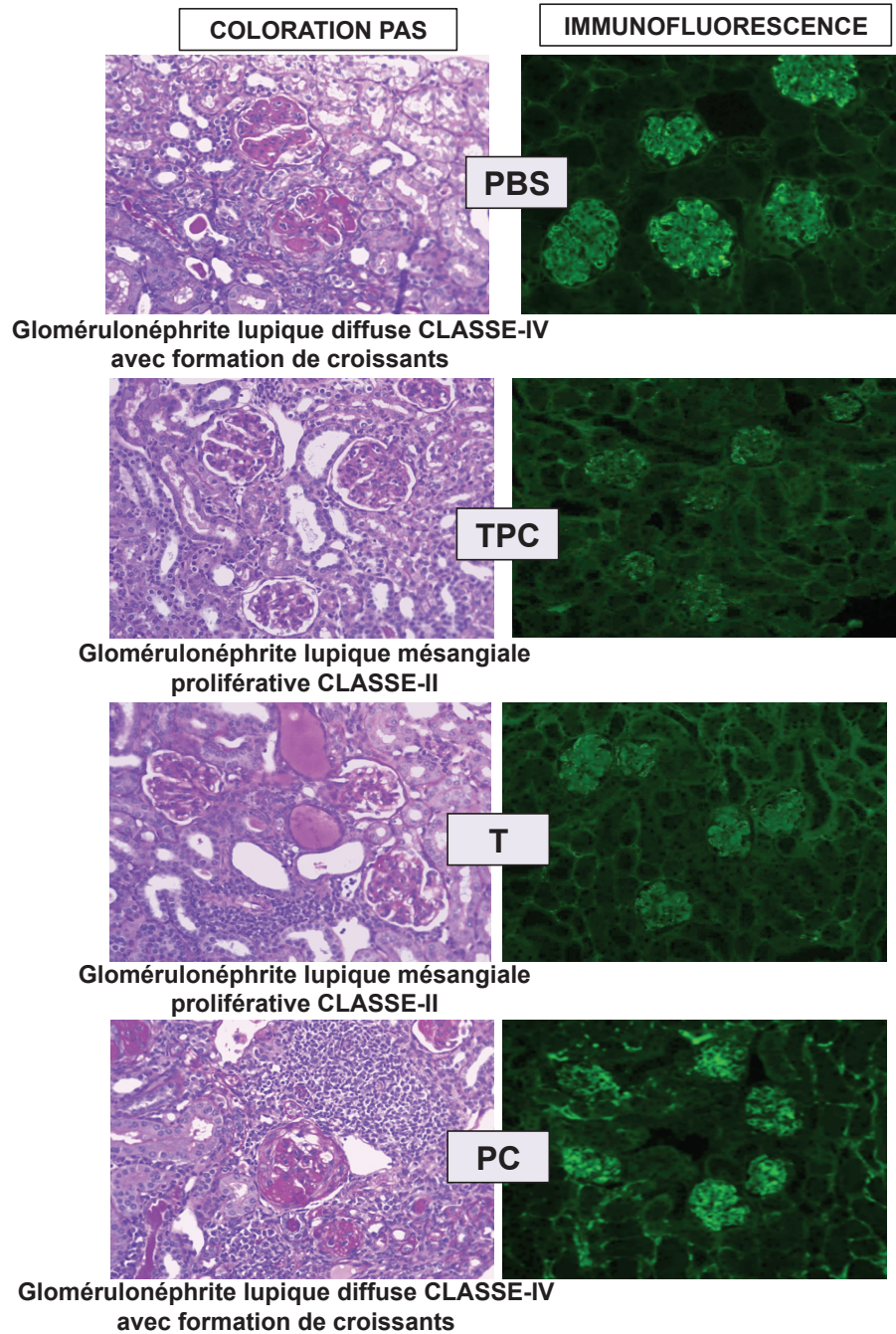
At the age of 30 weeks, histological analysis of the kidneys was performed by PAS staining, and immune complex (IC) deposition in the mesangium was evaluated by immunofluorescence (Figure 1b, page 66).

Kidney sections from the PBS and PC-treated mice (Figure 1b, A and D) showed diffuse lupus nephritis with crescents formation, class-IV of the ISN/RPS 2003 classification. PC had a moderate but not significant effect on IC deposition.

Both TPC and T-treated mice (Figure 1b, B and C) exhibited attenuated renal involvement limited to mesangial cellular proliferation and IC deposits, defined as class-II mesangial proliferative lupus nephritis. It is to note that infiltration and IC deposits were more impressive in the T treated group of mice compared to the TPC-treated group.

In summary, the treatment of lupus mice by TPC resulted in a significant reduction of renal disease, objectified by proteinuria and histological analysis. T also exerts a protective effect but with lower efficiency compared with TPC. Conversely, treatment with PC alone had moderate effect on proteinuria and no effect on histological lesions.

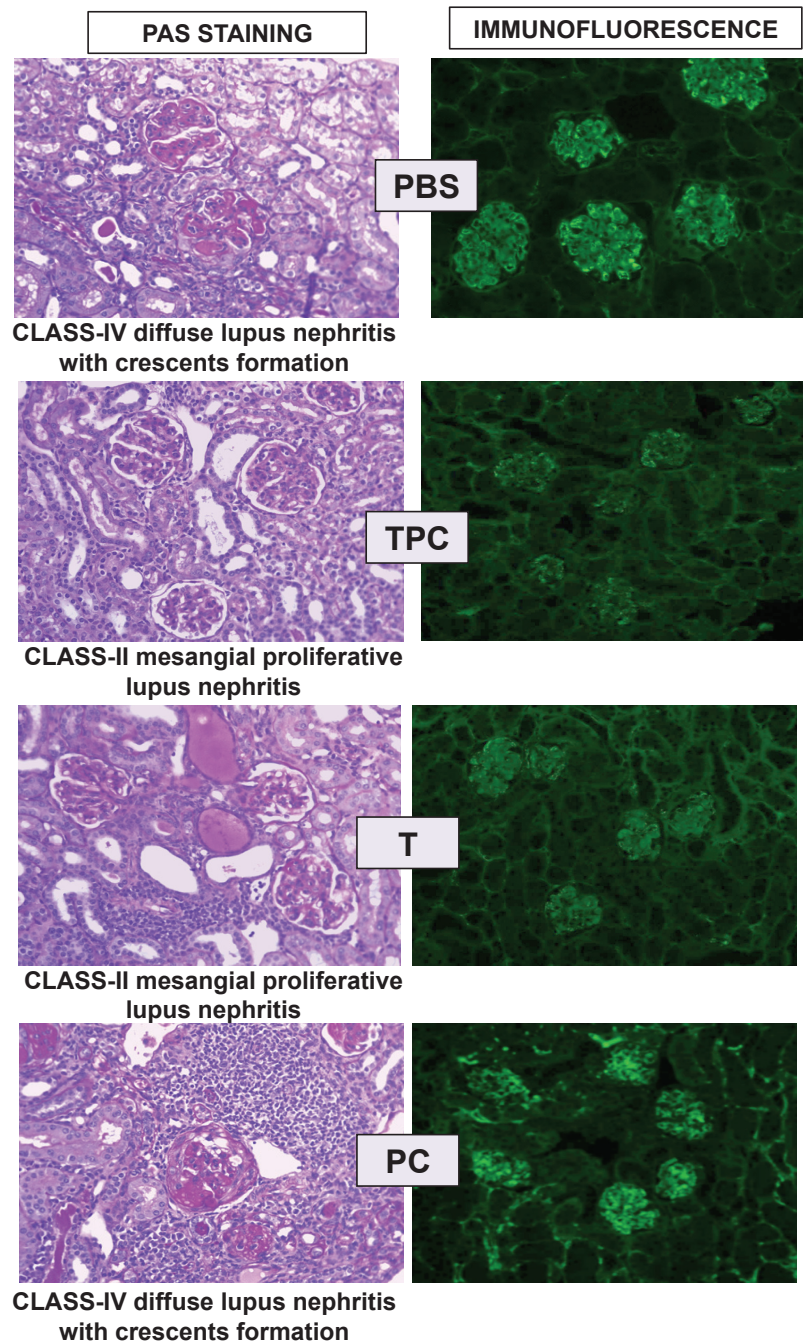
Figure 1b: Effets du TPC sur le développement de la glomérulonéphrite chez la souris lupique NZBxW/F1. Histologie.



Coloration PAS et dépôt de complexes immuns par immunofluorescence, sections de rein représentatives de chaque groupe de souris.

PBS (contrôle), TPC (Tuftsin-Phosphorylcholine), T (Tuftsin), PC (Phosphorylcholine). Agrandissement présenté: x40.

Figure 1b: TPC effects on glomerulonephritis development in NZBxW/F1 lupus prone mice. Histology.



PAS staining and immune complex deposition by immunofluorescence in representative kidney sections from each studied group of mice.

PBS (control), TPC (Tuftsin-Phosphorylcholine), T (Tuftsin), PC (Phosphorylcholine). Magnification presented: x40.

2. Le TPC atténue la glomérulonéphrite lupique en modulant le profil cytokinique

Les cytokines sont impliquées dans la pathogenèse du LED. Par conséquent, nous avons cherché à savoir si le traitement par TPC affectait le profil cytokinique chez les souris lupiques. A 30 semaines, 5 souris de chaque groupe (TPC, T, PC et PBS) ont été sacrifiées et l'expression par les splénocytes de cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , IL-17) et anti-inflammatoires (TGF- β , IL-10) a été étudiée *in vitro*.

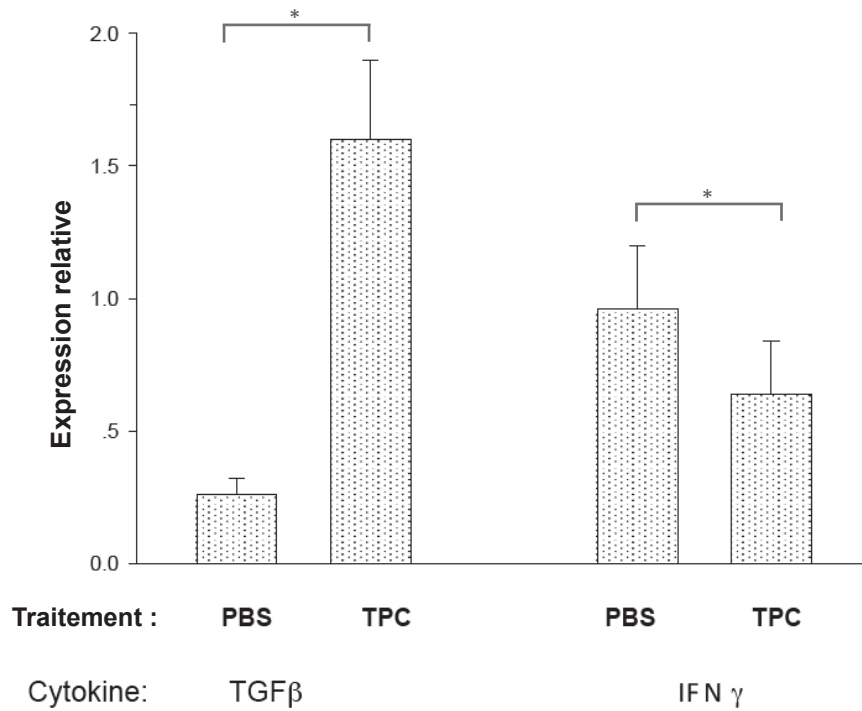
Les analyses par RT-PCR (Figure 2a, page 68) ont révélé une inhibition de l'expression de l'ARNm de la cytokine pro-inflammatoire IFN- γ chez les souris traitées par TPC par rapport au groupe contrôle PBS ($p < 0,03$). En parallèle, le TPC accroît l'expression de l'ARNm de la cytokine anti-inflammatoire TGF- β ($p < 0,001$ par rapport aux souris traitées par PBS).

2. TPC attenuates lupus glomerulonephritis by modulating cytokine profile

Cytokines are demonstrated to be involved in the pathogenesis of SLE. Therefore we assessed whether treatment with TPC affected cytokine profile in lupus mice. At 30 weeks, 5 mice from each group (TPC, T, PC and PBS) were sacrificed and splenocytes expression of proinflammatory (IFN- γ , IL-17) and anti-inflammatory cytokines (TGF- β , IL-10) was investigated *in vitro*.

Analysis by RT-PCR (Figure 2a, page 68) revealed an inhibition of mRNA expression of IFN- γ proinflammatory cytokine in TPC-treated mice relative to PBS control group ($p<0.03$). In parallel, TPC increased expression of TGF- β anti-inflammatory cytokine mRNA ($p<0.001$ compared to PBS-treated mice).

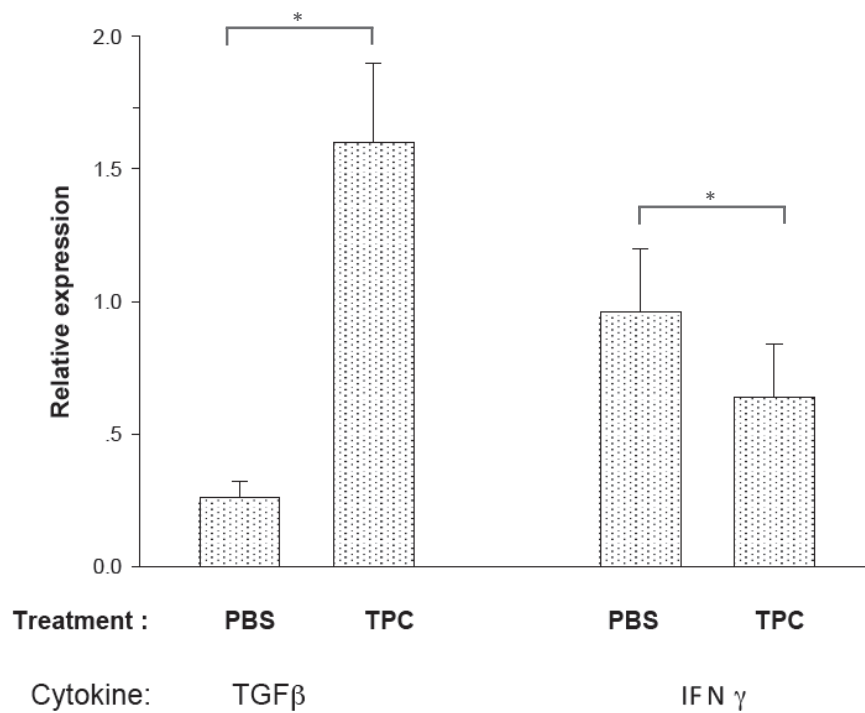
Figure 2a: Mesure par RT-PCR de l'expression des cytokines.



Les niveaux d'ARNm d'IFN-γ et de TGF-β des splénocytes ont été analysés par RT-PCR chez les souris traitées par PBS ou TPC puis normalisés par rapport aux niveaux de β-actine. Les données sont présentées comme l'expression relative de l'ARNm (moyenne ± DS de 3 expériences).

*PBS: contrôle, TPC: Tuftsin-Phosphorylcholine. * : $p < 0,05$*

Figure 2a: Analysis by RT-PCR of cytokines expression.



Splenocytes IFN- γ and TGF- β mRNA levels were analyzed by RT-PCR and normalized to β -actin levels in mice treated by TPC or PBS. Data are presented as relative mRNA expression (mean $\pm$ SD of 3 separate experiments).

*PBS: control, TPC: Tuftsin-Phosphorylcholine. * : $p < 0.05$*

Nous avons ensuite étudié *in vitro* la sécrétion de cytokines pro- (IFN- γ , IL-17) et anti-inflammatoires (TGF- β , IL-10) lors des différents traitements dans les surnageants des splénocytes mis en culture (Figure 2b, page 70).

Concernant les cytokines pro-inflammatoires : le TPC diminue de 5,2 fois la sécrétion d'IFN- γ par les splénocytes comparativement aux souris traitées par PBS ($p < 0,008$).

La T et la PC diminuent la sécrétion d'IFN- γ de 2,5 et 1,5 fois respectivement ($p < 0,03$, $p < 0,04$).

Une diminution majeure des niveaux de sécrétion de l'IL-17 dans les surnageants de splénocytes a été observée chez les souris traitées par TPC ($p < 0,01$ en comparaison avec les souris du groupe PBS).

Une inhibition moins significative de la sécrétion d'IL-17 a été induite par la T ($p < 0,03$) et dans une moindre mesure par la PC ($p < 0,048$).

L'analyse des niveaux de cytokines anti-inflammatoires dans le liquide de culture des splénocytes a montré une hausse de la sécrétion de TGF- β dans le groupe traité par TPC ($p < 0,007$ en comparaison avec les souris traitées par PBS).

La T augmente modérément la sécrétion de TGF- β ($p < 0,03$) tandis que la PC a un effet minime sur cette cytokine ($p < 0,05$).

Par ailleurs, le TPC a augmenté de façon majeure la concentration d'IL-10 ($p < 0,001$ par rapport au groupe PBS).

Une concentration significativement plus élevée d'IL-10 a également été détectée dans le groupe T ($p < 0,01$) alors que la PC seule n'a pas eu d'effet sur l'expression de l'IL-10.

We then studied *in vitro* the secretion of pro-inflammatory (IFN- γ , IL-17) and anti-inflammatory cytokines (TGF- β , IL-10) in the various treatment conditions in the supernatants of cultured splenocytes (Figure 2b, page 70).

Regarding pro-inflammatory cytokines, TPC was shown to decrease splenocyte secretion of IFN- γ by 5.2 times, compared to PBS-treated mice ($p<0.008$).

IFN- γ secretion upon T or PC treatment was reduced by 2.5 and 1.5 times respectively ($p<0.03$, $p<0.04$).

A striking decline in the levels of IL-17 secretion was observed in the supernatants of splenocytes of TPC-treated mice ($p<0.01$) when compared with PBS-treated mice.

T induced a less significant inhibition of IL-17 secretion ($p<0.03$) as well as PC ($p<0.048$).

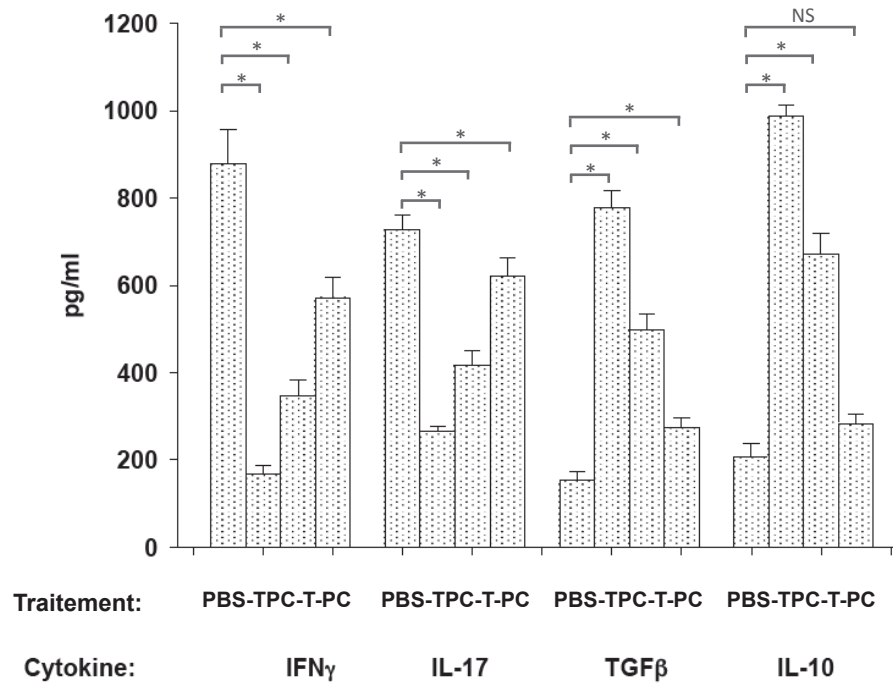
Analysis of anti-inflammatory cytokines levels in splenocytes culture fluid revealed an upregulation of TGF- β secretion ($p<0.007$) in the TPC-treated group when compared to PBS-treated mice.

T moderately enhanced the secretion of TGF- β ($p<0.03$) while PC had a minimal effect on this cytokine ($p<0.05$).

TPC remarkably increased IL-10 concentration in splenocytes culture fluid in comparison with PBS-treated mice ($p<0.001$).

A significantly higher concentration of IL-10 was also detected in the T-treated mice ($p<0.01$) whereas PC alone had no effect on IL-10 expression.

Figure 2b: Mesure par ELISA des niveaux de sécrétion des cytokines.

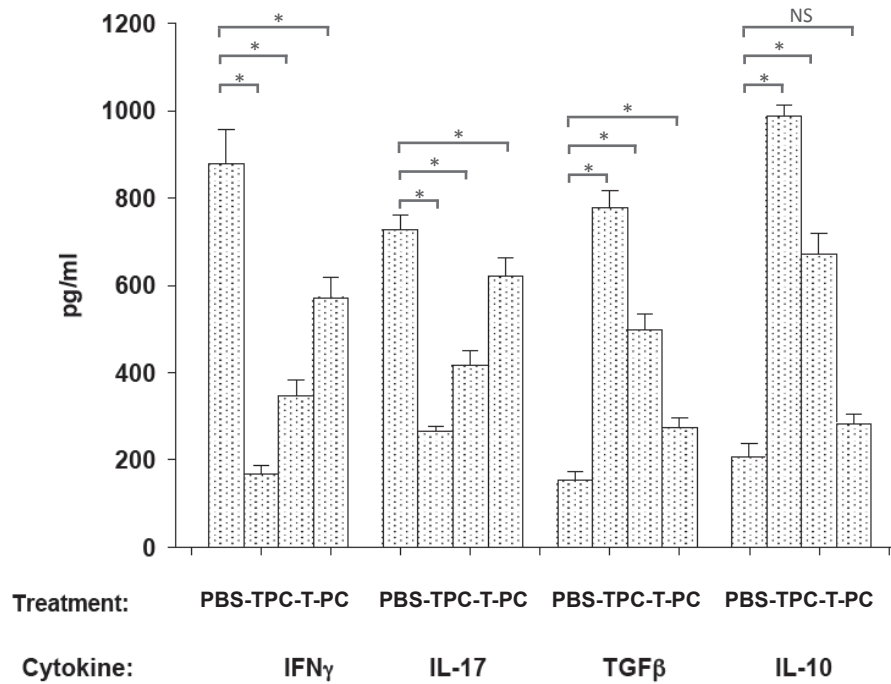


Analyse *in vitro* des niveaux de sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , IL-17) et anti-inflammatoires (IL-10, TGF- β) mesurés dans le surnageant de culture des splénocytes de souris traitées par TPC, T, PC et PBS. Les données sont présentées en moyenne $\pm$ DS de trois expériences séparées.

PBS: contrôle, TPC: Tuftsin-Phosphorylcholine, T: Tuftsin, PC: Phosphorylcholine,

** : $p < 0,05$. NS : Non significatif.*

Figure 2b: Analysis by ELISA of cytokines secretory levels.



In-vitro analyze of the secretory levels of pro-inflammatory (IFN- γ , IL-17) and anti-inflammatory (IL-10, TGF- β) cytokines in the culture fluids of splenocytes from TPC, T, PC and PBS-treated mice. The data are presented in mean $\pm$ DS of 3 separate experiments

PBS: control, TPC: Tuftsin-Phosphorylcholine, T: Tuftsin, PC: Phosphorylcholine,

* : $p < 0.05$. NS : Not significant.

3. Effets du TPC sur les lymphocytes T-régulateurs

Le nombre de LTreg CD4+CD25+FOXP3+ a été déterminé par cytométrie en flux à partir des splénocytes des souris traitées par TPC, T, PC et PBS, (Figure 3a, page 72).

Une augmentation significative du pourcentage de cellules Treg a été observée dans le groupe de souris traitées par TPC en comparaison avec les pourcentages de Treg retrouvés dans les groupes T ($p<0,01$), PC ($p<0,02$) et PBS ($p<0,01$) (respectivement 18%, 8%, 3% et 4%) (Figure 3b, page 72).

Le TPC a significativement favorisé le développement du phénotype Treg ($p<0,009$) par rapport aux autres groupes de souris.

Lorsque le pourcentage de LTreg a été comparé entre les autres groupes contrôle, la T n'a pas conduit à l'expansion des Treg ($p> 0,05$) et la PC a eu un effet léger sur la génération de Treg ($p <0,04$).

3. Effects of TPC on T-regulatory cells

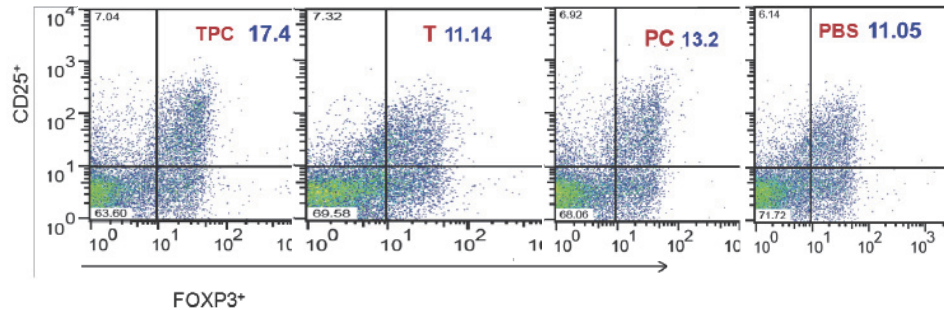
The number of CD4+CD25+FOXP3+ Treg cells was determined by flow cytometry from splenocytes of TPC, T, PC and PBS-treated mice (Figure 3a, page 72).

A significant enhancement in the percentage of Treg cells was observed in the TPC-treated group of mice when compared with T ($p<0.01$), PC ($p<0.02$) and PBS-groups ($p<0.01$) Tregs levels (18%, 8%, 3% and 4% respectively) (Figure 3b, page 72).

TPC significantly promoted Treg phenotype expansion ($p<0.009$) when compared to other groups of mice.

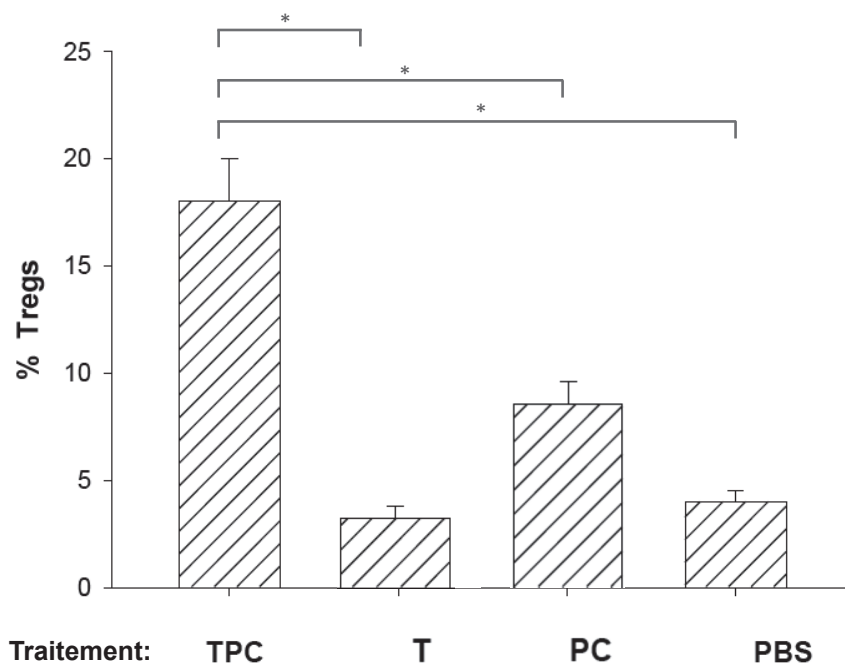
When the percentage of Treg was compared between the other control groups, T did not lead to Treg expansion ($p>0.05$) and PC had mild effect on Treg generation ($p<0.04$).

Figure 3a: Étude des lymphocytes T-régulateurs par cytométrie en flux.



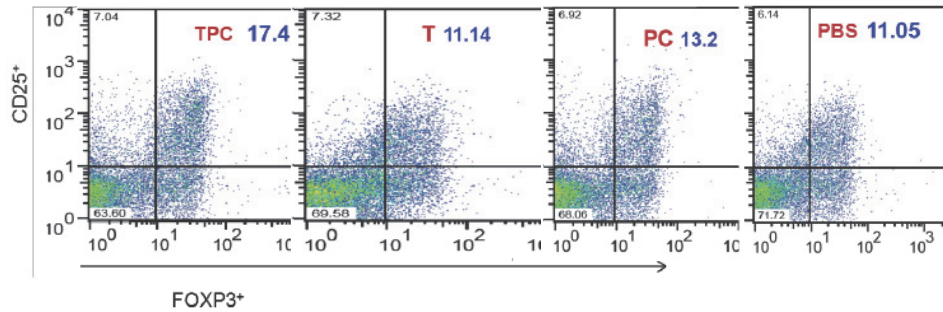
Analyse FACS représentative des cellules Treg CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ issues des splénocytes de souris traitées par TPC, T, PC et PBS. Le marquage a été effectué par CD4⁺ CD25⁺ et FOXP3⁺.

Figure 3b: Pourcentage de lymphocytes T-régulateurs dans chaque groupe de souris.



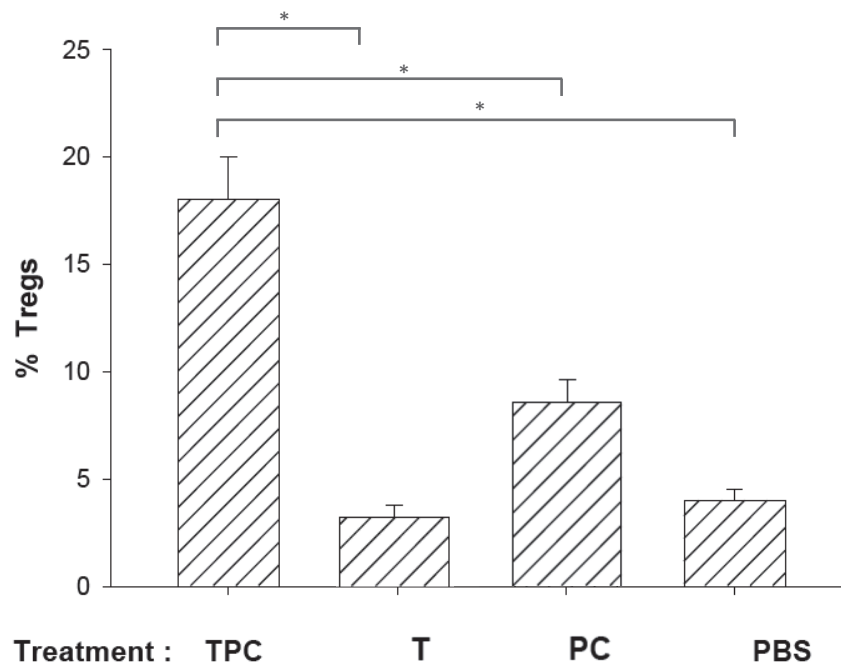
Pourcentage de cellules Treg dans la rate des souris traitées par TPC, T, PC et PBS. Les données sont présentées en moyenne $\pm$ DS de trois expériences séparées (n=5 pour chaque groupe). * : $p < 0,05$.

Figure 3a: Analysis of T-regulatory cells by flow cytometry.



Representative FACS analysis of Treg CD4+CD25+FOXP3+ cells from splenocytes of mice treated with TPC, T, PC and PBS. The gating was performed by CD4+ CD25+ and FOXP3+.

Figure 3b: Percentage of T-regulatory cells in each group of mice.



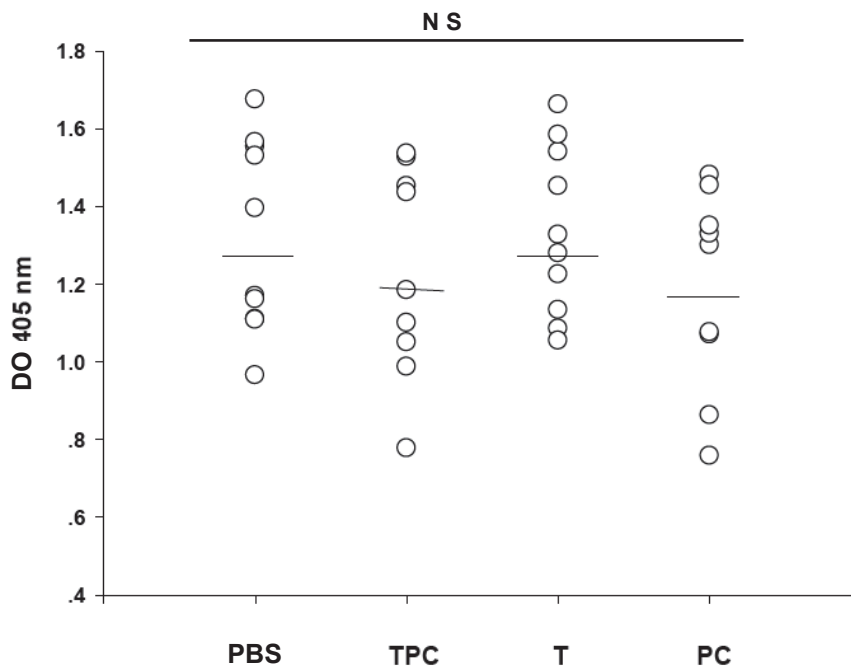
Percentage of Tregs cells in the spleen of TPC, T, PC and PBS-treated mice. The data are presented in mean $\pm$ DS of 3 separate experiments (n=5 for each group). * : $p < 0.05$.

4. Taux circulants d'anticorps anti-ADNdb

Les taux d'anticorps anti-ADNdb circulants sériques ont été mesurés toutes les 3 semaines au cours du développement de la maladie. Aucun changement statistiquement significatif n'a été observé entre les groupes de souris traitées par TPC, T, PC et PBS ($p>0,05$) (Figure 4, ci-dessous).

La Figure 4 présente les titres sériques d'anticorps anti-ADNdb à l'âge de 30 semaines à une dilution de 1:800. Le suivi des taux d'anticorps anti-ADNdb au cours du temps (16-40 semaines) n'a pas montré de changement significatif entre les différents groupes de souris ($p>0,05$) (données non présentées).

Figure 4: Taux circulants d'anticorps anti-ADNdb.



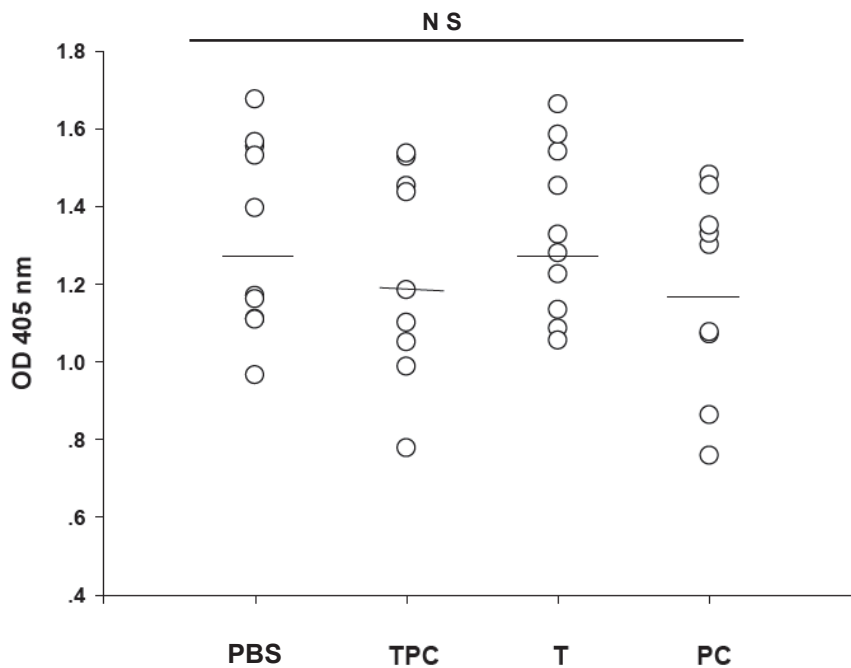
Les niveaux circulants d'anticorps anti-ADNdb ont été testés dans le sérum des souris traitées par TPC, T, PC et PBS par ELISA à une dilution de 1:800 ($n=10$ par groupe). Les données sont présentées à la densité optique (DO) de 405 nm. *PBS: contrôle, TPC: Tuftsin-Phosphorylcholine, T: Tuftsin, PC: Phosphorylcholine, DO: Densité Optique, NS: Non Significatif.*

4. Titers of circulating anti-dsDNA antibodies

The titers of circulating anti-dsDNA antibodies were measured in serum during disease development every 3 weeks. No statistically significant change was noticed between the groups of mice treated with TPC, T, PC and PBS ($p>0.05$) (Figure 4, below).

Figure 4 presents anti-dsDNA antibodies titers in the sera at 30 weeks of age with a 1:800 dilution. A follow-up of anti-dsDNA antibodies over time (16-40 weeks) did not show any significant change between the different groups of mice ($p>0.05$) (data not shown).

Figure 4: Circulating levels of anti-dsDNA antibodies.

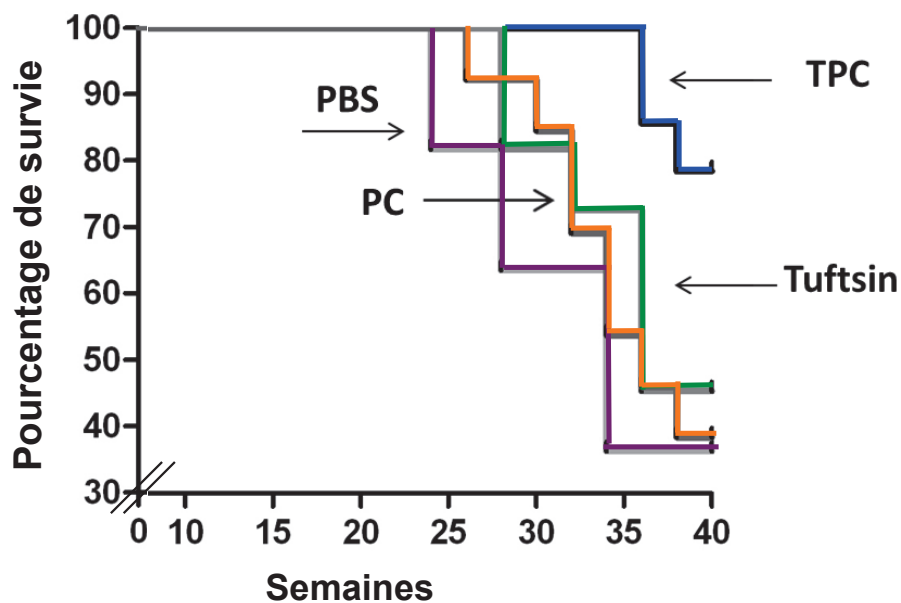


The levels of circulating anti-dsDNA antibodies were tested in the sera of mice treated with TPC, T, PC and PBS by ELISA at dilution of 1:800 ($n=10$ per group). The data are presented at optical density (OD) of 405nm. *PBS: control, TPC: Tuftsin-Phosphorylcholine, T: Tuftsin, PC: Phosphorylcholine, OD: Optical Density, NS: Not Significant.*

5. Le TPC prolonge la durée de vie des souris lupiques

L'une des complications principales de la néphrite lupique est le risque d'évolution vers une insuffisance rénale sévère qui peut mettre en jeu le pronostic vital. Par conséquent, nous avons suivi le temps de survie des souris traitées par TPC, T, PC ou PBS jusqu'à 40 semaines. Comme le montre la Figure 5 (ci-dessous), nous avons observé une différence significative de survie entre le groupe de souris traitées par TPC et les souris des autres groupes contrôles, visible dès 24 semaines.

Figure 5: Survie des souris lupiques au cours du temps.



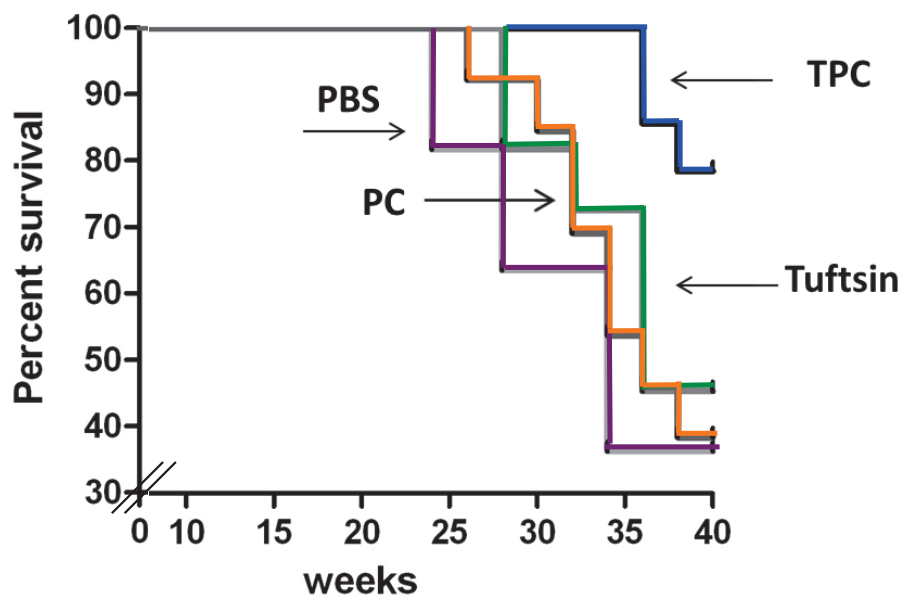
Le nombre de décès de souris a été suivi au cours du temps. Les données présentent le pourcentage de survie. Le temps de survie était significativement plus long chez les souris traitées par TPC par rapport aux groupes contrôle ($p < 0,01$).

PBS: contrôle, TPC: Tuftsins-Phosphorylcholine, T: Tuftsins, PC: Phosphorylcholine.

5. TPC prolongs survival time in lupus mice

One of the main complications of lupus nephritis is the risk of progression to severe renal insufficiency that may be life-threatening. Therefore we followed survival time of the mice treated either with TPC, T, PC or PBS until the age of 40 weeks. As depicted in Figure 5 (below), we observed a significant difference in survival time between TPC-treated mice and control groups from week 24.

Figure 5: Survival of lupus prone mice over time.



The number of dead mice was followed over time. The data present the percentage of mice that survived. Survival time was significantly longer in TPC-treated mice *versus* control groups ($p < 0.01$).

PBS: control, TPC: Tuftsin-Phosphorylcholine, T: Tuftsin, PC: Phosphorylcholine.

IV – DISCUSSION

Notre étude a permis de démontrer l'efficacité du conjugué TPC dans le modèle de souris lupiques NZBxW/F1 au cours d'un protocole préventif.

Nos résultats montrent que le TPC permet d'atténuer le développement et la sévérité de la glomérulonéphrite lupique chez les souris NZBxW/F1, ces effets étant objectivés par une diminution significative de la protéinurie et une amélioration majeure des lésions histopathologiques rénales dans le groupe traité par TPC par rapport aux souris traitées par PBS, conduisant à une survie prolongée dans le groupe TPC. L'efficacité clinique du TPC peut être attribuée à ses propriétés immunomodulatrices. En effet, nous avons observé une modulation du profil cytokinique avec une réduction importante de l'expression des cytokines pro-inflammatoires IFN- γ et IL-17 et une majoration des cytokines anti-inflammatoires TGF- β et IL-10, ainsi que de la prolifération des LTreg.

Dans la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques, les thérapies dérivées d'helminthes offrent un potentiel prometteur. Nées de l'«Hypothèse de l'Hygiène», qui postule que la moindre exposition aux micro-organismes infectieux dans les pays occidentaux serait responsable de l'augmentation de la prévalence des MAI au cours des dernières décennies (18), les thérapies issues des helminthes ont connu un essor majeur au cours des dix dernières années. Cela a conduit à l'application avec succès des helminthes et de leurs dérivés dans des modèles expérimentaux et des études cliniques de différents désordres à médiation immunitaire, principalement les MICI, la SEP, la PR et le DT1 (voir §I-3).

Dans notre étude, nous avons employé pour la première fois un dérivé d'helminthe dans un modèle murin de lupus, à savoir la souris NZBxW/F1. En effet, à l'exception d'une étude récente (200) qui a montré l'action bénéfique de l'infection à *S. mansoni* chez la souris lupique MRL/lpr, à ce jour aucune étude n'a évalué les produits d'helminthes dans des modèles expérimentaux ou cliniques de LED.

IV – DISCUSSION

Our findings provide evidence of the efficacy of TPC conjugate in NZBxW/F1 lupus prone mice in a preventive protocol.

Our findings demonstrate that TPC may attenuate development and severity of glomerulonephritis in NZBxW/F1 mice, as exemplified by lower proteinuria and milder renal histopathological lesions in TPC-treated group compared with PBS-treated mice, these effects resulting in a prolonged survival time in TPC-treated mice. TPC clinical efficacy may be attributed to its immunomodulatory potential. Indeed we observed a modulation of cytokine profile with significant reduction in IFN- γ and IL-17 pro-inflammatory cytokines and a striking increase in TGF- β and IL-10 anti-inflammatory cytokines, as well as Treg cells proliferation.

In the quest for new therapeutic strategies, helminth-derived therapies offer promising potentials. From “Hygiene Hypothesis” which postulates that the slightest exposure to micro-organisms in Western countries would be responsible for the increased prevalence of autoimmune diseases in recent decades (18), helminth therapies have been booming over last ten years. This led to the successful application of helminthes and helminth derivatives in experimental models and clinical studies of several immune-mediated conditions, mainly IBD, MS, RA and T1D (see §I-3).

In our study we first applied a helminth derivative in a mouse model of SLE, namely NZBxW/F1 mice. Indeed, apart from a recent study (200) that successfully investigated the impact of *S. mansoni* infection in MRL/lpr lupus mice, to date no study has evaluated helminth products in SLE experimental models or clinical trials.

Pourtant, il existe une réelle nécessité d'élargir l'arsenal thérapeutique dans le LED. En effet, les traitements actuels sont grevés de nombreux effets indésirables et ne permettent pas toujours le contrôle des atteintes les plus sévères, en particulier de la néphropathie lupique (193,233,234). Le traitement systémique du LED repose encore en grande partie sur des immunosuppresseurs non-spécifiques. Les thérapies ciblées disponibles dans le LED sont rares en comparaison avec d'autres maladies rhumatismales telles que la PR, les résultats des essais cliniques ayant souvent été décevants.

Ainsi, deux larges études randomisées, EXPLORER et LUNAR (235,236), évaluant le rituximab (un anticorps monoclonal anti-CD20) respectivement dans le LED modéré à sévère et dans la néphrite lupique stade III/IV de la classification ISN/RPS 2003 n'ont pas permis d'atteindre leurs objectifs primaires.

De la même façon, deux études cliniques (237,238) investiguant l'intérêt de l'abatacept (une protéine de fusion soluble CTLA4-Ig interférant avec la co-stimulation des cellules T) dans le LED, y compris dans la néphrite lupique (238) ont toutes deux rapporté des résultats négatifs.

Le belimumab (inhibiteur de BLyS, B Lymphocyte Stimulator) a quant à lui été récemment approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) après avoir démontré son efficacité dans deux essais cliniques, BLISS-52 et BLISS-76 (239,240). Toutefois, ces études n'ont porté que sur des patients présentant un lupus cutané-articulaire, et par conséquent le belimumab n'a pour l'instant pas prouvé son intérêt dans le lupus sévère (233).

D'autres thérapies ciblées ont été évaluées avec à l'heure actuelle des données mitigées ou insuffisantes (193). Malgré les efforts déployés visant à développer des molécules adaptées aux mécanismes physiopathologiques du LED (241), les récents échecs illustrent la complexité et la multiplicité des acteurs du système immunitaire mis en jeu. Cela peut expliquer l'inefficacité partielle ou totale de thérapies ne ciblant qu'un seul de ces mécanismes.

Yet, there is a need to expand the therapeutic arsenal in SLE. Indeed, current treatments are still burdened by numerous adverse events and do not always control the most severe damages especially lupus nephritis (193,233,234). Systemic treatment of SLE is still largely based on non-specific immunosuppressants. Targeted therapies available in SLE are rare when compared with other rheumatic diseases such as RA, since clinical trials have often been disappointing.

Thus, two large randomized trials, namely EXPLORER and LUNAR (235,236) evaluating rituximab (an anti-CD20 monoclonal antibody) in moderate to severe SLE and in stage III/IV lupus nephritis of ISN/RPS 2003 classification respectively failed to achieve their primary objectives.

Similarly, two clinical studies (237,238) investigating the interest of abatacept (a CTLA4-Ig soluble fusion protein interfering with T-cells co-stimulation) in SLE, including lupus nephritis (238) both have reported negative results.

Belimumab (BlyS (B Lymphocyte Stimulator) inhibitor), meanwhile, was recently approved by the FDA (Food and Drug Administration) after having demonstrated its efficacy in two clinical trials, BLISS-52 and BLISS-76 (239,240). However, these studies only included SLE patients with cutaneous and articular involvement. Therefore belimumab has not yet proven its worth in severe SLE (233).

Other targeted therapies still show mixed or insufficient data (193). Despite efforts to develop molecules suitable for SLE pathophysiology (241), recent failures illustrate both complexity and multiplicity of the cellular immune system actors involved in SLE. This may explain the partial or total inefficiency of targeted therapies that act only on one of these mechanisms.

L'intérêt des thérapies dérivées des helminthes dans les MAI, et en particulier dans le LED, semble donc résider dans l'immunomodulation globale qu'elles induisent, agissant de façon conjointe sur le système immunitaire inné et acquis de l'hôte pour contrôler les réponses inflammatoires et rétablir un environnement tolérant.

En effet, les helminthes modulent principalement la réponse immunitaire acquise en favorisant une polarisation Th2 ainsi que l'expansion des LTreg, et en inhibant la différenciation Th1/Th17. Par ailleurs, elles augmentent la prolifération des cellules Breg. Toutefois, elles agissent également sur le système immunitaire inné en promouvant un phénotype régulateur des macrophages de type M2, et en inhibant les CLI de type 2. A l'interface entre la réponse innée et acquise, les helminthes orientent également les CD vers un profil tolérogène, ces dernières favorisant à leur tour les réponses Th2/Treg (voir Figure A, page 40).

Les récents progrès scientifiques ont permis de déterminer certains des composants responsables des effets immunomodulateurs des helminthes. Parmi ceux-ci, la phosphorylcholine (PC) est la mieux caractérisée. Elle a été identifiée en 2008 (172) comme étant la partie active de l'ES-62, un produit d'ES du nématode *A.vitae*. Depuis lors, ses propriétés immunorégulatrices ont été largement démontrées, en particulier dans des modèles murins de PR (voir §I-3.3 et §I-5.2).

Toutefois, la PC est un composant naturel, et par conséquent est une molécule faiblement immunogène lorsqu'elle est seule. Pour cette raison, nous l'avons combinée avec la tuftsin (T), un adjuvant naturel, donnant naissance au composé TPC.

Les propriétés immunorégulatrices respectives de la PC et de la T, à la lumière des mécanismes physiopathologiques connus dans le LED (231,242–248), nous ont amenés à investiguer leur intérêt dans cette maladie.

The benefits of helminth-derived therapy in autoimmune disease, especially in SLE, therefore seems to lie in the overall immunomodulation induced, since helminthes act both on the innate and acquired immune system of the host in order to control inflammatory responses and restore a tolerant environment.

Indeed, helminthes mainly modulate acquired immune response by promoting Th2 polarization and expansion of Treg cells, and inhibiting Th1/Th17 differentiation. Furthermore, they increase Breg cells proliferation. However, helminthes also affect innate immune system by promoting a M2 regulatory phenotype of macrophages, and by inhibiting ILC-2. At the interface between innate and adaptive immune responses, helminthes also drive DC toward a tolerogenic profile, the latter in turn promoting Th2/Treg differentiation (see Figure A, page 40).

Recent advances have led to identify components responsible for helminthes' immunomodulatory effects. Among these, phosphorylcholine (PC) is the best characterized. It has been found in 2008 (172) to be the active part of ES-62, an ES product of the nematode *A.vitae*. Since then PC's immunoregulatory properties have been widely demonstrated especially in RA mice models (see §I-3.3 and §I-5.2).

However, PC is a natural component and therefore when alone is a weakly immunogenic molecule. For this reason, we combined it with tuftsin (T), a natural adjuvant and gave rise to TPC compound.

Immunoregulatory properties of both PC and T, in light of pathophysiological mechanisms identified in SLE (231,242–248), led us to investigate their interest in this disease.

En effet, la PC est capable de freiner les réponses Th1/Th17 réduisant ainsi les sécrétions d'IFN- γ , TNF- α , IL-6 et IL17, d'inhiber l'activation, la prolifération et la production d'IgG2a par les LB effecteurs en particulier les plasmocytes, d'interférer avec les voies de signalisation du BCR et du TCR en conduisant à état d'hyporéponse, de moduler la production d'IL-22, et de favoriser la différenciation des cellules Breg, des macrophages de type M2 et des CD tolérogènes.

La T stimule principalement l'activité phagocytaire des monocytes, macrophages et PNN. Par ailleurs, la T favorise le passage d'une réponse Th1 vers une réponse Th2 ainsi que la prolifération des cellules Treg.

L'association de ces deux molécules est donc susceptible d'avoir un effet bénéfique en agissant simultanément sur différents acteurs du système immunitaire, ciblant ainsi plusieurs des désordres pathogéniques identifiés au cours du LED.

Les mécanismes pathogéniques impliqués dans le LED sont encore largement méconnus. Toutefois, certains phénomènes immuno-pathologiques sont désormais bien décrits (231,249).

L'une des anomalies immunologiques majeures suspectée d'être un point de départ dans le déclenchement de l'auto-immunité au cours du LED est la clairance défectueuse des déchets cellulaires apoptotiques (231,247,250,251). Il a été montré que l'apoptose au cours du LED est dérégulée, les cellules immunitaires et en particulier les lymphocytes subissant de façon accrue les processus d'apoptose (252,253). De plus, les corps apoptotiques sont normalement rapidement éliminés du milieu extracellulaire par phagocytose. Dans le LED, ils vont persister de façon anormale en raison d'une clairance défectueuse des débris cellulaires, notamment due à l'altération de l'activité phagocytaire des macrophages (254). Par la suite, ces débris cellulaires persistants vont subir de multiples altérations post-apoptotiques créant des néo-épitopes ou exposant des épitopes cachés, et vont finalement évoluer vers une nécrose secondaire, relarguant alors de larges quantités d'antigènes nucléaires et de signaux de danger pro-inflammatoires.

PC is able to hamper Th1/Th17 polarization thereby lowering IFN- γ , TNF- α , IL-6 and IL-17 secretion, to inhibit effector B-cells, especially plasma cells, activation, proliferation and production of IgG2a, to interfere with BCR and TCR signaling pathways resulting in an hyporesponsive state, to modulate IL-22 production, and to promote the differentiation of Breg cells, M2-macrophages and tolerogenic DC.

T primarily stimulates monocytes, macrophages and neutrophils phagocytic activity. Furthermore, T induces a Th1 to Th2 switch and increases Treg cells proliferation.

The combination of these two molecules is therefore likely to have a beneficial effect by acting simultaneously on different players of the immune system and by targeting multiple pathogenic disorders identified in SLE.

The pathogenic mechanisms involved in SLE are still largely unknown. However, some immuno-pathological phenomena are now well documented (231,249).

One major immunological abnormality suspected to be a starting point in triggering autoimmunity in SLE is defective clearance of apoptotic cellular waste (231,247,250,251). Apoptosis has been found to be deregulated in SLE. Immune cells, especially lymphocytes, are more prone to apoptosis (252,253). Moreover, apoptotic bodies are normally rapidly cleared from the extracellular medium by phagocytosis. In SLE, the latter abnormally persist due to defective clearance of cellular debris, especially due to defective macrophages phagocytic activity (254). These persistent cellular debris undergo multiple post-apoptotic changes, creating neoepitopes or exposing hidden epitopes. Eventually, they evolve into secondary necrosis thereby releasing large amounts of nuclear antigens and pro-inflammatory danger signals.

Ces évènements favorisent la reconnaissance d'antigènes du soi et notamment d'antigènes nucléaires (nucléosomes, histones) par des lymphocytes auto-réactifs, conduisant à la production d'auto-anticorps.

Il est démontré (247) que la glomérulonéphrite lupique est initiée par le dépôt ou la formation *in situ* de CI à partir de ces auto-anticorps, en particulier des anticorps anti-nucléosomes et anti-ADNdb. Il a longtemps été pensé que ces CI se déposaient de façon passive dans les reins. En réalité, il apparaît désormais qu'ils se forment essentiellement par l'interaction des auto-anticorps avec des nucléosomes exposés sur la membrane basale glomérulaire et dans le mésangium (247,255). Ces CI entraîneront finalement l'activation du complément et l'infiltration de diverses cellules inflammatoires, conduisant à la formation des lésions de glomérulonéphrite.

Ces phénomènes conduisent ainsi aux lésions primitives observées en histologie (que l'on retrouve dans la classification des glomérulonéphrites lupiques ISN/RPS 2003 (232)), à savoir le dépôt de CI, et l'infiltration et la prolifération cellulaires.

En considérant le défaut de phagocytose et de clairance des débris apoptotiques comme l'un des mécanismes clés à l'origine de la rupture de tolérance dans le LED, l'utilisation de la T associée à la PC présente donc un intérêt tout particulier. En effet comme nous l'avons vu précédemment, la T est principalement reconnue pour ses capacités stimulatrices de la phagocytose sur les monocytes, les macrophages, et les PNN (220,221,256). De façon intéressante, ces effets bénéfiques avaient d'ailleurs été démontrés il y a 30 ans par Lukàcs *et al* (223) *in vitro* sur des monocytes issus de patients lupiques, augmentant leurs capacités chimiotactiques, migratoires et phagocytaires.

These events enhance recognition of self-antigens including nuclear antigen (nucleosomes, histones) by autoreactive lymphocytes, leading to the production of autoantibodies.

It is demonstrated (247) that lupus glomerulonephritis is initiated by *in situ* deposition or formation of immune complexes (IC) from these autoantibodies, particularly anti-nucleosome and anti-dsDNA antibodies. It was long thought that IC were mostly passively deposited in the kidneys. It now appears that IC primarily result from the interaction between autoantibodies and nucleosome exposed on glomerular basement membrane and in the mesangium (247,255). IC finally activate complement and promote inflammatory cells infiltration, resulting in glomerulonephritis lesions.

These phenomena thus lead to the primary lesions observed in histology (reported in the ISN/RPS 2003 classification of lupus nephritis(232)), namely CI deposits, and cellular infiltration and proliferation.

Since it is considered that defective phagocytosis and clearance of apoptotic debris is one of the key mechanisms underlying breakdown of tolerance in SLE, it is of particular interest to combine T with PC. Indeed as previously mentioned, T has been found to stimulate monocytes, macrophages, and neutrophils phagocytic activity (220,221,256). Interestingly, 30 years ago Lukacs *et al* demonstrated these beneficial effects *in vitro* (223) on monocytes from SLE patients. T was shown to increase their chemotactic, migratory and phagocytic activities.

Dans notre étude, la T seule permet une amélioration significative de la glomérulonéphrite lupique, illustrée par une réduction de la protéinurie, et surtout une amélioration majeure des lésions histologiques de néphrite et des dépôts de CI en immunofluorescence dans le groupe traité par T par rapport au groupe PBS, passant d'un stade IV à un stade II de la classification ISN/RPS 2003 (voir §III-1 et Figures 1a/1b).

Cela suggère que la T a pu, en stimulant l'activité phagocytaire, enrayer au moins en partie le phénomène initiateur de l'atteinte rénale, à savoir la persistance de déchets apoptotiques, réduisant ainsi la production d'auto-anticorps et leur dépôt sous forme de CI.

De façon paradoxale, l'analyse des taux d'anticorps anti-ADNdb par ELISA ne montre pas de baisse significative dans les groupes traités par rapport au groupe PBS contrôle, notamment dans le groupe T (voir §III-4, Figure 4), ce qui contraste avec la diminution des dépôts de CI. Toutefois, il faut savoir que la recherche d'anticorps anti-ADNdb par ELISA est une technique sensible mais non spécifique (257,258). En effet, elle détecte à la fois les anticorps de faible et de forte affinité, et réagit de façon globale avec les anticorps anti-nucléosome, anti-ribosome, et anti-ADNdb. Cette technique peut donc méconnaître une modulation sensible des taux d'un sous-type particulier d'anticorps, par exemple des anticorps anti-nucléosomes, qui sont suspectés d'être l'un des auto-anticorps les plus précoces au cours du LED (231). De plus, certains isotypes d'anticorps anti-ADNdb en particulier la présence d'IgM par opposition aux IgG ont été corrélés négativement avec le développement de la glomérulonéphrite lupique, suggérant un effet protecteur de ce sous-type d'anticorps (259,260). Dans notre analyse, nous n'avons pas déterminé les différents isotypes d'anticorps anti-ADNdb. Enfin, d'autres auto-anticorps non nucléaires, notamment les anticorps anti-C1q et les anticorps anti-alpha-actinine, largement impliqués dans la pathogénèse de la néphrite lupique (247,248,261–263), n'ont pas été recherchés ici. Il est possible que les traitements en particulier par T et TPC aient entraîné une diminution de ces anticorps.

In our study, T alone led to significant improvement of lupus glomerulonephritis, illustrated by reduced proteinuria, and especially by improved nephritis histological lesions and IC deposition in the T-treated group when compared with the PBS-treated group, from stage IV to stage II nephritis of the ISN/RPS 2003 classification (see §III-1 and Figures 1a/1b).

This observation suggests that T by its phagocytosis stimulating properties may hamper an early event in nephritis occurrence, namely persistence of apoptotic waste, thereby reducing autoantibody production and deposition and IC formation.

Paradoxically, no significant decrease was observed in anti-dsDNA antibodies levels when measured by ELISA, especially in T-treated group compared with PBS control group (see §III-4, Figure 4), contrasting with the decrease in IC deposits. However, it should be pointed that ELISA is a sensitive but not specific technique for anti-dsDNA measurement (257,258). It detects both high and low affinity antibodies and reacts together with anti-nucleosome, anti-ribosome and anti-dsDNA antibodies. Therefore, it may disregard significant rate modulation of one antibody subtype such as anti-nucleosome antibody, the latter being highly suspected to be one of the earliest autoantibodies in SLE (231). Furthermore, certain anti-dsDNA antibodies isotype in particular the presence of IgM versus IgG negatively correlated with the development of lupus glomerulonephritis, therefore suggesting a protective effect these antibodies (259,260). Herein, we have not distinguished the different isotypes of anti-dsDNA antibodies. Finally, we did not investigate non-nuclear autoantibodies that have been widely implicated in the pathogenesis of lupus nephritis, including anti-C1q antibody, and anti-alpha-actinin antibody (247,248,261–263). It is possible treatment in particular T and TPC, have resulted in a decrease of these antibodies.

La T seule a également conduit à une diminution des niveaux de cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , IL-17) (voir §III-2 et Figure 2b), pouvant refléter une moindre activation et une diminution de l'infiltration des cellules inflammatoires suite à la réduction des dépôts de CI dans les glomérules.

La molécule TPC, comme la T, a permis une amélioration des lésions histologiques rénales, passant d'un stade IV à un stade II ISN/RPS 2003. Toutefois, il faut noter que l'amélioration des dépôts de CI et de l'infiltration cellulaire était plus marquée dans le groupe TPC que dans le groupe T seule (voir §III-1 et Figure 1b). De plus, comme nous le discuterons plus loin, la molécule TPC a également conduit à une immunomodulation plus importante que la T seule. Cela souligne, malgré le bénéfice histologique important observé déjà avec la T seule, l'intérêt potentialisateur de son association à la PC.

Inversement, la PC seule a eu un effet modéré mais non significatif sur la protéinurie et le dépôt de CI, et aucun effet sur les lésions histologiques rénales. Cela peut s'expliquer par plusieurs raisons.

Tout d'abord, la raison majeure comme nous l'avons mentionnée est que la PC est une petite molécule naturelle et peu immunogène, et qui par conséquent lorsqu'elle est seule a des effets minimes sur le système immunitaire. Cette caractéristique est confirmée dans l'ensemble de nos expérimentations. C'est pourquoi nous l'avons associée à la T comme adjuvant, afin d'accroître son action.

Par ailleurs, les mécanismes d'action de la PC se situent plus en aval de la rupture initiale de tolérance. Comme nous le verrons plus loin, elle agit principalement sur l'activation ultérieure des cellules immunitaires principalement des LT et sur leur sécrétion de médiateurs inflammatoires, ces phénomènes participant aux dommages rénaux. La PC, contrairement à la T, ne semble pas agir sur les phénomènes précoces initiateurs de l'auto-immunité, à savoir la persistance de déchets apoptotiques conduisant à la création de néo-épitopes et à la production des auto-anticorps.

T-treated mice also exhibited decreased levels of pro-inflammatory cytokines (IFN- γ , IL-17) (see §III-2 and Figure 2b). It may be the result of reduced activation and infiltration of inflammatory cells due to lower glomerular IC deposition.

Like T, TPC molecule led to improved histological lesions from stage IV to stage II of ISN/RPS 2003. However, it should be noted that the improvement of IC deposits and cellular infiltration was more pronounced in the TPC-treated group than in the T-treated group (see §III-1 and Figure 1b). Moreover, as will be discussed below, TPC molecule also resulted in a more important immunomodulation than T alone. This highlights, despite the significant histological benefit observed with T alone, the potentiating interest of its association with PC.

Conversely, PC alone had moderate but not significant effect on proteinuria and IC deposition and no effect on renal histological lesions. There may be various reasons for this phenomenon.

First, PC is a small natural and poorly immunogenic molecule and do therefore have minimal effects when used alone. This characteristic is confirmed in all our experiments. For this reason, we associated PC with T as an adjuvant.

Furthermore, PC mechanisms of action are mainly downstream of the initial breaking of tolerance, since it acts primarily on immune cell activation, especially T-cells activation, and inflammatory mediators production responsible for renal damage. Unlike T, PC do not seems to act on early phenomena of autoimmunity, namely persistent apoptotic waste creating neo-epitopes and leading to autoantibodies production.

Cependant, il faut rappeler que Rodgers *et al* (127) ont récemment montré sur un modèle murin de PR un effet inhibiteur de l'ES-62 (dont la molécule active est la PC) sur l'activation, la prolifération, l'infiltration articulaire et la production d'IgG2a par les cellules B effectrices, en particulier les plasmocytes. Or, nous avons noté une diminution non significative mais notable du dépôt de CI dans le groupe traité par PC seule (voir §III-1 et Figure 1b). Il est donc possible que dans notre modèle, la PC seule ait freiné en partie l'activation des LB réduisant modérément la production et le dépôts d'auto-anticorps. Cet effet sur les cellules effectrices B peut être lié à une action directe sur les LB ou indirecte par l'intermédiaire de l'inhibition de l'activation des LT.

En dehors des cellules B effectrices, un sous-ensemble spécifique de LB récemment décrit (131), les cellules Breg, sont capables de moduler la réponse immunitaire et notamment la réponse cellulaire T, *via* la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire IL-10, des contacts cellulaires directs ou encore par le recrutement de LTreg. Leurs fonctions régulatrices apparaissent essentielles au cours des MAI (125,126,132). Au cours du LED, il a été démontré que les fonctions immunosuppressives de ces cellules Breg sont altérées (264). Ainsi, le transfert de lymphocytes Breg dans différents modèles murins de LED permet de prévenir le développement de la maladie (265).

Rodgers *et al* (127) ont précédemment montré que l'effet protecteur de la PC au cours de l'AIC de la souris était notamment lié à une restauration de taux normaux de cellules Breg sécrétrices d'IL-10, usuellement abaissées au cours de l'AIC. Même si dans notre modèle nous n'avons pas analysé ce sous-type cellulaire, nous pouvons envisager que la hausse des taux d'IL-10 observée dans le groupe traité par TPC (voir §III-2 et Figure 2b) est en partie liée à une augmentation des taux de cellules Breg sécrétrices d'IL-10 grâce à l'action de la PC potentialisée par la T.

However, it is noteworthy that Rodgers *et al* (127) recently demonstrated in a RA mouse model that PC-containing ES-62 molecule exerted inhibitory effects on B effector cells, particularly plasma cells, activation, proliferation, articular infiltration and IgG2a production. In our experiment, we observed a marked but not significant decrease in IC deposition in the PC-treated group (see §III-1 and Figure 1b). Therefore we can hypothetise that PC moderately slowed B-cells activation and thereby autoantibodies production and deposition. Presumably, this effect on the effector cells B may be linked to a direct action on B cells or an indirect action through T-cells inhibition.

Besides effector B-cells, Breg cells is a recently described B-cells specific subset (131). Breg cells may modulate immune response especially T-cells response, through its secretion of IL-10 anti-inflammatory cytokine as well as direct cell contact or Treg cells expansion. Breg cells regulatory functions have been found to be critical in autoimmune diseases (125,126,132). In SLE, these immunosuppressive functions have been demonstrated to be altered (264). Thus, Breg cells transfer in various lupus murine models prevented disease development (265).

Rodgers *et al* (127) previously found that protection against CIA in mice afforded by ES-62 was associated with restoration of the levels of IL-10-secreting Breg levels, the latter being decreased in the spleen of CIA mice. Although we have not analyzed this cell population, we may assume that the rise in IL-10 levels observed in TPC-treated group (see §III-2 and Figure 2b) may be partly related to an increase in IL-10 secreting Breg cells rate as a result of PC effect when T potentiates it.

Un autre intérêt de la PC dans le LED repose sur ses propriétés modulatrices des voies du TCR et du BCR. En effet, la PC est capable de désensibiliser ces deux récepteurs en modulant leurs signaux intracellulaires, induisant un état d'hyporéponse des LT et des LB respectivement (214–217). Or, l'un des dérèglement immunitaire rapportés au cours du LED est une hyperréactivité et une hyper réponse des cellules T et B liées à des anomalies de signalisation de leurs récepteurs (266,267). Il serait intéressant ultérieurement d'étudier les effets de notre molécule sur l'état d'activation de ces voies de signalisation.

Si les cellules lymphocytaires B, par leur sécrétion d'auto-anticorps, ont longtemps été considérées comme les acteurs principaux dans la pathogénèse du LED, de nombreuses données ont depuis démontré que les différents sous-types de LT et leurs cytokines associées jouent également un rôle crucial dans le LED (242). Les dérivés d'helminthes sont alors d'un intérêt majeur puisque la modulation de la réponse lymphocytaire T est l'un de leur principaux mode d'action pour promouvoir un environnement tolérant.

Ainsi, l'un des dérèglements immunologiques mis en évidence dans le LED est une dérégulation de la balance entre les LTreg et les LTh1/Th17.

Les LTh17, comme nous l'avons précédemment mentionné (voir §I-2.3.1), sont un sous-type de lymphocytes T-helper produisant essentiellement l'IL-17 et fortement impliqués dans la pathogénèse des MAI (98,99), notamment du LED (268–270). Ainsi, il a été rapporté par plusieurs groupes une expansion des LTh17 et des taux accrus d'IL-17 dans le sérum des patients lupiques, de même qu'une infiltration des organes cibles, en particulier des reins, par ces mêmes cellules (271,272), parfois corrélés avec l'activité de la maladie (269).

PC modulatory properties on TCR and BCR signaling pathways are also of critical interest in SLE. PC is able to desensitize both receptors by modulating intracellular signaling, thereby inducing T- and B-cells hyporesponsiveness (214–217). Hence, T-cell and B-cell hyperactivity and hyperresponsiveness is a key immune disorder reported in SLE likely due to receptors signaling defects (266,267). Later it would be interesting to study the effects of our molecule on the state of activation of these signaling pathways.

B-cells have long been considered to be the main players in SLE pathogenesis through their production of autoantibodies. Since then, many evidence have demonstrated that T-cells subsets and associated cytokines have a key role in SLE (242). Therefore helminth derivatives are of major interest in SLE since T-cells modulation is one of the main mechanisms by which helminthes promote a tolerant environment.

One of the other key immunological abnormalities identified in SLE is a deregulation of the balance between Treg and Th1/Th17.

As previously mentioned (see §I-2.3.1), Th17 lymphocytes are a subtype of T-helper lymphocytes mainly producing IL-17 and heavily involved in the pathogenesis of autoimmune diseases (98,99), including SLE (268–270). Thus, several groups have reported increased levels of IL-17 in the sera of SLE patients, as well as Th17-cells expansion and infiltration in target organs, especially kidneys, (271,272), both being correlated in some cases with disease activity (269).

Les produits d'helminthes, et en particulier la PC dérivée de l'ES-62, ont largement démontré leur action inhibitrice sur la différenciation Th17, induisant chez l'hôte une diminution majeure des taux d'IL-17 (voir §I-2.3.1 et I-5.1). Dans nos travaux, nous retrouvons l'effet inhibiteur de la PC sur la sécrétion d'IL-17, à la fois chez les souris lupiques traitées par PC seule et par TPC (voir §III-2 et Figure 2b). L'effet est toutefois beaucoup plus marqué dans le groupe TPC que dans le groupe PC seule, probablement à la fois grâce à l'action potentialisatrice de la T sur la PC, et par l'effet inhibiteur propre de la T. En effet, il est intéressant de noter que la T seule permet également une diminution significative des taux d'IL-17. Cet effet de la T n'avait jamais été rapporté, y compris dans les quelques études investiguant les effets de la T dans des modèles murins de MAI (223–226).

D'autre part, les LTh1 et leurs cytokines de type Th1, en particulier l'IFN- γ , participent à l'entretien des phénomènes d'inflammation et aux dommages rénaux au cours du LED (273,274). Ainsi la présence de LTh1 sécrétant d'IFN- γ a été objectivée dans les infiltrats inflammatoires de néphrite lupique (275). Par ailleurs, il semble qu'un profil de type Th1 favorise le développement d'une glomérulonéphrite diffuse proliférative, de pronostic plus sévère que la néphrite lupique mésangiale observée avec un profil Th2 (273,276). Récemment, l'infection de souris lupiques MRL/lpr par le trématode *S. mansoni* (200) a permis une modulation du profil Th1 vers un profil Th2 modifiant le phénotype de la néphrite d'une forme diffuse vers une forme mésangiale.

Dans notre étude, nous avons confirmé cette observation, puisque la modification du phénotype de la glomérulonéphrite d'une forme diffuse de classe-IV vers une forme mésangiale de classe-II dans les groupes de souris traitées par T et TPC s'accompagnait d'une modulation de la sécrétion cytokinique, d'un profil Th1 (IFN- γ) vers un profil Th2 (IL-10).

Helminth products, particularly ES-62-derived PC, have been widely demonstrated to inhibit Th17-cells differentiation in their host, resulting in major decrease in IL-17 levels (see § I-2.3.1 and I-5.1).

In our study, we confirmed PC inhibitory effect on IL-17 secretion both in PC-treated and TPC-treated lupus mice (see §III-2 and Figure 2b). However, this effect is more pronounced in TPC-treated mice when compared with PC-treated mice, likely due to both T potentiating action on PC as well as T own inhibitory activity. Interestingly, T alone also leads to significant reduction in IL-17 levels. This effect of T had never been reported, including in the few studies investigating the impact of T treatment in various autoimmune diseases animal models (223–226).

On the other hand, LTh1 and Th1 cytokines, especially IFN- γ , are involved in maintenance of inflammation and kidney damage in SLE (273,274). Thus the presence of LTh1 IFN- γ -secreting cells has been objectified in lupus nephritis inflammatory infiltrates (275). Moreover, it appears that a Th1 profile promotes the development of diffuse proliferative glomerulonephritis affected by worst prognosis than mesangial lupus nephritis observed with a Th2 profile (273,276). Recently, infection of MRL/lpr lupus mice with the trematode *S. mansoni* (200) was shown to modulate immune response from a Th1 to a Th2 profile moving nephritis pattern from a diffuse towards a mesangial form.

In our study, we confirmed this observation, since the modification of the glomerulonephritis from a class-IV-diffuse to a class-II-mesangial pattern in both T- and TPC-treated mice was accompanied by a modulation of cytokine secretion from a Th1 (IFN- γ) to a Th2 (IL-10) profile.

De plus le rôle directement pathogène de l'IFN- γ dans le LED a été démontré dans des modèles murins ainsi que chez des patients lupiques où ses taux ont été corrélés à l'activité de la maladie (274).

La PC et la T sont toutes deux connues pour leurs capacités à inhiber la réponse Th1 en promouvant une réponse Th2/Treg, réduisant ainsi la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires de type Th1, dont l'IFN- γ (voir §I-5). Notre étude a permis de vérifier ces propriétés. La PC et la T ont conduit indépendamment, et de façon conjuguée avec le TPC, à une réduction significative de la sécrétion d'IFN- γ chez les souris lupiques NZBxW/F1 (voir §III-2 et Figures 2a/2b).

Il faut noter que parmi les cytokines pro-inflammatoires impliquées dans la physiopathologie du LED, l'IL-22 a récemment été mise en lumière (277–283). Cette cytokine de la famille de l'IL-10 peut être sécrétée par les cellules immunitaires innées et acquises, en particulier les LTh17 et les LTh22. Ses taux ont été trouvés plus élevés chez les patients lupiques et corrélés avec l'activité de la maladie, en particulier l'atteinte rénale (277–283).

Au cours de l'AIC, l'ES-62, le produit d'ES d'*A. vitae* composé de PC, a démontré des propriétés étonnantes en modulant les niveaux sériques d'IL-22 en fonction du stade de la maladie. En effet, à la phase initiale de l'AIC l'ES-62 décroît l'IL-22 dont le rôle est néfaste, puis dans les phases plus tardives de la maladie, l'ES-62 favorise une hausse de la production cette cytokine qui exerce alors un effet protecteur (173). Dans notre modèle, nous n'avons pas étudié les taux d'IL-22, mais il serait intéressant par la suite de déterminer si la PC exerce les mêmes effets bénéfiques au cours du LED.

It is to note that IFN- γ pathogenic role has been demonstrated in lupus mouse models as well as in SLE patients where rates were correlated with disease activity (274).

PC and T are both recognized for their ability to inhibit Th1 response by promoting a Th2/Treg response, thereby decreasing the secretion of pro-inflammatory Th1 cytokines including IFN- γ (see §I-5). Our experiments confirmed these properties. PC and T separately and combined in the TPC compound led to a significant reduction of IFN- γ rates in lupus NZBxW/F1 mice (see §III-2 and Figures 2a/2b).

It should be noted that IL-22 has recently been highlighted as one of the pro-inflammatory cytokines involved in the pathogenesis of SLE (277–283). It belongs to the IL-10 family and may be secreted both by innate and acquired immune cells, particularly Th17 and Th22 cells. IL-22 rates were found to be higher in SLE patients and correlated with disease activity, especially renal involvement (277–283).

In CIA mice model, the PC-containing *A.vitae* product ES-62 showed surprising properties in modulating IL-22 serum levels according to the stage of the disease. Indeed, in the initial stage of CIA ES-62 decreases IL-22 that exhibit harmful effects. Then in later stages, ES-62 promotes IL-22 rise, since it exerts protective role (173). In our model, we have not measured IL-22 levels, but it would be of interest to determine if PC has the same beneficial effects in SLE.

Contrairement aux LTh1/Th17/Th22 pro-inflammatoires, les LTreg, connus pour leurs propriétés régulatrices anti-inflammatoires grâce notamment à la production d'IL-10 et de TGF- β (100), présentent au cours du LED un déficit fonctionnel et quantitatif (284,285). Les LTreg CD4+/CD25+/FOXP3+ sont l'une des sous-populations majeures de ce groupe hétérogène de lymphocytes. On distingue les LTreg CD4+/CD25+/FOXP3+ naturels générés dans le thymus, et les LTreg inductibles formés en périphérie grâce notamment à la stimulation par le TGF- β (286).

De façon importante, Tselios *et al* (287) ont récemment montré chez des patients lupiques que les taux de LTreg CD4+/CD25+/FOXP3+ étaient inversement corrélés à l'activité de la maladie. Par ailleurs, le transfert adoptif de ce même phénotype de LTreg dans le modèle de souris lupique NZBxW/F1 a permis de contrôler le développement du LED, en particulier l'atteinte rénale (288).

A ce jour, l'ES-62 et son composant principal la PC n'ont pas été démontrés comme promouvant l'expansion des cellules Treg (207). Concernant la T, cet effet a été rapporté dans une seule étude, sur un modèle murin d'EAE (225).

A l'inverse dans nos travaux, la PC seule a permis une expansion modérée de la population de LTreg, tandis que la T seule n'a eu aucun effet sur ces lymphocytes. Le TPC, en potentialisant l'effet modeste de la PC, a conduit à une hausse significative du taux de LTreg (voir §III-3 et Figures 3a/3b).

Parallèlement à cet effet, le TPC et dans une moindre mesure la PC seule ont entraîné une augmentation des taux d'IL-10 et de TGF- β , ou du TGF- β seul respectivement, deux cytokines immunosuppressives sécrétées entre autres par les LTreg (voir §III-2 et Figures 2a/2b).

Nous avons également observé dans le groupe traité par T seule une élévation de ces deux médiateurs – à savoir l'IL-10 et le TGF- β – et ce malgré l'absence de modification des taux de LTreg.

Treg cells are a T-cells subpopulation recognized for its anti-inflammatory properties through production of IL-10 and TGF- β (100). Unlike Th1/Th17/Th22 pro-inflammatory lymphocytes, SLE is associated with functional and quantitative deficit in Treg cells (284,285). CD4⁺/CD25⁺/FOXP3⁺ Treg is one of the major subset of this heterogeneous group of cells. The latter may be divided into natural CD4⁺/CD25⁺/FOXP3⁺ Treg cells generated in the thymus and induced CD4⁺/CD25⁺/FOXP3⁺ Treg developed from mature CD4⁺ T-cells especially under TGF- β stimulation (286).

Importantly, Tselios *et al* (287) have recently found that CD4⁺/CD25⁺/FOXP3⁺ Treg cells rates were inversely correlated with disease activity in SLE patients. Furthermore, adoptive transfer of Treg cells in NZBxW/F1 lupus mice attenuated disease severity, in particular renal disease (288).

To date, ES-62 and its main component PC has not been demonstrated to promote Treg cells expansion (207). Regarding T, this effect has been reported in one study conducted in a mouse model of EAE (225).

Conversely in our work, PC alone led to moderate expansion of Treg population while T had no effect on these cells. TPC by potentiating PC modest effect led to significant increase in Treg cells rate (see §III-3 and Figures 3a/3b).

Moreover, TPC and to a lesser extent PC increased both IL-10 and TGF- β or only TGF- β levels respectively, two immunosuppressive cytokines secreted by Treg cells (see §III-2 and Figures 2a/2b).

T-treated mice also showed an elevation in IL-10 and TGF- β levels despite the absence of rise in Treg cells number.

Toutefois, comme nous l'avons mentionné, l'IL-10 et le TGF- β sont sécrétés notamment mais non exclusivement par les LTreg. La présence de niveaux accrus de ces deux cytokines dans le groupe traité par T seule peut donc avoir pour origine d'autres types cellulaires aux propriétés régulatrices, notamment les cellules Breg que nous avons précédemment évoquées, ou encore les macrophages de type M2.

Il est intéressant de noter qu'au cours du LED, certaines cytokines peuvent exercer une action protectrice ou néfaste selon divers facteurs. Par exemple, la présence de TGF- β seul favorise la différenciation des LTreg, tandis que le TGF- β associé à l'IL-6 conduit à une différenciation de lymphocytes de type Th17 (289). Le TPC, en augmentant les niveaux de TGF- β tout en inhibant les cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-6, va donc soutenir la polarisation des Treg par rapport aux Th17.

De même, l'IL-10 exerce un double rôle au cours du LED (290). En effet, dans des modèles murins de lupus, l'IL-10 a alternativement été trouvée capable de promouvoir ou de protéger de la progression de la maladie. Par ailleurs, de nombreuses études ont rapporté des niveaux paradoxalement accrus de cette cytokine anti-inflammatoire chez les patients lupiques, parfois corrélés à l'activité du LED ainsi qu'aux taux d'anticorps anti-ADN.

Il apparaît que l'action de l'IL-10, tout comme celle du TGF- β , dépend en grande partie de facteurs micro environnementaux et de la balance cytokinique. Par exemple, la présence d'IL-18 associée à l'IL-10 favorise l'action stimulatrice de cette dernière sur les cellules NK (291). De même, Yuan *et al* (292) ont récemment démontré que l'action anti-inflammatoire de l'IL-10 sur les monocytes de patients lupiques était altérée en présence de CI. L'IL-10 peut donc, dans un microenvironnement favorable, réguler les CD et les fonctions lymphocytaires T vers un profil tolérant, ou inversement promouvoir une réponse inflammatoire. Le TPC, par la régulation globale des différents acteurs immunitaires, favorise un environnement tolérant et ainsi l'action anti-inflammatoire de l'IL-10.

However, it must be noticed that IL-10 and TGF- β are not exclusively secreted by Treg cells. Thus, high levels of these cytokines in the T-treated group may be caused by other cell types with regulatory properties, including Breg cells that we have previously mentioned, or M2 macrophages.

Interestingly, in SLE some cytokines may exert both protective and harmful actions. For example, since the presence of TGF- β alone towards a Treg differentiation, TGF- β associated with IL-6 towards a Th17 differentiation (289). TPC, by promoting anti-inflammatory cytokines such as TGF- β while inhibiting pro-inflammatory cytokines including IL-6 supports Treg rather than Th17 differentiation.

Similarly, IL-10 exerts a dual role in SLE (290). In lupus murine models, IL-10 has alternately been found able to promote or protect from disease progression. Furthermore, many studies have reported paradoxically higher IL-10 rates in SLE patients, the latter being sometimes correlated with disease activity as well as anti-DNA antibodies levels.

IL-10 such as TGF- β effects appears to depend on microenvironmental factors and cytokine imbalance. For example, the presence of IL-18 associated to IL-10 promotes a stimulating effect of IL-10 on the NK cells (291). Similarly, Yuan *et al* (292) have recently shown that anti-inflammatory action of IL-10 on monocytes of SLE patients was impaired in the presence of IC. Therefore IL-10 may in a favorable microenvironment regulate DC and T lymphocytes toward a tolerant profile, or conversely stimulate an inflammatory response. TPC through its overall control of immune response can promote a tolerant environment and thus IL-10 anti-inflammatory action.

Toutefois, il faut souligner que l'IL-10 est connue pour ses effets stimulateurs sur la prolifération et la sécrétion d'anticorps par les LB (243,290,293). Nous ne pouvons pas exclure dans notre cas que cette action stimulatrice de l'IL-10 ait contribué à l'absence de réduction significative des taux d'anticorps anti-ADNdb dans les différents groupes de souris traitées.

Pour finir, nous avons vu précédemment (voir §I-2.3.2 et I-2.3.4) que l'action immunosuppressive des helminthes passe également par la génération d'un phénotype tolérant des CD et macrophages, à savoir les CD dites tolérogènes et les macrophages régulateurs de type M2. Ces deux sous-types cellulaires sont caractérisés par leurs propriétés immunorégulatrices dues notamment à la production d'IL-10 et de TGF- β (117,133). Si le rôle des macrophages de type M2 dans le LED reste encore à définir, l'implication des CD tolérogènes est désormais reconnue (294). Il est important de préciser qu'au cours du LED, les CD plasmocytaires immunogènes sont la source principale d'IFN- α (231,247), l'un des facteurs pathogéniques clés au cours du LED que nous ne détaillerons pas ici, usuellement décrit comme la « signature interféron » (295,296).

Bien que nous n'ayons pas analysé ces deux sous-populations dans nos travaux, nous pouvons présumer que l'augmentation des taux d'IL-10 et de TGF- β sont en partie liés à une expansion de ces acteurs cellulaires. Il sera intéressant dans de futures études de déterminer l'effet de notre molécule TPC sur la génération de ces cellules régulatrices. En particulier, l'induction de CD tolérogènes aurait un intérêt majeur à la lumière du rôle sécréteur d'IFN- α des CD immunogènes au cours du LED.

However, we must stress that IL-10 is also known to exert stimulatory effects on B-cells proliferation and antibody secretion (243,290,293). In the present work, we can not exclude that IL-10 stimulatory action on effector B-cells may have contributed to the lack of significant reduction in anti-dsDNA levels in the different groups of treated mice.

Finally, as previously detailed (see §I-2.3.2 and I-2.3.4) helminth immunosuppressive effects also include generation of a tolerant phenotype of macrophages and DC, ie so called tolerogenic DC and regulatory M2 macrophages. These two subtypes are characterized by their cellular immunoregulatory properties mainly due to the production of IL-10 and TGF- β (117,133). While the role of M2 macrophages in SLE remains to be defined, the involvement of tolerogenic DC is now recognized (294). It is worth noting that in SLE plasmacytoid immunogenic DC are the main source of IFN- α (231,247), which is a key factor in SLE pathogenesis, usually reported as "interferon signature" (295,296).

Although we have not analyzed these two subpopulations in our work, we can assume that increase in IL-10 and TGF- β levels is partly related to an expansion of these two cellular populations. It will be interesting in future studies to determine the effect of our TPC molecule on the generation of these regulatory cells. Indeed, induction of tolerogenic DC would have a major interest in particular in the light of immunogenic DC IFN- α -secreting role in SLE.

V - CONCLUSION

En conclusion, nos travaux démontrent l'efficacité du conjugué TPC dans le modèle NZBxW/F1 de souris lupique. L'association de la PC dérivée des produits d'ES des helminthes, avec la T comme adjuvant naturel a permis d'atténuer de manière significative l'évolution de la glomérulonéphrite lupique, conduisant à une amélioration de la survie.

Nous avons montré que les effets du TPC sont liés à une modulation de la réponse immunitaire de l'hôte permettant de rétablir un environnement tolérant, en augmentant de manière significative la production de cytokines anti-inflammatoires et l'expansion des LTreg, tout en freinant la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires. Nous avons également confirmé l'intérêt de l'association de la T à la PC. Tout d'abord, la T a montré une action protectrice propre dans ce modèle murin de LED grâce notamment grâce à ses propriétés stimulatrices de la phagocytose. De plus, elle permet de potentialiser l'action de la PC qui, lorsqu'elle est seule, apparaît faiblement immunogène et produit des effets minimes.

Le vaste potentiel des thérapies dérivées des helminthes dans les MAI suscite un intérêt croissant. Il apparaît clairement désormais que ces parasites agissent simultanément à plusieurs niveaux et sur les différents acteurs cellulaires clés du système immunitaire, formant un véritable réseau visant à promouvoir un environnement tolérant. Les données encourageantes issues de modèles murins et des premiers essais cliniques menés en utilisant les thérapies dérivées des helminthes dans plusieurs MAI ont conduit à une augmentation spectaculaire du nombre de projets d'études cliniques de phase 1 et 2 dans les MCI, la SEP, la PR, le psoriasis et la maladie coéliquue (155). Le champ des maladies inflammatoires à médiation Th1/Th17 qui pourraient bénéficier d'un tel traitement est encore vaste. Nos travaux montrent que le LED est un candidat idéal pour ces nouvelles immunothérapies

V – CONCLUSION

To conclude, our work demonstrates the effectiveness of TPC compound in NZBxW/F1 lupus mice model. The association of PC derived from helminth ES products, with T as a natural adjuvant significantly attenuated lupus glomerulonephritis, leading to improved survival.

We show that TPC effects are related to its modulatory properties on the host immune response. TPC is able to restore a tolerant environment by significantly increasing anti-inflammatory cytokines production and Treg cells expansion, while inhibiting the secretion of proinflammatory mediators. We also confirmed the benefit of combining T to PC. First, T exhibit its own protective action in this lupus mouse model mainly through its stimulatory effects on phagocytosis. Moreover, it also potentiates the action of PC, that alone seems to be poorly immunogenic and produced minimal effects.

The great potential of helminth-derived therapy in autoimmune diseases raises growing interest. It is becoming apparent that these parasites are acting simultaneously at several levels and on the different key cellular players of immune system establishing a real network aiming to promote a tolerant environment. The encouraging data from mouse models and early clinical trials conducted in several autoimmune diseases using helminth-derived therapy, have led to a dramatic increase in the number of phase-1 and phase-2 clinical trials projects in IBD, MS, RA, psoriasis and celiac disease (155). The field of inflammatory Th1/Th17-mediated diseases that may benefit from such treatment remains wide. Our experiment suggest SLE as an ideal candidate for these new immunotherapies.

Néanmoins, nous n'en sommes qu'aux prémices des thérapies dérivées d'helminthes, et tout reste encore à faire. Cela inclut d'analyser et d'extraire d'autres molécules responsables des effets régulateurs des helminthes, de clarifier leurs modes d'action sur le système immunitaire, ces derniers dépendant probablement du micro-organisme impliqué, de confirmer les résultats précédemment rapportés dans de plus larges études prospectives et d'identifier d'autres maladies éligibles pour ce nouveau type d'immunomodulation.

Cependant, de nombreuses inconnues demeurent sur ces immunothérapies et imposent la plus grande prudence. En particulier, les effets à long terme de l'immunomodulation par les helminthes ne sont pas encore définis puisque les rares études cliniques à ce jour n'ont pas excédé 24 semaines de suivi. La manipulation de la réponse immunitaire peut conduire à compromettre les mécanismes de défense contre d'autres agents pathogènes ou contre les cancers. Il faut également rester prudent quant à l'utilisation de parasites induisant une infection chronique, qui peut être difficilement contrôlable. Sur ce plan, l'utilisation de molécules dérivées d'helminthes semble être une solution plus intéressante et sûre (94,155).

Nos travaux suggèrent que notre composé dérivé d'helminthe permet de retrouver et d'utiliser à des fins thérapeutiques toutes les propriétés immunomodulatrices des helminthes. En plus de son efficacité sur un modèle murin de lupus, nous avons utilisé avec succès notre composé dans un modèle animal de MICI (297) et de PR (données non publiées). Des études complémentaires seront nécessaires pour en préciser les mécanismes d'action et l'évaluer dans d'autres MAI.

Ainsi, si elles sont abordées avec prudence, les helminthes pourraient apporter de notre passé nos futures immunothérapies.

Nevertheless, it is only the beginnings of helminth-derived therapies and everything remains to be done. This includes to analyze and extract other molecules responsible for worms' regulating effects, clarify their action on immune system, the latter likely depending on the microorganism, confirm previous findings in larger prospective trials and identify other diseases eligible for this new type of immunomodulation.

However, many unknowns remain about these immunotherapies and require the greatest caution. Especially the long-term effects of helminth immunomodulation are still unclear since the rare clinical studies to date have not exceeded 24 weeks of follow-up. Manipulating immune response could lead to compromise defense mechanisms against other pathogens or cancers. It also needs to be careful about using parasites inducing chronic infection, which may be less controllable. Therefore, using helminth-derived molecules appears to be more attractive and safe (94,155).

Our experiments suggest that helminth-derived TPC compound exhibits all the helminth immunomodulatory properties that may be used for therapeutic use. In addition to its efficacy in a lupus mouse model, we have successfully used our compound in IBD (297) and RA (unpublished data) animal model. Further studies are needed to clarify its mechanisms of action and evaluate this molecule in other autoimmune diseases.

Thus, if handled cautiously, helminthes might provide from past our future therapies.

RÉFÉRENCES

1. Eder W, Ege MJ, von Mutius E. The asthma epidemic. *N Engl J Med*. 2006 Nov 23;355(21):2226–35.
2. Bieber T. Atopic dermatitis. *N Engl J Med*. 2008 Apr 3;358(14):1483–94.
3. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyürüs E, Green A, Soltész G. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet*. 2009 Jul 13;373(9680):2027–33.
4. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011 May;140(6):1785–94.
5. Moroni L, Bianchi I, Lleo A. Geoepidemiology, gender and autoimmune disease. *Autoimmun Rev*. 2012 May;11(6-7):A386–92.
6. World Health Organization. Atlas of Multiple Sclerosis. 2013.
7. Costenbader KH, Gay S, Alarcón-Riquelme ME, Iaccarino L, Doria A. Genes, epigenetic regulation and environmental factors: which is the most relevant in developing autoimmune diseases? *Autoimmun Rev*. 2012 Jun;11(8):604–9.
8. Colafrancesco S, Agmon-Levin N, Perricone C, Shoenfeld Y. Unraveling the soul of autoimmune diseases: pathogenesis, diagnosis and treatment adding dowels to the puzzle. *Immunol Res*. 2013 Jul;56(2-3):200–5.
9. Antico A, Tampoia M, Tozzoli R, Bizzaro N. Can supplementation with vitamin D reduce the risk or modify the course of autoimmune diseases? A systematic review of the literature. *Autoimmun Rev*. 2012 Dec;12(2):127–36.
10. Arnson Y, Shoenfeld Y, Amital H. Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity. *J Autoimmun*. 2010 May;34(3):J258–65.
11. Farhat SCL, Silva CA, Orione MAM, Campos LMA, Sallum AME, Braga ALF. Air pollution in autoimmune rheumatic diseases: a review. *Autoimmun Rev*. 2011 Nov;11(1):14–21.
12. Perricone C, Colafrancesco S, Mazar RD, Soriano A, Agmon-Levin N, Shoenfeld Y. Autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA) 2013: Unveiling the pathogenic, clinical and diagnostic aspects. *J Autoimmun*. 2013 Dec;47:1–16.

13. Versini M, Jeandel P-Y, Rosenthal E, Shoenfeld Y. Obesity in autoimmune diseases: Not a passive bystander. *Autoimmun Rev.* 2014 Sep;13(9):981–1000.
14. Bogdanos DP, Smyk DS, Invernizzi P, Rigopoulou EI, Blank M, Pouria S, et al. Infectome: a platform to trace infectious triggers of autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2013 May;12(7):726–40.
15. Saeki Y, Ishihara K. Infection-immunity liaison: Pathogen-driven autoimmune-mimicry (PDAIM). *Autoimmun Rev.* 2014 published online first on Aug 23;doi: 10.1016/j.autrev.2014.08.024.
16. Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y. Parasitic infection and autoimmunity. *Lupus.* 2009 Nov;18(13):1144–8.
17. Elliott DE, Weinstock J V. Helminth-host immunological interactions: prevention and control of immune-mediated diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2012 Jan;1247:83–96.
18. Rook GAW. Hygiene hypothesis and autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2012 Feb;42(1):5–15.
19. Okada H, Kuhn C, Feillet H, Bach J-F. The “hygiene hypothesis” for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin Exp Immunol.* 2010 Apr;160(1):1–9.
20. Greenwood BM. Autoimmune disease and parasitic infections in Nigerians. *Lancet.* 1968 Aug 17;2(7564):380–2.
21. Greenwood BM, Herrick EM, Voller A. Suppression of autoimmune disease in NZB and (NZB x NZW) F1 hybrid mice by infection with malaria. *Nature.* 1970 Apr 18;226(5242):266–7.
22. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ.* 1989 Nov 18;299(6710):1259–60.
23. Ball TM, Castro-Rodriguez JA, Griffith KA, Holberg CJ, Martinez FD, Wright AL. Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *N Engl J Med.* 2000 Aug 24;343(8):538–43.
24. Benn CS, Melbye M, Wohlfahrt J, Björkstén B, Aaby P. Cohort study of sibling effect, infectious diseases, and risk of atopic dermatitis during first 18 months of life. *BMJ.* 2004 May 22;328(7450):1223.
25. Goldberg S, Israeli E, Schwartz S, Shochat T, Izbicki G, Toker-Maimon O, et al. Asthma prevalence, family size, and birth order. *Chest.* 2007 Jun;131(6):1747–52.

26. Nicolaou NC, Simpson A, Lowe LA, Murray CS, Woodcock A, Custovic A. Day-care attendance, position in sibship, and early childhood wheezing: a population-based birth cohort study. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Sep;122(3):500–6.e5.
27. Strachan DP, Ait-Khaled N, Foliaki S, Mallol J, Odhiambo J, Pearce N, et al. Siblings, Asthma, Rhinoconjunctivitis And Eczema: A Worldwide Perspective From The International Study Of Asthma And Allergies In Childhood. *Clin Exp Allergy*. 2014 published online first on Jun 10;DOI: 10.1111/cea.12349.
28. Pelucchi C, Galeone C, Bach J-F, La Vecchia C, Chatenoud L. Pet exposure and risk of atopic dermatitis at the pediatric age: a meta-analysis of birth cohort studies. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Sep;132(3):616–622.e7.
29. Nowak D, Heinrich J, Jörres R, Wassmer G, Berger J, Beck E, et al. Prevalence of respiratory symptoms, bronchial hyperresponsiveness and atopy among adults: west and east Germany. *Eur Respir J*. 1996 Dec;9(12):2541–52.
30. Heinrich J, Hoelscher B, Frye C, Meyer I, Wjst M, Wichmann HE. Trends in prevalence of atopic diseases and allergic sensitization in children in Eastern Germany. *Eur Respir J*. 2002 Jun;19(6):1040–6.
31. Crane J, Wickens K. Antibiotics and asthma: a tricky tributary of the hygiene hypothesis. *Lancet Respir Med*. 2014 Aug;2(8):595–7.
32. Alm B, Goksör E, Pettersson R, Möllborg P, Erdes L, Loid P, et al. Antibiotics in the first week of life is a risk factor for allergic rhinitis at school age. *Pediatr Allergy Immunol*. 2014 Aug;25(5):468–72.
33. Wennergren G, Ekerljung L, Alm B, Eriksson J, Lötval J, Lundbäck B. Asthma in late adolescence--farm childhood is protective and the prevalence increase has levelled off. *Pediatr Allergy Immunol*. 2010 Aug;21(5):806–13.
34. Solis Soto MT, Patiño A, Nowak D, Radon K. Prevalence of asthma, rhinitis and eczema symptoms in rural and urban school-aged children from Oropeza Province - Bolivia: a cross-sectional study. *BMC Pulm Med*. 2014 Jan;14:40.
35. Cooper PJ, Chico ME, Rodrigues LC, Ordonez M, Strachan D, Griffin GE, et al. Reduced risk of atopy among school-age children infected with geohelminth parasites in a rural area of the tropics. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 May;111(5):995–1000.

36. Van den Biggelaar AHJ, Rodrigues LC, van Ree R, van der Zee JS, Hoeksma-Kruize YCM, Souverein JHM, et al. Long-term treatment of intestinal helminths increases mite skin-test reactivity in Gabonese schoolchildren. *J Infect Dis*. 2004 Mar 1;189(5):892–900.
37. Araujo MI, Lopes AA, Medeiros M, Cruz AA, Sousa-Atta L, Solé D, et al. Inverse association between skin response to aeroallergens and *Schistosoma mansoni* infection. *Int Arch Allergy Immunol*. 2000 Oct;123(2):145–8.
38. Lynch NR, Hagel I, Perez M, Di Prisco MC, Lopez R, Alvarez N. Effect of anthelmintic treatment on the allergic reactivity of children in a tropical slum. *J Allergy Clin Immunol*. 1993 Sep;92(3):404–11.
39. Flohr C, Tuyen LN, Lewis S, Quinnell R, Minh TT, Liem HT, et al. Poor sanitation and helminth infection protect against skin sensitization in Vietnamese children: A cross-sectional study. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Dec;118(6):1305–11.
40. Conradi S, Malzahn U, Schröter F, Paul F, Quill S, Spruth E, et al. Environmental factors in early childhood are associated with multiple sclerosis: a case-control study. *BMC Neurol*. 2011 Jan;11:123.
41. Hughes A-M, Lucas RM, McMichael AJ, Dwyer T, Pender MP, van der Mei I, et al. Early-life hygiene-related factors affect risk of central nervous system demyelination and asthma differentially. *Clin Exp Immunol*. 2013 Jun;172(3):466–74.
42. Bitti PP, Murgia BS, Ticca A, Ferrai R, Musu L, Piras ML, et al. Association between the ancestral haplotype HLA A30B18DR3 and multiple sclerosis in central Sardinia. *Genet Epidemiol*. 2001 Mar;20(2):271–83.
43. Sotgiu S, Pugliatti M, Sotgiu A, Sanna A, Rosati G. Does the “hygiene hypothesis” provide an explanation for the high prevalence of multiple sclerosis in Sardinia? *Autoimmunity*. 2003 Aug;36(5):257–60.
44. Sotgiu S, Sannella AR, Conti B, Arru G, Fois ML, Sanna A, et al. Multiple sclerosis and anti-*Plasmodium falciparum* innate immune response. *J Neuroimmunol*. 2007 Apr;185(1-2):201–7.
45. Sotgiu S, Angius A, Embry A, Rosati G, Musumeci S. Hygiene hypothesis: innate immunity, malaria and multiple sclerosis. *Med Hypotheses*. 2008 Jan;70(4):819–25.
46. Seiskari T, Kondrashova A, Viskari H, Kaila M, Haapala A-M, Aittoniemi J, et al. Allergic sensitization and microbial load--a comparison between Finland and Russian Karelia. *Clin Exp Immunol*. 2007 Apr;148(1):47–52.

47. Kondrashova A, Seiskari T, Ilonen J, Knip M, Hyöty H. The “Hygiene hypothesis” and the sharp gradient in the incidence of autoimmune and allergic diseases between Russian Karelia and Finland. *APMIS*. 2013 Jun;121(6):478–93.
48. Elliott DE, Urban JF JR, Argo CK, Weinstock J V. Does the failure to acquire helminthic parasites predispose to Crohn’s disease? *FASEB J*. 2000 Sep;14(12):1848–55.
49. Fiasse R, Latinne D. Intestinal helminths: a clue explaining the low incidence of inflammatory bowel diseases in Sub-Saharan Africa? Potential benefits and hazards of helminth therapy. *Acta Gastroenterol Belg*. 2006;69(4):418–22.
50. Bodansky HJ, Staines A, Stephenson C, Haigh D, Cartwright R. Evidence for an environmental effect in the aetiology of insulin dependent diabetes in a trans-migratory population. *BMJ*. 1992 Apr 18;304(6833):1020–2.
51. Staines A, Hanif S, Ahmed S, McKinney PA, Shera S, Bodansky HJ. Incidence of insulin dependent diabetes mellitus in Karachi, Pakistan. *Arch Dis Child*. 1997 Mar;76(2):121–3.
52. Leibowitz U, Kahana E, Alter M. The changing frequency of multiple sclerosis in Israel. *Arch Neurol*. 1973 Aug;29(2):107–10.
53. Detels R, Brody JA, Edgar AH. Multiple sclerosis among American, Japanese and Chinese migrants to California and Washington. *J Chronic Dis*. 1972 Jan;25(1):3–10.
54. Symmons DP. Frequency of lupus in people of African origin. *Lupus*. 1995 Jun;4(3):176–8.
55. Panda AK, Ravindran B, Das BK. Rheumatoid arthritis patients are free of filarial infection in an area where filariasis is endemic: comment on the article by Pineda et al. *Arthritis Rheum*. 2013 May;65(5):1402–3.
56. Rook GAW, Raison CL, Lowry CA. Microbial “old friends”, immunoregulation and socioeconomic status. *Clin Exp Immunol*. 2014 Jul;177(1):1–12.
57. Rook GAW. 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: darwinian medicine and the “hygiene” or “old friends” hypothesis. *Clin Exp Immunol*. 2010 Apr;160(1):70–9.
58. Dunder T, Tapiainen T, Pokka T, Uhari M. Infections in child day care centers and later development of asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis: prospective follow-up survey 12 years after controlled randomized hygiene intervention. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2007 Oct;161(10):972–7.

59. Koloski N-A, Bret L, Radford-Smith G. Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease: a critical review of the literature. *World J Gastroenterol*. 2008 Jan 14;14(2):165–73.
60. Yoo J, Tcheurekdjian H, Lynch S V, Cabana M, Boushey HA. Microbial manipulation of immune function for asthma prevention: inferences from clinical trials. *Proc Am Thorac Soc*. 2007 Jul;4(3):277–82.
61. Ziegelbauer K, Speich B, Mäusezahl D, Bos R, Keiser J, Utzinger J. Effect of sanitation on soil-transmitted helminth infection: systematic review and meta-analysis. *PLoS Med*. 2012 Jan;9(1):e1001162.
62. Hotez PJ, Brindley PJ, Bethony JM, King CH, Pearce EJ, Jacobson J. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *J Clin Invest*. 2008 Apr;118(4):1311–21.
63. Murray CpJL, Ortblad KF, Guinovart C, Lim SS, Wolock TM, Roberts DA, et al. Global, regional, and national incidence and mortality for HIV, tuberculosis, and malaria during 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2014 Sep 13;384(9947):1005–70.
64. Hooper L V, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*. 2012 Jun 8;336(6086):1268–73.
65. Lee YK, Mazmanian SK. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science*. 2010 Dec 24;330(6012):1768–73.
66. Surana NK, Kasper DL. Deciphering the tête-à-tête between the microbiota and the immune system. *J Clin Invest*. 2014 Oct 1;124(10):4197–203.
67. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*. 2014 Mar 27;157(1):121–41.
68. Karczewski J, Poniedziałek B, Adamski Z, Rzymiski P. The effects of the microbiota on the host immune system. *Autoimmunity*. 2014 Jul 14;1–11.
69. Huang EY, Devkota S, Moscoso D, Chang EB, Leone VA. The role of diet in triggering human inflammatory disorders in the modern age. *Microbes Infect*. 2013 Nov;15(12):765–74.
70. Hanski I, von Hertzen L, Fyhrquist N, Koskinen K, Torppa K, Laatikainen T, et al. Environmental biodiversity, human microbiota, and allergy are interrelated. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 May 22;109(21):8334–9.

71. Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012 Jun 14;486(7402):222–7.
72. Azad MB, Konya T, Maughan H, Guttman DS, Field CJ, Sears MR, et al. Infant gut microbiota and the hygiene hypothesis of allergic disease: impact of household pets and siblings on microbiota composition and diversity. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2013 Jan;9(1):15.
73. Brown EM, Arrieta M-C, Finlay BB. A fresh look at the hygiene hypothesis: how intestinal microbial exposure drives immune effector responses in atopic disease. *Semin Immunol*. 2013 Nov 30;25(5):378–87.
74. Penders J, Gerhold K, Thijs C, Zimmermann K, Wahn U, Lau S, et al. New insights into the hygiene hypothesis in allergic diseases: mediation of sibling and birth mode effects by the gut microbiota. *Gut Microbes*. 2014;5(2):239–44.
75. Maslowski KM, Mackay CR. Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat Immunol*. 2011 Jan;12(1):5–9.
76. Vieira SM, Pagovich OE, Kriegel MA. Diet, microbiota and autoimmune diseases. *Lupus*. 2014 May;23(6):518–26.
77. Manzel A, Muller DN, Hafler DA, Kleinewietfeld M. Role of “ Western Diet ” in Inflammatory Autoimmune Diseases. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2014;14(1):404.
78. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Aug 17;107(33):14691–6.
79. Pérez-Cobas AE, Artacho A, Knecht H, Ferrús ML, Friedrichs A, Ott SJ, et al. Differential effects of antibiotic therapy on the structure and function of human gut microbiota. *PLoS One*. 2013 Jan;8(11):e80201.
80. Modi SR, Collins JJ, Relman DA. Antibiotics and the gut microbiota. *J Clin Invest*. 2014 Oct 1;124(10):4212–8.
81. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jun 29;107(26):11971–5.
82. Kuo C-H, Kuo H-F, Huang C-H, Yang S-N, Lee M-S, Hung C-H. Early life exposure to antibiotics and the risk of childhood allergic diseases: an update from the perspective of the hygiene hypothesis. *J Microbiol Immunol Infect*. 2013 Oct;46(5):320–9.

83. Zeissig S, Blumberg RS. Life at the beginning: perturbation of the microbiota by antibiotics in early life and its role in health and disease. *Nat Immunol.* 2014 Apr;15(4):307–10.
84. Thavagnanam S, Fleming J, Bromley A, Shields MD, Cardwell CR. A meta-analysis of the association between Caesarean section and childhood asthma. *Clin Exp Allergy.* 2008 Apr;38(4):629–33.
85. Cardwell CR, Stene LC, Joner G, Cinek O, Svensson J, Goldacre MJ, et al. Caesarean section is associated with an increased risk of childhood-onset type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. *Diabetologia.* 2008 May;51(5):726–35.
86. Nielsen NM, Bager P, Stenager E, Pedersen B V, Koch-Henriksen N, Hjalgrim H, et al. Cesarean section and offspring's risk of multiple sclerosis: a Danish nationwide cohort study. *Mult Scler.* 2013 Oct;19(11):1473–7.
87. Decker E, Engelmann G, Findeisen A, Gerner P, Laass M, Ney D, et al. Cesarean delivery is associated with celiac disease but not inflammatory bowel disease in children. *Pediatrics.* 2010 Jun;125(6):e1433–40.
88. Mårild K, Stephansson O, Montgomery S, Murray JA, Ludvigsson JF. Pregnancy outcome and risk of celiac disease in offspring: a nationwide case-control study. *Gastroenterology.* 2012 Jan;142(1):39–45.e3.
89. McSorley HJ, Maizels RM. Helminth infections and host immune regulation. *Clin Microbiol Rev.* 2012 Oct;25(4):585–608.
90. Weinstock J V. Autoimmunity: The worm returns. *Nature.* 2012 Nov 8;491(7423):183–5.
91. Ben-Ami Shor D, Harel M, Eliakim R, Shoenfeld Y. The hygiene theory harnessing helminths and their ova to treat autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2013 Oct;45(2):211–6.
92. Zacccone P, Cooke A. Vaccine against autoimmune disease: can helminths or their products provide a therapy? *Curr Opin Immunol.* 2013 Jun;25(3):418–23.
93. Maizels RM, McSorley HJ, Smyth DJ. Helminths in the hygiene hypothesis: sooner or later? *Clin Exp Immunol.* 2014 Jul;177(1):38–46.
94. Shor DB-A, Shoenfeld Y. Autoimmunity: Will worms cure rheumatoid arthritis? *Nat Rev Rheumatol.* 2013 Mar;9(3):138–40.
95. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989 Jan;7:145–73.

96. Annunziato F, Romagnani S. Heterogeneity of human effector CD4⁺ T cells. *Arthritis Res Ther*. 2009 Jan;11(6):257.
97. Gause WC, Urban JF, Stadecker MJ. The immune response to parasitic helminths: insights from murine models. *Trends Immunol*. 2003 May;24(5):269–77.
98. Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol*. 2007 Apr;8(4):345–50.
99. Singh RP, Hasan S, Sharma S, Nagra S, Yamaguchi DT, Wong D, et al. Th17 cells in inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2014 published online first on Aug 21;doi: 10.1016/j.autrev.2014.08.019.
100. Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*. 2000 May 26;101(5):455–8.
101. Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol*. 2005 Apr;5(4):271–83.
102. Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol*. 2007 Feb;8(2):191–7.
103. Sofronic-Milosavljevic L, Radovic I, Ilic N, Majstorovic I, Cvetkovic J, Gruden-Movsesijan A. Mechanisms of modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by chronic *Trichinella spiralis* infection in Dark Agouti rats. *Parasite Immunol*. 2010 Jun;32(6):450–9.
104. Elliott DE, Metwali A, Leung J, Setiawan T, Blum AM, Ince MN, et al. Colonization with *Heligmosomoides polygyrus* suppresses mucosal IL-17 production. *J Immunol*. 2008 Aug 15;181(4):2414–9.
105. Wu Z, Nagano I, Asano K, Takahashi Y. Infection of non-encapsulated species of *Trichinella* ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis involving suppression of Th17 and Th1 response. *Parasitol Res*. 2010 Oct;107(5):1173–88.
106. Osada Y, Shimizu S, Kumagai T, Yamada S, Kanazawa T. *Schistosoma mansoni* infection reduces severity of collagen-induced arthritis via down-regulation of pro-inflammatory mediators. *Int J Parasitol*. 2009 Mar;39(4):457–64.
107. Pineda MA, McGrath MA, Smith PC, Al-Riyami L, Rzepecka J, Gracie JA, et al. The parasitic helminth product ES-62 suppresses pathogenesis in collagen-induced arthritis by targeting the interleukin-17-producing cellular network at multiple sites. *Arthritis Rheum*. 2012 Oct;64(10):3168–78.

108. Saunders KA, Raine T, Cooke A, Lawrence CE. Inhibition of autoimmune type 1 diabetes by gastrointestinal helminth infection. *Infect Immun*. 2007 Jan;75(1):397–407.
109. Hübner MP, Stocker JT, Mitre E. Inhibition of type 1 diabetes in filaria-infected non-obese diabetic mice is associated with a T helper type 2 shift and induction of FoxP3⁺ regulatory T cells. *Immunology*. 2009 Aug;127(4):512–22.
110. Zaccone P, Fehérvári Z, Jones FM, Sidobre S, Kronenberg M, Dunne DW, et al. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. *Eur J Immunol*. 2003 May;33(5):1439–49.
111. Zaccone P, Burton O, Miller N, Jones FM, Dunne DW, Cooke A. *Schistosoma mansoni* egg antigens induce Treg that participate in diabetes prevention in NOD mice. *Eur J Immunol*. 2009 Apr;39(4):1098–107.
112. Zaccone P, Burton OT, Gibbs SE, Miller N, Jones FM, Schramm G, et al. The *S. mansoni* glycoprotein ω -1 induces Foxp3 expression in NOD mouse CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol*. 2011 Sep;41(9):2709–18.
113. McInnes IB, Leung BP, Harnett M, Gracie JA, Liew FY, Harnett W. A novel therapeutic approach targeting articular inflammation using the filarial nematode-derived phosphorylcholine-containing glycoprotein ES-62. *J Immunol*. 2003 Aug 15;171(4):2127–33.
114. Hübner MP, Shi Y, Torrero MN, Mueller E, Larson D, Soloviova K, et al. Helminth protection against autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice is independent of a type 2 immune shift and requires TGF- β . *J Immunol*. 2012 Jan 15;188(2):559–68.
115. Torres-Aguilar H, Blank M, Jara LJ, Shoenfeld Y. Tolerogenic dendritic cells in autoimmune diseases: crucial players in induction and prevention of autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2010 Nov;10(1):8–17.
116. Diebold SS. Determination of T-cell fate by dendritic cells. *Immunol Cell Biol*. 2008 Jul;86(5):389–97.
117. Pulendran B, Tang H, Manicassamy S. Programming dendritic cells to induce T(H)2 and tolerogenic responses. *Nat Immunol*. 2010 Aug;11(8):647–55.
118. White RR, Artavanis-Tsakonas K. How helminths use excretory secretory fractions to modulate dendritic cells. *Virulence*. 2012 Nov 15;3(7):668–77.
119. Everts B, Smits HH, Hokke CH, Yazdanbakhsh M. Helminths and dendritic cells: sensing and regulating via pattern recognition receptors, Th2 and Treg responses. *Eur J Immunol*. 2010 Jun;40(6):1525–37.

120. Sofronic-Milosavljevic LJ, Radovic I, Ilic N, Majstorovic I, Cvetkovic J, Gruden-Movsesijan A. Application of dendritic cells stimulated with *Trichinella spiralis* excretory-secretory antigens alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Med Microbiol Immunol*. 2013 Jun;202(3):239–49.
121. Hang L, Setiawan T, Blum AM, Urban J, Stoyanoff K, Arihiro S, et al. *Heligmosomoides polygyrus* infection can inhibit colitis through direct interaction with innate immunity. *J Immunol*. 2010 Sep 15;185(6):3184–9.
122. Blum AM, Hang L, Setiawan T, Urban JP, Stoyanoff KM, Leung J, et al. *Heligmosomoides polygyrus bakeri* induces tolerogenic dendritic cells that block colitis and prevent antigen-specific gut T cell responses. *J Immunol*. 2012 Sep 1;189(5):2512–20.
123. Khan AR, Amu S, Saunders SP, Fallon PG. The generation of regulatory B cells by helminth parasites. *Methods Mol Biol*. 2014 Jan;1190:143–62.
124. Van der Vlugt LEPM, Zinsou JF, Ozir-Fazalalikhan A, Kremsner PG, Yazdanbakhsh M, Adegnik AA, et al. Interleukin 10 (IL-10)-Producing CD1dhi Regulatory B Cells From *Schistosoma Haematobium*-Infected Individuals Induce IL-10-Positive T Cells and Suppress Effector T-Cell Cytokines. *J Infect Dis*. 2014 Oct 15;210(8):1207–16.
125. Kalampokis I, Yoshizaki A, Tedder TF. IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease. *Arthritis Res Ther*. 2013 Jan;15 Suppl 1:S1.
126. Yang M, Rui K, Wang S, Lu L. Regulatory B cells in autoimmune diseases. *Cell Mol Immunol*. 2013 Mar;10(2):122–32.
127. Rodgers DT, Pineda MA, McGrath MA, Al-Riyami L, Harnett W, Harnett MM. Protection against collagen-induced arthritis in mice afforded by the parasitic worm product, ES-62, is associated with restoration of the levels of interleukin-10-producing B cells and reduced plasma cell infiltration of the joints. *Immunology*. 2014 Mar;141(3):457–66.
128. Wilson MS, Taylor MD, O’Gorman MT, Balic A, Barr TA, Filbey K, et al. Helminth-induced CD19+CD23hi B cells modulate experimental allergic and autoimmune inflammation. *Eur J Immunol*. 2010 Jun;40(6):1682–96.
129. Sattler S, Ling G-S, Xu D, Husaarts L, Romaine A, Zhao H, et al. IL-10-producing regulatory B cells induced by IL-33 (Breg(IL-33)) effectively attenuate mucosal inflammatory responses in the gut. *J Autoimmun*. 2014 May;50:107–22.
130. Correale J, Farez M, Razzitte G. Helminth infections associated with multiple sclerosis induce regulatory B cells. *Ann Neurol*. 2008 Aug;64(2):187–99.

131. Lund FE, Randall TD. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4⁺ T cell immunity. *Nat Rev Immunol*. 2010 Apr;10(4):236–47.
132. Mauri C, Blair PA. Regulatory B cells in autoimmunity: developments and controversies. *Nat Rev Rheumatol*. 2010 Nov;6(11):636–43.
133. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. 2012 Mar 1;122(3):787–95.
134. Herbert DR, Hölscher C, Mohrs M, Arendse B, Schwegmann A, Radwanska M, et al. Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity*. 2004 May;20(5):623–35.
135. Taylor MD, Harris A, Nair MG, Maizels RM, Allen JE. F4/80⁺ alternatively activated macrophages control CD4⁺ T cell hyporesponsiveness at sites peripheral to filarial infection. *J Immunol*. 2006 Jun 1;176(11):6918–27.
136. Jang SW, Cho MK, Park MK, Kang SA, Na B-K, Ahn SC, et al. Parasitic helminth cystatin inhibits DSS-induced intestinal inflammation via IL-10(+)F4/80(+) macrophage recruitment. *Korean J Parasitol*. 2011 Sep;49(3):245–54.
137. Spits H, Cupedo T. Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. *Annu Rev Immunol*. 2012 Jan;30:647–75.
138. Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol*. 2013 Feb;13(2):145–9.
139. McSorley HJ, Blair NF, Smith KA, McKenzie AN, Maizels RM. Blockade of IL-33 release and suppression of type 2 innate lymphoid cell responses by helminth secreted products in airway allergy. *Mucosal Immunol*. 2014 Feb 5;7(5):1068–78.
140. Lee SC, Tang MS, Lim YAL, Choy SH, Kurtz ZD, Cox LM, et al. Helminth colonization is associated with increased diversity of the gut microbiota. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 May;8(5):e2880.
141. Walk ST, Blum AM, Ewing SA-S, Weinstock J V, Young VB. Alteration of the murine gut microbiota during infection with the parasitic helminth *Heligmosomoides polygyrus*. *Inflamm Bowel Dis*. 2010 Nov;16(11):1841–9.
142. Khan WI, Blennerhasset PA, Varghese AK, Chowdhury SK, Omsted P, Deng Y, et al. Intestinal nematode infection ameliorates experimental colitis in mice. *Infect Immun*. 2002 Nov;70(11):5931–7.

143. Elliott DE, Li J, Blum A, Metwali A, Qadir K, Urban JF, et al. Exposure to schistosome eggs protects mice from TNBS-induced colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003 Mar;284(3):G385–91.
144. Moreels TG, Nieuwendijk RJ, De Man JG, De Winter BY, Herman AG, Van Marck EA, et al. Concurrent infection with *Schistosoma mansoni* attenuates inflammation induced changes in colonic morphology, cytokine levels, and smooth muscle contractility of trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in rats. *Gut*. 2004 Jan;53(1):99–107.
145. Hunter MM, Wang A, Hirota CL, McKay DM. Neutralizing anti-IL-10 antibody blocks the protective effect of tapeworm infection in a murine model of chemically induced colitis. *J Immunol*. 2005 Jun 1;174(11):7368–75.
146. Smith P, Mangan NE, Walsh CM, Fallon RE, McKenzie ANJ, van Rooijen N, et al. Infection with a helminth parasite prevents experimental colitis via a macrophage-mediated mechanism. *J Immunol*. 2007 Apr 1;178(7):4557–66.
147. Mo H, Liu W, Lei J, Cheng Y, Wang C, Li Y. *Schistosoma japonicum* eggs modulate the activity of CD4⁺ CD25⁺ Tregs and prevent development of colitis in mice. *Exp Parasitol*. 2007 Aug;116(4):385–9.
148. Motomura Y, Wang H, Deng Y, El-Sharkawy RT, Verdu EF, Khan WI. Helminth antigen-based strategy to ameliorate inflammation in an experimental model of colitis. *Clin Exp Immunol*. 2009 Jan;155(1):88–95.
149. McKay DM. The immune response to and immunomodulation by *Hymenolepis diminuta*. *Parasitology*. 2010 Mar;137(3):385–94.
150. Summers RW, Elliott DE, Qadir K, Urban JF, Thompson R, Weinstock J V. *Trichuris suis* seems to be safe and possibly effective in the treatment of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2003 Sep;98(9):2034–41.
151. Summers RW, Elliott DE, Urban JF, Thompson R, Weinstock J V. *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. *Gut*. 2005 Jan;54(1):87–90.
152. Summers RW, Elliott DE, Urban JF, Thompson RA, Weinstock J V. *Trichuris suis* therapy for active ulcerative colitis: a randomized controlled trial. *Gastroenterology*. 2005 Apr;128(4):825–32.
153. Sandborn WJ, Elliott DE, Weinstock J, Summers RW, Landry-Wheeler A, Silver N, et al. Randomised clinical trial: the safety and tolerability of *Trichuris suis* ova in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013 Aug;38(3):255–63.

154. Lu L, Nanus M, Forman S. Coronado Biosciences Announces Top-Line Results From Its TRUST-I Phase 2 Clinical Trial of TSO for the Treatment of Crohn's Disease. <http://globenewswire.com/news-release/2013/10/14/580190/10052399/en/Coronado-Biosciences-Announces-Top-Line-Results-From-Its-TRUST-I-Phase-2-Clinical-Trial-of-TSO-for-the-Treatment-of-Crohn-s-Disease.html>. 2013.
155. Wammes LJ, Mpairwe H, Elliott AM, Yazdanbakhsh M. Helminth therapy or elimination: epidemiological, immunological, and clinical considerations. *Lancet Infect Dis*. 2014 published online first on Jun 26;doi: 10.1016/S1473-3099(14)70771-6.
156. Croese J, O'neil J, Masson J, Cooke S, Melrose W, Pritchard D, et al. A proof of concept study establishing *Necator americanus* in Crohn's patients and reservoir donors. *Gut*. 2006 Jan;55(1):136-7.
157. Mortimer K, Brown A, Feary J, Jagger C, Lewis S, Antoniak M, et al. Dose-ranging study for trials of therapeutic infection with *Necator americanus* in humans. *Am J Trop Med Hyg*. 2006 Nov;75(5):914-20.
158. Kuijk LM, Klaver EJ, Kooij G, van der Pol SMA, Heijnen P, Bruijns SCM, et al. Soluble helminth products suppress clinical signs in murine experimental autoimmune encephalomyelitis and differentially modulate human dendritic cell activation. *Mol Immunol*. 2012 Jun;51(2):210-8.
159. La Flamme AC, Ruddenklau K, Bäckström BT. Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Infect Immun*. 2003 Sep;71(9):4996-5004.
160. Reyes JL, Espinoza-Jiménez AF, González MI, Verdin L, Terrazas LI. *Taenia crassiceps* infection abrogates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol*. 2011 Jan;267(2):77-87.
161. Sewell D, Qing Z, Reinke E, Elliot D, Weinstock J, Sandor M, et al. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova immunization. *Int Immunol*. 2003 Jan;15(1):59-69.
162. Walsh KP, Brady MT, Finlay CM, Boon L, Mills KHG. Infection with a helminth parasite attenuates autoimmunity through TGF-beta-mediated suppression of Th17 and Th1 responses. *J Immunol*. 2009 Aug 1;183(3):1577-86.
163. Zhu B, Trikudanathan S, Zozulya AL, Sandoval-Garcia C, Kennedy JK, Atochina O, et al. Immune modulation by Lacto-N-fucopentaose III in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Immunol*. 2012 Mar;142(3):351-61.

164. Gruden-Movsesijan A, Ilic N, Mostarica-Stojkovic M, Stosic-Grujicic S, Milic M, Sofronic-Milosavljevic L. *Trichinella spiralis*: modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats. *Exp Parasitol*. 2008 Apr;118(4):641–7.
165. Zheng X, Hu X, Zhou G, Lu Z, Qiu W, Bao J, et al. Soluble egg antigen from *Schistosoma japonicum* modulates the progression of chronic progressive experimental autoimmune encephalomyelitis via Th2-shift response. *J Neuroimmunol*. 2008 Feb;194(1-2):107–14.
166. Correale J, Farez M. Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2007 Feb;61(2):97–108.
167. Correale J, Farez MF. The impact of parasite infections on the course of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2011 Apr;233(1-2):6–11.
168. Fleming JO, Isaak A, Lee JE, Luzzio CC, Carrithers MD, Cook TD, et al. Probiotic helminth administration in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 1 study. *Mult Scler*. 2011 Jun;17(6):743–54.
169. Fleming JO. Helminth therapy and multiple sclerosis. *Int J Parasitol*. 2013 Mar;43(3-4):259–74.
170. Pineda MA, Al-Riyami L, Harnett W, Harnett M. Themed Issue 2014: Lessons from helminth infections: ES-62 highlights new interventional approaches in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2014 Jul;177(1):13–23.
171. Harnett W, Worms MJ, Kapil A, Grainger M, Parkhouse RM. Origin, kinetics of circulation and fate in vivo of the major excretory-secretory product of *Acanthocheilonema viteae*. *Parasitology*. 1989 Oct;99 Pt 2:229–39.
172. Harnett MM, Kean DE, Boitelle A, McGuinness S, Thalhamer T, Steiger CN, et al. The phosphorycholine moiety of the filarial nematode immunomodulator ES-62 is responsible for its anti-inflammatory action in arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2008 Apr;67(4):518–23.
173. Pineda MA, Rodgers DT, Al-Riyami L, Harnett W, Harnett MM. ES-62 Protects Against Collagen-Induced Arthritis by Resetting Interleukin-22 Toward Resolution of Inflammation in the Joints. *Arthritis Rheumatol* (Hoboken, NJ). 2014 Jun;66(6):1492–503.
174. Al-Riyami L, Pineda MA, Rzepecka J, Huggan JK, Khalaf AI, Suckling CJ, et al. Designing anti-inflammatory drugs from parasitic worms: a synthetic small molecule analogue of the *Acanthocheilonema viteae* product ES-62 prevents development of collagen-induced arthritis. *J Med Chem*. 2013 Dec 27;56(24):9982–10002.

175. Shi M, Wang A, Prescott D, Waterhouse CCM, Zhang S, McDougall JJ, et al. Infection with an intestinal helminth parasite reduces Freund's complete adjuvant-induced monoarthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 2011 Feb;63(2):434–44.
176. Carranza F, Falcón CR, Nuñez N, Knubel C, Correa SG, Bianco I, et al. Helminth antigens enable CpG-activated dendritic cells to inhibit the symptoms of collagen-induced arthritis through Foxp3⁺ regulatory T cells. *PLoS One.* 2012 Jan;7(7):e40356.
177. Song X, Shen J, Wen H, Zhong Z, Luo Q, Chu D, et al. Impact of *Schistosoma japonicum* infection on collagen-induced arthritis in DBA/1 mice: a murine model of human rheumatoid arthritis. *PLoS One.* 2011 Jan;6(8):e23453.
178. Salinas-Carmona MC, de la Cruz-Galicia G, Pérez-Rivera I, Solís-Soto JM, Segoviano-Ramírez JC, Vázquez AV, et al. Spontaneous arthritis in MRL/lpr mice is aggravated by *Staphylococcus aureus* and ameliorated by *Nippostrongylus brasiliensis* infections. *Autoimmunity.* 2009 Jan;42(1):25–32.
179. Cooke A, Tonks P, Jones FM, O'Shea H, Hutchings P, Fulford AJ, et al. Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Parasite Immunol.* 1999 Apr;21(4):169–76.
180. Zacccone P, Burton OT, Gibbs S, Miller N, Jones FM, Dunne DW, et al. Immune modulation by *Schistosoma mansoni* antigens in NOD mice: effects on both innate and adaptive immune systems. *J Biomed Biotechnol.* 2010 Jan;2010:795210.
181. Liu Q, Sundar K, Mishra PK, Mousavi G, Liu Z, Gaydo A, et al. Helminth infection can reduce insulinitis and type 1 diabetes through CD25- and IL-10-independent mechanisms. *Infect Immun.* 2009 Dec;77(12):5347–58.
182. Imai S, Tezuka H, Fujita K. A factor of inducing IgE from a filarial parasite prevents insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Sep 7;286(5):1051–8.
183. Wang B, Geng YB, Wang CR. CD1-restricted NK T cells protect nonobese diabetic mice from developing diabetes. *J Exp Med.* 2001 Aug 6;194(3):313–20.
184. Daveson AJ, Jones DM, Gaze S, McSorley H, Clouston A, Pascoe A, et al. Effect of hookworm infection on wheat challenge in celiac disease--a randomised double-blinded placebo controlled trial. *PLoS One.* 2011 Jan;6(3):e17366.

185. EMMcSorley HJ, Gaze S, Daveson J, Jones D, Anderson RP, Clouston A, et al. Suppression of inflammatory immune responses in celiac disease by experimental hookworm infection. *PLoS One*. 2011 Jan;6(9):e24092.
186. Nagayama Y, Watanabe K, Niwa M, McLachlan SM, Rapoport B. *Schistosoma mansoni* and alpha-galactosylceramide: prophylactic effect of Th1 Immune suppression in a mouse model of Graves' hyperthyroidism. *J Immunol*. 2004 Aug 1;173(3):2167–73.
187. Atochina O, Harn D. Prevention of psoriasis-like lesions development in *fsn/fsn* mice by helminth glycans. *Exp Dermatol*. 2006 Jun;15(6):461–8.
188. Agmon-Levin N, Mosca M, Petri M, Shoenfeld Y. Systemic lupus erythematosus one disease or many? *Autoimmun Rev*. 2012 Jun;11(8):593–5.
189. Borchers AT, Naguwa SM, Shoenfeld Y, Gershwin ME. The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*. 2010 Mar;9(5):A277–87.
190. Kasitanon N, Magder LS, Petri M. Predictors of survival in systemic lupus erythematosus. *Medicine (Baltimore)*. 2006 May;85(3):147–56.
191. Borchers AT, Keen CL, Shoenfeld Y, Gershwin ME. Surviving the butterfly and the wolf: mortality trends in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*. 2004 Aug;3(6):423–53.
192. Urowitz MB, Gladman DD, Tom BDM, Ibañez D, Farewell VT. Changing patterns in mortality and disease outcomes for patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2008 Nov;35(11):2152–8.
193. Murphy G, Lisnevskaja L, Isenberg D. Systemic lupus erythematosus and other autoimmune rheumatic diseases: challenges to treatment. *Lancet*. Elsevier Ltd; 2013;382(9894):809–18.
194. Adebajo AO. Low frequency of autoimmune disease in tropical Africa. *Lancet*. 1997 Feb 1;349(9048):361–2.
195. Greenwood B, Corrah T. Systemic lupus erythematosus in African immigrants. *Lancet*. 2001 Oct 6;358(9288):1182.
196. Minaur N, Sawyers S, Parker J, Darmawan J. Rheumatic disease in an Australian Aboriginal community in North Queensland, Australia. A WHO-ILAR COPCORD survey. *J Rheumatol*. 2004 May;31(5):965–72.

197. Hentati B, Sato MN, Payelle-Brogard B, Avrameas S, Ternynck T. Beneficial effect of polyclonal immunoglobulins from malaria-infected BALB/c mice on the lupus-like syndrome of (NZB x NZW)F1 mice. *Eur J Immunol.* 1994 Jan;24(1):8–15.
198. Al-Quraishy S, Abdel-Maksoud MA, El-Amir A, Abdel-Ghaffar FA, Badr G. Malarial infection of female BWF1 lupus mice alters the redox state in kidney and liver tissues and confers protection against lupus nephritis. *Oxid Med Cell Longev.* 2013 Jan;2013:156562.
199. Chen M, Aosai F, Norose K, Mun H-S, Ishikura H, Hirose S, et al. *Toxoplasma gondii* infection inhibits the development of lupus-like syndrome in autoimmune (New Zealand Black x New Zealand White) F1 mice. *Int Immunol.* 2004 Jul;16(7):937–46.
200. Miyake K, Adachi K, Watanabe M, Sasatomi Y, Ogahara S, Abe Y, et al. Parasites alter the pathological phenotype of lupus nephritis. *Autoimmunity.* 2014 Jun 24;1–10.
201. Perry D, Sang A, Yin Y, Zheng Y-Y, Morel L. Murine models of systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol.* 2011 Jan;2011:271694.
202. Harnett W. Secretory products of helminth parasites as immunomodulators. *Mol Biochem Parasitol.* 2014 Jul;195(2):130–6.
203. Harnett W, Frame MJ, Nor ZM, MacDonald M, Houston KM. Some preliminary data on the nature/structure of the PC-glycan of the major excretory-secretory product of *Acanthocheilonema viteae* (ES-62). *Parasite.* 1994 Jun;1(2):179–81.
204. Harnett W, Deehan MR, Houston KM, Harnett MM. Immunomodulatory properties of a phosphorylcholine-containing secreted filarial glycoprotein. *Parasite Immunol.* 1999 Dec;21(12):601–8.
205. Whelan M, Harnett MM, Houston KM, Patel V, Harnett W, Rigley KP. A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells. *J Immunol.* 2000 Jun 15;164(12):6453–60.
206. Goodridge HS, McGuinness S, Houston KM, Egan CA, Al-Riyami L, Alcocer MJC, et al. Phosphorylcholine mimics the effects of ES-62 on macrophages and dendritic cells. *Parasite Immunol.* 2007 Mar;29(3):127–37.
207. Al-Riyami L, Pineda MA, Rzepecka J, Huggan JK, Khalaf AI, Suckling CJ, et al. Immunomodulatory properties of ES-62, a phosphorylcholine-containing glycoprotein secreted by *Acanthocheilonema viteae*. *J Med Chem.* 2013 Mar 27;12(24):9982–10002.

208. Tomasz A. Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in *Pneumococcus*. *Science*. 1967 Aug 11;157(3789):694–7.
209. Harnett W, Harnett MM. Phosphorylcholine: friend or foe of the immune system? *Immunol Today*. 1999 Mar;20(3):125–9.
210. Houston KM, Harnett W. Structure and synthesis of nematode phosphorylcholine-containing glycoconjugates. *Parasitology*. 2004 Dec;129(Pt 6):655–61.
211. Lochnit G, Dennis RD, Geyer R. Phosphorylcholine substituents in nematodes: structures, occurrence and biological implications. *Biol Chem*. 2000;381(9-10):839–47.
212. Harnett W, Harnett MM. Modulation of the host immune system by phosphorylcholine-containing glycoproteins secreted by parasitic filarial nematodes. *Biochim Biophys Acta*. 2001 May 28;1539(1-2):7–15.
213. Goodridge HS, Marshall FA, Wilson EH, Houston KM, Liew FY, Harnett MM, et al. In vivo exposure of murine dendritic cell and macrophage bone marrow progenitors to the phosphorylcholine-containing filarial nematode glycoprotein ES-62 polarizes their differentiation to an anti-inflammatory phenotype. *Immunology*. 2004 Dec;113(4):491–8.
214. Deehan MR, Frame MJ, Parkhouse RM, Seatter SD, Reid SD, Harnett MM, et al. A phosphorylcholine-containing filarial nematode-secreted product disrupts B lymphocyte activation by targeting key proliferative signaling pathways. *J Immunol*. 1998 Mar 15;160(6):2692–9.
215. Wilson EH, Deehan MR, Katz E, Brown KS, Houston KM, O'Grady J, et al. Hyporesponsiveness of murine B lymphocytes exposed to the filarial nematode secreted product ES-62 in vivo. *Immunology*. 2003 Jun;109(2):238–45.
216. Harnett MM, Deehan MR, Williams DM, Harnett W. Induction of signalling anergy via the T-cell receptor in cultured Jurkat T cells by pre-exposure to a filarial nematode secreted product. *Parasite Immunol*. 1998 Nov;20(11):551–63.
217. Marshall FA, Grierson AM, Garside P, Harnett W, Harnett MM. ES-62, an immunomodulator secreted by filarial nematodes, suppresses clonal expansion and modifies effector function of heterologous antigen-specific T cells in vivo. *J Immunol*. 2005 Nov 1;175(9):5817–26.
218. Ball DH, Tay HK, Bell KS, Coates ML, Al-Riyami L, Rzepecka J, et al. Mast Cell Subsets and Their Functional Modulation by the *Acanthocheilonema viteae* Product ES-62. *J Parasitol Res*. 2013 Jan;2013:961268.

219. Rzepecka J, Siebeke I, Coltherd JC, Kean DE, Steiger CN, Al-Riyami L, et al. The helminth product, ES-62, protects against airway inflammation by resetting the Th cell phenotype. *Int J Parasitol.* 2013 Mar;43(3-4):211–23.
220. Najjar VA, Nishioka K. “Tuftsin”: a natural phagocytosis stimulating peptide. *Nature.* 1970 Nov 14;228(5272):672–3.
221. Siemion IZ, Kluczyk A. Tuftsin: on the 30-year anniversary of Victor Najjar’s discovery. *Peptides.* 1999 Jan;20(5):645–74.
222. Najjar VA. The clinical and physiological aspects of tuftsin deficiency syndromes exhibiting defective phagocytosis. *Klin Wochenschr.* 1979 Aug 1;57(15):751–6.
223. Lukács K, Szabó G, Sonkoly I, Végh E, Gács J, Szekerke M, et al. Stimulating effect of tuftsin and its analogues on the defective monocyte chemotaxis in systemic lupus erythematosus. *Immunopharmacology.* 1984 Jun;7(3-4):171–8.
224. Becherucci C, Perretti M, Nencioni L, Silvestri S, Parente L. Anti-inflammatory effect of tuftsin and its retro-inverso analogue in rat adjuvant arthritis. *Agents Actions.* 1992 Jan;Spec No:C115–7.
225. Wu M, Nissen JC, Chen EI, Tsirka SE. Tuftsin promotes an anti-inflammatory switch and attenuates symptoms in experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One.* 2012 Jan;7(4):e34933.
226. Bhasin M, Wu M, Tsirka SE. Modulation of microglial/macrophage activation by macrophage inhibitory factor (TKP) or tuftsin (TKPR) attenuates the disease course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *BMC Immunol.* 2007 Jan;8:10.
227. Pawan K, Ivanov BB, Kabilan L, Rao DN. Construction of a synthetic immunogen: use of the natural immunomodulator polytuftsin in malaria vaccines against RESA antigen of *Plasmodium falciparum*. *Vaccine.* 1994 Jul;12(9):819–24.
228. Saravanabava K, Nachimuthu K, Padmanaban VD. Effect of tuftsin on embryo vaccination with Newcastle disease virus vaccine. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2005 Jul;28(4):269–76.
229. Wardowska A, Dzierzbicka K, Szaryńska M, Dabrowska-Szponar M, Wiśniewska K, Myśliwski A, et al. Analogues of muramyl dipeptide (MDP) and tuftsin limit infection and inflammation in murine model of sepsis. *Vaccine.* 2009 Jan 14;27(3):369–74.

230. Liu X, Guo J, Han S, Yao L, Chen A, Yang Q, et al. Enhanced immune response induced by a potential influenza A vaccine based on branched M2e polypeptides linked to tuftsin. *Vaccine*. 2012 Oct 12;30(46):6527–33.
231. Gatto M, Zen M, Ghirardello A, Bettio S, Bassi N, Iaccarino L, et al. Emerging and critical issues in the pathogenesis of lupus. *Autoimmun Rev*. 2013 Feb;12(4):523–36.
232. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan S V, Alpers CE, Appel GB, et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney Int*. 2004 Feb;65(2):521–30.
233. Kyttaris VC. Treatment of SLE: Current paradigm and future directions. *Clin Immunol*. Elsevier B.V.; 2013 Sep;148(3):301–2.
234. Wofsy D. Recent progress in conventional and biologic therapy for systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2013 Apr;72 Suppl 2:ii66–8.
235. Merrill JT, Neuwelt CM, Wallace DJ, Shanahan JC, Latinis KM, Oates JC, et al. Efficacy and safety of rituximab in moderately-to-severely active systemic lupus erythematosus: the randomized, double-blind, phase II/III systemic lupus erythematosus evaluation of rituximab trial. *Arthritis Rheum*. 2010 Jan;62(1):222–33.
236. Rovin BH, Furie R, Latinis K, Looney RJ, Fervenza FC, Sanchez-Guerrero J, et al. Efficacy and safety of rituximab in patients with active proliferative lupus nephritis: the Lupus Nephritis Assessment with Rituximab study. *Arthritis Rheum*. 2012 Apr;64(4):1215–26.
237. Merrill JT, Burgos-Vargas R, Westhovens R, Chalmers A, D'Cruz D, Wallace DJ, et al. The efficacy and safety of abatacept in patients with non-life-threatening manifestations of systemic lupus erythematosus: results of a twelve-month, multicenter, exploratory, phase IIb, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*. 2010 Oct;62(10):3077–87.
238. Furie R, Nicholls K, Cheng T-T, Houssiau F, Burgos-Vargas R, Chen S-L, et al. Efficacy and safety of abatacept in lupus nephritis: a twelve-month, randomized, double-blind study. *Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ)*. 2014 Feb;66(2):379–89.
239. Furie R, Petri M, Zamani O, Cervera R, Wallace DJ, Tegzová D, et al. A phase III, randomized, placebo-controlled study of belimumab, a monoclonal antibody that inhibits B lymphocyte stimulator, in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2011 Dec;63(12):3918–30.

240. Navarra S V, Guzmán RM, Gallacher AE, Hall S, Levy RA, Jimenez RE, et al. Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2011 Feb 26;377(9767):721–31.
241. Markopoulou A, Kyttaris VC. Small molecules in the treatment of systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol*. 2013 Sep;148(3):359–68.
242. Crispín JC, Kyttaris VC, Terhorst C, Tsokos GC. T cells as therapeutic targets in SLE. *Nat Rev Rheumatol*. 2010 Jun;6(6):317–25.
243. Okamoto A, Fujio K, Okamura T, Yamamoto K. Regulatory T-cell-associated cytokines in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol*. 2011 Jan;2011:463412.
244. Yang J, Yang X, Zou H, Chu Y, Li M. Recovery of the immune balance between Th17 and regulatory T cells as a treatment for systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2011 Aug;50(8):1366–72.
245. Suen J-L, Chiang B-L. CD4(+)FoxP3(+) regulatory T-cells in human systemic lupus erythematosus. *J Formos Med Assoc*. 2012 Sep;111(9):465–70.
246. Mak A, Kow NY. The pathology of T cells in systemic lupus erythematosus. *J Immunol Res*. 2014 Jan;2014:419029.
247. Borchers AT, Leibushor N, Naguwa SM, Cheema GS, Shoenfeld Y, Gershwin ME. Lupus nephritis: a critical review. *Autoimmun Rev*. 2012 Dec;12(2):174–94.
248. Sterner RM, Hartono SP, Grande JP. The Pathogenesis of Lupus Nephritis. *J Clin Cell Immunol*. 2014 Apr;5(2).
249. Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*. 2011 Dec 1;365(22):2110–21.
250. Muñoz LE, Lauber K, Schiller M, Manfredi AA, Herrmann M. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol*. 2010 May;6(5):280–9.
251. Shao W-H, Cohen PL. Disturbances of apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2011 Jan;13(1):202.
252. Jin O, Sun L, Zhou K, Zhang X, Feng X, Mok M, et al. Lymphocyte apoptosis and macrophage function: correlation with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 2005 Apr;24(2):107–10.

253. Xue C, Lan-Lan W, Bei C, Jie C, Wei-Hua F. Abnormal Fas/FasL and caspase-3-mediated apoptotic signaling pathways of T lymphocyte subset in patients with systemic lupus erythematosus. *Cell Immunol.* 2006 Feb;239(2):121–8.
254. Tas SW, Quartier P, Botto M, Fossati-Jimack L. Macrophages from patients with SLE and rheumatoid arthritis have defective adhesion in vitro, while only SLE macrophages have impaired uptake of apoptotic cells. *Ann Rheum Dis.* 2006 Feb;65(2):216–21.
255. Seredkina N, Van Der Vlag J, Berden J, Mortensen E, Rekvig OP. Lupus nephritis: enigmas, conflicting models and an emerging concept. *Mol Med.* 2013 Jan;19:161–9.
256. Wardowska A, Dzierzbicka K, Trzonkowski P, Myśliwski A. The biological activity of new tuftsin derivatives--induction of phagocytosis. *Acta Pol Pharm.* 63(5):378–81.
257. Rouquette AM, Desgruelles C. Detection of antibodies to dsDNA: an overview of laboratory assays. *Lupus.* 2006 Jan;15(7):403–7.
258. Neogi T, Gladman DD, Ibanez D, Urowitz M. Anti-dsDNA antibody testing by Farr and ELISA techniques is not equivalent. *J Rheumatol.* 2006 Sep;33(9):1785–8.
259. Werwitzke S, Trick D, Kamino K, Matthias T, Kniesch K, Schlegelberger B, et al. Inhibition of lupus disease by anti-double-stranded DNA antibodies of the IgM isotype in the (NZB x NZW)F1 mouse. *Arthritis Rheum.* 2005 Nov;52(11):3629–38.
260. Witte T. IgM antibodies against dsDNA in SLE. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2008 Jun;34(3):345–7.
261. Orbai A-M, Truedsson L, Sturfelt G, Nived O, Fang H, Alarcón G, et al. Anti-C1q antibodies in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2014 published online first on Aug 14;pii: 0961203314547791.
262. Renaudineau Y, Deocharan B, Jousse S, Renaudineau E, Putterman C, Youinou P. Anti-alpha-actinin antibodies: a new marker of lupus nephritis. *Autoimmun Rev.* 2007 Aug;6(7):464–8.
263. Youinou P, Putterman C. The role of anti-alpha-actinin antibodies in the pathogenesis and monitoring of lupus nephritis. *Arthritis Res Ther.* 2009 Jan;11(6):137.

264. Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, et al. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity*. 2010 Jan 29;32(1):129–40.
265. Matsushita T. Regulatory B cells in mouse models of systemic lupus erythematosus (SLE). *Methods Mol Biol*. 2014 Jan;1190:195–205.
266. Peng SL. Altered T and B lymphocyte signaling pathways in lupus. *Autoimmun Rev*. 2009 Jan;8(3):179–83.
267. Moulton VR, Tsokos GC. Abnormalities of T cell signaling in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2011 Jan;13(2):207.
268. Shin MS, Lee N, Kang I. Effector T-cell subsets in systemic lupus erythematosus: update focusing on Th17 cells. *Curr Opin Rheumatol*. 2011 Sep;23(5):444–8.
269. Alunno A, Bartoloni E, Bistoni O, Nocentini G, Ronchetti S, Caterbi S, et al. Balance between regulatory T and Th17 cells in systemic lupus erythematosus: the old and the new. *Clin Dev Immunol*. 2012 Jan;2012:823085.
270. Martin JC, Baeten DL, Josien R. Emerging role of IL-17 and Th17 cells in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol*. 2014 Sep;154(1):1–12.
271. Chen XQ, Yu YC, Deng HH, Sun JZ, Dai Z, Wu YW, et al. Plasma IL-17A is increased in new-onset SLE patients and associated with disease activity. *J Clin Immunol*. 2010 Mar;30(2):221–5.
272. Crispín JC, Oukka M, Bayliss G, Cohen RA, Van Beek CA, Stillman IE, et al. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. *J Immunol*. 2008 Dec 15;181(12):8761–6.
273. Miyake K, Akahoshi M, Nakashima H. Th subset balance in lupus nephritis. *J Biomed Biotechnol*. 2011 Jan;2011:980286.
274. Pollard KM, Cauvi DM, Toomey CB, Morris K V, Kono DH. Interferon- γ and systemic autoimmunity. *Discov Med*. 2013 Sep;16(87):123–31.
275. Okamoto A, Fujio K, Tsuno NH, Takahashi K, Yamamoto K. Kidney-infiltrating CD4⁺ T-cell clones promote nephritis in lupus-prone mice. *Kidney Int*. 2012 Nov;82(9):969–79.
276. Masutani K, Akahoshi M, Tsuruya K, Tokumoto M, Ninomiya T, Kohsaka T, et al. Predominance of Th1 immune response in diffuse proliferative lupus nephritis. *Arthritis Rheum*. 2001 Sep;44(9):2097–106.

277. Zhao L, Jiang Z, Jiang Y, Ma N, Wang K, Zhang Y, et al. IL-22+CD4+ T-cells in patients with active systemic lupus erythematosus. *Exp Biol Med* (Maywood). 2013 Feb;238(2):193–9.
278. Yang X, Gao Y, Wang H, Zhao X, Gong X, Wang Q, et al. Increased urinary interleukin 22 binding protein levels correlate with lupus nephritis activity. *J Rheumatol*. 2014 Sep;41(9):1793–800.
279. Yang X, Wang H, Zhao X, Wang L, Lv Q, Wang Q. Th22, but not Th17 might be a good index to predict the tissue involvement of systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol*. 2013 May;33(4):767–74.
280. Pan H-F, Li X-P, Zheng SG, Ye D-Q. Emerging role of interleukin-22 in autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013 Feb;24(1):51–7.
281. Yu B, Guan M, Peng Y, Shao Y, Zhang C, Yue X, et al. Copy number variations of interleukin-17F, interleukin-21, and interleukin-22 are associated with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2011 Nov;63(11):3487–92.
282. Qin W-Z, Chen L-L, Pan H-F, Leng R-X, Zhai Z-M, Wang C, et al. Expressions of IL-22 in circulating CD4+/CD8+ T cells and their correlation with disease activity in SLE patients. *Clin Exp Med*. 2011 Dec;11(4):245–50.
283. Yang X, Zheng SG. Interleukin-22: a likely target for treatment of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2014 Jun;13(6):615–20.
284. Valencia X, Yarboro C, Illei G, Lipsky PE. Deficient CD4+CD25high T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 2007 Feb 15;178(4):2579–88.
285. La Cava A. T-regulatory cells in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2008 May;17(5):421–5.
286. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010 Jul;10(7):490–500.
287. Tselios K, Sarantopoulos A, Gkougkourelas I, Boura P. CD4+CD25highFOXP3+ T regulatory cells as a biomarker of disease activity in systemic lupus erythematosus: a prospective study. *Clin Exp Rheumatol*. 2014 published online first on Sep 8.
288. Scalapino KJ, Tang Q, Bluestone JA, Bonyhadi ML, Daikh DI. Suppression of disease in New Zealand Black/New Zealand White lupus-prone mice by adoptive transfer of ex vivo expanded regulatory T cells. *J Immunol*. 2006 Aug 1;177(3):1451–9.

289. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006 May 11;441(7090):235–8.
290. Peng H, Wang W, Zhou M, Li R, Pan H-F, Ye D-Q. Role of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 2013 Sep;32(9):1255–66.
291. Cai G, Kastelein RA, Hunter CA. IL-10 enhances NK cell proliferation, cytotoxicity and production of IFN-gamma when combined with IL-18. *Eur J Immunol*. 1999 Sep;29(9):2658–65.
292. Yuan W, DiMartino SJ, Redecha PB, Ivashkiv LB, Salmon JE. Systemic lupus erythematosus monocytes are less responsive to interleukin-10 in the presence of immune complexes. *Arthritis Rheum*. 2011 Jan;63(1):212–8.
293. al-Janadi M, al-Dalaan A, al-Balla S, al-Humaidi M, Raziuddin S. Interleukin-10 (IL-10) secretion in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: IL-10-dependent CD4+CD45RO+ T cell-B cell antibody synthesis. *J Clin Immunol*. 1996 Jul;16(4):198–207.
294. Llanos C, Mackern-Oberti JP, Vega F, Jacobelli SH, Kalergis AM. Tolerogenic dendritic cells as a therapy for treating lupus. *Clin Immunol*. 2013 Aug;148(2):237–45.
295. Obermoser G, Pascual V. The interferon-alpha signature of systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2010 Aug;19(9):1012–9.
296. Crow MK. Type I interferon in the pathogenesis of lupus. *J Immunol*. 2014 Jun 15;192(12):5459–68.
297. Ben-Ami Shor D, Bashi T, Lachnish J, Fridkin M, Bizzaro G, Barshak I, et al. Phosphorylcholine-tuftsins compound prevents development of dextran-sulfate-sodium-induced murine colitis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2014;in Press.

- ANNEXES -

ANNEXE-1 – Table 1 : Etudes expérimentales et cliniques des thérapies dérivées d'helminthes dans les maladies auto-immunes.

MALADIE INFLAMMATOIRE CHRONIQUE DE L'INTESTIN	SOURIS	<i>Trichinella spiralis</i> (142, 148)	Atténue la colite induite au DNBS. ⬆ IL-4, IL-13, TGF-β et ⬆ IFN-γ, IL-1β, activité MPO, expression d'iNOS.	
		<i>Schistosoma mansoni</i> (143, 144, 146)	Prévient ou atténue les colites induites au TNBS et au DSS. ⬆ IL-4, IL-10, macrophages F4/80+ et ⬆ IFN-γ.	
		<i>Heligmosomoides polygyrus</i> (121, 122)	Prévient la colite Rag avec transfert de LT IL-10-/-. ⬆ CD tolérogéniques et ⬆ IFN-γ, IL-17.	
		<i>Hymenoleptis diminuta</i> (145)	Atténue la colite induite au DNBS. ⬆ IL-10.	
		<i>Schistosoma japonicum</i> (147)	Atténue la colite induite au TNBS. ⬆ IL-4, IL-5, IL-13, Treg et ⬆ IFN-γ.	
		<i>Clonorchis sinensis</i> (136)	Atténue la colite induite au DSS. ⬆ IL-10, macrophages IL-10+ F4/80+ et ⬆ TNF-α.	
	HUMAIN	<i>Trichuris suis ova</i> (TSO) (150–153)	-MC : étude ouverte: 79.3% répondeurs, 72.4% rémission à 24 semaines. -RCH : essai contrôlé contre placebo: 43.3% répondeurs à 12 semaines <i>versus</i> 16.7% dans le groupe placebo. Pas de différence significative dans les taux de rémission. -MC : étude phase 2 TRUST-I: pas de différence significative entre le groupe TSO & les groupes placebo. Amélioration du CDAI chez 5/9 patients à 20 semaines et 3/5 à 45 semaines. Légers effets secondaires.	
		<i>Necator americanus</i> (156)		
	SCLÉROSE EN PLAQUES	SOURIS	<i>Schistosoma mansoni</i> (159, 161, 163)	Réduit l'incidence et atténue l'EAE. ⬆ IL-4, IL-10, TGF-β et ⬆ IFN-γ, TNF-α, IL-12, et l'infiltrat inflammatoire du SNC.
			<i>Trichinella spiralis</i> (103, 120, 164)	Atténue l'EAE. ⬆ IL-4, IL-10, TGF-β, Treg, CD tolérogéniques et ⬆ IFN-γ, IL-17.
<i>H. polygyrus</i> (128)			Prévention de l'EAE par transfert de LB de souris infectées IL-10-/-.	
<i>Trichinella pseudospiralis</i> (105)			Retarde et atténue l'EAE. ⬆ IL-4, IL-5, IL-10 et ⬆ TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-6, IL-17.	
<i>Schistosoma japonicum</i> (165)			Atténue l'EAE. ⬆ IL-4 et ⬆ IFN-γ et l'inflammation du SNC.	
<i>Fasciola hepatica</i> (162)			Atténue l'EAE. ⬆ IL-10, CD tolérogéniques, macrophages M2, LT sécréteurs d'IL-10 et ⬆ IFN-γ, IL-17.	
		<i>Taenia Crassiceps</i> (160)	Atténue l'EAE. ⬆ IL-4, IL-10, macrophages M2 et ⬆ TNF-α, IL-17, expression d'iNOS et inflammation du SNC.	
HUMAIN		<i>Hymenoleptis nanan</i> , <i>Trichuris trichura</i> , <i>Ascaris lumbricoides</i> , <i>Strongyloides stercoralis</i> , <i>Enterobius vermicularis</i> (130, 166, 167)	12 patients SEP naturellement infectés par helminthes et 12 contrôles, suivi 7.5 ans. ⬆ rechutes, scores d'invalidité, activité IRM, et ⬆ IL-10, TGF-β, Treg, Breg et ⬆ IFN-γ, IL-12 chez les patients infectés. Traitement anti-helminthique ⬆ activité clinique et radiologique.	
		<i>Trichuris suis ova</i> (TSO) (168)	5 patients avec SEP récurrente-rémittente. ⬆ nombre moyen de nouvelles lésions à l'IRM.	

ANNEXE-1 – Table 1: Experimental and clinical studies of helminth-derived therapies in autoimmune diseases.

INFLAMMATORY BOWEL DISEASE	MICE	<i>Trichinella spiralis</i> (142,148)	Attenuates DNBS-induced colitis. ↑ IL-4, IL-13, TGF-β and ↓ IFN-γ, IL-1β, MPO activity, iNOS expression.
		<i>Schistosoma mansoni</i> (143,144,146)	Prevents or attenuates TNBS- and DSS-induced colitis.
		<i>Heligmosomoides polygyrus</i> (121,122)	↑ IL-4, IL-10, F4/80+ macrophages and ↓ IFN-γ.
		<i>Hymenolepis diminuta</i> (145)	Prevents Rag IL-10-/- T-cell transfer model of colitis. ↑ tolerogenic DC and ↓ IFN-γ, IL-17.
			Attenuates DNBS-induced colitis. ↑ IL-10.
	HUMAN	<i>Schistosoma japonicum</i> (147)	Attenuates TNBS-induced colitis. ↑ IL-4, IL-5, IL-13, Treg and ↓ IFN-γ.
		<i>Clonorchis sinensis</i> (136)	Attenuates DSS-induced colitis. ↑ IL-10, IL-10+ F4/80+ macrophages and ↓ TNF-α. -CD: open-label study: 79.3% responded, 72.4% remitted at 24 weeks. -UC: placebo-controlled trial: 43.3% responded 12 weeks versus 16.7% in placebo group. No significant difference in remission rates. -CD: phase 2 TRUST-I trial: no significant differences between TSO and placebo groups. Improvement CDAI in 5/9 patients at 20 weeks and 3/5 at 45 weeks. Mild adverse events.
MULTIPLE SCLEROSIS	MICE	<i>Necator americanus</i> (156)	Reduces incidence and attenuates EAE. ↑ IL-4, IL-10, TGF-β and ↓ IFN-γ, TNF-α, IL-12, and CNS inflammatory cells infiltration.
		<i>Schistosoma mansoni</i> (159,161,163)	Attenuates EAE.
		<i>Trichinella spiralis</i> (103,120,164)	↑ IL-4, IL-10, TGF-β, Treg, tolerogenic DC and ↓ IFN-γ, IL-17.
		<i>H. polygyrus</i> (128)	Prevents EAE by transfer of B-cells from IL-10-/- infected mice.
		<i>Trichinella pseudospiralis</i> (105)	Delays and attenuates EAE. ↑ IL-4, IL-5, IL-10 and ↓ TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-6, IL-17.
		<i>Schistosoma japonicum</i> (165)	Attenuates EAE. ↑ IL-4 and ↓ IFN-γ and CNS inflammation.
		<i>Fasciola hepatica</i> (162)	Attenuates EAE.
		<i>Taenia Crassiceps</i> (160)	↑ IL-10, tolerogenic DC, M2-macrophages, IL-10 secreting T-cells and ↓ IFN-γ, IL-17. Attenuates EAE.
			↑ IL-4, IL-10, M2-macrophages and ↓ TNF-α, IL-17, iNOS expression and CNS inflammation.
	HUMAN	<i>Hymenolepis nanan</i> , <i>Trichuris trichura</i> , <i>Ascaris lumbricoides</i> , <i>Strongyloides stercoralis</i> , <i>Enterobius vermicularis</i> (130,166,167)	12 naturally infected MS patients and 12 controls, follow-up 7.5 years. ↓ relapses, disability scores, MRI activity, and ↑ IL-10, TGF-β, Treg, Breg and ↓ IFN-γ, IL-12 in infected patients. Anti-helminthic treatment ↑ clinical and radiological activity.
		<i>Trichuris suis ova</i> (TSO) (168)	5 patients with relapsing-remitting MS. ↓ mean number of new MRI lesions.

POLYARTHRITE RHUMATOÏDE	SOURIS	<i>Acanthocheilonema vitae</i> (ES-62) (107,127,172-174)	Réduit l'incidence et atténue l'AIC. ↑ IL-10, pic tardif IL-22, CD tolérogéniques, Breg et ↓ TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-17, pic précoce IL-22, IgG2a. Effets immunomodulateurs liés à la PC.
		<i>Schistosoma mansoni</i> (106)	Atténue l'AIC. ↑ IL-4, IL-10 et ↓ TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-6, IL-17A, IgG2a.
		<i>Hymenolepis diminuta</i> (175)	Atténue l'arthrite induite par l'adjuvant de Freund Protection abolie chez la souris dépourvue de LT et LB ou de l'IL-4Rα ou d'IL-10.
		<i>Fasciola hepatica</i> (176)	Réduit l'incidence et atténue l'AIC. ↑ IL-10, TGF-β, CD tolérogéniques, Treg et ↓ TNF-α, IL-17A, IgG2a.
		<i>Schistosoma japonicum</i> (177)	Atténue l'AIC. ↑ IL-10, Treg, IgG1 et ↓ TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-6, Th-17 cells, IgG2a.
		<i>Heligmosomoides polygyrus</i> & <i>N. brasiliensis</i> (178)	Réduit l'incidence et atténue l'arthrite spontanée de la souris MRL/lpr. ↑ IL-4, IgG1.
DIABÈTE DE TYPE-1	SOURIS	<i>Schistosoma mansoni</i> (110-112,179,180)	Réduit l'incidence ou prévient le diabète chez la souris NOD. ↑ IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, TGF-β, CD tolérogéniques, Treg, cellules NKT V alpha 14i NKT. Prévient la commutation de classe IgM à IgG des anticorps anti-insuline. La glycoprotéine sécrétée par les œufs de <i>S. mansoni</i> ω1 responsable de ses effets.
		<i>Heligmosomoides polygyrus</i> (108,181)	Prévient ou réduit la sévérité du diabète chez la souris NOD. ↑ IL-4, IL-10, IL-13, Treg et ↓ insulite pancréatique.
		<i>Trichinella spiralis</i> (108)	Prévient le diabète chez la souris NOD. ↑ IL-4 and ↓ insulite pancréatique. Pas de modifications de l'IL-10 et du IFN-γ.
		<i>Litomosoides sigmodontis</i> (109,114)	Prévient le diabète chez les souris NOD immunocompétentes et IL-4 déficientes. ↑ IL-4, IL-5, IgG1, Treg et ↓ insulite pancréatique.
		<i>Dirofilaria immitis</i> (182)	Prévient le diabète chez la souris NOD. ↑ IgE. Prévient la commutation de classe IgM à IgG des anticorps anti-insuline.
		<i>Necator americanus</i> (184,185)	Pas de changement significatif de la sévérité des symptômes au test au gluten au décours du traitement. ↓ IFN-γ, IL17A.
MALADIE COELIAQUE	HUMAIN		
MALADIE DE BASEDOW	SOURIS	<i>Schistosoma mansoni</i> (186)	Prévient le développement de la maladie de Basedow. ↓ IFN-γ, IgG2a, anti-TSHR antibodies
PSORIASIS	SOURIS	<i>Schistosoma mansoni</i> (187)	Prévient les lésions cutanées psoriasiques chez la souris fsm/fsm. ↑ IL-13 and ↓ IFN-γ.

Abréviations:

AIC: Arthrite induite au collagène - Breg: cellules B-régulatrices - CD: Cellules dendritiques - CDAI: Crohn's Disease Activity Index - DNBS: Dinitrobenzene Sulphonic Acid - DSS: Dextran-sodium-sulfate - EAE: Encéphalite expérimentale auto-immune - iNOS Oxyde Nitrique Synthase inducible - IFN: Interferon - IL: Interleukine - IRM: Imagerie par résonance magnétique - MC: Maladie de Crohn - MPO: Myeloperoxydase - NKT: Cellules T Natural Killer - NOD: Non-Obese Diabetic - PC: Phosphorylcholine - RCH: Rectocolite hémorragique - SEP: Sclérose en plaques - SNC: Système nerveux central - TGF: Transforming Growth Factor - Th: cellules T-helper - TNBS: Trinitrobenzene Sulphonic Acid - TNF: Tumor Necrosis Factor - Treg: Cellules T-régulatrices - TSHR: Thyroid Stimulating Hormone Receptor - TSO: Trichuris suis ova.

RHEUMATOID ARTHRITIS	MICE	<i>Acanthocheilonema vitae</i> (ES-62) (107,127,172–174)	Reduces incidence and attenuates CIA. ↑ IL-10, late IL-22, tolerogenic DC, Breg and ↓ TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-17, early IL-22, IgG2a. Immunomodulatory effects related to PC moiety.
		<i>Schistosoma mansoni</i> (106)	Attenuates CIA. ↑ IL-4, IL-10 and ↓ TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-6, IL-17A, IgG2a.
		<i>Hymenolepis diminuta</i> (175)	Attenuates Freund's complete adjuvant-induced arthritis Protection abrogated in mice lacking T- and B-cells or IL-4Rα or IL-10.
		<i>Fasciola hepatica</i> (176)	Reduces incidence and attenuates CIA. ↑ IL-10, TGF-β, tolerogenic DC, Treg and ↓ TNF-α, IL-17A, IgG2a.
		<i>Schistosoma japonicum</i> (177)	Attenuates CIA. ↑ IL-10, Treg, IgG1 and ↓ TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-6 Th-17 cells, IgG2a.
TYPE-1 DIABETES	MICE	<i>Heligmosomoides polygyrus</i> & <i>N. brasiliensis</i> (178)	Reduces incidence and attenuates spontaneous arthritis in MRL/lpr mice. ↑ IL-4, IgG1.
		<i>Schistosoma mansoni</i> (110–112,179,180)	Reduces incidence or prevents diabetes in NOD mice. ↑ IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, TGF-β, tolerogenic DC, Treg, V alpha 14i NKT cells. Prevents class switch from IgM to IgG anti-insulin autoantibodies. ω1 glycoprotein secreted by <i>S. mansoni</i> ova responsible for its effects.
		<i>Heligmosomoides polygyrus</i> (108,181)	Prevents and reduces severity of diabetes in NOD mice. ↑ IL-4, IL-10, IL-13, Treg and ↓ pancreatic insulinitis.
		<i>Trichinella spiralis</i> (108)	Prevents diabetes in NOD mice. ↑ IL-4 and ↓ pancreatic insulinitis. No change in IL-10 and IFN-γ.
		<i>Litomosoides sigmodontis</i> (109,114)	Prevents diabetes in immunocompetent and IL-4 deficient NOD mice. ↑ IL-4, IL-5, IgG1, Treg and ↓ pancreatic insulinitis.
		<i>Dirofilaria immitis</i> (182)	Prevents diabetes in NOD mice. ↑ IgE. Prevents class switch from IgM to IgG anti-insulin autoantibodies.
		<i>Necator americanus</i> (184,185)	No significant change in symptoms severity at the gluten challenge following treatment. ↓ IFN-γ, IL17A.
		<i>Schistosoma mansoni</i> (186)	Prevent Grave's disease development. ↓ IFN-γ, IgG2a, anti-TSHR antibodies
		<i>Schistosoma mansoni</i> (187)	Prevent psoriatic skin lesions in fsn/fsn mice. ↑ IL-13 and ↓ IFN-γ.
CELIAC DISEASE	HUMAN		
GRAVES' DISEASE	MICE		
PSORIASIS	MICE		

Abbreviations:

Breg: B-regulatory cells - CD: Crohn's Disease - CDAI: Crohn's Disease Activity Index - CIA: Collagen-Induced Arthritis - CNS: Central Nervous System - DC: Dendritic Cells - DNBS: Dinitrobenzene Sulphonic Acid - DSS: Dextran-sodium-sulfate - EAE: Experimental autoimmune encephalitis - iNOS: inducible Nitric Oxide Synthase - IFN: Interferon - IL: Interleukin - MPO: Myeloperoxidase - MRI: Magnetic Resonance Imaging - MS: Multiple Sclerosis - NKT cells: Natural Killer T-cells - NOD: Non-Obese Diabetic - PC: Phosphorylcholine - TGF: Transforming Growth Factor - Th: T-helper cells - TNBS: Trinitrobenzene Sulphonic Acid - TNF: Tumor Necrosis Factor - Treg: T-regulatory cells - TSHR: Thyroid Stimulating Hormone Receptor - TSO: Trichuris suis ova - UC: Ulcerative Colitis.

ANNEXE-2

Classification 2003 de l'International Society of Nephrology/Renal Pathology Society (ISN/RPS) des glomérulonéphrites lupiques

Classe I - Glomérulonéphrite lupique avec atteinte mésangiale minime.

Glomérule normal en microscopie optique, avec dépôts mésangiaux en immunofluorescence.

Classe II - Glomérulonéphrite lupique mésangiale proliférative.

Hypercellularité mésangiale pure en microscopie optique avec dépôts mésangiaux en immunofluorescence.

Quelques dépôts sous-épithéliaux ou sous-endothéliaux isolés peuvent être visibles par immunofluorescence ou microscopie électronique, mais pas par microscopie optique.

Classe III - Glomérulonéphrite lupique focale.

Glomérulonéphrite active ou inactive, focale, segmentaire ou globale, endo- ou extra-capillaire touchant <50% de tous les glomérules, généralement avec des dépôts immuns sous-endothéliaux focaux, avec ou sans altérations mésangiales.

Classe III (A) : Lésions actives: néphrite lupique focale proliférative.

Classe III(A/C) : Lésions actives et chroniques: néphrite lupique focale proliférative et sclérosante.

Classe III (C) : Lésions inactives chroniques avec cicatrices glomérulaires: néphrite lupique focale sclérosante.

ANNEXE-2

International Society of Nephrology/Renal Pathology Society (ISN/RPS) 2003 classification of lupus nephritis

Class I - Minimal mesangial lupus nephritis.

Normal glomeruli by light microscopy, but mesangial immune deposits by immunofluorescence

Class II - Mesangial proliferative lupus nephritis.

Purely mesangial hypercellularity of any degree or mesangial matrix expansion by light microscopy, with mesangial immune deposits.

A few isolated subepithelial or subendothelial deposits may be visible by immunofluorescence or electron microscopy, but not by light microscopy.

Class III - Focal lupus nephritis.

Active or inactive focal, segmental or global endo- or extracapillary glomerulonephritis involving <50% of all glomeruli, typically with focal subendothelial immune deposits, with or without mesangial alterations.

Class III (A) : Active lesions: focal proliferative lupus nephritis.

Class III (A/C) : Active and chronic lesions: focal proliferative and sclerosing lupus nephritis.

Class III (C) : Chronic inactive lesions with glomerular scars: focal sclerosing lupus nephritis.

Classe IV : Glomérulonéphrite lupique diffuse.

Glomérulonéphrite active ou inactive, focale, segmentaire ou globale, endo- ou extra-capillaire touchant $\geq 50\%$ de tous les glomérules, généralement avec des dépôts immuns sous-endothéliaux diffus, avec ou sans altérations mésangiales.

Cette classe est divisée en néphrite lupique segmentaire diffuse (IV-S) quand $\geq 50\%$ des glomérules concernés ont des lésions segmentaires, et néphrite lupique diffuse globale (IV-G) quand $\geq 50\%$ des glomérules concernés ont des lésions globales. Segmentaire est définie comme une lésion glomérulaire qui implique moins de la moitié du glomérule rénal.

Classe IV-S (A) : Lésions actives: néphrite lupique diffuse segmentaire proliférative.

Classe IV-G (A) : Lésions actives: néphrite lupique diffuse globale proliférative.

Classe IV-S (A/C) : Lésions actives et chroniques: néphrite lupique diffuse segmentaire proliférative et sclérosante.

Classe IV-G (A/C) : Lésions actives et chroniques: néphrite lupique diffuse globale proliférative et sclérosante.

Classe IV-S (C) : Lésions inactives chroniques avec cicatrices: néphrite lupique diffuse segmentaire sclérosante.

Classe IV-G (C) : Lésions inactives chroniques avec cicatrices: néphrite lupique diffuse globale sclérosante.

Classe V : Glomérulonéphrite lupique extra-membraneuse.

Dépôts sous-épithéliaux, globaux ou segmentaires, en microscopie optique, en immunofluorescence ou en microscopie électronique. Les dépôts sous-épithéliaux doivent toucher plus de 50% de la surface glomérulaire dans plus de 50% des glomérules.

Classe VI : Glomérulonéphrite lupique scléreuse avancée.

Plus de 90 % des glomérules sont globalement sclérosés sans activité résiduelle.

Class IV - Diffuse lupus nephritis.

Active or inactive diffuse, segmental or global endo- or extracapillary glomerulonephritis involving $\geq 50\%$ of all glomeruli, typically with diffuse subendothelial immune deposits, with or without mesangial alterations.

This class is divided into diffuse segmental (IV-S) lupus nephritis when $\geq 50\%$ of the involved glomeruli have segmental lesions, and diffuse global (IV-G) lupus nephritis when $\geq 50\%$ of the involved glomeruli have global lesions. Segmental is defined as a glomerular lesion that involves less than half of the glomerular tuft.

Class IV-S (A) : Active lesions: diffuse segmental proliferative lupus nephritis.

Class IV-G (A) : Active lesions: diffuse global proliferative lupus nephritis.

Class IV-S (A/C) : Active and chronic lesions: diffuse segmental proliferative and sclerosing lupus nephritis.

Class IV-G (A/C) : Active and chronic lesions: diffuse global proliferative and sclerosing lupus nephritis.

Class IV-S (C) : Chronic inactive lesions with scars: diffuse segmental sclerosing lupus nephritis.

Class IV-G (C) : Chronic inactive lesions with scars: diffuse global sclerosing lupus nephritis.

Class V - Membranous lupus nephritis.

Global or segmental subepithelial immune deposits or their morphologic sequelae by light microscopy and by immunofluorescence or electron microscopy, with or without mesangial alterations.

Class VI - Advanced sclerosis lupus nephritis.

90% of glomeruli globally sclerosed without residual activity

ANNEXE-3

ARTICLE SOUMIS – SUBMITTED ARTICLE

Therapy with Phosphorylcholine-tuftsins compound attenuates lupus nephritis in NZBXW/F1 lupus mice

^{1*}#Tomer Bashi, Bsc, ¹#Miri Blank, PhD, ¹Dana Ben-Ami, MD, ²Mati Fridkin, PhD, ^{1,3}Mathilde Versini, ¹Omer Gendelman, MD, MD, ⁴Alexander Volkov, MD, ⁴Iris Barshak, MD, ^{1,5}Yehuda Shoenfeld, MD, FRCP, MaACR

¹Zabludowicz Center for Autoimmune Diseases, and ⁴Institute of Pathology, Sheba Medical Center, affiliated to Sackler Faculty of Medicine, Tel-Aviv University, Tel-Aviv, Israel. ²Department of Organic Chemistry, The Weizmann Institute of Sciences, Rehovot, Israel. ³Department of Internal Medicine, Archet-1 Hospital, University of Nice-Sophia-Antipolis, Nice, France. ⁵Incumbent of the Laura Schwarz-Kipp Chair for Research of Autoimmune Diseases, Tel-Aviv University, Israel.

Running head: Phosphorylcholine-tuftsins treatment in experimental lupus

Key words: Phosphorylcholine, tuftsins, lupus mice, helminthes, autoimmunity

* This work was performed in partial fulfillment of the requirements for the PhD, Sackler Faculty of Medicine, Tel Aviv University, Israel.

The first and the second author equally contributed to the study

Corresponding author: Prof. Yehuda Shoenfeld MD, FRCP, MaACR, Head of Zabludowicz Center for Autoimmune Diseases, Sheba Medical Center, Tel-Hashomer, 52621, Israel. Tel: 972-3-5308070 Email: shoenfel@post.tau.ac.il

- The authors declare no conflict of interest
- This study was supported by Moris Family Foundation, Los Angeles USA

Abstract

Background: In areas where helminthes infections are common, autoimmune diseases are rare. Treatment with helminthes and ova from helminthes, improved clinical findings of inflammatory bowel disease, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis and type-I-diabetes mellitus, in human and in animal models. The tolerogenic properties of the helminthes and their ova were attributed to the phosphorylcholine (PC) molecule. We aimed to decipher the tolerogenic potential of tuftsin-PC (TPC) compound in an experimental model of lupus.

Methods: Lupus prone NZBXW/F1 mice received subcutaneously TPC (5mg/1ml), three times a week starting at 14 weeks age. Autoantibodies were tested by ELISA, T-regulatory-cells by FACS, cytokines by RT-PCR and protein by ELISA duoset. Glomerulonephritis was addressed by the presence of proteinuria, PAS staining and immunoglobulin deposition in the mesangium by immunofluorescence of the kidneys.

Results : TPC attenuated the development of glomerulonephritis in lupus prone mice, in particular, it ameliorated proteinuria ($p<0.02$), and reduced immunoglobulin deposition in the kidney mesangium. TPC also enhanced the expression of TGF- β and IL-10 ($p<0.001$), and inhibited IFN- γ and IL-17 expression ($p<0.03$). Significant enhancement of CD4+CD25+FOXP3+ T-regulatory cells (Tregs) phenotype was documented.

Conclusion: TPC hampered lupus development in lupus prone mice which was exemplified by moderate glomerulonephritis, attenuation of pro-inflammatory cytokines and enhancement of anti-inflammatory cytokines expression, as well as Tregs expansion. Our results propose a new approach for natural therapy for lupus patients.

Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a multi-systemic disease characterized by the presence of more than 100 circulating autoantibodies directed to diverse array of cellular components (1). The disease is manifested among other findings, by glomerulonephritis (GN), brain and skin involvements. GN requires aggressive immunosuppressive therapy, usually with cyclophosphamide and corticosteroids or biological therapy such as anti-BAFF (Belimumab) (2,3). Still, these therapies show various side effects including morbidity and mortality in lupus patients. Therefore, there is a need for novel approaches to treat GN in lupus. Our current studies are aimed at investigating and evaluating a novel therapeutic approach, which is based on a worm derivative.

In Western countries, a strong correlation exists between improved sanitation and hygiene, and a significant increase in the prevalence of autoimmune diseases and autoinflammatory syndromes. Moreover, a strong link was reported between high prevalence of parasitic worms (helminthes) in certain geographic areas and protection against atopic, autoimmune, and autoinflammatory diseases (4-7). A hallmark of parasitic worms is their ability to survive within their hosts for long periods through "suppression" of the host immune-network. During the last decades many studies reported that infection with parasitic helminthes, or systemic treatment with helminthes extracts and secretory molecules, can reduce inflammation associated with autoimmune diseases (6-12). The successful therapy improves the condition of several diseases such as: multiple sclerosis (MS), rheumatoid arthritis (RA), type I diabetes mellitus (T1DM), and inflammatory bowel diseases (IBD) (6-12).

The helminthes therapy was not associated with significant side effects or serious complications attributable to the therapeutic agent.

Employing experimental autoimmune animal models, amelioration of disease activity was achieved by helminthes or helminthes derivatives administration in type-I diabetes mellitus (T1DM), experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), collagen induced arthritis (CIA), and colitis (6,9-16).

Filarial nematodes are parasites of vertebrates and humans, which secrete immunomodulatory molecules comprising of phosphorylcholine (PC)-moieties glycoproteins into the host environment (17-23). The most widely studied secretory glycoprotein is the ES-62. Its immunosuppressive activity is attributed to the PC moieties, covalently attached to N-type glycans (18-20). In addition, PC in nature is presented by apoptotic cells, Gram-positive bacterium including *Streptococcus pneumonia*, *Clostridium*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* and the Gram-negative bacterium *Haemophilus influenzae* in which the PC is attached directly to sugar residues such as N-acetylgalactosamine (23-26).

Taken together, these data impelled us to examine the protective potential of PC-based compound on GN development in lupus mice. Currently, in the field of autoimmunity there is a need for a treatment with small molecule which have minimal side effects. PC is a non-immunogenic small molecule, natural compound, therefore we conjugated it to tuftsin, a self-natural adjuvant, and coined the molecule TPC (27-30). Tuftsin is a physiological natural immunostimulating tetrapeptide (Thr-Lys-Pro-Arg) fraction of the IgG-heavy-chain molecule produced by enzymatic cleavage in the spleen (29).

Our data provide experimental proof-of-concept of TPC therapeutic efficacy in a prophylactic protocol in experimental lupus. TPC beneficial effect was associated with a reduction in glomerular immune-complex deposition, less severe inflammatory response and kidney damage followed by delayed onset of proteinuria, and improved survival.

Methods

Mice and experimental design: Female lupus prone (NZBxW)F1 mice at ages 14-15 weeks were purchased from Harlan-Netherlands. The mice were maintained in a conventional animal housing facility at Sheba Medical Center Israel and kept in individually ventilated cages. All experiments were approved and executed according to the protocols of the Ethical Committee of the Israeli Ministry of Health no.696/11. The following groups of mice were treated with 5 mg/mouse subcutaneously (s.c) three times a week (n=15 for each group), TPC (Synthesized by Prof. Fridkin, Department of Organic Chemistry, Weizmann Institute for Sciences, Rehovot, Israel), PC (Sigma-Aldrich L-4391 St Louis, MO, USA), tuftsin (GLS peptide synthesis, Shanghai, China), or PBS as a vehicle. The treatment started at week 14 before clinical findings were observed.

Measurement of proteinuria: Urine was tested every week for proteinuria by a standard semiquantitative test using Bayer Multistix dipsticks (Bayer, Fernwald, Germany). Results were graded according to the manufacturer's instructions. Nephritis was defined semiquantitatively as the presence of 100-300 mg/dl of proteinuria.

Histologic analysis of the GN: Kidneys were obtained from the sacrificed mice and were paraffin-embedded. The pathology of glomerulonephritis was exemplified by histological staining (PAS) as previously described by us (33,34). For detection of immunoglobulin deposits, paraffin-embedded sections were incubated with FITC-conjugated anti-mouse-IgG. All histopathological evaluations were performed by a pathologist.

Analysis of serum anti-dsDNA antibodies: The titers of anti-dsDNA autoantibodies were measured by ELISA as previously described by us (32,33).

Quantitative real-time PCR

The mRNA levels of IFN- γ and TGF- β were analyzed by real-time RT-PCR by using LightCycler (Roche, Mannheim, Germany). Total RNA was isolated from splenocytes, and was reverse-transcribed to prepare cDNA by using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega Inc. Wisconsin, USA). The resulting cDNA was subjected to real-time PCR in the presence of specific primers, according to the manufacturer's instructions. Briefly, a 20- μ l reaction volume contained 3 mM MgCl₂, LightCycler HotStart DNA SYBR Green I mix (Roche), specific primer pairs, and 5 μ l of cDNA. The relative expression of IFN- γ and TGF- β were normalized to β -actin levels.

Cytokine production by splenocytes: Splenocytes (5×10^6 cells per well) originated from TPC, tuftsin, PC and PBS treated mice, were cultured in the presence of 5 mg/ml TPC, tuftsin or PC for 48 hrs and 72 hrs and tested by duoset (R&D systems Minneapolis, MN, USA). The cytokine levels were determined by sandwich ELISA, performed according to the manufacturers' instructions. For the detection of TGF- β , the plates were coated with a recombinant human TGF- β sRII/Fc chimera (R&D Systems). Supernatants were added after activation of latent TGF- β to immunoreactive TGF- β 1, a biotinylated anti-human TGF- β 1 Ab was added thereafter, and the assay was developed according to the manufacturer's instructions (R&D Systems).

T regulatory analysis by flow cytometry: Isolated splenocytes were incubated with the relevant antibodies anti-CD4⁺FITC anti-CD25⁺APC anti-FOXP3⁺PE (eBioscience, San Diego, USA) and analyzed by FACS, with forward and side scatter gates adjusted to include all cells and to exclude debris (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NY, USA). For intracellular staining of FOXP3, the cells were preincubated with a fixation solution, washed, and resuspended in permeabilization solution (Serotec, Oxford, UK) and stained for FOXP3. The gating was on the CD4⁺ T cells.

Statistical Analysis: The data are expressed as the mean $\pm$ SD. Statistical analysis was performed with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student's t-test for comparison between groups. P-values < 0.05 were considered to be significant

Results

Significant attenuated onset of glomerulonephritis in TPC treated mice.

To examine the potential protective effect of TPC, female NZBxW/F1 lupus prone mice received s.c TPC, PC, tuftsin (T) or PBS given separately as controls in a prophylactic protocol starting at week 14, before the clinical onset of lupus (n=15 per group). As illustrated in Fig.1, at the age of 30 weeks, 72% of the mice injected with PBS developed proteinuria whereas only 21% of the TPC injected group had proteinuria above 100 mg/dl.

The TPC treated mice showed a significant hampered onset of proteinuria as compared with control mice that received PBS, tuftsin or PC controls ($p<0.001$, $p<0.02$, $p<0.03$ respectively).

At the age of 30 weeks, histological analyses of the kidneys were performed by PAS staining and immune complex (IC) deposition in the mesangium, which was evaluated by immunofluorescence, Fig.1b. Kidney sections from the PBS group and PC treated mice showed diffuses lupus nephritis class-IV with crescents formation. Both TPC and tuftsin delayed the onset of IC deposits defined as mesangial proliferative lupus nephritis class-II, although the infiltration and the IC deposits were more impressive in the tuftsin treated group of mice. In sum, based on PAS staining and IC depositions, treatment of lupus mice with TPC prevented the appearance of IC depositions in the mesangium to class-II nephritis. Whereas, treatment with the PC or PBS did not diminish the development of strong mesangial damage defined as class-IV. PC had moderate but not significant effect on IC deposition.

TPC prolong survival time of lupus mice.

A main complication in lupus nephritis is the short survival time due to severe kidney failure. Therefore we followed survival time of the mice treated either with TPC or with its control PC, tuftsin or PBS. As depicted in Fig.2, we observed a significant difference between the TPC injected mice and the control groups from week 24 up to week 40.

Additionally, a significant difference in the percentage of death number was documented between PBS injected mice in comparison to PC, tuftsin and TPC treated mice already at week 24.

TPC and titers of circulating anti-dsDNA antibodies.

The titers of circulating anti-dsDNA antibodies in the sera were followed during the disease development, and their levels were measured every 3 weeks. No statistically significant change was noticed between the group of mice treated with TPC, tuftsin, PC or PBS ($p>0.05$, Fig.3). The data presented in Fig.3 describe the anti-dsDNA antibodies titers in the sera at the age of 30 weeks at a dilution of 1:800. A follow-up of anti-dsDNA antibodies over time (16-40 weeks) did not show any significant change between the different groups of mice ($p>0.05$) (data not shown).

TPC attenuated glomerulonephritis by immunomodulating the cytokine profile.

Cytokines were shown to play a major role in the pathogenesis of lupus. Therefore we assessed whether treatment with TPC affected cytokine profile in the studied mice. NZBXW/F1 female mice treated with TPC and the appropriate controls were sacrificed at week 30, and their splenocytes were studied *in-vitro* for pro-inflammatory (IFN- γ , IL-17) and anti-inflammatory (TGF- β , IL-10) cytokine expression. RT-PCR analyses found that TPC inhibited the mRNA expression of the pro-inflammatory cytokine IFN- γ in comparison to mRNA expressed by the PBS treated mice ($p<0.03$), (Fig.4a). In parallel, TPC accelerated the mRNA expression of the anti-inflammatory cytokine TGF- β ($p<0.001$) compared to the mRNA expressed by splenocytes derived from PBS-treated mice.

We then deciphered the alteration in secretion of pro-inflammatory (IFN- γ , IL-17) and anti-inflammatory cytokines (TGF- β , IL-10) upon treatment with TPC (Fig.4b), *in-vitro*.

TPC was shown to decrease the splenocyte secretion of IFN- γ from lupus TPC treated mice by 5.2 times, compared to IFN- γ secretion by splenocytes from PBS treated mice ($p<0.008$), (Fig.4b).

IFN- γ secretion upon tuftsin or PC treatments was reduced by 2.5 and 1.5 times respectively ($p < 0.03$, $p < 0.04$). A striking decline in the levels of IL-17 secretion was observed in the supernatants of splenocytes of TPC treated mice, ($p < 0.01$) when compared with the PBS treated mice. Less significant inhibition of IL-17 secretion was induced by tuftsin ($p < 0.03$) and to a lower extent by PC, ($p < 0.048$). Analysis of anti-inflammatory cytokines levels in the culture fluid of splenocytes revealed an upregulation of TGF- β secretion ($p < 0.007$), in the TPC treated group, when compared to splenocyte secretion from PBS treated mice. Tuftsin moderately enhanced the secretion of TGF- β , while PC had a minimal effect on this cytokine expression, ($p < 0.05$). TPC remarkably increased IL-10 concentration in the culture fluid of splenocytes of TPC treated mice in comparison with the PBS treated mice, ($p < 0.001$). A significantly higher concentration of IL-10 was detected in the culture fluid of splenocytes from tuftsin treated mice, ($p < 0.01$), whereas, PC alone did not have any effect on IL-10 expression.

The effect of TPC on the development of CD4⁺ Treg cells.

The frequency of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Tregs subset was determined *in-vivo* in the splenocytes' culture fluid, following treatment with TPC, tuftsin, PC and PBS, as elucidated in Fig 5a,b. A striking enhancement in the percentage of Tregs phenotype was observed in the TPC treated group of mice when compared with tuftsin, PC or PBS Tregs levels (18%, 8%, 3% and 4% respectively).

Representative data of the Treg levels in splenocytes derived from TPC, tuftsin, PC and PBS treated mice (one experiment) gating on CD4⁺ T cells, are presented in Fig.5a. As illustrated in Fig.5b, TPC significantly promoted the Tregs phenotype expansion ($p < 0.009$) when compared to other groups of mice. When the percentage of Tregs was compared intra-groups, tuftsin did not lead to Tregs expansion ($p > 0.05$), PC had a mild effect on Tregs generation ($p < 0.04$).

Discussion

The main findings of this study are that TPC delayed the development of glomerulonephritis to class IV and prolonged survival time of the lupus prone mice. The clinical efficacy of TPC may be attributed to its potential to reduce pro-inflammatory cytokines expression such as IFN- γ and IL-17 and accelerate the anti-inflammatory cytokines profile such as TGF- β and IL-10. Our data suggest that TPC ability to attenuate lupus nephritis is based on its potential to affect the anti-inflammatory network. More specifically, TPC enhance secretion of anti-inflammatory cytokines, reduce pro-inflammatory cytokines expression, and enhances expansion of Tregs phenotype cells subset.

Glomerulonephritis is one of the potential life-threatening manifestations of SLE. The progress in deciphering the molecular mechanisms underlying the pathogenesis of lupus and other autoimmune diseases has led to the development of new-targeted biological treatments (35). Nevertheless, existing therapies for SLE such as cyclophosphamide, Rituximab or Belimumab often causes severe side effects.

In the search for new therapeutic strategies, helminth-derived products offer promising potential. In response to the “Hygiene Hypothesis”, which postulates that the slightest exposure to microorganisms in western countries would be responsible for the increased prevalence of autoimmune diseases (36,37), helminth therapies have been booming over last ten years. This led to the successful application of helminths in experimental models of autoimmune diseases and in clinical studies of several autoimmune and autoinflammatory conditions, including multiple sclerosis, inflammatory bowel disease, rheumatoid arthritis, and type-1 diabetes mellitus (6-12). Successful treatment of lupus with parasite worms was reported when NZBxW/F1 lupus prone mice were infected with *Toxoplasma gondii*, which prevented the onset of lupus nephritis (38). Introducing malaria by infection to NZBxW/F1 mice delayed development of lupus nephritis in the mice (39).

Herein, based on the immunomodulatory importance of PC (17-23), we constructed a novel chimeric molecule comprised of PC with natural adjuvant – tuftsin. Tuftsin is a naturally occurring tetrapeptide derived from immunoglobulin heavy chain and was initially described in 1970 by Najjar & Nishioka as a natural phagocytosis stimulating peptide (28-30). Although their mechanisms of action remain poorly elucidated, it is well recognized that tuftsin or tuftsin-like peptides also exhibit other stimulatory effects, including increased migration, activation of macrophages and enhance chemotaxis of defective monocytes derived from patients with SLE (28-30,40). At that time in 1989, scientists were not aware that lupus patients and lupus animal models have a defect in the clearance of apoptotic cells which lead to long exposure of the immune system to the apoptotic cells (41,42).

Due to this defect, apoptotic cells extensively circulate; undergo post-translational modifications and dephosphorylations followed by new membrane arrangements and neo-antigens formation, leading to flare-up of pathogenic autoantibodies to many cellular components (1). Tuftsin, as stimulator of macrophages, may have a role of accelerating the clearance of apoptotic cells leading to improvement of lupus development. Our data confirm the anti-inflammatory activity of tuftsin as shown in animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis and rat adjuvant arthritis (43,44). Tuftsin in a branched peptide form was used as a natural adjuvant for developing a vaccine to influenza with no side effects (31). However, the TPC chimer molecule, given to lupus mice, enhanced the anti-inflammatory activity at least 5 times more than tuftsin alone as exemplified in the elevated levels of TGF- β and IL-10. Moreover, TPC enhanced in more significant way Treg cells phenotype expansion as was documented in the TPC treated mice in comparison to tuftsin injected lupus mice. Our data confirm that PC molecule alone with no adjuvant or hapten carrier molecule is non-immunogenic, and has a mild/tendency effect on enhancing anti-inflammatory activity. Indeed, a key imbalance between the CD4+ lymphocyte subsets has been shown in lupus.

On the one hand, there is excessive differentiation toward Th1/Th17 lymphocytes, resulting in high amounts of pro-inflammatory cytokines, including IFN- γ , and IL-17, whose harmful role in autoimmune diseases, especially SLE, is well recognized (45-47); On the other hand, there is a marked quantitative and functional deficit in Tregs cells in lupus which by adoptive transfer of Tregs can attenuate glomerulonephritis and anti-dsDNA antibodies production (48-50). Tregs were shown to be reduced in the secondary lymphoid organs of the NZB/W F1 lupus-prone mouse model as compared with age-matched non-autoimmune mice (49). Deficiency of CD4⁺ Tregs is linked to the development of lupus-like disease, while adoptive transfer of CD4⁺ Tregs slowed the progression of renal disease and reduced mortality in NZB/W F1 mice (49). TPC treated mice had a significant elevated phenotype expression of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg cells and in concert with their ability to accelerate anti-inflammatory cytokines expression, it contribute to the delay in the onset of lupus nephritis and prolong the lupus mice survival time.

In conclusion, our findings suggest that TPC is an effective treatment for the prevention of severe lupus glomerulonephritis damage, by restoring the balance between the Treg levels and anti-inflammatory network.

Author contribution

All authors were involved in drafting the article and approved the final version to be published. Study conception and design: Dr. Shoenfeld and Dr. Blank. Experimental work was equally done by Dr. Blank and Bashi. Dr. Fridkin constructed the TPC molecule. Bizzaro, Dr. Ben-Ami, Dr. Versini, Dr. Gendelman took part in performing the study. Dr. Volkov and Dr. Barshak are pathologists, which covered the histological part.

References

1. Sherer Y, Gorstein A, Fritzler MJ, Shoenfeld Y. Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: more than 100 different antibodies found in SLE patients. *Semin Arthritis Rheum.* 2004;34:501-37.
2. Contreras G, Pardo V, Leclercq B, Lenz O, Tozman E, O'Nan P, et al. Sequential therapies for proliferative lupus nephritis. *N Engl J Med* 2004;350:971-80.
3. Ginzler EM¹, Wallace DJ, Merrill JT, Furie RA, Stohl W, Chatham WW, Weinstein A, McKay JD, McCune WJ, Zhong ZJ, Freimuth WW, Petri MA; LBSL02/99 Study Group. Disease control and safety of belimumab plus standard therapy over 7 years in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2014;41:300-9.
4. Wilson MS, Maizels RM. Regulation of allergy and autoimmunity in helminth infection. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2004;26:35-50.
5. Jackson JA, Friberg IM, Little S, Bradley JE. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: immunity against helminths and immunological phenomena in modern human populations: coevolutionary legacies? *Immunology.* 2009;126:18-27.
6. Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF, Stadecker MJ and Gause WC. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nature Reviews Immunology.* 2007;7:975-87.
7. Shor DB¹, Shoenfeld Y. Autoimmunity: Will worms cure rheumatoid arthritis? *Nat Rev Rheumatol.* 2013;9:138-40.
8. Ben-Ami D, Bashi T, Lachnish J, Fridkin M, Bizzaro G, Volkov A, Barshak I, Blank M, Shoenfeld Y. Helminthes derived immunomodulator based on phosphorylcholine for the treatment of mice with experimental colitis. *Crit. Rev.All. Immunol* 2014 in press.
9. Sotgiu S, Sannella AR, Conti B, Arru G, Fois ML, Sanna A, Severini C, Morale MC, Marchetti B, Rosati G et al.: Multiple sclerosis and anti-*Plasmodium falciparum* innate immune response. *J Neuroimmunol* 2007, 185:201-7.
10. Zacccone P¹, Cooke A. Vaccine against autoimmune disease: can helminths or their products provide a therapy? *Curr Opin Immunol.* 2013;25:418-23.
11. Summers RW, Elliott DE, Urban JF, Thompson R, and Weinstock JV. *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. *Gut* 2005; 54, 87–90.

12. Summers RW, Elliott DE, Urban JF, Thompson RA, and Weinstock JV. Trichuris suis therapy for active ulcerative colitis: a randomized controlled trial. *Gastroenterology* 2005;128, 825-32.
13. Zacccone P, Fehervari Z, Jones FM, Sidobre S, Kronenberg , Dunne MDW, and A Cooke. Schistosoma mansoni antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. *Eur J Immunol.* 2003;33:1439-49.
14. Liu Q, Sundar K, Mishra PK, Mousavi G, Liu Z, Gaydo A, Alem F, Lagunoff D, Bleich D, Gause WC. Helminth infection can reduce insulinitis and type 1 diabetes through CD25- and IL-10-independent mechanisms. *Infect Immun.* 2009;77:5347-58.
15. Sewell D, Qing Z, Reinke E, Elliot D, Weinstock J, Sandor M, and Z Fabry. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova immunization. *Int Immunol.*2003;15:59-69.
16. Ruysers NE, De Winter BY, De Man JG, Ruysers ND, Van Gils AJ, Loukas A, Pearson MS, Weinstock JV, Pelckmans PA, Moreels TG. Schistosoma mansoni proteins attenuate gastrointestinal motility disturbances during experimental colitis in mice. *World J Gastroenterol.* 2010;16:703-12.
17. McInnes IB, Leung BP, Harnett M, Gracie JA, Liew FY, and Harnett W. A novel therapeutic approach targeting articular inflammation using the filarial nematode-derived phosphorylcholine -containing glycoprotein ES-62. *J Immunol.* 2003; 171:2127-33.
18. Harnett W and Harnett MM. Phosphorylcholine: friend or foe of the immune system?. *Immunol Today.* 1999;20:125-8.
19. Harnett MM, Kean DE, Boitelle A, McGuiness S, Thalhamer T, Steiger CN, Egan C, Al-Riyami L, Alcocer MJ, Houston KM, Gracie JA, McInnes IB, Harnett W. The phosphorylcholine moiety of the filarial nematode immunomodulator ES-62 is responsible for its anti-inflammatory action in arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2008;67:518-23.
20. Goodridge HS, McGuiness S, Houston KM, Egan CA, Al-Riyami L, Alcocer MJ, Harnett MM, Harnett W. Phosphorylcholine mimics the effects of ES-62 on macrophages and dendritic cells. *Parasite Immunol.* 2007;29:127-37.
21. Harnett W and Harnett MM. Immunomodulatory activity and therapeutic potential of the filarial nematode secreted product, ES-62. *Adv Exp Med Biol.* 2009;666:88-94.
22. Pineda MA, Lumb F, Harnett MM, Harnett W. ES-62, a therapeutic anti-inflammatory agent evolved by the filarial nematode *Acanthocheilonema viteae*. *Mol Biochem Parasitol.* 2014;194:1-8.

23. Al-Riyami L, Harnett W. Immunomodulatory properties of ES-62, a phosphorylcholine-containing glycoprotein secreted by *Acanthocheilonema viteae*. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2012;12(1):45-52
24. Pörtl G, Kerner D, Paschinger K, Wilson IB. N-glycans of the porcine nematode parasite *Ascaris suum* are modified with phosphorylcholine and core fucose residues. *FEBS J*. 2007;274:714-26
25. Tomasz A. Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in pneumococcus. *Science*. 1967;157, 694-7.
26. Pery P, Petit A, Poulain J and Luffau G. Phosphorylcholine-bearing components in homogenates of nematodes. *Eur J Immunol*. 1974; 4:637-9.
27. Peng Y, Martin DA, Kenkel J, Zhang K, Ogden CA, Elkon KB. Innate and adaptive immune response to apoptotic cells. *J Autoimmun*. 2007;29:303-9.
28. Najjar VA, Nishioka K."Tuftsin": a natural phagocytosis stimulating peptide. *Nature*. 1970;228:672-3.
29. Siemion IZ, Kluczyk A. Tuftsin: on the 30-year anniversary of Victor Najjar's discovery. *Peptides*. 1999;20:645-74.
30. Fridkin M, Najjar VA. Tuftsin: its chemistry, biology, and clinical potential. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1989;24:1-40.
31. Liu X, Guo J, Han S, Yao L, Chen A, Yang Q, Bo H, Xu P, Yin J, Zhang Z. Enhanced immune response induced by a potential influenza A vaccine based on branched M2e polypeptides linked to tuftsin. *Vaccine*. 2012;30:6527-33.
32. Shoenfeld Y, Rauch J, Massicte H, Datta SK, Schwartz JA, Stollar BD, et al. Polyspecificity of monoclonal lupus autoantibodies produced by human-human hybridomas. *N Engl J Med* 1983;308:414–20.
33. Shoenfeld Y, Rauova L, Gilburd B, Kvapil F, Goldberg I, Kopolovic J, Rovensky J, Blank M. Efficacy of IVIG affinity-purified anti-double-stranded DNA anti-idiotypic antibodies in the treatment of an experimental murine model of systemic lupus erythematosus. *Int Immunol*. 2002;14:1303-11.
34. Blank M, Baraam L, Eisenstein M, Fridkin M, Dardik R, Heldman Y, Katchalski-Katzir E, Shoenfeld Y. β 2-Glycoprotein-I based peptide regulate endothelial-cells tissue-factor expression via negative regulation of pGSK3 β expression and reduces experimental-antiphospholipid-syndrome. *J Autoimmun*. 2011;37:8-17.
35. Murphy G, Lisnevskaja L, Isenberg D. Systemic lupus erythematosus and other autoimmune rheumatic diseases : challenges to treatment. *Lancet*. Elsevier Ltd; 2013;382:809-18.

36. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989;299:1259-60.
37. Rook GAW. Hygiene hypothesis and autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2012;42:5-15.
38. Chen M, Aosai F, Norose K, Mun HS, Ishikura H, Hirose S, Hirose S, Piao LX, Fang H, Yano A. *Toxoplasma gondii* infection inhibits the development of lupus-like syndrome in autoimmune (new zealand black x new zealand white) f1 mice. *Int Immunol* 2004;16:937-46.
39. Greenwood BM, Voller A. Suppression of autoimmune disease in New Zealand mice associated with infection with malaria. I. (NZBxNZW) F1 hybrid mice. *Clin Exp Immunol.* 1970;7:793-803.
40. Lukács K, Szabó G, Sonkoly I, Végh E, Gács J, Szekerke M, et al. Stimulating effect of tuftsin and its analogues on the defective monocyte chemotaxis in systemic lupus erythematosus. *Immunopharmacology.* 1984;7:171-8.
41. Muñoz LE, Lauber K, Schiller M, Manfredi AA, Herrmann M. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6:280-9.
42. Gaip US, Voll RE, Sheriff A, Franz S, Kalden JR, Herrmann M. Impaired clearance of dying cells in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* 2005;4:189-94.
43. Becherucci C, Perretti M, Nencioni L, Silvestri S, Parente L. Anti-inflammatory effect of tuftsin and its retro-inverso analogue in rat adjuvant arthritis. *Agents Actions.* 1992; Spec No:C115-7.
44. Wu M, Nissen JC, Chen EI, Tsirka SE. Tuftsin promotes an anti-inflammatory switch and attenuates symptoms in experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One.* 2012 ;7:e34933.
45. Martin JC, Baeten DL, Josien R. Emerging role of IL-17 and Th17 cells in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol.* 2014 May 23; [Epub ahead of print].
46. Alunno A, Bartoloni E, Bistoni O, Nocentini G, Ronchetti S, Caterbi S, Valentini V, Riccardi C, Gerli R. Balance between regulatory T and Th17 cells in systemic lupus erythematosus: the old and the new. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:823085.
47. Pollard KM, Cauvi DM, Toomey CB, Morris K V, Kono DH. Interferon- γ and systemic autoimmunity. *Discov Med.* 2013;16:123-31.

48. Scalapino KJ1, Tang Q, Bluestone JA, Bonyhadi ML, Daikh DI. Suppression of disease in New Zealand Black/New Zealand White lupus-prone mice by adoptive transfer of ex vivo expanded regulatory T cells. *J Immunol.* 2006;177:1451-9.
49. La Cava A, Ebling FM, Hahn BH. Ig-reactive CD4+CD25+ T cells from tolerized (New Zealand Black x New Zealand White)F1 mice suppress in vitro production of antibodies to DNA. *J Immunol.* 2004;173:3542-8.
50. La Cava A. T-regulatory cells in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2008;17:421-5.

Figure 1a

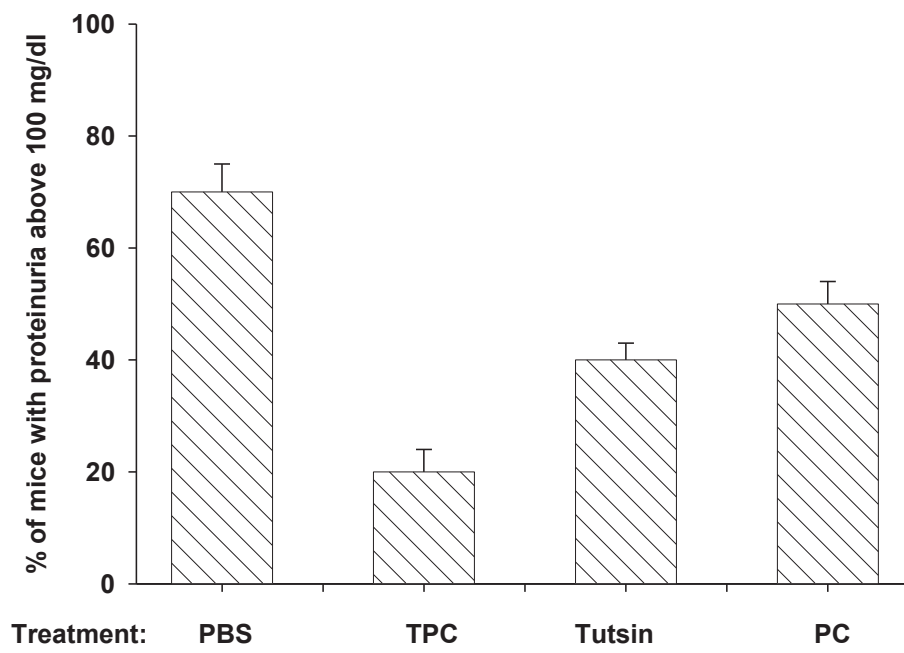


Figure 1b

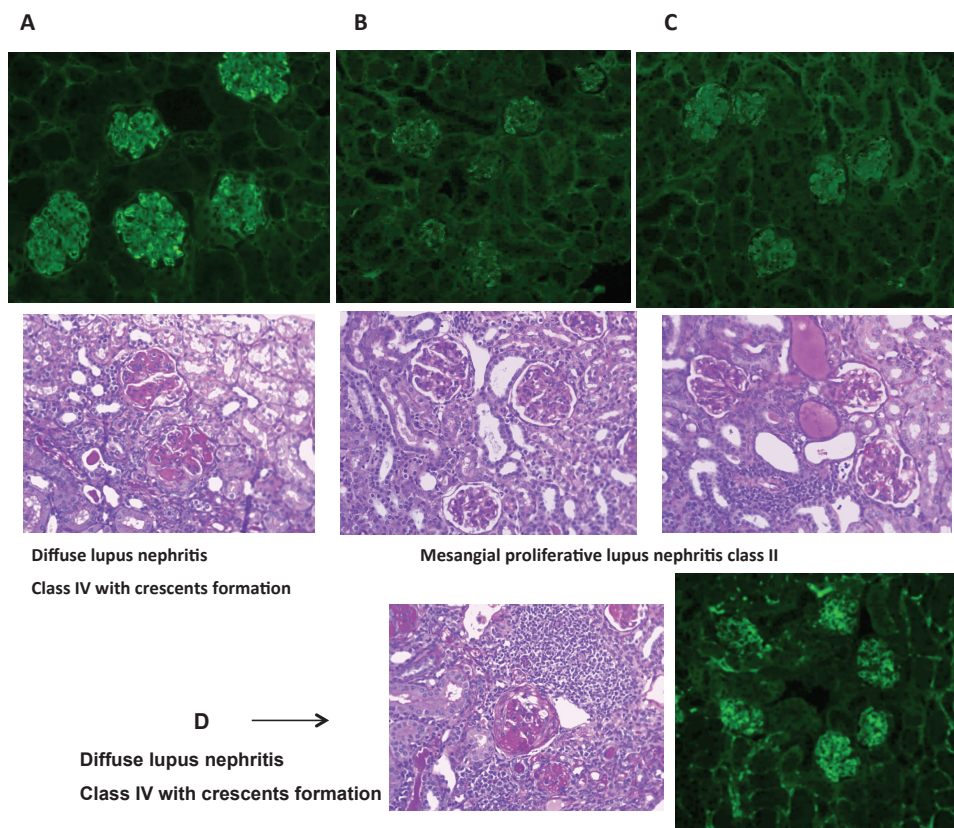


Figure 2

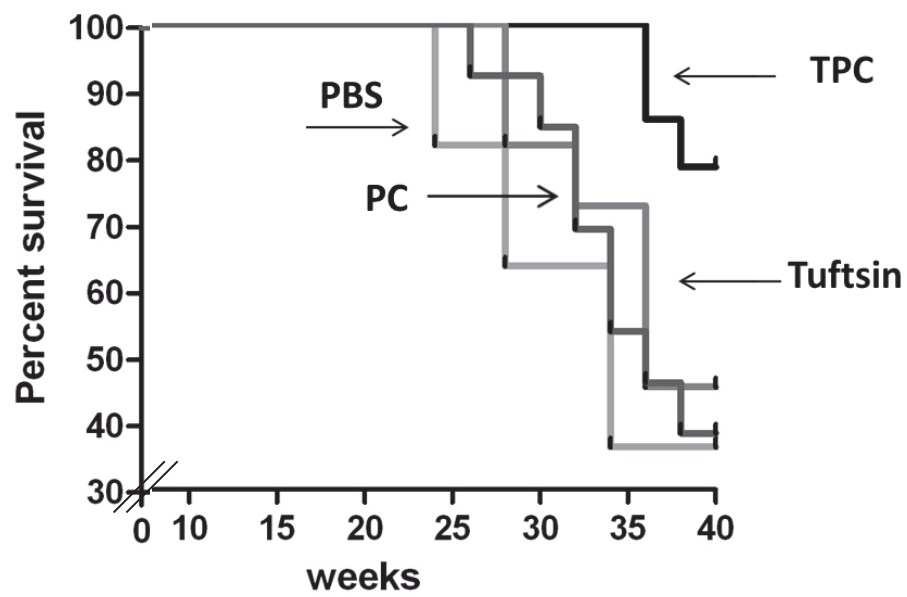


Figure 3

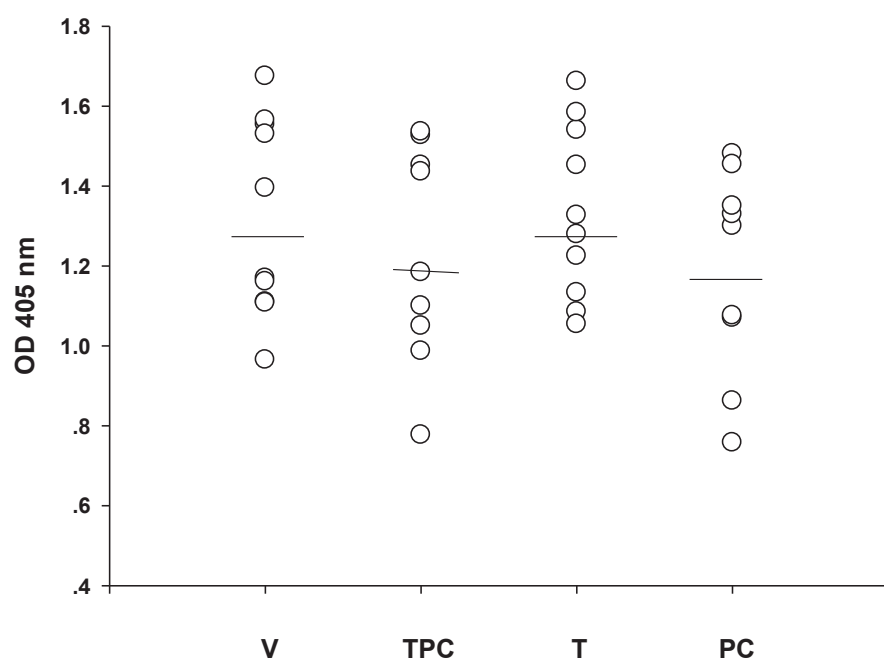


Figure 4a

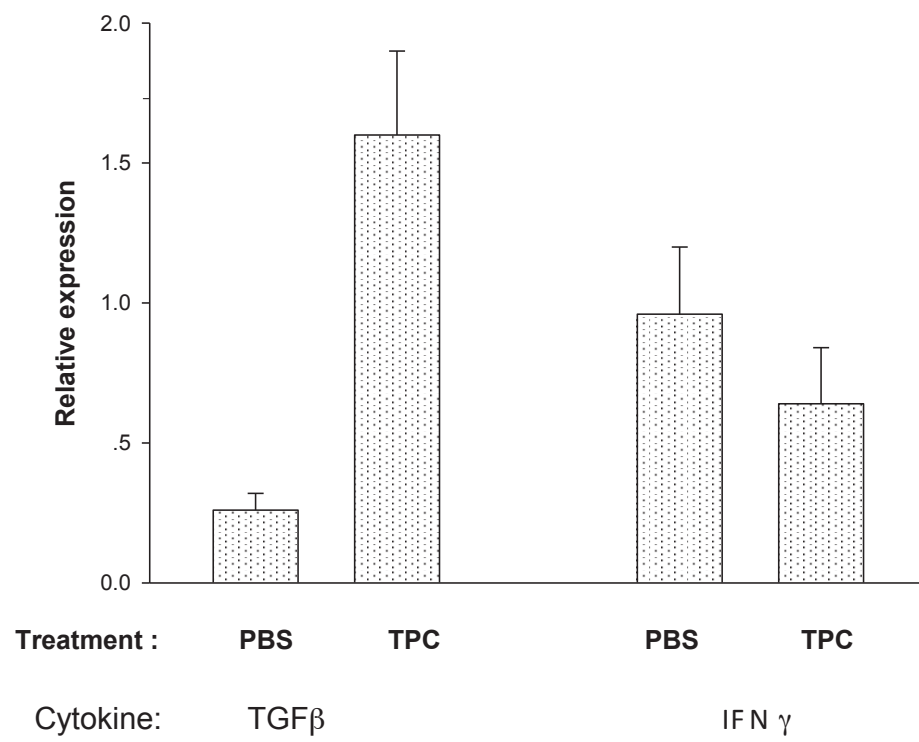


Figure 4b

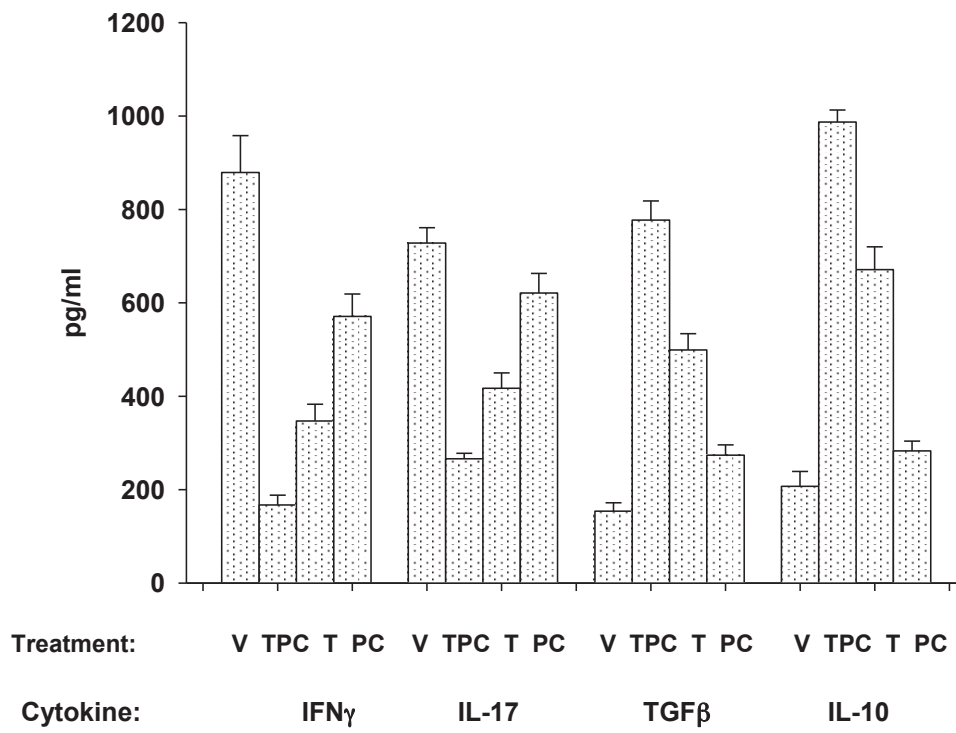


Figure 5a

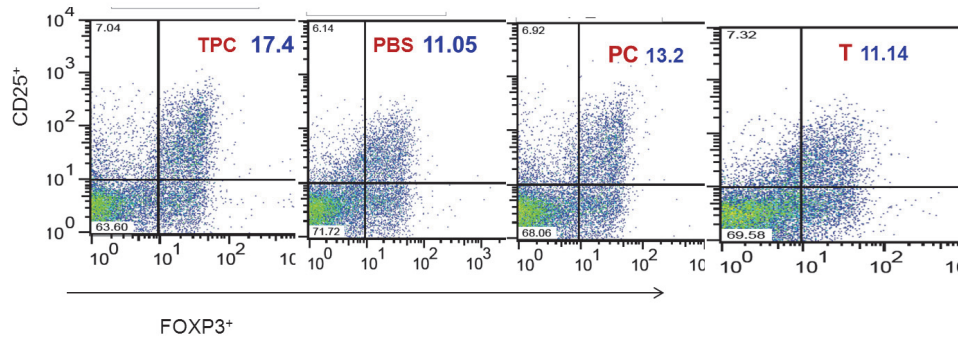
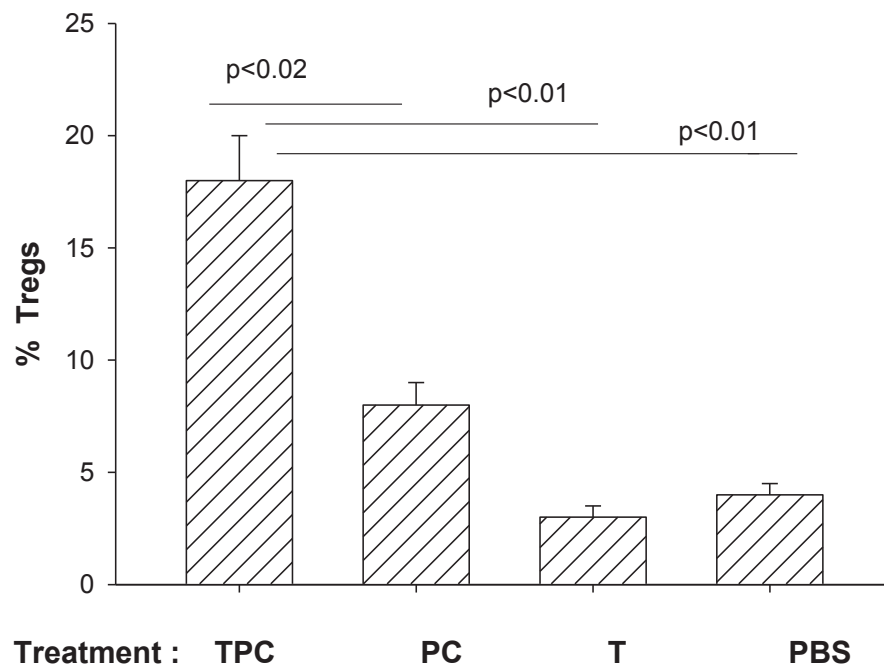


Figure 5b



Legend to Figures

Figure 1. TPC effect on glomerulonephritis development in NZBxW/F1 lupus mice:

a: Proteinuria: The levels of proteinuria are presented as percentage of mice that had above 100 mg/dl protein, in each group of mice (n=15 per group), treated with tuftsin-phosphorylcholine(TPC), tuftsin (T), phosphorylcholine (PC) or PBS (vehicle).

B: Histological analysis: PAS staining and immune complex deposition by immunofluorescence, in representative kidney sections from each studied group of mice.

A: Mice treated with PBS; B: mice treated with TPC; C: mice treated with tuftsin; D mice treated with PC. Magnification presented: x40.

Fig.2. Survival mice treated with TPC, tuftsin, PC and PBS: The number of dead mice were followed over time . The data presented are percent of mice that survived per a week. The time to death were significantly longer in the TPC treated mice versus control animals, $p<0.01$.

Fig.3. Circulating anti-dsDNA antibodies: The levels of circulating anti-dsDNA antibodies were tested in the sera of mice treated with TPC, tuftsin (T), vehicle (V- PBS), by ELISA at dilution of 1:800 (n=10 per group). The data are presented at optical density (OD) of 405nm.

Fig.4.Cytokines expression following TPC treatment:

a: Splenocytes IFN γ and TGF β mRNA was analyzed by RT-PCR and normalized to β -actin levels, in mice treated with TPC or PBS. The data are presented as relative mRNA expression of 3 separate experiments mean $\pm$ SD.

b: *In-vitro* analyses of the levels of pro-inflammatory cytokines (IFN γ , IL-17) and anti-inflammatory cytokines (IL-10, TGF β), in the culture fluids of splenocytes originated from TPC, tuftsin (T), PC and PBS (V-vehicle) treated mice. The data are presented in mean $\pm$ SD of 3 separate experiments.

Fig.5. Tregs levels in the TPC treated mice:

a: Representative FACS analyses of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ in splenocytes derived from the TPC, tuftsin (T), PC and PBS treated mice.

b: Percentage of Tregs expansion in the spleens of TPC, tuftsin (T), PC and PBS treated mice. The data are presented in mean $\pm$ SD of 3 separate experiments (n=5 for each group).

SERMENT d'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté,
de mes chers condisciples
et devant l'effigie d'Hippocrate,
je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur
et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent
et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.
Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis dans l'intérieur des maisons,
mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe,
ma langue taira les secrets qui me seront confiés
et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations
de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale
viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le secret absolu de la vie humaine.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes
connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres,
je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime
si je suis fidèle à mes promesses.
Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.