



HAL
open science

Le macrophage dans l'arthrite réactionnelle à Chlamydia chez la souris SKG

Claire Douillard

► **To cite this version:**

Claire Douillard. Le macrophage dans l'arthrite réactionnelle à Chlamydia chez la souris SKG. Médecine humaine et pathologie. 2017. dumas-01592000

HAL Id: dumas-01592000

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01592000>

Submitted on 22 Sep 2017

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

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

AVERTISSEMENT

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

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

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

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

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

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

**Le macrophage dans l'arthrite réactionnelle à
Chlamydia chez la souris SKG**

Thèse présentée pour l'obtention du Doctorat en Médecine
Diplôme d'État
Spécialité Rhumatologie

Par Claire Douillard

[Données à caractère personnel]

Thèse soutenue publiquement à la Faculté de Médecine de Grenoble*

Le 13 septembre 2017

Devant le jury composé de :

Mr le Professeur Philippe Gaudin, Président du Jury

Mr le Professeur Athan Baillet, Directeur de thèse

Mr le Professeur Robert Juvin

Mme le Docteur Aurélie Bozon

Mme le Docteur Marie-Hélène Paclet

*La Faculté de Médecine de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

RÉSUMÉ

Objectif :

La physiopathologie de l'arthrite réactionnelle à *Chlamydia* est encore mal comprise. Le rôle du macrophage a récemment été évoqué dans le modèle de la souris SKG, sans que les mécanismes exacts soient encore connus. L'importance du TNF α a également été suggérée dans l'expression clinique de l'arthrite. Nous émettons l'hypothèse que l'infection des macrophages induit un phénomène d'autophagie et/ou du stress du réticulum endoplasmique entraînant une majoration de la production de cytokines, dont l'IL-23, responsable de l'arthrite, et que le TNF α joue un rôle dans la symptomatologie clinique de l'arthrite.

Méthodes :

Après infection par *Chlamydia muridarum*, un groupe de souris SKG a subi une déplétion en macrophages par injection de clodronate. Nous avons contrôlé l'efficacité de l'infection et de la déplétion en macrophages par rapport au groupe contrôle. La survenue d'arthrite a été évaluée cliniquement de manière hebdomadaire, puis histologiquement lors de l'euthanasie 12 semaines post-infection. Ceci a également été évalué après blocage du TNF α en administrant à deux groupes de souris SKG infectées du certolizumab pegol ou de l'étanercept. L'autophagie, le stress du réticulum endoplasmique et la production d'IL-23 ont été évalués par RT-qPCR dans les tractus génitaux et dans les articulations des souris SKG infectées.

Résultats :

La déplétion en macrophages empêche l'apparition de l'arthrite réactionnelle à *C. muridarum* chez la souris SKG. Le blocage du TNF α en préventif et en curatif permet une diminution de la sévérité de l'arthrite. Il existe une surproduction d'IL-23 corrélée à une augmentation de l'autophagie dans les tractus génitaux des souris SKG infectées, 1 semaine post-infection, sans modification du stress du réticulum endoplasmique. La corrélation est inverse dans les articulations à la semaine 5.

Conclusion :

Nos résultats suggèrent l'importance du macrophage dans la physiopathologie de l'arthrite réactionnelle à *C. muridarum* chez la souris SKG, probablement par une activation de l'autophagie à l'origine d'une surproduction d'IL-23. Le TNF α semble être une cytokine fondamentale pour le développement des manifestations inflammatoires de l'arthrite.

Mots clés : Chlamydia, macrophage, arthrite réactionnelle, TNF α , autophagie, IL-23

ABSTRACT

The macrophage in *Chlamydia*-induced reactive arthritis in SKG mice

Objective :

The mechanisms underlying *Chlamydia*-induced reactive arthritis are poorly understood. Macrophages have recently come to light as key effectors in the SKG mouse model, without precisising the exact mechanisms. TNF α has also been suggested to play a pivotal role in clinical manifestations. We hypothesize that infection of macrophages induces autophagy and/or endoplasmic reticulum stress leading to an increased production of pro-inflammatory cytokines, including IL-23, leading to arthritis, and that TNF α plays a role in its clinical expression.

Methods :

We depleted macrophages in a group of SKG mice after infection by *Chlamydia muridarum*, by injection of clodronate. Infection and macrophage depletion were confirmed, compared to a control group. Arthritis was evaluated clinically for 12 weeks, and confirmed by histology upon sacrifice. Arthritis was similarly evaluated after TNF α blockade by treating two groups of infected SKG mice with certolizumab pegol or etanercept. Autophagy, endoplasmic reticulum stress and IL-23 production were analyzed by RT-qPCR in the genital tracts and joints of infected SKG mice.

Results :

Macrophage depletion prevents *C. muridarum*-induced reactive arthritis in SKG mice. TNF α blockade both preventively and therapeutically reduces the intensity of the arthritis. Increased autophagy is correlated to a rise in IL-23 production in the genital tracts of infected SKG mice, 1 week post-infection, whereas endoplasmic reticulum stress remains stable. The inverse correlation was found in the joints of infected SKG mice, 5 weeks post-infection.

Conclusion :

Collectively, our results show the importance of macrophages in the physiopathology of *Chlamydia*-induced reactive arthritis in SKG mice, probably via an activation of autophagy leading to increased IL-23 production initially. TNF α plays a pivotal role secondarily with its role in tissue damage and inflammation.

Key words : Chlamydia, macrophage, reactive arthritis, TNF α , autophagy, IL-23

LE MACROPHAGE DANS L'ARTHRITE REACTIONNELLE A CHLAMYDIA CHEZ LA SOURIS SKG

Structure de rattachement :

Laboratoire GREPI UGA EA7408

Université Grenoble Alpes

621 avenue Centrale

38400 Saint-Martin-d'Hères

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	7
----------------------	----------

ABRÉVIATIONS	10
---------------------	-----------

INTRODUCTION	11
---------------------	-----------

I. L'ARTHRITE REACTIONNELLE A <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i>	11
---	-----------

• HISTORIQUE.....	11
• DEFINITION ET EPIDEMIOLOGIE.....	11
• TABLEAU CLINIQUE ET EVOLUTION	12
• THERAPEUTIQUE.....	13
• CHLAMYDIA TRACHOMATIS	14
• HYPOTHESES PHYSIOPATHOLOGIQUES.....	14

II. LA SOURIS SKG : UN NOUVEAU MODELE D'ARTHRITE	15
---	-----------

• HISTORIQUE DES MODELES D'ARTHRITE REACTIONNELLE	15
• DECOUVERTE DE LA SOURIS SKG	16
• LA SOURIS SKG : UN MODELE D'ARTHRITE REACTIONNELLE	17

III. LE MACROPHAGE ET SES MECANISMES DANS L'ARTHRITE REACTIONNELLE	18
---	-----------

• ACTIVATION MACROPHAGIQUE DANS L'ARTHRITE REACTIONNELLE A <i>CHLAMYDIA</i>	18
• TUMOR NECROSIS FACTOR A	19
• INTERLEUKINE 23	19
• AUTOPHAGIE	20
• STRESS DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE.....	21

IV. HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE L'ETUDE	21
---	-----------

MATÉRIEL ET MÉTHODES	23
-----------------------------	-----------

I. MODELE MURIN D'ARTHRITE REACTIONNELLE A <i>C. MURIDARUM</i>	23
---	-----------

• INFECTION DES SOURIS SKG PAR <i>C. MURIDARUM</i>	23
• PRODUCTION ET PURIFICATION DE L'ANTIGENE MOMP RECOMBINANT DE <i>C. MURIDARUM</i>	24
• WESTERN BLOT DE L'ANTIGENE MOMP RECOMBINANT DE <i>C. MURIDARUM</i>	24
• VERIFICATION DE LA SEROCONVERSION A <i>C. MURIDARUM</i>	25
• ÉVALUATION CLINIQUE ET HISTOLOGIQUE DE L'INFLAMMATION TISSULAIRE ET ARTICULAIRE ...	26

II. ÉVALUATION DU ROLE DU MACROPHAGE	26
---	-----------

• DEPLETION MACROPHAGIQUE.....	26
• ANALYSE DE LA DEPLETION MACROPHAGIQUE PAR CYTOMETRIE EN FLUX.....	27
• ÉVALUATION CLINIQUE ET HISTOLOGIQUE DE L'ARTHRITE REACTIONNELLE A <i>C. MURIDARUM</i> APRES DEPLETION MACROPHAGIQUE.....	27

III. ÉVALUATION DU ROLE DU TNFA	27
--	-----------

• BLOCAGE DU TNFA.....	27
• ÉVALUATION CLINIQUE ET HISTOLOGIQUE DE L'ARTHRITE REACTIONNELLE A <i>C. MURIDARUM</i> LORS DU BLOCAGE DU TNFA.....	28

IV. AUTOPHAGIE, STRESS DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE ET IL-23	28
V. STATISTIQUES	30
VI. PLAN EXPERIMENTAL.....	30
RÉSULTATS	32
<hr/>	
I. MODELE MURIN D'ARTHRITE REACTIONNELLE A <i>C. MURIDARUM</i>	32
• CONFIRMATION DE L'INFECTION A <i>C. MURIDARUM</i>	32
• SEULES LES SOURIS SKG INFECTEES PAR <i>C. MURIDARUM</i> PRESENTENT UN PHENOTYPE CLINIQUE ET HISTOLOGIQUE D'ARTHRITE REACTIONNELLE	32
II. ÉVALUATION DU ROLE DU MACROPHAGE	34
• CONFIRMATION DE LA DEPLETION EN MACROPHAGES	34
• LA DEPLETION MACROPHAGIQUE PREVIENT L'APPARITION DE L'ARTHRITE REACTIONNELLE CHEZ LA SOURIS SKG INFECTEE PAR <i>C. MURIDARUM</i>	35
III. ÉVALUATION DU ROLE DU TNFA.....	37
• LE CERTOLIZUMAB EST EFFICACE COMME TRAITEMENT PREVENTIF ET CURATIF DE L'ARTHRITE REACTIONNELLE A <i>C. MURIDARUM</i> CHEZ LA SOURIS SKG	38
• L'ETANERCEPT EST EFFICACE COMME TRAITEMENT PREVENTIF ET CURATIF DE L'ARTHRITE REACTIONNELLE A <i>C. MURIDARUM</i> CHEZ LA SOURIS SKG	39
IV. AUTOPHAGIE, STRESS DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE ET IL-23	41
• LA PRODUCTION D'IL-23 EST CORRELEE A UNE AUGMENTATION DE L'AUTOPHAGIE DANS LE TRACTUS GENITAL DES SOURIS SKG INFECTEE PAR <i>C. MURIDARUM</i>	41
• LA PRODUCTION D'IL-23 EST INVERSEMENT CORRELEE A L'AUTOPHAGIE DANS LES ARTICULATIONS DES SOURIS SKG INFECTEE PAR <i>C. MURIDARUM</i>	43
DISCUSSION	44
<hr/>	
CONCLUSION	52
<hr/>	
BIBLIOGRAPHIE	55
<hr/>	
ANNEXE	61
<hr/>	

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury :

- *Mr le Professeur Juvin : mon choix de spécialité s'est fait en grande partie grâce à vous, et je vous en remercie. Merci de m'avoir enseigné la médecine comme personne et d'inspirer ma pratique au quotidien de part votre sens clinique et votre éthique. Je suis très honorée d'avoir pu travailler à vos côtés et que vous fassiez partie de mon jury aujourd'hui.*
- *Mr le Professeur Gaudin : merci pour votre accueil, votre gentillesse et vos conseils tout au long de mon internat. Je tâcherai d'être à la hauteur de votre confiance pour les deux années à venir.*
- *Mr le Professeur Baillet : first thesis as a PU-PH, congrats! Thanks for your availability in this work, for your advice and for forcing me to rehearse my oral presentation!*
- *Me le Docteur Paquet: merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury et de ton accueil chaleureux au GREPI.*
- *Me le Docteur Bozon: merci de m'avoir encadrée au cours de ces travaux de recherche, de ta bonne humeur à toute épreuve et de ta gentillesse.*

À ma famille :

- *Papa, Maman, merci de votre soutien si précieux toutes ces années. Je sais que ça n'a pas toujours été facile et je m'en excuse. C'est en grande partie grâce à vous que je suis là aujourd'hui (il paraît que sinon j'aurais fait archi!). Merci de nous avoir entouré d'amour et de joie, nous avons beaucoup de chance d'avoir des parents comme vous. Je vous aime.*
- *Mes frères, Antoine et Ludo, je vous aime aussi très fort, grandir à vos côtés fut un bonheur et parfois un peu sportif! Hâte de vous revoir pour me rendre compte à nouveau que j'ai pris un coup de vieux et que vous n'êtes plus mes « petits » frères du tout (surtout Ludo d'ailleurs!)*
- *Mes grands-parents, merci à vous de nous avoir tant appris, le jardinage et la botanique, la plomberie, l'amour du grand air à la mer comme à la montagne. Mes étés avec vous sont des souvenirs précieux.*
- *Ma Tata et José, merci de votre accueil mensuel à Paris, je me lèche les babines d'avance en pensant à la cuisine de José!*

À mes amis :

- *First of all, thanks to my girls Ayda (Moose), Mathilde (Mouffin) and Quiterie (Kiki). We've shared so much for more than a decade and you girls probably know me better than anyone else. Thank you for always being there, for your wise advice on pretty much everything and for giving me energy. I am looking forward to being there for all three of you until we grow old, gossiping around a cup of tea for hours. I love you girls.*
- *Aurélie et Lauranne, merci d'avoir réussi à me supporter pendant 2 années chacune en coloc, d'avoir partager des sanglots mais surtout des fous rires, des envies de déco et de chaussures, des recettes de cuisine et j'en passe! J'ai encore du mal à réaliser qu'il y a 10 ans nous grimpons ensemble dans le car du WEI, on a bien grandi depuis!*
- *Merci à Fanny, sans toi je n'aurais jamais autant révisé la D4! Merci de ta gentillesse, de ta générosité, de ton énergie et de tes pertinents conseils en paperasses administratives :)*

- *Annaëlle, nos aventures au Burkina et en Thaïlande (entre autre) resteront mémorables. Et qui sait, peut être qu'un jour on repartira à l'autre bout du monde ensemble ?*
- *Laulau, cette fameuse salle 10 aura été bien plus qu'une chance pour moi. Merci pour ton écoute, tes conseils avisés et ta joie de vivre si contagieuse !*
- *Merci à toute la team médecine La Middle, La Grande, Cyril, La Petite, heureuse de voir que malgré notre éparpillement aux 4 coins de la France nous arrivons toujours à nous voir!*
- *Merci à Antonin, Benjamin, Emily, Greg, Julie, William, Cédric, Karim, Alex pour les sorties vélo, rando ou piscine, les cours de pilates, de skating et de snowboard, les brunchs, les meilleures pad thai et frites...entre autre!*

À mes cointernes anciens et actuels:

- *Marine, merci pour ta relecture avisée, ton écoute, ta disponibilité.*
- *Maxime, je reste padawan, merci pour ta gentillesse et ta bienveillance.*
- *Céline, tu es la première à m'avoir appris à penser autrement ma vie professionnelle et je t'en remercie du fond du coeur.*
- *Romain et Francky, merci de me faire tant rire en duo comme en solo.*
- *Xavier, merci d'avoir fait et refait les stats et de ta disponibilité pour discuter des résultats étranges!*
- *Antoine, Arnaud, Jason, Julien, Mélanie, Margot, Sophie (ça compte toujours!), Sally, Chloé: on ne s'est pas tous croisés en stage mais c'est un plaisir de se voir au moins en cours. Et merci de prendre le risque de monter en voiture avec moi au volant!*

Merci à toute l'équipe médicale et paramédicale de rhumatologie, de neurologie, d'infectieux, de rééducation avec des mentions spéciales pour:

- *Le Dr Gilson qui m'a beaucoup soutenue lors d'un semestre difficile et beaucoup appris tant sur le plan médical que sur la manière de pratiquer la médecine.*
- *Le Dr Grange, pour sa bonne humeur et ses blagues pas toujours recommandées.*
- *Les Dr Vaillant et Casez, pour leur amour de la neurologie, vous avez presque réussi à me faire changer de bord!*
- *Les Dr Gourmelen et Vidon pour leur gentillesse et leur encadrement à Aix, merci de m'avoir montré une autre manière d'exercer la rhumatologie.*
- *Les Dr Blanchard et Vidal pour leur accueil et leur enseignement à Rocheplane,*
- *Toute l'équipe de kiné et ergo de Rocheplane, riche d'apprentissage.*

Merci à Chuong, Bertrand et toute l'équipe du GREPI pour leurs conseils, leur disponibilité et leur accueil chaleureux pendant mon master.

À mes deux hommes,

Matthieu,

Merci d'être à mes côtés chaque jour, de partager les moments heureux et ceux plus difficiles aussi.

Merci de savoir trouver les mots justes pour me soutenir et me redonner confiance.

Merci de tempérer mes folies organisatrices, de cuisiner la patate sautée comme personne et de prendre toujours un pull en plus pour moi quand on part en vadrouille (entre autre).

Je t'aime mon pandaillou.

Eliott,

Merci de nous avoir embarqué dans une aventure magnifique où chaque jour est émerveillement et découverte,

Merci de me remplir de bonheur à chaque instant,

Merci de me rappeler quotidiennement de profiter de l'instant présent,

Je suis très heureuse et fière d'être ta Maman et vais faire de mon mieux pour que tu le sois aussi chaque jour.

ABRÉVIATIONS

AINS: anti-inflammatoires non stéroïdiens
ARN: acide ribonucléique
ARNm: acide ribonucléique messenger
BL21 (DE3): souche d'*Escherichia coli*
CMH complexe majeur d'histocompatibilité
C. muridarum/ Cmu: *Chlamydia muridarum*
C. trachomatis: *Chlamydia trachomatis*
DMARDs: Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs
ELISA: *Enzyme* Linked ImmunoSorbent Assay
HLA-B27: Human Leukocyte Antigen-B27
HPRT1: hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
HRP: horseradish peroxidase, peroxydase de raifort
HSPA5: heat shock protein family A member 5
HSP60: heat shock protein 60
IL-17 / IL-22 / IL-23: interleukine 17 / 22 / 23
IFN γ / IFN β : interferon gamma / interferon bêta
IFU: inclusion forming units
IP: intra-péritonéale
IPTG: isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LPS: lipopolysaccharides
LT: lymphocyte T
M-CSF: Macrophage Colony Stimulating Factor
MBP: maltose binding protein, protéine liant le maltose
MOMP: Major Outer Membrane Protein
mTOR: Mammalian Target of Rapamycin
PAMPs: Pathogen-associated Molecular Patterns
PBS: phosphate buffered saline, tampon phosphate salin
PBST: PBS 0,05% v/v Tween20
PCR: réaction de polymérisation en chaîne
Q-PCR: réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel
RT-qPCR: réaction de polymérisation en chaîne quantitative par transcription inverse
RE: réticulum endoplasmique
RPL32: ribosomal protein L32
SPF: Specific Pathogen Free
SPG: Sucrose Phosphate Glutamate
TCR: T cell receptor
Th1/ Th2 / Th17: Lymphocyte T helper 1 / 2 / 17
TGTP1: T cell specific Guanosine Triphosphate hydrolase 1
TLR-2: Toll-Like Receptor-2
TMB: tétraméthylbenzidine
TNF α : tumor necrosis factor alpha
T_{reg}: Lymphocyte T régulateur
UPR : unfolded protein response, réponse aux protéines mal repliées
v/v: volume pour volume
ZAP-70^{W163C} : mutation W163C de la zeta-chain-associated protein kinase 70

INTRODUCTION

I. L'arthrite réactionnelle à *Chlamydia trachomatis*

- **Historique**

Le lien entre arthrite et infection génito-urinaire fut établi pour la première fois par Hippocrate au 4^{ème} siècle avant J.-C., lorsqu'il nota dans ses observations qu' « un jeune ne souffre d'arthrite qu'après un rapport sexuel » (1). Pendant les siècles qui ont suivis, plusieurs observations médicales ont confirmés l'association entre une atteinte infectieuse génito-urinaire et la survenue secondaire d'une arthrite (2). Des rapports historiques décrivent la survenue d'une arthrite avec inflammation oculaire chez Christophe Colomb, survenue dans les suites de son voyage aux Amériques (3).

La triade classique arthrite-conjonctivite-urétrite fut décrite de manière précise par Sir Benjamin Brodie en 1818 sur une série de 5 patients ayant présenté un tableau de polyarthrite asymétrique des membres inférieurs associée à une inflammation oculaire, dans les suites immédiates d'une urétrite (4). En 1916, les Docteurs Fiessinger et Leroy en France et le Dr Reiter en Allemagne décrivirent des cas similaires dans les suites cette fois-ci d'épisodes dysentériques, d'où l'éponyme syndrome de Fiessinger-Leroy-Reiter ou plus couramment syndrome de Reiter qui a été utilisé pendant plus d'un siècle par les rhumatologues (5). Cependant, le Dr Reiter ayant appartenu au Parti Nazi et conduit des expériences médicales dans les camps de concentration, de nombreux médecins et patients ont demandé le retrait de cet éponyme et ce syndrome est maintenant connu sous le nom d'arthrite réactionnelle.

- **Définition et épidémiologie**

L'arthrite réactionnelle est une maladie appartenant au groupe des spondyloarthrites. Sa définition a été largement débattue et il n'y a aujourd'hui toujours pas de critères diagnostiques ayant obtenu de consensus international. Il est cependant considéré qu'une arthrite aseptique survenant dans les suites d'une infection gastro-intestinale ou génito-

urinaire peut être diagnostiquée comme une arthrite réactionnelle. Les pathogènes les plus fréquemment incriminés sont *Shigella spp*, *Salmonella spp*, *Yersinia spp* ou *Campylobacter spp* au niveau digestif et *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) au niveau génito-urinaire.

L'incidence est variable selon les études mais peut être estimée entre 0,6 et 27 cas pour 100.000 (6), tous pathogènes confondus. Il est cependant probable que cette incidence soit sous-estimée, notamment pour l'arthrite réactionnelle à *C. trachomatis* étant donné la forte prévalence des infections génitales à *C. trachomatis* et la présence de *C. trachomatis* et/ou *C. pneumoniae* chez 62% des patients présentant une spondyloarthrite indifférenciée (7). *C. trachomatis* est une bactérie intracellulaire qui prolifère au sein de vacuoles des cellules hôtes eucaryotes et représente la cause la plus fréquente d'arthrite réactionnelle : 4 à 15% des individus avec une infection génitale à *C. trachomatis* présenteront une arthrite réactionnelle (8).

- **Tableau clinique et évolution**

L'âge de début varie beaucoup avec un pic entre 20 et 40 ans et une prédominance masculine possiblement lié au fait que l'infection génito-urinaire préalable à l'arthrite est davantage symptomatique chez ce dernier, alors qu'elle passe fréquemment inaperçue chez la femme (9,10). Le tableau clinique historiquement décrit associant la triade arthrite-conjonctivite-urétrite, ou syndrome de Fiessenger-Leroy-Reiter, est aujourd'hui rarement observé de façon complète. Les patients présentent généralement une oligoarthrite asymétrique touchant préférentiellement les grosses articulations des membres inférieurs. Une atteinte des membres supérieurs est également possible, tout comme un tableau polyarticulaire touchant les petites articulations ou une atteinte uniquement enthésitique, l'enthèse achilléenne étant alors la plus fréquemment touchée (9). Des symptômes extra-articulaires oculaires, tels qu'une conjonctivite ou uvéite, et/ou cutanéomuqueux, tels qu'une kératodermie blennorragique ou une balanite circinée sont parfois associés.

Le pronostic de l'arthrite réactionnelle à *Chlamydia* est moins bon que celle aux germes

entéro-invasifs, avec davantage de risque d'évolution vers la chronicité (11) et dans tous les cas un risque d'infertilité chez la femme. L'évolution est favorable en moins de 6 mois chez seulement un patient sur deux, avec une durée moyenne d'évolution entre 3 et 5 mois (11). Au-delà de 6 mois, la forme chronique se présente généralement sous forme d'une alternance de phases de rechute et de rémission.

- **Thérapeutique**

En premier lieu, chaque patient présentant une infection génitale à *C. trachomatis* doit bénéficier d'un traitement antibiotique adapté par une dose unique d'azithromycine, afin de prévenir le risque de transmission et d'infertilité entre autre.

A la phase aiguë de l'arthrite réactionnelle, des mesures conventionnelles associant une cure d'AINS (Anti-inflammatoires non stéroïdiens) à forte dose, des antalgiques et un repos relatif sont préconisés. Une infiltration locale de corticoïdes peut également être bénéfique, surtout en cas d'atteinte monoarticulaire. Une corticothérapie systémique sera discutée en cas d'atteinte polyarticulaire ou d'inflammation systémique importante et invalidante.

Pour les formes chroniques, évoluant au-delà de 6 mois, il n'y a pas de consensus thérapeutique. Un traitement prolongé pendant six mois par une association d'antibiotiques (azithromycine + rifampicine ou doxycycline + rifampicine) a montré son efficacité mais son intérêt reste débattu (12). Il n'existe que très peu d'études randomisées sur l'intérêt des DMARDs (Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs) synthétiques ou biologiques. La sulfasalazine à la dose de 2g/jour semble être bénéfique (13). Des études récentes ont démontrées l'efficacité des anti-TNF α par voie sous cutanée ou intra veineuse, sans réactivation de l'infection (14,15).

Cette absence de consensus thérapeutique est plurifactoriel, lié à la fois à une incidence faible de l'arthrite réactionnelle à *Chlamydia* sous-estimée de par le caractère fréquemment asymptomatique de l'infection génito-urinaire initiale, à son évolution favorable en moins de 6 mois chez 50% des patients et surtout au fait que les mécanismes physiopathologiques à son

origine sont encore mal compris.

- **Chlamydia trachomatis**

C. trachomatis est une bactérie intracellulaire qui prolifère au sein des vacuoles des cellules hôtes eucaryotes. Ce germe représente la cause la plus fréquente d'arthrite réactionnelle.

Le cycle d'infection de *Chlamydia trachomatis* dure entre 48-72h. Initialement le Chlamydia est sous sa forme infectieuse extracellulaire : le corps élémentaire, il est ensuite absorbé par sa cellule hôte (cellule épithéliale, macrophage...) dans une inclusion cytoplasmique. Dans la cellule, il va prendre la forme d'un corps réticulé. Enfin, à la fin de son cycle de réplication, il reprend sa forme infectieuse (corps élémentaire) ce qui provoque la mort de la cellule hôte et la propagation de l'infection aux cellules avoisinantes.

- **Hypothèses physiopathologiques**

Bien que le concept d'arthrite réactionnelle soit connu depuis environ un siècle, très peu d'études en précisent les mécanismes étiopathogéniques.

L'hypothèse initiale était celle d'une réaction auto-immune par mimétisme moléculaire entre un épitope de *Chlamydia* et un antigène du soi. Cependant, la caractérisation de ce peptide arthritogène peinant à aboutir, une autre hypothèse a donc été proposée postulant que ce rhumatisme était dû à une dysfonction du système immunitaire inné favorisant une diminution de la clairance bactérienne et donc la persistance de signaux de danger ou PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) à l'origine de la réponse inflammatoire tissulaire chronique.

Il est en effet suggéré que la persistance de *Chlamydia* est liée à une polarisation des lymphocytes T (LT) CD4+ en faveur des lymphocytes Th17 (16) et au détriment des lymphocytes Th1, ce qui a pour conséquence une diminution de la production de TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha) et d'IFN- γ (Interferon gamma), cytokines pro-inflammatoires bactéricides (17,18). L'haplotype HLA-B27 (Human Leucocyte Antigen-B27) aurait également un impact sur l'élimination articulaire de *Chlamydia* de par sa corrélation avec une baisse de TNF- α et d'IFN- γ dans le liquide articulaire (19,20). Ceci pourrait expliquer la

corrélation entre le HLA-B27 et la sévérité et chronicité de l'arthrite réactionnelle (6,21). De plus, il a été montré que *Chlamydia* infecte les macrophages (22) et se dissémine probablement ainsi dans l'organisme jusqu'à la synoviale où on peut la mettre en évidence à l'état vivant (23) mais sous la forme d'un corps aberrant (24). Les PAMPs de *Chlamydia* exprimés par les macrophages infectés induisent ainsi une inflammation locale par l'activation de la voie de signalisation des Toll-Like Receptor-2 (TLR-2) (25). Cependant, la cause de cette réponse inflammatoire exagérée suite à la persistance des PAMPs est mal comprise, tout comme les mécanismes à l'origine de la chronicité du rhumatisme. Ceci est dû à la fois au caractère intracellulaire de *Chlamydia*, à son cycle de développement, à la méconnaissance de son génome mais également au manque de modèle animal d'arthrite réactionnelle.

II. La souris SKG : un nouveau modèle d'arthrite

- **Historique des modèles d'arthrite réactionnelle**

Il existe de nombreux modèles murins d'infection du tractus génital par *Chlamydia* (26) qui permettent d'étudier la pathogénèse de l'infection génitale de ces bactéries et de tester des vaccins dans l'objectif de diminuer la prévalence de cette pathologie.

Il existe, par contre, très peu de modèles murins permettant d'étudier l'histoire naturelle et la pathogénèse de l'arthrite réactionnelle. Hough A. *et al.* ont induit une arthrite aiguë par l'inoculation articulaire de *C. trachomatis* chez la souris C57BL/6 (27). L'inoculation intra-articulaire a entraîné une inflammation aiguë et chronique articulaire chez les souris précédemment infectées par voie génitale avec *C. trachomatis* mais pas chez les souris qui n'avaient pas été infectées au préalable. L'étude par microscopie électronique a démontré que les synoviocytes de type macrophagique contenaient des corps élémentaires de *C. trachomatis*. Dans ce modèle, on ne notait pas de persistance de *C. trachomatis* dans l'articulation à distance de l'infection comme cela a été constaté chez l'Homme. Inman *et al.*

(28) ont étudié un autre modèle qui consistait à injecter en intra-articulaire des synoviocytes qui avaient été préalablement infectés par du *C. trachomatis* chez des rats mâles Lewis. En résultait une arthrite aiguë puis chronique associée à une diffusion hépatique et splénique. Aucune arthrite ne survenait à distance de l'articulation infectée.

Ces modèles ne reproduisent donc pas fidèlement l'arthrite réactionnelle survenant chez l'Homme, rendant difficile l'extrapolation de ces résultats.

- **Découverte de la souris SKG**

La souris SKG est une souris BALB/c présentant une mutation ZAP-70^{W163C}, découverte fortuitement par Sakaguchi en 2003 (29). Cette équipe japonaise a constaté l'apparition spontanée d'arthrites dans un sous-groupe de leur élevage de souris BALB/c. Ils ont confirmé la présence de synovites histologiques, d'érosions et de modifications immunologiques avec notamment l'apparition de facteur rhumatoïde chez ces souris. L'ensemble de ces données suggère que le tableau d'arthrite chronique spontanée développé chez ces souris est similaire à celui d'une polyarthrite rhumatoïde humaine.

Ces souris possèdent une mutation génétique ponctuelle dans un locus d'un gène situé sur le chromosome 1, mutation de transmission autosomique récessive avec 100% de pénétrance. La mutation consiste en la substitution d'une guanine (G) pour une thymine (T) au niveau du nucléotide 489 du gène ZAP-70 (Zeta-chain Associated Protein kinase 70) qui altère le codon 163 en remplaçant l'acide aminé tryptophane par la cystéine (W163C) au niveau du domaine SH2 de la protéine ZAP 70.

ZAP-70 est une molécule clé dans la transduction du signal des lymphocytes T (LT). La sélection thymique positive ou négative des LT nécessite un certain degré d'activation de la signalisation ZAP-70 du récepteur du LT (TCR). La mutation ZAP-70^{W163C} des SKG est susceptible d'augmenter l'avidité du TCR pour des autoantigènes présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), mécanisme ayant pour objectif de compenser le signal réduit par la protéine ZAP-70 aberrante afin de permettre un processus de sélection thymique

a minima. De ce fait, les LT reconnaissant des antigènes du soi subissent une sélection positive par le thymus au lieu d'être éliminés. Par ce mécanisme le thymus génère des lymphocytes T CD4⁺ hautement auto-réactifs aussi appelés LT arthritogènes. Cette mutation provoque également une déficience sévère de la sélection positive thymique des LT entraînant un déficit périphérique en LT occasionnant une susceptibilité accrue aux infections. Enfin, un déficit de lymphocytes T_{reg} est aussi retrouvé, responsable d'une suppression réduite des LT auto-réactifs anormalement produits.

- **La souris SKG : un modèle d'arthrite réactionnelle**

L'équipe australienne du Pr Thomas a démontré que ces mêmes souris SKG développent une spondyloarthropathie (30) après une injection de curdlan (bêta-glucan microbien), avec apparition de conjonctivite, dactylite, arthrite, spondylite et iléite (Figure 1).



Figure 1. L'injection intra péritonéale de bêta-glucan fongique entraîne un état inflammatoire chez la souris SKG. Expérience chez 80 souris. Souris SKG 8 semaines après injection du bêta-glucan curdlan (a). Les souris SKG non traitées par curdlan ne développent pas d'inflammation tissulaire (encadré à gauche). Certaines souris SKG infectées présentent des conjonctivites (encadré à droite). Pattes d'une souris SKG non traitée (b) et d'une souris traitée par curdlan présentant une dactylite (c). Tuméfaction et épaissement de l'intestin grêle chez une souris SKG traitée par curdlan (e) par rapport à une souris non traitée (d). Radiographies de rachis (traitée (g), non traitée (f)), et de pattes (traitée (i), non traitée (h)). Micro-scanners de rachis (traitée (k), non traitée (j)), et de pattes (traitée (m), non traitée (l)) montrant des érosions sévères et une production osseuse (Ruutu, Arthritis Rheumatol 2012).

Le Dr Baillet a récemment démontré que 5 semaines après une infection génitale à *Chlamydia muridarum*, équivalent murin de *C. trachomatis*, 85% des souris SKG présentent les

symptômes typiques d'une arthrite réactionnelle avec des arthrites des poignets et des chevilles alors que les souris sauvages BALB/c ne développent aucune inflammation (31). L'analyse histologique montrait les caractéristiques de sacro-iliite, enthésite, synovite et spondylite (Figure 2).

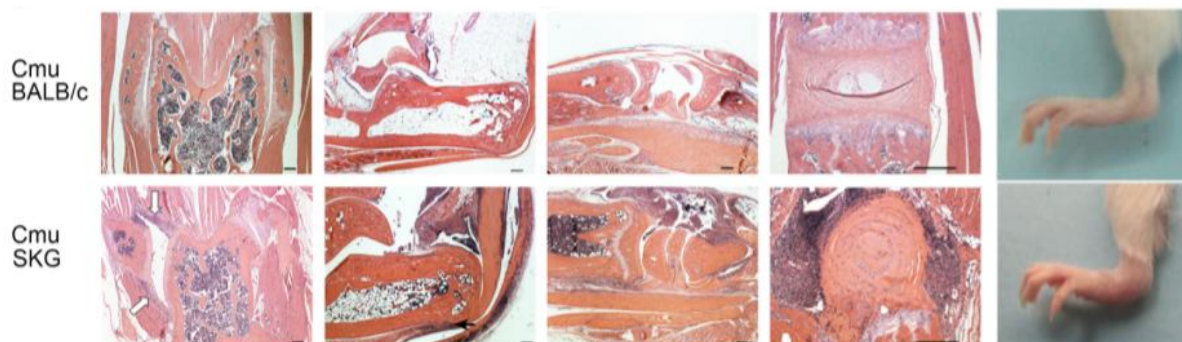


Figure 2. L'infection génitale par *C. muridarum* entraîne des enthésites, synovites, spondylites et sacro-iliites chez la souris SKG. Coupes à l'hématoxyline et à l'éosine de sacro-iliaques, pattes arrière, pattes avant et disques intervertébraux chez des souris SKG et contrôles sauvages BALB/c, (de gauche à droite) montrant une sacro-iliite, une enthésite du tendon d'Achille et une fasciite plantaire, une synovite et une spondylite 12 semaines après l'infection uniquement chez les souris SKG; grossissement X4, les barres d'échelle représentent 0,5mm. À droite, pattes arrière d'une souris SKG et BALB/c 12 semaines après l'infection, montrant une tuméfaction uniquement chez la souris SKG (en bas) (31).

Ce modèle est, à notre connaissance, le premier modèle murin d'arthrite réactionnelle induite par les Chlamydias se rapprochant le plus de la présentation clinique survenant chez l'Homme. L'étude de ce modèle pourrait améliorer notre connaissance de la physiopathologie de l'arthrite réactionnelle qui reste à ce jour encore mal connue.

III. Le macrophage et ses mécanismes dans l'arthrite réactionnelle

- **Activation macrophagique dans l'arthrite réactionnelle à *Chlamydia***

Il est suggéré que *C. trachomatis* et *C. pneumoniae* infectent les macrophages (22,32) et se disséminent ainsi dans les différents tissus de l'organisme, dont la synoviale (23). Les macrophages infectés expriment les PAMPS de *Chlamydia* et activent ainsi une réponse inflammatoire tissulaire, notamment via la voie des TLR-2 (25). L'arthrite réactionnelle à *Chlamydia* est en effet atténuée chez la souris TLR-2^{-/-} (31). Par ailleurs, chez la souris SKG,

il existe une augmentation du nombre de monocytes et macrophages après infection par *C. muridarum*, qui semble être responsable d'une majoration de la production de TNF- α en réponse à l'antigène MOMP (Major Outer Membrane Protein) de *C. muridarum* (31).

Ce nouveau modèle conforte l'hypothèse que l'arthrite réactionnelle à *Chlamydia* chez la souris SKG est induite par une réponse exubérante du système immunitaire inné, avec un rôle clé des cellules myéloïdes, plutôt que par un processus auto-immun.

- **Tumor Necrosis Factor α**

Le Tumor Necrosis α (TNF α) est une cytokine homotrimérique produite en grande majorité par les cellules de l'immunité innée dont les macrophages et les monocytes, mais également par les lymphocytes T CD4+. Ses effets sont multiples avec entre autre un effet anti-tumoral (d'où sa dénomination) et anti-infectieux. Cependant, il peut aussi avoir des effets délétères notamment dans les rhumatismes inflammatoires tels que les spondyloarthrites, de par son action pro-inflammatoire. On note ainsi chez ces patients une surproduction de TNF α par les macrophages activés, notamment au niveau des enthèses où il joue un rôle dans la formation osseuse (33).

Baillet *et al.* ont montré que l'arthrite réactionnelle à *C. muridarum* chez la souris SKG était dépendante du TNF α , avec une corrélation entre la sévérité de l'arthrite, le taux circulant de TNF α et la charge bactérienne (31). Il semblerait que le TNF α ait ainsi un rôle délétère, favorisant la survenue des phénomènes inflammatoires articulaires au détriment du contrôle de l'infection.

Ceci permet d'envisager la voie du TNF α comme voie thérapeutique dans l'arthrite réactionnelle. En effet, il a récemment été montré qu'un traitement par anti-TNF α chez les patients présentant une arthrite réactionnelle chronique permettait une rémission clinique (14).

- **Interleukine 23**

L'interleukine-23 (IL-23) est une cytokine hétérodimérique formée de 2 sous-unités : 1 sous-unité p40 commune à l'IL-12 et à l'IL-23, et 1 sous-unité p19 spécifique de l'IL-23.

Son rôle fondamental dans la pathogénèse des spondyloarthrites a récemment été évoqué (34). Il existe en effet une augmentation de cette cytokine dans le sang, l'intestin et le liquide synovial de patients atteints de spondyloarthrite (35) et il a été démontré son rôle essentiel dans le développement de l'enthésite et de la néoformation osseuse à ce niveau, par son action sur les lymphocytes T ROR- γ ⁺CD3⁺CD4⁻CD8⁻ (34).

Elle induit également la différenciation des LT CD4⁺ naïfs en lymphocytes Th17 (16), producteurs de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-17 et l'IL-6. Cette surproduction d'IL-23 chez les patients atteints de spondyloarthrites provient essentiellement des macrophages activés (35), après activation des TLRs par les lipopolysaccharides (LPS). Il a été suggéré que ce phénomène soit lié à une augmentation de l'autophagie et/ou du stress du réticulum endoplasmique (RE) (36).

- **Autophagie**

L'autophagie est un mécanisme cellulaire présent dans toutes les cellules eucaryotes et joue un rôle essentiel dans l'homéostasie et la survie cellulaire. Elle est caractérisée par la séquestration de composants cytoplasmiques dans une vacuole à double membrane appelée autophagosome qui fusionne ensuite avec un lysosome afin de dégrader le matériel séquestré. L'autophagie aboutit ainsi à la dégradation lysosomale d'organelles intracellulaires (mitochondries altérées, fragments de ribosomes...) et de complexes protéiques de grande taille. Sa fonction principale est le recyclage des composés du cytoplasme, générant ainsi à la fois des protéines à partir d'acides aminés et de l'énergie essentielle pour maintenir le métabolisme cellulaire, en particulier en cas de rupture d'apport énergétique. Elle prévient également l'accumulation de toxines lors d'un stress métabolique et est un moyen de défense contre les bactéries et les virus (37).

L'autophagie régule la production d'IL-23 au niveau digestif chez des patients présentant une spondyloarthrite (38) et ceci notamment par la régulation de la sécrétion d'IL-1 dans les macrophages (39). L'autophagie contrôle également l'activité de l'inflammasome et donc la

production de cytokines pro-inflammatoires en réponse à un stimulus microbien (37). Dans les suites d'une infection à *C. trachomatis*, l'autophagie au sein de macrophages humains semble permettre une meilleure éradication du pathogène (40). L'autophagie semble donc avoir un rôle central dans la réponse inflammatoire liée au système immunitaire inné.

- **Stress du réticulum endoplasmique**

Le RE rempli de multiples fonctions cellulaires et peut dans certaines conditions présenter un stress qui se traduira par une réponse aux protéines mal repliées (Unfolded protein response, UPR). Celle-ci a pour objectif de restaurer l'homéostasie au sein du RE par divers mécanismes et, en cas d'échec, d'entraîner l'apoptose cellulaire.

Il a été montré que l'UPR induisait notamment une dérégulation cytokinique en faveur de l'IL-23, l'IFN β et l'IL-1 α (41). Or, la protéine HLA-B27 est sujette au mauvais repliement et à l'homodimérisation, favorisant ainsi son accumulation dans le RE à l'origine d'un stress (41). Chez le rat transgénique exprimant HLA-B27 et la microglobuline humaine beta-2 (h β_2 m), modèle murin de spondyloarthrite, l'activation de l'UPR dans les macrophages entraîne la production d'IL-23 (42). Cependant, ceci n'a pas été montré *in vitro* chez des macrophages de patients présentant une spondyloarthrite (35).

Ainsi, les rôles respectifs de l'autophagie et du stress du RE dans la production d'IL-23 par les macrophages restent encore à préciser, en particulier dans l'arthrite réactionnelle à *Chlamydia*.

IV. Hypothèses et objectifs de l'étude

Nous émettons les hypothèses suivantes :

- 1) Les macrophages infectés jouent un rôle dans le transport de *Chlamydia* depuis le tractus génital jusqu'à l'articulation et disséminent l'inflammation liée à *Chlamydia* dans l'organisme de la souris SKG infectée par *C. muridarum*.

- 2) Le TNF α est une cytokine clé dans le développement des manifestations cliniques inflammatoires de l'arthrite réactionnelle à *C. muridarum*.
- 3) Les macrophages infectés présentent une augmentation du stress du RE et/ou de l'autophagie entraînant ainsi une production d'IL-23 au niveau de l'articulation, elle-même à l'origine du tableau clinique d'arthrite réactionnelle à *C. muridarum* chez la souris SKG.

Nous étudierons donc à la fois l'impact de la déplétion en macrophages et du blocage du TNF α sur le déclenchement et la sévérité de l'arthrite réactionnelle mais également l'expression de l'IL-23, des marqueurs d'autophagie et du stress du RE chez les souris SKG infectées par *C. muridarum*.

Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique Cometh (246_UHTA-FRE3405-AB-01).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Modèle murin d'arthrite réactionnelle à *C. muridarum*

- **Infection des souris SKG par *C. muridarum***

Dans ce projet, nous nous sommes intéressés à l'arthrite réactionnelle après infection génitale par *C. muridarum* chez les souris femelles SKG. Nous avons choisis de nous focaliser sur les souris femelles car 85% des femelles SKG contre 50% des mâles SKG présentaient la symptomatologie typique de l'arthrite réactionnelle, probablement à cause du privilège immunitaire des organes génitaux chez les souris mâles (31).

Les souris SKG nous ont été généreusement fournies par le Pr Ranjeny Thomas (Diamantina Institute, University of Queensland, Brisbane, Australie) et les souches de *C. muridarum* (Nigg II VR123, ATCC) par le Pr Kenneth Beagley (University of Queensland, Brisbane, Australie). Les bactéries ont ensuite été cultivées dans le laboratoire de bactériologie du Pr Max Maurin (Institut de Biologie et Pathologie, CHU Grenoble Alpes, France).

Des souris femelles SKG âgées de 6 à 10 semaines ont été infectées par voie vaginale avec 7×10^3 IFUs (inclusion forming units) de *C. muridarum* (43). Vingt microlitres d'une solution de *C. muridarum* à $3,5 \times 10^5$ IFUs/mL ont été déposés avec une pipette, sous anesthésie générale après injection intra-péritonéale (IP) d'un mélange de kétamine et de xylazine (100 mg/kg et 10 mg/kg respectivement). Un priming à la progestérone a été réalisé une semaine avant, par injection sous-cutanée de 2,5 mg d'acétate de médroxyprogestérone (Pfizer) au niveau de la nuque, afin de synchroniser les cycles hormonaux des souris et augmenter leur susceptibilité à l'infection.

A noter qu'afin d'éviter des contaminations croisées, les souris infectées étaient placées dans des cages séparées des souris témoins non infectées et manipulées séparément. Les souris étaient hébergées à la Plateforme de Haute Technologie Animale (CHU Grenoble Alpes, France), dans des conditions correspondant aux conditions SPF (Specific Pathogen Free) australiennes.

- **Production et purification de l'antigène MOMP recombinant de *C. muridarum***

Les protéines recombinantes MOMP ont été produites et purifiées selon un protocole établi par l'équipe du Pr Kenneth Beagley (44). Nous avons transformé des *Escherichia coli* compétentes BL21 (DE3) avec le plasmide MBP-MOMP codant pour la protéine MOMP de *C. muridarum* fusionnée à une étiquette peptidique liant le maltose (MBP), plasmide généreusement fourni par le Dr Charles Armitage (University of Queensland, Brisbane, Australie). Les bactéries transformées avec le plasmide MBP-MOMP ont ensuite été mises en culture au 1/100^{ème} sur la nuit dans un milieu de culture Luria Broth avec de l'ampicilline (antibiotique de sélection codé par le plasmide), à 37 °C. Dans les clones ainsi obtenus, la production de la protéine recombinante MBP-MOMP a été induite par l'ajout d'1 mM d'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) et incubation pendant 3 h à 37 °C. L'IPTG est utilisé pour induire la transcription d'ADN sous le contrôle d'un promoteur lac. Les membranes des bactéries contenant la protéine d'intérêt ont été lysées par sonication. Après plusieurs centrifugations et lavages au PBS (tampon phosphate salin), ainsi qu'une incubation avec un cocktail d'inhibiteur de protéase pendant 2 h à 37 °C, les protéines MBP-MOMP ont été purifiées par dialyse. Cinq dialyses de 2 h à 4 °C ont été réalisées dans un boudin de dialyse retenant les molécules de plus de 50 kDa, placé successivement dans une solution d'urée 4M, d'urée 2M et à trois reprises dans du PBS, puis aliquoté et placé à -20°C.

- **Western blot de l'antigène MOMP recombinant de *C. muridarum***

La concentration protéique du produit de dialyse a été mesurée avec un spectrophotomètre (DU 640, Beckman) par la méthode de Bradford. La présence de l'antigène recombiné MBP-MOMP d'un poids moléculaire de 81kDa (MBP 42kDa et MOMP 39kDa) a été confirmée par Western Blot. Électrophorèse sur gel à 10% d'acrylamide, anticorps primaire : sérum de mouton anti-Cmu MOMP au 500^{ème} (fourni par le Dr Charles Armitage, Diamantina Institute, University of Queensland, Brisbane, Australie) et secondaire : anticorps de lapin anti-IgG de

chèvre marqué à l'HRP (Peroxydase de Raifort) au 50000^{ème} (fourni par le Dr Bertrand Favier, GREPI).

- **Vérification de la séroconversion à *C. muridarum***

Afin de vérifier l'efficacité de l'infection, la séroconversion à *C. muridarum* a été recherchée 12 semaines après infection. Le jour de l'euthanasie des souris, le sang intracardiaque a été prélevé sous anesthésie générale. Chaque échantillon de sang a été collecté dans un eppendorf stérile non hépariné, conservé pendant 1 h à température ambiante puis toute la nuit à 4 °C. Le lendemain, le sérum a été prélevé après une centrifugation à 1000 g pendant 20 min à 4 °C et a ensuite été stocké à -20 °C. La présence d'IgG anti-Chlamydia MOMP dans chaque sérum, ou séroconversion, a ensuite été contrôlée par un test ELISA (Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay)(43).

Après incubation sur la nuit dans une plaque 96 puits NUNC MaxiSorp (Thermo Scientific) de 2 µg/puit d'antigènes MBP-MOMP dilué dans du tampon de coating (tampon bicarbonate), chaque échantillon de sérum a été incubé à une dilution différente par puit (au 200^{ème}, 400^{ème}, 800^{ème}, 1600^{ème}, 3200^{ème}, 6400^{ème}, 12800^{ème}, 25600^{ème}, et 51200^{ème}) puis conjugué avec 4 anticorps secondaires dilués au 6000^{ème} dans du PBST (PBS 0.05% v/v Tween 20): anticorps de chèvre anti-IgA (Thermo Scientific), anti-IgG (Jackson ImmunoResearch), anti-IgG1 (Thermo Scientific) et anti-IgG2a (Life Technologies) de souris conjugués à la peroxidase de raifort (HRP). La révélation a été effectuée par ajout de tétraméthylbenzidine (TMB, Invitrogen) et incubation pendant 10 minutes puis arrêt de la réaction avec de l'acide sulfurique 1 N. La lecture de la densité optique de chaque puit à 450 nm a été effectuée avec un spectrophotomètre Multiskan GO (Thermo Scientific).

Les titres des anticorps anti-MOMP des souris infectées ainsi obtenus ont été comparés à ceux du groupe contrôle (souris SKG non infectées). Le titre de séroconversion retenu pour chaque souris était la plus importante dilution de sérum pour laquelle la densité optique obtenue était supérieure à la moyenne des blancs additionnée de trois fois l'écart-type des blancs.

- **Évaluation clinique et histologique de l'inflammation tissulaire et articulaire**

Sur le plan clinique, la tuméfaction des pattes a été évaluée de manière hebdomadaire pendant 12 semaines par la mesure de l'index d'inflammation des articulations des pattes (gonflement par rapport à J0) au pied à coulisse digital. Ces mesures ont été effectuées au niveau des pattes avant et arrière par le même opérateur afin de garantir une meilleure reproductibilité et éviter un biais inter-opérateur.

Sur le plan histologique, les poignets et chevilles ont été prélevés lors de l'euthanasie des souris à 12 semaines après infection puis mis dans du formol à 10% v/v pour ensuite être décalcifiés puis inclus en paraffine. Des coupes de 3µm d'épaisseur ont été réalisées puis colorées à l'éosine et l'hématoxyline. L'évaluation de l'infiltration inflammatoire était réalisée par deux opérateurs indépendants au microscope optique au grossissement x2,5 en aveugle du traitement selon un score histologique allant de 0 (absence d'inflammation) à 5 (inflammation majeure) (cf annexe 1). Le score retenu pour chaque articulation était la moyenne des scores obtenus par les 2 opérateurs.

II. Évaluation du rôle du macrophage

- **Déplétion macrophagique**

La déplétion macrophagique a été effectuée par injection de liposomes de clodronate (Nico von Rooijen, Clodronate Liposome) en intra-péritonéal, à compter du jour de l'infection. Après une dose de charge initiale de 2 mg pour 20 g de souris (soit 400 µL pour 20 g de souris d'une solution de liposomes de clodronate à 5 mg/mL), les souris SKG ont été traitées de manière hebdomadaire par injection de 1 mg pour 20 g de souris (soit 200 µL pour 20 g de souris de la même solution)(45). Le groupe témoin a été injecté avec des liposomes de PBS, selon un protocole identique.

- **Analyse de la déplétion macrophagique par cytométrie en flux**

La déplétion des monocytes a été contrôlée par cytométrie en flux sur sang total obtenu par caudectomie, 48h après injection de liposomes de clodronate (ou liposomes de PBS pour les souris contrôle). Nous avons utilisé comme anticorps primaire un anticorps anti-CD115 de souris (IgG2a kappa de rat, eBioscience), protéine membranaire qui est le récepteur du M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor), cytokine contrôlant la production, différenciation et fonction des monocytes (46). L'isotype était une immunoglobuline IgG2a de rat non spécifique (eBioscience). L'anticorps secondaire était un anticorps de chèvre anti-IgG de rat couplé à la phycoérythrine (Santa Cruz Biotechnology).

- **Évaluation clinique et histologique de l'arthrite réactionnelle à *C. muridarum* après déplétion macrophagique**

L'inflammation au niveau des pattes a tout d'abord été évaluée sur le plan clinique, comme décrit précédemment, en mesurant l'index d'inflammation des pattes avec un pied à coulisse digital de manière hebdomadaire dans le groupe de souris traitées par déplétion macrophagique et le groupe témoin (traité par PBS).

Une analyse histologique a également été effectuée afin de mesurer l'inflammation tissulaire au niveau des poignets, des chevilles et de la peau à partir des prélèvements tissulaires réalisés lors de l'euthanasie des souris, 12 semaines après infection.

III. Évaluation du rôle du TNF α

- **Blocage du TNF α**

Afin d'évaluer l'importance du TNF α dans la physiopathologie de l'arthrite réactionnelle, les souris SKG infectées par *C. muridarum* ont été traitées par des anticorps anti-TNF de souris. Nous avons constitué 6 groupes de souris, deux groupes de souris traités des semaines 0 à 12 soit dès l'infection, deux groupes traités des semaines 5 à 12 soit à l'apparition de l'arthrite et deux groupes contrôle. En effet, nous avons utilisé deux anti-TNF différents : la version

murine du certolizumab pegol à la dose de 2mg/kg/semaine en injection intra-péritonéale et l'étanercept à la dose de 4,5mg/kg/3jours également en injection intra-péritonéale. Les groupes contrôle étaient respectivement injectés en intra-péritonéal par du PBS stérile toutes les semaines ou tous les 3 jours.

- **Évaluation clinique et histologique de l'arthrite réactionnelle à *C. muridarum* lors du blocage du TNF α**

Comme décrit précédemment, nous avons procédé à une évaluation clinique en mesurant l'index d'inflammation des pattes avec un pied à coulisse digital de manière hebdomadaire dans les deux groupes de souris traitées par anti-TNF α (certolizumab pegol ou etanercept) et les deux groupes contrôle correspondants traités par PBS.

L'inflammation tissulaire a été objectivée par analyse histologique des prélèvements tissulaires réalisés à la semaine 12, lors de l'euthanasie des 4 groupes de souris.

IV. Autophagie, stress du réticulum endoplasmique et IL-23

Les tractus génitaux et pattes arrière de souris SKG infectées et contrôles ont été prélevés après euthanasie des souris, 1 et 5 semaines après l'infection. L'ARN_m (acide ribonucléique messager) a été extrait de ces échantillons en vue de mesurer par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel après une étape de transcription inverse (RT-qPCR) l'autophagie, le stress du RE et la production d'IL-23 dans ces différents organes.

Les échantillons tissulaires prélevés ont été placés dans des tubes stériles contenant des billes CK14 (Bertin Instruments) pour les tissus mous et CK28 pour les articulations, plongés immédiatement dans de l'azote liquide puis stockés à -80°C. L'ARN a ensuite été extrait grâce à la technique d'extraction au Trizol® (TRIzol Reagent, Thermo Fisher Scientific). Du Trizol® est ajouté au prélèvement pour permettre la lyse cellulaire en dissociant tous les composants cellulaires et en inhibant par la même occasion l'action de RNAses et DNAses intracellulaires. Le tissu est ensuite homogénéisé puis le chloroforme est ajouté pour séparer

le lysat en plusieurs phases : phase organique (protéines et ADN) et phase aqueuse (ARN). Après une centrifugation à 4°C la phase aqueuse contenant l'ARN est récupérée. De l'isopropanol 100% est ajouté afin de permettre la précipitation des acides nucléiques. Après une nouvelle centrifugation, le culot d'ARN est lavé avec de l'éthanol 75% puis laissé à l'air libre pour sécher pendant 10 minutes puis resuspendu. Enfin l'échantillon est chauffé à 60°C pendant 15 minutes pour solubiliser l'ARN. Un traitement par DNase est effectué (Rapidout DNA removal kit (K2981), ThermoFisher Scientific) consistant en l'ajout d'une DNase et son tampon dans l'échantillon. L'enzyme est ensuite activée grâce à une incubation à 37°C pendant 30 minutes. Un agent chélateur de la DNase est ensuite ajouté puis l'ensemble est centrifugé. Enfin le surnageant contenant uniquement l'ARN est placé dans un eppendorf stérile.

La transcription inverse est ensuite effectuée pour obtenir de l'ADN complémentaire et un traitement par RNase est effectué à la fin de la transcription inverse afin de supprimer l'ARN résiduel (SuperScript III First-Strand Synthesis Super Mix for qRT-PCR, Invitrogen).

La RT-qPCR (Stratagene® Mx3005P, Agilent Technologies) a été effectuée en utilisant le kit Quantitec® SYBR® Green PCR (Quiagen) et des amorces permettant de mettre en évidence HSPA5 pour le stress du RE, TGTP1 pour l'autophagie et l'IL-23A, la sous-unité alpha p19 spécifique de l'IL23. Les résultats ont été normalisés sur l'expression de deux gènes de ménage : HPRT1 et RPL32. L'analyse des résultats d'amplification a été effectuée par quantification relative entre les souris SKG contrôles et infectées en utilisant la méthode $\Delta\Delta Ct$.

Une corrélation entre l'IL-23, HSPA5 et TGTP1 a été recherchée afin de clarifier les rôles du stress du RE et de l'autophagie sur la production d'IL-23.

V. Statistiques

La normalité de la distribution a été évaluée par le test de Kolmogorov-Smirnov. Le test t de Student et l'analyse de la variance (ANOVA), respectivement, ont été utilisés pour évaluer la différence quantitative significative entre 2 ou 3 groupes pour des données de distribution normale, et les tests de Mann-Whitney et de Kruskal-Wallis, respectivement, ont été utilisés pour des distributions non-normales de données. Une différence statistiquement significative était définie par une p value <0,05. Le nombre d'animaux nécessaire pour atteindre la puissance statistique était estimé à partir des expériences précédentes. L'analyse statistique a été réalisées à l'aide du logiciel Graph pad Prism®.

VI. Plan expérimental

L'étude s'est déroulée sur 13 semaines et a intéressé 114 souris SKG. Nous avons procédé à plusieurs expériences afin de répondre à nos différentes hypothèses (Figure 3):

- 1) Expérience 1 : Confirmation de la survenue d'arthrite réactionnelle chez la souris SKG après infection à *C. muridarum*. Deux groupes de 6 souris, un groupe de souris SKG infectées par *C. muridarum* et un groupe contrôle de souris SKG non infectées.
- 2) Expérience 2 : Évaluation du rôle du macrophage. Deux groupes de 7 souris SKG infectées par *C. muridarum*, un groupe déplété en macrophages par injection de clodronate et un groupe injecté avec du PBS, ainsi qu'un groupe contrôle de 8 souris SKG non infectées.
- 3) Expérience 3a : Évaluation du rôle du TNF α par blocage avec un anticorps monoclonal. Quatre groupes de souris SKG infectées par *C. muridarum*, un groupe traité par certolizumab pegol des semaines 0 à 12 (n=10) et son groupe contrôle injecté avec du PBS (n=6), un groupe traité par certolizumab pegol des semaines 5 à 12 (n=10) et son groupe contrôle injecté avec du PBS (n=6).

- 4) Expérience 3b : Évaluation du rôle du TNF α par blocage avec un récepteur soluble. Quatre groupes de souris SKG infecté par *C. muridarum*, un groupe traité par étanercept des semaines 0 à 12 (n=10) et son groupe contrôle injecté avec du PBS (n=6), un groupe traité par étanercept des semaines 5 à 12 (n=10) et son groupe contrôle injecté avec du PBS (n=6).
- 5) Expérience 4 : Évaluation de l'autophagie, du stress du RE et de l'IL-23. Prélèvements tissulaires chez 4 souris SKG infectées par *C. muridarum* et 4 souris contrôles, aux semaines 1 et 5 (n=16).

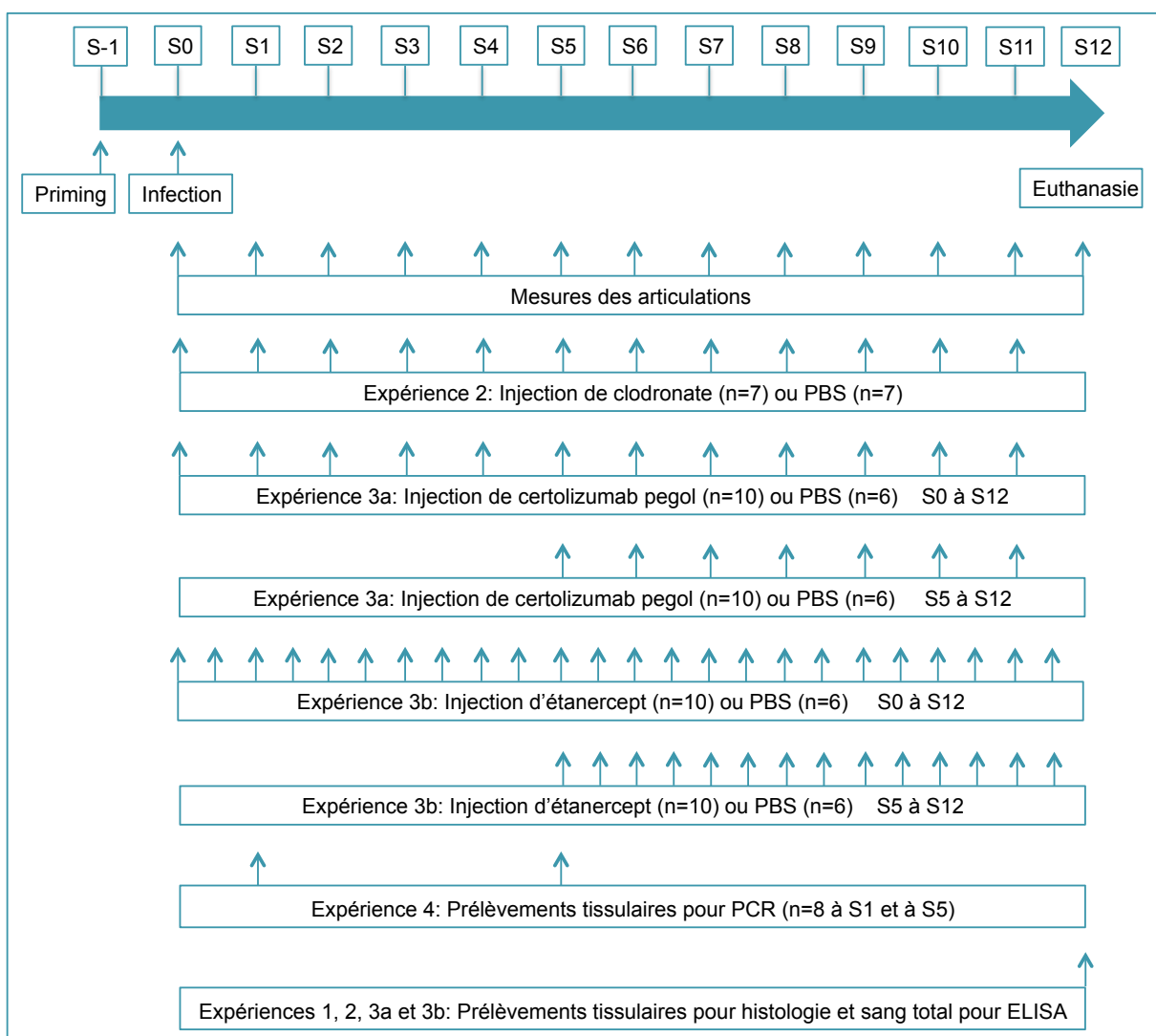


Figure 3 : Plan expérimental. L'ensemble des actes effectués intéressent toutes les souris des expériences 1 à 4, sauf si spécifié autrement.

RÉSULTATS

I. Modèle murin d'arthrite réactionnelle à *C. muridarum*

- **Confirmation de l'infection à *C. muridarum***

Nous avons vérifié par ELISA la séroconversion à *C. muridarum* chez les souris SKG infectées et les souris contrôle non infectées. Ceci a permis de confirmer l'infection des souris SKG avec un titre moyen d'anticorps anti-Cmu MOMP de 24686 ± 14035 ($p < 0,05$) par rapport au groupe contrôle (Figure 4). Nous avons procédé de même pour l'ensemble des expériences, avec à chaque fois une séroconversion des souris SKG infectées.

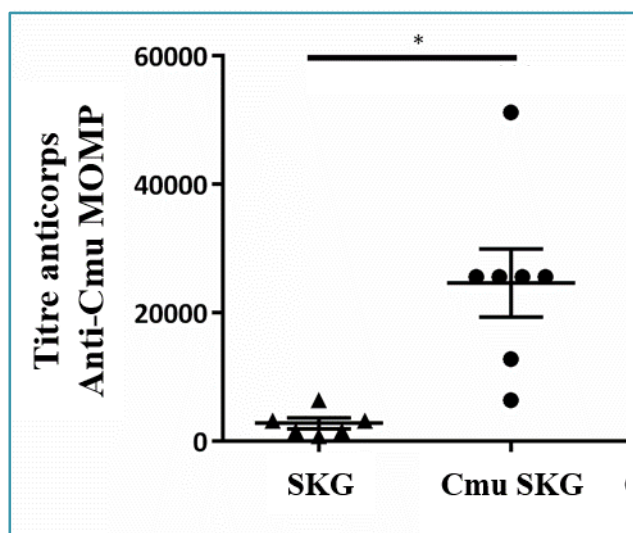


Figure 4 : Titre des anticorps anti-Cmu MOMP analysé par ELISA à 12 semaines de l'infection par *C. muridarum* des souris infectées, comparés au groupe contrôle. SKG : souris SKG non infectée titre moyen 2800, Cmu SKG: souris SKG infectées, titre moyen 24686. Analyse statistique par test de Kruskal Wallis.* $p < 0,05$. 6 souris par groupe.

- **Seules les souris SKG infectées par *C. muridarum* présentent un phénotype clinique et histologique d'arthrite réactionnelle**

Les mesures des pattes arrière et avant de manière hebdomadaire chez les souris contrôles et infectées ont permis de constater l'apparition d'arthrites dans le groupe des souris infectées à partir de la cinquième semaine post-infection, ce qui respecte le schéma habituel d'apparition de l'arthrite dans les études similaires (31). Le nombre d'arthrites ainsi que leurs tailles au cours des semaines suivantes ont augmenté pour au final correspondre à un tableau de

polyarthrite asymétrique, évocateur d'une arthrite réactionnelle. Le groupe contrôle n'a pas présenté d'arthrite tout au long des 12 semaines.

Nous avons constaté que l'apparition de ces tuméfactions était corrélée à la présence d'une inflammation tissulaire. L'analyse histologique a en effet permis d'observer des infiltrats inflammatoires au niveau des pattes arrière et pattes avant (Figure 5).

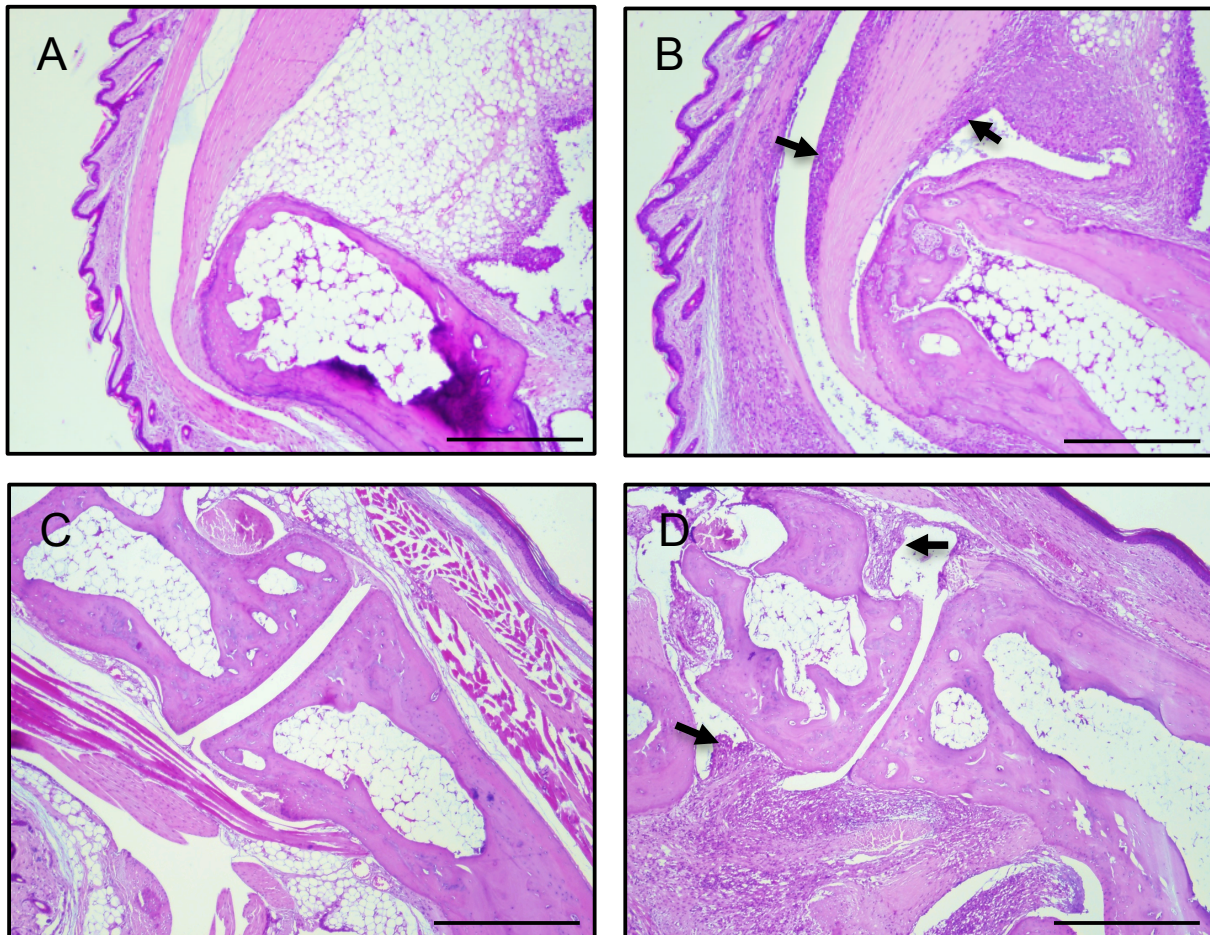


Figure 5 : Coupes histologiques des chevilles et poignets de souris SKG infectées par *C. muridarum* et des souris contrôles. Cheville (A) et poignet (C) de souris SKG contrôle montrant l'absence d'inflammation. Cheville (B) et poignet (D) de souris SKG infectée montrant un important infiltrat inflammatoire des tissus mous (flèches). Coloration à l'hématoxyline et éosine, grossissement x4, barre=500µm.

Seules les souris infectées présentaient ces lésions histologiques. Les moyennes des scores histologiques des pattes arrière étaient respectivement de 4,5 et 0 pour les souris SKG infectées et les contrôles, un score de 4 correspondant à un infiltrat inflammatoire intéressant les tissus mous, l'enthèse et les fascias (score histologique en annexe).

Ceci permet donc de confirmer que l'infection à *C. muridarum* chez la souris SKG induit bien un tableau clinique et histologique évocateur d'une arthrite réactionnelle.

II. Évaluation du rôle du macrophage

- **Confirmation de la déplétion en macrophages**

La recherche de monocytes dans le sang total prélevé par caudectomie, 48h après une injection de liposomes de clodronate ou PBS, a été effectuée par cytométrie en flux.

La fluorescence moyenne de la population marquée avec l'anticorps anti-CD115 était de 48075 (Figure 6) contre 13752 pour le contrôle isotypique (soit 3,5 fois plus) chez une souris du groupe traité avec des liposomes de PBS. Un marquage spécifique des monocytes/macrophages peut donc être mis en évidence dans le groupe non déplété.

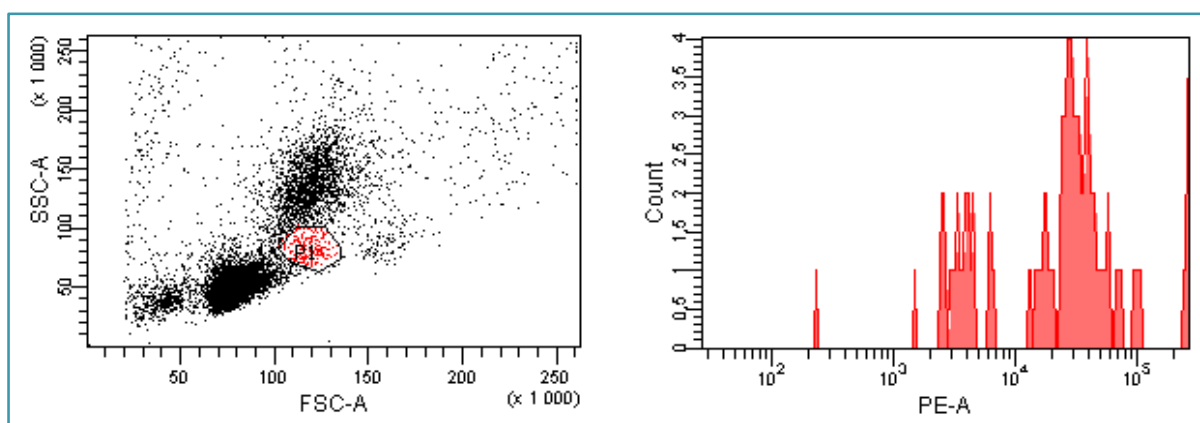


Figure 6 : Marquage des monocytes chez une souris traitée par liposomes de PBS. Identification des monocytes dans la population globale, à gauche (P1), et mesure de la fluorescence de cette population cible (P1), à droite, avec fluorescence moyenne à 48075.

En revanche, la fluorescence moyenne était seulement de 11982 pour la population marquée avec l'anticorps anti-CD115 chez une souris traitée par liposomes de clodronate (Figure 7), contre 9031 pour le contrôle isotypique (soit seulement 1,33 fois de plus). Le marquage spécifique des monocytes/macrophages dans le groupe traité avec des liposomes de clodronate ne peut être mis en évidence contrairement à ce qui est observé dans le groupe

traité avec des liposomes de PBS. L'efficacité de la déplétion macrophagique dans le groupe traité avec des liposomes de clodronate a ainsi été confirmée.

Des résultats similaires ont été obtenus sur 2 autres souris par groupe.

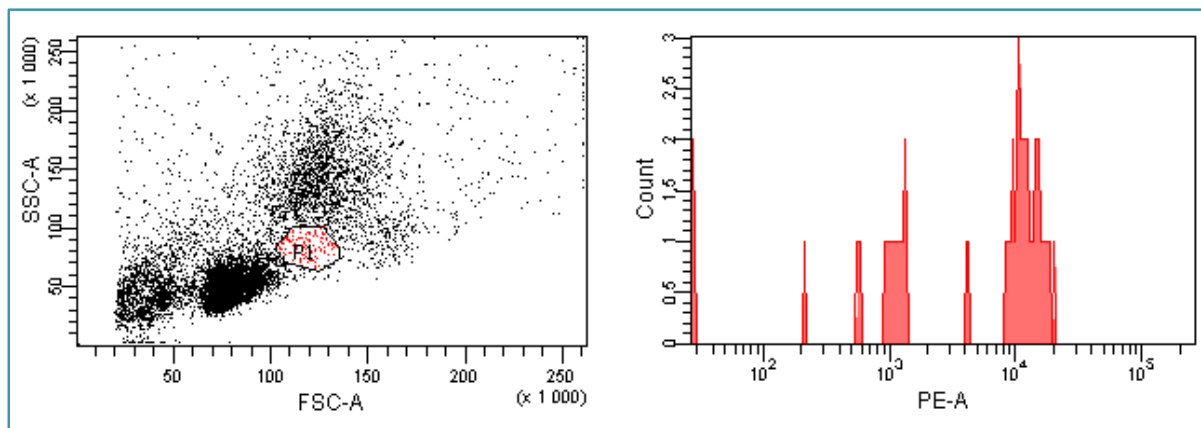


Figure 7 : Marquage des monocytes chez une souris traitée par liposomes de clodronate. Identification des monocytes dans la population globale, à gauche (P1), et mesure de la fluorescence de cette population cible (P1), à droite, avec une fluorescence moyenne à 11982.

- **La déplétion macrophagique prévient l'apparition de l'arthrite réactionnelle chez la souris SKG infectée par *C. muridarum***

Les mesures hebdomadaires des pattes arrière et avant chez les souris des groupes traités par liposomes de PBS ou clodronate ont permis de mettre en évidence l'apparition d'arthrites seulement dans le groupe traité par PBS, avec respectivement 72% des souris infectées symptomatiques contre 0%. Les premières tuméfactions articulaires sont apparues comme précédemment dès la semaine 5, seulement dans le groupe traité par PBS. L'index d'inflammation des pattes arrière, soit une variation de la taille des pattes arrière par rapport au J0, a augmenté de manière significative dans le groupe traité par PBS par rapport au groupe traité par clodronate à partir de la semaine 5 avec une variation de $0,22 \text{ mm} \pm 0,2247$ contre $0,001 \text{ mm} \pm 0,0927$ ($p < 0.01$), et ce d'autant plus à la semaine 12 avec une variation de $0,44 \text{ mm} \pm 0,3101$ contre $0,03 \text{ mm} \pm 0,1194$ ($p < 0.0001$) (Figure 8).

Les souris traitées par clodronate n'ont pas présenté d'arthrite au cours des 12 semaines de l'expérience, présentant une taille relativement constante des pattes arrière et donc un index

d'inflammation des pattes arrière stable (Figure 8), suggérant un rôle du macrophage dans l'apparition de l'arthrite réactionnelle à *C. muridarum* chez la souris SKG.

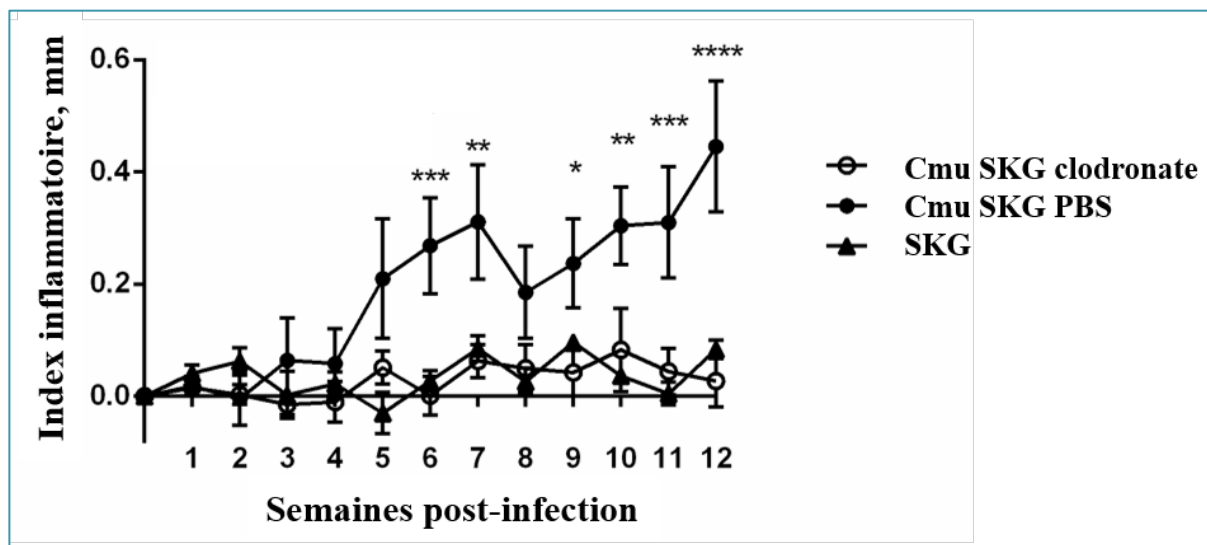


Figure 8 : Index inflammatoire des chevilles au cours des 12 semaines suivant l'infection par *C. muridarum* des souris SKG traitées par PBS ou par clodronate en mm \pm SEM. SKG : 8 souris SKG non infectées contrôle, Cmu SKG PBS lip : 7 souris SKG infectées et traitées par PBS, Cmu SKG Clodro lip : 7 souris SKG infectées et traitées par clodronate. Évaluation statistique par analyse de variance à deux facteurs et test post-hoc de Tukey. Entre les groupes Cmu SKG PBS lip et Cmu SKG clodro lip pour les semaines 6 et 11 post-infection : * $p < 0.001$, semaines 7 et 10 : ** $p < 0.01$; semaine 9 : * $p < 0.05$; semaine 12 : **** $p < 0.0001$.**

Ces résultats cliniques ont été confirmés par l'analyse histologique des pattes arrière, pattes avant et de la peau (prélèvement des oreilles). Nous avons en effet observé davantage d'infiltrats inflammatoires chez les souris infectées et traitées par liposomes de PBS que chez les souris infectées et traitées par liposomes de clodronate (Figure 9).

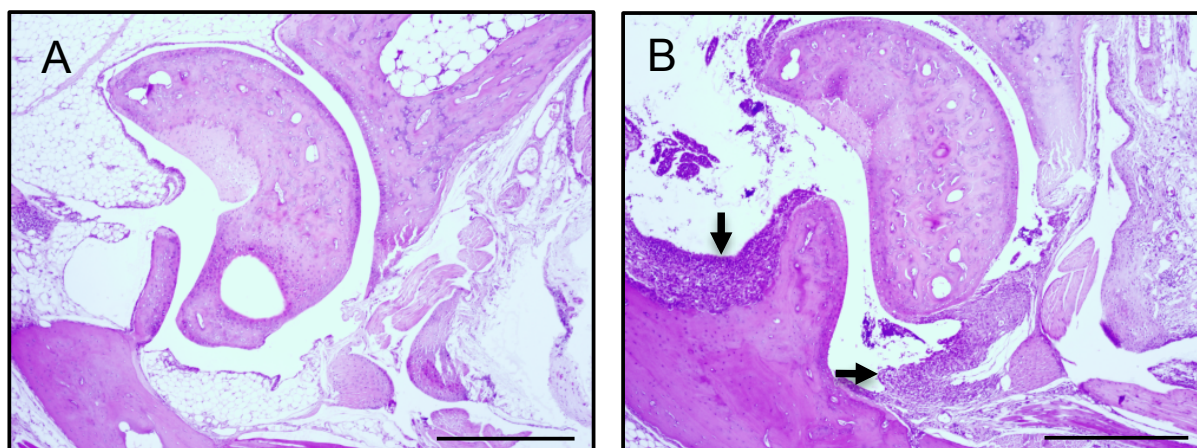


Figure 9 : Coupes histologiques de cheville d'une souris SKG infectée par *C. muridarum* traitée par clodronate (A) et par PBS (B). Cheville (A) d'une souris SKG infectée et traitée par clodronate montrant l'absence d'inflammation. Cheville (B) d'une souris SKG infectée traitée par PBS montrant un important infiltrat inflammatoire (flèches). Coloration à l'hématoxyline et éosine, grossissement x4, barre=500µm.

La moyenne des scores histologiques d'inflammation était de $2,70 \pm 0,50$ pour les souris traitées par PBS et $1 \pm 0,35$ pour les souris traitées par clodronate ($p < 0,05$) au niveau des chevilles et de $0,90 \pm 0,20$ pour les souris traitées par PBS et $0,36 \pm 0,38$ pour les souris traitées par clodronate ($p < 0,05$) au niveau de la peau (Figure 10). Il n'y avait pas de différence statistiquement significative au niveau des poignets, ce qui est probablement lié au fait que l'arthrite réactionnelle à *C. muridarum* chez la souris SKG touche préférentiellement les articulations des chevilles.

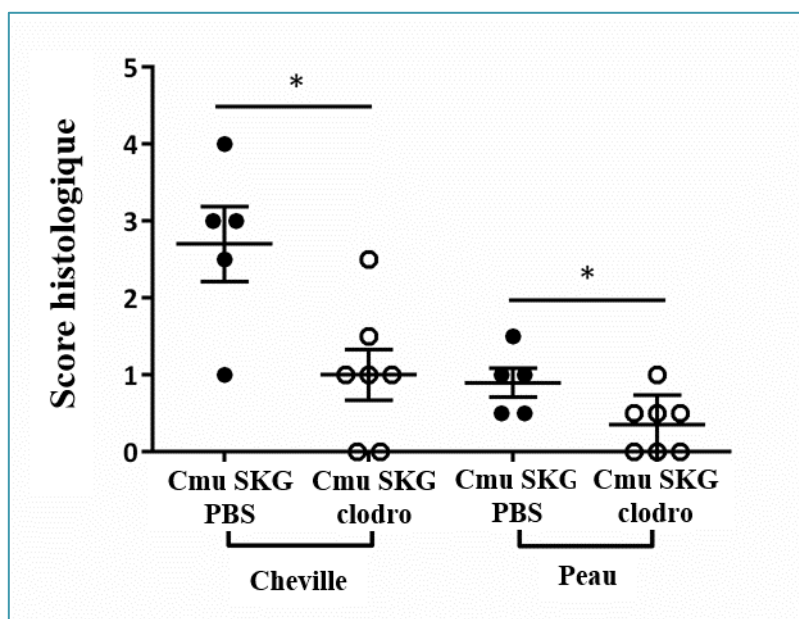


Figure 10 : Score histologique d'inflammation des chevilles et de la peau 12 semaines après infection par *C. muridarum* chez les souris SKG traitées par clodronate ou PBS. Cmu SKG PBS : souris SKG infectées traitées par liposomes de PBS. Cmu SKG clodro : souris SKG infectées traitées par liposomes de clodronate. Score développé en annexe 1. Chaque symbole représente une souris. Résultats exprimés en moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$ avec test de Student.

III. Évaluation du rôle du TNF α

Le blocage du TNF α , que ça soit par récepteur soluble ou anticorps monoclonal, est efficace à la fois pour la prévention et pour le traitement de l'arthrite réactionnelle. En effet, les souris SKG infectées traitées préventivement (semaines 0 à 12) par des anticorps de souris anti-TNF α , que cela soit par certolizumab pegol ou étanercept, ont moins présenté d'arthrite clinique ou histologique, contrairement aux groupes contrôles. Le traitement curatif (semaines 5 à 12) a également permis une amélioration de l'arthrite.

- **Le certolizumab est efficace comme traitement préventif et curatif de l'arthrite réactionnelle à *C. muridarum* chez la souris SKG**

Dans les groupes traités par certolizumab pegol, l'index inflammatoire moyen à la semaine 12 était de $0,14\text{mm} \pm 0,346$ pour le groupe traité des semaines 0 à 12 et de $0,12\text{mm} \pm 0,149$ pour le groupe traité des semaines 5 à 12, comparativement à $0,31\text{mm} \pm 0,237$ pour le groupe contrôle (p values respectivement $<0,0001$ et $<0,01$, Figure 11). Il existait une différence statistiquement significative à partir de la semaine 8 entre le groupe contrôle et le groupe traité des semaines 0 à 12, et à partir de la semaine 10 entre le groupe contrôle et le groupe traité des semaines 5 à 12, avec donc une moins bonne efficacité du traitement curatif.

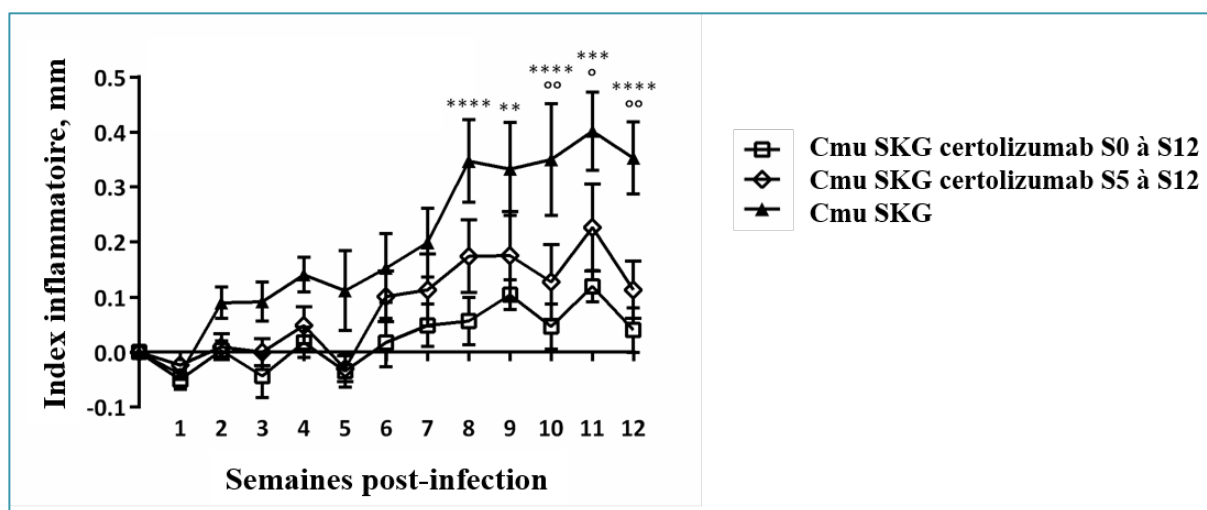


Figure 11 : Index inflammatoire des chevilles au cours des 12 semaines suivant l'infection par *C. muridarum* des souris SKG infectées et traitées par PBS ou par certolizumab pegol en $\text{mm} \pm \text{SEM}$. Cmü SKG : souris SKG infectées traitées par PBS, Cmü SKG certolizumab S0-S12: souris SKG infectées traitées par certolizumab pegol des semaines 0 à 12, Cmü SKG certolizumab S5-S12: souris SKG infectées traitées par certolizumab pegol des semaines 5 à 12. Évaluation statistique par analyse de variance à deux facteurs et test post-hoc de Tukey. * p values pour la différence entre Cmü SKG et Cmü SKG certolizumab S0-S12 * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ * $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. ° p values pour la différence entre Cmü SKG et Cmü SKG certolizumab S5-S12 ° $p < 0.05$ °° $p < 0.01$.**

L'analyse histologique a confirmé ces résultats avec davantage d'infiltrats cellulaires dans le groupe contrôle par rapport au groupe traité des semaines 0 à 12 (Figure 12). Les scores histologiques moyens respectifs étaient en effet de $2,89 \pm 2,19$ et $0,94 \pm 1,45$ ($p < 0,05$). Il n'y avait pas de différence significative pour le groupe traité des semaines 0 à 5, avec un score histologique moyen de $1,95 \pm 1,98$ (Figure 13).

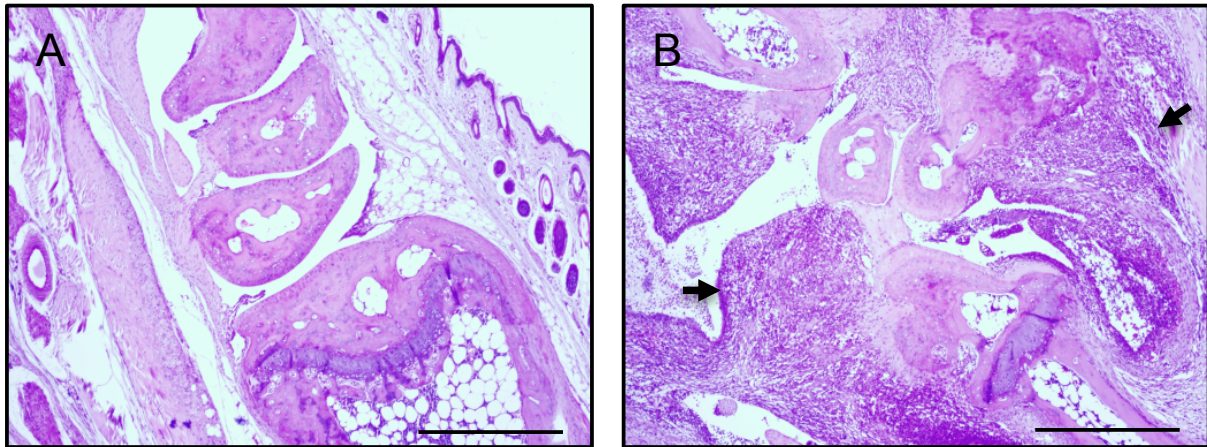


Figure 12 : Coupes histologiques de poignet d'une souris SKG infectée par *C. muridarum* traitée par certolizumab pegol (A) et par PBS (B). Poignet (A) d'une souris SKG infectée et traitée par certolizumab pegol montrant l'absence d'inflammation. Poignet (B) d'une souris SKG infectée traitée par PBS montrant un important infiltrat inflammatoire (flèches). Coloration à l'hématoxyline et éosine, grossissement x4, barre=500µm.

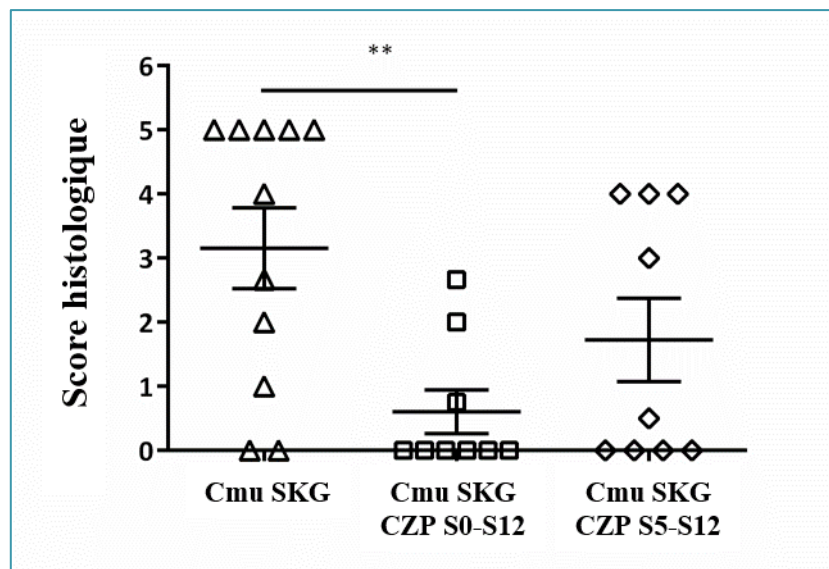


Figure 13 : Score histologique d'inflammation des chevilles 12 semaines après infection par *C. muridarum* chez les souris traitées par certolizumab pegol. Cmu SKG : souris SKG infectées contrôle. Cmu SKG CTZ S0-S12 : souris SKG infectées traitées par certolizumab pegol des semaines 0 à 12. Cmu SKG CTZ S5-S12 : souris SKG infectées traitées par certolizumab pegol des semaines 5 à 12. Score développé en annexe 1. Chaque symbole représente une souris. Résultats exprimés en moyenne \pm SEM. ** $p < 0,01$ avec test de Mann-Whitney.

- **L'étanercept est efficace comme traitement préventif et curatif de l'arthrite réactionnelle à *C. muridarum* chez la souris SKG**

Dans les groupes traités par étanercept, l'index inflammatoire moyen à la semaine 12 était de $0,17\text{mm} \pm 0,077$ pour le groupe traité des semaines 0 à 12 contre $0,24\text{mm} \pm 0,182$ pour le groupe contrôle (p value $< 0,01$, Figure 14). Contrairement à ce qui était observé pour le

certolizumab pegol, le groupe traité des semaines 5 à 12 présentait une différence statistiquement plus importante avec le groupe contrôle avec un index d'inflammation moyen de $0,0002\text{mm} \pm 0,137$ (p value $<0,0001$) à la semaine 12. Cette différence était significative dès la semaine 7 pour le groupe traité des semaines 5 à 12, et seulement pour les semaines 10 et 12 pour le groupe traité des semaines 0 à 12. L'efficacité de l'éтанercept était donc meilleure en curatif qu'en préventif.

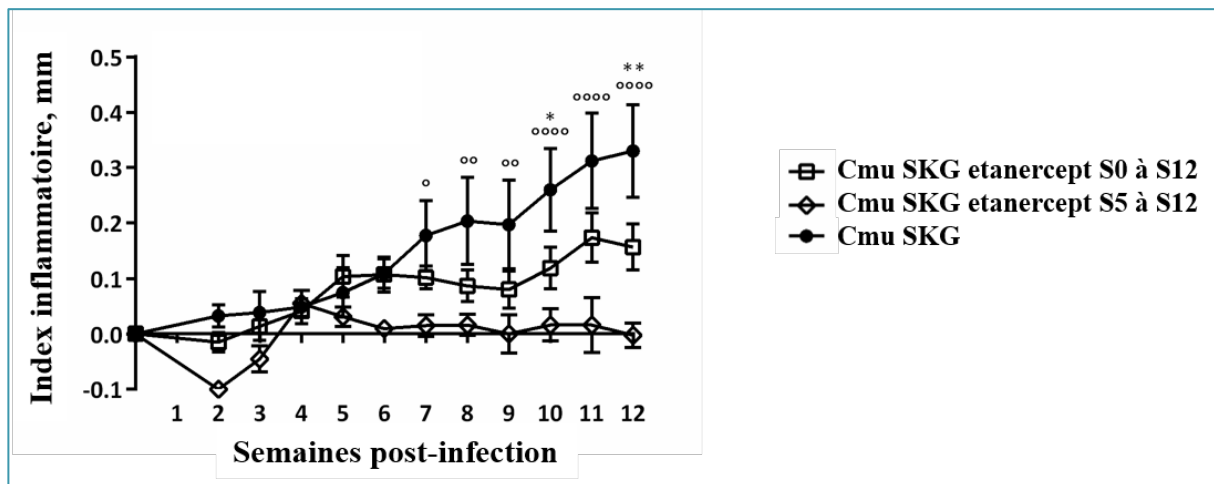


Figure 14 : Index inflammatoire des chevilles au cours des 12 semaines suivant l'infection par *C. muridarum* des souris SKG infectées et traitées par PBS ou par étanercept en $\text{mm} \pm \text{SEM}$. Cmu SKG : souris SKG infectées traitées par PBS, Cmu SKG étanercept S0-S12: souris SKG infectées traitées par étanercept des semaines 0 à 12, Cmu SKG étanercept S5-S12: souris SKG infectées traitées par étanercept des semaines 5 à 12. Évaluation statistique par analyse de variance à deux facteurs et test post-hoc de Tukey. * p values pour la différence entre Cmu SKG et Cmu SKG étanercept S0-S12 * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. ° p values pour la différence entre Cmu SKG et Cmu SKG étanercept S5-S12 ° $p < 0,05$, °° $p < 0,01$, °°°° $p < 0,0001$.

L'analyse histologique a confirmé ces résultats cliniques (Figure 15). Le score histologique moyen des souris contrôles était de $1,6 \pm 2,36$ contre $1,33 \pm 1,41$ pour les souris traitées des semaines 0 à 12 (p value $<0,01$) et $0,25 \pm 0,70$ pour les souris traités des semaines 5 à 12 (p value $<0,01$, Figure 16).

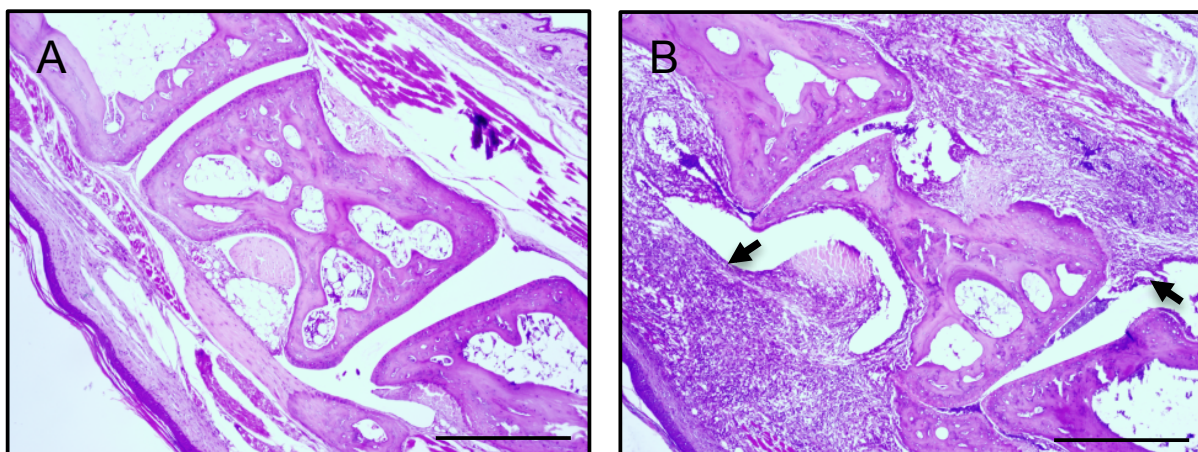


Figure 15 : Coupes histologiques de tarse d'une souris SKG infectée par *C. muridarum* traitée par étanercept (A) et par PBS (B). Tarse (A) d'une souris SKG infectée et traitée par étanercept montrant l'absence d'inflammation. Tarse (B) d'une souris SKG infectée traitée par PBS montrant un important infiltrat inflammatoire (flèches). Coloration à l'hématoxyline et éosine, grossissement x4, barre=500µm.

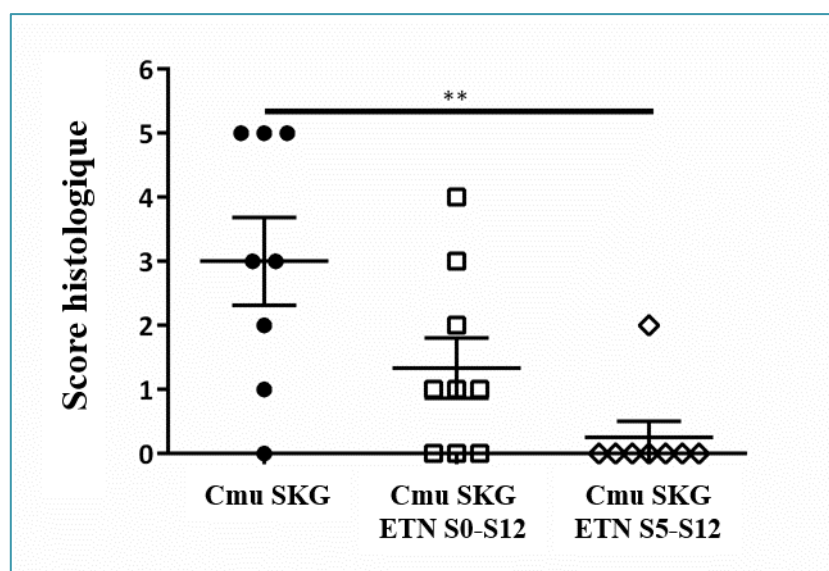


Figure 16 : Score histologique d'inflammation des chevilles 12 semaines après infection par *C. muridarum* chez les souris traitées par étanercept. Cmu SKG : souris SKG infectées contrôle. Cmu SKG ETN S0-S12 : souris SKG infectées traitées par étanercept des semaines 0 à 12. Cmu SKG ETN S5-S12 : souris SKG infectées traitées par étanercept des semaines 5 à 12. Score développé en annexe 1. Chaque symbole représente une souris. Résultats exprimés en moyenne \pm SEM. ** $p < 0,01$ avec test de Mann-Whitney.

IV. Autophagie, stress du réticulum endoplasmique et IL-23

- **La production d'IL-23 est corrélée à une augmentation de l'autophagie dans le tractus génital des souris SKG infectée par *C. muridarum***

L'analyse par RT-qPCR de l'expression des ARN_m de HSPA5, TGTP1 et IL-23A a mis en évidence une augmentation de l'ARN_m de l'IL-23A et de TGTP1 dans les tractus génitaux des

souris SKG infectées par rapport au groupe contrôle non infecté, 1 semaine après infection (Figure 17). Le facteur d'amplification moyen était respectivement de $10,55 \pm 1,95$ et $3,55 \pm 0,65$ pour TGTP1 et IL-23A ($p < 0,05$). Ceci n'est pas retrouvé 5 semaines après infection, avec un retour à la normale voir une diminution de l'expression des ARNm de TGTP1 et IL-23A. Il existe une forte corrélation ($R^2=0,89$) entre les modifications d'expression des ARNm de TGTP1 et IL-23A (Figure 17).

Nous ne retrouvons pas de modification significative de l'expression de l'ARNm de HSPA5 par rapport aux souris contrôles, que cela soit à 1 ou 5 semaines post-infection (Figure 17). Il ne semble donc pas y avoir d'augmentation du stress du RE dans les tractus génitaux des souris infectées.

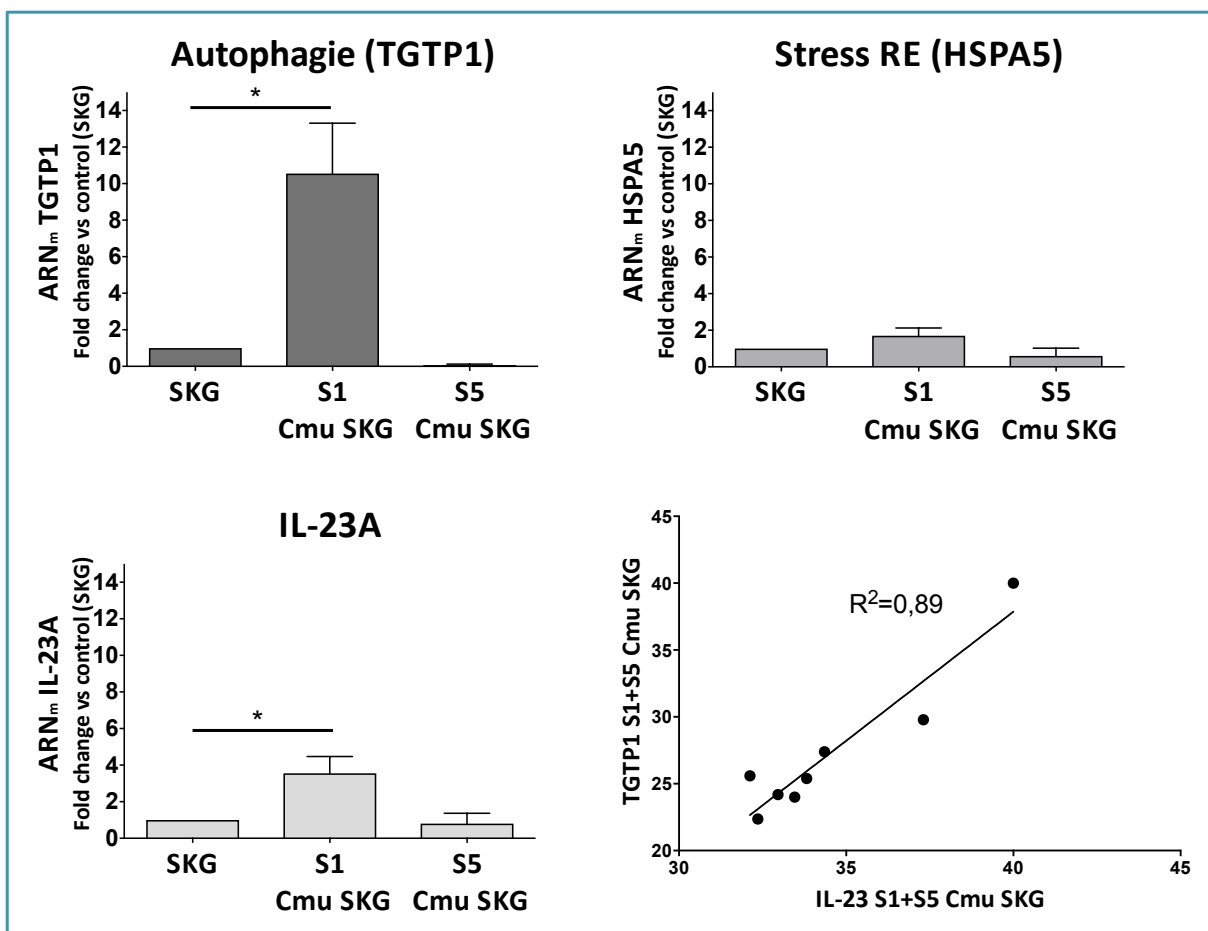


Figure 17 : Taux d'expression de l'ARNm d'HSPA5, d'IL23A et de TGTP1 dans les tractus génitaux des souris SKG infectées et contrôles 1 et 5 semaines post-infection. Expérience sur 4 souris SKG et 4 souris SKG infectées par *C. muridarum*. Évaluation statistique par analyse de variance à un facteur et test de Dunnet. Moyennes±SEM * $p < 0,05$. En bas à droite : corrélation entre TGTP1 et IL-23A aux semaines 1 et 5 chez les souris SKG infectées.

- **La production d'IL-23 est inversement corrélée à l'autophagie dans les articulations des souris SKG infectée par *C. muridarum***

Au niveau articulaire, l'analyse par RT-qPCR de l'expression des ARN_m de HSPA5, TGTP1 et IL-23A montre une augmentation des ARN_m de l'IL-23A et de HSPA5 5 semaines post-infection et de TGTP1 1 semaine post-infection, par rapport au groupe contrôle non infecté (Figure 18). Le facteur d'amplification moyen était de $6,4 \pm 0,8$ pour TGTP1 à la semaine 1, de $2,05 \pm 0,05$ pour HSPA5 et de $1,85 \pm 0,05$ pour l'IL-23A à la semaine 5 ($p < 0,01$).

Il existe une corrélation forte ($R^2=0,86$) entre les modifications d'expression des ARN_m de TGTP1 à la semaine 1 et de l'IL-23A à la semaine 5, à l'opposé de ce qui est retrouvé dans les tractus génitaux. Étonnamment, il semble y avoir une diminution de l'expression de l'ARN_m de HSPA5 et de l'IL-23A à la semaine 1, qui est significative.

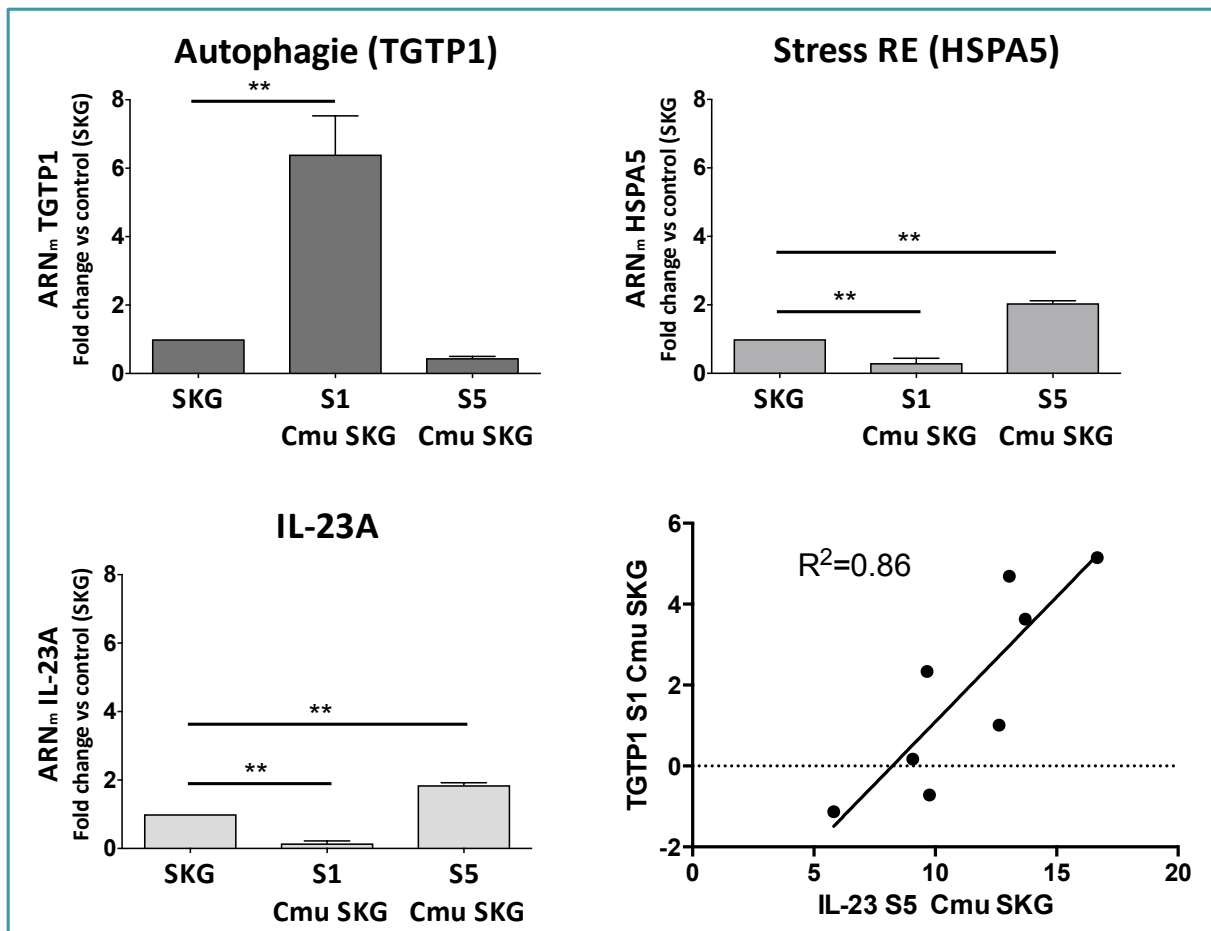


Figure 18 : Taux d'expression de l'ARN_m d'HSPA5, d'IL23A et de TGTP1 dans les chevilles des souris SKG infectées et contrôles 1 et 5 semaines post-infection. Expérience sur 4 souris SKG et 4 souris SKG infectées par *C. muridarum*. Évaluation statistique par analyse de variance à un facteur et test de Dunnett. ** $p < 0,001$. Moyennes \pm SEM. En bas à droite : corrélation entre TGTP1 à la semaine 1 et IL-23A à la semaine 5 chez les souris SKG infectées.

DISCUSSION

Cette étude permet en premier lieu de confirmer que la souris SKG infectée par *C. muridarum* présente un tableau clinique et histologique évocateur de l'arthrite réactionnelle humaine, mais surtout que l'apparition de cette dernière est prévenue par la déplétion en macrophages et que le blocage du TNF α permet une amélioration de la sévérité de l'arthrite. De plus, nous suggérons qu'un des mécanismes par lequel le macrophage agit est une activation de l'autophagie, à l'origine d'une surproduction d'IL-23, cytokine clé dans la physiopathologie des spondyloarthrites.

L'incidence d'arthrite réactionnelle chez la souris SKG après infection par *C. muridarum*, est similaires aux études antérieures avec 75% de souris symptomatiques contre aucune chez les souris non-infectées (31). Le tableau clinique chez les souris infectées était celui d'une oligoarthrite prédominant aux membres inférieurs, confirmée au niveau histologique par la présence d'infiltrats inflammatoires. Certaines souris ont également développé une inflammation oculaire évocatrice d'une conjonctivite. Les souris symptomatiques semblaient présenter un taux d'anticorps anti-Cmu MOMP plus important que les autres, sans que nous puissions mettre en évidence de corrélation significative.

La déplétion des macrophages par l'utilisation de clodronate a permis de prévenir la survenue de l'arthrite. Ceci suggère l'importance du macrophage dans les phénomènes initiaux à l'origine de l'arthrite, comme cela avait déjà été supposé (47,48). Cependant, ce résultat est à pondérer avec certaines limitations de notre étude, dont le fait que le macrophage joue un rôle global dans la réponse inflammatoire du système immunitaire inné et que sa déplétion a donc probablement des conséquences sur les activités d'autres cellules.

Le blocage du TNF α , que ça soit par récepteur soluble ou anticorps monoclonal, est efficace à la fois pour la prévention et pour le traitement de l'arthrite réactionnelle. Ces résultats concordent avec les rares études chez l'Homme qui ont également montrée une amélioration de l'arthrite réactionnelle sous anti-TNF α (14,15). Le fait qu'une immunosuppression

permette une amélioration de la symptomatologie clinique, alors qu'elle même est dû initialement à une infection génitale, est paradoxal et souligne bien la complexité des mécanismes menant à l'arthrite réactionnelle.

Le TNF α joue probablement un rôle davantage dans les phénomènes inflammatoires cliniques chroniques que dans ceux précédents l'apparition de l'arthrite. En effet, Baillet *et al.* ont montré que la sévérité de l'arthrite chez la souris SKG était corrélée au taux de TNF α (31). Ceci est également suggéré chez l'Homme par l'analyse des profils cytokiniques des patients atteints d'arthrite réactionnelle : les patients présentant une arthrite réactionnelle aigüe ont un taux de TNF α abaissé par rapport aux patients présentant une arthrite réactionnelle chronique (50). Une diminution de la production de TNF α par les lymphocytes Th1 pourrait ainsi être à l'origine de la persistance bactérienne et donc favoriser l'arthrite réactionnelle (50). D'autres cytokines, telle que l'IL-23 (51), auraient donc leur place dans les mécanismes initiaux à l'origine de l'arthrite et sans doute moins dans sa chronicité.

Étonnamment, il semble exister une différence d'efficacité entre le certolizumab pegol et l'éta nercept, le premier étant davantage efficace lors d'un traitement préventif et le deuxième lors d'un traitement curatif. Ceci pourrait éventuellement être expliqué par leur mécanisme d'action différent, sans que nous puissions y trouver un rationnel. Meyer *et al* n'avaient pas traité leurs patients par certolizumab mais ils ne mettent pas en évidence de différence d'efficacité entre l'éta nercept et les anticorps monoclonaux utilisés à savoir l'adalimumab ou l'infliximab (14). Il a été montré précédemment que l'éta nercept était moins pourvoyeur de réactivation de tuberculose latente par rapport aux anticorps monoclonaux, or *M. tuberculosis* est une bactérie intracellulaire tout comme *C. trachomatis* infectant les macrophages où elle persiste sous une forme latente, exprimant alors toutes deux des gènes orthologues (52).

L'importance du macrophage dans la survenue de l'arthrite réactionnelle peut s'expliquer par plusieurs mécanismes.

Tout d'abord, son rôle de dissémination du pathogène. En effet, on sait que *Chlamydia* infecte les macrophages (48) et il est suggéré qu'elle se dissémine ainsi dans les différents tissus de l'organisme (32), dont la membrane synoviale (23). Ce rôle de transporteur est confirmé chez la souris SKG, l'ADN de *C. muridarum* étant retrouvé dans les macrophages prélevés au niveau de la rate et des ganglions lymphatiques lombaires 7 jours après infection (31). Les macrophages infectés exprimant les PAMPs de *Chlamydia* induisent une réponse inflammatoire tissulaire par l'activation de la voie de signalisation des TLR-2 (25). De plus, il a été montré que la voie des TLR-2 a un rôle dans les phénomènes inflammatoires aigus mais aussi chroniques dans les suites d'une infection génitale à *C. trachomatis*.

Le macrophage est également une cellule présentatrice d'antigène et pourrait donc ainsi activer les LT et une réponse immunitaire. Ceci est suggéré par la présence de LT CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques de *Chlamydia* dans les articulations de patients présentant une arthrite réactionnelle à *Chlamydia* (53). La persistance des PAMPs de *Chlamydia* induiraient une activation chronique des LT à l'origine d'une production de cytokines pro-inflammatoires activant à leur tour les macrophages, générant ainsi une inflammation persistante (54). Ainsi, la prévention d'arthrite lors de la déplétion en macrophages pourrait suggérer le rôle prédominant de ces derniers dans l'activation du système immunitaire adaptatif, par rapport à d'autres cellules présentatrices d'antigène.

Le macrophage pourrait également activer le système immunitaire adaptatif par d'autres mécanismes dont la production d'IL-23, cytokine permettant la différenciation de LT CD4⁺ naïfs en lymphocytes Th17 (16). Le rôle du système immunitaire adaptatif dans l'arthrite réactionnelle est en effet suggéré par plusieurs études. Il a été montré que l'apparition de l'arthrite à *C. muridarum* chez la souris SKG faisait suite à une production altérée d'IFN γ et d'IL-17 par les LT déficients et que la déplétion des LT_{reg} entraînait une aggravation de l'arthrite (31). De plus, les macrophages infectés par *Chlamydia* entraînent l'apoptose des LT via la production de TNF α et par contact direct (55), ce qui pourrait favoriser la persistance du

pathogène. Ceci suggère à la fois l'importance du système immunitaire adaptatif dans le contrôle de l'infection mais également du macrophage dans la chronicité de l'arthrite. Certaines études mettant en évidence qu'une réponse cytokinique de type 1 est primordiale pour une défense efficace contre *Chlamydia* et ce dès 3 jours après l'infection, le système immunitaire adaptatif intervient donc probablement dans un second temps (18,56).

De plus, l'IL-23 pourrait agir sur d'autres cellules que les LT, notamment le macrophage lui-même. Par un effet autocrine, mais également paracrine par la synthèse d'IL-23 par les cellules dendritiques, les macrophages seraient alors stimulés de manière chronique, favorisant la persistance de l'inflammation tissulaire (57). Une étude a montré que les macrophages de patients présentant une spondyloarthrite produisaient davantage d'IL-23 que des patients sains après stimulation par des LPS *in vitro* (35). Ceci suggère une dérégulation de la production d'IL-23 par les macrophages dans la spondyloarthrite et donc possiblement également dans l'arthrite réactionnelle, sans que les mécanismes soient encore bien compris. Il est possible que le microbiote digestif ait un rôle à ce niveau, les variations de ce dernier régulant la production d'IL-23 chez la souris SKG après injection de β -glucan (58).

Plusieurs mécanismes sont donc probablement intriqués et notre hypothèse est que le macrophage infecté induit une réponse inflammatoire chronique à l'origine de l'arthrite chez la souris SKG infectée par *C. muridarum* en produisant de l'IL-23 via une augmentation de l'autophagie ou du stress du RE. Nous constatons en effet une synthèse d'IL-23 dans les tractus génitaux des souris SKG infectées, corrélée à une augmentation de l'autophagie mais pas au stress du RE, qui reste stable. Ceci est observé seulement 1 semaine post-infection, avec un retour à la normale à la fois de l'autophagie et de la production d'IL-23 5 semaines post-infection, probablement en lien avec la guérison clinique de l'infection génitale. En effet, les souris SKG présentent une guérison spontanée de l'infection génitale à *C. muridarum* en environ 3 semaines (31). Au niveau articulaire, l'augmentation de la production d'IL-23 n'apparaît que 5 semaines post-infection, soit lors de la survenue de l'arthrite. Cette

surproduction est inversement corrélée à l'autophagie et semble être corrélée à une augmentation du stress du RE sans que ceci soit significatif. Concernant le stress du RE au niveau du tractus génital chez la souris SKG, des données non publiées montrent que celui-ci est corrélée à une augmentation de l'IL-23. Il n'y a pas à notre connaissance d'autres études concernant ces phénomènes au niveau articulaire, ils sont donc à interpréter avec précaution, d'autant plus que nous montrons de manière surprenante une diminution du stress du RE et de la production d'IL-23 au niveau articulaire 1 semaine post-infection. Il est possible que la technique utilisée pour extraire d'ADN des articulations est entraînée une diminution de la qualité de l'échantillon. De plus, afin de confirmer que l'augmentation de l'autophagie et de l'IL-23 soient bien liées au macrophage il faudrait pratiquer des expériences supplémentaires, en recherchant notamment une différence d'expression de l'ARN_m après déplétion des macrophages. De plus, la présence d'ARN_m n'est pas synonyme de présence de la protéine.

Très peu d'études se sont intéressées à ces mécanismes dans l'arthrite réactionnelle à *Chlamydia*. On sait cependant qu'il existe un rôle de l'autophagie dans la clairance de *Chlamydia*, notamment de par son action sur l'IFN γ , cytokine importante pour l'élimination de pathogènes intracellulaires (40). De plus, *C. trachomatis* a été mis en évidence au sein d'autophagosomes dans des macrophages murins et humains (48). Un des mécanismes à l'origine de l'activation de l'autophagie dans les macrophages infectés serait une régulation négative de l'expression de mTOR (*Mechanistic Target of Rapamycin*), un inhibiteur endogène de l'autophagie (48). Le phénomène d'autophagie semble donc avoir un rôle non négligeable dans l'induction de la réponse inflammatoire par le macrophage infecté. Son rôle dans la chronicité de l'arthrite reste cependant à démontrer.

Nous ne retrouvons pas d'activation du stress du RE, possiblement du fait d'un nombre de souris insuffisant. Il a en effet été montré une augmentation du stress du RE au niveau intestinal chez la souris SKG après injection de β -glucan (36) et au niveau des tractus génitaux 1 semaine post-infection par *C. muridarum* (données non publiées), dans les deux

cas corrélée à une production plus importante d'IL-23. Cependant, une autre étude a montré que c'était l'autophagie et non le stress du RE qui entraînait une sur production d'IL-23 dans les intestins de patients présentant une spondyloarthrite (38). Par ailleurs, la souris SKG ne possède l'antigène HLA-B27, les données de la littérature reliant ce dernier à l'augmentation du stress du RE dans la spondyloarthrite (42) ne sont donc pas applicables à notre modèle. Cependant l'association du HLA-B27 avec l'arthrite réactionnelle est bien plus faible que dans les autres spondyloarthrites (17).

Si les phénomènes d'autophagie et de stress du RE ne parviennent pas à justifier le rôle du macrophage dans la chronicité de l'arthrite, sa polarisation pourrait être une des hypothèses. On distingue en effet les macrophages M1, inflammatoires de manière constitutionnelle, et les macrophages M2, activés secondairement, chacun étant respectivement associé aux réponses Th 1 et 2 des LT (59). Cette polarisation est plastique et se fait selon l'environnement cytokinique, l'IFN γ produite par les LTh1 favorisant les macrophages M1 alors que l'IL-10 et l'IL-4 produites par les LTh2 favoriseraient les macrophages M2 (59). Il a déjà été montré l'importance d'un équilibre entre ces deux types de macrophages dans certains rhumatismes inflammatoires chroniques dont la spondyloarthrite, où il existe une prédominance de M2 (60). Il serait donc intéressant de préciser s'il existe également un phénotype de prédilection dans le cadre de l'arthrite réactionnelle à *Chlamydia*. Une réponse M1 est essentielle à l'élimination des pathogènes intracellulaires, alors qu'une réponse M2 prédominante est liée à une infection chronique à *Chlamydia* (61). L'infection par *C. muridarum* de macrophages murins *in vitro* montrait la persistance du germe dans les macrophages M1 et sa multiplication intense dans les macrophages M2 (62), suggérant que *Chlamydia*, comme d'autres pathogènes intracellulaires, a trouvé une solution pour échapper aux défenses immunitaires.

En effet, lors d'une infection articulaire persistante *Chlamydia* se trouve sous la forme d'un corps aberrant, forme du pathogène ayant une expression génétique différente des deux autres formes de *Chlamydia*, corps élémentaire et réticulé (24). Le corps aberrant est la forme

intracellulaire, morphologiquement anormale, viable mais non cultivable de *Chlamydia*. Il exprime en grande quantité l'hsp60 et presque plus MOMP, contrairement aux deux autres formes. Fait intéressant, il a été montré que ce corps aberrant surexprimait des gènes orthologues avec ceux exprimés par *Mycobacterium tuberculosis* lors d'une infection persistante (52). Cependant, la persistance articulaire de *Chlamydia* n'est pas synonyme d'arthrite réactionnelle, le germe ayant été retrouvé dans des articulations de patients arthrosiques voir même sains (63,64), et pourrait être simplement le résultat d'un équilibre entre l'hôte et le pathogène.

L'existence de multiples sérovars pourrait également expliquer pourquoi seuls 4 à 15% des patients infectés présentent une arthrite réactionnelle (8). Cependant, les études concernant l'association des différentes souches de *Chlamydia* avec l'arthrite réactionnelle ont des résultats variables. Notamment, de façon surprenante, les résultats d'une étude montrent que seuls des sérovars oculaires ont été retrouvés dans les tissus synoviaux de 36 patients présentant une arthrite réactionnelle à *Chlamydia* (65). Ces résultats suggèrent que les souches oculaires ont une virulence plus importante que les souches génitales, et donc plus de facilité à migrer jusqu'à l'articulation et à y perdurer à l'état de corps aberrant.

Une autre hypothèse pouvant expliquer cette alternance de phases de guérison et rechute de l'arthrite pourrait être une re-contamination par voie génitale, voire même par voie digestive basse. Bien qu'une réinfection génitale soit associée à des symptômes locaux, il n'a pas encore été montré de lien avec la chronicité de l'arthrite. À l'inverse, l'hypothèse d'une auto-recontamination par voie digestive basse a récemment été évoquée pour plusieurs raisons. Tout d'abord, *Chlamydia* est présent dans le tube digestif des souris 7 jours après une infection génitale sans qu'une dissémination systémique puisse l'expliquer (66). De plus, 36,1% des femmes ayant une infection génitale à *C. trachomatis* présentent une infection rectale concomitante (67), et ceci a été confirmé par plusieurs autres études (68). Il est suggéré que le tractus gastro-intestinal serait un réservoir permettant la persistance de

Chlamydia (69), d'une part du fait d'un privilège immunitaire et d'autre part du fait de la mauvaise diffusion intestinale de l'azithromycine prescrit en dose unique pour le traitement des infections non compliquées à *Chlamydia* (70). L'ensemble de ces données permet d'envisager que suite à une infection génitale à *C. trachomatis*, les femmes présentent une infection persistante du tractus digestif inférieur à l'origine d'une réinfection par auto-recontamination de l'appareil génital, favorisant ainsi la survenue d'une arthrite réactionnelle.

CONCLUSION

Nos résultats soulignent le rôle fondamental du macrophage dans le développement de l'arthrite réactionnelle à *C. muridarum* chez la souris SKG et celui du TNF α dans les manifestations cliniques de l'arthrite. Nous suggérons qu'un des mécanismes à l'origine de l'arthrite est l'augmentation de l'autophagie et une surproduction d'IL-23 dans les suites immédiates de l'infection. Ceci permet de supposer un enchaînement aboutissant à l'arthrite réactionnelle à *Chlamydia* chez l'Homme, qui serait en fait une réponse inflammatoire chronique à une infection intracellulaire persistante.

Tout d'abord le macrophage infecté par *Chlamydia* au niveau génital disséminerait ce dernier aux différents tissus de l'organisme, dont les articulations. *Chlamydia* persisterait alors dans le macrophage sous la forme d'un corps aberrant et serait à l'origine d'une activation de l'autophagie et non du stress du RE, ce qui favoriserait la production d'IL-23 et induirait la réponse immunitaire initiale. La polarisation M2 du macrophage permettrait une chronicité du rhumatisme en inhibant l'activation du système immunitaire adaptatif et en produisant entre autre du TNF α en quantité importante, à l'origine des atteintes tissulaires.

Bien évidemment, ceci n'est qu'une hypothèse et il reste encore de nombreuses zones d'ombre, notamment afin d'expliquer la susceptibilité individuelle, la persistance de *Chlamydia* et le mécanisme de la réponse immunitaire exubérante à l'infection. De plus, nos résultats sont à préciser et compléter pour confirmer pleinement cette hypothèse chez la souris puis chez l'Homme mais suggèrent l'importance du système immunitaire inné dans la physiopathologie de l'arthrite réactionnelle à *Chlamydia* et permettent d'espérer de nouvelles thérapeutiques pour ces patients.

**POUR LA CONCLUSION DE VOTRE THESE,
INDICATIONS A RECOPIER (*).**

THESE SOUTENUE PAR : Claire Douillard

TITRE : Le macrophage dans l'arthrite réactionnelle à *Chlamydia* chez la souris SKG.

CONCLUSION :

Nos résultats soulignent le rôle fondamental du macrophage dans le développement de l'arthrite réactionnelle à *C. muridarum* chez la souris SKG et celui du TNF α dans les manifestations cliniques de l'arthrite. Nous suggérons qu'un des mécanismes à l'origine de l'arthrite est l'augmentation de l'autophagie et une surproduction d'IL-23 dans les suites immédiates de l'infection. Ceci permet de supposer un enchaînement aboutissant à l'arthrite réactionnelle à *Chlamydia* chez l'Homme, qui serait en fait une réponse inflammatoire chronique à une infection intracellulaire persistante.

Tout d'abord le macrophage infecté par *Chlamydia* au niveau génital disséminerait ce dernier aux différents tissus de l'organisme, dont les articulations. *Chlamydia* persisterait alors dans le macrophage sous la forme d'un corps aberrant et serait à l'origine d'une activation de l'autophagie et non du stress du RE, ce qui favoriserait la production d'IL-23 et induirait la réponse immunitaire initiale. La polarisation M2 du macrophage permettrait une chronicité du rhumatisme en inhibant l'activation du système immunitaire adaptatif et en produisant entre autre du TNF α en quantité importante, à l'origine des atteintes tissulaires.

Bien évidemment, ceci n'est qu'une hypothèse et il reste encore de nombreuses zones d'ombre, notamment afin d'expliquer la susceptibilité individuelle, la persistance de *Chlamydia* et le mécanisme de la réponse immunitaire exubérante à l'infection. De plus, nos résultats sont à préciser et compléter pour confirmer pleinement cette hypothèse chez la souris puis chez l'Homme mais suggèrent l'importance du système immunitaire

inné dans la physiopathologie de l'arthrite réactionnelle à *Chlamydia* et permettent d'espérer de nouvelles thérapeutiques pour ces patients.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 01/09/12

LE DOYEN

J.P. ROMANET

Pour la Présidente
et par délégation
Le Doyen de Médecine
Pr. Jean-Paul ROMANET

LE PRESIDENT DE LA THESE

PROFESSEUR GAUBIN



BIBLIOGRAPHIE

1. Lloyd GER. Hippocratic Writings. 1978.
2. Keat A. Reiter's syndrome and reactive arthritis in perspective. *N Engl J Med.* 1983 Dec 29;309(26):1606–15.
3. Allison DJ. Christopher Columbus: first case of Reiter's disease in the Old World? *Lancet Lond Engl.* 1980 Dec 13;2(8207):1309.
4. Brodie B. Pathological and Surgical Observations on the Diseases of Joints. London:Longman, Brown, Green and Longmans; 1818.
5. Iglesias-Gammara A, Restrepo J, Valle R, Matteson E. A Brief History of Stoll-Brodie-Fiessinger-Leroy Syndrome (Reiters Syndrome) and Reactive Arthritis with a Translation of Reiters Original 1916 Article into English. *Curr Rheumatol Rev.* 2005 Jan 1;1(1):71–9.
6. Hannu T. Reactive arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2011 Jun;25(3):347–57.
7. Carter JD, Gérard HC, Espinoza LR, Ricca LR, Valeriano-Marcet J, Snelgrove J, et al. Chlamydiae as Etiologic Agents for Chronic Undifferentiated Spondyloarthritis. *Arthritis Rheum.* 2009 May;60(5):1311–6.
8. Rich E, Hook EW, Alarcón GS, Moreland LW. Reactive arthritis in patients attending an urban sexually transmitted diseases clinic. *Arthritis Rheum.* 1996 Jul;39(7):1172–7.
9. Amor B. Reiter's syndrome. Diagnosis and clinical features. *Rheum Dis Clin North Am.* 1998 Nov;24(4):677–95, vii.
10. Zimmerman HL, Potterat JJ, Dukes RL, Muth JB, Zimmerman HP, Fogle JS, et al. Epidemiologic differences between chlamydia and gonorrhea. *Am J Public Health.* 1990 Nov;80(11):1338–42.
11. Leirisalo-Repo M. Prognosis, course of disease, and treatment of the spondyloarthropathies. *Rheum Dis Clin North Am.* 1998 Nov;24(4):737–51, viii.
12. Carter JD, Espinoza LR, Inman RD, Sneed KB, Ricca LR, Vasey FB, et al. Combination antibiotics as a treatment for chronic Chlamydia-induced reactive arthritis: A double-blind, placebo-controlled, prospective trial. *Arthritis Rheum.* 2010 May;62(5):1298–307.
13. Clegg DO, Reda DJ, Weisman MH, Cush JJ, Vasey FB, Schumacher HR, et al. Comparison of sulfasalazine and placebo in the treatment of reactive arthritis (Reiter's syndrome). A Department of Veterans Affairs Cooperative Study. *Arthritis Rheum.* 1996 Dec;39(12):2021–7.

14. Meyer A, Chatelus E, Wendling D, Berthelot J-M, Dernis E, Houvenagel E, et al. Safety and efficacy of anti-tumor necrosis factor α therapy in ten patients with recent-onset refractory reactive arthritis. *Arthritis Rheum.* 2011 May;63(5):1274–80.
15. Brinster A, Guillot X, Prati C, Wendling D. Anti-TNF treatment of reactive arthritis. A monocentric experience. *Jt Bone Spine Rev Rhum.* 2017 Mar;84(2):237–8.
16. McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, Laurence A, Joyce-Shaikh B, Blumenschein W, et al. Interleukin 23 receptor is essential for terminal differentiation of effector T helper type 17 cells in vivo. *Nat Immunol.* 2009 Mar;10(3):314–24.
17. Carter JD, Hudson AP. The evolving story of Chlamydia-induced reactive arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2010 Jul;22(4):424–30.
18. Inman RD, Chiu B. Early cytokine profiles in the joint define pathogen clearance and severity of arthritis in Chlamydia-induced arthritis in rats. *Arthritis Rheum.* 2006 Feb;54(2):499–507.
19. Bas S, Kvien TK, Buchs N, Fulpius T, Gabay C. Lower level of synovial fluid interferon-gamma in HLA-B27-positive than in HLA-B27-negative patients with Chlamydia trachomatis reactive arthritis. *Rheumatol Oxf Engl.* 2003 Mar;42(3):461–7.
20. Braun J, Yin Z, Spiller I, Siegert S, Rudwaleit M, Liu L, et al. Low secretion of tumor necrosis factor alpha, but no other Th1 or Th2 cytokines, by peripheral blood mononuclear cells correlates with chronicity in reactive arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999 Oct;42(10):2039–44.
21. Carter JD. Bacterial agents in spondyloarthritis: a destiny from diversity? *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2010 Oct;24(5):701–14.
22. Sun HS, Eng EWY, Jeganathan S, Sin AT-W, Patel PC, Gracey E, et al. Chlamydia trachomatis vacuole maturation in infected macrophages. *J Leukoc Biol.* 2012 Oct;92(4):815–27.
23. Gérard HC, Carter JD, Hudson AP. Chlamydia trachomatis is present and metabolically active during the remitting phase in synovial tissues from patients with chronic Chlamydia-induced reactive arthritis. *Am J Med Sci.* 2013 Jul;346(1):22–5.
24. Gérard HC, Branigan PJ, Schumacher HR, Hudson AP. Synovial Chlamydia trachomatis in patients with reactive arthritis/Reiter's syndrome are viable but show aberrant gene expression. *J Rheumatol.* 1998 Apr;25(4):734–42.
25. Beckett EL, Phipps S, Starkey MR, Horvat JC, Beagley KW, Foster PS, et al. TLR2, but not TLR4, is required for effective host defence against Chlamydia respiratory tract infection in early life. *PloS One.* 2012;7(6):e39460.
26. De Clercq E, Kalmar I, Vanrompay D. Animal Models for Studying Female Genital Tract Infection with Chlamydia trachomatis. *Infect Immun.* 2013 Sep;81(9):3060–7.

27. Hough AJ, Rank RG. Pathogenesis of acute arthritis due to viable *Chlamydia trachomatis* (mouse pneumonitis agent) in C57Bl/6 mice. *Am J Pathol.* 1989 Apr;134(4):903–12.
28. Inman RD, Chiu B. Synoviocyte-packaged *Chlamydia trachomatis* induces a chronic aseptic arthritis. *J Clin Invest.* 1998 Nov 15;102(10):1776–82.
29. Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, Nomura T, Tagami T, Yamazaki S, et al. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature.* 2003 Nov 27;426(6965):454–60.
30. Ruutu M, Thomas G, Steck R, Degli-Esposti MA, Zinkernagel MS, Alexander K, et al. β -glucan triggers spondylarthritis and Crohn's disease-like ileitis in SKG mice. *Arthritis Rheum.* 2012 Jul;64(7):2211–22.
31. Baillet AC, Rehaume LM, Benham H, O'Meara CP, Armitage CW, Ruscher R, et al. High *Chlamydia Burden* Promotes Tumor Necrosis Factor-Dependent Reactive Arthritis in SKG Mice. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ.* 2015 Jun;67(6):1535–47.
32. Moazed TC, Kuo CC, Grayston JT, Campbell LA. Evidence of systemic dissemination of *Chlamydia pneumoniae* via macrophages in the mouse. *J Infect Dis.* 1998 May;177(5):1322–5.
33. Kiltz U, Baraliakos X, Mercieca C, Borg A. Spondyloarthritis: pathogenesis, clinical aspects and diagnosis. EULAR on-line course on Rheumatic Diseases; 2013.
34. Sherlock JP, Joyce-Shaikh B, Turner SP, Chao C-C, Sathe M, Grein J, et al. IL-23 induces spondyloarthropathy by acting on ROR- γ t+ CD3+CD4-CD8- enthesal resident T cells. *Nat Med.* 2012 Jul;18(7):1069–76.
35. Zeng L, Lindstrom MJ, Smith JA. Ankylosing spondylitis macrophage production of higher levels of interleukin-23 in response to lipopolysaccharide without induction of a significant unfolded protein response. *Arthritis Rheum.* 2011 Dec;63(12):3807–17.
36. Benham H, Rehaume LM, Hasnain SZ, Velasco J, Baillet AC, Ruutu M, et al. Interleukin-23 mediates the intestinal response to microbial β -1,3-glucan and the development of spondyloarthritis pathology in SKG mice. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ.* 2014 Jul;66(7):1755–67.
37. Shibutani ST, Saitoh T, Nowag H, Münz C, Yoshimori T. Autophagy and autophagy-related proteins in the immune system. *Nat Immunol.* 2015 Oct;16(10):1014–24.
38. Ciccio F, Accardo-Palumbo A, Rizzo A, Guggino G, Raimondo S, Giardina A, et al. Evidence that autophagy, but not the unfolded protein response, regulates the expression of IL-23 in the gut of patients with ankylosing spondylitis and subclinical gut inflammation. *Ann Rheum Dis.* 2014 Aug;73(8):1566–74.
39. Peral de Castro C, Jones SA, Ní Cheallaigh C, Hearnden CA, Williams L, Winter J, et al. Autophagy regulates IL-23 secretion and innate T cell responses through effects on

- IL-1 secretion. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2012 Oct 15;189(8):4144–53.
40. Al-Zeer MA, Al-Younes HM, Lauster D, Abu Lubad M, Meyer TF. Autophagy restricts *Chlamydia trachomatis* growth in human macrophages via IFNG-inducible guanylate binding proteins. *Autophagy*. 2013 Jan;9(1):50–62.
 41. Colbert RA, Tran TM, Layh-Schmitt G. HLA-B27 misfolding and ankylosing spondylitis. *Mol Immunol*. 2014 Jan;57(1):44–51.
 42. DeLay ML, Turner MJ, Klenk EI, Smith JA, Sowders DP, Colbert RA. HLA-B27 Misfolding and the Unfolded Protein Response Augment IL-23 Production and are Associated with Th17 Activation in Transgenic Rats. *Arthritis Rheum*. 2009 Sep;60(9):2633–43.
 43. O'Meara CP, Armitage CW, Harvie MCG, Timms P, Lycke NY, Beagley KW. Immunization with a MOMP-based vaccine protects mice against a pulmonary *Chlamydia* challenge and identifies a disconnection between infection and pathology. *PloS One*. 2013;8(4):e61962.
 44. Skelding KA, Hickey DK, Horvat JC, Bao S, Roberts KG, Finnie JM, et al. Comparison of intranasal and transcutaneous immunization for induction of protective immunity against *Chlamydia muridarum* respiratory tract infection. *Vaccine*. 2006 Jan 16;24(3):355–66.
 45. Zeisberger SM, Odermatt B, Marty C, Zehnder-Fjällman AHM, Ballmer-Hofer K, Schwendener RA. Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach. *Br J Cancer*. 2006 Aug 7;95(3):272–81.
 46. Breslin WL, Strohacker K, Carpenter KC, Haviland DL, McFarlin BK. Mouse blood monocytes: standardizing their identification and analysis using CD115. *J Immunol Methods*. 2013 Apr 30;390(1-2):1–8.
 47. Gracey E, Inman RD. *Chlamydia*-induced ReA: immune imbalances and persistent pathogens. *Nat Rev Rheumatol*. 2012 Jan;8(1):55–9.
 48. Sun HS, Eng EWY, Jeganathan S, Sin AT-W, Patel PC, Gracey E, et al. *Chlamydia trachomatis* vacuole maturation in infected macrophages. *J Leukoc Biol*. 2012 Oct;92(4):815–27.
 49. Saviola G, Abdi-Ali L, Povino MR. CLODRONATE: OLD DRUG, NEW USES. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2015 Sep;29(3):719–22.
 50. Butrimiene I, Jarmalaite S, Ranceva J, Venalis A, Jasiuleviciute L, Zvirbliene A. Different cytokine profiles in patients with chronic and acute reactive arthritis. *Rheumatol Oxf Engl*. 2004 Oct;43(10):1300–4.
 51. Pfeifle R, Rothe T, Ipseiz N, Scherer HU, Culemann S, Harre U, et al. Regulation of autoantibody activity by the IL-23–TH17 axis determines the onset of autoimmune

disease. *Nat Immunol.* 2016 Nov 7;18(1):104–13.

52. Gérard HC, Whittum-Hudson JA, Schumacher HR, Hudson AP. Synovial *Chlamydia trachomatis* up regulates expression of a panel of genes similar to that transcribed by *Mycobacterium tuberculosis* during persistent infection. *Ann Rheum Dis.* 2006 Mar;65(3):321–7.

35. Gérard HC, Carter JD, Hudson AP. *C. trachomatis* is present and metabolically active during the remitting phase in synovial tissues from patients with chronic *Chlamydia*-induced reactive arthritis. *Am J Med Sci.* 2013 Jul;346(1).

54. Rihl M, Köhler L, Klos A, Zeidler H. Persistent infection of *Chlamydia* in reactive arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2006 Mar;65(3):281–4.

55. Jendro MC, Fingerle F, Deutsch T, Liese A, Köhler L, Kuipers JG, et al. *Chlamydia trachomatis*-infected macrophages induce apoptosis of activated T cells by secretion of tumor necrosis factor- α in vitro. *Med Microbiol Immunol (Berl).* 2004 Feb;193(1):45–52.

56. Jiang X, Shen C, Yu H, Karunakaran KP, Brunham RC. Differences in innate immune responses correlate with differences in murine susceptibility to *Chlamydia muridarum* pulmonary infection. *Immunology.* 2010 Apr;129(4):556–66.

57. Iwakura Y, Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest.* 2006 May 1;116(5):1218–22.

58. Rehaume LM, Mondot S, Aguirre de Cárcer D, Velasco J, Benham H, Hasnain SZ, et al. ZAP-70 genotype disrupts the relationship between microbiota and host, leading to spondyloarthritis and ileitis in SKG mice. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ.* 2014 Oct;66(10):2780–92.

59. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004 Dec;25(12):677–86.

60. Baeten D, Kruithof E, De Rycke L, Boots AM, Mielants H, Veys EM, et al. Infiltration of the synovial membrane with macrophage subsets and polymorphonuclear cells reflects global disease activity in spondyloarthropathy. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(2):R359–69.

43. Buchacher T, Ohradanova-Repic A, Stockinger H, Fischer MB, Weber V. M2 Polarization of Human Macrophages Favors Survival of the Intracellular Pathogen *Chlamydia pneumoniae*. *PLoS ONE.* 2015 Nov 25;10(11).

44. Gracey E, Lin A, Akram A, Chiu B, Inman RD. Intracellular Survival and Persistence of *Chlamydia muridarum* Is Determined by Macrophage Polarization. *PLoS ONE.* 2013 Aug 14;8(8).

63. Schumacher HR, Arayssi T, Crane M, Lee J, Gerard H, Hudson AP, et al. *Chlamydia*

trachomatis nucleic acids can be found in the synovium of some asymptomatic subjects. *Arthritis Rheum.* 1999 Jun;42(6):1281–4.

64. Wilkinson NZ, Kingsley GH, Jones HW, Sieper J, Braun J, Ward ME. The detection of DNA from a range of bacterial species in the joints of patients with a variety of arthritides using a nested, broad-range polymerase chain reaction. *Rheumatology.* 1999 Mar 1;38(3):260–6.

65. Gerard HC, Stanich JA, Whittum-Hudson JA, Schumacher HR, Carter JD, Hudson AP. Patients with Chlamydia-associated arthritis have ocular (trachoma), not genital, serovars of *C trachomatis* in synovial tissue. *Microb Pathog.* 2010 Feb;48(2):62.

66. Perry LL, Hughes S. Chlamydial Colonization of Multiple Mucosae following Infection by Any Mucosal Route. *Infect Immun.* 1999 Jul;67(7):3686–9.

67. Bax CJ, Quint KD, Peters RPH, Ouburg S, Oostvogel PM, Mutsaers J a. EM, et al. Analyses of multiple-site and concurrent Chlamydia trachomatis serovar infections, and serovar tissue tropism for urogenital versus rectal specimens in male and female patients. *Sex Transm Infect.* 2011 Oct;87(6):503–7.

68. Jones RB, Rabinovitch RA, Katz BP, Batteiger BE, Quinn TS, Terho P, et al. Chlamydia trachomatis in the pharynx and rectum of heterosexual patients at risk for genital infection. *Ann Intern Med.* 1985 Jun;102(6):757–62.

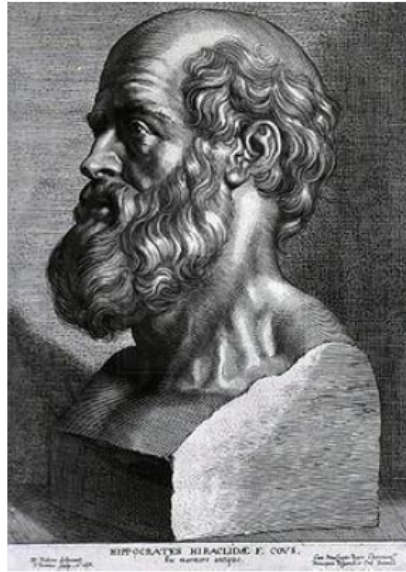
69. Yeruva L, Spencer N, Bowlin AK, Wang Y, Rank RG. Chlamydial infection of the gastrointestinal tract: a reservoir for persistent infection. *Pathog Dis.* 2013 Aug;68(3):88–95.

70. Yeruva L, Melnyk S, Spencer N, Bowlin A, Rank RG. Differential Susceptibilities to Azithromycin Treatment of Chlamydial Infection in the Gastrointestinal Tract and Cervix. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Dec;57(12):6290–4.

ANNEXE

Score histologique d'inflammation articulaire chez la souris

0	Normal
1	Quelques cellules inflammatoires
2	1 à 2 infiltrat(s) inflammatoire(s)
3	Inflammation dans l'ensemble de l'articulation
4	Inflammation des tissus mous, fascias et enthèses
5	Tuméfaction importante avec infiltrat inflammatoire diffus



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 donnerais mes soins gratuitement à l'indigent et n'exigerais jamais un salaire au dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis dans l'intimité des maisons, mes yeux n'y 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 respect 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.

Doyen de la Faculté : M. le Pr. Jean Paul ROMANET

Année 2016-2017

ENSEIGNANTS A L'UFR DE MEDECINE

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	ALBALADEJO Pierre	Anesthésiologie réanimation
PU-PH	APEL Florent	Ophthalmologie
PU-PH	ARVIEUX-BARTHELEMY Catherine	Chirurgie générale
PU-PH	BALOSSO Jacques	Radiothérapie
PU-PH	BARONE-ROCHETTE Gilles	Cardiologie
PU-PH	BARRET Luc	Médecine légale et droit de la santé
PU-PH	BAYAT Sam	Physiologie
PU-PH	BENHAMOU Pierre Yves	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	BERGER François	Biologie cellulaire
MCU-PH	BIDART-COUTTON Marie	Biologie cellulaire
MCU-PH	BOISSET Sandrine	Agents infectieux
PU-PH	BONAZ Bruno	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
PU-PH	BONNETERRE Vincent	Médecine et santé au travail
PU-PH	BOREL Anne-Laure	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	BOSSON Jean-Luc	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	BOTTARI Serge	Biologie cellulaire
PU-PH	BOUGEROL Thierry	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	BOUILLET Laurence	Médecine interne
PU-PH	BOUZAT Pierre	Réanimation
PU-PH	BRAMBILLA Christian	Pneumologie
MCU-PH	BRENIER-PINCHART Marie Pierre	Parasitologie et mycologie
PU-PH	BRICAULT Ivan	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	BRICHON Pierre-Yves	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
MCU-PH	BRIOT Raphaël	Thérapeutique, médecine d'urgence
MCU-PH	BROUILLET Sophie	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
PU-PH	CAHN Jean-Yves	Hématologie
MCU-PH	CALLANAN-WILSON Mary	Hématologie, transfusion
PU-PH	CARPENTIER Françoise	Thérapeutique, médecine d'urgence
PU-PH	CARPENTIER Patrick	Chirurgie vasculaire, médecine vasculaire
PU-PH	CESBRON Jean-Yves	Immunologie
PU-PH	CHABARDES Stephan	Neurochirurgie
PU-PH	CHABRE Olivier	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	CHAFFANJON Philippe	Anatomie

PU-PH	CHARLES Julie	Dermatologie
PU-PH	CHAVANON Olivier	Chirurgie thoracique et cardio- vasculaire
PU-PH	CHIQUET Christophe	Ophthalmologie
PU-PH	CINQUIN Philippe	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	COHEN Olivier	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	COUTURIER Pascal	Gériatrie et biologie du vieillissement
PU-PH	CRACOWSKI Jean-Luc	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PU-PH	CURE Hervé	Oncologie
PU-PH	DEBILLON Thierry	Pédiatrie
PU-PH	DECAENS Thomas	Gastro-entérologie, Hépatologie
PU-PH	DEMATTEIS Maurice	Addictologie
MCU-PH	DERANSART Colin	Physiologie
PU-PH	DESCOTES Jean-Luc	Urologie
MCU-PH	DETANTE Olivier	Neurologie
MCU-PH	DIETERICH Klaus	Génétique et procréation
MCU-PH	DOUTRELEAU Stéphane	Physiologie
MCU-PH	DUMESTRE-PERARD Chantal	Immunologie
PU-PH	EPAULARD Olivier	Maladies Infectieuses et Tropicales
PU-PH	ESTEVE François	Biophysique et médecine nucléaire
MCU-PH	EYSSERIC Hélène	Médecine légale et droit de la santé
PU-PH	FAGRET Daniel	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	FAUCHERON Jean-Luc	Chirurgie générale
MCU-PH	FAURE Julien	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	FERRETTI Gilbert	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	FEUERSTEIN Claude	Physiologie
PU-PH	FONTAINE Éric	Nutrition
PU-PH	FRANCOIS Patrice	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-MG	GABOREAU Yoann	Médecine Générale
PU-PH	GARBAN Frédéric	Hématologie, transfusion
PU-PH	GAUDIN Philippe	Rhumatologie
PU-PH	GAVAZZI Gaétan	Gériatrie et biologie du vieillissement
PU-PH	GAY Emmanuel	Neurochirurgie
MCU-PH	GILLOIS Pierre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	GRAND Sylvie	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	GRIFFET Jacques	Chirurgie infantile
PU-PH	GUEBRE-EGZIABHER Fitsum	Néphrologie
MCU-PH	GUZUN Rita	Endocrinologie, diabétologie, nutrition, éducation thérapeutique
PU-PH	HAINAUT Pierre	Biochimie, biologie moléculaire
PU-PH	HENNEBICQ Sylviane	Génétique et procréation
PU-PH	HOFFMANN Pascale	Gynécologie obstétrique
PU-PH	HOMMEL Marc	Neurologie
PU-MG	IMBERT Patrick	Médecine Générale
PU-PH	JOUK Pierre-Simon	Génétique
PU-PH	JUVIN Robert	Rhumatologie

PU-PH	KAHANE Philippe	Physiologie
PU-PH	KRACK Paul	Neurologie
PU-PH	KRAINIK Alexandre	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	LABARERE José	Epidémiologie ; Eco. de la Santé
MCU-PH	LANDELLE Caroline	Bactériologie - virologie
MCU-PH	LAPORTE François	Biochimie et biologie moléculaire
MCU-PH	LARDY Bernard	Biochimie et biologie moléculaire
MCU-PH	LARRAT Sylvie	Bactériologie, virologie
MCU - PH	LE GOUËLLEC Audrey	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	LECCIA Marie-Thérèse	Dermato-vénérologie
PU-PH	LEROUX Dominique	Génétique
PU-PH	LEROY Vincent	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
PU-PH	LEVY Patrick	Physiologie
MCU-PH	LONG Jean-Alexandre	Urologie
PU-PH	MAGNE Jean-Luc	Chirurgie vasculaire
MCU-PH	MAIGNAN Maxime	Thérapeutique, médecine d'urgence
PU-PH	MAITRE Anne	Médecine et santé au travail
MCU-PH	MALLARET Marie-Reine	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-PH	MARLU Raphaël	Hématologie, transfusion
MCU-PH	MAUBON Danièle	Parasitologie et mycologie
PU-PH	MAURIN Max	Bactériologie - virologie
MCU-PH	MC LEER Anne	Cytologie et histologie
PU-PH	MERLOZ Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	MORAND Patrice	Bactériologie - virologie
PU-PH	MOREAU-GAUDRY Alexandre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	MORO Elena	Neurologie
PU-PH	MORO-SIBILOT Denis	Pneumologie
PU-PH	MOUSSEAU Mireille	Cancérologie
PU-PH	MOUETET François	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie
MCU-PH	PACLET Marie-Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	PALOMBI Olivier	Anatomie
PU-PH	PARK Sophie	Hémato - transfusion
PU-PH	PASSAGGIA Jean-Guy	Anatomie
PU-PH	PAYEN DE LA GARANDERIE Jean-François	Anesthésiologie réanimation
MCU-PH	PAYSANT François	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	PELLETIER Laurent	Biologie cellulaire
PU-PH	PELLOUX Hervé	Parasitologie et mycologie
PU-PH	PEPIN Jean-Louis	Physiologie
PU-PH	PERENNOU Dominique	Médecine physique et de réadaptation
PU-PH	PERNOD Gilles	Médecine vasculaire
PU-PH	PIOLAT Christian	Chirurgie infantile
PU-PH	PISON Christophe	Pneumologie
PU-PH	PLANTAZ Dominique	Pédiatrie
PU-PH	POIGNARD Pascal	Virologie

PU-PH	POLACK Benoît	Hématologie
PU-PH	POLOSAN Mircea	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	PONS Jean-Claude	Gynécologie obstétrique
PU-PH	RAMBEAUD Jacques	Urologie
PU-PH	RAY Pierre	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
PU-PH	REYT Émile	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	RIGHINI Christian	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	ROMANET Jean Paul	Ophthalmologie
PU-PH	ROSTAING Lionel	Néphrologie
MCU-PH	ROUSTIT Matthieu	Pharmacologie fondamentale, pharmaco clinique, addictologie
MCU-PH	ROUX-BUISSON Nathalie	Biochimie, toxicologie et pharmacologie
MCU-PH	RUBIO Amandine	Pédiatrie
PU-PH	SARAGAGLIA Dominique	Chirurgie orthopédique et traumatologie
MCU-PH	SATRE Véronique	Génétique
PU-PH	SAUDOU Frédéric	Biologie Cellulaire
PU-PH	SCHMERBER Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	SCHWEBEL-CANALI Carole	Réanimation médicale
PU-PH	SCOLAN Virginie	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	SEIGNEURIN Arnaud	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	STAHL Jean-Paul	Maladies infectieuses, maladies tropicales
PU-PH	STANKE Françoise	Pharmacologie fondamentale
MCU-PH	STASIA Marie-José	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	STURM Nathalie	Anatomie et cytologie pathologiques
PU-PH	TAMISIER Renaud	Physiologie
PU-PH	TERZI Nicolas	Réanimation
MCU-PH	TOFFART Anne-Claire	Pneumologie
PU-PH	TONETTI Jérôme	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	TOUSSAINT Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	VANZETTO Gérald	Cardiologie
PU-PH	VUILLEZ Jean-Philippe	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	WEIL Georges	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	ZAOUI Philippe	Néphrologie
PU-PH	ZARSKI Jean-Pierre	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie

PU-PH : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers
MCU-PH : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers
PU-MG : Professeur des Universités de Médecine Générale
MCU-MG : Maître de Conférences des Universités de Médecine Générale