

THESE DE DOCTORAT DE CHARLENE TRILLEAUD

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605

« Développement d'un agoniste de ChemR23 en tant que vecteur de résolution de l'inflammation »

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 11 juin 2020

Unité de recherche : CRTI UMR-1064

Thèse N° :

Rapporteurs avant soutenance :

Pierre Desreumaux PU/PH à Université de Lille
Sylvain Perruche CR à Université de Besançon

Composition du Jury :

Président :
Examineurs : Malvyne Derkinderen DR à l'Université de Nantes
Examineurs : Marc Dubourdeau Directeur d'Ambiotis

Dir. de thèse : Gilles Blancho PU/PH à Université de Nantes
Co-dir. de thèse : Nicolas Poirier DR à OSE Immunotherapeutics

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je souhaite remercier le Dr Sylvain Perruche ainsi que le Pr. Pierre Desreumaux d'avoir accepté de relire ma thèse et d'en être rapporteurs. Je voudrais aussi remercier tous les membres de mon jury d'avoir accepté d'assister à la présentation de ce travail et de s'être rendu disponible malgré le contexte actuel.

Je souhaite remercier le Pr. Gilles Blancho ainsi que le Dr. Bernard Vanhove d'avoir accepté d'être mes directeurs de thèse et de m'avoir permis de faire cette thèse collaborative entre un laboratoire public et une entreprise privée. Quelque peu mouvementé par certains événements durant les dernières années, ce fût une expérience enrichissante de pouvoir travailler à vos côtés durant ces 4 années.

Je souhaite aussi remercier le Dr Nicolas Poirier. Tout d'abord, merci de m'avoir permis de faire mon stage de master 2 au sein de l'équipe d'Effimune avec un projet novateur et plein d'ambition. Nous avons par la suite pu lancer un projet de thèse qui démarrait sur les chapeaux de roues, mais comme tu le dis si bien « la science c'est comme surfer sur une vague » alors j'ai essayé de surfer comme je le pouvais malgré les gros dénivelés par moment. Heureusement, vous avez toujours été là pour me soutenir et trouver de nouvelles idées pour faire avancer le projet. Travailler à tes côtés fût très formateur autant sur l'axe scientifique que sur le management « familial » que tu te démenes à maintenir chez OSE.

Je suis aussi très reconnaissante d'avoir pu travailler avec Dr Vanessa Gauttier. Tu as été mon encadrante depuis mon arrivée à Effimune et c'est grâce à toi et ton encadrement que j'en suis arrivée là aujourd'hui. Au fil des années j'ai appris à te connaître et nous sommes devenue de très bonnes collègues. C'était vraiment agréable de pouvoir apprendre, échanger, collaborer mais aussi papoter et rigoler avec toi Vanessa. Tu es une personne qui donne énormément pour son travail et pour la science et je reste impressionnée par ce dévouement que tu as pour ce boulot. Toi aussi, tu as surfé avec moi sur les vagues du projet EffiR23 et ce n'était pas tous les jours facile mais honnêtement je n'en garde que des bons souvenirs que ça soit scientifique ou « extra-travail ». Donc un grand merci pour tous ces bons moments que nous avons passé ensemble, toutes nos heures à l'animalerie ou sous les PSM, ça va me manquer.

Evidemment, même si Vanessa et Nicolas m'ont beaucoup apporté durant ces quelques années de thèse, je tiens aussi à remercier toute l'équipe d'OSE Immunotherapeutics sans qui le projet et ma thèse n'auraient pas été les mêmes. Plus particulière, merci à Caroline et Virginie qui m'ont permis d'avoir des anticorps qui marchait du feu de dieu, enfin surtout sur la fin. Merci pour vos petits mots de soutien quand cela était nécessaire et pour votre bonne humeur au quotidien. Merci aussi à Sabrina, je n'oublie pas que c'est toi qui m'as appris à faire un ELISA lors de mon stage de master 2. J'ai rarement vu une personne aussi pointilleuse et exemplaire que toi dans les expériences, j'essayerai d'en prendre de la graine dans les prochaines années. Merci aussi à Géraldine, pour tous ces déjeuner et petites pauses chocolat au soleil. On se suit depuis le début chez Effimune et c'était vraiment un plaisir de discuter avec toi de tout et de rien, du soleil de Savoie (tu m'aurais presque donnée envie d'y aller ...). Je voudrais aussi dire merci à Lyssia, j'ai réellement apprécié pouvoir échanger avec toi que ça soit pour le projet ou pour tout autre chose. Je t'ai longtemps regardé avec de l'admiration pour la thèse qui tu as soutenu et j'espère pouvoir faire aussi bien que toi dans quelques semaines. Merci pour le soutien que tu as su me montrer lorsque j'avais des coups de mou. Je tiens aussi à remercier, Justine, Margaux, Ariane, Emmanuelle, Marion, Isabelle pour votre aide quand j'en avais besoin, pour votre sympathie et votre bonne humeur, ce fût un vrai plaisir de travailler avec vous.

Vous allez croire que je vous ai oublié mais évidemment que non. Je voudrais dire un grand merci à Kevin et Aurore. Merci Kevin pour ton aide sur le projet ChemR23, tu as apporté par tes connaissances ce qu'il nous manquait et grâce à toi j'ai pu en apprendre d'avantages en IHC et microscopie. On a beaucoup échangé, discuté, émis des hypothèses sur le projet pour pouvoir le faire avancer et c'était un vrai plaisir de pouvoir le faire avec toi. Mais en vrai, le plus sympathique c'était de t'avoir comme collègue de bureau. Je sais qu'on a beaucoup mangé (surtout moi, mais un peu toi aussi quand même), souvent ris de tes blagues (parfois un peu nulles), parfois pris des pauses un peu trop longues, et de temps en temps cherché des trucs sur internet qui n'avait pas beaucoup d'intérêt mais honnêtement tu as rendu mes journées tellement meilleures et ça me manque déjà. Et puis, il y a aussi ma petite Aurore. Tu es arrivée tout droit de NYC et j'ai très vite été impressionnée par cet afflux de connaissance que tu nous montrais lors des réunions (tu rivalises presque avec Nicolas). A côté de ça tu es tellement abordable, bienveillante et douce qu'on ne peut que t'apprécier. Mon projet avait beau être à l'opposé du tien, tu as toujours pris le temps de répondre à mes questions lorsque j'en avais besoin. Tu es pour moi un exemple de chef d'équipe et j'espère un jour pouvoir faire aussi bien que toi. Je

dois aussi te dire merci pour ces heures de badmintons, ce fût un bon moyen de se défouler/dépenser tout en papotant et progressant évidemment Je n'oublie pas tous nos moments extérieurs au travail et pour tout ça, je vous dis un grand merci à tous les 2.

Je souhaite aussi remercier toutes les personnes travaillant au CRTI : Amédée, Alexandra, Mélanie, Florian, Marion, Alice, Aurore, Laurence, Flora... vous avez vous aussi contribué à l'aboutissement de ce projet que ça soit par des conseils, des blagues, des échanges, des discussions ... alors merci à tous. Je voudrais remercier aussi les membres l'équipe 3 du CRTI qui ont su m'accueillir lors de mes premiers pas dans le laboratoire. Merci pour nos échanges lors des réunions ou entre deux couloirs.

De plus, j'aimerais remercier tous nos collaborateurs qui ont participé à ce projet de thèse ainsi que les membres qui ont participé aux comités de thèse durant la réalisation de ce travail, je pense au Dr Naveilhan et au Dr Dubourdeau.

Je ne peux que finir ces remerciements par ma famille. L'aboutissement de 8 années d'études qui finalement ne sont possible que grâce à vous. Je pense à mon papa, ma maman et mes sœurs. Vous direz que j'ai toujours été la chouchoute et c'est évident puisque je suis la dernière, mais en réalité je vous suis reconnaissante de m'apporter autant de bonheur et d'amour au quotidien. Vous êtes mon pilier, les personnes qui me soutiennent le plus depuis le début et cela m'a permis de toujours aller plus loin. Je pense aussi à mon chéri, Tom. Des années que l'on se connait et que tu me soutiens dans ce projet. Sans toi, l'aventure n'aurait pas été la même. J'imagine que de me supporter au quotidien, surtout dans les dernières semaines, n'a pas été chose facile mais j'espère qu'aujourd'hui tu es fière de moi, moi en tout cas je suis fière de nous et de notre petit bout de chou qui a chamboulé les derniers mois de ma thèse. Je souhaiterais finir en disant un petit mot à mon fils, Eliot. Tu as simplement rempli mon cœur d'un bonheur et d'un amour immense. Ça n'a pas toujours été facile de concilier ma thèse avec toi, mais j'en suis ressorti plus forte et plus déterminée que jamais. J'espère qu'un jour tu liras ces quelques lignes et promis je te raconterais toute l'aventure.

Un grand MERCI à tous.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	2
ABREVIATIONS.....	7
LISTE DES FIGURES.....	9
LISTE DES TABLEAUX.....	10
PREAMBULE	11
INTRODUCTION	14
I. L'inflammation :.....	14
a) Le processus d'inflammation aiguë	15
b) Les acteurs de l'inflammation aiguë.....	18
i. Les médiateurs solubles	18
ii. Les polymorphonucléaires neutrophiles	22
iii. Les macrophages.....	25
iv. Les cellules dendritiques	26
v. L'immunité adaptative	29
II. La résolution de l'inflammation	29
a) Les mécanismes de la résolution	29
i. Inhibition de l'infiltrat leucocytaire.....	29
ii. Induction de l'apoptose des neutrophiles.....	30
iii. Efferocytose	32
b) Les médiateurs lipidiques et les cytokines pro-résolutifs.....	34
i. Les cytokines anti-inflammatoires	34
ii. Les lipoxines	35
iii. Les Résolvines.....	35
iv. La marésine et protectine	37
c) Récepteur couplé aux protéines G (GPCR) : ChemR23	38
i. Expression de ChemR23	38
ii. Les ligands de ChemR23.....	42
1) Chémérine.....	42
2) Résolvine E1.....	44
d) Conclusion	49
III. L'inflammation chronique	50
a) Les maladies inflammatoires chroniques	50
b) L'échec de la résolution de l'inflammation	52
c) Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin	54
i. Physiologie de l'intestin	54
ii. Généralités sur les MICI	56
iii. La rectocolite hémorragique	58
1) Epidémiologie et facteurs de risques.....	58
2) La physiopathologie	59
iv. La maladie de Crohn.....	61
1) Epidémiologie et facteurs de risques.....	61

2) Physiopathologie.....	62
v. Les facteurs immunologiques.....	64
d) Les traitements actuels.....	66
i. Les anti-inflammatoires et les immunomodulateurs	67
ii. Les anti-TNF.....	67
iii. Les anti-intégrines	68
iv. Problématiques	68
OBJECTIFS.....	70
Développement d'un anticorps anti-ChemR23 par la société OSE Immunotherapeutics....	72
RESULTATS	78
RESULTATS COMPLEMENTAIRES	132
I. Le diabète de type 1	132
a) Physiopathologie	132
b) Modèle de souris NOD.....	132
II. La sclérose en plaque	134
a) Physiopathologie	134
b) Le modèle de souris EAE.....	134
DISCUSSION.....	137
PERSPECTIVES.....	146
CONCLUSION	148
ANNEXES	150
BIBLIOGRAPHIE.....	225
RESUME.....	258
ABSTRACT.....	259

ABREVIATIONS

5-ASA : 5-aminosalicylic	ESR: <i>erythrocyte sedimentation rate</i>
AC : adénylate cyclase	fMLP: Formyl-Met-Leu-Phe
ADA : anticorps anti-médicaments	FPR2: <i>formyl peptide receptor 2</i>
Ag : antigène	GLP: <i>good laboratory practices</i>
AIM2 : <i>absent in melanoma 2</i>	GMP : <i>good manufacturing practices</i>
AINS : anti-inflammatoire non stéroïdien	GPCR : récepteur couplé aux protéines G
ALT : Alanine aminotransférase	iDC : cellule dendritique immature
ANCA: <i>anti-neutrophil cytoplasmic antibody</i>	IFN : interféron
AnxA1: Annexine A1	Ig : immunoglobuline
AZA: Azathioprine	IL : interleukine
BAI: <i>Brain-specific angiogenesis inhibitor</i>	ILC : <i>innate lymphoid cells</i>
CLR: <i>C-type lectin receptor</i>	iNOS : <i>inducible nitric oxide synthase</i>
CMC: <i>Chemical Manufacturing and Control</i>	LB : lymphocyte B
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité	LO : lipoxygénase
COX : cyclooxygénase	LP : lamina propria
CPA : Cellules présentatrices d'antigènes	LPS : lipopolysaccharide
CRP : protéine C-réactive	LT : lymphocytes T
DAMP: Damage Associated Molecular Pattern	LTA4/LTB4 : leucotriène A4/B4
db: double brain	LXA4: lipoxine A4
DC : cellules dendritiques	LXR: <i>liver X receptor</i>
DHA : acide docosahexaénoïque	MAI : maladie auto-immune
DSS : <i>Dextran Sulfate Sodium</i>	MaR1 : Marésine 1
EL : boucle extracellulaire	MC : maladie de Crohn
EPA : acide eicosapentaénoïque	MCV : maladie cardiovasculaire
	mDC : cellules dendritique myéloïde
	MIC : maladie inflammatoire chronique
	MICI : maladie inflammatoire chronique de l'intestin

MMP : métalloprotéase
 MoDC : cellules dendritique dérivées de monocytes
 MPO: myeloperoxidase
 NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
 NASH: *Non-alcoholic steatohepatitis*
 NET: *Neutrophil Extracellular Traps*
 NK: *Natural Killer*
 NLR: *NOD like receptor*
 NO: *Nitric oxygen*
 OLS: organe lymphoïde secondaire
 PAF : Facteur activateur des plaquettes
 PAMP: *pathogen associated molecular pattern*
 PD1: protectine D1
 pDC : cellule dendritique plasmacytoïde
 PG: prostaglandine
 PMN: polymorphonucléaire neutrophiles
 PPAR: *peroxisome proliferator activated receptor*
 PR : polyarthrite rhumatoïde
 PRR : *pattern recognition receptor*
 PS : phosphatidylsérine
 RCH : rectocolite hémorragique
 Ri : index de résolution
 RLR: *Rig-I-like receptor*
 ROS: *Reactive Oxygen Species*
 Rv: résolvine
 RvE1: résolvine E1
 S1P: sphingosine-1 phosphate
 SEP: sclérose en plaque
 SPM: médiateur pro-résolutif (*specialized pro-resolutif lipid mediator*)

T2D : diabète de type 2
 TAM: *Tyros3/Axl/Merck*
 TIM: *T cell immunoglobulin mucin*
 TLR: *toll like receptor*
 TNBS: *2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid*
 TNF: *tumor necrosis factor*
 Treg : lymphocytes T régulateur
 VHC/VHB : virus de l'hépatite C et B
 VIH : virus de l'immunodéficience humaine
 VIS : virus de l'immunodéficience simienne
 VS: vaisseaux sanguins

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les phases de l'inflammation.	15
Figure 2 : Mode d'action des neutrophiles.	23
Figure 3 : Action de l'adénosine sur les neutrophiles.	25
Figure 4 : Les voies d'activation intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.	31
Figure 5 : Les signaux « trouvez-moi » et « mangez-moi » nécessaire à l'efferocytose.	33
Figure 6 : La synthèse des lipides médiateurs de la résolution de l'inflammation.	38
Figure 7 : Structure de ChemR23.	40
Figure 8 : Les voies de signalisation au travers ChemR23.	41
Figure 9: Les voies de synthèses de la RvE1.	45
Figure 10 : tableau récapitulatif des multiples rôles des SPM.	49
Figure 11 : La boucle des maladies inflammatoires chroniques.	52
Figure 12 : Echec de la résolution de l'inflammation.)	54
Figure 13 : Les différentes couches de la paroi du tube digestif.	55
Figure 14 : Le processus physiologique d'inflammation dans le côlon.	56
Figure 15 : Les facteurs influençant les MICI.	57
Figure 16 : La physiopathologie de la rectocolite hémorragique.	60
Figure 17 : Les différentes classes de sévérité de la RCH.	61
Figure 18 : La physiopathologie de la maladie de Crohn.	63
Figure 19 : Les macrophages et les neutrophiles impliqués dans les MICI. (	65
Figure 20 : Pyramides de traitements dans les MICI.	66
Figure 21 : Action des anticorps anti-ChemR23 commerciaux.	72
Figure 22 : Etude de l'efficacité in vitro de variants chimériques anti-ChemR23 sur des DC de souris.	73
Figure 23 : Etude de l'efficacité in vitro des variants chimériques anti-ChemR23 sur des macrophages humains.	74
Figure 24 : Etude d'affinité de liaison des anticorps anti-ChemR23 en cours d'humanisation.	75
Figure 25 : Etude de l'affinité de liaison des anticorps de la troisième vague d'humanisation.	75
Figure 26 : Etude de l'efficacité in vitro des anticorps humanisés sur l'induction de mortalité des neutrophiles.	76
Figure 27 : L'αChemR23 ralentit le développement du diabète de type 1 chez la souris NOD.	133
Figure 28 : l'utilisation d'un anticorps αChemR23 accélère la phase de récupération dans le modèle d'EAE.	135
Figure 29 : l'anticorps anti-ChemR23 réduit la sévérité de la pathologie.	136

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Illustration des principaux DAMPs et PAMPs stimulant l'inflammation ...	17
Tableau 2 : Récapitulatif des principaux médiateurs solubles de l'inflammation	21
Tableau 3 : Classification des cellules dendritiques	28
Tableau 4 : Récapitulatif des effets biologiques de la Résolvine E1	47

PREAMBULE

Les maladies non-transmissibles, qui regroupent les inflammations chroniques et les maladies inflammatoires chroniques (MIC) tuent, de nos jours, 41 millions de personnes par an, ce qui équivaut à **71 %** de la mortalité globale. Parmi elles, 1,7 millions sont des jeunes adultes de moins de 30 ans et 15,2 millions sont âgés entre 30 et 70 ans [1]. On dénombre environ 50 MIC différentes dont les **maladies cardiovasculaires** (MCV) (17 millions de décès/an), le **cancer** (9 millions de décès/an), les **maladies respiratoires chroniques** (3,8 millions de décès/an) et le **diabète** (1,6 millions de décès/an) ont la plus grande incidence et mortalité dans le monde. En effet, ces quatre pathologies représentent à elles seules, 80 % de la mortalité due au MIC. Les pays à faible et intermédiaire développement dénombrent la plus grande mortalité avec 78% de mortalité causée par les MIC. De plus, l'incidence de mortalité dans ces pays est plus élevée avec 22% de risques de mourir pour les patients actuels, ce que représente 2 fois plus que dans les pays à fort revenus (12%). Les plus grandes incidences de mortalité sont observées dans les régions Africaines (22%), l'est de la méditerranée (24%) et l'Asie du sud-est (23%). Dans les pays à forts revenus, l'incidence de mortalité est plus faible : l'Amérique (15%), l'Europe (17%) et le pacifique ouest (16%). Les pays en voie de développement sont donc les plus touchés par l'émergence de ces MIC. Ceci s'explique par l'urbanisation de ces pays, avec des problèmes socioéconomiques et de communications sur ces pathologies ainsi que l'accès récent à de la nourriture rapide (*Fast-food*) et les changements d'hygiène. En effet, en 1990 on estimait à 47 % le pourcentage de maladies non-transmissibles alors que désormais son estimation est de 69 %, dont les MCV comme affection principale dans ces pays [2–4]. Toutefois, la mortalité causée par les MCV semble diminuer, alors que, à l'inverse la prévalence du diabète (type 1 et type 2) ne cesse d'augmenter passant de 4,7 % en 1980 à 8,5 % en 2014 [5,6]. On estime à 578 millions le nombre de cas en 2030 alors qu'il n'y en avait que 194 millions en 2003 et 463 millions en 2019. L'Inde dénombre la plus grande prévalence avec une estimation de 79,4/100 000 en 2030. Ces MIC sont induites par 4 facteurs de risques majeurs : le tabac, l'alcool, l'inactivité physique et le régime alimentaire [7].

Chaque MIC est unique avec des atteintes tissulaires et des mécanismes physiopathologiques différents les uns des autres. On distingue, par exemple, le diabète de type 1 qui est une attaque du pancréas alors que les MCV sont des atteintes des vaisseaux sanguins ou du muscle

cardiaque [8]. Néanmoins, ces inflammations chroniques sont toutes des attaques du système immunitaire contre des antigènes du soi décrites dans les maladies auto-immunes, ou contre des bactéries de la flore microbienne ou encore provoqué par l'exposition prolongée à des irritants (Amiante). De plus, il existe des comorbidités importantes pour chaque MIC. Ceci rend donc difficile la mise en place de traitement compte tenu de l'étendu des différences physiopathologiques et des attaques systémiques de chaque MIC. Toutefois, ces MIC sont caractérisées par l'infiltration massive de leucocytes (LT, NK, neutrophiles) engendrant la sécrétion de grandes quantités de cytokines dont le $TNF\alpha$, l'IL-6 ou l'IFN. Ces cytokines de l'inflammation servent de biomarqueurs pour le diagnostic d'inflammation chronique mais aussi de stratégies thérapeutiques [9]. Les traitements actuels visent principalement à diminuer l'initiation de l'inflammation, avec l'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (Ibuprofène, Aspirine), ou bien de stéroïdes tels que les corticostéroïdes. D'autres stratégies ciblent les cytokines de l'inflammation, c'est le cas des anti- $TNF\alpha$ qui sont les traitements de références pour de nombreuses MIC. Ceci permet donc de diminuer l'inflammation mais pas de la résoudre. De plus, une grande partie des patients ne répondent pas à ces traitements ou acquièrent une résistance secondaire [10] et les répondeurs vivent avec des traitements à vie liés à de nombreux effets secondaires non négligeables [11]. De nouvelles stratégies doivent être élaborées afin de combler ses impasses thérapeutiques et améliorer le quotidien des patients.

Récemment, le concept de résolution de l'inflammation a été mis en évidence. Ce mécanisme actif a pourtant été décrit pour la première fois en 1907 par E.Opie, découvrant la clairance des polymorphonucléaire neutrophiles et la persistance des mononucléaires sur le site inflammatoire sans comprendre le mécanisme [12]. Ce processus a longtemps été considéré comme passif jusqu'en 1997 où alors C.Serhan et son équipe découvrent de nouveaux médiateurs lipidiques (SPM) impliqués dans la résolution de l'inflammation [13,14]. Ils décrivent 4 grandes classes de médiateurs lipidiques avec pour action de **1)** diminuer le recrutement cellulaire, **2)** d'induire l'apoptose des neutrophiles puis leur **3)** clairance par le mécanisme d'efferocytose médiée par les macrophages [15,16]. Désormais, l'échec de la résolution de l'inflammation est associée à de nombreuses maladies inflammatoires chroniques [17,18]. Compte tenu des découvertes sur ces médiateurs lipidiques, leurs actions et leurs cibles, ainsi que leurs rôles dans la chronicité de l'inflammation de nouvelles stratégies peuvent être imaginées [19].

L'objectif de ma thèse a été d'étudier et de caractériser le potentiel thérapeutique d'un agoniste des voies de la résolution de l'inflammation à l'aide d'un anticorps agoniste anti-ChemR23. Ce récepteur, ciblé par la Résolvine E1 (RvE1), joue un rôle important dans la résolution de l'inflammation et il a déjà, sous l'action agoniste de la RvE1, démontré des effets prometteurs dans certains modèles de MIC [20–23]. Cependant, l'utilisation de la RvE1, bien que prometteuse chez l'animal, ne permet qu'un traitement court puisque sa demi-vie et sa pharmacocinétique ne sont pas optimal compte tenu de sa structure lipidique. Ceci contraint les patients à recevoir une injection journalière et donc l'identification d'un anticorps agoniste de ChemR23 avec une pharmacocinétique meilleure que celle de la RvE1 semble prometteur comme stratégie thérapeutique.

INTRODUCTION

I. L'inflammation :

L'inflammation est une réaction physiologique de l'organisme confronté à un agent infectieux, une lésion ou un traumatisme tissulaire entraînant une rupture de l'homéostasie. Ce processus vise à éliminer l'agent inflammatoire par différents mécanismes puis rétablir l'homéostasie tissulaire. C'est en 1500 avant J-C que les premières descriptions de pathologies inflammatoires et de leurs remèdes sont mentionnées dans les papyrus d'Edwin Smith. Ce papyrus décrit, pour les premières fois, une cinquantaine de blessures de guerre avec leurs pronostics de survie et leurs traitements. Par la suite, Aulus Celsus, médecin romain du 1^{er} siècle, définit les premiers 4 signes cardinaux de l'inflammation : la rougeur, le gonflement, la chaleur et la douleur [24]. Puis, cette définition est complétée avec la notion d'impotence fonctionnelle par Virchow en 1858. Et c'est en 1899 que Friedrich Bayer commercialise l'Aspirine®, le premier traitement pour contrer les effets douloureux de l'inflammation.

L'inflammation a longtemps été perçue comme un mécanisme néfaste, pour finalement s'avérer être un processus indispensable pour le maintien du bon fonctionnement du corps humain. Ce processus d'inflammation se répartit en 3 grandes phases [15] : (Fig. 1)

- Une phase d'initiation avec la reconnaissance de l'agent causal.
- Une phase d'amplification qui induit la prolifération cellulaire et l'élimination de l'agent inflammatoire.
- Une phase de résolution qui tend à réparer le tissu atteint et conduit à un retour à l'homéostasie tissulaire.

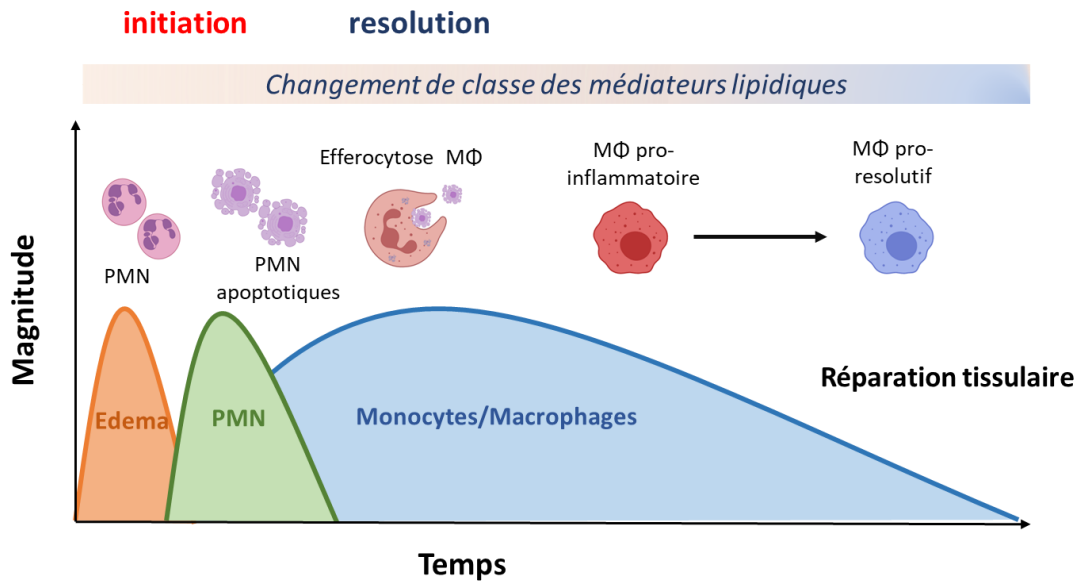


Figure 1 : Les phases de l'inflammation. L'inflammation est subdivisée en 3 grandes phases dont l'initiation et l'amplification cellulaire permettent l'afflux de PMN sur le site inflammatoire à la suite d'une réaction vasculo-exsudative dont la formation d'œdème facilite cette migration. Après avoir joué leur rôle les neutrophiles entrent en apoptose et permettent l'attraction de monocytes sur site. Les macrophages vont alors phagocyter les PMN apoptotiques et débiter la dernière phase de l'inflammation : la résolution de l'inflammation ainsi que la réparation tissulaire. Tout ceci est orchestré par le changement des lipides pro-inflammatoires en lipides pro-résolutifs. (Adaptée de Sansbury & Spite, 2017)

Ces 3 phases agissent lors d'une inflammation aiguë et mettent en jeu différents acteurs cellulaires que nous décrirons plus en détail dans les prochaines sous parties.

a) Le processus d'inflammation aiguë

À la suite d'une agression externe, une inflammation de type aiguë se met en place. Elle est généralement de courte durée, d'installation très rapide et se guérit spontanément. C'est un processus dynamique divisé en plusieurs étapes. La première phase de l'inflammation est une réaction vasculo-exsudative qui comporte 3 phénomènes : 1) une **congestion active** qui se traduit par une vasodilatation des vaisseaux sanguins (VS) de la zone atteinte. Il en résulte une augmentation de l'apport sanguin et un ralentissement du courant circulatoire de la zone agressée, qui favorise le recrutement cellulaire. 2) un œdème inflammatoire se forme, engendré par le passage d'eau et de protéines plasmatiques appelé **exsudat** dans le tissu conjonctif. 3) la **diapédèse leucocytaire** qui correspond à la migration des leucocytes des VS vers le foyer lésionnel [25].

Durant la réaction vasculo-exsudative, de nombreux médiateurs lipidiques ainsi que des cytokines et chimiokines sont sécrétés provoquant le recrutement des cellules de l'immunité sur le site inflammatoire. La deuxième phase de l'inflammation est donc une **phase cellulaire**, avec la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP, *Pathogene Associated Molecular Pattern*) ou de motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires (DAMP, *Damage Associated Molecular Pattern*) par les récepteurs de reconnaissance de motifs (PRR, *Pattern Recognition Receptor*) tels que les TLR, NLR, RLR, CLR et AIM2 exprimés par les cellules résidentes tissulaires [26,27]. Parmi ces cellules résidentes, les macrophages et les cellules dendritiques (DC) jouent un rôle primordial en phagocytant l'agent pathogène ou la cible cellulaire et en sécrétant à leur tour, des cytokines et chimiokines permettant le recrutement d'autres cellules de l'immunité. Les premières cellules recrutées sont les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN). Ces cellules assurent la première ligne de défense de l'organisme avec pour rôle la phagocytose et la destruction de la cible. Dans un second temps, les macrophages ainsi que les DC sont recrutés et pour finir l'immunité adaptative est activée permettant l'élimination définitivement de l'agresseur.

Il existe 2 grands types d'inflammation, **1)** une inflammation de type viral ou bactérien avec reconnaissance de PAMP par les PRR, ou **2)** une inflammation médiée par des DAMPs reconnus par les PRR et appelé inflammation stérile [28]. Les PAMPs sont des motifs antigéniques exprimés par les bactéries ou les virus et reconnus par les PRR des cellules immunitaires (tableau 1). Cela permet d'induire une réaction inflammatoire afin de lutter contre une infection. Les DAMPs, à l'inverse, sont des facteurs endogènes relargués à la suite d'une mort cellulaire par nécrose, par des agents irritants [29], ou lors de maladies inflammatoires chroniques (goutte, Alzheimer [30], athérosclérose [31]) provoquant, comme les PAMPs, l'activation du système immunitaire par les PRR (tableau 1). Ces 2 types d'inflammations activent les mêmes PRR et les mêmes voies moléculaires en aval, contribuant à l'induction d'une réaction finale identique.

Ce manuscrit traitera de ces 2 types d'inflammations de façon commune.

Tableau 1 : Illustration des principaux DAMPs et PAMPs stimulant l'inflammation

	Motifs	PRR	Type cellulaire associé
DAMPs	HMGB1, HSPs	TLR2/4, RAGE CD24, CD91	Nécrose, traumatisme cellulaire
	Acide urique	NLRP3	Goutte
	β -amyloïde	NLRP3, CD36, RAGE	Maladie Alzheimer
	IL-1 α	IL-1R	Nécrose, traumatisme cellulaire
	IL-33	ST2	Nécrose, traumatisme cellulaire
	ADN	TLR9	Nécrose, traumatisme cellulaire
	Hyaluronane, biglycane, versicane, héparane sulfate	TLR2, TLR4	Nécrose, traumatisme cellulaire
PAMPs	LPS	TLR4	Bactéries gram négatif
	Lipoprotéines, lipopeptides	NLR, TLR2	Bactéries
	Mannose	Récepteurs aux mannoses	Bactéries, levures
	Peptidoglycane, acides lipotéchoïques	TLR2	Bactéries gram-positif
	Flagelline	TLR5	Bactéries gram-positif
	Acides nucléiques (ARN, ADN)	TLR3, TLR7, TLR8	Bactéries, virus

En phase terminale, une fois l'agent inflammatoire éliminé par ces cellules de l'immunité, les débris résiduels doivent être nettoyés et le tissu doit retrouver une fonction et une architecture d'origine. À la suite de certains signaux gouvernés par des lipides et cytokines pro-résolutifs, les neutrophiles entrent en apoptose sur le site inflammatoire où ils sont alors phagocytés de façon non-phlogistique (sans induire d'inflammation) par les macrophages [15,32]. En effet, il existe plusieurs médiateurs solubles et cellulaires jouant un rôle dans l'inflammation puis sa **résolution**, décrits ci-dessous.

b) Les acteurs de l'inflammation aiguë

i. Les médiateurs solubles

L'activation des PRR par les différents DAMP et PAMP conduit à la synthèse de médiateurs de l'inflammation par les cellules cibles. Ces médiateurs solubles ont pour but de recruter et d'activer les cellules sur le foyer lésionnel. Ils sont subdivisés en 7 grandes classes : les amines vasoactives, les peptides vasoactifs, les composés du complément, les enzymes protéolytiques, les médiateurs lipidiques et les cytokines et chimiokines (tableau 2) [33].

Parmi les **amines vasoactives**, on distingue l'**histamine** et la **sérotonine** qui sont sécrétées par les mastocytes résidents. L'histamine augmente la perméabilité vasculaire et permet la contraction des muscles lisses localement [34,35].

Les **peptides vasoactifs** comprennent les **kinines** (bradykinine) et les **fibrinopeptides**, qui ont pour rôle la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité vasculaire. La bradykinine participe aussi à la sensation de douleur lors de l'inflammation [36–38].

Les **facteurs du complément** C3a, C4a et C5a aussi connu sous le nom d'**anaphylatoxines**, sont des polypeptides issus respectivement du clivage du C3, C4 et C5 de la voie du complément. Le C3a a pour rôle d'augmenter la perméabilité vasculaire, alors que le C5a est une puissante chimiokine pour les polynucléaires et un inducteur de la production de l'interleukine (IL)-1 par les macrophages [39].

Les **enzymes protéolytiques**, parmi elles les **défensines** et **cathepsines** [40,41], sont capables de s'insérer dans les membranes bactériennes et d'induire leur lyse. Les **métalloprotéases** (MMP), quant à elles, jouent un rôle dans la réparation tissulaire et la migration leucocytaire en dégradant tous les composants de la matrice extra-cellulaire [42,43].

Les **médiateurs lipidiques** pro-inflammatoires comptant les **eicosanoïdes** et le **facteur activateur des plaquettes** (PAF), sont des dérivés de phospholipides membranaires. Sous l'action du TNF- α , la phospholipase A2 est activée et induit la transformation des acides gras membranaires en acide arachidonique. La dégradation enzymatique de l'acide arachidonique, par les enzymes lipoxygénases permet la production de leucotriènes (LTA4, LTB4), alors que lorsqu'il est dégradé par les cyclooxygénases celles-ci permettent la production de prostaglandines (PG) (PGE2, PGD2) et de thromboxanes [44–46]. Il existe 2 types de cyclooxygénases : la COX1 qui est constitutive et assure l'agrégation plaquettaire, la protection des muqueuses gastro-duodénales et la régulation du flux sanguin rénal ; et la COX2 qui

s'active seulement lorsque les phagocytes sont dans des conditions inflammatoires [47,48]. Le PAF, quant à lui, est généré par l'acétylation de l'acide lysophosphatidique [49]. Ces médiateurs lipidiques inflammatoires ont pour rôle d'activer l'immunité innée, d'induire le recrutement des leucocytes, d'augmenter la vasodilatation et la perméabilité vasculaire.

Les cytokines et les chimiokines pro-inflammatoires jouent un rôle dans chacune des étapes de l'inflammation. Les cellules inflammatoires sont à la fois émettrices et réceptrices de ces cytokines et chimiokines. Elles sont capables d'agir localement ou en systémique et peuvent avoir un rôle dans la croissance, la différenciation, la migration et l'activation cellulaire. Les cytokines permettent d'orienter la réponse inflammatoire en fonction de leur nature. Une centaine de cytokines sont à ce jour décrites, nous parlerons ici des 3 cytokines les plus importantes lors de l'inflammation [50,51]:

- IL-1 (α ou β) sécrétée par de nombreuses cellules (leucocytes, cellules endothéliales, fibroblastes ...). Elle stimule l'expression de molécules d'adhésion au niveau de l'endothélium favorisant la migration cellulaire. Un de ses rôles les plus importants est l'induction de la fièvre en agissant directement sur le centre de l'hypothalamus qui contrôle la température corporelle, provoquant une accélération de la prolifération des lymphocytes [52,53].
- IL-6, produite majoritairement par les phagocytes (macrophages et DC) et les cellules endothéliales, conduit localement à l'activation des phagocytes et la modification de l'endothélium. De plus, elle favorise le recrutement des monocytes et la production de protéines de la phase aiguë (dont la CRP) [54,55].
- Le $\text{TNF}\alpha$ sécrété par les macrophages, les DC, les lymphocytes T et les mastocytes stimule l'expression des molécules d'adhésion et la production de chimiokines par les cellules endothéliales permettant le recrutement de neutrophiles, monocytes et NK (*Natural Killer*). De plus, il conduit à la prolifération des lymphocytes T et B induisant une réponse adaptative et il permet la production de facteurs de croissances indispensables à la réparation tissulaire [56,57].

D'autres cytokines sont produites telles que l' $\text{IFN}\alpha$ qui induit la production de molécules antivirales, ou encore l'IL-12 et l'IL-18 qui vont activer les NK. Ces cytokines jouent donc un rôle primordial pour orchestrer la réponse immunitaire et limiter la diffusion de l'inflammation.

Les chimiokines sont des cytokines avec un pouvoir chimiotactique permettant d'orienter la migration cellulaire [58]. Elles sont sécrétées par de nombreuses cellules sentinelles et forment

un gradient qui permet de diriger la migration leucocytaire vers le tissu où elles sont sécrétées. Il existe 4 grandes familles de chimiokines, parmi lesquelles on distingue les chimiokines CXCL8, CXCL10, CXCL1, 2 et 3, ainsi que le CCL2 ou le CCL5. Ces chimiokines sont produites principalement par les monocytes, l'endothélium ou les fibroblastes et ciblent de nombreux récepteurs [50,59]. En outre, les neutrophiles sont attirés par un gradient de CXCL8 (IL-8) reconnu par les récepteurs CXCR1 et 2, induisant un flux massif et rapide des polynucléaires neutrophiles dans le tissu endommagé [60].

Tableau 2 : Récapitulatif des principaux médiateurs solubles de l'inflammation

Classes	Acteurs	Cellules sécrétrices	Rôles
Amines vasoactives	Histamine	Basophiles, mastocytes, plaquettes	Vasodilatation, perméabilité vasculaire, douleur
	Sérotonine	Mastocytes, plaquettes, neurones	Vasodilatation, neurotransmetteur
Peptides vasoactifs	Bradykinine	Hépatocytes	Perméabilité vasculaire, douleur, vasodilatation
	Fibrinopeptide	Hépatocytes	Chimiotactisme, synthèse de cytokines
Facteurs du complément	C3a	Hépatocytes	Perméabilité vasculaire, chimiotactisme
	C4a	Hépatocytes	Phagocytose, cytolyse
	C5a	Hépatocytes	Perméabilité vasculaire, chimiotactisme
Enzymes protéolytiques	Défensine	PMN, monocytes, LT	Dégradation protéolytique, chimiotactisme
	Cathepsine	Ubiquitaire (lysosome)	Dégradation protéolytique
	MMP	Ubiquitaire	Dégradation protéolytique
Lipides pro-inflammatoires	PG (E2, F2, D2, I2)	Ubiquitaire	Vasodilatation, fièvre, douleur
	Thromboxane	Ubiquitaire	Vasoconstriction, agrégation plaquettaire
	Leucotriène	Plaquettes, leucocytes	Perméabilité vasculaire, chimiotactisme PMN
	PAF	Plaquettes, mastocytes, PMN	Perméabilité vasculaire, agrégation plaquettaire, chimiotactisme PMN
Cytokines	TNF α	Macrophages, LT, DC	Fièvre, adhésion, activation leucocytaire, production de cytokines et chimiokines
	IL-1	Macrophages, LT, DC	
	IL-6	Macrophages, LT, DC	Fièvre, prolifération LT et LB
Chimiokines	CXCL8	Macrophages, endothélium, fibroblastes	Chimiotactismes neutrophiles
	CXCL10	Monocytes, LT, fibroblastes, endothélium	Chimiotactisme monocytes, NK
	CCL2	Monocytes, macrophages, fibroblastes	Chimiotactisme macrophages, basophiles
	CCL5	LT, endothélium, plaquettes	Chimiotactisme basophiles, LT

ii. Les polymorphonucléaires neutrophiles

Les polymorphonucléaires neutrophiles sont des cellules plurilobées représentant 55 à 70 % des leucocytes du sang. Ces cellules sont décrites pour avoir une durée de vie très courte, environ 7 heures [61], dans des conditions non-inflammatoires. Les PMN sont générés à partir de cellules souches hématopoïétiques et contrôlés par l'hormone de croissance G-CSF [62,63] dans la moelle osseuse, où ils sont ensuite majoritairement stockés dans l'attente d'un signal de danger. Lors du processus d'inflammation, les neutrophiles « réservoir » sont libérés et migrent vers le tissu inflammé. Ces PMN, par leur facilité migratoire et d'accès à tous les organes, sont les premières cellules recrutées sur le site infectieux et jouent un rôle majeur dans la lutte antimicrobienne. La migration des neutrophiles est induite pour un gradient de chimiokines IL-8 mais aussi par les leucotriènes, les prostaglandines et le fragment C5a du complément. De plus, les composants bactériens tels que le fMLP (Formyl-Met-Leu-Phe) ou le peptidoglycane contribuent à leur recrutement. Une fois sur le site infectieux, les neutrophiles participent activement à l'élimination des pathogènes. Quatre grands mécanismes utilisés par ces PMN sont décrits [64] (Fig. 2) :

- La **phagocytose**, qui se fait par opsonisation ou non, des débris cellulaires et des microorganismes [65]. Elle permet l'élimination du pathogène et le nettoyage du tissu. La dégradation du pathogène ingéré conduit aux 2 mécanismes suivants.
- La **génération de ROS** (*Reactive Oxygen Species*) par la NADPH oxydase. Cette enzyme permet la réduction du dioxygène (O_2) en ion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) qui sera converti en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Une autre enzyme, la myéloperoxydase (MPO) convertit l' H_2O_2 en HOCl. L' $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 et HOCl sont des ROS responsables du stress oxydant et permettent la destruction du pathogène [66]. Cette production de ROS doit être contrôlée afin d'éviter un effet délétère sur les tissus.
- La **dégranulation** de protéines enzymatiques. Il existe 4 types de granules : **1)** les granules primaires ou azurophiles contenant les défensines, la MPO ou les cathepsines, **2)** les granules spécifiques avec les phosphatases alcalines, la lactoferrine, le lysozyme, la NADPH oxydase, les cathélicidines ou les collagénases, **3)** les granules tertiaires avec la gélatinase et **4)** les vésicules sécrétrices d'albumine. La dégranulation de ces vésicules dans les phagolysosomes ou en extracellulaire est dépendante de signaux extracellulaires induits par un microorganisme tels que l'activation de la β -arrestine ou des Rho récepteurs [67].

- La **NETose** (*Neutrophil Extracellular Traps*) qui est définie par l'expulsion de filaments d'ADN, provenant du noyau et des mitochondries des neutrophiles, vers l'extérieur, permettant d'emprisonner puis de dégrader les microorganismes (bactéries, virus, parasites, fongique) hors de la cellule [68–70]. Les NET ne sont pas constitués uniquement d'ADN, ils comprennent aussi des histones, des sérines protéases, de la MPO, des cathelicidines, défensines, calprotectines et de l'actine. Ce relargage apparaît soit **1)** à la suite du processus de mort cellulaire donc dans les 3 à 8 heures après la stimulation des PMN [71], soit **2)** dans la minute après l'exposition à *S.aureus* [72].

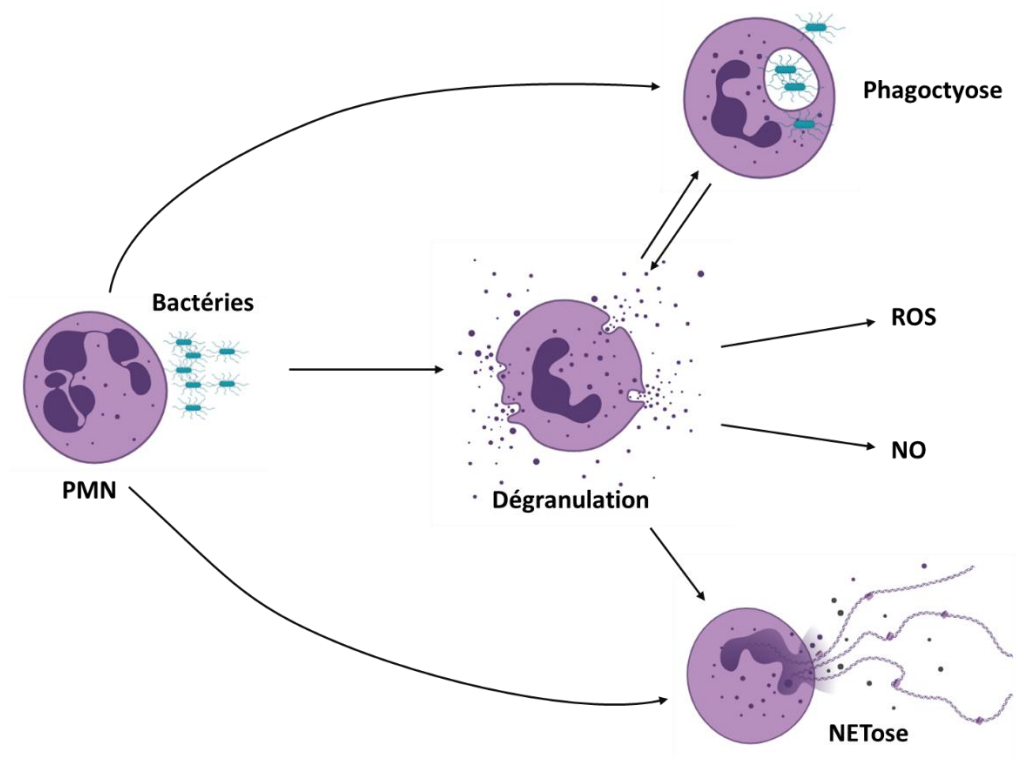


Figure 2 : Mode d'action des neutrophiles. L'activation des PMN par un stimulus extracellulaire provoque 3 mécanismes de défenses dont la phagocytose de l'agent inflammatoire afin de l'éliminer, la dégranulation de protéines enzymatiques permettant la lyse du stimulus et la formation de NET ayant pour but d'emprisonner puis de dégrader le pathogène. (Adaptée de Bonomo, 2015).

Lors de l'activation des neutrophiles sur le site inflammatoire, un grand nombre de médiateurs de l'inflammation sont sécrétés, tels que des cytokines ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$), des chimiokines (CXCL8, CCL3) mais aussi des facteurs de croissance (G-CSF, GM-CSF) et des médiateurs lipidiques (LTB_4 , PGE_2). Ceci permet d'orchestrer la réponse immunitaire en recrutant d'autres cellules de l'immunité (monocytes, DC) et en amplifiant la fonction propre du neutrophiles (production de ROS, de lipides pro-inflammatoires). Il a aussi été démontré que

les PMN peuvent avoir un rôle dans l'immunité adaptative en acquérant des propriétés de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) permettant ainsi d'activer les lymphocytes T (LT) et B (LB) [73]. En effet, dans un modèle de colite induite par transfert de LT, les neutrophiles infiltrant le côlon présentent une augmentation de l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II et CD86, leur permettant d'induire la prolifération des LT [73,74].

Ces neutrophiles ont donc un rôle primordial dans les premières phases de l'inflammation, mais ils sont aussi un acteur majeur dans l'arrêt de cette inflammation. Si la réaction inflammatoire est importante, sa régulation et sa résolution le sont tout autant [75]. Pour cela les neutrophiles doivent entrer en apoptose et laisser place aux macrophages. L'inhibition de l'action des neutrophiles se fait principalement à l'aide d'une molécule nommée l'**adénosine**. L'adénosine se fixe à son récepteur A_{2A} et provoque un changement majeur dans le profil de sécrétion des médiateurs lipidiques des PMN [76]. Dans les premières étapes de l'inflammation, les neutrophiles convertissent l'acide arachidonique en LTB₄ grâce à l'enzyme 5-lipoxygénase (LO). Lorsque l'adénosine agit sur le neutrophile, elle empêche la translocation de la 5-LO et potentialise l'expression de la COX-2 reconnue comme source majeure de PGE₂, un lipide anti-inflammatoire (Fig. 3) [77]. Cette molécule est associée à d'autres fonctions du neutrophiles qui sont, d'inhiber l'adhérence à la paroi endothéliale, la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, ainsi que l'explosion oxydative et la dégranulation [76]. De plus, les neutrophiles sont connus pour participer à la synthèse de nombreux médiateurs lipidiques pro-résolutifs (SPM ; décrits dans la sous partie II-b), provoquant le retour à l'homéostasie [78]. Une fois ce rôle pro-résolutif des neutrophiles enclenché, ces derniers sont éliminés *via* le mécanisme d'apoptose [79,80]. Ces PMN apoptotiques sont ensuite phagocytés par les macrophages pro-résolutifs du site inflammatoire [81].

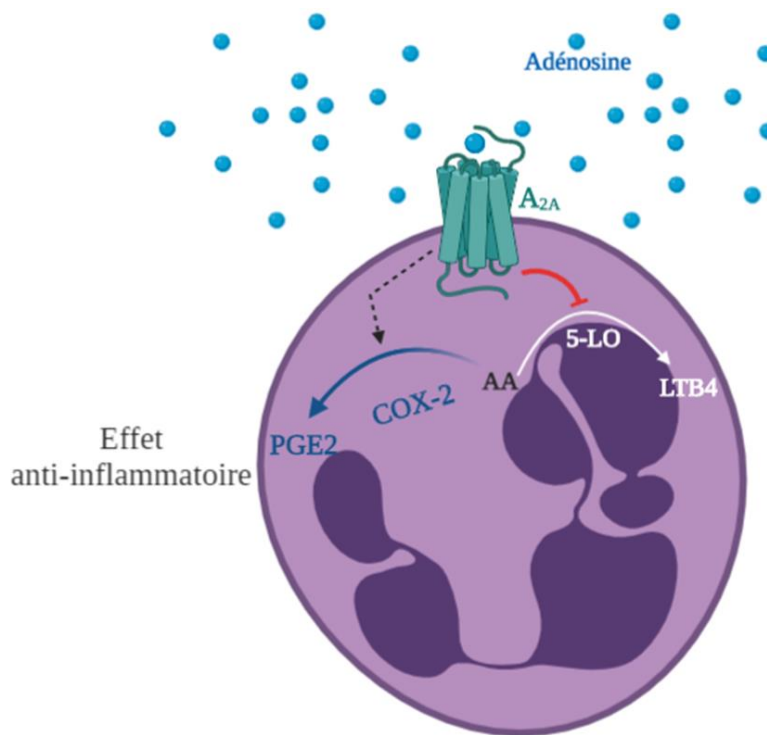


Figure 3 : Action de l'adénosine sur les neutrophiles. La liaison de l'adénosine à son récepteur A_{2A} conduit à l'activation de l'enzyme COX-2 permettant la synthèse de lipide anti-inflammatoires et à l'inverse inhibe l'enzyme 5-LO et par conséquent la formation de lipide pro-inflammatoire par les neutrophiles.

iii. Les macrophages

Les macrophages sont des cellules d'une grande plasticité que l'on retrouve dans chaque tissu humain et qui sont nécessaires à l'homéostasie tissulaire. Ces cellules jouent un rôle dans le développement, l'immunité innée et la réparation tissulaire. Les macrophages résidents, dérivés de macrophages embryonnaires, jouent un rôle de cellules sentinelles afin de protéger l'organisme d'une infection ou d'une inflammation stérile. De par leur grande plasticité, les macrophages ont longtemps été divisés en 2 grandes catégories en fonction de leur statut « inflammatoire », avant que les récentes technologies (ex : scRNAseq) n'illustrent leurs très grande hétérogénéité et plasticité dans les tissus [82,83]. Initialement, on distinguait, les macrophages M1 dits pro-inflammatoires qui répondent à l'IFN γ , et les macrophages M2 dits pro-résolutifs qui répondent à l'IL-4 et l'IL-13 [84]. Les macrophages pro-inflammatoires se distinguent par l'expression des marqueurs CD86, iNOS et le CMH de classe II, et par leur capacité à relarguer des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-12, IL-23, TNF α , mais aussi des agents oxydants (NO, O $^{2-}$) [85]. Ces caractéristiques leur permettent de lyser l'agent

inflammatoire par les radicaux libres, d'induire le recrutement des LT de type Th1 par les cytokines IL-12 et IL-23 [86], et des neutrophiles par les chimiokines CXCL1 et CXCL2 assurant ainsi une défense antibactérienne et virale. Une fois le microorganisme éliminé à l'aide des macrophages et des autres cellules de l'immunité, il est important de résoudre l'inflammation. Pour cela les macrophages pro-inflammatoires subissent soit le phénomène d'apoptose soit une repolarisation vers des macrophages dit pro-résolutifs. Ces macrophages pro-résolutifs, facilitent la réparation tissulaire [87]. Leur action majeure est le nettoyage des débris cellulaires par **efferocytose**. L'efferocytose est une phagocytose sans inflammation [81], permettant ainsi d'éliminer les débris cellulaires, comme les neutrophiles apoptotiques, sans produire de cytokines pro-inflammatoires. Au contraire, ces macrophages vont augmenter leur sécrétion de cytokines anti-inflammatoires, telles que l'IL-10 ou le TGF β , l'expression de marqueurs qui favorisent l'homéostasie comme le CD200R et le CD47, l'expression du CD163, de l'arginase 1 favorisant le profil anti-inflammatoire, et des facteurs de transcription PPAR γ (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma*) et LXR (*Liver X receptor*) activant ces macrophages, ainsi que la synthèse de lipides pro-résolutifs (résolvines, protectines...) [85]. De plus, les macrophages de type M2 sécrètent de nombreuses chimiokines (CCL17, CCL22) qui conduisent au recrutement de LT Th2 qui régulent la lutte antiparasite et les allergies [86]. Les macrophages sont donc des acteurs clés, qui par leur grande plasticité vont permettre l'élimination du pathogène ainsi que la réparation tissulaire nécessaire pour retrouver une homéostasie du tissu.

iv. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques font partie de l'immunité innée et permettent d'activer l'immunité adaptative par leur propriété de CPA. Ces cellules sont subdivisées en 2 classes : les cellules résidentes qui se trouvent en permanence dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS) et sont dites immatures (iDC) et les cellules migratoires qui sont localisées dans les tissus et peuvent migrer vers les ganglions lymphatiques drainants lors d'une inflammation. Ces 2 populations de DC ont pour point commun l'expression constitutive du CMH de classe II et la capacité de stimuler les LT naïfs. Une autre classification met en lumière 3 classes de DC issu de la circulation sanguine : les DC plasmacytoïdes (pDC) qui représentent une petite proportion des DC et permettent la sécrétion d'IFN α , les DC myéloïdes (mDC) qui sont associées au processus de présentation antigénique et les DC dérivées de monocytes (MoDC) qui sont les DC inflammatoires et expriment le CD14+ [88–90]. Les mDC ont un potentiel unique par leur multi-localisation (organes lymphoïdes et non lymphoïdes), leur présentation antigénique

puissante, leur pouvoir de migration vers les OLS et leur capacité d'activer les LT naïfs. Ces cellules se distinguent des autres leucocytes par l'expression du CD1a, du CD141, ainsi que du CMH II et des facteurs de transcriptions IRF4 et 8. Les mDC du sang sont les précurseurs de nombreuses sous catégories de DC en fonction de leur localisation et de leurs marqueurs d'expressions à la surface cellulaire : les CD141+/IRF8 (mDC1) ou CD1c+/IRF4 (mDC2) pour les mDC résidentes des tissus (intestin, poumon), les CD1a+/ EpCAM- ou CD1a+/EpCAM+ pour les cellules résidentes des OLS (rate, ganglions) et les CD1a+ pour les cellules de la peau (cellules de Langerhans) (tableau 3) [90]. Lors d'une lésion tissulaire, les mDC immatures du sang et les DC dérivées de monocytes (CD14+) phagocytent de nombreux pathogènes induisant leur maturation ainsi que la sécrétion de cytokines (IFN γ , III, IL-6, IL-12) et l'acquisition du récepteur aux chimiokines CCR7 [91]. Par un gradient de CCL21, les mDC maturées et les MoDC vont migrer vers les OLS dans le but d'activer les LT [92]. Les mDC1 CD141+ sont spécialisées dans la présentation croisée des antigènes par le CMH de classe I, conduisant à l'activation de LT CD8 [93]. A l'inverse, les mDC2 CD1c+ conduisent à la prolifération de LT CD4, et sont activées lors d'une réponse antivirale ou antifongique par le CMH II [94].

Tableau 3 : Classification des cellules dendritiques

Classe	Marqueurs	Localisation	Fonction
pDC	HLA-DR, CD123+, CD303+, CD304+, CLEC4C, IRF8 et IRF4	Sang, tissus lymphoïdes	Sécrétion de cytokines
mDC1	CD141+ , BDCA-1, IRF8 , CD163, Clec9A, Flt3, CMHI	Sang, tissus non lymphoïdes : intestin (LP), reins	Activation des TCD8 et des cellules NK, production IFN, TNF, CXCL9
mDC2	CD1c , CD11c, CD11b, SIRP α , IRF4 , Clec10A, CMHI et II	Sang, poumon, intestin, foie, peau	Senseur, activation des TCD4 (Th1, Th2, TH17) and TCD8, cytokines production (IL-12, TNF, IL-6, IL23), induction de la tolérance
DC inflammatoire (MoDC)	CD14+	Sang, tissu	Senseur, activation des LT Th1 et Th17
Cellules de Langerhans	HLA-DR , CD11c, CD207, CD1a , CD62E, CD123, CD303, langerine	Epiderme	Tolérance, régulation des Treg du derme, CPA, sécrétion d'IL-15 et IL-22
cDC dans les organes lymphoïdes	CD1a+, EpCAM+ CD1a+, EpCAM- CD206+, CD14+	Cellule de Langerhans migratoire DC du derme migratoire	CPA dans les OLS

Au final, les neutrophiles, les macrophages et les DC travaillent ensemble pour reconnaître, phagocyter et éliminer le pathogène. De plus les macrophages ainsi que les DC permettent par leur propriété de présentation de l'antigène d'activer l'immunité adaptative lorsque l'immunité innée n'est pas toujours suffisante.

v. L'immunité adaptative

L'immunité adaptative met en action 2 grands acteurs : les lymphocytes T et les lymphocytes B. Les LB assurent l'immunité humorale, conduisant à l'élimination d'antigènes (Ag) solubles principalement. En comparaison, les LT assurent l'immunité cellulaire, contribuant à l'élimination des Ag portés par un microorganisme. Durant l'inflammation, les LB génèrent des anticorps, nommés immunoglobulines, reconnaissant des Ag solubles et induisant leur élimination par opsonisation [95,96]. A l'opposé, les LT ne sont pas capables de reconnaître un Ag soluble. L'Ag doit être présenté par une CPA telle que les DC, les macrophages, ou les LB. Une fois l'Ag présenté par les molécules du CMH et reconnu par le TCR, les LT s'activent et se différencient. Deux catégories de LT existent : les LT CD4⁺ qui sont dit auxiliaires, avec de nombreuses sous-populations (Th1, Th2, Th17, T régulateur), et les LT CD8⁺ qui sont cytotoxiques [97,98]. Ces 3 acteurs viennent en aval de l'immunité innée pour éliminer l'agent inflammatoire et permettent d'instaurer une mémoire contre cet Ag.

Une fois l'agent inflammatoire éliminé, il est primordial d'arrêter le système immunitaire de manière active dans le processus inflammatoire et pour cela d'entrer dans la phase de résolution de l'inflammation.

II. La résolution de l'inflammation

En condition physiologique, la réaction inflammatoire se termine par une phase de résolution de l'inflammation. Cette résolution de l'inflammation met en jeu 3 grands mécanismes : 1) **l'inhibition du recrutement** leucocytaires, 2) l'**apoptose** des PMN et 3) l'**efferocytose** de ces corps apoptotiques par des macrophages pro-résolutifs. Ces mécanismes sont orchestrés par des médiateurs lipidiques spécialisés dans la résolution de l'inflammation (SPM), ce qui aura pour rôle de diminuer les médiateurs de l'inflammation, puis de nettoyer le tissu dans le but de retrouver un état d'homéostasie [15].

a) Les mécanismes de la résolution

i. Inhibition de l'infiltrat leucocytaire

Lors de la réaction inflammatoire, de nombreuses cytokines et chimiokines sont sécrétées par les acteurs de l'immunité innée notamment les macrophages, les neutrophiles et les DC. Ceci ayant pour but de guider l'infiltration leucocytaire dans le tissu inflammé. Pour résoudre l'inflammation il est important d'éliminer ces cytokines et chimiokines du tissu afin de stopper la migration cellulaire qui en découle. Plusieurs mécanismes sont mis en place, notamment le

clivage des chimiokines par l'enzyme **MMP12**. Cette enzyme, synthétisée par les macrophages, inactive les facteurs du complément (C3a, C5a), et clive des motifs de liaisons aux récepteurs de certaines classes de cytokines, augmentant ainsi la phagocytose et diminuant l'attraction sur le foyer lésionnel d'autres cellules de l'immunité [99]. D'autre part, il a aussi été démontré une augmentation du récepteur **CCR5** à la surface des neutrophiles et des LT apoptotiques menant à la capture et l'élimination de chimiokines pro-inflammatoires (CCL3 et CCL5), inhibant le recrutement des cellules de l'immunité par chimiotactisme [100]. Un autre mécanisme est décrit par le récepteur aux chimiokines **D6**. Ce récepteur est un récepteur couplé aux protéines G (GPCR), déficient en motif DRY lui procurant une insensibilité au gradient chimiotactique. Il a la capacité de lier des chimiokines inflammatoires de la famille β , puis de les endocyter et de les dégrader limitant le recrutement d'autres acteurs de l'immunité [101]. Tous ces mécanismes ont pour but de stopper la migration cellulaire sur le site inflammatoire afin de diminuer l'inflammation.

ii. Induction de l'apoptose des neutrophiles

Dans un second temps, il est nécessaire d'activer l'apoptose des neutrophiles afin de nettoyer le tissu inflammé [102]. Il existe 2 grandes voies de mort par apoptose : la voie extrinsèque activée par des signaux extracellulaires (liaison de Fas/CD95 ou $\text{TNF}\alpha/\text{TNFR1}$) qui provoque l'activation de la caspase 8, et la voie intrinsèque activée par des signaux intracellulaires (dommages à l'ADN) qui provoque la libération du cytochrome C par les mitochondries et conduit à l'activation de la caspase 9. Les caspases sont donc les actrices majeures de la mort cellulaire par apoptose (Fig. 4). Cette mort par apoptose, contrairement à la nécrose, n'entraîne pas de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Au contraire, celle-ci permet la sécrétion d'IL-10 et de $\text{TGF}\beta$, des cytokines anti-inflammatoires qui permettent d'éteindre l'inflammation. La mort cellulaire par apoptose des PMN se fait par différents mécanismes. Les voies extrinsèques de l'apoptose sont activées par la liaison du ligand Fas à son récepteur CD95 [103] mais aussi par la liaison du $\text{TNF}\alpha$ au TNFR1 récepteur. Le $\text{TNF}\alpha$, sécrété par les macrophages pro-inflammatoires à forte concentration (>10 ng/ml), active les voies de l'apoptose par l'intermédiaire de la voie PI3K. La liaison du $\text{TNF}\alpha$ à son récepteur active la voie PI3K provoquant la synthèse de ROS nécessaire à l'élimination des cellules cibles par oxydation [104]. L'accumulation de ROS en intracellulaire dans les PMN provoque l'activation de la caspase 3 conduisant à l'apoptose des neutrophiles. De plus, les ROS peuvent activer le TNFR1 et induire l'apoptose médiée par la caspase 8. En outre, les cathepsines D, situées dans les granules primaires des ROS, activent elles aussi les voies intrinsèques de l'apoptose [105].

Ainsi que précédemment mentionné, l'apoptose des neutrophiles entraîne, la synthèse de cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF β), ainsi que la synthèse de SPM. Ces SPM ont été découverts par Charles Serhan [16,106,107], qui a mis en évidence leur implication dans l'induction de l'apoptose des neutrophiles en particulier la résolvine E1 et la lipoxine A4 (détaillé dans la partie II-b). Les neutrophiles induisent aussi la libération d'annexine A1, un médiateur pro-résolutif séquestré dans les granules tertiaires et qui a pour action, en se liant à son récepteur FPR2, de promouvoir l'apoptose des neutrophiles, l'efferocytose et de diminuer la migration cellulaire [79,108]. Deux autres molécules, α -défensine, située dans les granules primaires des ROS, et la lactoferrine, sécrétée lors de l'apoptose des PMN, ont un rôle anti-inflammatoire en inhibant l'action du TNF α et du NO et en empêchant la migration des PMN, respectivement [109].

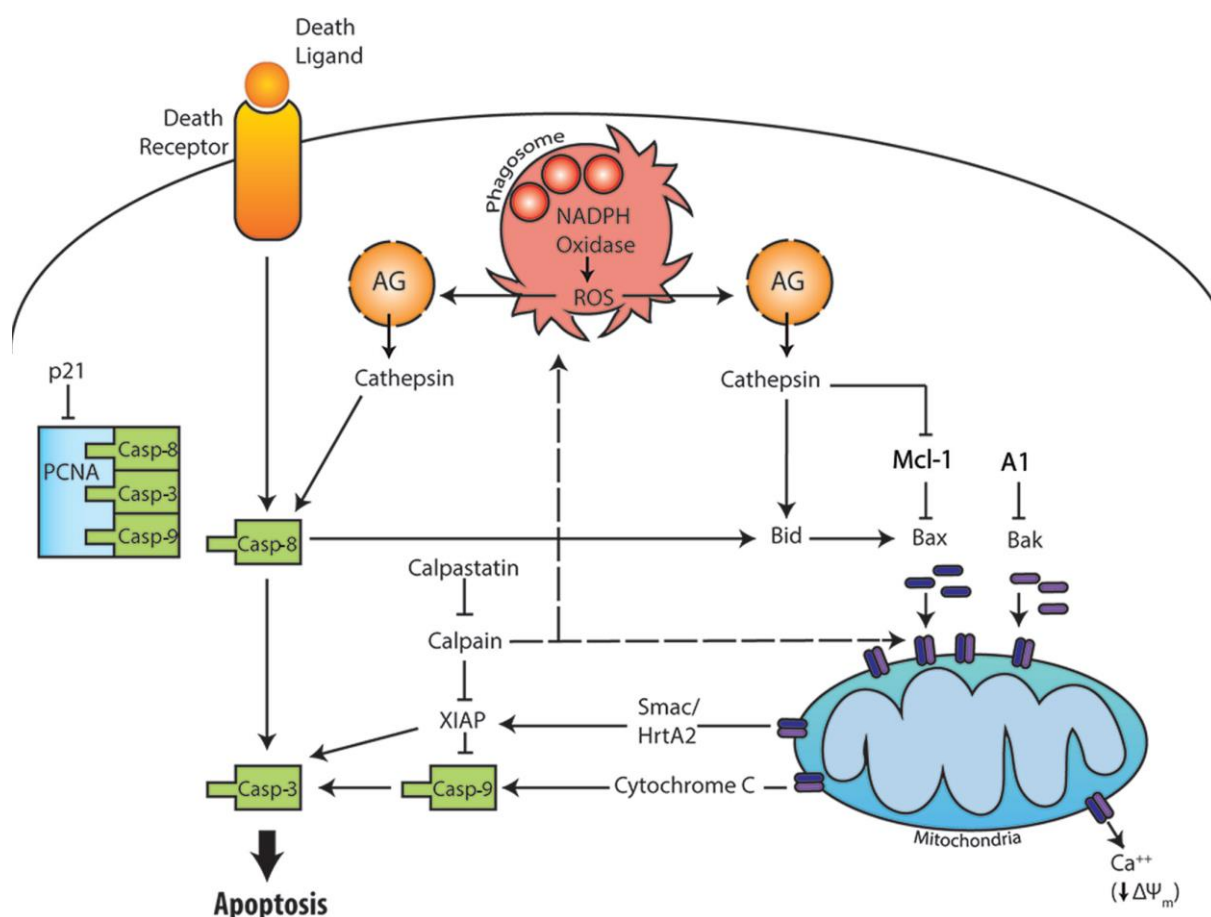


Figure 4 : Les voies d'activation intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose. Deux voies grandes voies de l'apoptose ont été décrite. La voie extrinsèque de l'apoptose est enclenchée lors de l'activation des récepteurs de mort et provoque l'activation de la caspase 8 puis de la caspase 3 conduisant à l'apoptose. La voie intrinsèque de l'apoptose est activée par des dommages

intracellulaire conduisant à la libération du cytochrome C par les mitochondries activant la caspase 9 puis la caspase 3 et induisant l'apoptose. (McCracken et Allan, 2014)

iii. Efferocytose

La clairance des cellules apoptotiques est assurée par les phagocytes. L'efferocytose est le mécanisme de phagocytose des débris cellulaires de façon non-phlogistique, c'est-à-dire sans induire de signal inflammatoire. L'efferocytose est un mécanisme très régulé, qui se déroule en 2 étapes : l'étape 1 qui envoie un signal « trouvez-moi » et l'étape 2 avec le signal « mangez-moi » [81] (Fig. 5).

- **Les signaux « trouvez-moi ».** Plusieurs travaux ont démontré que les cellules apoptotiques libèrent de nombreuses molécules induisant le recrutement des phagocytes. Parmi ces molécules on retrouve, l'ATP et l'UTP fortement sécrété par les cellules en apoptose et qui, en ciblant les récepteurs P2Y₂, favorisent l'attraction des monocytes. Ces 2 nucléotides ont aussi la capacité d'augmenter l'expression des récepteurs à la phagocytose [110]. La chimiokine CX3CL1 montre aussi une action dans le signal « trouvez-moi ». Cette chimiokine se fixe au récepteur CX3CR1, exprimé par les macrophages, et induit leur migration vers les cellules apoptotiques [111]. Le lipide sphingosine-1 phosphate (S1P) relargué par les cellules apoptotiques se fixe à son récepteur S1PR1-5 et induit, lui aussi, le chimiotactisme des cellules myéloïdes sur le foyer lésionnel. De plus, ce lipide a aussi montré des propriétés anti-inflammatoires en diminuant la sécrétion du TNF α et de l'IL12 et en augmentant la synthèse d'IL-10 [112,113]. Un autre acteur du signal « trouvez-moi » est le lysophosphatidylcholine, un puissant chimioattractant des macrophages/monocytes durant l'efferocytose [114]. Ces différentes molécules sont donc sécrétées par les cellules apoptotiques et induisent la migration des phagocytes vers le signal émis.
- **Les signaux « mangez-moi ».** Une fois attirés par les signaux « trouvez-moi », les macrophages phagocytent les débris cellulaires de manière spécifique. Pour cela, les cellules apoptotiques expriment un ligand spécifique à l'apoptose : la phosphatidylsérine (PS). La PS est une molécule exprimée sur la couche interne de la membrane lipidique des cellules vivantes. Lors de l'entrée en apoptose des cellules, la PS se transloque sur la membrane externe et devient détectable, notamment des phagocytes. Pour lier la PS, il existe de nombreux récepteurs qui reconnaissent le ligand de manière directe ou indirecte. Parmi les récepteurs directs, on distingue 4 classes : la

famille des **BAI 1** (*Brain-specific angiogenesis inhibitor 1*) exprimée par les macrophages et les cellules endothéliales [115], les récepteurs **TIM 1 et 4** (*T cell immunoglobulin mucin*) exprimés par les macrophages et DC ayant aussi pour rôle d'inhiber la synthèse de cytokines pro-inflammatoires [116], le **CD300** [117] et les **stabilines 1 et 2** [118,119]. Ces récepteurs reconnaissent directement la PS à la surface des cellules apoptotiques et induisent leur phagocytose. Parmi les récepteurs indirects, on compte le **CD36** [120], les **intégrines $\alpha v \beta 3$ et $\alpha v \beta 5$** , et les **TAM** (*Tyros3/Axl/Merck*). Pour se fixer, ces récepteurs ont besoin d'une molécule de pontage comme par exemple la molécule MFGE8 qui permet la liaison des intégrines αv [121], mais aussi GAS6 ou ProS1 qui aide à la liaison des récepteurs TAM [122]. Suite à la liaison de ces récepteurs avec la PS, les macrophages phagocytent les cellules apoptotiques. De plus, la liaison de certains récepteurs comme par exemple des récepteurs TAM ou TIM, induisent un signal inhibiteur sur la sécrétion du $TNF\alpha$ et d'IFN de type I, contribuant à la résolution de l'inflammation.

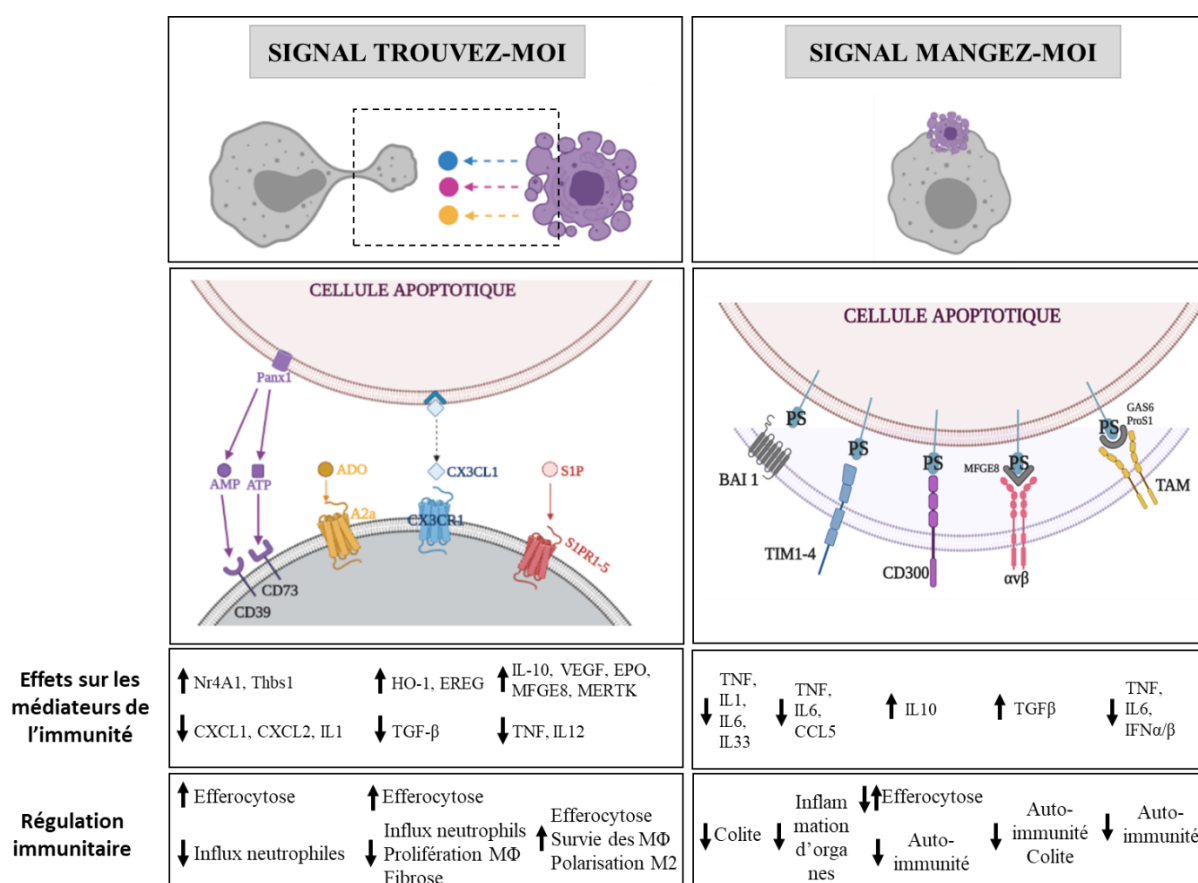


Figure 5 : Les signaux « trouvez-moi » et « mangez-moi » nécessaire à l'efferocytose. Les cellules apoptotiques libèrent de nombreuses molécules induisant le recrutement de phagocytes. Une fois attiré sur le site inflammatoire, les macrophages phagocytent de manière spécifique leur cible. Pour cela les cellules apoptotiques expriment un ligand, la phosphatidylsérine

reconnue par de nombreux récepteurs et permettant la phagocytose des corps apoptotiques par les macrophages afin de nettoyer le tissu. (Adaptée de Eliott et al, 2017)

Ce mécanisme d'efferocytose induit la reprogrammation des macrophages pro-inflammatoires vers un profil pro-résolutif. Ces macrophages pro-résolutifs ont la particularité d'éteindre l'inflammation en participant à l'efferocytose des neutrophiles et en sécrétant des SPM et des cytokines anti-inflammatoires. Une étude récente démontre aussi le rôle des Treg dans l'efferocytose. En effet, cette sous-population cellulaire qui régule l'action des LT effecteurs par différents mécanismes, augmente l'efferocytose des macrophages dans 3 modèles d'inflammations aiguës (l'athérosclérose, la péritonite et l'inflammation pulmonaire aiguë) [123]. Un des mécanismes des Treg sur l'induction de l'efferocytose évoqué dans cet article passe par la sécrétion d'IL-13 permettant l'induction l'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire) par les macrophages et stimulant l'efferocytose.

b) Les médiateurs lipidiques et les cytokines pro-résolutifs

La synthèse de médiateurs lipidiques pro- ou anti-inflammatoires joue un rôle primordial lors de l'inflammation. En effet les lipides pro-inflammatoires agissent au début de l'inflammation en permettant le recrutement des PMN sur le site inflammatoire [124]. A l'opposé, les lipides pro-résolutifs (SPM) induisent eux, l'arrêt de l'infiltration leucocytaire ainsi que l'apoptose des neutrophiles et la polarisation des macrophages M1 vers des macrophages M2 dits pro-résolutifs [14,15,125]. Ceci contribue au changement de profil des cytokines pro-inflammatoires vers des cytokines anti-inflammatoires. A ce jour, 4 grandes classes de SPM sont décrites : les **lipoxines**, les **résolvines**, les **protectines** et les **marésines** [16,106,126,127]. Ces SPM sont issus de la dégradation d'acides gras polyinsaturés de type omega-3 et omega-6 [128]. Ils agissent sur des cibles différentes et par l'intermédiaire de récepteurs différents mais ont le même but : éteindre activement l'inflammation.

i. Les cytokines anti-inflammatoires

Parmi les cytokines anti-inflammatoires, 2 cytokines majeures ont été identifiées. 1) Le **TGF- β** qui supprime les signaux induits par les TLR et conduit à la diminution de la réponse inflammatoire. Il est sécrété à la suite de la liaison des macrophages avec des cellules apoptotiques (PS/CD36 ou TAM) et favorise la prolifération des Treg, la polarisation des macrophages pro-inflammatoires vers des macrophages pro-résolutifs et la réparation cellulaire par les myofibroblastes (sécrétion de MMP-1, collagène et fibronectine) [129]. 2) **L'IL-10**,

cette cytokine est sécrétée par de nombreuses cellules de l'immunité (LT, LB, macrophages, NK) et a des effets fonctionnels sur tout autant de cellules. L'IL-10 permet l'induction d'une multitude de signaux activateurs ou inhibiteurs tels que l'inhibition de la sécrétion de nombreux médiateurs pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF, IL-12) ainsi que des chimiokines. Elle inhibe aussi l'activité des CPA, le chimiotactisme des macrophages, des PMN et des DC, ainsi que la prolifération des LT CD4. A l'opposé, elle augmente la sécrétion de médiateurs anti-inflammatoires (IL1R antagoniste, récepteur soluble au TNF α , IL-10), la phagocytose, la prolifération des LB et des NK, et elle promeut le phénotype Tr1 [130]. La sécrétion de ces 2 cytokines joue donc un rôle majeur dans la résolution.

ii. Les lipoxines

Les lipoxines et spécifiquement la lipoxine A4 (LXA4) est un médiateur lipidique spécialisé dans la résolution de l'inflammation [131]. Elle est synthétisée par les neutrophiles ou les macrophages grâce au basculement des enzymes de synthèse. En effet, durant les premières phases de l'inflammation les neutrophiles sécrètent des leucotriènes ainsi que des PG par l'intermédiaire de la 5-lipoxygénase (LO) et de la COX, respectivement. La synthèse de PGE2 ou D2 provoque de nombreux changement enzymatique. A la suite de cela, les enzymes LO-5, -12 et -15 permettent, à partir d'acide arachidonique, la synthèse de la LXA4 par les neutrophiles (Fig. 6) [132,133]. Ce lipide est connu pour se lier à son récepteur ALX (ou FPR2) [134] et a démontré de nombreux effets pro-résolutifs notamment en inhibant la sécrétion d'IL12 [135], ainsi que l'infiltration des PMN et des LT et en stimulant l'efferocytose dans des tests *in vitro* [136,137]. De plus la LXA4 joue un rôle bénéfique en accélérant la résolution de l'inflammation dans des modèles d'inflammation aiguë, comme par exemple dans le modèle « d'Air Pouch » ou de colite induite au DSS chez la souris [133,138]. Néanmoins, plusieurs pathologies telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) [139] ou les maladies cardiovasculaires, ont montré un défaut de synthèse de ce lipide pouvant être associé à un défaut de résolution et entraînant une inflammation chronique.

iii. Les Résolvines

La famille des résolvines (Rv), comporte 2 grandes classes, les **résolvines E** (RvE) ou **D** (RvD) [140,141]. La classe des RvE est issue de l'acide eicosanoïde (EPA) qui est converti en 18R-HEPE par l'enzyme COX-2 ou les microparticules P450 [13,106]. Ce substrat est ensuite converti en RvE1 ou 2 par la 5-LO [20,142] ou en RvE3 par la 15-LO par les neutrophiles [143,144] (Fig. 6).

- La RvE1 est un puissant médiateur lipidique anti-inflammatoire et pro-résolutif. Il se fixe à ses récepteurs **ChemR23** ou BLT1 [145] et permet de prévenir l'inflammation et d'accélérer la résolution. Il a été démontré que ce SPM diminuait la migration des PMN [13], ainsi que la sécrétion d'IL-12 par les DC [20]. En parallèle, il augmente l'apoptose des PMN [23], l'efferocytose [146] et la sécrétion d'IL-10 par les macrophages. Lorsqu'on injecte la RvE1 dans des modèles d'inflammation aiguë chez la souris, notamment dans la péritonite [20], la parodontite [22] mais aussi dans des modèles de colite induite au DSS et TNBS [21,147] on observe dans chacun d'entre eux, une accélération de la résolution avec un index de résolution de l'inflammation réduit [148,149]. Ceci démontre qu'activer les voies de la résolution a un effet bénéfique sur la récupération lors d'une inflammation aiguë. Ce lipide est ensuite inactivé par une dégradation enzymatique sous forme de 18-oxo-RvE1 [150].
- La RvE2 est synthétisée par les PMN et joue, elle aussi, un rôle dans l'accélération de la résolution en diminuant le recrutement des PMN, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et augmentant l'efferocytose et la sécrétion d'IL-10 par les macrophages [142,151]. En effet, ce lipide démontre des effets identiques à la RvE1 dans le modèle de péritonite et son efficacité est renforcée lorsqu'il est injecté en intraveineuse [142]. La RvE2 est un antagoniste du récepteur BLT-1 empêchant la liaison du LTB4 et diminuant le recrutement des neutrophiles et elle est un agoniste partiel de ChemR23 [151]. Il semblerait donc que ce lipide cible d'autres récepteurs pour induire son effet pro-résolutif.
- La RvE3, comme la RvE1 et E2, favorise la récupération de l'inflammation en diminuant l'infiltration des PMN [144]. Le récepteur de ce lipide n'a pour le moment pas été déterminé, cependant il prévient l'inflammation dans un modèle de péritonite et d'asthme allergique [144,152]. La RvE3 diminue le recrutement des éosinophiles et supprime la synthèse d'IL-23, cytokine sécrétée par les LT Th17 et fortement retrouvée dans les maladies inflammatoires chroniques [153].

L'autre classe de résolvines, les RvD, contient 6 sous-types issus de la conversion du DHA en 17HpDHA par la COX-2 puis en RvD1, 2, 3, 4, 5, ou 6 par la LO-15 ou -5 par les neutrophiles et les macrophages (Fig. 6) [106,126]. Parmi elles, la RvD1 est la plus décrite. Elle se fixe aux récepteurs GPR32 ou ALX/FPR2 [154], induisant une régulation de la migration des PMN et de la phagocytose [155–159]. Ce lipide est retrouvé diminué dans le poumon des patients atteints de mucoviscidose [160] et a démontré des effets bénéfiques dans plusieurs modèles de

maladies inflammatoires chroniques dont la colite induite au DSS et TNBS [161], la polyarthrite rhumatoïde [162] et le syndrome sec [163]. De plus, elle agit sur la synthèse des miRNA, notamment en augmentant miR-208 et 302 et en inhibant miR-219 et 21 générant un effet anti-inflammatoire [164]. La RvD2 joue elle aussi un rôle dans l'accélération de la réparation tissulaire en inhibant la migration des neutrophiles et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dans les modèles de colites induites [157,161,165]. La RvD3 quant à elle, apparaît plus tardivement que les autres SPM dans le processus de l'inflammation, lui suggérant un rôle spécifique lors de la résolution qui n'est pas encore découvert. Toutefois, elle diminue le recrutement des neutrophiles et la production de cytokines pro-inflammatoires justifiant son rôle pro-résolutif [166,167]. De plus, elle augmente la production de ROS par les neutrophiles et la clairance du site inflammatoire par les macrophages [167]. Ce lipide est aussi retrouvé dérégulé dans la polyarthrite rhumatoïde et son administration diminue l'infiltration leucocytaire sur le site inflammatoire et par conséquent réduit les signes inflammatoires chez la souris [168].

Ainsi, la notion de résolution de l'inflammation est un concept très récent, avec la découverte de nouveaux médiateurs lipidiques et de nouvelles cibles très régulièrement, permettant d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques.

iv. La marésine et protectine

La marésine ainsi que la protectine sont les 2 dernières familles de SPM. Elles sont synthétisées à partir de DHA [106,126,141,169,170] (Fig. 6). La protectine D1 (PD1) est synthétisée par les PMN, les macrophages, les LT Th2 et les éosinophiles [171,172]. Elle permet de diminuer la sensation de douleur en se fixant à son récepteur, le GPR37, ainsi que de réduire la sévérité de l'inflammation dans les modèles de colite induite au TNBS, d'Alzheimer et d'ischémie-reperfusion [173,174]. De plus, elle diminue la transmigration des neutrophiles, elle augmente l'efferocytose et induit l'apoptose des LT Th2 [171,172,175]. Elle a été retrouvée fortement diminuée dans l'asthme et son administration diminue les signes d'inflammation [176,177]. La marésine 1 (MaR1) quant à elle, est synthétisée par les macrophages [169,170] et favorise la conversion des macrophages pro-inflammatoires vers des macrophages pro-résolutifs induisant une fonction pro-résolutif [169,178]. De plus, elle montre des effets bénéfiques dans la régénération tissulaire et diminue la sensation de douleur en se fixant à son récepteur LGR6 [179–181]. Ce lipide est aussi retrouvé diminué chez les patients atteints de maladie

d'Alzheimer alors que des études montrent qu'elle permet de diminuer l'inflammation en augmentant la phagocytose des cellules microgliales [182].

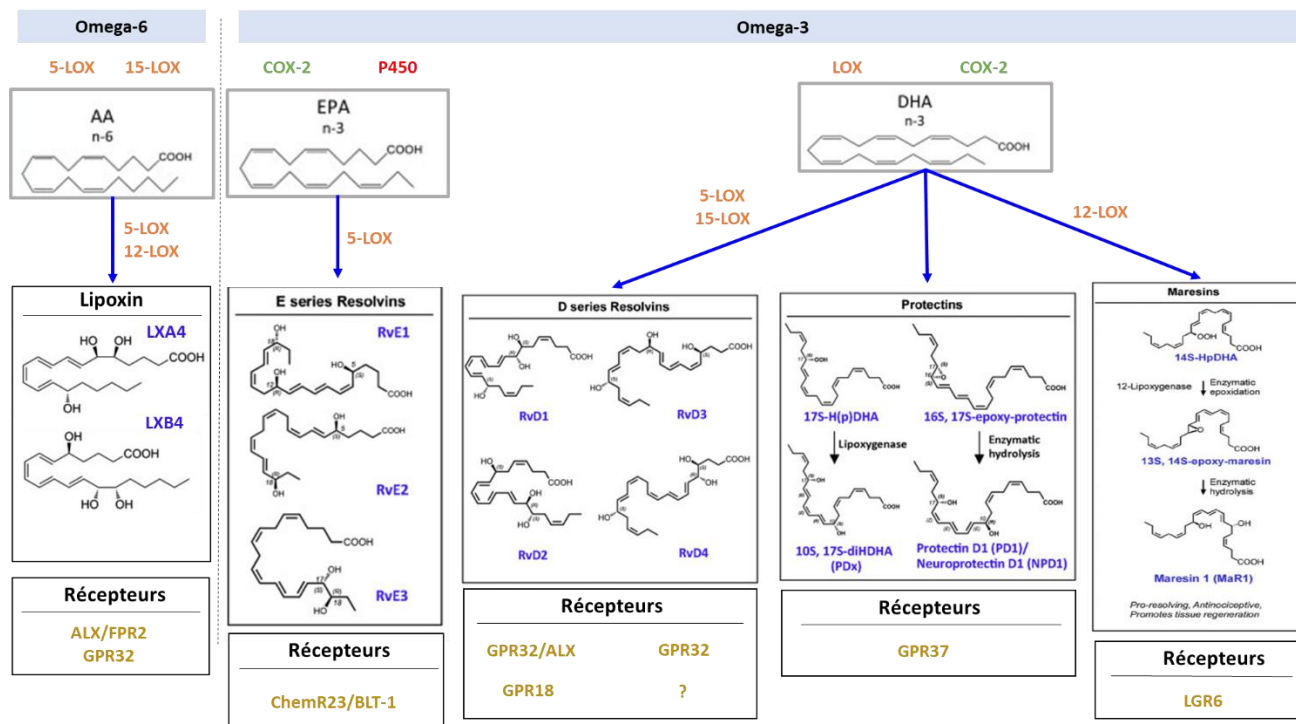


Figure 6 : La synthèse des lipides médiateurs de la résolution de l'inflammation. L'oméga 6 et l'oméga 3 provenant de l'alimentation sont dégradés, lors de la résolution l'inflammation, en lipide pro-résolutifs. 5 grandes classes de lipides pro-résolutifs sont désormais connues : les lipoxines issues d'oméga 6 dégradé en acide arachidonique (AA), les résolvines E issues d'oméga-3 dégradés en EPA ou les résolvines D, la protectine et la marésine issues elles aussi d'oméga-3 et dégradés en DHA par différentes enzymes. Chaque SPM cible différent récepteur. (Adaptée de Buckel et al, 2014)

Ces SPM ont donc un rôle primordial dans l'organisation de la résolution de l'inflammation ainsi que dans son échec. Ils agissent sur de nombreuses sous-populations cellulaires par l'intermédiaire d'une variété de récepteurs. Parmi ces récepteurs, le récepteur couplé aux protéines G ChemR23 a démontré avoir un rôle majeur dans l'induction de la résolution de l'inflammation grâce à son ligand la RvE1.

c) Récepteur couplé aux protéines G (GPCR) : ChemR23

i. Expression de ChemR23

ChemR23, aussi appelé ERV1 est un récepteur couplé aux protéines G (GPCR) [183]. Il possède donc 7 domaines transmembranaires (Fig. 7) avec 4 boucles extracellulaires (EL1, EL2, EL3 et EL4) qui sont des cibles potentielles pour des anticorps monoclonaux (Fig. 7). Il

est associé à la sous-unité G α i/o qui possède un pouvoir inhibiteur sur l'adénylate cyclase et par conséquent diminue l'AMP cyclique. Il est exprimé par le gène *CMKLR1* (*Chemokine Like Receptor 1*), situé dans le chromosome 12q.24.1 et possède 371 acides-aminés. Deux isoformes ont été décrites, avec une absence des deux premiers acides aminés pour l'isoforme 2 [184]. Il existe une homologie de 80 % entre la séquence Homo sapiens et Mus musculus (souris), ce qui facilite son étude pré-clinique dans des modèles *in vivo* [185,186]. ChemR23 est fortement exprimé dans les tissus adipeux, la rate, les ganglions lymphatiques ainsi que dans le poumon et la peau. Au niveau des leucocytes, ce récepteur est retrouvé exprimé dans les DC, principalement dans les cDC et les iDC, mais aussi dans les macrophages, les cellules NK et les PMN [186–188]. On retrouve aussi son expression sur les cellules endothéliales, les muscles lisses vasculaires et sur certaines classes de cellules tumorales [189–191]. Cette grande diversité d'expression lui procure de multiples fonctions, dont le développement et la différenciation d'ostéoblaste et d'adipocytes, l'angiogenèse et la réponse immunitaire [184,185,191,192]. L'expression de ce récepteur est régulée en fonction du microenvironnement inflammatoire ; des travaux montrent qu'il est sur-exprimé après stimulation au LPS ou à l'IFN γ sur les macrophages. On retrouve donc une plus forte expression de ce récepteur par les macrophages de type M1 que par les monocytes ou les macrophages de type M2 [184]. D'autres travaux montrent une surexpression de ChemR23 par les cellules endothéliales après stimulation au TNF α , IL-6 et IL-1 β [191]. En parallèle, des études ont mis en évidence que ce récepteur pouvait s'hétérodimeriser avec les récepteurs CXCR4 et CCR7, induisant une coopérativité négative de liaison des ligands CCL19 et CXCL12 par la chémérine, sans induire d'internalisation ni de signalisation intracellulaire mais permettant de diminuer la migration leucocytaire [193].

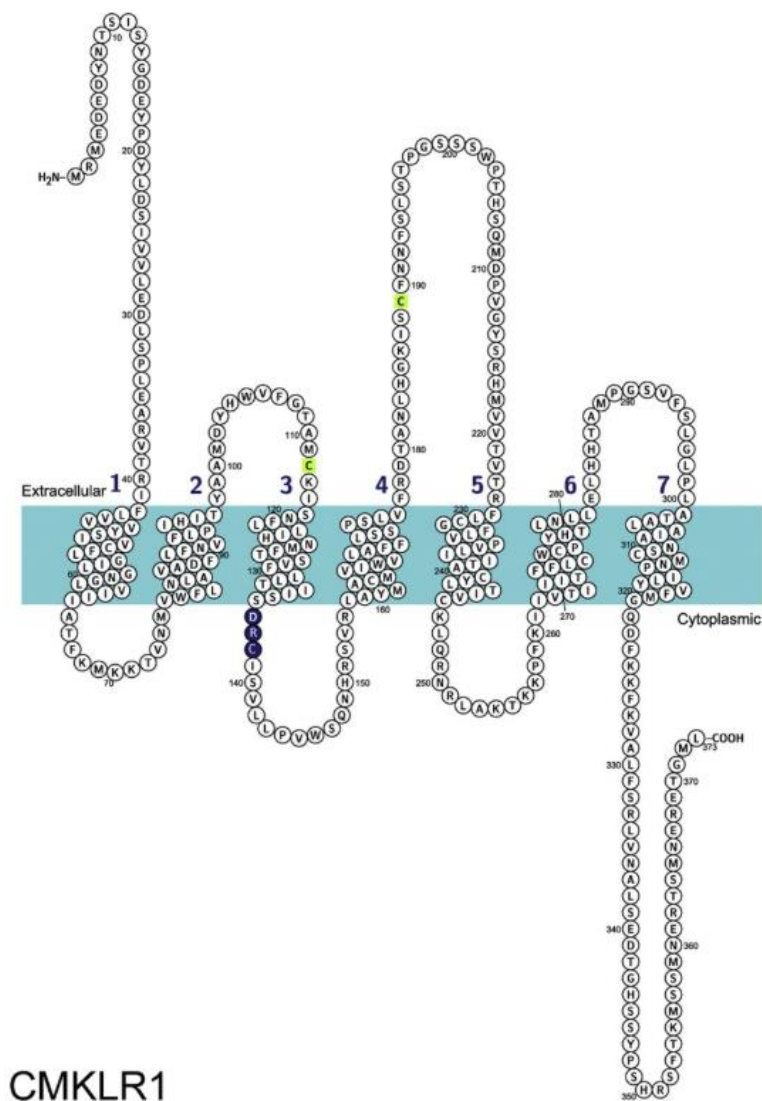


Figure 7 : Structure de ChemR23. CMKLR1 est un GPCR comprenant 7 domaines transmembranaire, 3 boucles extracellulaires et 3 boucles intracellulaires. (Kennedy et Davenport, 2018)

Ce GPCR, comme les autres GPCR, a la caractéristique de pouvoir fixer différents ligands et d'induire différents signaux, qu'on appelle le « biais du ligand ». Le biais du ligand procure aux GPCR le pouvoir de fixer différents ligands sur leurs domaines extracellulaires et d'induire une signalisation au travers de deux voies : la voie des $G\alpha/\beta/\gamma$ ou la voie de la β -arrestine induisant des effets fonctionnels multiples [194]. Ceci entraîne des difficultés dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. En effet l'utilisation de molécules orthostériques ou allosteriques de ces GPCR peut provoquer de nombreux effets non anticipés associés aux biais du ligand [195–197]. ChemR23 est connu pour posséder deux voies d'activation, une voie dépendante de la β -arrestine et une voie dépendante de la $G\alpha_{i1,2,3}$ et $G\alpha_{o,a,b}$ [198]. Le biais du

ligand pour ce récepteur s'explique par l'induction de deux effets fonctionnels distincts induits par 2 ligands : la chémérine [199] qui joue un rôle de chimiokine lors de l'inflammation et la RvE1 qui joue un rôle de lipide pro-résolutif, ce qui confère à ce récepteur un double rôle pro-inflammatoire ou pro-résolutif [20]. A ce jour, il est connu que l'axe chémérine/ChemR23 active la voie de la β -arrestine ainsi que la voie $G_{\alpha_{i/o}}$ provoquant l'internalisation du récepteur par le biais de la β -arrestine et la diminution de l'AMPc, le relargage de calcium en intracellulaire ainsi que la phosphorylation d'ERK et d'Akt par les sous-unité $\alpha/\beta/\gamma$ du GPCR [198,199]. L'axe RvE1/ChemR23 est connu pour inhiber le facteur NF κ B et phosphoryler les facteurs ERK, Akt et ribosome S6 par la voie de la $G_{\alpha_{i/o}}$ (Fig. 8) [200].

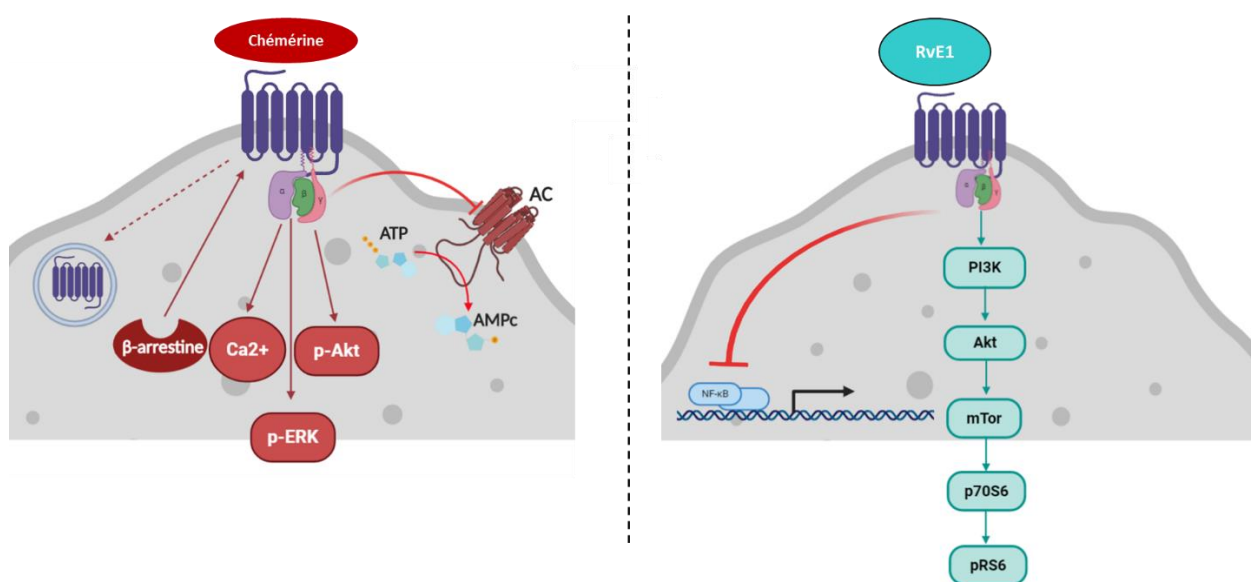


Figure 8 : Les voies de signalisation au travers ChemR23. La liaison de la chémérine à ChemR23 induit la phosphorylation d'Akt et de ERK, le relargage de calcium en intracellulaire ainsi que l'inhibition de l'adénylate cyclase (AC) par la sous-unité $G_{\alpha_{i/o}}$. Le recrutement de la β -arrestine, suite à cette liaison provoque l'internalisation du récepteur. En revanche, la liaison de la RvE1 à ChemR23 est connue pour activer, par la sous-unité $G_{\alpha_{i/o}}$, la voie de signalisation : PI3K, Akt, mTor, p70S6 et pRS6.

A la suite de la découverte des ligands de ChemR23 et de son rôle dans l'inflammation, de nombreuses recherches ont été faites afin de déterminer ces différents rôles et son association à diverses pathologies. Il a été mis en avant que la surexpression du gène ChemR23 augmente la clairance du site inflammatoire et diminue les signes cliniques de la parodontite de façon RvE1 dépendante et apporte une protection contre la stéatose hépatique, l'obésité, l'intolérance au glucose et la calcification vasculaire [189,201,202]. Cependant ce récepteur est aussi retrouvé

augmenté dans certaines pathologies associées à un déficit de RvE1, c'est le cas dans le diabète de type 2 où l'on retrouve une augmentation d'expression de ChemR23 par les neutrophiles corrélés à une diminution d'expression du récepteur BLT-1 et de la RvE1 et une augmentation du taux de LTB₄. Ceci entraîne un échec de l'efferocytose et de clairance du tissu, contribuant à une inflammation chronique [203]. Dans la maladie d'Alzheimer, un taux élevé de ce récepteur est aussi observé dans les astrocytes et les microgliales afin de compenser le déficit en SPM, mais ceci conduit à une neurotoxicité [204]. A l'inverse, l'absence de ChemR23 dans des modèles *in vivo* augmente l'expression des cytokines IL-6 et MCP-1 ainsi que la protéine ALT (Alanine Aminotransférase) associée aux maladies du foie. De plus l'absence de ce récepteur augmente le taux de glucose dans le sang et l'intolérance à l'insuline, il est donc fortement associé à l'obésité et au diabète de type 2 [205,206]. Dans un modèle de souris *Apoe*^{-/-}, la délétion du gène ChemR23 induit une augmentation du déclenchement d'athérosclérose associée à une augmentation du nombre de lésions, des corps nécrotiques et des macrophages sur le site inflammatoire ainsi qu'une diminution de la phagocytose [207]. Ce récepteur possède donc des fonctions très divergentes et controversées en fonction de la pathologie et du contexte inflammatoire étudiés. Ce récepteur est aussi décrit pour être un corécepteur du VIH-1 (Virus de l'Immunodéficience Humaine) et du VIS (Virus de l'Immunodéficience Simienne) [208].

ii. Les ligands de ChemR23

1) Chémérine

La chémérine est une adipokine fortement sécrétée par les adipocytes et les hépatocytes, et est constituée de 137 acides-aminés (aa) [192]. Elle est encodée par le gène *TIG2* (ou *RARRES2*) et est d'abord sécrétée sous forme d'un précurseur inactif, la prochémérine de 163 aa [209]. Cette forme inactive est activée sur le site infectieux par une protéolyse. Cette protéolyse est faite par des enzymes de la famille des sérine protéases qui clivent le domaine C-terminal provoquant la libération de plusieurs isoformes de chémérine dont la forme prédominante de 137aa [210]. La chémérine est exprimée dans de nombreux tissus : le foie, les reins, le pancréas mais aussi dans les tissus adipeux brun et blanc. On la retrouve aussi dans l'hypophyse, le placenta, les ovaires et les testicules lui suggérant un rôle dans la reproduction [186,211,212]. La chémérine possède 3 récepteurs : ChemR23, GPR1 et CCRL2 [198,209,213,214]. Lorsque la chémérine se fixe au récepteur ChemR23 sur les macrophages ou DC, on observe une mobilisation du calcium intracellulaire, une inhibition de l'AMPc, le recrutement de la β -arrestine et une activation de la voie NF κ B [198]. Ceci aura pour effet d'augmenter l'expression des marqueurs d'adhésion par les cellules cibles facilitant leur migration sur le site infectieux

[199,215,216] puis l'internalisation du récepteur par la voie de la β -arrestine. Le récepteur GPR1, exprimé par les cellules du système nerveux, montre une faible activité β -arrestine mais son mode d'action reste pour le moment non élucidé [198]. Concernant le récepteur CCRL2, il est fortement exprimé par les cellules endothéliales du poumon, les macrophages, les mastocytes et les DC, mais lorsqu'il fixe la chémérine, cela ne provoque pas de signalisation intracellulaire [214]. Ce récepteur participe à la biodisponibilité de la chémérine en la séquestrant et en la présentant au récepteur ChemR23 [214]. La chémérine joue donc un rôle de chimiokine durant les phases de l'inflammation par l'intermédiaire du récepteur ChemR23. Plusieurs analogues de chémérine ont été décrits, notamment le peptide C9 (148-156aa) et le peptide C15 (141-155aa). Le peptide C9 est un analogue issu du domaine C-terminal de la chémérine et se liant au récepteur ChemR23 chez l'Homme et chez la souris. Ce peptide induit l'activation de ChemR23 avec la même activité chez la souris mais une activité augmentée chez l'homme en comparaison à la chémérine [217,218]. Il provoque, comme la chémérine, le chimiotaxisme puis l'internalisation du récepteur [209,219]. Cependant ce peptide démontre des effets bénéfiques dans l'athérosclérose induisant une diminution du déclenchement de la pathologie associée à une réduction des lésions aortiques et de l'infiltrat des macrophages [220]. A l'inverse, le peptide C15, actif exclusivement chez la souris, exerce un effet opposé à celui de la chémérine en accélérant la résolution de l'inflammation. Ce peptide induit la polarisation des macrophages pro-inflammatoires vers des macrophages pro-résolutifs et augmente l'efferocytose induisant le nettoyage du tissu inflammé [221,222].

Etant donnée l'expression de cette adipokine et sa fonction dans les différents organes, elle possède des effets bénéfiques et néfastes pour l'organisme. En effet, la chémérine joue un rôle protecteur dans le déclenchement de l'athérosclérose (comme le peptide C9) [207,220], les inflammations pulmonaires [186,223], la calcification vasculaire et les maladies chroniques du reins associées [224,225], ainsi que dans certaines tumeurs dont le mélanome et l'hépatocarcinome [226,227]. Cet effet protecteur de la chémérine est provoqué soit par son pouvoir d'angiogenèse permettant la formation de nouveaux capillaires [191,224] ou bien par le recrutement cellulaire comme par exemple les NK permettant l'élimination de la tumeur [227,228]. Cependant, ses différents rôles peuvent être associés à de nombreuses pathologies. C'est le cas par exemple du psoriasis pour lequel la chémérine est fortement retrouvée dans le sérum des patients et est associé au développement de la pathologie [229,230], ainsi que le lichen plan qui démontre un rôle du recrutement des NK et des DC par la chémérine dans la physiopathologie de la maladie [231]. De plus, un taux important de l'isoforme 158K

(chémérine dépourvu des 5 derniers acides aminés) est retrouvé dans le liquide synovial des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde ou dans le liquide céphalo-rachidien des patients atteints de glioblastome, démontrant une activité pathologique de certaines isoformes de chémérine [232,233]. D'autres études ont mis en évidence une augmentation du taux de chémérine dans l'obésité et dans les pathologies métaboliques qui lui sont associées (diabète, maladies cardiovasculaires) [234] ainsi que dans les ascites des cancers ovariens, de l'œsophage et du foie [190,199,235]. Il a été démontré que le niveau de chémérine circulante était corrélé à l'indice de masse corporelle, au taux de triglycérides et aux niveaux plasmatiques des cytokines inflammatoires [211,212]. La chémérine est donc une protéine induisant le chimiotactisme des macrophages et DC durant l'inflammation, elle joue donc un rôle pro-inflammatoire. Par ce rôle, elle est associée à plusieurs maladies inflammatoires chroniques.

2) Résolvine E1

▪ Les effets biologiques

La RvE1 est synthétisée à partir d'EPA converti en 18R-HEPE par l'enzyme COX-2 au niveau des cellules endothéliales. Le 18R-HEPE est ensuite converti en RvE1 par l'enzyme LO-5, cette fois-ci au niveau des neutrophiles [13]. La synthèse de la RvE1 se fait donc par des interactions cellule-cellule. Cette synthèse est dite dépendante ou indépendante de l'aspirine. En effet, l'aspirine induit une acétylation irréversible de la COX-2 lui permettant de convertir l'EPA en 18R-HEPE qui sera ensuite converti en RvE1, ce qui explique en partie son rôle anti-inflammatoire. La voie indépendante de l'aspirine met en action le cytochrome P450, un dérivé bactérien, qui permet lui aussi la conversion de l'EPA en 18R-HEPE puis l'enzyme LO-5 des neutrophiles converti ce médiateur en RvE1 (Fig. 9) [236]. Ce médiateur lipidique est aussi retrouvé sous forme inactive après oxydoréduction enzymatique. On retrouve trois formes inactives, le 20-carboxy-RvE1, le 18-oxo-RvE1 et le 10,11, dihydro-RvE1 démontrant une régulation de ce lipide par l'organisme [150]. La RvE1 possède 2 récepteurs, le récepteur BLT-1 et le récepteur ChemR23. Le récepteur BLT-1 est exprimé par les leucocytes et il lie le leucotriène B4, un médiateur lipidique pro-inflammatoire, induisant le chimiotactisme des cellules de l'immunité sur le site inflammatoire [237,238]. La RvE1 démontre un pouvoir antagoniste sur ce récepteur, empêchant la liaison du LTB4 et par conséquent réduisant le recrutement cellulaire [145]. Cette observation a notamment été faite dans le modèle d'air-pouch et de péritonite pour lesquels une diminution de l'infiltration des neutrophiles a été observée associée au récepteur BLT-1, fortement exprimé par cette population [20,148]. De plus, cette liaison entraîne une augmentation de la synthèse des ROS par les neutrophiles ainsi

que l'induction de leur apoptose [23,151,239]. En parallèle, ce SPM cible le récepteur ChemR23 [20]. La liaison de la RvE1 sur ChemR23, exprimé fortement par les macrophages et les DC, induit la phosphorylation d'Akt et d'ERK provoquant une augmentation de l'efferocytose et de la sécrétion d'IL-10 par les macrophages [151,200] et une diminution de la migration des DC et de la sécrétion d'IL-12 [20]. De plus, des travaux ont mis en évidence que l'axe RvE1/ChemR23 augmente la synthèse de LXA4 chez les patients asthmatiques augmentant son pouvoir pro-résolutif [240], et diminue la sensation de douleur post-opératoire en agissant sur les nocicepteurs [241–243]. Son rôle majeur est donc de résoudre l'inflammation en diminuant l'infiltration leucocytaire et en augmentant l'apoptose des PMN et leur efferocytose induisant la clairance du tissu [148].

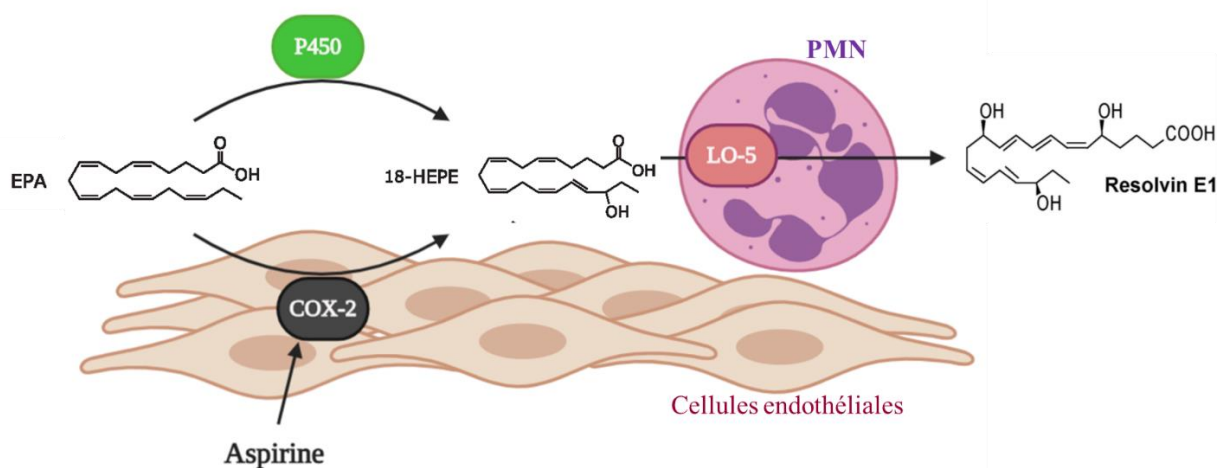


Figure 9: Les voies de synthèses de la RvE1. Lors de la résolution de l'inflammation l'EPA issue d'oméga-3 est dégradé en 18-HEPE soit par l'enzyme COX-2 (voie dépendante de l'aspirine) au niveau des cellules endothéliales soit par le cytochrome P450 (voie indépendante de l'aspirine). Ce substrat, 18-HEPE, est ensuite transformé en RvE1 par l'intermédiaire de l'enzyme lipoxigénase 5 (LO-5) au niveau des neutrophiles. (Adaptée de Arita et al, 2005)

▪ Efficacité préclinique

Compte tenu de son action pro-résolutive, des études précliniques approfondies de ce lipide ont été faites dans de nombreux modèles. Les deux modèles les plus décrits sont des colites induites au TNBS ou au DSS. Il s'agit de deux modèles d'inflammation aiguë de l'intestin avec une résolution spontanée. L'évaluation de la RvE1 dans ces modèles a démontré une perte de poids et un score de selles moins important lors de la mise en place de l'inflammation, ainsi qu'un colon moins rétracté reflétant une inflammation réduite [21,147]. Ces observations cliniques sont corrélées avec une diminution de l'infiltration des LT et des neutrophiles, ainsi qu'un score histologique réduit dans le colon des souris. Ceci démontre l'action anti-inflammatoire et pro-

résolutive de ce SPM, qui s'évalue grâce à un index de résolution. Ce dernier permet de mesurer le **temps nécessaire pour réduire 50% de l'amplitude maximal de l'inflammation** [148]. Ainsi, un index de résolution diminué traduit un temps de récupération plus rapide et par conséquent un effet pro-résolutif. L'effet anti-inflammatoire est démontré par une amplitude d'inflammation plus faible [244]. Concernant la RvE1, elle démontre des effets anti-inflammatoires en diminuant le recrutement cellulaire et par conséquent en diminuant l'amplitude d'inflammation. Elle présente aussi des effets pro-résolutifs en augmentant l'apoptose des neutrophiles et l'efferocytose des macrophages engendrant une diminution de l'index de résolution [127,244]. D'autres modèles d'inflammation aiguë ont été étudiés, notamment les deux modèles de référence pour évaluer l'impact sur la résolution de l'inflammation, le modèle de péritonite et le modèle d'air-pouch. Dans ces deux modèles, la RvE1 diminue l'infiltration des neutrophiles et augmente leur apoptose sur le site inflammatoire associée à un index de résolution réduit traduisant une résolution plus rapide [20,21]. La RvE1 a démontré d'autres effets bénéfiques, notamment dans le modèle de parodontite ou un échec d'efferocytose a été évalué [245]. Dans ce modèle, l'injection de RvE1 permet de renverser la perte osseuse en diminuant la quantité d'ostéoclaste et l'expression des gènes pro-inflammatoires ainsi qu'en augmentant la phagocytose des macrophages [22,245]. D'autres travaux ont démontré que la RvE1 diminuait la calcification des vaisseaux sanguins réduisant les risques de déclencher une maladie cardiovasculaire [246]. De plus, elle accélère la récupération post-opératoire en diminuant la sensation de douleur et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires en agissant sur la microglie et les nocicepteurs [247,248]. D'autres études ont mis en avant un effet protecteur de la RvE1 dans le diabète de type 2, la dermatite atopique, les inflammations pulmonaires et la maladie d'Alzheimer [23,249–251].

En parallèle et dans un autre contexte que les maladies inflammatoires chroniques, Dipak Panigrahy et son équipe ont étudié l'impact de ce SPM dans des modèles de cancérologie. Plusieurs modèles *in vivo* ont été évalués (LLC, CT26, MC38 ...) et il en est ressorti que les résolvines, dont la RvE1, empêchaient la croissance tumorale en stimulant la phagocytose des débris cellulaires tumoraux inflammatoires, générés par la chimiothérapie, médiée par les macrophages induisant une résolution de l'inflammation [252]. De plus, la RvE1 utilisée en traitement avant la chirurgie tumorale réduit les risques post-opératoires de rechute sur le site tumoral primaire [253]. La RvE1 affirme donc son rôle pro-résolutif dans plusieurs modèles d'inflammation aiguë en accélérant leur récupération. Elle montre aussi des résultats prometteurs en cancérologie.

Tableau 4 : Récapitulatif des effets biologiques de la Résolvine E1

Modèle	Effet biologique de la RvE1
Colite induite au TNBS	Perte de poids diminuer Diarrhée moins sévère Côlon moins retractoré Inhibe l'infiltration leucocytaire (PMN, monocytes, LT) Diminue la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire (IL12p40, TNFa, iNOS, COX2)
Colite induite au DSS	Réduit la perte de poids Côlon moins retractoré Score histologique moins sévère Diminue la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire (TNFa, IL-1b, IL-6)
Péritonite	Réduit l'infiltration leucocytaire
Air-pouch	Diminue le recrutement leucocytaire
Parodontite	Augmente la phagocytose des macrophages Réduit la résorption osseuse Réduit l'infiltration cellulaire et la densité d'ostéoclaste Réduction des gènes de l'inflammation (<i>Ccl3</i> , <i>Ccl9</i> , <i>Cxcl1</i> , <i>Cxcl2</i> , <i>Rac2</i>), des gènes de la résorption osseuse (<i>Acp5</i> , <i>Ccl3</i> , <i>Mmp3</i> , <i>Trem2</i>), et de la sécrétion pancréatique (<i>Sctr</i>) Basculement du microbiote sublingual
Athérosclérose	Réduction des lésions de type V Augmentation de l'air des cellules du muscles lisses vasculaires Sous-régulation des gènes de l'inflammation (<i>Ctss</i> , <i>Cd74</i> , <i>Cd44</i> ...) Réduit la calcification vasculaire
Diabète de type 2	Augmentation de la phagocytose des neutrophiles
Dermatite atopique	Diminue la production d'IFN γ et IL-4 Diminue l'infiltration eosinophile, mastocytes, CD4 et CD8 dans les lésions
Inflammation pulmonaire	Augmente l'efférocytose par les macrophages Augmente la production de ROS, et l'apoptose des neutrophiles (Caspase 8)
Alzheimer	Augmente le niveau de SPM Diminue l'activation des microglies et des astrocytes Diminue les plaques Ab40 Diminue les cytokines GM-CSF, IL1b, IL-6 et IL-10
Douleur	Diminue la sensation de douleur
Cancérologie	Augmente la clairance par phagocytose des débris cellulaire Inhibe la formation de métastase et échappement à la chimiothérapie

▪ Le déficit de RvE1

Le déficit en médiateurs lipidiques pro-résolutifs entraîne de nombreuses maladies inflammatoires chroniques. Concernant la RvE1, peu d'études mettent en avant un défaut ou une surexpression de ce lipide chez les patients. Une étude a mis en évidence un défaut de RvE1 chez les patients atteints de diabète de type 2 (T2D) [203]. Dans cette pathologie une surexpression du récepteur ChemR23 par les neutrophiles est démontrée, associée à un défaut d'expression du récepteur BLT-1 et de la RvE1 et une augmentation du taux de LTB4 [203]. Ce défaut de RvE1 entraîne un échec de clairance du tissu inflammatoire et conduit à une inflammation chronique [203]. L'utilisation de RvE1 sur ces neutrophiles de patients T2D entraîne une augmentation de phagocytose des neutrophiles démontrant son pouvoir thérapeutique. En parallèle, une étude chez la souris T2D a démontré elle aussi que l'utilisation de la RvE1 sur les neutrophiles de souris T2D augmente leur phagocytose ainsi que leur apoptose induisant la clairance du tissu et diminuant l'inflammation [206]. Un autre travail démontre un défaut d'expression de SPM, dont la RvE1, chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer [204]. L'utilisation de la RvE1 comme traitement dans un modèle de souris développant les séquelles et symptômes de la maladie d'Alzheimer permet d'augmenter l'expression de ces SPM (RvE1, LXA4, RvD1), de diminuer les lésions neuronales et d'induire l'activation des microglies et des astrocytes. Cela aura pour conséquence de rétablir un état d'homéostasie [249]. D'autres études démontrent une surexpression du ligand protéique, la chémérine, suspectant un défaut de fonction de la RvE1 et entraînant une action pro-inflammatoire au travers ChemR23. C'est le cas dans 2 modèles d'inflammation pulmonaires chroniques pour lesquelles un taux élevé de chémérine a été retrouvé et l'étude de la délétion de ChemR23 réduit l'inflammation justifiant un déficit de la RvE1 et un déséquilibre en faveur de la chémérine. De plus, l'injection de RvE1 dans ce contexte permet de restaurer l'homéostasie [223,254].

▪ Une étude clinique dans le syndrome de l'œil sec

La résolvine E1 démontre des effets bénéfiques dans de multiples modèles pré-cliniques allant de la colite [147], à l'asthme [240], à la parodontite [245] ou encore au diabète de type 2 [206] et à la maladie d'Alzheimer [249]. Ce lipide a aussi démontré des effets bénéfiques dans le syndrome de l'œil sec chez le rat et la souris. En effet, l'injection de RvE1 augmente la sécrétion de larmes par les cellules de l'œil après 2 jours de traitement et protège contre la destruction des cellules caliciformes et des cellules de la cornée [255,256]. Son utilisation a ensuite été évaluée en phase clinique I et I/II. Le laboratoire Resolvix a synthétisé un premier analogue de

la RvE1 nommé RX-10001. Cette molécule a démontré des effets bénéfiques en diminuant l'inflammation et en augmentant la présence de larmes chez ces patients. Cependant l'étude pharmacocinétique de cette molécule a démontré de nombreux des points faibles notamment une élimination rapide et une faible stabilité [257]. Resolvix a donc synthétisé un nouvel analogue de la RvE1, nommé RX-10045 en améliorant considérablement ces derniers paramètres. Désormais, une phase III est en cours dans le syndrome de l'œil sec [258–260].

d) Conclusion

L'inflammation aiguë est divisée en 3 phases : une phase d'initiation, une phase d'amplification cellulaire et une phase de résolution. Elle est orchestrée par de nombreux médiateurs cellulaires et moléculaires permettant l'élimination de l'agent inflammatoire puis le retour à l'homéostasie. La résolution de l'inflammation est médiée par des médiateurs lipidiques pro-résolutifs permettant d'enclencher trois mécanismes d'actions majeurs : 1) l'inhibition du recrutement leucocytaire, 2) l'induction de l'apoptose des neutrophiles et 3) l'efferocytose médiée par les macrophages induisant la clairance du tissu (Fig. 10). Cette réaction inflammatoire est donc un mécanisme bénéfique pour l'organisme lorsqu'elle demeure aiguë et se résout spontanément.

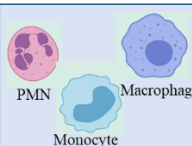
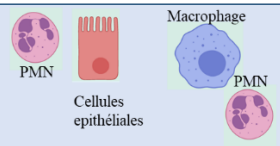
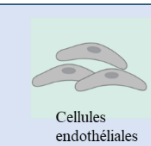
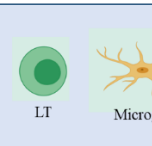
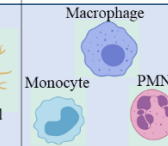
Précurseurs	Acide Arachidonique (AA)	Acide Eicosapentanoïque (EPA)	Acide Docosahexanoïque (DHA)			
Familles	Lipoxine	Resolvine E	Resolvine D	Protectine Neuroprotectine	Marésine	
Cibles						
Ligands	LXA4	RvE1	RvD1	RvD2	PD1-NPD1	MaR1
Actions	↓ Migration PMN ↓ Douleur ↓ Angiogénèse/prolifération ↑ Phagocytose/production IL10	↓ Migration DC/production IL12 ↓ Inhibition NFκB ↓ Fibrose ↑ Apoptose PMN ↑ Clairance mucosal par CD55 ↑ LXA4 ↑ Elimination microbienne	↓ Récepteur d'adhésion ↓ ROS/TNFα, IL8 ↓ Transmigration PMN ↓ Fibrose ↑ Phagocytose / IL10 ↑ Protection d'organe	↓ Adhésion PMN ↑ NO ↑ Elimination microbienne/Clairance	↓ NFκB/ COX-2 ↓ Fibrose rénale ↓ Migration LT ↓ Sécrétion TNF et IFNγ ↓ Cytokines des microglial ↑ Action neuroprotective ↑ CCR5 par les LT	↑ Régénération tissulaire ↑ M1 → M2 ↓ Douleur

Figure 10 : tableau récapitulatif des multiples rôles des SPM. Trois précurseurs lipidiques sont à l'origine de 5 classes de SPM : les lipoxines, les résolvines E et D, la protectine et la marésine. Chaque SPM possède des cibles cellulaires différentes engendrant des fonctions différentes ayant pour but de diminuer l'inflammation. (Adaptée de Bucket et al, 2014)

Plusieurs travaux ont démontré qu'un échec de résolution lors de l'inflammation, conduit à une persistance de l'inflammation qui favorise le déclenchement de maladies inflammatoires chroniques que nous allons maintenant développer.

III. L'inflammation chronique

a) Les maladies inflammatoires chroniques

Les maladies inflammatoires chroniques (MIC), qui font parties des maladies non-transmissibles, sont responsables de 70 % de la mortalité dans le monde [7]. Actuellement, 4 grandes classes de MIC sont les plus répandues : 1) les **maladies cardiovasculaires** (MCV), 2) le **cancer**, 3) les **maladies chroniques respiratoires**, et 4) le **diabète**. L'inactivité physique, le sommeil, la nourriture, l'alcool et la cigarette jouent un rôle prédominant dans le déclenchement des MIC (Fig. 11) [261,262]. Des études ont démontré que l'exercice physique diminue de 17 % les risques de déclencher une maladie cardiovasculaire, de 40 % de déclencher la maladie d'Alzheimer et de 26 % de déclencher un diabète de type 2 [263,264]. De plus, les risques de développer une MIC augmentent avec l'âge, en effet les individus plus âgés ont un taux de cytokines, chimiokines et de protéines de la phase aiguë plus élevé, ainsi qu'une réponse immunitaire plus faible menant plus facilement à une chronicité de l'inflammation [265]. Cette augmentation de médiateurs de l'inflammation est causée par la sénescence cellulaire [8]. Cette sénescence cellulaire n'est pas entièrement comprise, mais son déclenchement semble être dû à des dommages de l'ADN, un dysfonctionnement des télomères, un stress oxydatif ou environnemental [266], ainsi qu'à notre mode d'alimentation menant à l'obésité ou à la dysbiose du microbiote [267] (Fig. 11). Malheureusement, avec notre modèle industriel actuel, le taux de MIC a dramatiquement augmenté [268,269]. On estime une prévalence de 2,5 fois entre 1995 et 2025 passant de 84 millions à 228 millions de personnes touchées, avec environ 70 % de la mortalité associée [7,270]. 60 % de cette augmentation se situe dans les pays en voie de développement, comme par exemple en Inde et en Chine, à cause de l'urbanisation des zones rurales [4]. Aux États-Unis, en l'an 2000, 125 millions d'Américains vivaient avec une MIC et 21 % étaient atteints par plus d'une MIC. En 2014, c'est 60 % des Américains qui sont touchés par une MIC dont 42 % qui en ont plus d'une et 12 % des adultes qui en possèdent 5 ou plus. Les maladies cardiovasculaires dénombrent le plus de décès avec 18 millions/an, puis on retrouve les cancers avec 9 millions/an, les maladies respiratoires (4 millions/an) et le diabète avec 1,6 millions/an [270,271].

Il existe d'autres MIC, telles que la polyarthrite rhumatoïde (PR), les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), le lupus érythémateux, la sclérose en plaque (SEP) ou encore l'athérosclérose. Ces MIC possèdent des caractéristiques différentes avec des atteintes d'organes et des types de lésions différents. Dans la PR par exemple, qui est une MAI, on retrouve une forte sécrétion d'auto-anticorps (anti-CCP ou ACPA) qui s'attaquent aux membranes synoviales de toutes les articulations (mains, poignets...) provoquant une hypertrophie de la synoviale puis une destruction osseuse [272–275]. Cette pathologie est associée à un taux élevé de macrophages sur le site inflammatoire et un défaut des Treg [276]. Ceci entraîne des déformations articulaires et des destructions tendineuses. Les MICI, elles, sont une attaque de la paroi du système digestif causée par une exacerbation du système immunitaire. La cause n'est pour le moment pas déterminée mais la présence prolongée de pathogènes ou le dysfonctionnement du système immunitaire est probablement la cause. On y retrouve un fort infiltrat de LT Th1, Th2 ou Th17 ainsi qu'une accumulation de neutrophiles (partie décrite plus en détail en III-c) [277–281]. Ceci entraîne la dégradation de la paroi du système digestif avec des douleurs abdominales et des diarrhées intenses. La SEP, quant à elle, est une MAI qui touche le système nerveux central. La présence d'auto-anticorps dirigés contre la myéline a été retrouvé chez ces patients induisant des lésions, aussi appelées plaques, entraînant une dégénérescence axonale avec à terme des conséquences fonctionnelles néfastes sur la mobilité [282–284]. Bien que les MIC soient en général identifiées et classables, elles partagent souvent des symptômes systémiques. C'est le cas de la PR qui peut être associée à une résistance à l'insuline et/ou une hypertension, pouvant conduire à des diabètes de type 2 et des MCV [285,286] ou bien pour les patients atteints de MICI des complications plus fréquentes à type de cancer colorectal sont observées [287].

Les diagnostics de ces MIC se fait principalement sur l'aspect clinique associé à des biomarqueurs en particulier de l'inflammation tels que la CRP, l'IL-6, l'IL-1 β ou le TNF α [288]. Concernant les traitements actuels de ces MIC, ils sont principalement dirigés contre des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-6, IL-1 β , IL-17, IL-12/23, IL-5) à partir d'anticorps monoclonaux dirigés contre des cytokines ou leurs récepteurs, ou des stéroïdes (glucocorticoïdes) [289–291]. De nouvelles approches tendent à réguler l'afflux des cellules immunitaires, c'est le cas par exemple du Vedolizumab (anti-intégrine $\alpha 4\beta 7$) dans le traitement de certaines MICI [292]. Cependant, ces traitements ne visent pas à résoudre l'inflammation mais simplement à l'empêcher de se mettre en place, c'est pourquoi on les appelle des anti-inflammatoires. Environ 35 % des patients ne répondent pas à ces traitements, en particulier

aux anti-TNF α [293]. De plus, ces traitements amènent de nombreux effets secondaires : sensibilité aux infections virales et bactériennes, diabète, croissance de tumeurs malignes, infertilité [11]... Ainsi la demande de nouvelles stratégies thérapeutiques est forte.

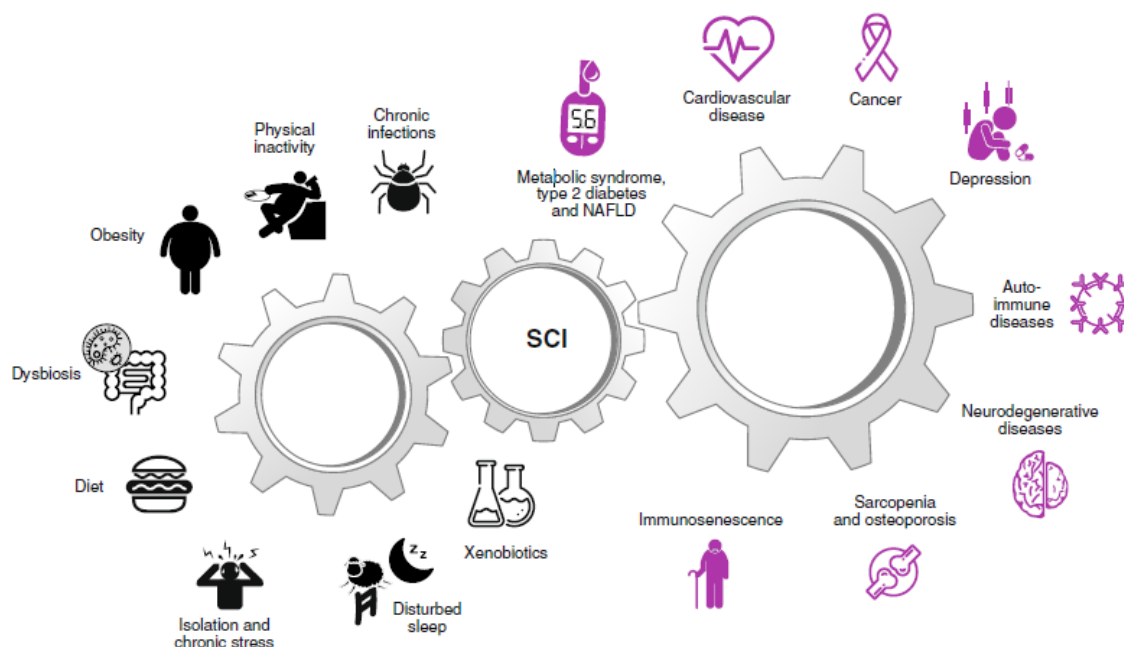


Figure 11 : La boucle des maladies inflammatoires chroniques. Plusieurs causes sont à l'origine des maladies inflammatoires chroniques (SCI) et les conséquences ont été identifiées. A gauche les causes les plus communes : l'inactivité physique, les infections chroniques, l'obésité, les insomnies, le stress, la dysbiose, le régime alimentaire et les xénobiotiques (cigarettes, pollution...). A droite les conséquences qui peuvent en découler : le diabète, les maladies cardiovasculaires, le cancer, la dépression, les maladies auto-immunes, les maladies neurodégénératives, ostéoporose et l'immunosénescence. (Furman et al, 2019)

b) L'échec de la résolution de l'inflammation

Les 3 principaux mécanismes de la résolution de l'inflammation sont la diminution du recrutement leucocytaire, l'apoptose des neutrophiles et l'efferocytose par les macrophages pro-résolutifs. Lorsqu'un de ces mécanismes est détourné, retardé ou inactivé, un échec de la résolution pourra conduire à une inflammation chronique non contrôlée. Les causes d'un défaut de résolution peuvent être des facteurs génétiques, qui « codent » pour une réponse immunitaire exagérée (mutation du récepteur à l'IL-10 dans la colite, HLA-B27 dans l'arthrite) [294,295], une modulation du microbiote [296–298], la présence d'auto-antigènes comme par exemple la protéine citrullinate dans la PR [299], mais aussi l'exposition prolongée à des pathogènes ou bien un défaut de synthèse de SPM [139,160,168,300]. Parmi ces MIC, plusieurs semblent être déclenchées par un échec de résolution de l'inflammation [300]. C'est le cas du lupus

érythémateux, où l'on retrouve une augmentation de l'apoptose cellulaire et un défaut de phagocytose par les macrophages contribuant à une persistance de l'inflammation [301]. Dans cette pathologie la présence d'auto-anticorps dirigés contre l'ADN double brin (db), provenant de l'apoptose et des NET des neutrophiles, a été démontré et corrèle avec à un défaut d'efférocytose qui conduit à une exposition prolongée de l'antigène provoquant une réaction immunitaire exacerbée [302,303]. Cet échec de phagocytose des macrophages a aussi été démontré dans la parodontite et le diabète [245,304]. Cela conduit à une exposition prolongée des pathogènes et une clairance tissulaire diminuée induisant, ici aussi, une réaction immunitaire non contrôlée. Dans la maladie d'Alzheimer et les MICI, des réductions de LXA4 et de RvE1 ont été identifiées, altérant et retardant la résolution de l'inflammation [139,204]. Alors que dans l'asthme, c'est la protectine D1 qui est retrouvée diminuée et dans la PR une dérégulation de la RvD3 a été démontré [168,176]. La RvE1 est aussi diminuée chez les patients diabétiques de type 2 [203] et la RvD1 est retrouvée diminuée chez les patients atteints de mucoviscidose [160], conduisant à un retard d'apoptose des PMN et d'efférocytose des macrophages menant à l'échec de la résolution de l'inflammation. D'autres travaux ont montré une inhibition des facteurs pro-apoptotiques dans l'athérosclérose menant au maintien d'un milieu inflammatoire par la nécrose cellulaire [305]. Pour finir, un retard d'apoptose des neutrophiles a été démontrée dans la PR et les MICI, menant à une accumulation locale des neutrophiles puis une inflammation chronique tissulaire [280].

Tous ces travaux confirment que l'apoptose des neutrophiles, l'efférocytose ainsi que la synthèse des SPM jouent un rôle majeur pour le maintien de l'homéostasie et si un de ces mécanismes échouent cela mène rapidement à une inflammation non contrôlée comme dans les MICI (Fig. 12) que nous avons pris comme modèle expérimental de nos travaux.

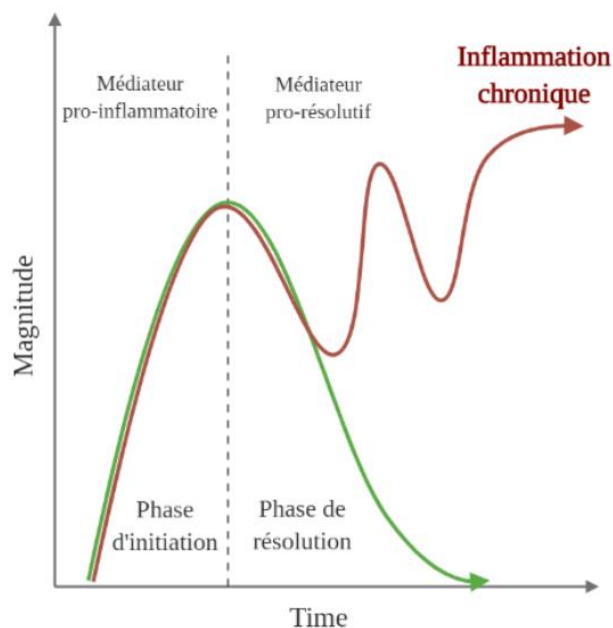


Figure 12 : Echec de la résolution de l'inflammation. La ligne verte représente la courbe d'une inflammation aiguë qui se résout spontanément avec une phase d'initiation et une phase de résolution gouverné par des médiateurs pro-inflammatoires ou pro-résolutifs, respectivement. La courbe rouge illustre une inflammation chronique dépourvu de résolution de l'inflammation. La phase d'initiation est identique à celle de l'inflammation aiguë, en revanche la phase de résolution est absente et conduit à une chronicité de l'inflammation. (Adaptée de Barnig et al, 2019)

c) Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

i. Physiologie de l'intestin

Afin de comprendre la survenue de la chronicité de l'inflammation et l'échec de la résolution dans les MICI, nous décrirons d'abord la physiologie d'une réponse immunitaire dans l'intestin et le fonctionnement de celui-ci.

Le système gastrointestinal s'étend de la bouche à l'anus. Il comprend la bouche, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, le côlon et le rectum. L'intestin grêle est divisé en 3 parties : le duodénum (30 cm), le jéjunum (2.5mètres) et l'iléon (3.5 mètres de long, globalement 6 mètres au total). Il a pour rôle principal l'absorption des nutriments par les entérocytes. Sa structure en villosité lui procure une capacité d'échange maximale. C'est aussi au niveau de l'intestin grêle que l'on retrouve les plaques de Peyer, un organe lymphoïde secondaire. Le côlon, lui, contient le caecum, le colon droit, le colon transverse puis le colon gauche se terminant par le sigmoïde puis le rectum. Il a pour fonction principale l'absorption de l'eau et des électrolytes [306]. C'est

dans le côlon que l'on retrouve le plus de bactéries, comptant jusqu'à mille milliards, alors que l'intestin grêle n'en contient qu'environ 1 million. Ce tapis bactérien sur l'épithélium est appelé la flore microbienne ou encore le microbiote [307,308]. La paroi du tube digestif comprend 4 grandes couches (Fig.13). En partant de la lumière intestinale, on retrouve : la muqueuse qui comprend l'épithélium, la lamina propria (LP) et la musculaire muqueuse, puis la sous-muqueuse qui est constituée de tissu conjonctif et contient les VS et lymphatiques, enfin il y a la musculaire et la sous-séreuse.

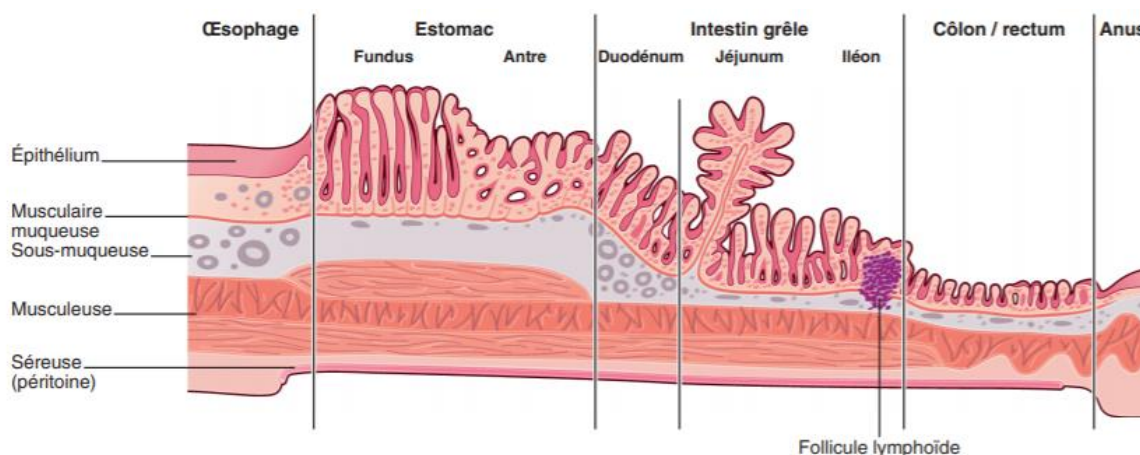


Figure 13 : Les différentes couches de la paroi du tube digestif. Le tube digestif est constitué de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin grêle puis du côlon et pour finir de l'anus. Chaque partie contient un épithélium, une muqueuse musculaire, une sous-muqueuse, une musculaire et la séreuse. (Illustration de Carole Fumat)

L'épithélium permet de créer une barrière entre le contenu de la lumière, multitude de bactéries et micro-organismes et le reste de l'organisme. Parmi les entérocytes, on trouve des cellules caliciformes qui ont pour rôle de produire une grande quantité de mucus ainsi que des facteurs de réparation et de régulation de l'inflammation [309]. Les cellules de Paneth, au sein de l'épithélium, ont un rôle anti-microbien par la sécrétion d' α -défensine et de lysozyme [310]. Sous cet épithélium, la LP (Fig. 14), aussi appelé chorion, est un tissu conjonctif lisse constitué de cellules immunitaires innées (macrophages, DC). Ce site immunologique a pour rôle de reconnaître différents PAMPs et DAMPs en provenance de la lumière intestinale et d'induire soit une tolérance (contre les nutriments de l'alimentation ou les micro-organismes de la flore) soit d'activer le système immunitaire (contre une bactérie pathogène) [311]. Lorsque les cellules immunitaires innées résidentes reconnaissent un PAMP ou DAMP par leur PRR, elles migrent vers les ganglions lymphatiques mésentériques, afin d'activer l'immunité adaptative [312]. La migration des LT vers l'intestin se fait entre autres grâce à l'intégrine $\alpha 4 \beta 7$ et la chimiokine CCR9 [313–315]. Une fois dans l'intestin, les LT vont induire une réponse immune

menant à l'élimination du pathogène, et les LB secrètent eux des immunoglobulines de type IgA [316]. Puis le processus de résolution et de réparation tissulaire se met en place (comme décrit plus haut).

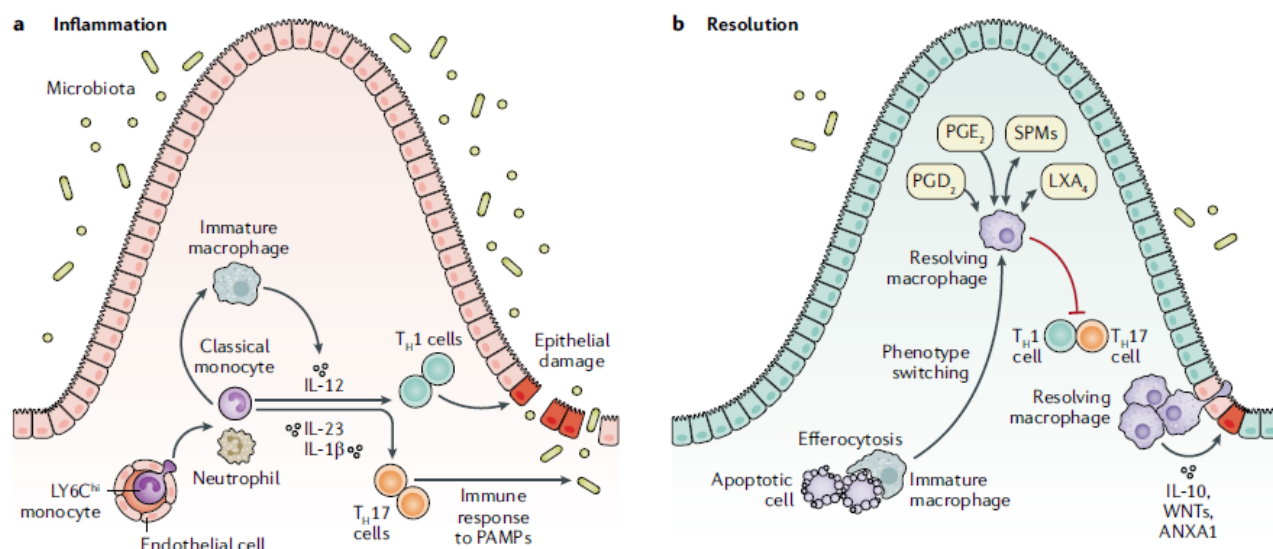


Figure 14 : Le processus physiologique d'inflammation dans le côlon. (Gauche) durant l'inflammation intestinale, les neutrophiles et les macrophages inflammatoires sont recrutés initiant une réponse immunitaire. Ces cellules de l'immunité innée secrètent des cytokines dont l'IL-12, l'IL-23 et l'IL-1β permettant d'activer les lymphocytes Th17 et Th1. (Droite) la phase de résolution de l'inflammation est gouvernée par l'efferocytose des neutrophiles apoptotiques provoquant la transformation des macrophages inflammatoires en macrophages pro-résolutifs. Ces macrophages secrètent de nombreux lipides pro-résolutifs (LXA4, SPM) ainsi que des cytokines anti-inflammatoires (IL-10). De plus ces macrophages inhibent la prolifération de LT Th1 et Th17. (Na et al, 2019)

ii. Généralités sur les MICI

Cette réponse immunitaire peut être exacerbée et entraîner des maladies inflammatoires chroniques au niveau de l'intestin (MICI). Ces MICI sont représentées par 2 formes majeures qui sont la **rectocolite hémorragique (RCH)** et la **maladie de Crohn (MC)**. Ces maladies sont catégorisées comme des maladies polygéniques avec 163 gènes à risque répertoriés dont 28 sont partagés entre la RCH et la MC [317,318]. Les locus des chromosomes 1, 3, 6, 7, 12 et 16 ont été montrés corrélés à la pathologie. Mais la causalité est bien plus complexe avec bien d'autres facteurs associés : la cigarette, l'appendicectomie, les antibiotiques et les contraceptives oraux (Fig. 15) [319].

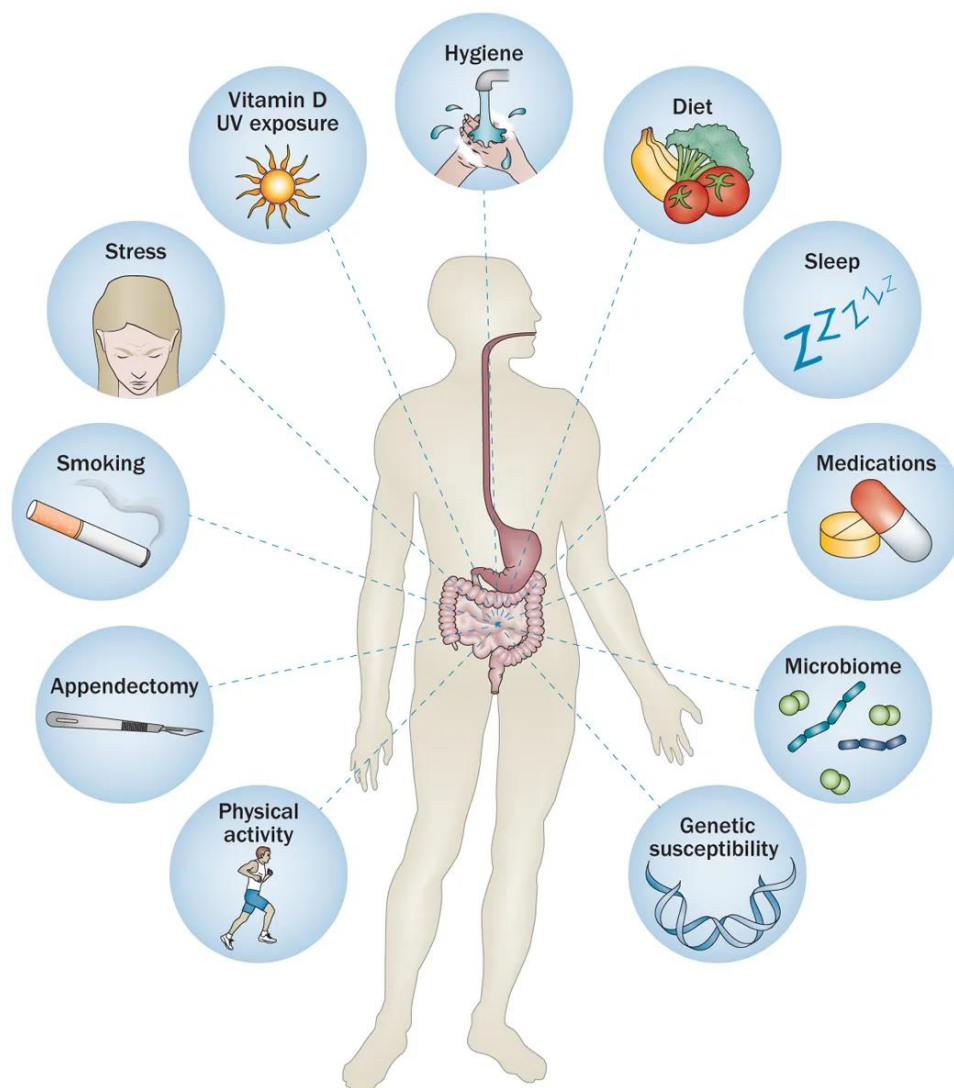


Figure 15 : Les facteurs influençant les MCI. Le développement des MCI est dirigé par de nombreux facteurs dont la génétique, le microbiote, la prise de médicaments, le sommeil, l'alimentation, le stress, la cigarette, l'appendicectomie et l'activité physique. (Ananthakrishnan et al, 2015)

Cette pathologie se déclare majoritairement entre 15 et 30 ans pour la MC et entre 30 et 40 ans pour la RCH [320]. On dénombre environ 6,8 millions de cas en 2017 (contre 3,7 millions en 1990) dont 1,5 millions de cas aux USA et 2,2 millions de cas en Europe avec une prévalence de 396/100 000 nouveaux cas par an [321–323]. Cette augmentation de prévalence et d'incidence s'explique par l'urbanisation des pays en voie de développement, comme par exemple au Japon pour lequel on observe une prévalence de la RCH passant de 18,1/100 000 en 1991 à 121,9/100 000 en 2005 [324–326]. En effet, la modernisation des zones rurales et la migration dans les pays en voie de développement amènent de nouveaux facteurs environnementaux dans ces pays augmentant les risques de développer une MCI [327]. Le

changement de style de vie avec l'augmentation de consommation d'acide gras, de sucres, la diminution de consommation de végétaux et de fruits, mais aussi les changements d'hygiènes avec une exposition aux microbes diminuée et la prise d'antibiotiques augmentée contribue à cette augmentation de prévalence dans les pays en voie de développement [328].

Les MICI sont caractérisées par une réponse exacerbée du système immunitaire contre le microbiote. Elle peut être due à une rupture de la barrière épithéliale créant une pénétration bactérienne dans la LP, ou bien à un dysfonctionnement de la réponse immune. Les facteurs de risques et épidémiologiques, bien que similaires, n'impactent pas le tractus digestif de la même façon entre la RCH et la MC. Nous allons maintenant décrire chaque pathologie.

iii. La rectocolite hémorragique

1) Epidémiologie et facteurs de risques

La RCH est une MIC idiopathique qui affecte principalement le rectum ainsi que le côlon chez l'adulte entre 30 et 40 ans [323]. Elle est caractérisée par une inflammation de la muqueuse avec des phases de rémissions puis de rechutes touchant principalement le rectum et pouvant remonter jusqu'au colon. L'incidence de cette pathologie a augmenté ces dernières années à cause de notre mode de vie actuel. Les incidences les plus élevées sont répertoriées dans le nord de l'Europe (24,3/100 000), au Canada (19,2/100 000), et en Australie (17,4/100 000) [320,324]. Alors que, les prévalences les plus importantes se trouvent en Europe (505/100 000), au Canada (248/100 000) et aux USA (214/100 000) [329]. L'un des facteurs de risques les plus étudiés est la génétique. Environ 11 % des patients atteints de RCH montrent un historique de MICI dans leur famille. De plus, de nombreux gènes ont été associés à la RCH comme par exemple le *HNFA4* ou le *CDH1* [330,331]. Mais la génétique n'explique que 7,5 % des causes de la RCH. Il existe donc d'autres facteurs tels que des facteurs environnementaux. La cigarette est l'un des facteurs environnementaux les plus fortement associés à la RCH, mais contre-intuitivement ce sont les ex fumeurs qui sont les plus sujets à déclencher une RCH alors que les fumeurs actifs ont moins de risques d'en développer [332]. Un autre facteur semble jouer un rôle important, c'est la prise de médicament. En effet, les contraceptifs, les thérapies hormonales ou encore les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) ont été associées à une augmentation de risques [319,333,334]. En revanche, l'appendicectomie et l'allaitement semblent eux conférer une protection contre la RCH [335–337]

2) La physiopathologie

Il existe de nombreuses différences entre la RCH et la MC, notamment sur la physiologie de la maladie. Les colonocytes, la muqueuse et l'épithélium défectueux jouent un rôle majeur dans la RCH. On retrouve une forte diminution de l'expression du facteur nucléaire PPAR γ et du gène *XBP1* dans les colonocytes des patients atteints de RCH [338,339]. Le facteur PPAR γ est activé par le TLR4 après fixation son ligand, le LPS [340]. Il a pour fonction de diminuer la sécrétion d'IL1 β , du TNF α ainsi que certaines chimiokines et les marqueurs d'adhésions cellulaires, lui suggérant un rôle anti-inflammatoire. Sa sous-régulation induit donc une augmentation des médiateurs de l'inflammation contribuant à l'inflammation chronique [341]. La délétion du gène *XBP1* conduit elle, à une diminution du nombre de cellules caliciformes et de Paneth induisant une réduction de la formation de muqueuse et par conséquent une augmentation de la perméabilité cellulaire [339]. Pour finir, une dysbiose est observée chez ces patients avec une diminution des bactéries commensales (Firmicutes) et une augmentation des pathogènes opportunistes (γ -protéobactéries et Entérobactéries) conduisant à une sur stimulation de l'immunité mucoale [342]. Cependant, il n'est pas encore clair si la dysbiose est une cause ou une conséquence [343]. La RCH est caractérisée par une infiltration prédominante de LT Th2, qui sécrètent une grande quantité d'IL-5, d'IL-4 et d'IL-13 avec une surexpression du gène *GATA-3*, qui collaborent pour l'élimination contre les helminthes [344,345]. Une nouvelle classe de LT-CD4 a été associée à la RCH, ce sont les Th9 [346,347]. Ces Th9 produisent de l'IL-9 qui contribue au développement de la RCH. L'IL-9 est connue pour inhiber la prolifération cellulaire et la réparation tissulaire et augmenter la concentration en TNF α et chimiokines [348,349] (Fig.16). De plus cette cytokine est connue pour induire la migration des LT Th2.

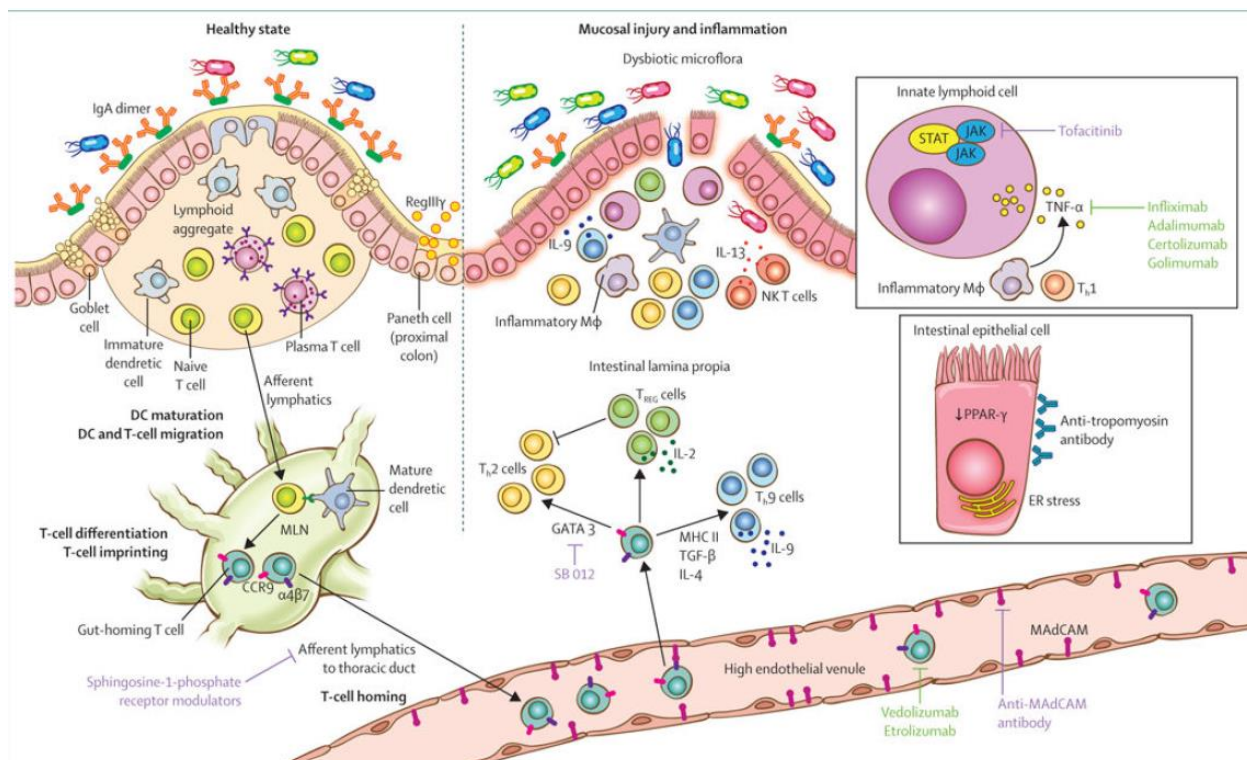


Figure 16 : La physiopathologie de la rectocolite hémorragique. (Gauche) dans un organisme sain la barrière intestinale est maintenue par du mucus et un tapis de cellules épithéliales créant une barrière cellulaire. Des IgA et des facteurs antimicrobiens (RegIIIγ) permettent de séquestrer la flore microbienne du lumen pour la transloquer dans la lamina propria. Les DC phagocytent l'antigène et sont ensuite drainés jusqu'au organe lymphoïde secondaire afin de présenter l'antigène aux LT et LB. Les LT et LB migrent vers l'intestin grâce l'expression des récepteurs CCR9 ou $\alpha 4\beta 7$. La réaction immunitaire innée et adaptative se coordonnent pour retrouver un état d'homéostasie. (Droite) la RCH est associée à des dommages dans la barrière intestinale permettant à la flore microbienne de franchir l'épithélium vers la lamina propria créant une réaction immunitaire exacerbée. Les LT Th9 induisent l'apoptose des entérocytes et inhibent la réparation de la muqueuse contribuant à maintenir la dégradation de la barrière intestinale. L'IL-13, produite par les NK-T, contribue elle aussi à la dégradation de l'épithélium. De plus, cette dégradation mucosale est associée à une dysbiose qui participe à maintenir le cycle de l'inflammation. Des cibles thérapeutiques ont émergé après connaissance de la physiopathologie de la RCH, notamment l'utilisation d'anti-TNF α . (Ungaro et al, 2017)

Il existe 3 classes de sévérité de la RCH : 1) la proctite qui est une RCH légère et concerne 30-60 % des patients, 2) la colite gauche (16-45 % des patients) et 3) la colite ulcéraire extensive (15-35 % des patients) qui touche tout le colon et est la RCH la plus sévère (Fig. 17) [350].

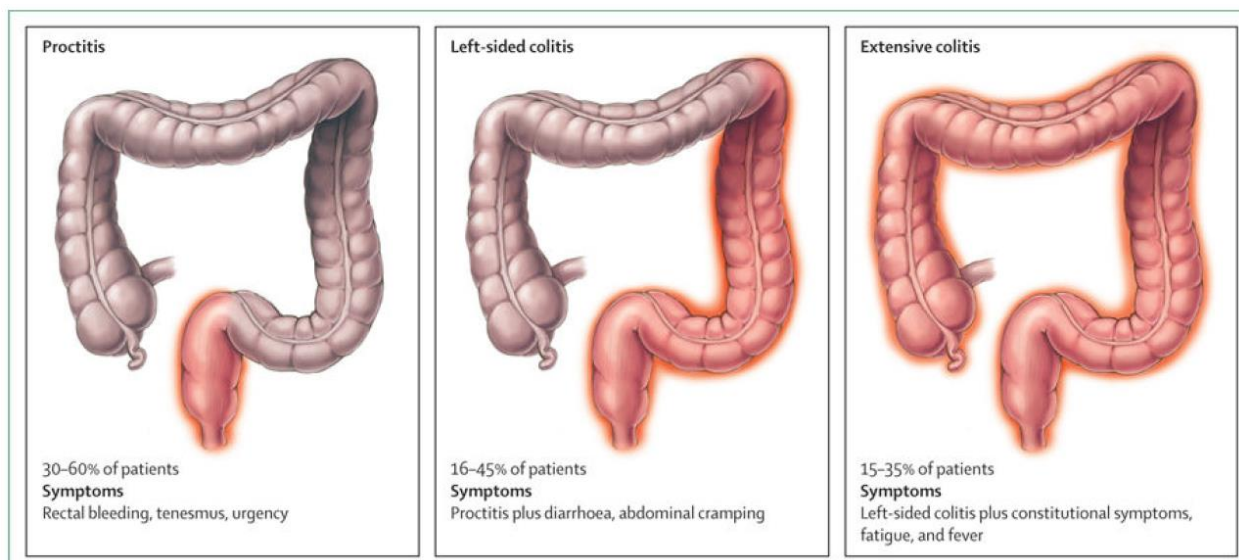


Figure 17 : Les différentes classes de sévérité de la RCH. Trois classes de RCH sont recensées. (Gauche) la proctite qui est une RCH légère représentant environ 45% des patients, (milieu) la colite gauche qui est une RCH modérée représentant 30% des patients, (droite) la colite extensive qui est une RCH sévère représentant environ 25% des patients. (Ungaro et al, 2017)

Concernant les symptômes, les plus communs sont la présence de sang dans les selles, la diarrhée ainsi que les maux de ventre et crampes abdominales. 15% des patients présentent une forme sévère avec des symptômes quelque peu différents : incontinence, fatigue, évacuation de mucus par les selles, fièvre et perte de poids. Le diagnostic de cette pathologie se fait par une analyse des selles [351], une endoscopie pour étude macroscopique et biopsies muqueuses, ainsi qu'une analyse de sang à la recherche de marqueurs de l'inflammation de type CRP et ESR [333].

iv. La maladie de Crohn

1) Epidémiologie et facteurs de risques

La MC, à l'inverse peut toucher tout le tractus intestinal avec une inflammation transmurale qui est associée à des sténoses, des fistules et des abcès. De plus, ces patients ont un risque augmenté de déclencher un psoriasis, un cancer colorectal ou encore une cholangite sclérosante primitive ou une spondylarthrite ankylosante [278,352,353]. Elle touche des personnes entre 20 et 40 ans avec un pic plus faible entre 50 et 60 ans. Sa prévalence et son incidence sont plus importantes dans les pays développés que dans les pays en développement, et dans les zones urbaines que dans les zones rurales. L'incidence la plus élevée se trouve au Canada (20,2/100 000), dans le nord de l'Europe (10,6/100 000), en Nouvelle- Zélande (16,5/100 000) et en Australie (29,3/100 000). Alors que les prévalences les plus importantes sont en Europe

(322/100 000), au Canada (319/100 000) et aux USA (214/100 000) [321,329]. Comme pour la RCH, les facteurs génétiques, environnementaux et la flore microbienne jouent un rôle majeur [319,354]. 12 % des patients atteints de MC ont un historique familial de MICI [355]. La population juive est associée à des forts risques de développer une MC (3 à 4 fois plus de risques), alors que les afro-américains et les asiatiques sont associés à un risque plus faible [356,357]. Parmi les 200 allèles répertoriés comme associés aux MICI, 37 sont spécifiques de la MC. On peut compter les gènes *NOD2* et *ATG16L1* ... [318,318,358]. Toutefois, la génétique n'explique que 13 % du déclenchement de la maladie. D'autres facteurs sont donc impliqués, comme les facteurs environnementaux. La cigarette, les antibiotiques, les AINS ou encore les contraceptifs oraux augmentent le risque d'avoir la MC [332]. Notre mode d'alimentation semble aussi jouer un rôle, la réduction des fibres et l'augmentation des gras saturés sont associés à un risque augmenté de MC [359]. Comme pour la RCH, la dysbiose (diminution des bactéries commensales (Firmicutes)- augmentation des γ -protéobactéries et actinobactéries) est associée au développement de la pathologie. 1/3 des patients montrent une augmentation de la bactérie *E.coli* dans l'intestin, qui est connue pour envahir les cellules épithéliales puis se répliquer dans les macrophages, provoquant une forte sécrétion de $\text{TNF}\alpha$. A l'inverse, les bactéries commensales qui ont un rôle anti-inflammatoire sont diminuées [360]. L'allaitement, le contact avec les animaux, vivre dans une ferme sont identifiés pour avoir un rôle protecteur dans le déclenchement de la MC [336].

2) Physiopathologie

La MC est associée à une inflammation transmurale avec un défaut de perméabilité intestinale et un défaut du système immunitaire innée et adaptatif [360,361]. Chez 40 % des patients, on retrouve une mutation dans le gène *NOD2*, qui code pour le PRR *NOD2* responsable de la reconnaissance de peptidoglycanes bactériens [362,363]. Il est exprimé par les cellules de Paneth et les monocytes [364,365] et sa mutation induit un défaut de reconnaissance microbienne [366], un défaut de fonction des cellules de Paneth et de la production de peptides anti-microbiens [367], ainsi qu'un défaut de la mort bactérienne et de la fonction du système immunitaire innée [368,369]. De plus, un échec du processus d'autophagie est observé chez ces patients. L'autophagie est une dégradation lysosomale permettant l'élimination du pathogène tout en induisant la survie cellulaire, la différenciation et l'homéostasie [370]. Ce défaut s'explique par la mutation des gènes *ATG16L1*, *IRGM* ou *LRRK2* [371,372] et conduit à la persistance du signal de danger dans le colon des patients atteints de MC, créant une réaction immunitaire exacerbée. En parallèle, et à l'inverse de la RCH, la MC est associée à un profil

Th1 et Th17 avec un défaut d'activité des Treg (Fig. 18) [373–375]. La présence de LT Th1 est induite par la sécrétion de cytokines IL-12 et IFN γ . Cette sous-population cellulaire exprime le facteur de transcription *T-bet* et sécrète de forte quantité d'IFN γ qui est un puissant activateur d'inflammation et de mort intracellulaire induite par les macrophages. Le rôle des LT Th17 a été décrit bien plus tard [376]. Ces cellules sont générées par la présence d'IL-6 et de TGF β et elles sécrètent de l'IL-17, IL-22, IL-23 et induisent le recrutement des neutrophiles [277,377]. L'IL-23 a aussi été retrouvée fortement augmentée chez ces patients et s'avère primordiale pour l'induction de la maladie [358,378,379]. Son rôle est de maintenir la survie et la prolifération des LT Th17 et d'une nouvelle classe, les ILC (*Innate Lymphoid Cells*) [380,381]. Le défaut d'activité de Treg s'explique par le fait que l'induction de Th17 inhibe l'expression de *Foxp3*, le facteur de transcription des Treg [382].

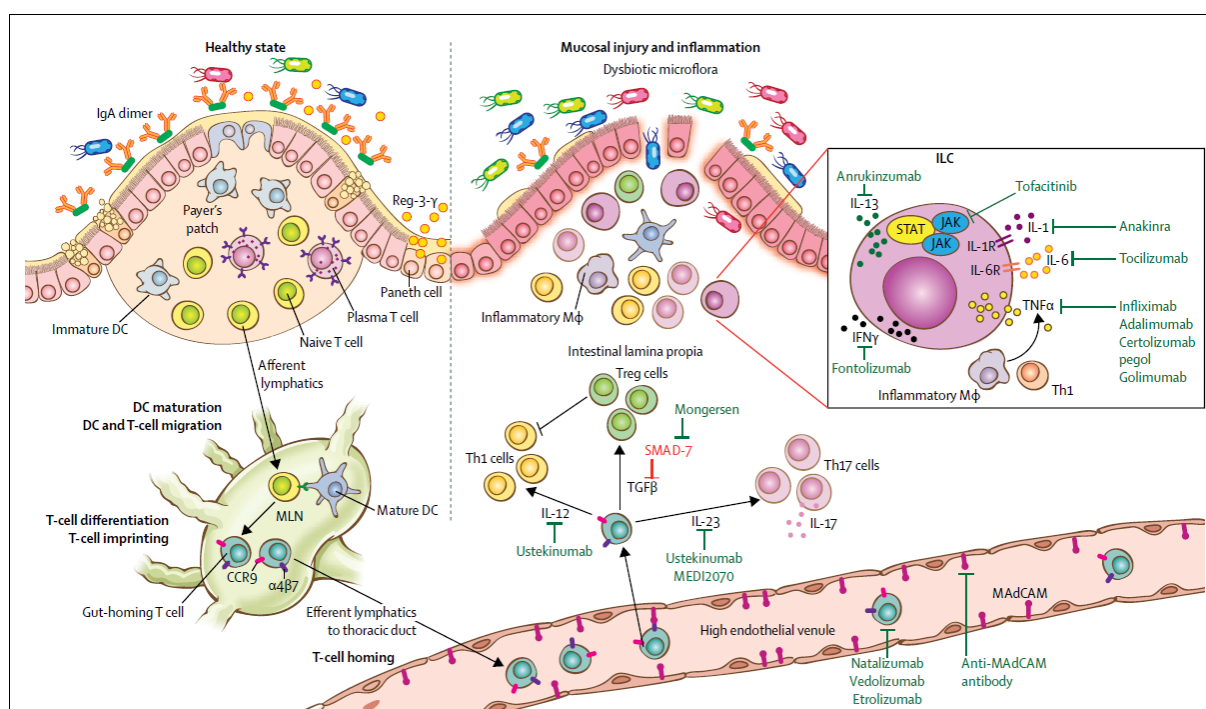


Figure 18 : La physiopathologie de la maladie de Crohn. (Gauche) dans un organisme sain la barrière intestinale est maintenue par du mucus et un tapis de cellules épithéliales créant une barrière cellulaire. Des IgA et des facteurs antimicrobiens (RegIII γ) permettent de séquestrer la flore microbienne du lumen pour la transloquer dans la lamina propria. Les DC phagocytent l'antigène et sont ensuite drainés jusqu'au organe lymphoïde secondaire afin de présenter l'antigène aux LT et LB. Les LT et LB migrent vers l'intestin grâce l'expression des récepteurs CCR9 ou $\alpha 4\beta 7$. La réaction immunitaire innée et adaptative se coordonnent pour retrouver un état d'homéostasie. Durant la MC, une brèche dans la barrière intestinale apparaît permettant le passage de la flore microbienne du lumen vers la lamina propria. Stimulant la réponse immunitaire médiée par les macrophages et les DC. Les Treg sont alors dépassés et n'arrivent pas à contrôler la prolifération des LT Th1 et Th17. En parallèle, les ILC induisent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire maintenant l'inflammation. Une dysbiose est observée perpétuant elle aussi l'inflammation. Les connaissances de la physiopathologie de la MC ont

permis de mettre en place de nouvelles thérapies dont les anti-TNF α , anti-IL6 et anti-IL1. (Torres et al, 2016)

Les symptômes cliniques de la MC dépendent de la localisation, de la sévérité et du comportement de la maladie. Les principaux symptômes sont des crampes abdominales, une diarrhée sanglante, une perte de poids et une fatigue intense. Les complications liées à la MC sont la sténose, les abcès et les fistules. De plus, un risque accru de cancer colorectal est retrouvé chez ces patients. Pour le diagnostic, une endoscopie est obligatoire avec une analyse des biomarqueurs sanguin (CRP, IgA anti-Saccharomyces) et des marqueurs de l'inflammation dans les selles (calprotectine) [351,360,383].

v. Les facteurs immunologiques

La réponse immunitaire dans ces pathologies joue un rôle primordial. Le paradigme actuel montre que la réponse Th2 et Th9 est associée à la RCH et qu'une réponse Th1 et Th17 est associée à la MC. Cependant, de récents travaux démontrent que les neutrophiles, les macrophages ainsi que certains SPM jouent un rôle tout aussi important dans ces MICI. En effet, il a été observé, dans les premières phases de la pathologie, un retard de recrutement des neutrophiles chez les patients atteints de MC [384,385]. Ce retard de recrutement semble être dû à une sécrétion diminuée d'IL-8 par les macrophages [386], ce qui conduit à un retard dans l'élimination du pathogène et crée une réaction immunitaire exacerbée dans l'intestin [75]. Ce retard de recrutement n'est que temporaire, puisque l'analyse histologique des patients atteints de MC montre une accumulation de neutrophiles dans leur colon [387]. Cette accumulation est provoquée par un échec d'apoptose des neutrophiles et contribue au développement de la pathologie par une sécrétion excessive de ROS et de MPO qui conduisent à la dégradation tissulaire de l'intestin [280,281]. L'échec d'apoptose des neutrophiles s'explique par la présence accrue d'IL-8 et une diminution de l'expression de la pro-caspase 3 [280]. En parallèle une accumulation de macrophages pro-inflammatoires est décrite chez ces patients. Ces macrophages sécrètent de fortes quantités d'IL-23, d'IFN γ , de TNF α et de G-CSF [388,389]. Ceci induit la prolifération des LT Th17 et conduit à maintenir un contexte inflammatoire alors que le G-CSF donne un signal de survie aux neutrophiles qui explique aussi leur retard d'apoptose. De plus, les neutrophiles apoptotiques libèrent certains SPM, dont l'AnxA1 qui induit normalement le basculement des macrophages pro-inflammatoires vers des macrophages pro-résolutifs. Une diminution de ce SPM est retrouvée chez les patients atteints de MC [390], ce qui démontre indirectement que l'échec d'apoptose des neutrophiles conduit au maintien du

phénotype pro-inflammatoire des macrophages. De plus, les patients atteints de RCH, montrent une diminution du taux de LXA4 et de l'enzyme LO-15 qui conduit à un échec de résolution de l'inflammation et contribuent à une inflammation chronique [139,390]. Les neutrophiles ainsi que les macrophages contribuent donc tout autant au développement des MICI que les LT. L'échec de résolution de l'inflammation chez ces patients est bien présent et de nouvelles cibles thérapeutiques doivent être considérées. En effet, les traitement actuels visent les mécanismes d'initiation de l'inflammation dans le but de prévenir l'inflammation, mais étant donné le défaut de résolution chez ces patients, de nouvelles stratégies pourraient permettre d'activer la résolution de l'inflammation et résoudre cette inflammation chronique [391] (Fig. 19).

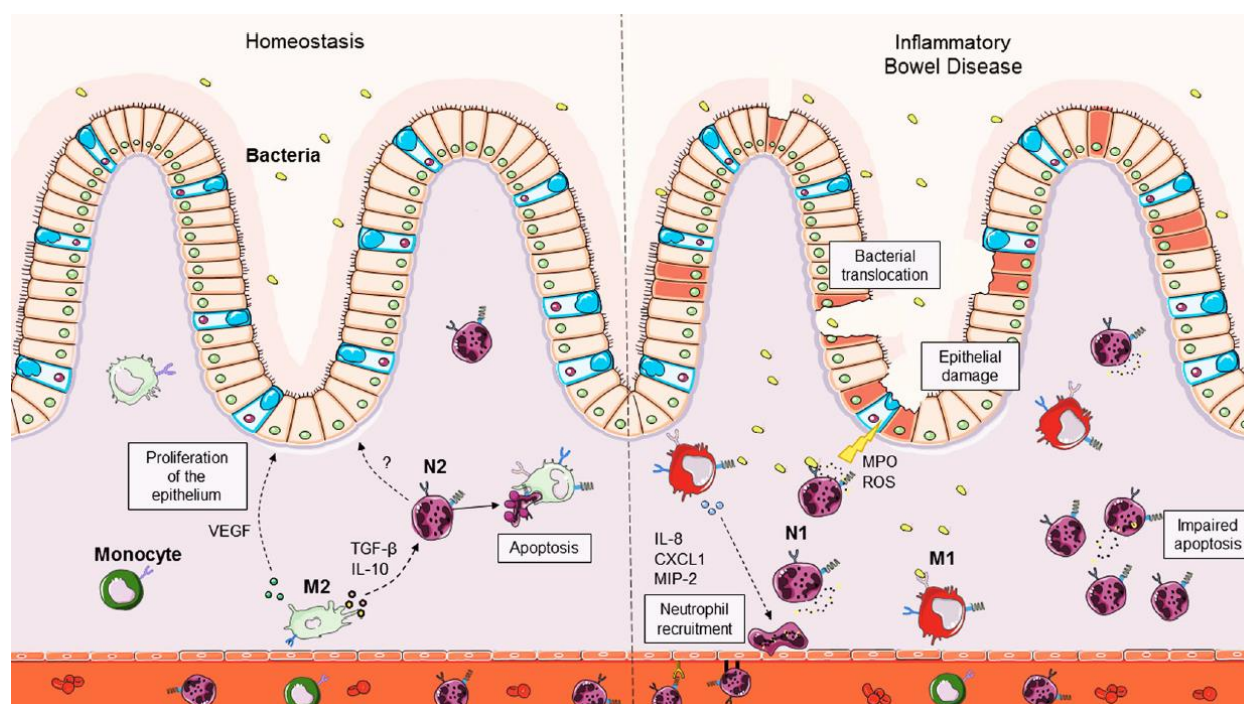


Figure 19 : Les macrophages et les neutrophiles impliqués dans les MICI. (Gauche) homéostasie intestinale est régie par la présence de macrophages anti-inflammatoires M2 sécrétant des cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGF-β). Ces cytokines influencent le profil des neutrophiles et permettent d'induire leur apoptose ainsi que la prolifération de l'épithélium. Les neutrophiles apoptotiques sont ensuite éliminés par efferocytose conduisant au nettoyage tissulaire. (Droite) lors de MICI des dommages dans la barrière intestinale sont observés menant à l'entrée de microorganisme dans la lamina propria. De plus, les macrophages présentent un profil pro-inflammatoire et sécrètent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (IL-8, CXCL1, MIP-2) provoquant le recrutement de neutrophiles. Ces neutrophiles libèrent des facteurs anti-microbiens (ROS, MPO) qui détruisent la barrière intestinale. L'accumulation de neutrophiles dans le tissu s'explique par un défaut d'apoptose de ces cellules. (Prame Kumar et al, 2018)

d) Les traitements actuels

D'une façon générale les traitements visent à prévenir les rechutes, améliorer la guérison ainsi que la cicatrisation des muqueuses et éviter les complications liées au MICI. Les traitements sont utilisés de façon graduelle en fonction de la sévérité de la pathologie (Fig. 20).

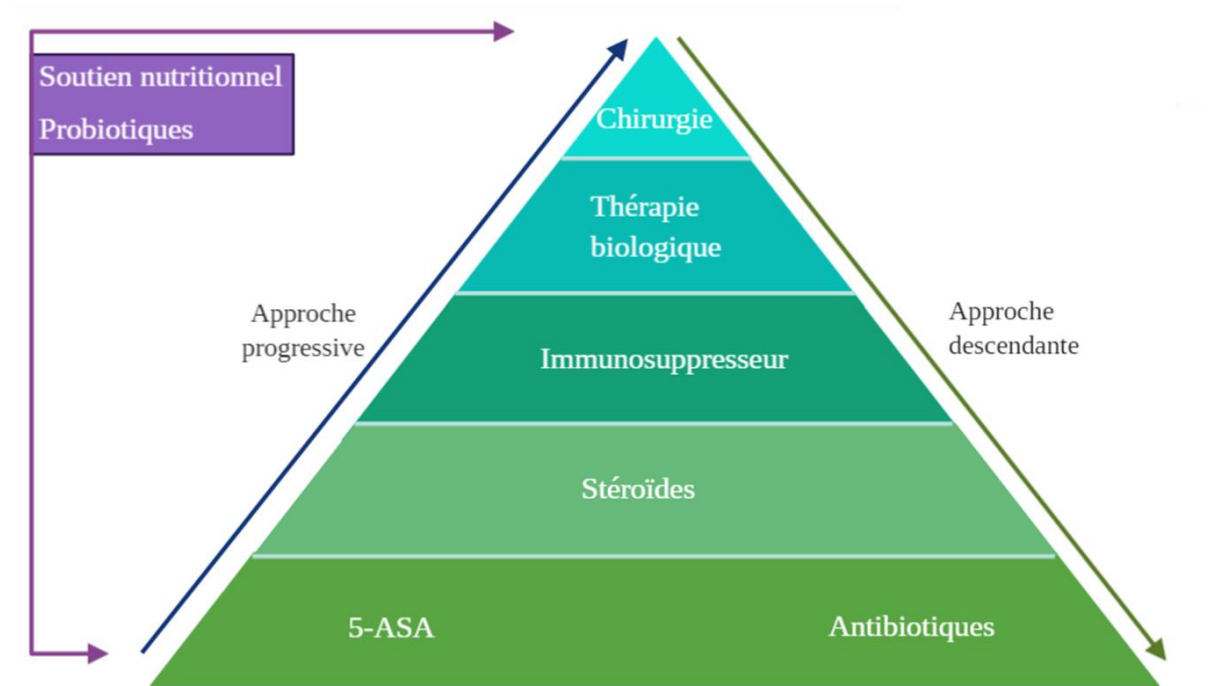


Figure 20 : Pyramides de traitements dans les MICI. Les traitements actuels utilisés dans les MICI sont graduels en fonction de la sévérité de la pathologie. Les MICI légères sont traitées avec des antibiotiques ou du 5-ASA, puis l'on retrouve les stéroïdes, les immunosuppresseurs pour des MICI modérées et les thérapies biologiques pour les MICI sévères. L'échec de ces traitements conduit à la résection chirurgicale. (Adaptée de IBD clinic)

Si les patients ne répondent pas à la première ligne de traitement, qui sont les aminosalicyliques, les corticostéroïdes, les antibiotiques et les immunomodulateurs, alors les anti-TNF α sont utilisés ainsi que des agents ciblant les intégrines (nécessaire à la migration des LT dans l'intestin). Malheureusement, en cas de non-réponse à ces traitements, les patients se retrouvent dans une impasse thérapeutique car il n'existe, pour le moment, aucun autre traitement. La solution finale, reste la chirurgie. Celle-ci apporte de nombreux inconvénients dans la vie des patients, et n'exclut pas une rechute chez ces patients.

i. Les anti-inflammatoires et les immunomodulateurs

Les traitements les plus utilisés sont les amino-salicyliques qui regroupent le sulfasalazine et le 5-aminosalicylic (5-ASA) [392,393]. Ils ont un rôle anti-inflammatoire et réduisent la rechute des patients. Cependant 30 % des patients montrent des effets secondaires (nausée, vomissement, diarrhée, fièvre, pancréatite, néphrite, hépatite) [394–396]. En deuxième lieu, on retrouve les corticostéroïdes, ils sont les plus utilisés lors d'épisodes aigus de la maladie. Le plus courant est la prednisone utilisée chez les patients RCH, elle a un effet anti-inflammatoire et immunosuppresseur sur le chimiotactisme et la sécrétion de cytokines de l'inflammation [397]. Là aussi des effets secondaires à court terme sont bien connus (rétention d'eau/œdème, prise de poids) et à long terme (ostéoporose, cataracte, myopathie, diabète). Face à une pathologie d'expression plus sévère, l'utilisation d'immunosuppresseurs est indiquée. Les plus courants sont l'azathioprine (AZA) ou le 6-mercaptopurine [398–400]. En inhibant la prolifération des LT et des NK, ils provoquent un effet immunosuppresseur et anti-inflammatoire. Ils présentent eux aussi des effets secondaires mais en général bien contrôlés [396].

ii. Les anti-TNF

L'utilisation des anti-TNF α (*Tumor Necrosis Factor alpha*) est considérée depuis ces dernières années comme le traitement de référence. Le TNF α est une cytokine pro-inflammatoire qui joue un rôle important dans la RCH mais aussi dans la MC, et la réduction de son niveau tend à diminuer la réponse inflammatoire pathogénique [401–404]. Ils sont utilisés pour des patients atteints de MICI modérée à sévère. Parmi ces anti-TNF α , on retrouve des anticorps complets, l'Infliximab, Adalimumab et le Golimumab, ou bien des molécules de fusion comme pour l'Etanercept (fragment Fc de l'anticorps) et le Certolizumab (fragment Fab de l'anticorps). Les anticorps complets se lient au TNF α de façon bivalente afin de former un complexe « anticorps-antigène » et induisent différents mécanismes : neutralisation du TNF, cytotoxicité des cellules liant le TNF ou exprimant le TNF Récepteur, activation des voies de l'apoptose et inhibition des voies de synthèse de cytokines pro-inflammatoires [405–407]. Alors que l'Etanercept, constitué d'un fragment Fc et d'un domaine de liaison au TNFR [408], permet l'inhibition de l'action du TNF sur son récepteur. Le Certolizumab est lui constitué d'un fragment Fab et il se lit de façon monovalente au TNF [409]. De nombreuses études ont démontré une efficacité de ce traitement avec 60 % des patients RCH et 50 % des patients MC présentant une diminution de l'inflammation avec des effets cliniques très positifs, une amélioration histologique sur l'infiltration du côlon, ainsi qu'une diminution des fistules [403]. Cependant, plus de 30 % des

patients ne répondent pas à ce traitement ciblant le TNF α . De plus 50 % des répondeurs initiaux perdent leur réponse dans les 3-5 ans après le début du traitement [410]. Ce sont donc 50 % de patients qui se retrouvent dans une impasse thérapeutique, pour lesquels de nouvelles stratégies doivent être mises en place.

iii. Les anti-intégrines

Afin de contrer ses impasses thérapeutiques médiée par l'échec et la résistance aux anti-TNF α de nouvelles stratégies sont élaborées. La migration des LT des OLS vers l'intestin se fait par l'expression d'intégrines. On retrouve les $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$ ou $\alpha E\beta 7$. Afin de contrer cette migration des LT vers l'intestin, qui est à l'origine de la persistance de l'inflammation, plusieurs anticorps ont été mis au point et commercialisés. Parmi eux, le Natalizumab, un anticorps anti- $\alpha 4$, qui bloque les intégrines $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 4\beta 7$. Il s'agit du premier anticorps à avoir démontré des effets bénéfiques contre les MICI avec un maintien de la rémission [411]. Cependant il est associé à un risque accru de leucoencéphalite multiple par son inhibition de la migration, par $\alpha 4\beta 1$, vers le système nerveux central [411]. Le Vedolizumab introduit secondairement sur le marché, est un anti- $\alpha 4\beta 7$ spécifique de la migration des LT dans le système gastro-intestinal [412]. Il empêche la liaison de cette intégrine à son récepteur MadCAM-1 exprimé par les cellules endothéliales, provoquant l'inhibition de la migration des LT vers l'intestin. Cependant il n'inhibe pas la migration vers d'autres organes comme le fait le Natalizumab. Il est utilisé dans le traitement de la RCH et de la MC modérée à sévère en deuxième ligne après un échec aux anti-TNF α et est en passe de devenir la première ligne au vu des derniers résultats cliniques observés très encourageants. Il démontre une rémission chez 30 à 40 % des patients qui n'ont pas répondu aux anti-TNF avec 90 % de rémission 152 semaines après le traitement [413,414]. Une étude a notamment été faite afin de comparer l'effet thérapeutique du Védolizumab et des anti-TNF à 52 semaines. Cette étude démontre que le Védolizumab diminue les risques d'infections et maintient la rémission clinique et l'amélioration endoscopique de façon significative par rapport à l'Adalimumab à 52 semaines [415]. Le dernier traitement en date est l'Etrolizumab, qui est un anticorps anti- $\beta 7$ [416]. Il cible donc les intégrines $\alpha 4\beta 7$ et $\alpha E\beta 7$ et les études pré-cliniques montrent qu'il inhibe la migration des LT dans l'intestin sans inhiber la migration vers les autres muqueuses [417]. Il est actuellement en phase clinique III.

iv. Problématiques

Les thérapies anti-TNF α (Adalimumab, Infliximab, Certolizumab, Golimumab, Etanercept) ont une efficacité comparable en induisant et en maintenant la rémission, spécialement chez les patients ayant une pathologie avancée, sévère et qui sont réfractaires aux traitements

conventionnels utilisant les corticostéroïdes ou les immunomodulateurs [406]. En effet, un an de rémission clinique a été observée sous anti-TNF α chez 35 % des patients atteints de RCH et 33 % chez les patients ayant la MC. Néanmoins, des données ont montré que leur utilisation n'est pas efficace chez 1/3 des patients en première ligne de traitement, et la moitié des répondeurs montrent une perte de réponse dans les 5 ans (résistance secondaire). De nombreuses hypothèses ont été formulées afin d'expliquer ces échecs. Concernant la résistance secondaire, le manque de réponse peut être dû à une dose insuffisante, à la présence d'ADA (anticorps anti-médicaments), ou à la présence trop prédominante de structures fibrillaires [10,403]. Pour la résistance primaire, l'hypothèse la plus discutée concerne l'implication de mécanismes indépendants de la voie de signalisation au TNF α pouvant contrôler l'inflammation. De nombreuses études ont été entreprises chez les patients ayant une RCH ou une MC afin de déterminer la différence en terme génétique entre les patients répondeurs et les non-répondeurs aux anti-TNF. Parmi ces études l'une d'entre elle a mis en évidence une surexpression du récepteur à l'IL-7 chez les patients qui ne répondent pas aux anti-TNF. Cette cytokine contrôle l'expression de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ permettant la migration des LT dans le colon [418]. Le blocage de ce récepteur réduit la migration des LT dans le colon et diminue la sévérité de la pathologie. D'autres travaux ont mis en avant 5 gènes impliqués dans la résistance aux anti-TNF, dont l'IL-13R $\alpha 2$ et l'IL-11 [419]. Cela sous-entend fortement qu'il y a des voies dépendantes du TNF et indépendantes du TNF dans les MICI et qui peuvent être ciblées afin de répondre à la problématique actuelle de la résistance primaire et secondaire [410].

OBJECTIFS

L'objectif de ma thèse a été d'évaluer et de caractériser l'activation de la voie ChemR23 par un anticorps agoniste. ChemR23 est un GPCR connu pour activer les voies de la résolution de l'inflammation lorsqu'il lie son ligand la Résolvine E1 (RvE1). La résolution de l'inflammation est un mécanisme actif permettant de résoudre l'inflammation aiguë. Désormais, plusieurs médiateurs lipidiques de la résolution de l'inflammation ont été décrits par C.Serhan et son équipe, ce qui a permis de mettre en évidence 4 familles de médiateurs lipidiques de la résolution de l'inflammation (SPM) : les lipoxines, les résolvines, les protectines et la marésine. Ces molécules sont connues pour 1) diminuer l'infiltration leucocytaire, 2) enclencher l'apoptose des neutrophiles et 3) induire la clairance par le mécanisme d'efferocytose médiée par les macrophages. Ce concept de résolution de l'inflammation permet donc, par l'intermédiaire de ces 3 mécanismes, de résoudre l'inflammation, mais lorsque ce mécanisme est en échec cela conduit rapidement à une inflammation chronique non contrôlée. En effet, plusieurs maladies inflammatoires chroniques (MIC) ont démontré des défauts de résolution avec notamment l'accumulation de neutrophiles sur le site inflammatoire, un retard de clairance par les macrophages ou bien une diminution de quantité de certains SPM. L'utilisation de ces SPM dans des modèles d'inflammation aiguë démontre qu'ils accélèrent la phase de résolution de l'inflammation justifiant leur pouvoir pro-résolutif. La RvE1 a notamment démontré son effet anti-inflammatoire et pro-résolutif dans de nombreux modèles *in vivo* dont les colites induites, la parodontite et les inflammations pulmonaires. En effet, la Résolvine E1 est connue pour diminuer la migration leucocytaire, augmenter l'apoptose des neutrophiles et induire l'efferocytose par les macrophages. Toutefois, sa pharmacocinétique et sa stabilité ne sont pas idéale compte tenu de sa structure lipidique. Nous avons donc évalué l'action d'un anticorps anti-ChemR23 agoniste pour activer la résolution de l'inflammation dans des modèles similaires à ceux de la RvE1, mais avec l'objectif d'augmenter les effets de l'activation de ChemR23 ainsi que la pharmacocinétique facilitant le traitement des patients. Nous avons étudié son efficacité préclinique dans des modèles de colites aiguë et chronique, ce qui n'avait encore jamais été évalué auparavant. L'utilisation d'un anticorps apporte de nombreux avantages en comparaison à la RvE1 qui est un lipide. Ceci pourrait donc permettre de faciliter le traitement des patients et améliorer leur quotidien.

J'aborderai maintenant le développement de l'anticorps anti-ChemR23 effectué par mon laboratoire, OSE Immunotherapeutics, afin de comprendre comment nous avons identifié les propriétés d'un anticorps ciblant la résolution de l'inflammation et la sélection d'un candidat final pour l'étude pré-clinique puis clinique.

Développement d'un anticorps anti-ChemR23 par la société OSE Immunotherapeutics

Pour étudier le rôle de ChemR23, nous avons d'abord recensé tous les anticorps anti-ChemR23 commerciaux disponibles et évalué leur activité *in vitro* sur des macrophages et cellules dendritiques. Ce rôle a été étudié dans un protocole décrit dans la littérature où il est possible de mesurer l'activité agoniste du récepteur ChemR23 telle que la Résolvine E1 l'induit [184]. Nous avons mis en évidence qu'un seul anticorps anti-ChemR23, nommé α ChemR23 ci-dessous, induisait des effets pro-résolutif en augmentant la sécrétion d'IL-10 et de CCL17 par les macrophages de type M2 et en diminuant la sécrétion d'IL-12p40 par les DC (Fig.21).

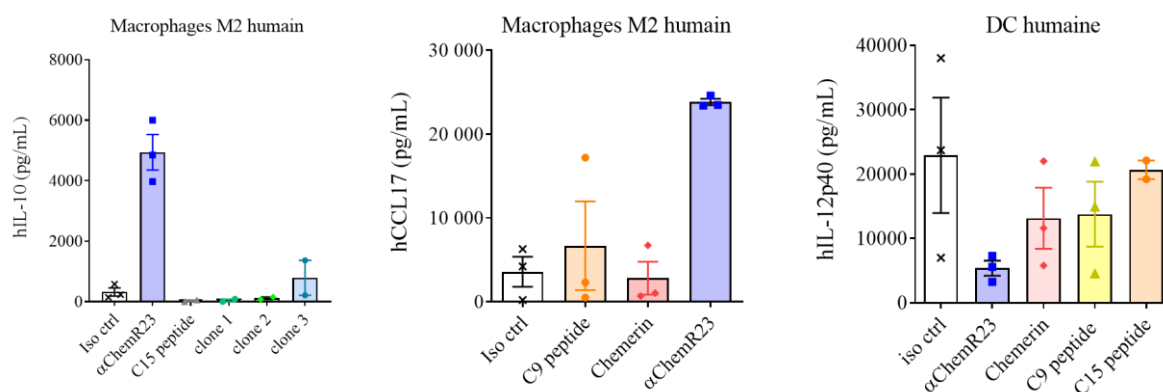


Figure 21 : Action des anticorps anti-ChemR23 commerciaux. (Gauche) graphique représentant la sécrétion d'IL-10 par les macrophages M2 (IL-4) humains traitées avec différentes molécules durant la polarisation (n=3). (Milieu) graphique représentant la sécrétion de CCL17 par les macrophages M2 (IL-4) humains après stimulation par différentes molécules durant la polarisation (n=3). (Droite) graphique représentant la sécrétion d'IL-12p40 par les DC humaines maturées au LPS et stimulées avec différentes molécules durant la maturation (n=3). Iso ctrl : isotype contrôle mIgG1 ; α ChemR23 : anticorps commercial anti-ChemR23 de souris, C-7 ; chémérine : protéine se liant à ChemR23 ; peptide C15 et C9 : dérivés de la chémérine ; clone 1, 2 et 3 : anticorps commerciaux anti-ChemR23.

Nous avons identifié que les peptides d'immunisation utilisés pour générer ces différents anticorps ne sont pas les mêmes. En effet, le peptide d'immunisation pour le clone 1, 2 et 3 comprend la région de la boucle 1 du récepteur alors que le peptide d'immunisation de notre anticorps anti-ChemR23 est celui de la boucle 3. Ceci explique probablement les différences d'activité des anticorps entre eux, mettant en avant la complexité de générer des anticorps anti-GPCR.

Nous avons, par la suite, séquencé par spectrométrie de masse la séquence de cet anticorps anti-ChemR23. Cette technique d'analyse ne permettant pas de différencier les leucines des

isoleucines que nous avons identifiés au nombre de 2 dans la séquence, nous avons généré 4 variants chimériques se différenciant par ces 2 motifs sur les CDR3 : Leu/Leu (1G1), Leu/Iso (2G1), Iso/Leu (3G1) et Iso/Iso (4G1) fusionnés avec la chaîne IgG1 humain.

Afin de sélectionner un de ces anticorps chimérique, nous avons étudié leur productivité, leur affinité et avidité de liaison, ainsi que leur efficacité *in vitro*.

Peu de différences ont été observées concernant la productivité et l'affinité de liaison de ces 4 variants chimériques. L'étude *in vitro* a donc été le critère discriminant. En effet, nous avons évalué l'action de ces variants sur la maturation des cellules dendritiques et la polarisation des macrophages dans le but de s'assurer de la conservation des propriétés résolutive précédemment identifiées avec l'anticorps originel. Nous avons mis en avant que tous les variants chimériques, comparés à l'anticorps commercial, le C-7, diminuent l'expression des marqueurs d'activation CD80, CD86, CD40 et le CMH de classe II (I/Ab^b) sur des DC de souris (Fig.22).

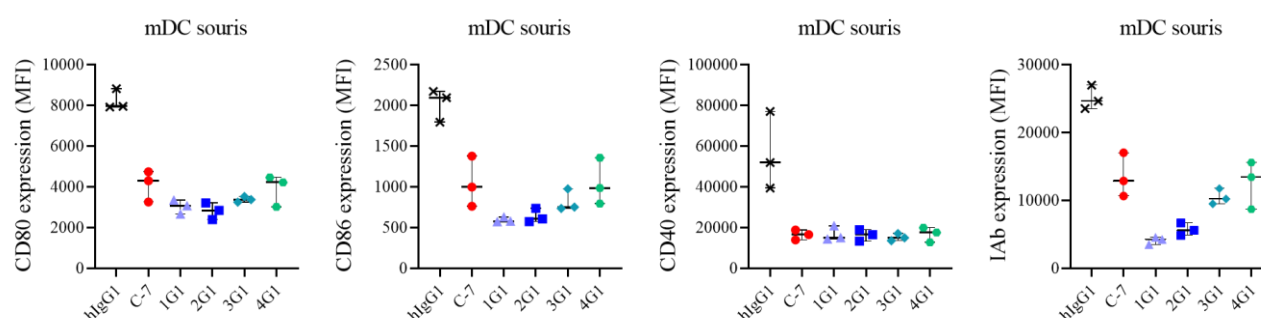


Figure 22 : Etude de l'efficacité *in vitro* de variants chimériques anti-ChemR23 sur des DC de souris. Graphique représentant le phénotype des DC de souris maturées au LPS et traitées avec différents anticorps durant la maturation (n=3). L'expression des marqueurs CD80, CD86, CD40 et CMHII (IAb) ont été étudiés. hIgG1 : isotype contrôle ; C-7 : anticorps anti-ChemR23 de souris commercial, 1G1, 2G1, 3G1, 4G1 : variants chimérique issue de l'anticorps C-7.

De plus, l'étude sur des macrophages humain a mis en évidence que selon l'anticorps chimérique testé, la diminution de la sécrétion d'IL12p40 par les macrophages M1 et du marqueur CCR7 par les macrophages M2 pouvait être différente, et nous l'avons observé plus forte pour les variants 1G1 et 2G1 (Fig.23).

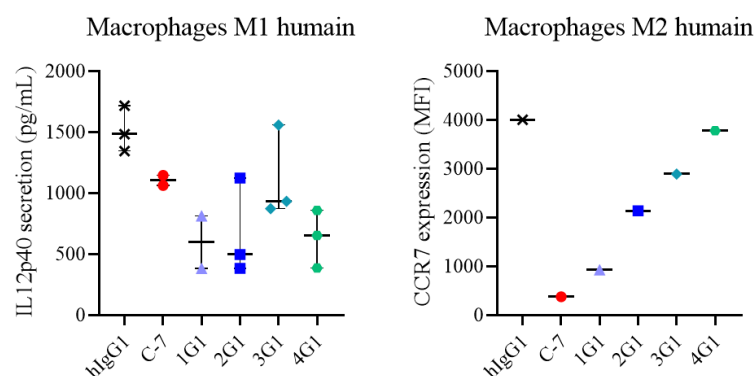


Figure 23 : Etude de l'efficacité *in vitro* des variants chimériques anti-ChemR23 sur des macrophages humains. Graphiques représentant (gauche) la sécrétion d'IL-12p40 par les macrophages M1 humains traités avec différents anticorps durant la polarisation (n=3) et (droite) l'expression du marqueur CCR7 par les macrophages M2 humain après stimulation par différents anticorps pendant la polarisation (n=1). hIgG1 : isotype contrôle ; C-7 : anticorps anti-ChemR23 de souris commercial, 1G1, 2G1, 3G1, 4G1 : anticorps anti-ChemR23 chimérique issue de l'anticorps C-7.

La viabilité des cellules (donnée non montrée) a aussi été un paramètre discriminant où l'on a observé que les anticorps 3G1 et 4G1 induisaient une toxicité et une mortalité importante des cellules les rendant inutilisable pour la suite de l'étude.

Ainsi, toutes ces données nous ont permis de sélectionner l'anticorps chimérique **2G1** portant les motifs Leu/Iso.

Récemment, l'humanisation du 2G1 a été réalisée. Cette humanisation a été effectuée par une méthode *in silico* appelée « CDR grafting ». La chaîne lourde du 2G1 a été greffée sur 3 lignées germinatives humaines et la chaîne légère a été greffée sur 3 autres lignées germinatives humaines permettant ainsi de générer 9 anticorps. Seulement une des 3 chaînes lourdes et une des 3 chaînes légères a permis la production d'un anticorps, nommée HALA, faisant une première sélection.

Cet anticorps HALA, se liant toujours à ChemR23 (donnée non montrée), a subi de nouveau quelques mutations dans le CDR3 des chaînes lourde et légère afin d'augmenter son humanisation et de réduire les risques de glycosylation ou de déamination. Trois vagues d'humanisation ont ainsi été faites. La productivité ainsi que l'affinité de ces anticorps humanisés ont été étudiées à chaque vague d'humanisation et nous avons mis en évidence que la deuxième vague d'humanisation a permis d'augmenter la liaison des anticorps au peptide de ChemR23 reconnu par l'anticorps (**Fig.24**). En effet, les DE50 (dose efficace 50) des anticorps 2G1 WT et de l'anticorps HALA sont plus élevées que celles des anticorps HCLC, HDLC et

HDLD signifiant que l'humanisation de notre anticorps améliore l'affinité de celui-ci pour son peptide.

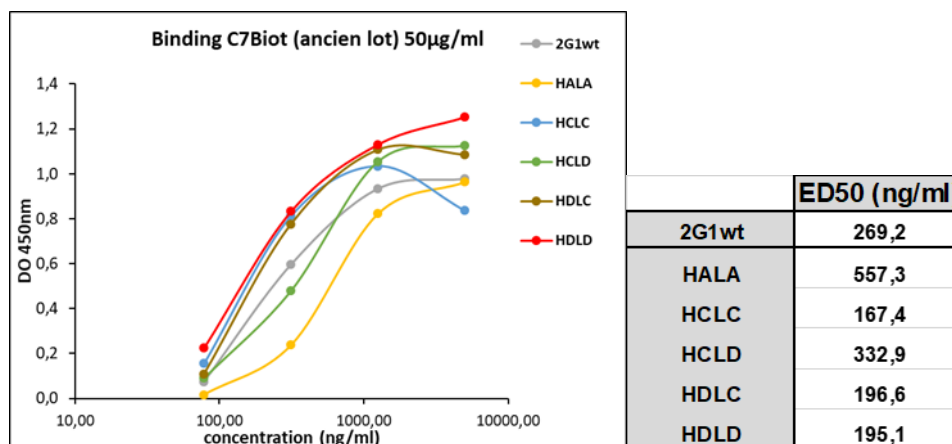


Figure 24 : Etude d'affinité de liaison des anticorps anti-ChemR23 en cours d'humanisation. (Gauche) ELISA de liaison des anticorps anti-ChemR23 en cours d'humanisation au peptide d'immunisation. La liaison des anticorps a été évaluée par une dose réponse de 100 ng/mL à 10 µg/mL. (Droite) tableau représentant les ED50 (Dose efficace 50) de chaque anticorps. 2G1WT : anticorps anti-ChemR23 chimérique ; HALA, HCLC, HCLD, HDLC, HDLD : anticorps anti-ChemR23 en cours d'humanisation.

La troisième vague d'humanisé, permettant de diminuer l'immunogénicité de l'anticorps nous a permis, une nouvelle fois, d'améliorer cette affinité de liaison avec l'anticorps HEF-LDT52S (Fig.25).

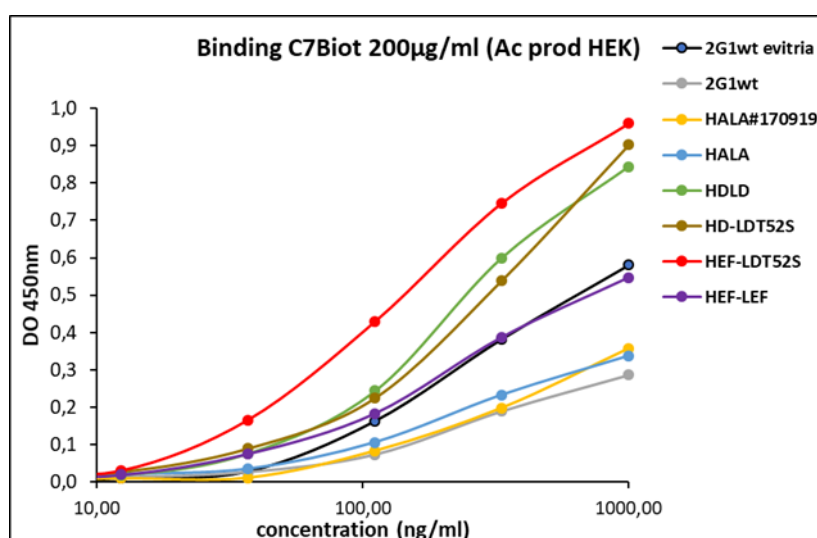


Figure 25 : Etude de l'affinité de liaison des anticorps de la troisième vague d'humanisation. ELISA de liaison des anticorps anti-ChemR23 en cours d'humanisation au peptide d'immunisation. La liaison des anticorps a été évaluée en dose-réponse de 10 ng/mL à 1 µg/mL.

2GA Evitria : anticorps anti-ChemR23 chimérique produit chez évitria ; 2G1WT : anticorps anti-ChemR23 chimérique produit chez OSE Immunotherapeutics ; HALA, HDLD, HD-LDT52S, HEF-LDT52S, HEF-LEF : anticorps anti-ChemR23 en cours d'humanisation.

En parallèle de l'étude d'affinité des anticorps, nous avons évalué dans un test biologique si l'humanisation de l'anticorps pouvait avoir un impact sur sa fonction agoniste. Il a été décrit que la RvE1 était capable d'induire l'apoptose des neutrophiles via son récepteur ChemR23. Nous avons donc étudié l'effet de notre anticorps originel anti-ChemR23 murin sur l'induction de l'apoptose des PMN. Par ce test, nous avons mis en avant qu'un anticorps anti-ChemR23 permettait d'induire l'apoptose des neutrophiles et in fine leur mort, de façon comparable à la RvE1. Nous avons donc utilisé ce test biologique afin d'évaluer l'activité agoniste des futurs variants d'humanisation. Cela nous a permis de mettre en évidence que les différentes vagues d'humanisations n'empêchent pas l'action biologique des anticorps agoniste anti-ChemR23 avec au contraire une activité renforcée pour certains variants ou l'on a observé plus de mortalité que l'anticorps initial, le 2G1 (**Fig.26**).

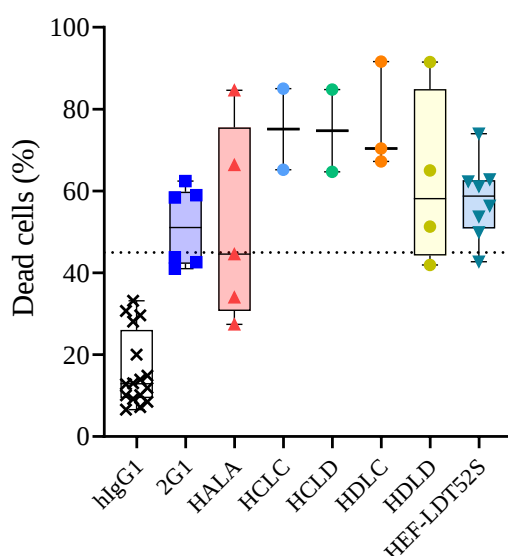


Figure 26 : Etude de l'efficacité in vitro des anticorps humanisés sur l'induction de mortalité des neutrophiles. Graphique représentant le pourcentage de neutrophiles mort après 24h de traitement avec un isotype contrôle (hIgG1) ou un anticorps anti-ChemR23 (2G1, HALA, HCLC, HCLD, HDLC, HDLD, HEF-LDT52S). Ce pourcentage de mortalité a été évalué par microscopie à l'aide d'une sonde Live and Dead.

Le candidat sélectionné à la suite de l'humanisation a été le **HEF-LDT52S** car il fait partie des anticorps les plus humanisés avec une forte affinité pour son récepteur, une bonne productivité,

une activité biologique améliorée par rapport à l'anticorps initial et enfin une immunogénicité diminuer le protégeant d'une réponse immunitaire lors du traitement.

Nous allons donc maintenant décrire les résultats que nous avons obtenus à la suite de l'étude d'efficacité de notre anticorps anti-ChemR23. Ces résultats font l'objet d'un papier en cours de soumission.

RESULTATS

ARTICLE :

**Agonist anti-ChemR23 mAb reduces tissue
neutrophil accumulation and triggers chronic
inflammation resolution**

Agonist anti-ChemR23 mAb reduces tissue neutrophil accumulation and triggers chronic inflammation resolution

Short Title: ChemR23 mAb agonist triggers inflammation resolution

Trilleaud C.^{1,2,†}, Gauttier V.^{1,†}, Belarif L.¹, Biteau K.¹, Mary C.¹, Teppaz G.¹, Thepenier V.¹, Girault I.¹, Danger R.², Robert-Siegwald G.⁴, Neel M.^{2,3}, Poupon A.⁵, Mosnier JF.^{2,6}, Chene G.⁷, Dubourdeau M.⁷, Blancho G.^{2,3}, Vanhove B.^{1,††}, Poirier N.^{1,††,*}

¹OSE Immunotherapeutics, Nantes, France

²Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie (CRTI), UMR 1064, Inserm, Université de Nantes, Nantes, France

³Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), CHU Nantes, Nantes, France

⁴Inovarion, Paris, France

⁵MabSillico, Nouzilly, France

⁶Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, CHU Nantes, Nantes, France

⁷Ambiotis, Canal Biotech 2, Toulouse, France

[†]These authors contributed equally to the first authorship of this study

^{††} These authors contributed equally to the senior authorship of this study

*Correspondence should be addressed to:

Dr. Nicolas Poirier
OSE Immunotherapeutics
22 Boulevard Benoni Goullin
44200 Nantes, France
Tel: +33(0) 228 291 010
Email: nicolas.poirier@ose-immuno.com

The authors of this manuscript have conflicts of interest to disclose: C.T., V.G., C.M., B.V. and N.P. are authors of patents related to ChemR23 agonists and employee of OSE Immunotherapeutics, a company owning ChemR23 agonists.

Abstract

Resolution of inflammation is elicited by pro-resolving lipids such as resolvin E1, which activate GPCRs to induce neutrophil apoptosis, reduce neutrophil tissue recruitment, and promote macrophage efferocytosis. We conducted transcriptional analyses in up to 300 patients with Inflammatory Bowel Disease (IBD) to identify potential therapeutic targets mediating chronic inflammation. We found that ChemR23, a GPCR targeted by resolvin E1, is over-expressed in inflamed colon tissues of severe IBD patients unresponsive to anti-TNF α or anti- $\alpha 4\beta 7$ therapies. Moreover, treatment resistance was also characterized by significant mucosal neutrophil accumulation, consistent with previous reports showing that chronic inflammation is associated with abnormal efferocytosis of apoptotic neutrophils. ChemR23 was mainly expressed in resident tissue macrophages and neutrophils under inflammatory conditions. Finally, we have identified an anti-ChemR23 agonist antibody that induces receptor signaling, promotes macrophage efferocytosis and neutrophil apoptosis at the site of inflammation, but not at the periphery. ChemR23 agonist mAb accelerated inflammation resolution in acute preclinical models and triggered efficient resolution in ongoing chronic colitis models, with a significant decrease in leukocyte infiltrates, tissue lesions, fibrosis and inflammation-driven tumors. Our findings suggest that failure of current IBD therapies may be associated with neutrophil infiltration and that ChemR23 is a promising therapeutic target for chronic inflammation. Thus, we uncover a novel treatment strategy for inflammatory disease using mAbs as pharmacological agonists of inflammation resolution.

Key words: ChemR23, Resolvin, Inflammation Resolution, Inflammatory Bowel Disease, Neutrophils

Introduction

Inflammatory Bowel Disease (IBD) such as ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) are chronic relapsing gastrointestinal disorders characterized by chronic intestinal inflammation, dysregulated immune responses to intestinal microbiota, and dysfunction of the epithelial barrier [1,2]. Although IBDs are associated with marked morbidity and have a major impact on quality of life and ability to work, their incidence and prevalence keeps increasing worldwide [3, 4]. Current conventional treatments aim to prevent inflammation by gradual administration of anti-inflammatory agents, steroids, immunosuppressive drugs or biological agents targeting TNF cytokines or gut-specific $\alpha 4\beta 7$ integrin, particularly for refractory and severe forms of IBD [5, 6]. However, these therapies do not induce remission in over half of the patients, and relapse also occurs over time in primary responders [7], with fibrotic complications developing in a significant number of patients [8]. Thus, research efforts should be invested in identifying novel mechanisms and signaling networks implicated in, not only dampening or preventing inflammation, but also in turning off the chronicity of inflammation and promoting tissue homeostasis.

Inflammation resolution is an active process governed in part by endogenous mediators, including members of the superfamily of specialized pro-resolving mediators (SPMs), which promote clearance of inflammatory infiltrates, restoration of tissue integrity, and ultimately the return to normal function [9–12]. Failed resolution occurs when excessive or unresolved protective acute inflammation response progresses to chronic inflammation, which is a universal feature in many organ-specific diseases [13]. SPMs are lipids biosynthesized from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids that act as resolution agonists by targeting distinct G protein coupled receptors (GPCR) expressed by immune cells, in particular phagocytes [14–17]. SPMs have been shown to stop neutrophil transmigration and trigger their

apoptosis, and to promote non-phlogistic phagocytosis of cellular debris (efferocytosis), including apoptotic neutrophils [18, 19]. These functions are critical for inflammation resolution, as neutrophils recruited in excess or unable to exit the site of inflammation can cause unintended collateral tissue damage, which amplifies ongoing inflammation [20, 21]. In IBD, delayed neutrophil apoptosis and neutrophil-mediated damage are associated with the development of UC and CD [22, 23]. Moreover, recruitment of activated neutrophils correlates with disease severity in CD [24], whereas complete resolution of mucosal neutrophils improves long-term clinical outcome in UC [25]. SPM production is reduced in the colonic mucosa of UC patients [26] and, conversely, increased expression of SPMs in UC colon tissue is associated with remission and mucosa homeostasis [27, 28]. Notably, it has been shown that exogenous treatment with resolvin E1 (RvE1) accelerates the resolution of colon inflammation in acute, spontaneously resolute colitis mice models [29–31]. RvE1 triggers ERK and Akt signaling via activation of ChemR23 GPCRs (*CMKLR1* gene) expressed by myeloid cells such as macrophages, dendritic cell (DC), neutrophils and NK cells [32–34]. The RvE1/ChemR23 axis has been reported to decrease inflammatory TNF- α and IL-12 secretion by DC[30,34], reduce neutrophil transmigration[35], increase reactive oxygen species (ROS) generation by neutrophils [36], stimulate efferocytosis[37] and promote M1 to M2 macrophage conversion [32].

Despite increasing evidence that chronic inflammation in humans is associated with a deficit of SPMs, current treatments based on pro-resolutive drug delivery are limited to experimental validation in spontaneously resolute acute inflammation murine models, due to the restricted bioavailability and rapid clearance of SPMs. Thus, whether this novel therapeutic approach can promote efficient resolution in non-spontaneously resolute chronic inflammation remains unclear. Here, we report that ChemR23 receptor over-expression in the IBD colon mucosa is associated with neutrophil infiltration and unresponsiveness to anti-

TNF/ α 4 β 7 therapies. Moreover, activating pro-resolutive ChemR23 signaling with an agonistic monoclonal antibody (mAb) efficiently accelerates resolution in acute colitis models and triggers resolution of ongoing chronic colitis in unresolved preclinical models, thereby preventing fibrosis and limiting the development of inflammation-driven colorectal tumors.

Results

Increased mucosal neutrophil infiltrates and ChemR23 expression are associated with resistance to immunotherapies in IBD

We previously reported a meta-analysis of publicly available transcriptional UC cohorts datasets from colon mucosa biopsies performed before anti-TNF treatment [38]. Differential analysis of all expressed genes in the meta-dataset (17,037 genes) identified only 85 genes significantly (adjusted P value < 0.05) and differentially (log2 FC > 1) expressed between responders and non-responders. Gene set enrichment analysis indicated over-expression of genes associated with myeloid cell activation, neutrophil activation and degranulation, leukocytes chemotaxis and response to bacterium (**Supplementary Figure 1A, B**). To investigate whether local/mucosal neutrophil excessive infiltrates are associated with responsiveness to conventional immunotherapies (anti-TNF or anti- $\alpha 4\beta 7$ mAbs), we first analyzed neutrophil gene expression signatures using deconvolution tools on previously published transcriptomic datasets from mucosal biopsies of IBD patients with clinical annotation. We examined colon biopsies (responders n=28, non-responders n=41) from three independent UC cohort datasets (GSE16879 [39], GSE12251 [40] and GSE73661 [41]), and colon and ileal biopsies (responders n=20, non-responders n=17) from one CD cohort dataset (GSE16879 [39]). Colon biopsies were performed before the start of therapy and then 4-6 weeks after the first antibody infusion. Response to immunotherapy was determined by histological healing. Our analysis based on CIBERSORT transcriptomic signatures shows that, in both UC and CD patients, the relative fraction of neutrophils in the gut mucosa was significantly higher in non-responder patients before and after anti-TNF treatment, when compared to responders or non-IBD controls (**Figure 1A**). Similar results were obtained in UC patients before and after anti-TNF (**Supplementary Figure 2A**) or anti- $\alpha 4\beta 7$ integrin (**Supplementary Figure 2B**)

therapy by using the Quantiseq deconvolution method. As previously reported [42, 43], transcriptomic signature analyses also revealed an increase in inflammatory (M1) macrophages over resolutive-type (M2) macrophages before anti-TNF treatment in colon biopsies of non-responder patients (**Supplementary Figure 2C**). The accumulation of neutrophils in the colon mucosa of anti-TNF non-responder UC and CD patients was confirmed with histological sections from independent local cohorts (UC responders n=6, UC non-responders n=8, CD responders n=9, CD non-responders n=6 from Nantes University Hospital, France) by using pathologist blinded analysis of Robarts score, which integrates the quantity and localization of neutrophils in the tissue (**Figure 1B**). No differences in disease severity (Lichtiger score) between responder and non-responder UC patients before therapy was observed in these histological sections (**Figure 1C**), further demonstrating that excessive neutrophil infiltrates in non-responders in our local IBD cohort is not simply due to the severity of the disease.

Next, we asked whether the pro-resolutive myeloid receptor ChemR23 (*cmklr1* gene) is also differentially expressed in the gut mucosa of IBD patients in response to current immunotherapies. Based on the same publicly available datasets and our meta-cohort, we found that ChemR23 is significantly over-expressed in the mucosa of UC and CD patients unresponsive to anti-TNF (**Figure 1D**) or anti- $\alpha 4\beta 7$ (**Figure 1E**) therapies, when compared to responders and non-IBD controls. Similarly, ChemR23 mucosal over-expression is detected before and after treatment in UC and CD non-responders and significantly correlates with neutrophil transcriptomic signature and M1/M2 transcriptomic ratio (**Supplementary Figure 2D**). Analysis of different colon and ileal biopsy datasets from UC and CD patients after treatment with corticosteroids and/or immunosuppression showed that ChemR23 is over-expressed in gut inflamed tissues, but not in proximal non-inflamed segments or non-IBD controls (**Supplementary Figure 1C, D**). Moreover, analysis of a recent scRNA-seq dataset from ileal tissues of CD patients [44] confirmed that ChemR23 is mainly expressed by mucosal

macrophages, in particular resident macrophages (**Supplementary Figure 3A**). Consistent with this, scRNA-seq data from colon biopsies of UC patients [45] shows that ChemR23 is expressed by macrophages within leukocytes subsets, but not by stromal or epithelial cells (**Supplementary Figure 4**). Unfortunately, scRNA-seq technology does not permit the analysis of granulocytes subsets. However, histological ChemR23 stainings on colon or ileal biopsies from a local cohort of UC and Crohn anti-TNF non-responders showed that ChemR23 is mainly expressed by neutrophils in inflamed mucosae (**Figure 1F**).

These data indicate that mucosal excessive neutrophil infiltration and ChemR23 over-expression before treatment are associated with unresponsiveness to anti-TNF and anti- $\alpha 4\beta 7$ immunotherapies in UC and CD patients, suggesting that ChemR23-dependent neutrophil infiltration may be associated with refractory and severe chronic inflammation.

ChemR23 expression is regulated by inflammatory signals

To dissect the regulatory mechanisms underpinning ChemR23 activity during inflammation, we examined ChemR23 expression *in vitro* in leucocyte subpopulations cultured with inflammatory signals, and *in vivo* using murine acute inflammatory models. Whereas ChemR23 was weakly expressed on freshly isolated human neutrophils, it was significantly upregulated in neutrophils cultured with inflammatory signals (TNF α , IL-6, LPS or IL-8) (**Figure 2A**). Similarly, IL-6 significantly increased ChemR23 expression in human monocytes and dendritic cells (DC) over time (**Figure 2A**) as previously described [32, 46, 47]. In naïve mice, ChemR23 expression at steady state in the spleen was significantly lower than in resident macrophages and DCs in the colon (**Supplementary Figure 5A, B**). Moreover, neutrophils from the spleen, bone marrow, or colon do not express ChemR23 in naïve mice. However, similar to human, mouse neutrophils or monocytes from naïve mice over-expressed ChemR23 when cultured with inflammatory mediators (IL-6 or LPS) (**Supplementary Figure 5C**). In *in vivo* murine air-

pouch models, subcutaneous injection of TNF α or Carrageenan (an algae-derived polysaccharide) induces rapid and strong local recruitment of macrophages and neutrophils expressing ChemR23 (**Figure 2B**). Notably, although no ChemR23 was detected in resident macrophages and neutrophils at baseline, a significant proportion of macrophages and neutrophils recruited upon inflammation expressed ChemR23. We next analyzed ChemR23 levels in preclinical models of acute colitis induced by chemical agents (DSS or TNBS), and in models of chronic colitis induced by adoptive transfer of CD4⁺ CD45Rb^{high} T cells into Rag1 KO mice. In both these models, ChemR23 expression in macrophages and neutrophils was detected only in the inflamed colon, and not in the periphery (spleen) (**Figure 2C**). Interestingly, chronic colitis models showed stronger ChemR23⁺ neutrophil infiltration than acute colitis models.

Together these results indicate that ChemR23 is induced by inflammatory signals and is primarily expressed in resident tissue macrophages and inflammatory neutrophils.

Agonist anti-ChemR23 mAb as new pro-resolving therapeutic modality

Current progress on the potential therapeutic applications of SPMs remains essentially limited to experimental validation in spontaneously resolvable acute inflammation models, due to the reduced bioavailability and rapid clearance of these molecules. To explore a different therapeutic modality for triggering efficient resolution of chronic inflammation with a long elimination half-life, we screened novel monoclonal antibodies (mAb) for their pro-resolutive agonist properties. We found that an agonist anti-ChemR23 mAb induced rapid ERK and Akt phosphorylation (**Figure 3A**), which is a well-characterized ChemR23 downstream signaling pathway typically induced by RvE1 [48]. This signaling event triggered the repolarization of human macrophages into pro-resolving macrophages, as revealed by an increase in IL-10

secretion and decrease in CD80, CD86 and CCR7 expression in M1 IFN γ -polarized macrophages, and an increase in IL-10 secretion and decrease in CD206 and CD11b expression in M2 TGF β -polarized macrophages (**Figure 3B** and **Supplementary Figure 6A**). Pre-treatment of human macrophages with agonist ChemR23 mAb for one hour increased phagocytosis of apoptotic neutrophils (**Figure 3C**), consistent with previous research showing that ChemR23 pro-resolutive activity in macrophages induces efferocytosis of apoptotic neutrophils [49]. Moreover, as previously described for RvE1 [50], agonist ChemR23 mAb significantly reduced human neutrophil trans-endothelial migration during inflammation (**Figure 3D**), consistent with a reduction in L-selectin (CD62L) membrane expression and increase in soluble L-selectin (**Figure 3E**). These findings suggest that agonist ChemR23 mAb reduces neutrophil transmigration by inducing L-selectin shedding. In addition, agonist anti-ChemR23 mAb accelerated neutrophil apoptotic cell death (**Figure 3G**), as revealed by an increase in Caspase 3/7 activation (**Figure 3F**). Mechanistically, this accelerated neutrophil apoptosis was associated with increased reactive-oxygen species (ROS) production (**Supplementary Figure 6B**). However, no significant NETosis was detected (**Supplementary Figure 6B, C**).

Next, we identified the ChemR23 epitope recognized by the mAb using MabTope *in silico* epitope mapping (**Supplementary Figure 7A, B**) [51], and then confirmed these results by ELISA binding assay (**Supplementary Figure 7C**). The antibody binds to ChemR23's GPCR extracellular loop 3 (EL-3), a peptide sequence highly conserved between mouse and human, thereby suggesting cross-reactivity. Indeed, agonist anti-ChemR23 mAb triggered ERK and Akt signaling in mouse macrophages (**Supplementary Figure 6D**) and promoted inflammation resolution *in vivo*. In the TNF α air pouch acute inflammation model, injection of anti-ChemR23 mAb did not reduce the initial inflammatory local recruitment of neutrophils, but significantly promoted the clearance of neutrophils from the inflammatory sites, similarly to RvE1 (**Figure**

3H). Moreover, biochemical characterization of exudates showed that anti-ChemR23 mAb injection significantly increased local production of SPMs and their precursors at 8 hours during the inflammation phase (e.g. Lipoxins), and also at 48 hours during the resolution phase (e.g. Resolvin E1 and D3) (**Figure 3I**).

Taken together, these data show that agonist anti-ChemR23 mAb triggers inflammation resolution by reprogramming inflammatory macrophages towards pro-resolutive activity, thereby inducing inflammatory neutrophil clearance from inflamed sites and promoting the secretion of pro-resolutive molecules.

ChemR23 activation with agonist mAb triggers resolution of acute and chronic intestinal inflammation

RvE1 was previously shown to accelerate the resolution of inflammation in spontaneously resolvable acute colitis mouse models [30, 31]. ChemR23 mAb treatment significantly accelerated recovery from acute colitis in DSS and TNBS mouse models, as shown by a reduced resolution index, acceleration of weight recovery, and normalization of stool consistency and fecal blood signs (**Figure 4**). Colon retraction, a key hallmark of colonic inflammation, was also significantly restored after RvE1 or agonist ChemR23 mAb treatment, which further demonstrates their pro-resolutive action (**Figure 4B, F**).

To investigate whether ChemR23 activation with a mAb effectively reduces inflammation in non-resolvable and chronic inflammatory colitis models, we conducted an adoptive transfer of CD4⁺CD45Rb^{high} T cells into RAG1KO mice, which induces progressive and chronic colitis over time without a resolution phase. Treatment with agonist ChemR23 mAb initiated after colitis onset (from day 32 to day 51) and T lymphocyte infiltration (**Supplementary Figure 8**) significantly reversed ongoing chronic colitis and protected mice

from fatal weight loss (**Figure 5A**). Histological evaluation of the colon at sacrifice showed a significant decrease in mucosal inflammation and thickness, reduced signs of vasculitis, and nearly complete inhibition of colon fibrosis (**Figure 5B**). Transcriptomic analysis (Nanostring Immunology panel) in responding mice revealed a significant decrease in gene expression signatures associated with T lymphocyte signaling, IFN γ pathway, and adaptive immune response (**Figure 5C**). Consistent with this, histology in mice showed that agonist anti-ChemR23 mAb treatment significantly affects T cell and neutrophil infiltrates in the colon (**Figure 5D**).

IL-10KO mice develop chronic colitis spontaneously over the time[52]. We treated these mice for two weeks with the agonist ChemR23 mAb or its corresponding isotype control when significant clinical symptoms of colitis were monitored (weight decrease > 5% and/or stool score > 1). After 14 days of treatment, mice treated with anti-ChemR23 mAb displayed significantly fewer signs of diarrhea and weight loss when compared to the control group (**Supplementary Figure 9**), showing that agonist anti-ChemR23 mAb triggers resolution of ongoing chronic colitis in different models.

Given that anti-ChemR23 mAb accelerates neutrophil apoptosis (**Figure 3F,G**) and is a human IgG1 isotype with potential cell cytotoxicity [53], we assessed its *in vivo* effects on the peripheral immune cell population. No significant changes were detected in immune cell populations (neutrophils, macrophages, DCs, T cells, NK cells) in the spleen of mice treated with agonist ChemR23 mAb in three different models of induced acute or chronic colitis (**Supplementary Figure 10**), in agreement with the expression pattern of ChemR23 primarily in myeloid tissue. These data further suggest that agonist anti-ChemR23 treatment does not induce peripheral immune cell depletion or neutropenia.

Agonist anti-ChemR23 mAb limits colon cancer development

Chronic colon inflammation is an important risk factor for colorectal cancer (CRC) development [54]. However, conventional therapies to inhibit inflammation can have a negative impact on the overall survival of IBD patients with CRC [55]. To evaluate the potential effects of triggering inflammation resolution with agonist ChemR23 mAb on tumor development, we treated mice with chronic inflammation-mediated colon cancer receiving cycles of dextran sulfate sodium (DSS) after an initial injection of a carcinogenic agent (Azoxymethane). Treatment with ChemR23 mAb was initiated after the first cycle of DSS. Although no weight loss differences were detected (**Figure 6A**), anti-ChemR23 treatment caused a significant reduction in diarrhea during the entire treatment period (three months), as each diarrhea phase after DSS administration was shorter in mice treated with anti-ChemR23 than in controls (**Figure 6B**). Colon retraction was also significantly reduced at sacrifice in mice treated with anti-ChemR23 (**Figure 6C**) and, importantly, macroscopic evaluation of the colon at three months revealed significantly fewer tumor nodules (**Figure 6D**). To further investigate whether anti-ChemR23 has a protective anti-tumoral effect, mice implanted subcutaneously with the MC38 (**Figure 6E**) or CT26 (**Figure 6F**) colorectal mouse cell lines were treated with agonist anti-ChemR23 mAb in monotherapy. In CT26 mice, which are less immunogenic, we also tested a combined treatment with anti-ChemR23 and chemotherapy (Cisplatin). Agonist anti-ChemR23 treatment induced partial or complete anti-tumor responses in MC38 and CT26 models, including with monotherapy. Notably, all mice with complete response also developed a memory immune response, as second MC38 or CT26 graft re-challenges were rejected without new treatment (data not shown).

These data suggest that activation of the pro-resolutive ChemR23 pathway suppresses cancer development in chronic inflammatory diseases by triggering chronic inflammation resolution.

Discussion

Chronic inflammatory diseases, such as IBD, are currently managed with therapies that suppress the production of inflammatory mediators (i.e. inflammatory cytokines) or block immune cell recruitment or activation (i.e. integrin, costimulation). However, these strategies are not effective in a substantial proportion of patients, and significant rates of acquired resistance are observed [56]. The identification of alternative therapeutic approaches targeting novel mechanisms and different disease phases is therefore urgently needed. Research in the last decade has shown that inflammation does not just peter out, but is instead actively shut down by specialized pro-resolutive (SPMs) mediators acting on receptors expressed by immune cells[57–60]. Whilst there is growing interest in developing SPM analogues to treat inflammatory diseases [61–63], there are currently few pro-resolutive drugs in clinical development because stable SPM analogs have limited pharmacokinetic properties and their chemical synthesis is complex. In this study, we explored an innovative approach using an agonist monoclonal antibody to activate receptors involved in inflammation resolution. Moreover, our results elucidate the mechanisms of ChemR23 regulation during inflammation and chronic inflammatory disease. Finally, we show that promoting inflammation resolution via ChemR23 receptor activation with a monoclonal antibody actively switches-off ongoing chronic inflammation and tumor development in preclinical models.

Neutrophils recruited following infection or sterile wounding are key components of the inflammatory response. It has recently been suggested that neutrophils may have other functions in addition to providing immune protection when physical barriers are breached. For instance, neutrophils may contribute directly to inflammation resolution and recovery [64,65] and orchestrate exacerbated adaptive responses by recruiting inflammatory macrophages and dendritic cells that release pro-inflammatory cytokines associated with chronic inflammation,

such as TNF α and IL-23 [66]. Appropriate neutrophil apoptosis is fundamental for inducing resolution of inflammation and promoting the conversion of pro-inflammatory (M1) towards resolutive-type (M2) macrophages [67]. In IBD, neutrophil intestinal infiltration is typically associated with severe inflammation [68] and occurrence of abscesses and/or granulomata [69], particularly in UC patients. Our analysis of colon transcriptomic datasets from IBD patients revealed that imbalanced M1/M2 macrophage ratios and neutrophil persistence and accumulation are strongly associated with a significant risk of resistance to anti-TNF or anti- $\alpha 4\beta 7$ therapies in different cohorts of UC or CD patients. Moreover, histological analysis of an independent and local cohort of UC and CD patients showed that patients unresponsive to anti-TNF therapy have excessive neutrophil infiltrates that persist after treatment. Interestingly, we found that inflammatory signals (cytokines, TLR agonist) induce ChemR23 expression *in vitro*, including in neutrophils, which express very low ChemR23 level at steady state [46]. In patients, ChemR23 was over-expressed in UC and CD colon biopsies from anti-TNF or anti- $\alpha 4\beta 7$ non-responders and correlated with neutrophil and M1/M2 macrophage transcriptomic signatures. ScRNAseq analysis performed on UC or CD mucosas showed that ChemR23 is predominantly expressed in myeloid cells, in particular in macrophage samples lacking granulocyte subsets. In addition, histological stainings revealed that the majority of neutrophils in the inflamed mucosa expressed ChemR23. These findings suggest that high ChemR23 expression in tissues is associated with excessive neutrophils and inflammatory (M1) over resolutive (M2) macrophages infiltrates, which are key features of chronic inflammation resolution deficiency.

Resolvin E1, an endogenous lipid that binds to and activates ChemR23 receptor, has been shown to promote resolutive macrophage polarization, inhibit neutrophil recruitment, induce neutrophil apoptosis, and promote efferocytosis in resolutive-type macrophages [32, 37, 46, 70]. We have identified an anti-human ChemR23 monoclonal antibody with similar receptor

signaling functions as Resolvin E1, including in promoting macrophage resolute polarization as well as inflammatory neutrophil migration and apoptosis. As expected, *in vivo* treatment with agonist anti-ChemR23 mAb did not affect the initiation phase of inflammation, as intensity of neutrophil recruitment, weight loss, and diarrhea were similar in acute colitis and air pouch murine models in comparison to controls. However, as previously reported for RvE1 [30,31], agonist anti-ChemR23 mAb significantly shortened the resolution index, as revealed by an accelerated clearing of leukocytes from the inflammatory site, increased apoptosis of remaining neutrophils, and faster recovery from colitis. Mass spectrometry of different resolution mediators or their precursors in exudates from TNF α air pouch model at different time points showed that agonist anti-ChemR23 mAb treatment triggers a global resolute response, as expression of other mediators from the Lipoxin or Resolvin (including RvE1) families increased locally after treatment. A deficit in local and/or peripheral expression of a number of SPMs was reported in various chronic inflammatory diseases, including IBD [26,71], rheumatoid arthritis [72] and severe asthma [73], but also in other inflammatory conditions such as type 2 diabetes [46], cystic fibrosis [74] or Alzheimer's disease[75]. In agreement with our findings, peripheral administration of RvE1 was shown to increase local concentration of RvE1, Resolvin D and Lipoxin mediators in the hippocampus of Alzheimer's mouse models [76], suggesting that pro-resolutive pathways are inter-connected and hence pro-resolutive therapies may be beneficial for various type of inflammatory diseases.

Although it has been shown that RvE1 accelerates inflammation resolution in different preclinical models, such as IBD [30,31], periodontitis [77], and pulmonary infections [17], most of these studies used acute inflammatory models that resolved spontaneously. Thus, whether a potent agonist of ChemR23 may trigger non-resolutive chronic inflammation remained unknown. Our results in two different chronic colitis preclinical models show that treatment with agonist anti-ChemR23 mAb initiated after onset of the disease significantly reduces

disease progression. Transcriptomic and histological analyses revealed major modifications in the colon upon ChemR23 activation, including reduced colon thickness and fibrosis, and decreased neutrophil and T cell infiltration.

Chronic colon inflammation is an important risk factor for colorectal cancer (CRC) development in IBD patients [54,66]. However, inhibition of inflammation with conventional anti-inflammatory drugs can have a negative impact on the overall survival of IBD patients with CRC [55]. Recent preclinical studies demonstrated that various SPMs have a beneficial effect in reducing tumor development and metastasis in mouse models by promoting the elimination of apoptotic tumor cells by resolutive-type macrophages [78,79]. On the other hand, tumor-infiltrating neutrophils may play a detrimental role in the tumor microenvironment and contribute to tumor development [80,81]. We found that, besides triggering the resolution of chronic colitis, agonist ChemR23 mAb treatment also reduced colon tumor development caused by chronic inflammation, and induced anti-tumoral immune response memory in preclinical models. Moreover, ChemR23 mAb mono- or combined-therapy also significantly inhibited colon tumor growth in two CRC models.

In conclusion, our results show that ChemR23 is over-expressed in inflammatory myeloid immune cells in inflammatory tissues. Excessive neutrophil and pro-inflammatory macrophage mucosal infiltration is strongly associated with unresponsiveness to anti-TNF and anti- $\alpha 4\beta 7$ therapies in IBD patients and may contribute to chronic inflammation persistence. Moreover, we show that an agonist anti-human ChemR23 mAb is a novel pro-resolutive therapeutic modality that accelerates recovery from acute inflammation and most importantly and triggers also chronic inflammation resolution, thereby preventing fibrosis and reducing tumor development. Altogether, our findings open a new therapeutic avenue for the development of a novel class of drugs to reinstate efficient resolution of chronic inflammation.

Methods

Mice & Reagents

C57Bl/6Rj and BALB/c mice were purchased from Janvier Laboratory (France) and kept in the Nantes SFR Bonamy animal facility. Rag1^{-/-} mice were kindly provided by Dr Richard Danger and IL-10^{-/-} mice by Dr Florian Chain. Animal housing and surgical procedures were conducted according to the guidelines of the French Agriculture Ministry and were approved by the regional ethical committee (APAFIS 5978, 9851 & 13136). Colon carcinoma MC38 and CT26 cells were cultured in RPMI (Life Technologies), 10% FBS, glutamine, and antibiotics at 37°C and 5% CO₂. Cells were harvested and resuspended in PBS before inoculation into mice. hIgG1 control mAb was purchased from Evitria (MOTA-hIgG1) and anti-RvE1 from Cayman Biochemicals. The anti-ChemR23 monoclonal antibody was produced and purified by OSE Immunotherapeutics.

ChemR23 expression and PMN infiltration in colon of IBD patients

Gene expression datasets were obtained from the Gene Expression Omnibus database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). GSE16879 [39], GSE12251 [40] and GSE73661 [41] for colon biopsies from UC patients after treatment with immunosuppressants and/or corticosteroids; GSE16879 [39] for colon and ileal biopsies from CD patients before and 4–6 weeks after treatment with anti-TNF (infliximab); GSE73661 [41] for colon biopsies from UC patients before and 4–6 weeks after treatment with anti-TNF (infliximab), and UC patients before, 6 weeks, and 52 weeks after treatment with anti- α 4 β 7 (vedolizumab). In all cohorts, anti-TNF or anti- α 4 β 7 responses were defined by complete histological and endoscopic healing. Batch effect for the different cohorts were removed with Conbat. For deconvolution, the R package immunedeconv was used (<https://grst.github.io/immunedeconv>). To determine the

fraction of neutrophils and M1/M2 macrophages in samples, we utilized two methods: quantiseq and cibersort. We specified that expression data were from non-tumor samples (parameter tumor=FALSE) and from microarrays, instead of RNAseq (parameters arrays = TRUE and rmgens = “none”). H&E colon sections from diagnosis and routine care of IBD patients were collected from the Service of AnatomicoCytopathologie of the Nantes CHU hospital and analyzed by a pathologist for the Robarts Histopathological Index (as previously described [82]) and ChemR23 stainings (1A7 clone).

ChemR23 expression analysis

hPBMC isolated from the blood of healthy volunteers by Ficoll gradient and mouse bone marrow cells from male C57BL/6J mice were cultured for different times with either recombinant human or mouse TNF α at 100U/mL (R&D System), IL-6 at 10ng/mL (R&D Systems), LPS at 100ng/mL (Sigma-Aldrich), or IL-8 at 50ng/mL (R&D Systems). ChemR23 expression was assessed by flow cytometry with anti-human ChemR23 Ab (clone 84939) and anti-mouse ChemR23 Ab (clone 477806). To identify PMN, monocytes, and DCs, we utilized, respectively, anti-CD66b (clone Ms), anti-CD14 (clone M5E2) and anti-CD11c (clone Bu15) for human, and anti-Ly6G (clone 1A8) and anti-CD11b (clone M1/70) for mouse.

Murine dorsal air pouch model

Dorsal air pouches were formed on male Balb/c mice (6-8 weeks old) by injecting subcutaneously 3mL of sterile air at day 0 and d3. Mice were then i.p.-injected with anti-ChemR23 mAb or hIgG1 control mAb at 1mg/kg, or with RvE1 (50 μ g/kg) on successive days at d5 and d6. On day 6, inflammation was induced by intra-pouch injection of recombinant murine TNF (50ng) or Carrageenan (1%/1ml/pouch). Pouch lavages (PBS-EDTA 2mM) were collected at 4, 8, 24, or 48 hours and cells were stained for phenotyping by flow cytometry. F4/80 (BM8), Ly6G (1A8), and anti-mouse ChemR23 (clone 477806) were used to identify

macrophages, PMN, and ChemR23 expression, respectively. PMN mortality was evaluated with a viability dye (Life Technologies). The extraction protocol and analysis of bioactive lipids were performed as previously described [83] and adapted according to the Ambiotis SAS (Toulouse, France) standard operating procedure. The LC-MS/MS experiment was performed on an Exion LC AD U-HPLC system (Sciex) coupled to a QTRAP 6500+ MS (Sciex) and equipped with electrospray ionization source, and performed in negative ion mode.

Macrophages polarization

Human monocytes were isolated by magnetic sorting from Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) of healthy volunteers (Classical monocytes isolation kit, Miltenyi Biotec). Macrophages were generated with human M-CSF (100ng/mL) in RPMI 1640 (Gibco) supplemented with serum, penicillin/streptomycin and glutamine for 5 days at 37°C and 5% CO₂. Macrophages were polarized for 2 days either with human IFN γ (20ng/mL) to obtain M1 inflammatory macrophages, or with human TGF β (50ng/mL) to obtain M2c anti-inflammatory macrophages, and then treated with 10 μ g/mL of coated anti-ChemR23 or hIgG1 control mAbs. Mouse M1 macrophages were obtained from bone marrow after differentiation for 5 days with M-CSF (100ng/mL) followed by polarization for 2 days with IFN γ (20ng/mL) in complete RPMI supplemented with 50 μ M of beta-mercaptoethanol. IL-10 secretion was assessed by ELISA (BD) in the supernatant after the 2 day-polarization, and phenotyping for CD80, CD86, CCR7, CD206, CD11b expression was assessed by flow cytometry.

Efferocytosis assay

Freshly isolated human monocytes from Healthy Volunteers (HV) were incubated for 2 days at 37°C with M-CSF (100 ng/ml) to drive the differentiation into macrophages. 2 day-monocytes and freshly isolated PMNs were labelled for 10min at 37°C with Cell Proliferation Dye (CPD) eFluor 670 and 450 (ThermoFisher), respectively. Macrophages were incubated with the

selected mAb (10µg/ml) for 1h and then mixed with PMN at a 1:2 ratio for 60min. Efferocytosis was quantified by flow cytometry. The percentage of phagocytic macrophages was calculated as the number of CPD e450+ macrophages/total number of macrophages x100.

Human PMN isolation and related biological assays

PMN were isolated as described previously [84]. Briefly, after a Ficoll gradient of blood from HV, the pellet was collected, the PMN were separated on a Dextran gradient, and red blood cells were lysed with water. Then, the PMN were incubated with coated anti-ChemR23 mAb or a control Ab at 10µg/mL in RPMI medium. Viability of PMN was assessed using a Live & Dead kit (Thermo Scientific) after a 24h mAbs incubation and quantified by microscopy imaging (Zeiss Axiocam). NETosis was evaluated on the same images. Caspase-3/7 activity was estimated by using the CellEvent Caspase 3/7 probe (ThermoFisher) at 2 µM after 10h of culture with mAbs and quantified by microscopy with a Nikon Ti2 microscope. ROS production was investigated after 5h of ChemR23 activation and revealed with 5 µM CM-H2DCFDA (Thermo Scientific) and 2 µM Cell Tracker Deep Red (Thermo Scientific) using A1RSi confocal microscope (Nikon). All quantifications were realized using 5 random recorded x20 pictures and analyzed using Fiji software. CD62L (clone DREG-56) expression was revealed by flow cytometry after 4h of mAbs incubation and CD62L shedding was measured by ELISA using a commercial kit (BD).

ChemR23 signalling

PMN ($1,5 \times 10^6$ /mL) or M1 macrophages ($1,5 \times 10^6$ /mL) obtained from hPBMC or murine bone marrow were stimulated with hIgG1 control or anti-ChemR23 mAbs (10µg/ml) for different times. Cells were lysed by adding 300 µL of RIPA buffer 1X (Cell Signaling) with Protease Inhibitor Cocktail (Sigma Aldrich). ChemR23 signaling pathway was analyzed either by WB or ELISA. Briefly, 20 µg of proteins were loaded in Mini-PROTEAN TGX gel (Bio-RAD, 10

wells, 4-15%), then transferred onto a microcellulose membrane. After 2h of saturation in TBS-5% BSA, the membranes were incubated with primary antibodies: anti-P-p44/42 MAPK (T202/Y204) (1/1000), or anti-P-Akt (S473) (1/1000) purchased from Cell signaling, for 1h at room temperature. Proteins were incubated with HRP-coupled secondary antibodies (anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody from Cell signaling, 1/5000) for 1h at room temperature and then revealed with the chemoluminescent Super SignalTM West Femto ECL detection system. WB images and quantification were obtained with Image Lab. For some experiments, P-ERK and P-Akt were measured by ELISA using commercially available kits (R&D Systems).

PMN Transmigration

Chemotaxis of PMN were evaluated in a Boyden chamber using a monolayer of Human Dermal Microvascular Endothelial Cells (HDMEC) ($0,2 \times 10^6$ cells/well) coated overnight in the upper chamber on a 0.1% gelatine layer. IL-8 (50ng/mL) was used as the chemoattractant in the bottom part of the chamber, and PMN (3×10^6 cells/well) and Ab (10 μ g/ml) were added in the upper part of the chamber. After a 90min incubation at 37°C in an incubator with 5% CO₂, the bottom part of the chamber was collected. Migrated cells were counted by flow cytometry using counting beads (123count eBeadsTM, Thermo Fisher). CD62L expression (DREG-56) and shedding (R&D Systems) were analyzed by flow cytometry and ELISA, respectively, on PMN incubated with either the anti-ChemR23 or hIgG1 control mAbs at 10 μ g/mL for 1 to 4 hours.

Preclinical colitis models

DSS Colitis was induced in 8-week-old male C57BL/6J mice by addition of 2.5% (wt/vol) DSS (Dextran sodium sulfate) in drinking water for 6 days. On day 6, DSS supplementation was discontinued, mice were sacrificed after clinical recovery and colon length was measured. Anti-ChemR23 or anti-hIgG1 mAbs were intraperitoneally administered at 1mg/kg every 2 days

from day 0 to day 6. Resolvin E1 was injected i.p. daily at 50µg/kg starting on d0 for 5 days. TNBS colitis was induced by intrarectal injection of 200 µL of a solution containing 5 mg of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (Sigma-Aldrich) in 50% ethanol (VWR International). Mice were administered anti-ChemR23 or anti-hIgG1 mAbs intraperitoneally at 1mg/kg on day 0 and day 2 (2 injections), or RvE1 daily at 50µg/kg for 3 days starting on d0. Adoptive transfer of 0.5×10^6 CD4⁺CD45Rb^{high} T cells from C57BL/6J WT female mice was conducted by injection i.p. into Rag1KO female mice at 5-weeks-old. Anti-ChemR23 mAb or hIgG1 control mAb were administered when the mice developed the disease by i.p.-injection 3 times a week for 3 weeks. IL10-KO mice were curatively injected i.p with anti-ChemR23 or hIgG1 (1mg/kg) 3 times a week for 2 weeks. The Abs was administrated when the mice lost 5% of their initial weight and/or presented a stool score >1. Disease appearance was observed by weighting the mice 3 times a week and evaluating the stool score as follow: 0 > normal consistency; 1 > soft consistency but still formed; 2 > diarrhea but still formed; 3 > diarrhea; 4 > diarrhea with blood. Mice were sacrificed at 25% of body weight loss. Resolution index (Ri) was determined for each stool score as previously described [70]. T_{max} and T_{50} of stool score were measured and Ri was calculated as follows: $T_{max} - T_{50}$, thus representing the required time necessary to recover 50% of maximal stool score.

Preclinical tumor models

Colorectal carcinoma MC38 cells or CT26 (0.5×10^6 cells/mouse) were injected subcutaneously in 8-week-old C57BL/6J male mice or 8-week-old Balb/c female mice, respectively. Tumor development was measured 3 times a week and calculated as follows: (length*width) 1.5*0.52. Anti-ChemR23 or hIgG1 control mAbs were administered at 1mg/kg when the tumor volume was between 50 and 100mm³ for MC38 and from d7 after tumor inoculation for CT26 for 3 weeks. For the AOM-DSS model, 7-week-old female C57BL/6J mice were intraperitoneally injected with azoxymethane (7.5mg/kg, Sigma-Aldrich). Then,

three 5 days-cycles of 1% DSS in drinking water separated by 14-days regular drinking water were performed starting 5 days after AOM injection. Eighty days after AOM injection, the mice were sacrificed, colon length was measured, and the aberrant crypt foci were counted.

Colon, spleen and bone marrow infiltrating leukocytes immunophenotyping

To collect colonic immune infiltrating cells, colon pieces were incubated in 10 mL of solution 1 (PBS, EDTA 30mM, DTT 1,5mM) for 10min at 37°C under agitation. After filtration, colon pieces were treated with 10 mL of solution 2 (PBS, EDTA 30mM) for 10min at 37°C under agitation, and finally filtered and incubated in 5 mL of collagenase D (Sigma-Aldrich) and 25 µL of DNase I (Sigma-Aldrich) solution for 15min at 37°C under agitation. Splenocytes and bone marrow cells were isolated after lysis of red blood cells and immune cells were immunophenotyped. Cell mortality was evaluated with a viability dye (Life Technologies). Leukocytes were stained with fluorochrome-conjugated anti-mouse antibodies: F4/80 (BM8), CD11b (M1/70), I/Ab (AF6-120.1), CD3e (500A8), CD4 (RM4-5), CD8 (53-6.7), NK1.1 (PK136), Ly6G (1A8), CD19 (1D3), all from BD Pharmingen and anti-mouse ChemR23 (clone 477806) from R&D Systems. FACS analysis was conducted using a BD Pharmingen LSR-II, Canto-II flow cytometers and FlowJo software (Tree Star).

Immunohistochemistry

Colon samples from Rag1KO mice were frozen in Tissue-Tek (Fisher Scientific) and cut into 10 µm sections. Immunofluorescence was performed with an anti-mouse CD3 Ab (500A2), an anti-mouse Ly6G (1A8). Sections were scanned and analyzed using standard fluorescence microscopy and NDPview2 imaging software (Hamamatsu). T-cell and PMN infiltration were analyzed by measuring the fluorescence intensity in the different channels or manually counted and related to the tissue surface or DAPI-positive cells, respectively. Tissue morphology

(inflammation and vasculitis) and fibrosis were revealed by H&E staining or Masson's Trichrome staining, respectively. Submucosa and Mucosa thickness were determined using NDPview2 imaging software.

Nanostring analysis

RNAs from mouse colon of DSS-, TNBS, or Rag1KO preclinical models were extracted in the RLT buffer with RNeasy Mini kit (Qiagen) supplemented by beta-mercaptoethanol at 1%. Gene expression was quantified with the NanoString nCounter platform using 50 ng of total RNA in the nCounter Mouse Immunology Panel (NanoString Technologies). The code set was hybridized with the RNA overnight at 65°C. RNA transcripts were immobilized and counted using the NanoString nCounter Sprint. Normalized expression data were analyzed with the nSolver software. Standardized not log2 transformed counts were used for differential gene expression analysis with the R package DESeq2 (Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550 (2014).). Genes were ranked in order of differential expression and pvalue score. Gene set enrichment analysis was performed with the GSEA software with 1000 permutations.

Statistical analysis

Continuous variables are expressed as mean $\pm$ SEM unless otherwise indicated, and compared with the nonparametric Mann-Whitney two-sided test or Kruskal–Wallis tests with Dunn's ad hoc pairwise comparisons for more than two groups. Graft survival was calculated using the Kaplan–Meyer method. The log-rank test was used to compare survival times between different groups. The Spearman test was used for correlation analyses. P values of <0.05 were considered statistically significant. All statistical analyses were performed on GraphPad Software (GraphPad Software, San Diego, CA).

Authorship

Conceived the study: NP, BV. Designed and supervised the experiments: NP, VG, BV

Performed the experiments: CT, VG, KB, LB, CM, GT, VT

Analyzed data: CT, VG, KB, RD, GRS, IG, JFM, BV, GB, NP.

Wrote the paper: CT, VG, BV, NP.

Acknowledgments

This work was supported by OSE Immunotherapeutic. We thank the MicroPICell cellular and tissular imaging core facility of Nantes University.

Competing Interests

The authors of this manuscript have conflicts of interest to disclose: C.T., V.G., C.M., B.V. and N.P. are authors of a patent related to ChemR23 agonist and employee of OSE Immunotherapeutics, a company developing ChemR23 agonist.

References

1. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2011;474:307–17.
2. Abraham C, Cho JH. Inflammatory Bowel Disease. *N. Engl. J. Med.* 2009;361:2066–78.
3. Danese S, Fiocchi C. Ulcerative colitis. *N. Engl. J. Med.* 2011;365:1713–25.
4. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet Lond. Engl.* 2012;380:1590–605.
5. Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, Peyrin-Biroulet L, Colombel J-F. Ulcerative colitis. *Lancet Lond. Engl.* 2017;389:1756–70.
6. Torres J, Mehandru S, Colombel J-F, Peyrin-Biroulet L. Crohn's disease. *Lancet Lond. Engl.* 2017;389:1741–55.
7. Allez M, Karmiris K, Louis E, Van Assche G, Ben-Horin S, Klein A, et al. Report of the ECCO pathogenesis workshop on anti-TNF therapy failures in inflammatory bowel diseases: definitions, frequency and pharmacological aspects. *J. Crohns Colitis* 2010;4:355–66.
8. Singh S, George J, Boland BS, Vande Casteele N, Sandborn WJ. Primary Non-Response to Tumor Necrosis Factor Antagonists is Associated with Inferior Response to Second-line Biologics in Patients with Inflammatory Bowel Diseases: A Systematic Review and Meta-analysis. *J. Crohns Colitis* 2018;12:635–43.
9. Serhan CN, Levy BD. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. *J. Clin. Invest.* 2018;128:2657–69.
10. Ortega-Gómez A, Perretti M, Soehnlein O. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol. Med.* 2013;5:661–74.
11. Sugimoto MA, Sousa LP, Pinho V, Perretti M, Teixeira MM. Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset? *Front. Immunol.* [Internet] 2016 [cited 2019 Sep 13];7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4845539/>
12. Fullerton JN, Gilroy DW. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2016;15:551–67.
13. Serhan CN, Yacoubian S, Yang R. Anti-Inflammatory and Pro-Resolving Lipid Mediators. *Annu. Rev. Pathol.* 2008;3:279–312.
14. Chiang N, Libreros S, Norris PC, Rosa X de la, Serhan CN. Maresin 1 activates LGR6 receptor promoting phagocyte immunoresolvent functions. *J. Clin. Invest.* 2019;129:5294–311.
15. Tjonahen E, Oh SF, Siegelman J, Elangovan S, Percarpio KB, Hong S, et al. Resolvin E2: Identification and Anti-Inflammatory Actions: Pivotal Role of Human 5-Lipoxygenase in Resolvin E Series Biosynthesis. *Chem. Biol.* 2006;13:1193–202.
16. Dalli J, Winkler JW, Colas RA, Arnardottir H, Cheng C-YC, Chiang N, et al. Resolvin D3 and Aspirin-Trigged Resolvin D3 Are Potent Immunoresolvents. *Chem. Biol.* 2013;20:188–201.

17. Kebir DE, Gjorstrup P, Filep JG. Resolvin E1 promotes phagocytosis-induced neutrophil apoptosis and accelerates resolution of pulmonary inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012;109:14983–8.
18. Schett G, Neurath MF. Resolution of chronic inflammatory disease: universal and tissue-specific concepts. *Nat. Commun.* [Internet] 2018 [cited 2019 Nov 28];9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6093916/>
19. Buckley CD, Gilroy DW, Serhan CN. Proresolving Lipid Mediators and Mechanisms in the Resolution of Acute Inflammation. *Immunity* 2014;40:315–27.
20. Koedel U, Frankenberg T, Kirschnek S, Obermaier B, Häcker H, Paul R, et al. Apoptosis Is Essential for Neutrophil Functional Shutdown and Determines Tissue Damage in Experimental Pneumococcal Meningitis. *PLOS Pathog.* 2009;5:e1000461.
21. Kennedy AD, DeLeo FR. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol. Res.* 2009;43:25.
22. Brannigan AE, O’Connell PR, Hurley H, O’Neill A, Brady HR, Fitzpatrick JM, et al. Neutrophil apoptosis is delayed in patients with inflammatory bowel disease. *Shock* 2000;13:361–6.
23. Butin-Israeli V, Bui TM, Wiesolek HL, Mascarenhas L, Lee JJ, Mehl LC, et al. Neutrophil-induced genomic instability impedes resolution of inflammation and wound healing. *J. Clin. Invest.* 2019;129:712–26.
24. Therrien A, Chapuy L, Bsai M, Rubio M, Bernard G, Arslanian E, et al. Recruitment of activated neutrophils correlates with disease severity in adult Crohn’s disease. *Clin. Exp. Immunol.* 2019;195:251–64.
25. Pai RK, Hartman DJ, Rivers CR, Regueiro M, Schwartz M, Binion DG, et al. Complete Resolution of Mucosal Neutrophils Associates With Improved Long-Term Clinical Outcomes of Patients With Ulcerative Colitis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2019;S1542356519314387.
26. Mangino MJ, Brounts L, Harms B, Heise C. Lipoxin biosynthesis in inflammatory bowel disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2006;79:84–92.
27. Gobetti T, Dalli J, Colas RA, Federici Canova D, Aursnes M, Bonnet D, et al. Protectin D1_{n-3 DPA} and resolvin D5_{n-3 DPA} are effectors of intestinal protection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2017;114:3963–8.
28. Vong L, Ferraz JGP, Dufton N, Panaccione R, Beck PL, Sherman PM, et al. Up-Regulation of Annexin-A1 and Lipoxin A4 in Individuals with Ulcerative Colitis May Promote Mucosal Homeostasis. *PLoS ONE* 2012;7:e39244.
29. Ağış ER, Savaş B, Melli M. Impact of colonic mucosal lipoxin A4 synthesis capacity on healing in rats with dextran sodium sulfate-induced colitis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2015;121:63–9.
30. Arita M, Yoshida M, Hong S, Tjonahen E, Glickman JN, Petasis NA, et al. Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005;102:7671–6.

31. Ishida T, Yoshida M, Arita M, Nishitani Y, Nishiumi S, Masuda A, et al. Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from eicosapentaenoic acid, prevents dextran sulfate sodium induced colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 2010;16:87–95.
32. Herová M, Schmid M, Gemperle C, Hersberger M. ChemR23, the Receptor for Chemerin and Resolvin E1, Is Expressed and Functional on M1 but Not on M2 Macrophages. *J. Immunol.* 2015;194:2330–7.
33. Samson M, Edinger AL, Stordeur P, Rucker J, Verhasselt V, Sharron M, et al. ChemR23, a putative chemoattractant receptor, is expressed in monocyte-derived dendritic cells and macrophages and is a coreceptor for SIV and some primary HIV-1 strains. *Eur. J. Immunol.* 1998;28:1689–700.
34. Arita M, Bianchini F, Aliberti J, Sher A, Chiang N, Hong S, et al. Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. *J. Exp. Med.* 2005;201:713–22.
35. Serhan CN, Hong S, Gronert K, Colgan SP, Devchand PR, Mirick G, et al. Resolvins. *J. Exp. Med.* 2002;196:1025–37.
36. Unno Y, Sato Y, Fukuda H, Ishimura K, Ikeda H, Watanabe M, et al. Resolvin E1, but not resolvins E2 and E3, promotes fMLF-induced ROS generation in human neutrophils. *FEBS Lett.* 2018;592:2706–15.
37. Ohira T, Arita M, Omori K, Recchiuti A, Dyke TEV, Serhan CN. Resolvin E1 Receptor Activation Signals Phosphorylation and Phagocytosis. *J. Biol. Chem.* 2010;285:3451–61.
38. Belarif L, Danger R, Kermarrec L, Nerrière-Daguin V, Pengam S, Durand T, et al. IL-7 receptor influences anti-TNF responsiveness and T cell gut homing in inflammatory bowel disease. *J. Clin. Invest.* 2019;129:1910–25.
39. Arijis I, De Hertogh G, Lemaire K, Quintens R, Van Lommel L, Van Steen K, et al. Mucosal gene expression of antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease before and after first infliximab treatment. *PloS One* 2009;4:e7984.
40. Arijis I, Li K, Toedter G, Quintens R, Van Lommel L, Van Steen K, et al. Mucosal gene signatures to predict response to infliximab in patients with ulcerative colitis. *Gut* 2009;58:1612–9.
41. Arijis I, Hertogh GD, Lemmens B, Lommel LV, Bruyn M de, Vanhove W, et al. Effect of vedolizumab (anti- $\alpha 4\beta 7$ -integrin) therapy on histological healing and mucosal gene expression in patients with UC. *Gut* 2018;67:43–52.
42. Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kobayashi T, Sato T, et al. Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *J. Clin. Invest.* 2008;118:2269–80.
43. Liu H, Dasgupta S, Fu Y, Bailey B, Roy C, Lightcap E, et al. Subsets of mononuclear phagocytes are enriched in the inflamed colons of patients with IBD. *BMC Immunol.* 2019;20:42.
44. Martin JC, Chang C, Boschetti G, Ungaro R, Giri M, Grout JA, et al. Single-Cell Analysis of Crohn's Disease Lesions Identifies a Pathogenic Cellular Module Associated with Resistance to Anti-TNF Therapy. *Cell* 2019;178:1493-1508.e20.

45. Smillie CS, Biton M, Ordovas-Montanes J, Sullivan KM, Burgin G, Graham DB, et al. Intra- and Inter-cellular Rewiring of the Human Colon during Ulcerative Colitis. *Cell* 2019;178:714-730.e22.
46. Freire M, Dalli J, Charles SN, Van Dyke TE. Neutrophil Resolvin E1 Receptor Expression and Function in Type 2 Diabetes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 2017;198:718–28.
47. Cash JL, Bena S, Headland SE, McArthur S, Brancalone V, Perretti M. Chemerin15 inhibits neutrophil-mediated vascular inflammation and myocardial ischemia-reperfusion injury through ChemR23. *EMBO Rep.* 2013;14:999–1007.
48. Keinan D, Leigh N, Nelson J, De Oleo L, Baker O. Understanding Resolvin Signaling Pathways to Improve Oral Health. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14:5501–18.
49. Serhan CN, Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N. Novel anti-inflammatory--pro-resolving mediators and their receptors. *Curr. Top. Med. Chem.* 2011;11:629–47.
50. Arita M, Ohira T, Sun Y-P, Elangovan S, Chiang N, Serhan CN. Resolvin E1 Selectively Interacts with Leukotriene B4 Receptor BLT1 and ChemR23 to Regulate Inflammation. *J. Immunol.* 2007;178:3912–7.
51. Bourquard T, Musnier A, Puard V, Tahir S, Ayoub MA, Jullian Y, et al. MAbTope: A Method for Improved Epitope Mapping. *J. Immunol.* [Internet] 2018 [cited 2020 Mar 22];Available from: <https://www.jimmunol.org/content/early/2018/10/12/jimmunol.1701722>
52. Scheinin T, Butler DM, Salway F, Scallan B, Feldmann M. Validation of the interleukin-10 knockout mouse model of colitis: antitumour necrosis factor-antibodies suppress the progression of colitis. *Clin. Exp. Immunol.* 2003;133:38–43.
53. Stewart R, Hammond SA, Oberst M, Wilkinson RW. The role of Fc gamma receptors in the activity of immunomodulatory antibodies for cancer. *J. Immunother. Cancer* 2014;2:29.
54. Averboukh F, Ziv Y, Kariv Y, Zmora O, Dotan I, Klausner JM, et al. Colorectal carcinoma in inflammatory bowel disease: a comparison between Crohn's and ulcerative colitis. *Colorectal Dis.* 2011;13:1230–5.
55. Luo WY, Bryant AK, Stringfield S, Murphy JD, Eisenstein S. Effects of Anti-Tumor Necrosis Factor Use on Colorectal Cancer Outcomes in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *J. Am. Coll. Surg.* 2018;227:e105.
56. Allez M, Karmiris K, Louis E, Van Assche G, Ben-Horin S, Klein A, et al. Report of the ECCO pathogenesis workshop on anti-TNF therapy failures in inflammatory bowel diseases: Definitions, frequency and pharmacological aspects. *J. Crohns Colitis* 2010;4:355–66.
57. Serhan CN. Resolution Phase of Inflammation: Novel Endogenous Anti-Inflammatory and Proresolving Lipid Mediators and Pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 2007;25:101–37.
58. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol.* 2008;8:349–61.
59. Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* 2014;510:92–101.

60. Sugimoto MA, Vago JP, Perretti M, Teixeira MM. Mediators of the Resolution of the Inflammatory Response. *Trends Immunol.* 2019;40:212–27.
61. Paiva C de, Schwartz C, Gjørstrup P, Pflugfelder S. Resolvin E1 (RX-10001) Reduces Corneal Epithelial Barrier Disruption and Protects Against Goblet Cell Loss in a Murine Model of Dry Eye. *Cornea* 2012;31:1299–303.
62. Cholkar K, Trinh HM, Vadlapudi AD, Wang Z, Pal D, Mitra AK. Interaction Studies of Resolvin E1 Analog (RX-10045) with Efflux Transporters. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 2015;31:248–55.
63. Torricelli AAM, Santhanam A, Agrawal V, Wilson SE. Resolvin E1 analog RX-10045 0.1% reduces corneal stromal haze in rabbits when applied topically after PRK. *Mol. Vis.* 2014;20:1710–6.
64. Fournier BM, Parkos CA. The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* 2012;5:354–66.
65. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2013;13:159–75.
66. Moschen AR, Tilg H, Raine T. IL-12, IL-23 and IL-17 in IBD: immunobiology and therapeutic targeting. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2019;16:185–96.
67. Perretti M, Solito E. Annexin 1 and neutrophil apoptosis. *Biochem. Soc. Trans.* 2004;32:507–10.
68. Bressenot A, Salleron J, Bastien C, Danese S, Boulagnon-Rombi C, Peyrin-Biroulet L. Comparing histological activity indexes in UC. *Gut* 2015;64:1412–8.
69. Naito Y, Takagi T, Yoshikawa T. Neutrophil-Dependent Oxidative Stress in Ulcerative Colitis. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2007;41:18–26.
70. Bannenberg GL, Chiang N, Ariel A, Arita M, Tjonahen E, Gotlinger KH, et al. Molecular Circuits of Resolution: Formation and Actions of Resolvins and Protectins. *J. Immunol.* 2005;174:4345–55.
71. Sena A, Grishina I, Thai A, Goulart L, Macal M, Fenton A, et al. Dysregulation of Anti-Inflammatory Annexin A1 Expression in Progressive Crohns Disease. *PLoS ONE [Internet]* 2013 [cited 2020 Feb 5];8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3794972/>
72. Arnardottir HH, Dalli J, Norling LV, Colas RA, Perretti M, Serhan CN. Resolvin D3 Is Dysregulated in Arthritis and Reduces Arthritic Inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2016;197:2362–8.
73. Miyata J, Fukunaga K, Iwamoto R, Isobe Y, Niimi K, Takamiya R, et al. Dysregulated synthesis of protectin D1 in eosinophils from patients with severe asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013;131:353-360.e2.
74. Eickmeier O, Fussbroich D, Mueller K, Serve F, Smaczny C, Zielen S, et al. Pro-resolving lipid mediator Resolvin D1 serves as a marker of lung disease in cystic fibrosis. *PLoS ONE [Internet]* 2017 [cited 2020 Feb 7];12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5291435/>

75. Wang X, Zhu M, Hjorth E, Cortés-Toro V, Eyjolfssdottir H, Graff C, et al. Resolution of inflammation is altered in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2015;11:40-50.e2.
76. Kantarci A, Aytan N, Palaska I, Stephens D, Crabtree L, Benincasa C, et al. Combined administration of resolvin E1 and lipoxin A4 resolves inflammation in a murine model of Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 2018;300:111–20.
77. Lee C-T, Teles R, Kantarci A, Chen T, McCafferty J, Starr JR, et al. Resolvin E1 Reverses Experimental Periodontitis and Dysbiosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2016;197:2796–806.
78. Sulciner ML, Serhan CN, Gilligan MM, Mudge DK, Chang J, Gartung A, et al. Resolvins suppress tumor growth and enhance cancer therapy. *J. Exp. Med.* 2018;215:115–40.
79. Panigrahy D, Gartung A, Yang J, Yang H, Gilligan MM, Sulciner ML, et al. Preoperative stimulation of resolution and inflammation blockade eradicates micrometastases. *J. Clin. Invest.* 2019;129:2964–79.
80. Shaul ME, Fridlender ZG. Tumour-associated neutrophils in patients with cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2019;16:601–20.
81. Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, Bratman SV, Feng W, Kim D, et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat. Med.* 2015;21:938–45.
82. Mosli MH, Feagan BG, Zou G, Sandborn WJ, D'Haens G, Khanna R, et al. Development and validation of a histological index for UC. *Gut* 2017;66:50–8.
83. Le Faouder P, Baillif V, Spreadbury I, Motta J-P, Rousset P, Chêne G, et al. LC–MS/MS method for rapid and concomitant quantification of pro-inflammatory and pro-resolving polyunsaturated fatty acid metabolites. *J. Chromatogr. B* 2013;932:123–33.
84. Kuhns DB, Priel DAL, Chu J, Zarembka KA. Isolation and Functional Analysis of Human Neutrophils. *Curr. Protoc. Immunol.* [Internet] 2015 [cited 2020 Jan 29];111. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471142735.im0723s111>
85. Recchiuti A, Mattoscio D, Isopi E. Roles, Actions, and Therapeutic Potential of Specialized Pro-resolving Lipid Mediators for the Treatment of Inflammation in Cystic Fibrosis. *Front. Pharmacol.* [Internet] 2019 [cited 2020 Feb 4];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2019.00252/full>

Figures legends

Figure 1: Colonic mucosal neutrophil infiltrates and ChemR23 overexpression are associated with non-response to anti-TNF and anti- $\alpha 4\beta 7$ mAbs therapies in IBD.

(A) Neutrophils transcriptomic signature fraction among immune cells using CIBERSORT analysis in intestinal biopsies of non-IBD patients (black, n=18), responders (green) and non-responders (orange) before and after TNF treatment. Meta-analysis (dataset GSE16879 [39], GSE12251 [40] and GSE73661 [41]) of colon biopsies from 3 UC cohorts (responders n=28-15, non-responders n=41-31) and analysis (dataset GSE16879 [39]) of colon and ileal biopsies from a CD cohort (responders n=24-23, non-responders n=19) with histological healing as the anti-TNF response criteria. (B) Representative H&E staining (*left*) from colon biopsies of UC and ileal biopsies of CD patients with white arrows indicating neutrophils infiltrates. Neutrophils-associated histological Robarts score quantification (*right*) in colon and ileal biopsies from a french local cohort of UC and CD patients before treatment with anti-TNF: UC (responders n=6, non-responders n=8) and CD (responders n=9, non-responders n=6). (C) Lichtiger score of the same cohort as in (D). (Responders: green; Non-responders: orange). (D) ChemR23 transcriptomic relative expression in intestinal biopsies from the same IBD cohorts as in A) before and after anti-TNF treatment. (E) ChemR23 transcriptomic relative expression in colon biopsies of UC patients before and after anti- $\alpha 4\beta 7$ mAbs therapy: dataset GSE73661[41], responders n=9-22, non-responders n=30-37. (F) Representative staining of the ChemR23 protein expression from colon biopsies of UC and ileal biopsies of CD patients from the local cohort in (B). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005 (Kruskal-Wallis and Mann-Withney test).

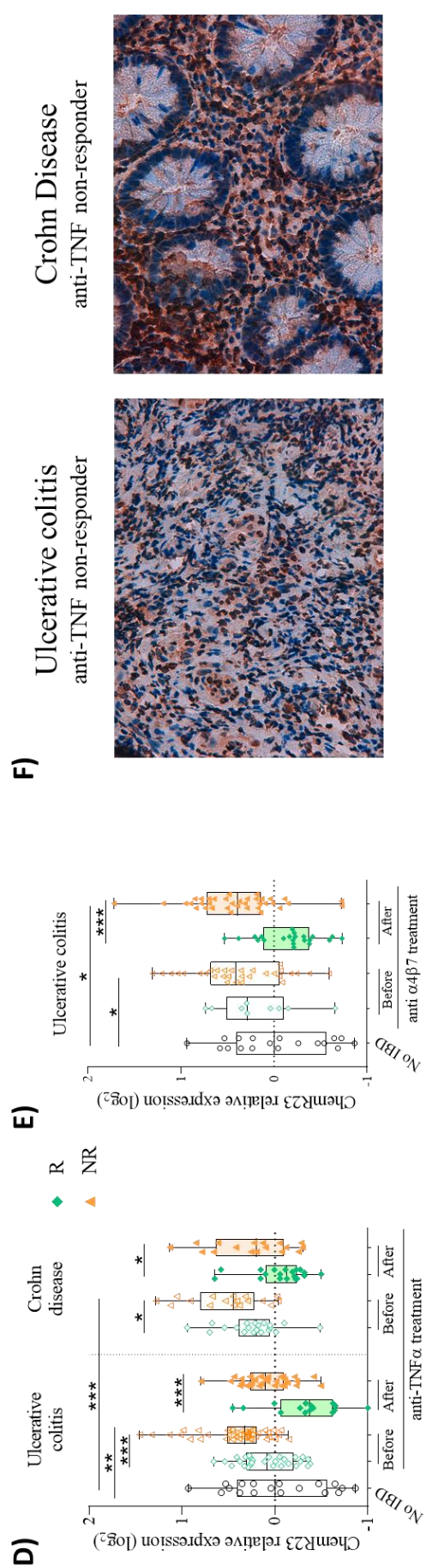
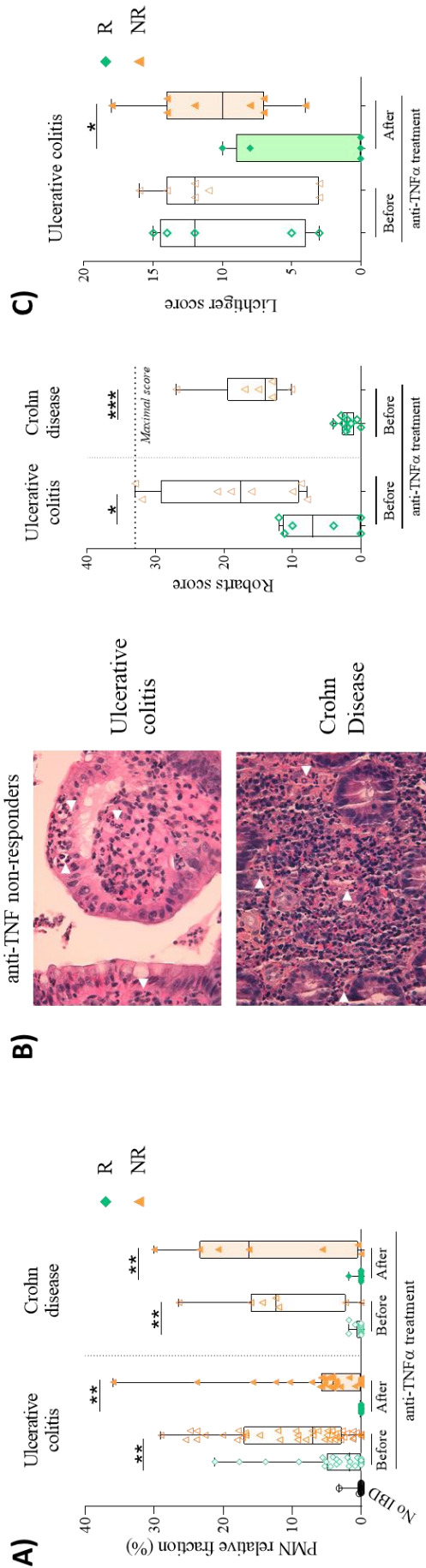
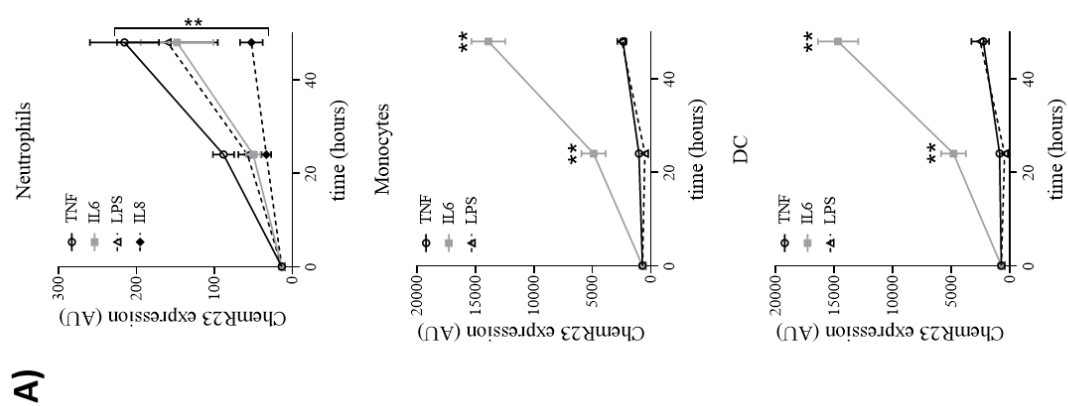
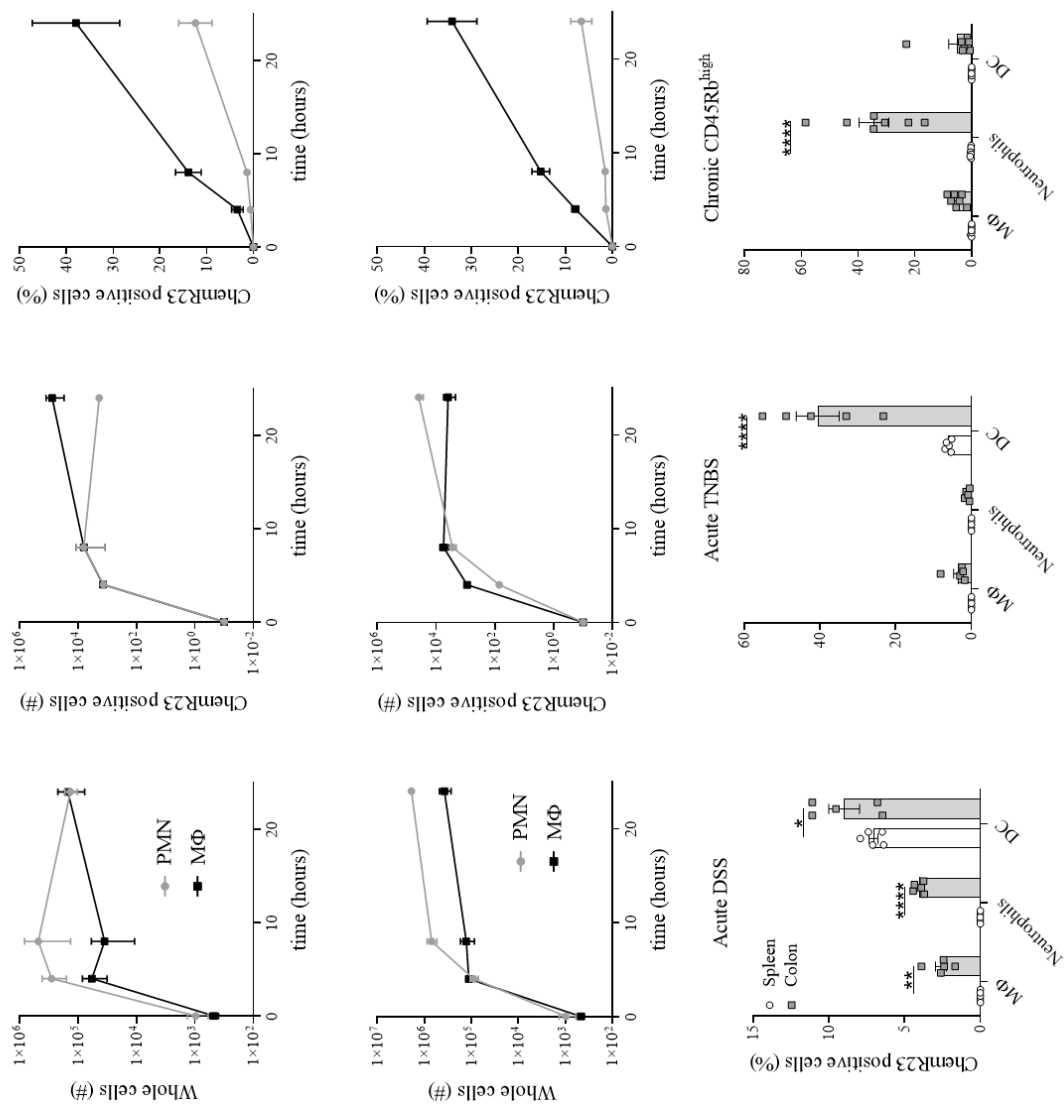


Figure 2: ChemR23 expression is regulated by inflammation.

(A) ChemR23 expression (median fluorescent intensity) analyzed by flow cytometry of neutrophils (CD66b+), monocytes (CD14+) and dendritic cells (CD11c+) after human peripheral blood leukocytes cultured with TNF α (100U/mL), IL-6 (10ng/mL), IL-8 (50ng/mL) or LPS- (100ng/mL) for the indicated period of time (n=6-12/group). (B) (*Left*) Absolute numbers of macrophages (black) and neutrophils (grey) recruitment in skin air-pouch models induced by 50ng of TNF α (*Top*) or 1% carrageenan (*Bottom*) injection. (*Middle*) Absolute numbers and (*Right*) frequency of ChemR23-positive macrophages and neutrophils recruited in these air-pouch models. (C) ChemR23 expression by indicated population in spleen (white) and colon (grey) of acute DSS (day 6), acute TNBS (day 3) and chronic CD45Rb^{high} transfer (day 61) colitis mouse models (n=5-7/group). *P < 0.05, **P < 0.01, ****P < 0.001 (Mann-Whitney and Multiple comparison 2 ways ANOVA).



B)



C)

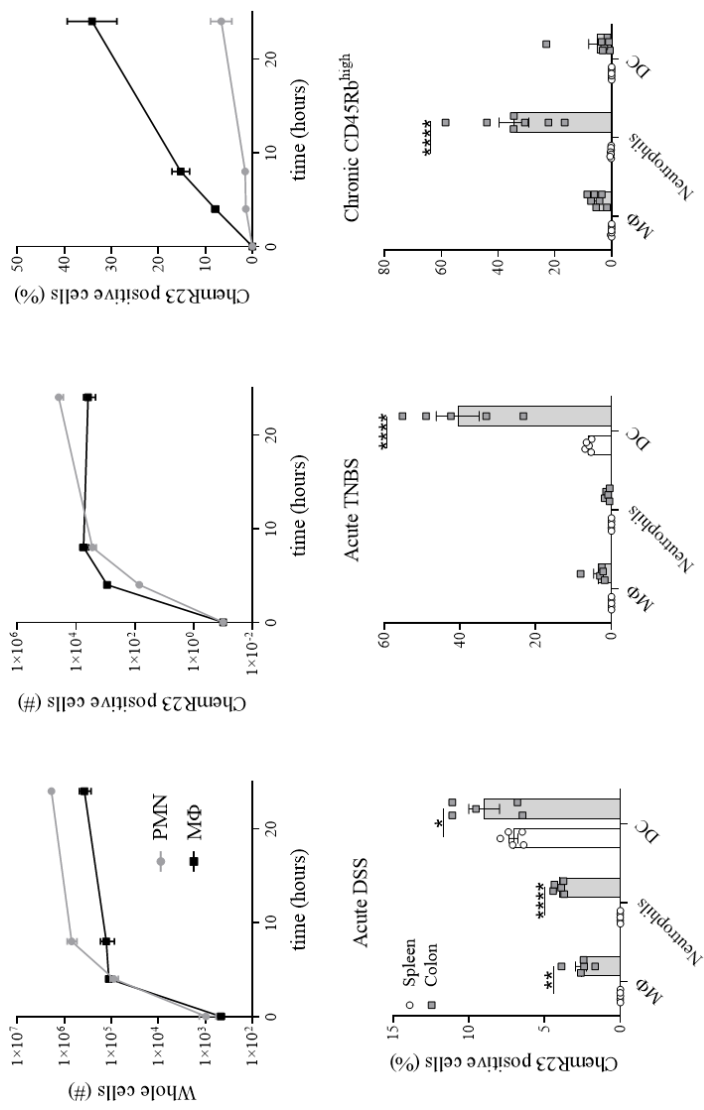


Figure 3: Pro-resolutive mechanisms of agonist ChemR23 mAb.

(A) p-ERK (Thr202/Tyr204) and p-Akt (Ser473) ChemR23 signaling measured by ELISA in protein lysate of human inflammatory M1 macrophages cultured with isotype hIgG1 or anti-ChemR23 mAbs (10µg/ml) for the indicated period of time. (B) IL-10 secretion in the supernatant of M1 IFN γ -polarized (*left*) and M2 TGF β -polarized (*right*) human macrophages culture for 48h with human IgG1 isotype control or anti-ChemR23 mAbs (10µg/mL) (n=6). (C) Efferocytosis of human neutrophils by human macrophages pre-treated for 1 hours with isotype hIgG1 or anti-ChemR23 mAbs (10µg/mL) (n=4). (D) Transmigration of human neutrophils across a monolayer of human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC) preincubated over night with medium or TNF α (100U/ml). Isotype hIgG1 or anti-ChemR23 mAbs were added at 10µg/ml in a Boyden chamber (n=8). IL-8 (50ng/ml) was used in the lower part of the chamber as neutrophil chemoattractant for 90 minutes. (E) CD62L (L-selectin) expression by flow cytometry (*left*) and soluble CD62L concentration supernatant (*right*) of human neutrophils cultured with isotype hIgG1 or anti-ChemR23 mAbs (10µg/mL) for 4h (n=4). (F) Percentage of Caspase 3/7 human neutrophils determined by microcopy after 10 hours of culture with isotype hIgG1 or anti-ChemR23 mAbs at 10µg/mL (n=3). (G) Percentage of dead human neutrophils determined using Live & Dead assay after 24 hours of culture with isotype hIgG1 or anti-ChemR23 mAbs at 10µg/mL (n=8). (H) Neutrophils absolute number (*left*) and percentage of dead neutrophils (*right*) measured in mouse exudates of TNF-induced inflammation air pouch model at indicated time-points. hIgG1 control (black) or anti-ChemR23 mAbs (blue) were administered twice i.p. at d-1 & d0 (20µg/injection; n=4 -5/group). (I) SPMs and precursors quantification by mass-spectrometry in same exudates as in H) 8 hours (*left*) and 48 hours (*right*) after TNF injection. *P < 0.05, **P < 0.01 (Mann-Withney).

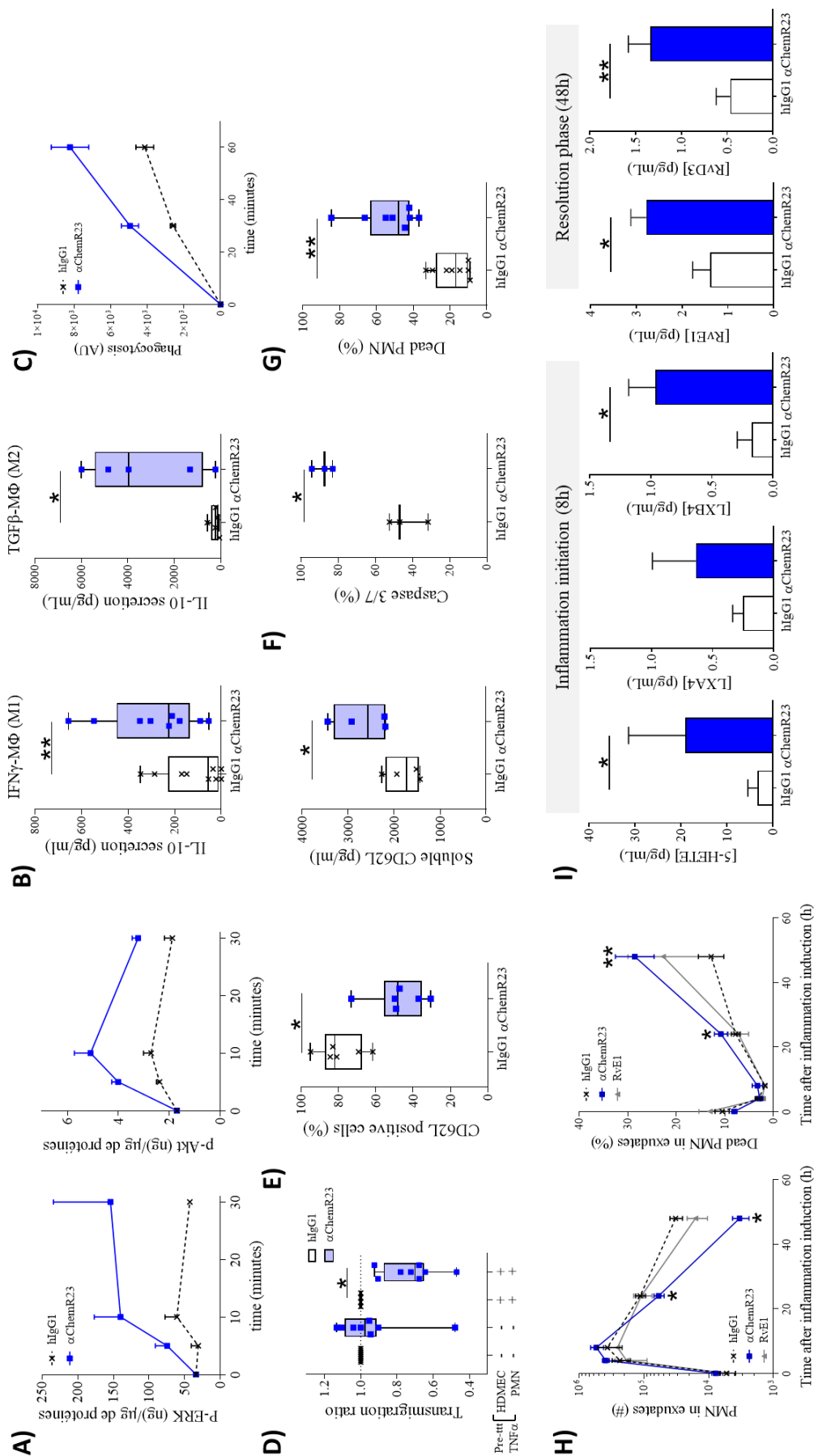


Figure 4: Agonist ChemR23 mAb accelerates the resolution of acute colon inflammation.

(A) Weight variation, (B) colon length (d22) and (C) diarrhea (stool score) of mice in the acute DSS (2%) colitis model treated i.p. at d0, d2 and d4 with isotype hIgG1 (black; n=10) or anti-ChemR23 (blue; n= 10) mAbs at 1mg/kg or Resolvin E1 (50µg/kg/day; grey; n=10) daily for 5 days.(D) Resolution index of colitis based on the time to resolve 50% of the diarrhea symptoms as discussed in [85].(E) Weight variation and (F) colon length (d5) of mice in the acute intra-rectal TNBS/Ethanol (50%) colitis model treated i.p. at d0 and d2with isotype (control) or anti-ChemR23 mAbs (1mg/kg) or Resolvin E1 (50µg/kg/days) daily for 3 days(n=9-10/group). Naïve = age-matched mice which did not received administration of DSS or TNBS/Ethanol. *P < 0.05, **P < 0.01 (Mann-Withney).

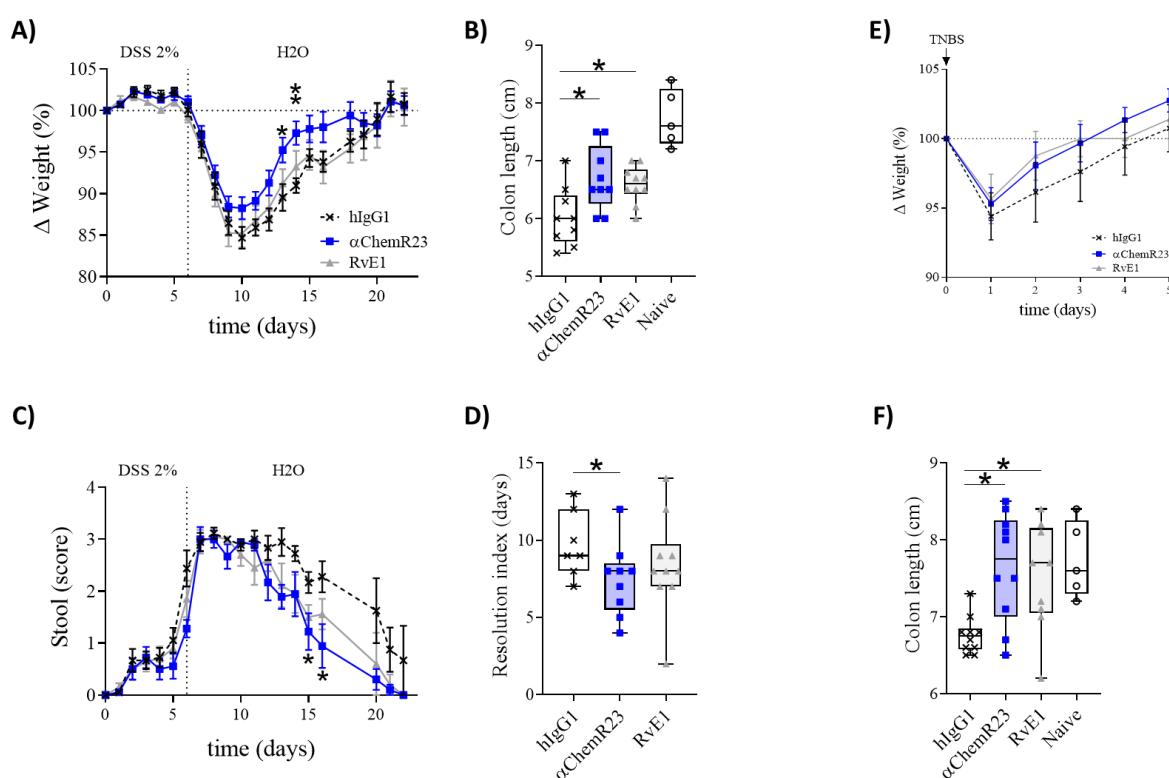


Figure 5: Agonist ChemR23 mAb triggers the resolution of ongoing chronic colon inflammation.

(A) Weight variation of Rag1^{-/-} mice reconstituted i.p with 5×10^5 CD4⁺ CD45Rb^{high} T cells from wild-type C57Bl/6 mice and treated i.p. with 1mg/kg of isotype hIgG1 (black; n=8) or anti-ChemR23 (blue; n= 7) mAbs three times/week from days 32 to day 51 after T-cell transfer.(B) Representative colon H&E (*top*) and Masson's Trichrome (*bottom*) staining and pathological quantification of colon inflammation, vasculitis, colon mucosa thickness (black bars) and fibrotic submucosa thickness (red bars)in same model as in A) at sacrifice (1 month after treatment initiation, control n=6-8, anti-ChemR23 n=6-7).(C) Representative heatmap of clustered differential gene expression and enrichment (GSEA plots) of transcriptomic analysis of colon in the CD4⁺ CD45Rb^{high} adoptive transfer model using the Nanostring mouse inflammation panel. Isotype hIgG1 (black; n=4) and anti-ChemR23 (red for non-responders n=2; blue for responders n= 3) mAbs treated mice. (D) Representative immunofluorescent staining of T cells (CD3+) and neutrophils (Ly6G+) and quantification in same colon. *P < 0.05, **P < 0.01 (Mann-Withney).

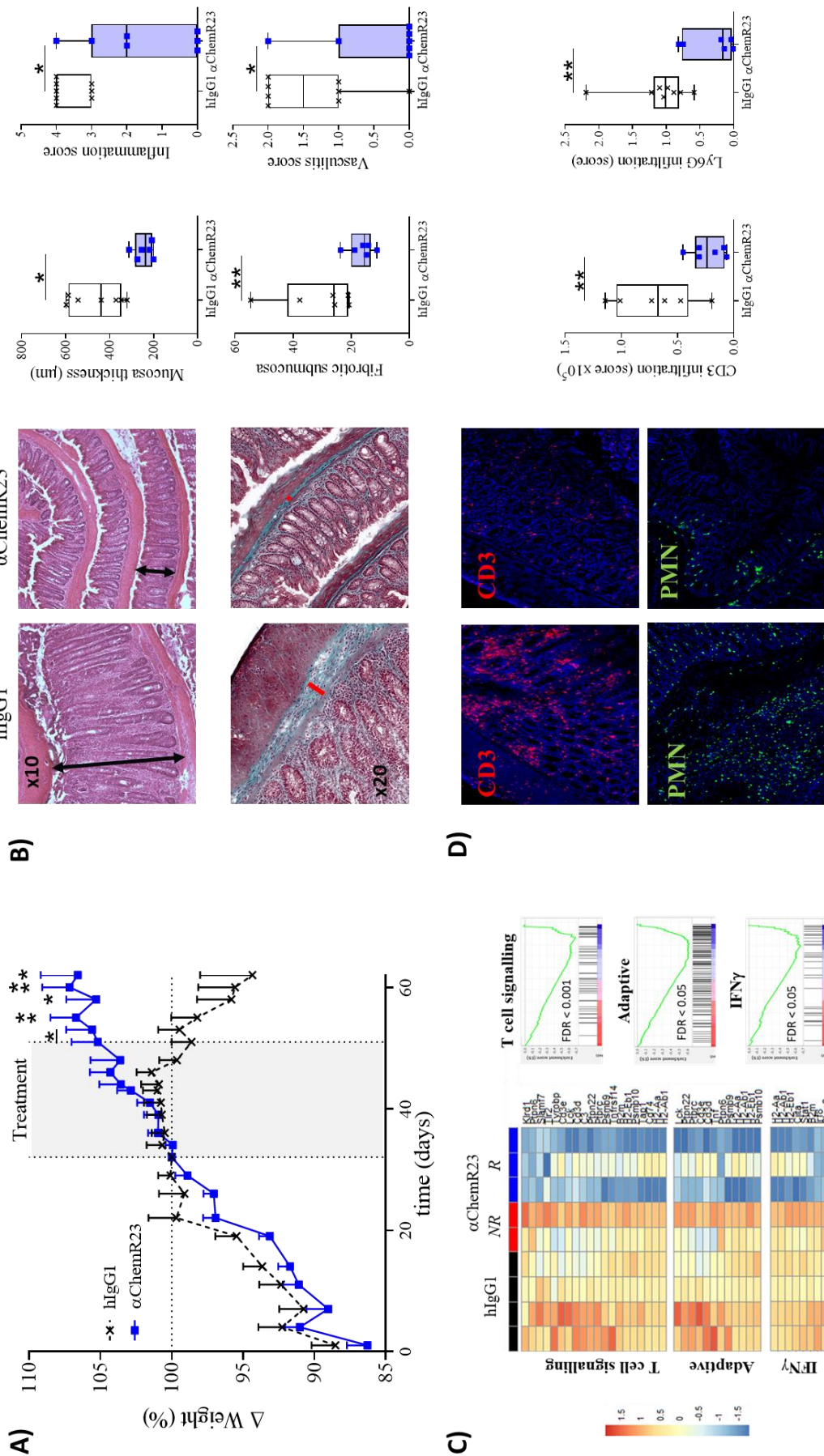
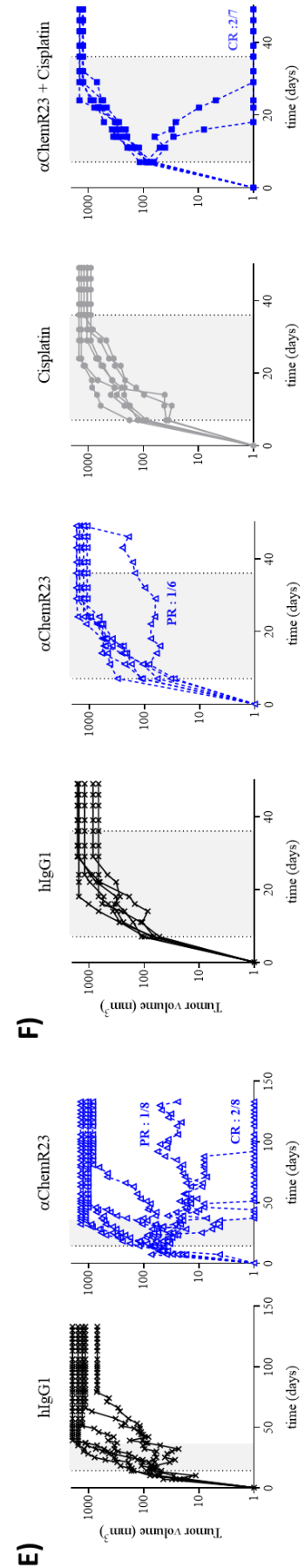
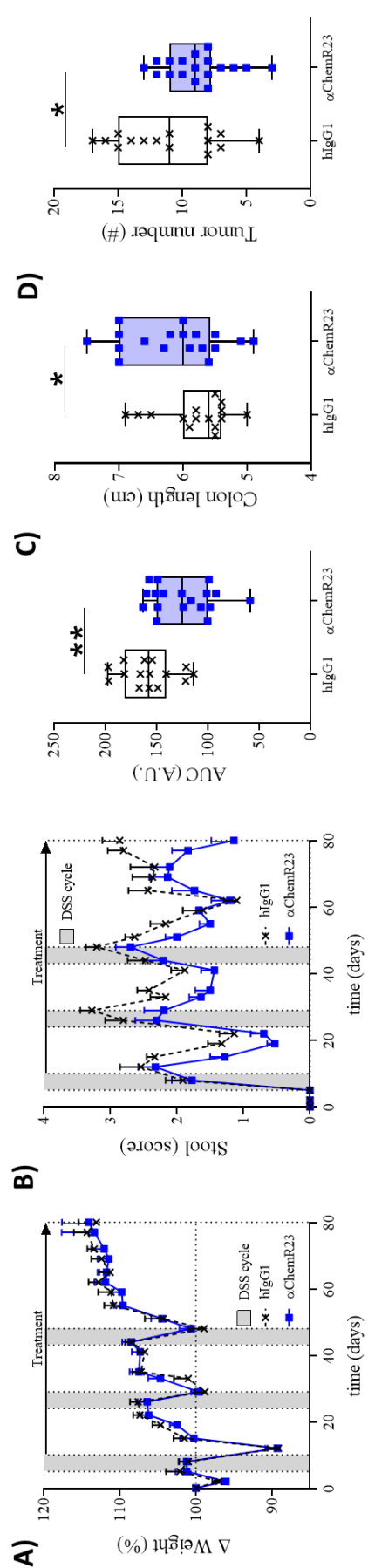


Figure 6: Agonist ChemR23 mAb inhibits colon tumor development.

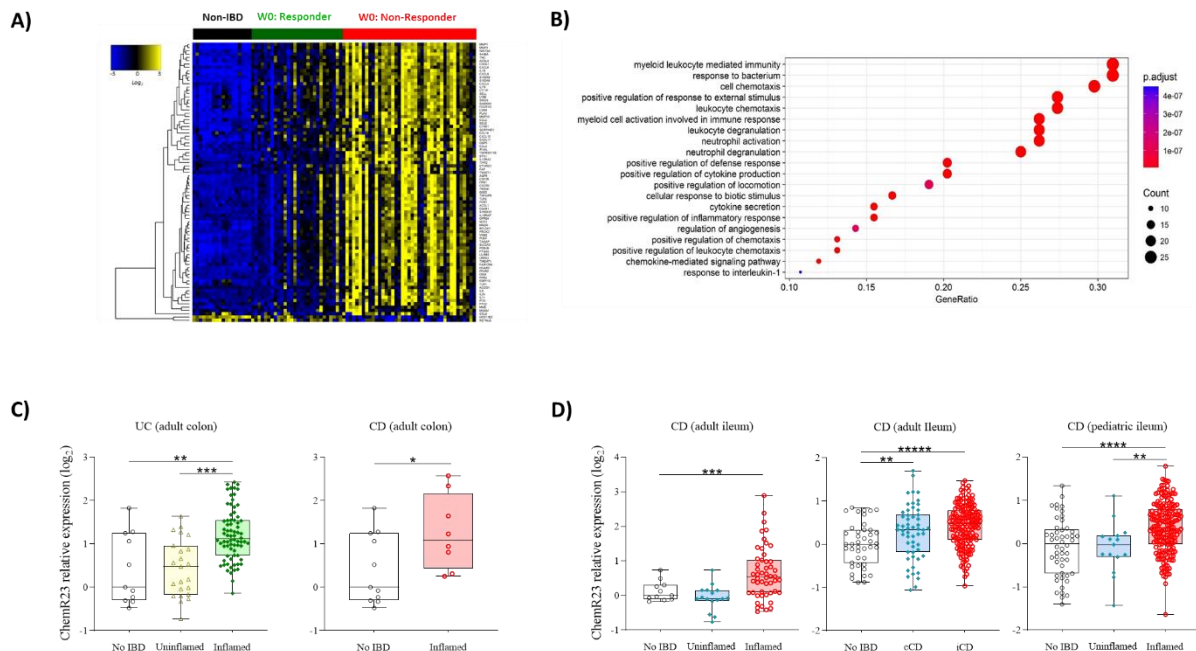
(A) Weight variation of mice in the chronic AOM/DSS colitis-associated colorectal neoplasia model treated i.p. twice/week with 1 mg/kg of isotype hIgG1 (black; n=15) or anti-ChemR23 (blue; n=18) from day 10 (end of the first cycle of DSS) until day 80. DSS cycle are indicated by a grey area. (B) Same as in A) for diarrhea (stool score) (*left*) and Area Under the Curve (AUC) of total stool scores from day 0 to day 80 (*right*). (C) colon length and (D) colon macroscopic tumors measured at day 80 in the AOM/DSS model. (E) Tumor volume after subcutaneous injection of 5×10^5 MC38 colorectal cell line injection in immunocompetent mice treated i.p. three times/week for 21 days with 1mg/kg of isotype hIgG1 (black, n=6) or anti-ChemR23 (blue, n=8) mAbs starting when the tumor volume ranged between 50-100mm³. (F) Tumor volume after subcutaneous injection of 5×10^5 CT26 colorectal cell line injection in immunocompetent mice treated i.p. three times/week for 21 days with 1mg/kg of isotype hIgG1 (black, n=6) or anti-ChemR23 (blue, empty square n=7) mAbs from d7 to day 28, and/or 5 mg/kg of Cisplatin injected i.p. every 5 days from d7 to day 28 (monotherapy, grey n=6; Cisplatin + anti-ChemR23, blue solid square n=7). PR: partial response. CR: complete response. *P < 0.05, **P < 0.01 (Mann-Withney).



Supplementary Figures

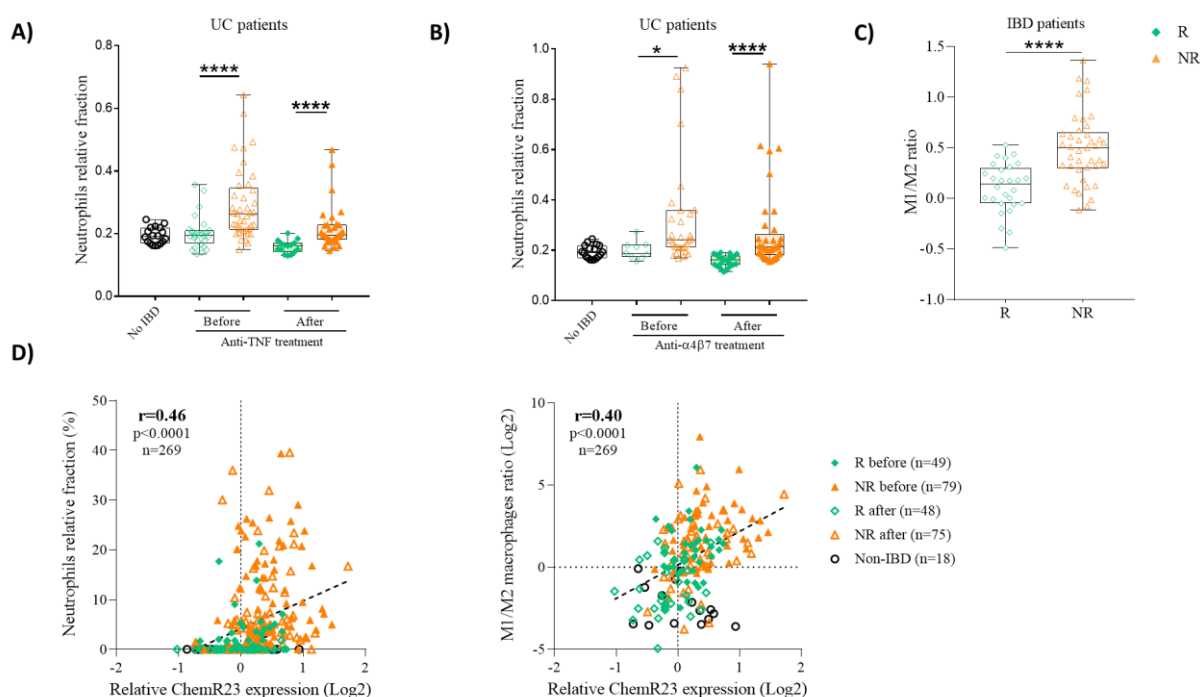
Supplementary Figure 1: Differential gene expression analysis between colon mucosa of responders and non-responders UC patients before therapy with anti-TNF.

(A) Heatmap of the expression of the 85 genes identified with an adjusted p-value < 0.05 and a Log₂ Fold Change (FC) > 1 in colon biopsies of non-IBD controls (n=18), responders (green, n=28) and non-responders (red, n=41) before anti-TNF therapy. Meta-analysis of 3 UC cohorts with histological healing as the anti-TNF response criteria: dataset GSE16879 and GSE12251, and GSE73661. (B) Gene Ontology (GO), identified with the *ClusterProfiler* R package, of the 85 genes signatures associated with anti-TNF resistance before treatment. (C) ChemR23 expression (*cmklr1* gene) in colon biopsies of non-IBD controls, UC and Crohn Disease (GSE75214) patients in the inflamed and uninflamed proximal segments after corticosteroids and/or immunosuppression therapy. (D) ChemR23 expression (*cmklr1* gene) in ileal biopsies of non-IBD controls, Crohn Disease adults in the inflamed and uninflamed proximal segments after corticosteroids and/or immunosuppression therapy (GSE75214, GSE59071, GSE 57945) and newly-diagnosed and untreated pediatric patients (GSE101794).



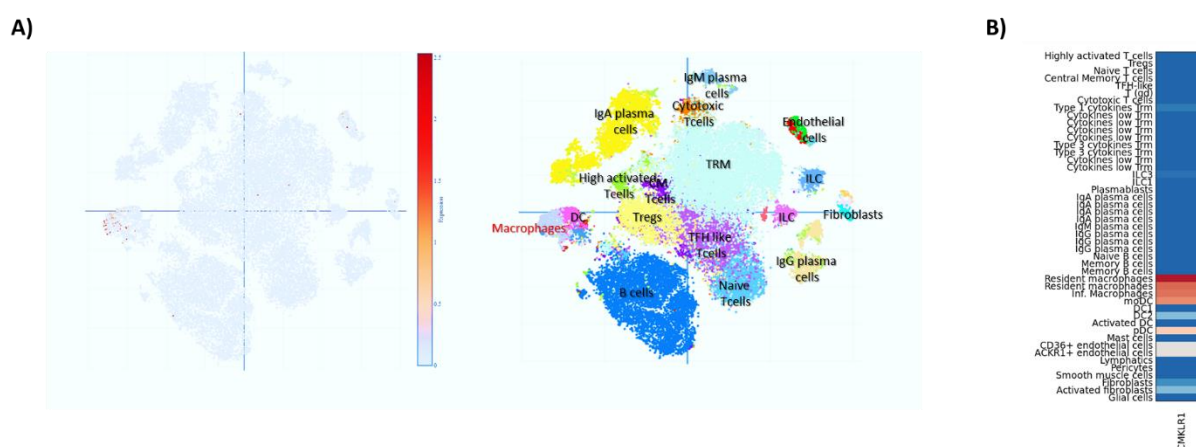
Supplementary Figure 2: Neutrophil and pro-inflammatory macrophages signatures correlates with ChemR23 expression and are associated with non-response to anti-TNF

(A) Neutrophils transcriptomic signature fraction among immune cells using Quantiseq analysis in intestinal biopsies of non-IBD patients (black), responders (green) and non-responders (orange) before and after TNF treatment using our meta-analysis (dataset GSE16879, GSE12251 and GSE73661) of colon biopsies from 3 UC cohorts (responders n=28-15, non-responders n=41-31) with histological healing as the anti-TNF response criteria. (B) Neutrophils transcriptomic signature fraction among immune cells using Quantiseq analysis of colon biopsies from a UC cohort (responders n=9-22, non-responders n=30-37) with histological healing as the anti- $\alpha 4\beta 7$ response criteria (dataset GSE73661). (C) M1 inflammatory macrophages over M2 resolutive-type macrophages transcriptomic signature ratio among immune cells using CIBERSORT analysis from the same anti-TNF IBD cohort as in (Fig1A) before treatment (responders n= 28; non-responders n=41). (D) Correlation between ChemR23 relative expression and Neutrophils or Macrophages transcriptomic signature fractions according to anti-TNF response in IBD patients (no-IBD: black; responders: green; non-responders: orange). ****P < 0.001 (Mann-Whitney and Pearson correlation coefficients).



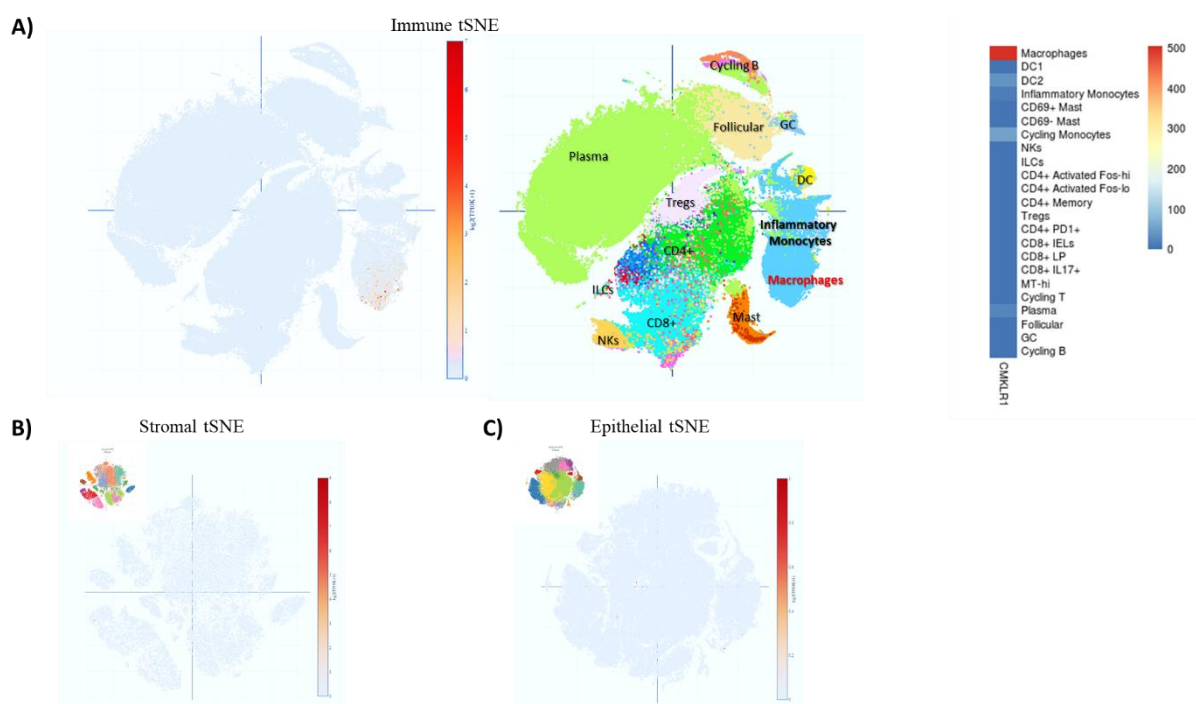
Supplementary Figure 3: ChemR23 scRNA-seq analysis in ileal tissues of CD patients

ChemR23 (*cmklr1* gene) visualised in the single cell RNAseq dataset #GSE134809 of Human Ileum during Crohn's disease [44] with (A) the Broad Institute Single Cell portal (https://singlecell.broadinstitute.org/single_cell/study/SCP359/ica-ileum-lamina-propria-immunocytes-sinai#study-visualize) and (B) the website of the article (<https://scdissector.org/martin/>).



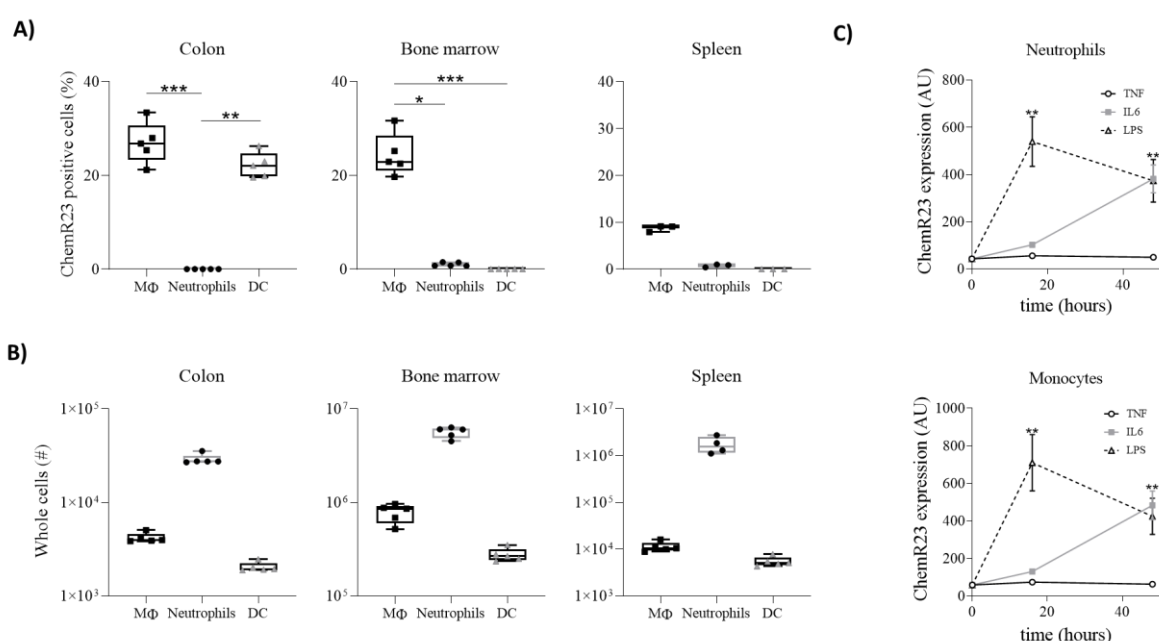
Supplementary Figure 4: ChemR23 scRNA-seq analysis in colon tissues of UC patients

CMKLR1 is visualised on the single cell RNAseq of Human Colon cells during Ulcerative Colitis in 3 tSNE (A) Immune, (B) Stromal, and (C) Epithelial [45] with the Broad Institute Single Cell portal (https://singlecell.broadinstitute.org/single_cell/study/SCP259/intra-and-inter-cellular-rewiring-of-the-human-colon-during-ulcerative-colitis#/).



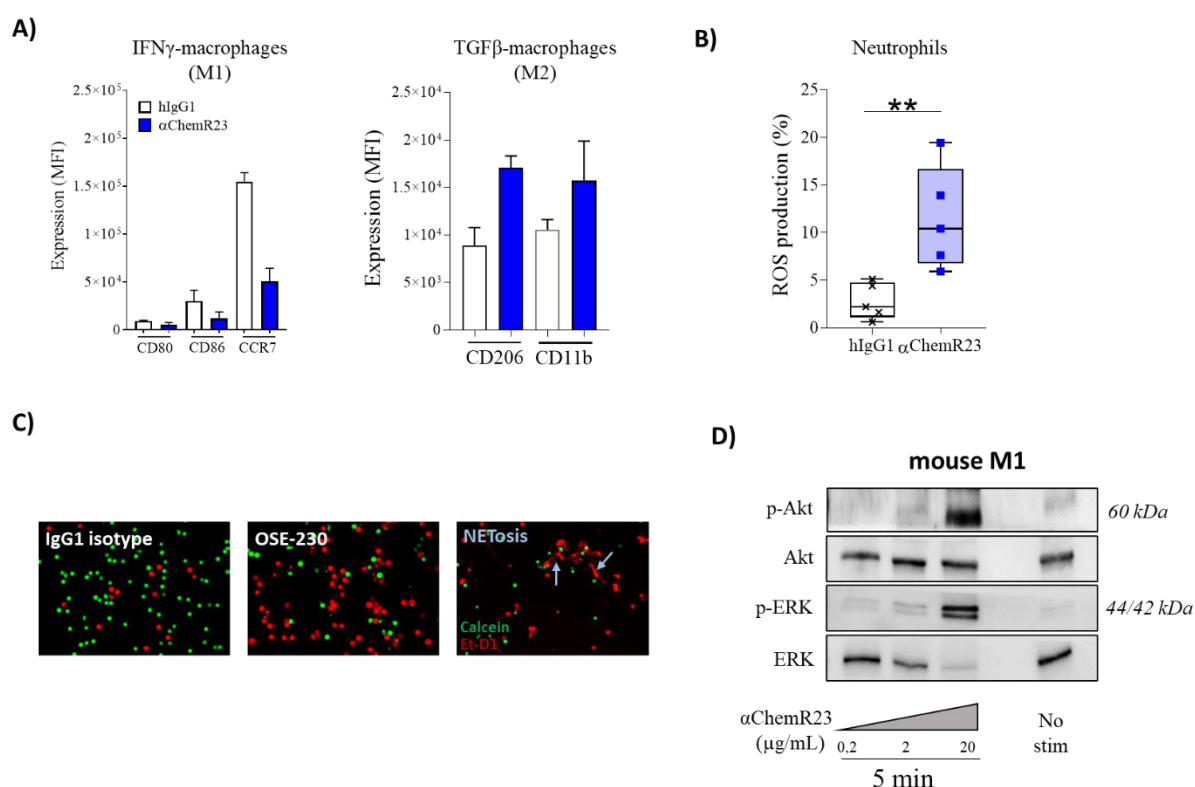
Supplementary Figure 5: ChemR23 expression in mouse.

(A) ChemR23 expression (% of cells) analyzed by flow cytometry of macrophages (F4/80+), neutrophils (Ly6G+) and dendritic cells (CD11c+) from colon, bone marrow and spleen of naïve mice (n=5/group). (B) Absolute number of macrophages, neutrophils and dendritic cells from colon, bone marrow and spleen of naïve mice (n=5/group). (C) ChemR23 expression analyzed (median fluorescent intensity) by flow cytometry of neutrophils (Ly6G+) and monocytes (CD11b+) after bone-marrow cells cultured with TNF α (100U/mL), IL-6 (10ng/mL) or LPS- (100ng/mL) for the indicated period of time (n=5/group). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005 (Mann-Withney).



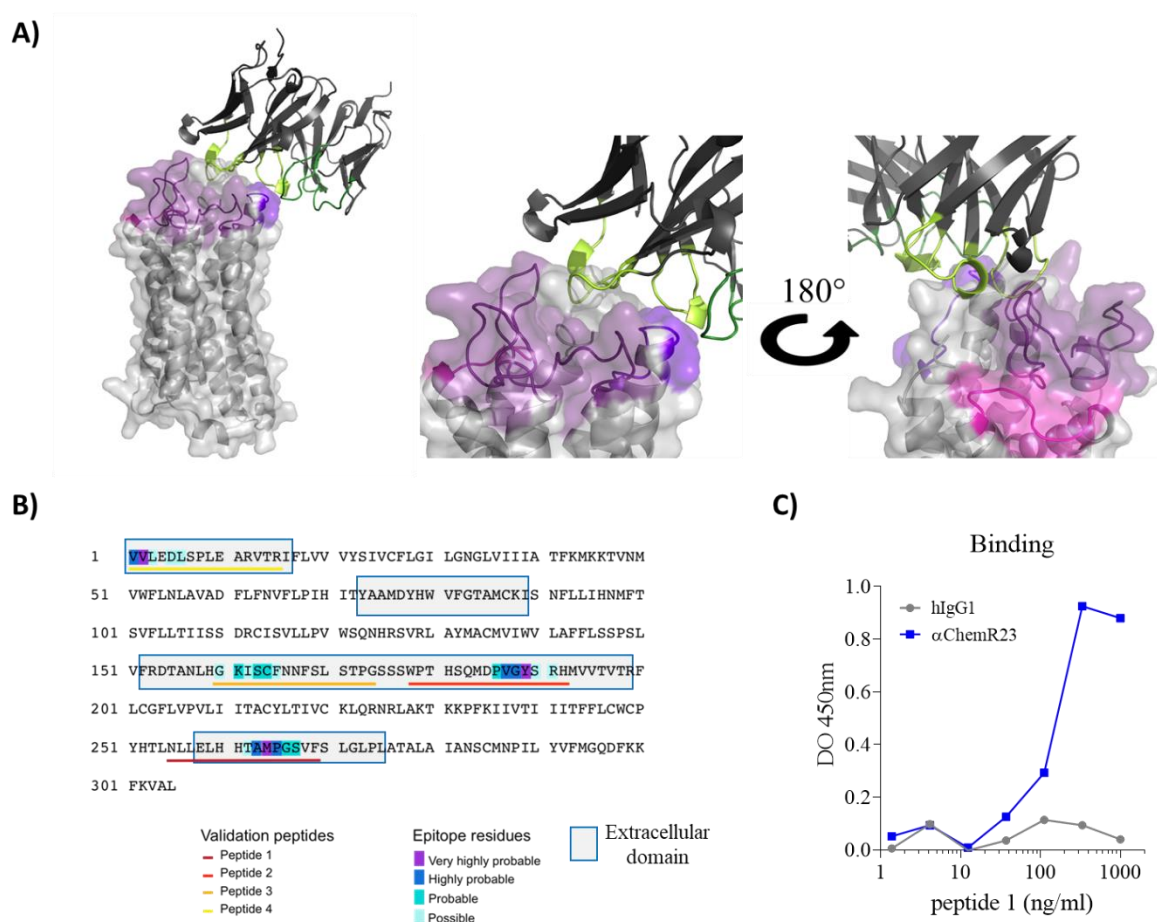
Supplementary Figure 6: Complementary pro-resolutive mechanisms of agonist ChemR23 mAb

(A) CD80, CD86 and CCR7 (*left*) and CD206 and CD11b (*right*) expression (median fluorescent intensity) analyzed by flow cytometry on IFN γ -polarized (M1) or TGF β -polarized (M2) human macrophages cultured for 48 hours either isotype control or anti-ChemR23 mAbs at 10 μ g/mL. (B) Intracellular ROS production revealed by CM-H2DCFDA (5 μ M) and CellTracker Deep Red (2 μ M) of human neutrophils cultured for 5 hours with isotype hIgG1 or anti-ChemR23 mAbs (10 μ g/ml) (n=5). (C) Representative Calcein and Ethidium Homodier-1 (Et-D1) staining of human neutrophils cultured for 24 hours with isotype hIgG1 or anti-ChemR23 mAbs (10 μ g/ml). (D) p-ERK (Thr202/Tyr204), total ERK, p-Akt (Ser473), and total Akt ChemR23 signaling measured by WB in protein lysate of mouse M1 macrophages cultured with anti-ChemR23 mAbs at 0.2, 2, or 20 μ g/ml for 5 minutes. **P < 0.01.



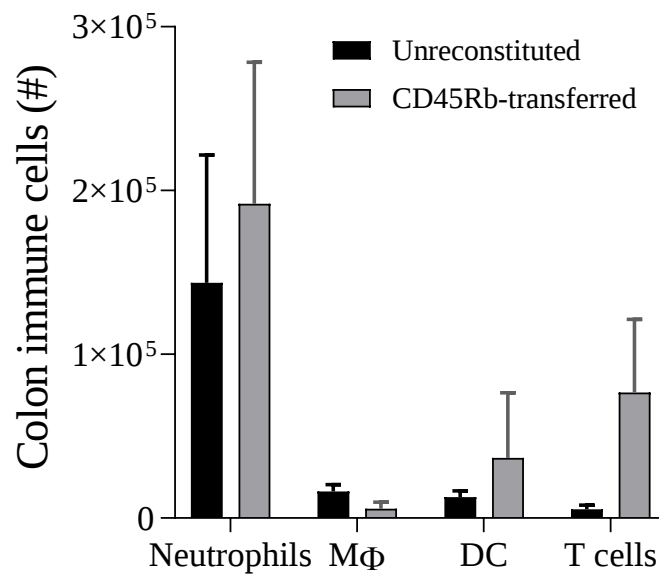
Supplementary Figure 7: Agonist ChemR23 mAb epitope characterization.

(A) 3D-structural *in silico* representation of the ChemR23 receptor and the anti-ChemR23 antibody interaction. Specific domains of interaction of ChemR23 (grey) with the mAb (black) were visualized in pink for the EL1; violet for the EL2; and dark violet for the EL3 on ChemR23 and in green for the CDRH and dark green for the CDRL. (Left) global representation of the ChemR23 and the anti-ChemR23 mAb interaction. (Right) Magnification on ChemR23/antibody interaction domains at two different angles with 180° degrees rotation. (B) *In silico* prediction of binding epitopes of the anti-ChemR23 mAb to the ChemR23 receptor according mAb Silico algorithms using properties of the protidic sequence of the anti-ChemR23 mAb and ChemR23 receptor. Extracellular domains are identified by the blue boxes on the protein sequence of ChemR23 receptor. (C) Dose-dependent ELISA binding of the anti-ChemR23 mAb (blue) to the peptide 1 identified in B) and revealed by MSD technology (DO 450nm) compared to an irrelevant control mAb (grey).



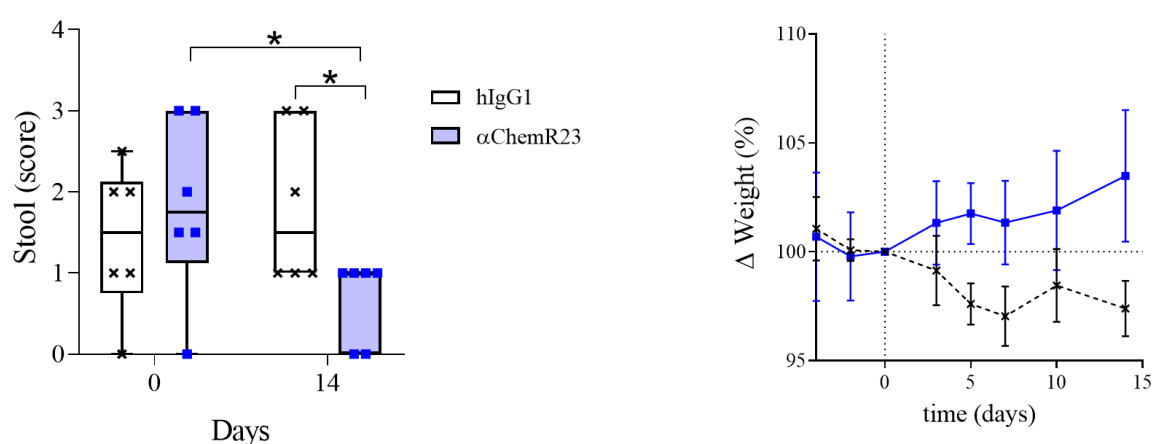
Supplementary Figure 8: Colon infiltrates in the CD45Rb^{high} transfer chronic colitis model before treatment with agonist ChemR23 mAb.

Absolute numbers of different immune cell populations in the colon of Rag1^{-/-} unreconstituted naïve mice and Rag1^{-/-} mice one month after 5×10^5 CD4⁺ CD45Rb^{high} T cells (from wild-type C57Bl/6) i.p. injection.



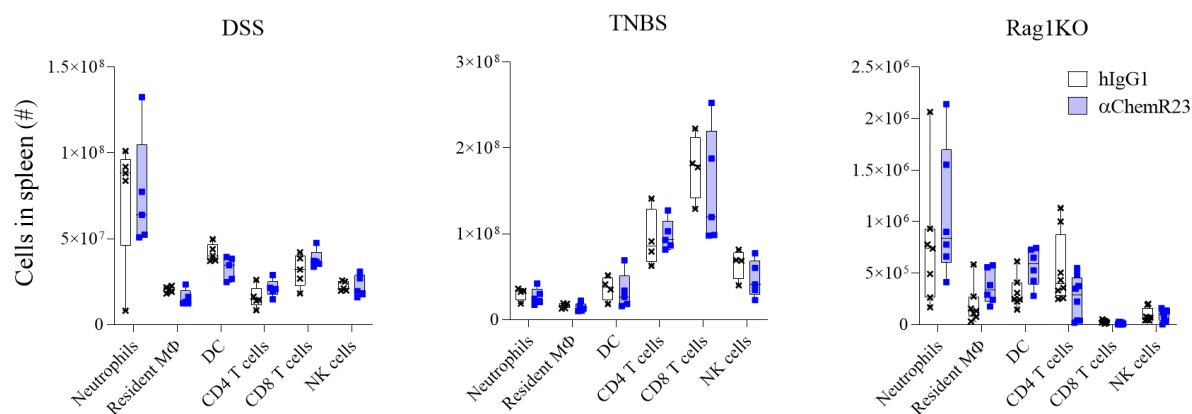
Supplementary Figure 9: Agonist ChemR23 mAb triggers inflammation resolution in IL-10 KO chronic colitis mice model.

(left) Diarrhea (stool score) measured at d0 & d14 and (right) weight variation (normalized to the day of mAb injection) in IL-10^{-/-} mice blindly treated with isotype hIgG1 (black) or anti-ChemR23 (blue) mAbs at 1mg/kg three times/week for 14 days. Treatments started when mice developed clinical signs of chronic colitis defined by a weight decrease > 5% and/or with a stool score > 1 (N=7/group). *P < 0.05 (Mann-Whitney).



Supplementary Figure 10: Agonist ChemR23 mAb does not induce peripheral leukocytes numbers modification

Absolute numbers of different immune cell populations in the spleen of mice (*Left*) at day 22 in the acute DSS (2%) colitis model treated i.p. at d0, d2 and d4 with isotype control (black; n=5) or anti-ChemR23 (blue; n=5) mAbs (1mg/kg), (*Middle*) day 5 in the acute intra-rectal TNBS/Ethanol (50%) colitis model treated i.p. at d0 and d3 with isotype control (black; n=5) or anti-ChemR23 (blue; n=5) mAbs (1mg/kg), or (*Right*) two months in CD45Rb^{high} transfer chronic colitis model treated i.p. with 1mg/kg of isotype hIgG1 (black; n=5) or anti-ChemR23 (blue; n= 5) mAbs three times/week from days 32 to day 51 after T-cell transfer.



RESULTATS COMPLEMENTAIRES

L'échec de la résolution de l'inflammation a aussi été observée dans de nombreuses maladies auto-immunes notamment la sclérose en plaque et le diabète de type 1. Nous avons donc, en parallèle de notre étude sur les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, évaluer l'efficacité pré-clinique d'un anticorps anti-ChemR23 dans 2 modèles de maladies auto-immunes où un défaut des mécanismes de la résolution de l'inflammation a été identifié.

I. Le diabète de type 1

a) Physiopathologie

Chez l'Homme le diabète de type 1, aussi appelé diabète insulino-dépendant, est caractérisé par une dégradation des cellules β des îlots de Langerhans dans le pancréas, par des LT auto-réactifs. Le modèle de souris NOD (non-obese diabetic) est décrit pour déclencher un diabète de type 1 très proche de celui chez l'Homme. Ce modèle est caractérisé par une hyperglycémie ainsi qu'une infiltration leucocytaire dans le pancréas. L'incidence est cependant plus importante chez la femelle que chez le mâle.

b) Modèle de souris NOD

Pour ce modèle nous avons utilisé des femelles NOD/ShiLtJ âgées de 7 semaines, en provenance du laboratoire Jackson. La glycémie (taux de glucose dans le sang) a ensuite été mesurée 2 fois par semaines jusqu'à la fin de l'étude par une piqûre au niveau de la veine caudale. Les souris ont été traitées avec un isotype contrôle ou un anticorps α ChemR23 (20 μ g/injection en i.p) en curatif lorsque la glycémie atteignait, 2 fois de suite, 250 mg/dL (diabète précoce). Les traitements ont été injectés pendant 2 semaines à hauteur de 3 injections par semaine. Un point limite d'euthanasie a été fixé à 580mg/dL de taux de glucose dans le sang où cette hyperglycémie peut devenir létale. Lors de l'utilisation d'un anticorps α ChemR23 dans un diabète précoce, nous avons observé un ralentissement du développement de la pathologie. En effet, en comparaison à l'isotype contrôle, les souris traitées ne montrent pas d'augmentation dans leur taux de glucose sanguin lorsqu'elles sont sous traitement. On observe au jour 28 un taux de mortalité important pour le groupe contrôle, alors qu'aucune souris dans le groupe α ChemR23 n'a atteint le point limite d'euthanasie (**Fig. 27**).

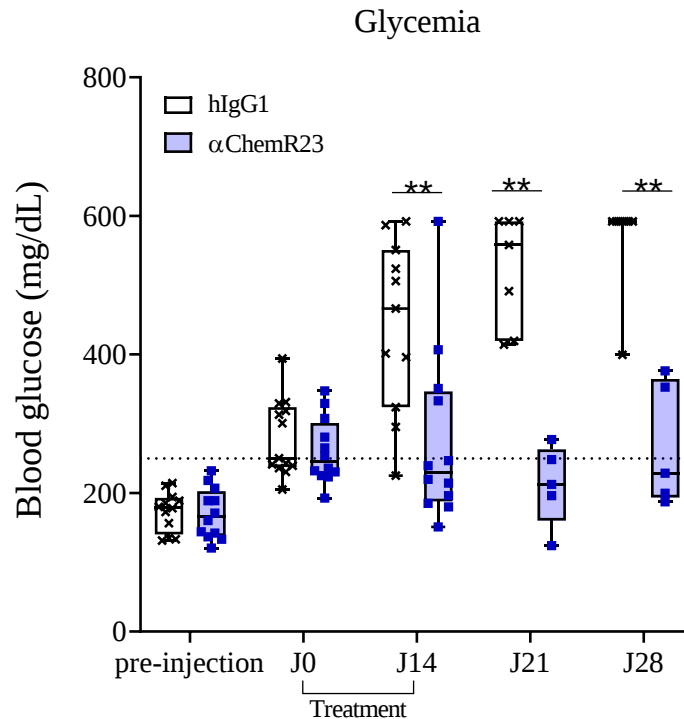


Figure 27 : L'αChemR23 ralentit le développement du diabète de type 1 chez la souris NOD.

Ce graphe représente la mesure du taux de glucose dans le sang chez la souris NOD avant, pendant et après le traitement avec un anticorps contrôle (croix noir) ou un anticorps anti-ChemR23 (carré bleu). La première mesure a été faite avant l'injection (=pré-injection) des traitements afin de démontrer que les souris n'avaient pas atteint la limite de taux de glucose dans le sang minimal. Au jour 0, les souris atteignent un taux de glucose dans le sang suffisant pour être traités puis elles sont suivies à hauteur de 2 mesures de glycémie par semaine et 3 injections d'anticorps par semaine pendant 2 semaines. Les souris atteignant 580 mg/dL de glycémie sont sacrifiées.

Cependant, cette action de notre anticorps anti-ChemR23 n'est observé que sous traitement et quelques semaines après pour quelques souris. En effet, une fois le traitement fini les souris déclenchent de nouveau une hyperglycémie jusqu'à atteindre le point limite. L'utilisation d'un anticorps anti-ChemR23 permet donc de ralentir le développement du diabète de type 1 chez la souris sans induire de tolérance. Cette étude montre que de cibler les voies de la résolution dans le diabète de type 1, ou tout du moins dans des maladies auto-immunes où un défaut de la résolution a été observé, permet de moduler la réponse inflammatoire, et donc à terme de préserver le tissu inflammé et sa fonction. Des études histologiques et transcriptomiques sont en cours pour identifier les mécanismes d'action de notre anticorps anti-ChemR23.

II. La sclérose en plaque

a) Physiopathologie

La sclérose en plaque est une maladie auto-immune qui affecte le système nerveux central (SNC). Une réponse auto-réactive du système immunitaire est observée chez les patients avec une attaque au niveau de la gaine de myéline des axones provoquant des lésions appelées plaques et, à terme, une perte de motricité. Chez la souris, le modèle Encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) est utilisée car il partage de nombreuses caractéristiques cliniques et physiopathologiques avec la SEP humaine. L'EAE est un modèle d'encéphalite induite, chez la souris C57Bl/6J, par un cocktail de composants bactériens et du peptide auto-réactif, comprenant la MOG₃₅₋₃₅ (*Myelin Oligodendrocyte glycoprotein*) qui est l'épitope immunogénique, l'adjuvant complet de Freund (CFA), ainsi que des mycobactéries et de la toxine pertussique de coqueluche (PTX). La MOG seule ne permet pas de déclencher la pathologie c'est pourquoi on ajoute du CFA qui booste la réaction immunitaire ainsi que des mycobactéries qui activent les phagocytes. La PTX provoque une rupture de la barrière hémato-encéphalique permettant le passage des LT et des macrophages dans le SNC.

b) Le modèle de souris EAE

Le modèle d'EAE-MOG₃₅₋₃₅ est caractérisé par une inflammation aiguë du SNC entraînant une paralysie flasque ascendante causée par l'infiltration de cellules immunitaires auto-réactives dans le SNC et a été étudié chez la souris C57Bl/6J âgée de 9 semaines. L'épitope immunogène MOG₃₅₋₃₅ est repris dans de l'acide acétique à 1% puis dilué en PBS afin de le mélanger avec le CFA, supplémenté avec du mycobactérium créant le « MOG cocktail ». Ce MOG cocktail est émulsifié à l'aide de mouvements de va et vient entre 2 seringues sur glace pendant 30 minutes puis conservé sur glace quelques heures. L'injection de cette émulsion de MOG cocktail se fait en sous-cutanée dans le bas du dos des souris avec 50µL d'injection à gauche puis 50µL d'injection à droite de la colonne vertébrale (volume final = 100 µL ; concentration finale de l'épitope MOG : 216µg/souris ; concentration finale CFA + mycobactérium : 400µg/souris). La toxine PTX est injectée 2 heures après l'injection du MOG cocktail en intrapéritonéal (i.p) (100µL/souris ; 200ng/souris) puis une nouvelle injection est faite 2 jours plus tard. Les souris sont scorées tous les jours (score 1= paralysie caudale ; 2= paralysie d'une patte arrière ; 3= paralysie des 2 pattes arrière ; 4= paralysie qui remonte jusqu'au tronc de l'animal (point limite)) puis traitées lorsque le score est situé entre 1 ou 2. Les souris ont été

traitées avec un anticorps contrôle (hIgG1) ou un anti-ChemR23, 3 fois par semaine jusqu'à la fin de l'étude (20µg/injection en i.p).

Nous avons pu observer que les souris traitées avec un anticorps α ChemR23 ont une phase de récupération plus rapide que les souris contrôles comme montré en **figure 28A**. Nous avons ensuite évalué l'impact thérapeutique sur les animaux ayant développé une EAE plus sévère (score>2) représenté dans la **figure 28B**. Nous avons pu apprécier que même lorsque la sévérité de la pathologie est élevée l'administration de l'anticorps anti-ChemR23 permet d'accélérer la phase de résolution en comparaison aux souris contrôles.

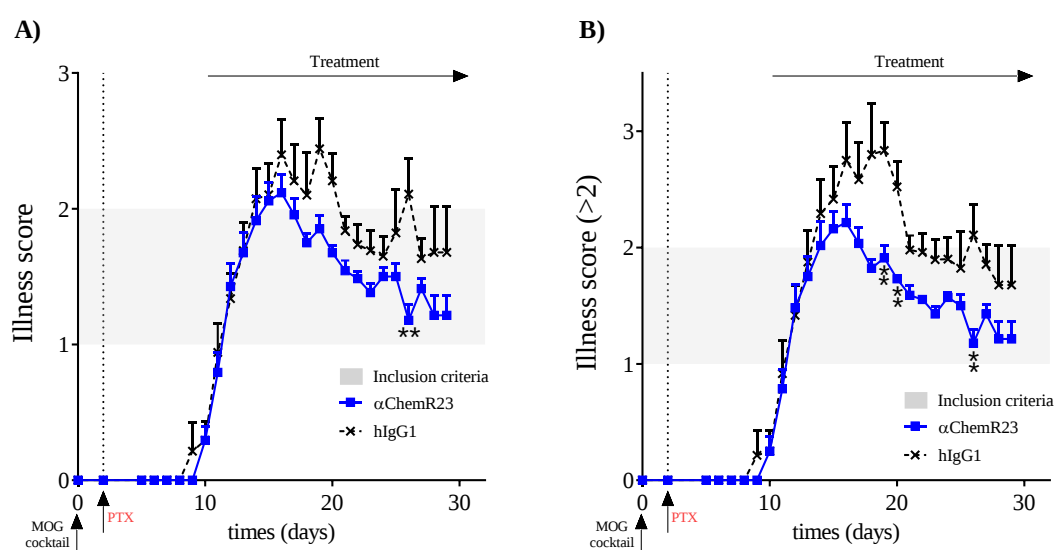


Figure 28 : l'utilisation d'un anticorps α ChemR23 accélère la phase de récupération dans le modèle d'EAE. (Gauche) Graphique représentant le score de la pathologie en fonction des jours dans le modèle EAE-MOG traité avec un isotype contrôle (hIgG1 ; croix noire ; n=17) ou un anticorps anti-ChemR23 (α ChemR23, carré bleu ; n=17). La zone grise représente la zone de score atteinte pour débute le traitement (entre 1 et 2). (Droite) Graphique représentant le score de la pathologie en fonction des jours des mêmes souris EAE-MOG qu'à gauche mais regroupant seulement les souris ayant eu un score de pathologie de 2 ou plus. Les souris ont été traitées lorsque leur score atteignait 1 ou 2 avec un isotype contrôle (croix noire ; n=14) ou un anticorps anti-ChemR23 (carré bleu ; n=12).

Lorsque nous analysons l'incidence de la pathologie en fonction du score, à savoir le nombre d'animaux ayant développé une EAE de score égal ou supérieur à 3, qui correspond à une immobilité totale des membres inférieurs, nous avons observé que l'activation de la voie ChemR23 avec un anticorps agoniste permet de réduire l'incidence de la pathologie et donc sa sévérité. En effet seulement 2 souris sur 17 (12 %) ont atteint un score de 3 dans le groupe traité

avec l'anticorps anti-ChemR23, alors que dans le groupe contrôle, 9 souris sur 17 (53 %) ont atteint un score de 3 (**Fig. 29**).

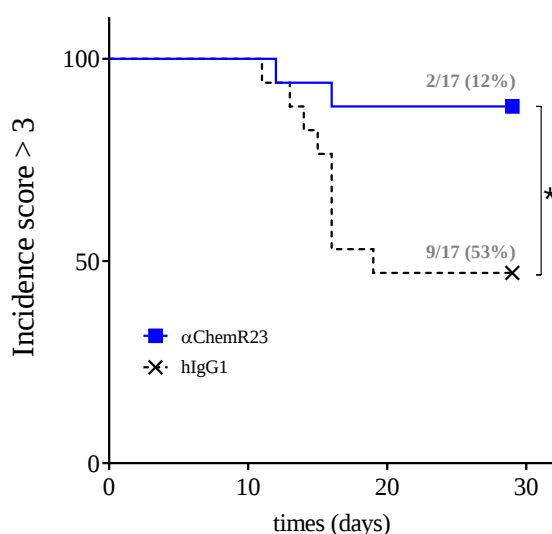


Figure 29 : l'anticorps anti-ChemR23 réduit la sévérité de la pathologie. Graphique représentant l'incidence de la pathologie chez les souris EAE-MOG. Cette incidence a été calculé en fonction des souris ayant atteint un score de 3 ou plus.

Ces résultats montrent que de cibler les voies de la résolution dans ce genre de modèle conduit également à un bénéfice thérapeutique significatif et que de cibler les cellules myéloïdes dans des indications où leur fonction résolutive fait défaut peut être une bonne stratégie thérapeutique.

DISCUSSION

De récentes recherches mettent en évidence l'échec de la résolution de l'inflammation dans l'initiation des maladies inflammatoires chroniques. Cet échec notamment médié par un défaut d'apoptose et de clairance des neutrophiles, est fortement étudié dans des modèles d'inflammation aiguë. L'utilisation de SPM et d'analogues chimiques démontrent accélérer la phase de résolution sur ces modèles, cependant leur utilisation reste limitée à l'inflammation aiguë. Nous avons souhaité étudier l'efficacité d'un anticorps agoniste de ChemR23 dans des modèles d'inflammation chronique ou une déficience de la résolution a été identifiée.

Dans les MICI un défaut de résolution a été démontré. En effet chez les patients atteints de MC on observe une accumulation tissulaire de neutrophiles ainsi que de macrophages pro-inflammatoires [420]. Plusieurs études montrent un échec de recrutement puis d'apoptose des neutrophiles associés à une altération de différenciation des macrophages pro-inflammatoire en macrophages pro-résolutifs chez ces patients [280,388,421]. Dans les premières phases de l'inflammation de la MC un défaut de recrutement des neutrophiles sur le site inflammatoire a été observé, causé par l'absence de sécrétion d'IL-8 par les macrophages [385]. Ce délai de recrutement des neutrophiles initial induit un retard d'élimination de l'agent inflammatoire provoquant une réaction immunitaire exacerbée [386]. Cependant, ce retard de recrutement des neutrophiles ne semble être effectif que dans les premières phases de la pathologie, puisque à terme une accumulation de neutrophiles est observée sur le site pathologique. Le défaut de différenciation des macrophages chez les patients atteints de RCH ou MC est associé à une prolongation de la survie des bactéries intracellulaire entraînant un retard dans l'élimination de l'agent infectieux [422] ainsi qu'une forte sécrétion de cytokines pro-inflammatoires IL-23 et TNF α [388]. La présence prolongée des bactéries provoque, à son tour, une réaction immunitaire exacerbée alors que la sécrétion accrue d'IL-23 induit la génération de LT Th17, fortement retrouvé chez ces patients [277]. Cette sous-population cellulaire est connue pour sécréter de nombreuses cytokines notamment de l'IL-17, de l'IL-22, du G-CSF et de d'IL-8 induisant le recrutement d'autres cellules de l'immunité. Une fois les neutrophiles recrutés sur le site inflammatoire, un défaut d'apoptose est observé [280]. Ce défaut d'apoptose des neutrophiles est principalement causé par l'altération du phénotype des macrophages. En effet, ce sont les macrophages anti-inflammatoires qui induisent normalement l'apoptose des PMN

[80,423] alors que les macrophages M1 (retrouvés fortement dans la RCH et MC), eux, induisent la sécrétion de G-CSF, une cytokine permettant de prolonger la survie des neutrophiles [63]. De plus, l'apoptose des neutrophiles induit la libération de médiateurs de la résolution (AnxA1) qui provoque ensuite la polarisation de macrophages pro-inflammatoires vers des macrophages anti-inflammatoires [79]. L'échec de l'apoptose conduit donc indirectement à l'accumulation des macrophages de type M1 dans le côlon. On observe donc un réel impact de l'altération des macrophages et de l'échec d'apoptose des neutrophiles dans les MICI.

Les patients répondeurs aux anti-TNF montrent une accumulation de macrophages anti-inflammatoires réduisant la prolifération des LT et par conséquent la sévérité de la pathologie [404]. Cette induction de macrophages régulateurs n'est observée qu'avec des anticorps ayant un Fc qui permet la liaison au Fcγ récepteur et induit la synthèse d'IL-10 [424,425], ce n'est pas le cas par exemple du Certolizumab pegol qui ne possède pas de Fc. Notre anticorps semble pouvoir activer le même processus, puisqu'il induit une augmentation de la sécrétion de l'IL-10 par les M1 de façon Fc dépendant (absence d'effet avec un anticorps muté pour le Fc ; donnée non montrée). Par notre méta-analyse CIBERSORT de la muqueuse intestinale des patients atteints de MICI (RCH ou MC) nous avons démontré une accumulation de neutrophiles ainsi qu'un ratio important de macrophages pro-inflammatoires chez les non-répondeurs. Cette observation corrèle parfaitement avec les observations des équipes précédentes démontrant un échec d'apoptose des neutrophiles et une altération du phénotype des macrophages [389]. De plus, et pour la première fois, nous démontrons que les patients réfractaires aux anti-TNF sont associés à une surexpression du récepteur ChemR23 dans la muqueuse intestinale. Ce récepteur est impliqué dans l'activation des voies de la résolution de l'inflammation lorsqu'il fixe son ligand la RvE1, appuyant son pouvoir thérapeutique. Sachant que 1/3 des patients ne répondent pas aux anti-TNF ou aux anti-intégrines et que suite à l'échec de ces traitements les patients se retrouvent en impasse thérapeutique, il est aujourd'hui primordial de mettre au point de nouvelles stratégies thérapeutiques et d'identifier de nouvelles cibles [293,410,426,427]. De nouvelles thérapies cibles d'autres cytokines de l'inflammation telles que l'IL-6R, IL-13, IL-12/IL-23 et l'IL-36R mais elles gardent le même concept de prévention de l'inflammation ou d'être des anti-inflammatoires induisant simplement la diminution de l'inflammation sans la résoudre activement [428,429]. Récemment, de nouvelles recherches mettent en avant l'utilisation de SPM ou d'analogues chimiques afin d'activer les voies de la résolution de l'inflammation dans différents modèles et axes thérapeutiques. Une étude a mis en avant un

défaut de production de la lipoxine A4 chez les patients atteints de MICI [139]. L'utilisation d'un analogue de la LXA4 a démontré atténuer la sévérité de la colite induite au DSS ainsi que l'expression des gènes pro-inflammatoires [138]. Désormais plusieurs médiateurs lipidiques ont été utilisés dans des modèles de colites aiguës dont la RvE1, la protectine et la RvD5 [21,147,430]. Ils accélèrent la phase de résolution de l'inflammation dans des modèles d'inflammation aiguë en augmentant l'apoptose des PMN, l'efferocytose ainsi qu'en diminuant l'infiltration leucocytaire [200]. La Marésine 1 a elle mis en avant des résultats prometteurs dans un modèle de colite chronique induit par 2 cycles de DSS mais qui démontre une résolution spontanée malgré tout [431]. Néanmoins, dans des modèles *in vivo* d'inflammation aiguë identiques, les SPM démontrent des effets biologiques similaires entre eux, à savoir (1) induire l'apoptose des PMN et (2) diminuer la migration leucocytaire, malgré leurs cibles différentes. Il est donc plus judicieux de s'intéresser aux modifications d'expression des cibles ou bien des médiateurs lipidiques afin d'être plus spécifique dans la cible thérapeutique. Etant donnée l'effet positif de l'activation de l'axe RvE1/ChemR23 sur les modèles d'inflammation aiguë de colite [21,147], en plus de la surexpression du récepteur ChemR23 chez les patients MICI qui ne répondent pas aux anti-TNF et de l'accumulation de neutrophiles dans leurs tissus (signe d'un déficit de résolution), nous avons souhaité évaluer l'effet thérapeutique de notre anticorps agoniste de ChemR23 sur ces mêmes modèles. La RvE1 agit comme un anti-inflammatoire ainsi qu'un pro-résolutif. En effet, dans les modèles de colites aiguës ce médiateur diminue la perte de poids ainsi que l'infiltration leucocytaire (LT et neutrophiles) dans la lamina propria et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-12p40, TNF α , IL-6) [21,147]. Alors qu'il augmente l'apoptose des neutrophiles et l'efferocytose des macrophages dans le modèle d'air-pouch et de péritonite [20]. Après évaluation de l'action de notre agoniste, nous avons pu mettre en avant que l'activation de la voie ChemR23 par notre anticorps accélère la phase de résolution dans deux modèles de colites aiguës en mimant les effets de la RvE1, voire même en l'améliorant. Nous avons observé une récupération de la perte de poids et du score selle plus rapide avec notre anticorps et la RvE1, ainsi qu'un côlon moins retractoré démontrant une inflammation plus résolue. De plus, nous avons observé une récupération plus rapide dans le modèle d'air-pouch justifiée par une augmentation de l'apoptose et de l'élimination des neutrophiles par le biais de notre anticorps, comme cela est décrit pour la RvE1 [13,20]. La mise en place de nos modèles d'inflammation aiguë a permis de mettre en évidence que notre anticorps n'agit pas comme un anti-inflammatoire mais bien comme un pro-résolutif [148]. A la différence de la RvE1, il ne provoque pas de changement lors des premières phases de l'inflammation mais permet d'accélérer la phase de résolution, ce qui est démontré par l'index

de résolution (Ri). Cet index détermine le temps nécessaire pour récupérer 50 % du maximum de l'inflammation. Lorsque l'amplitude maximale d'inflammation est identique entre deux traitements (ou placebo) cela démontre que l'inflammation est la même, c'est le cas de notre anticorps dans nos modèles d'inflammation aiguë [148,149]. Dans la littérature la RvE1 montre des effets anti-inflammatoires puisqu'elle diminue l'amplitude d'inflammation [244]. Au contraire, si le Ri est diminué cela démontre que la récupération a été plus rapide et c'est ce que l'on observe avec notre anticorps dans nos modèles d'inflammations aiguë. La RvE1 n'a pour le moment jamais été utilisée pour des modèles de colites chroniques, et seule la marésine a démontré des effets bénéfiques dans un modèle de colite chronique induite avec une résolution spontanée [431]. L'étude de notre anticorps dans 2 modèles de colites chroniques, IL10-KO et Rag1KO [432,433] qui ne se résolvent pas spontanément, a mis en évidence l'effet positif de l'activation de la voie ChemR23 par notre anticorps sur l'induction de la résolution de l'inflammation. Notre anticorps anti-ChemR23 permet d'enclencher une résolution de l'inflammation dans des modèles dépourvus de résolution entraînant une protection contre la chronicité de la pathologie. Ceci est justifié par une absence de signes cliniques ainsi qu'une diminution de l'infiltration des LT et des neutrophiles dans le côlon des souris Rag1KO. De plus, notre étude histologique du côlon montre une diminution du score de vascularite et d'inflammation globale chez ces souris. A l'inverse, la présence d'ulcération dans le côlon des souris souligne la mise en place d'une inflammation qui s'est résolue plus rapidement grâce au traitement et donc l'action curative et non préventive du traitement. Ceci permet de justifier que notre anticorps agit comme un pro-résolutif et non comme un anti-inflammatoire. Notre anticorps permet donc d'activer les voies de la résolution de l'inflammation sans prévenir significativement l'installation d'une inflammation de type aiguë. Cela n'est pas le cas des traitements anti-TNF qui augmentent les risques d'infection en empêchant les inflammations aiguës de se mettre en place. En effet, le TNF α est une cytokine majeure lors des premières phases de l'inflammation permettant le recrutement des macrophages, des LT et des NK nécessaires pour lutter contre l'inflammation microbienne ou stérile. Les anti-TNF empêchent par conséquent l'action du TNF α et augmente fortement les risques d'infections bactériennes (Tuberculose, pneumonie, méningite...), virales (VIH, VHB, VHC ...), parasitaire (toxoplasmose) et fongique (Aspergillus, Candidose...) [434,435]. Les anti-TNF entraînent dans 18 % des cas une neutropénie et dans 3 % des cas une neutropénie sévère, notamment chez les patients atteints de PR ou l'on retrouve 80 % des patients qui ont déjà subi un épisode de neutropénie [436]. Cette diminution accrue du nombre de neutrophiles augmente fortement les risques d'infections et retardent la phase de résolution de l'inflammation conduisant à une

d'inflammation chronique [437]. Quelques cas de neutropénie ont été observés chez les patients ayant une MC ainsi que chez des nouveaux nés dont la mère était traitée avec des anti-TNF [438,439]. Etant donnée l'impact de notre anticorps sur l'élimination des neutrophiles dans le tissu inflammatoire, nous avons évalué son effet sur les neutrophiles en périphérie. Nous avons d'abord mis en évidence que l'expression de ChemR23 est inductible en conditions inflammatoires et que son expression est retrouvée exclusivement sur les neutrophiles du site inflammatoire. Cela protège donc l'élimination des neutrophiles en périphérie et c'est pourquoi nous n'avons détecté aucune altération sur le nombre de neutrophiles dans la rate des souris traitées avec notre anticorps. Ceci apporte un point positif en comparaison aux anti-TNF.

L'activation des voies de la résolution de l'inflammation est aujourd'hui un nouvel axe de recherche thérapeutique plein d'espoir. De plus en plus de travaux mettent en évidence une diminution de synthèse des SPM dans certaines MIC. C'est le cas par exemple dans les MICI ou l'on a retrouvé un défaut de synthèse de la LXA4 ainsi qu'une perte du médiateur pro-résolutif AnxA1 [139,390]. Mais ce défaut d'AnxA1 est contré grâce aux thérapies anti-TNF, qui démontrent une augmentation de l'expression de l'AnxA1 suite aux traitements chez les répondeurs ; ce n'est pas le cas des patients qui ne répondent pas aux anti-TNF [390]. La lipoxine A4 ainsi que la protectine D1 sont aussi retrouvées diminuées chez les patients atteints d'asthme sévère [176,440]. De multiples indications sont donc désormais traitées avec ces SPM. La lipoxine A4, le premier SPM découvert, est utilisée dans des modèles de colites, d'asthme, de fibrose polycystique, ou encore d'ischémie-reperfusion et de péritonite. La RvD1 a démontré des effets bénéfiques dans la maladie d'Alzheimer, l'arthrite ainsi que dans le diabète de type 1. La RvE1 a été retrouvée diminuée dans le diabète de type 2 ainsi que dans la parodontite [203,245], cependant son pouvoir pro-résolutif a été étudié dans de multiples indications : le diabète de type 2 [203,251], les MICI [21,147], la parodontite [22], les inflammations pulmonaires [23], l'ischémie-reperfusion [247], la maladie d'Alzheimer [249] et dans la dermatite atopique [250]. De plus, l'utilisation de la RvE1 entraîne une augmentation de la concentration de LXA4 chez les patients asthmatique apportant un nouveau mode d'action de ce SPM [240]. Ceci démontre que les stratégies ciblant les voies de la résolution de l'inflammation peuvent agir sur un grand nombre d'indications justifiant l'impact de l'échec de la résolution de l'inflammation dans les MIC. Pour le moment nous avons étudié l'effet de notre anticorps dans 3 indications : (1) les MICI qui sont associées à une accumulation de neutrophiles et à un défaut de clairance, (2) le diabète de type 1 qui démontre un excès de cellules apoptotiques associé, là aussi, à un défaut de phagocytose des macrophages

[304,441,442] et (3) l'EAE dans lequel il est observé une accumulation de macrophages pro-inflammatoires avec un défaut de balance M1/M2 [443,444], ainsi qu'un défaut de synthèse de RvD1 chez ces patients [445,446]. Etant donnée l'effet de notre anticorps sur l'induction de l'apoptose des neutrophiles et l'augmentation de la clairance nous pourrions envisager de nouvelles indications. Une des pathologies la plus associée aux neutrophiles est la vascularite à ANCA (*Antineutrophil cytoplasmic antibody*) [447]. Cette MAI est caractérisée par une inflammation chronique des vaisseaux sanguins causée par la sécrétion d'auto-anticorps dirigés contre les protéines PR3 et MPO exprimées dans le cytoplasme des neutrophiles à l'état basal et transloquée en surface après activation [448,449]. Cette attaque des neutrophiles induit leur dégranulation, la sécrétion d'agent oxydatif et la formation de NET dans les VS causant une destruction de l'endothélium [450,451]. Des résultats controversés sont décrits sur l'apoptose des neutrophiles avec soit un échec soit une activation de l'apoptose dans cette pathologie [452,453]. Néanmoins, induire l'apoptose de ces neutrophiles avec notre anticorps contribuerait à diminuer leur activation et par conséquent à ralentir la destruction de l'endothélium. De plus l'élimination des neutrophiles permettrait de diminuer la sécrétion d'auto-anticorps par élimination de la cible (PR3 ou MPO). Dans une autre voie, le lupus érythémateux est une maladie auto-immune qui touche de nombreux organes engendrant des éruptions cutanées puis des dysfonctionnements. Il est caractérisé par une hyper-réactivité des LB et une forte sécrétion d'auto-anticorps anti-ADN double brin. Ces ADN double brin sont sécrétés lors de l'apoptose et de la NETose des neutrophiles [454]. Une augmentation de l'apoptose cellulaire notamment des neutrophiles et des macrophages ainsi qu'un défaut d'efferocytose de ces corps apoptotiques par les macrophages ont été mis en évidence dans cette pathologie [302,303]. Etant donné l'efficacité de notre anticorps pour augmenter l'efferocytose des macrophages cela pourrait contribuer à résoudre l'inflammation en éliminant les corps apoptotiques plus rapidement et par conséquent en diminuant la présence d'ADN double brin. D'autres pathologies que les maladies auto-immunes peuvent être envisagées comme indications thérapeutiques, comme par exemple la mucoviscidose. Cette maladie est causée par une altération du canal CFTR induisant des dysfonctions sur de nombreux organes notamment les poumons. Une inflammation chronique pulmonaire est observée chez ces patients et caractérisée par une accumulation de neutrophiles au niveau des muqueuses avec une absence de clairance [455,456]. Le défaut de synthèse du canal CFTR altère aussi la fonction d'élimination de l'agent inflammatoire (*P.Aeruginosa*) par le neutrophile [457]. De plus, un faible taux de LXA4 et de RvD1 a été trouvé chez ces patients associé à une réduction de l'expression des enzymes LO-12 et 15 (permettant la synthèse des SPM) justifiant le défaut de

résolution de l'inflammation [160,458–460]. Compte tenu de l'action de notre anticorps pour induire l'activation des neutrophiles par sécrétion de ROS puis l'augmentation de leur apoptose, cette pathologie pourrait donc être une bonne cible thérapeutique afin d'aider le système immunitaire à contrer l'infection ainsi que l'inflammation chronique. Une autre MIC, avec une forte augmentation de prévalence ces dernières années, est la NASH (*Nonalcoholic steatohepatitis*) [461]. Cette pathologie est caractérisée par une inflammation stérile du foie causée par activation des PRR dans le foie après reconnaissance de DAMPs, entraînant l'apoptose massive des hépatocytes puis une fibrose cicatricielle [462]. On y retrouve une accumulation de macrophages pro-inflammatoires M1 et de neutrophiles. Des travaux ont mis en évidence que la sécrétion d'IL-10 par les macrophages de type M2 permet d'induire l'apoptose des macrophages M1 présent dans la NASH et protège les souris contre cette pathologie [463]. L'activation de la voie ChemR23 par notre anticorps favorise la sécrétion d'IL-10 par les macrophages de type M1, induisant un changement de phénotype vers des macrophages anti-inflammatoires nécessaires à la résolution de l'inflammation. De plus, notre anticorps provoque l'apoptose des neutrophiles ainsi que leur efferocytose sur le site inflammatoire. Ceci pourrait permettre de résoudre l'inflammation présente dans le foie des patients NASH et empêcherait l'installation de la fibrose responsable à terme du dysfonctionnement de l'organe.

Dans un autre contexte que les MIC, Dipak Panigraphy et son équipe ont mis en évidence l'intérêt d'utiliser des SPM dans des modèles de cancérologie. Ils ont démontré que l'utilisation de SPM en combinaison à la chimiothérapie réduit, voire inhibe, la progression tumorale dans plusieurs modèles tumoraux (LLC, 4T1 ...) [252]. Cet effet sur le développement tumoral est justifié par l'accélération de l'élimination des corps apoptotiques, créés par la chimiothérapie, et la réduction de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, empêchant une nouvelle inflammation de se mettre en place sur le site tumoral. Lors de l'étude d'efficacité de notre anticorps anti-ChemR23 sur la prolifération tumorale dans 3 modèles différents de cancérologie nous avons mis en évidence, à notre tour, que l'activation de la voie ChemR23 protège contre une prolifération exacerbée de tumeur de type colorectal. Dans cette indication de cancer colorectaux, nous avons observé une efficacité chez 20 à 30 % des souris. Cet effet bénéfique doit être approfondi. Nous pourrions envisager de tester d'autres modèles tumoraux associés plus fortement aux neutrophiles, c'est le cas par exemple du cancer du sein ainsi que du cancer du poumon et du pancréas [464,465]. De plus, un ratio élevé de neutrophiles/LT est associé à une résistance à la chimiothérapie dans de nombreux cancers [466–468]. L'induction

d'apoptose des neutrophiles par notre anticorps anti-ChemR23 pourrait donc favoriser le nettoyage du site tumoral et la diminution de l'inflammation puis cela pourrait permettre aux patients résistant à la chimiothérapie, à cause de ce ratio, d'en bénéficier.

Le fait d'avoir choisi un format anticorps monoclonal comme modalité thérapeutique apporte de multiples avantages, notamment celui de sa durée de vie après injection. En effet, en phase I la molécule RX-10001 issue de la Résolvine E1 montre des effets prometteurs dans le syndrome de l'œil sec mais possède un profil pharmacocinétique suboptimal avec une durée de vie de 7 à 8 heures. Une administration journalière, par défaut contraignante, était donc indispensable et l'étude clinique a été arrêtée en phase I/II pour des raisons indéterminées [258,469]. Compte tenu des difficultés de stabilité des lipides, de nouvelles stratégies de synthèse sont étudiées. L'utilisation de la RX-10045, une molécule synthétique issue aussi de la RvE1, démontre une stabilité plus élevée que son prédécesseur avec actuellement une phase III dans l'indication du syndrome de l'œil sec [259,470]. Cependant cette molécule reste difficile d'utilisation puisqu'elle est sensible à la lumière, se dégrade rapidement à température ambiante avec une préparation et une stabilité fragile [258,471]. En comparaison, un anticorps de type IgG peut avoir une durée de vie jusqu'à 18-21 jours [472]. De plus la synthèse d'un anticorps, sa stabilité et son élimination sont avantageuses en comparaison aux lipides. D'autres stratégies utilisent des analogues de SPM, notamment des analogues de la RvE1 ou de la RvD1. Ces analogues miment les effets de leur substrat de référence mais ils possèdent une structure différente leur permettant d'être résistant à la dégradation enzymatique les inactivant. Cela permet donc d'avoir un produit plus stable et protéger contre une inactivation [150].

L'utilisation de SPM et d'analogues chimiques est donc de plus en plus utilisée pour contrer l'échec de la résolution de l'inflammation dans les maladies inflammatoires chroniques. Cet échec de résolution est principalement dû à un défaut d'apoptose des neutrophiles et de clairance du site inflammatoire par les macrophages. La stabilité des lipides ainsi que leur synthèse est un frein dans le développement de nouvelles thérapies, malgré les nombreuses découvertes sur l'échec de la résolution. Nous avons donc souhaité évaluer l'effet d'un anticorps agoniste ciblant le récepteur ChemR23 dans l'activation de la résolution de l'inflammation dans les MIC. Cette nouvelle stratégie est avantageuse puisque la synthèse et la stabilité d'un anticorps sont aujourd'hui bien connus et largement utilisée en clinique. Nous avons pu mettre en avant, et pour la première fois, que l'activation de la voie ChemR23 par un anticorps agoniste accélère la résolution dans des modèles de colite aiguë et enclenche une résolution dans des modèles de colite chronique dépourvus de résolution, effet qui n'a jamais

été démontré avec la RvE1. De plus, nous avons démontré que l'utilisation d'un anticorps anti-ChemR23 protège contre le développement de cancer colorectaux, un des principaux effets secondaires liés au MICI.

PERSPECTIVES

Nous avons donc mis en évidence que l'activation de la voie ChemR23 par un anticorps agoniste permet d'enclencher la résolution de l'inflammation dans des modèles d'inflammation de colite aiguë mais aussi chronique dépourvue de résolution. Cet effet biologique s'explique par l'inhibition de la transmigration des neutrophiles, l'augmentation de leur apoptose sur le site inflammatoire ainsi qu'une augmentation de l'efferocytose par les macrophages au travers de l'axe ChemR23/anticorps agoniste.

Désormais de nouvelles indications peuvent être envisagées. En effet, l'efficacité préclinique bénéfique d'une telle stratégie thérapeutique encourage les tests vers d'autres indications thérapeutiques où un défaut de résolution a été observé. Nous envisageons de caractériser l'effet biologique de notre anticorps dans un modèle *in vivo* de lupus érythémateux ainsi que dans un modèle d'arthrite au collagène représentant la PR. Les lupus étant défini par une augmentation de l'apoptose cellulaire et un échec d'efferocytose, ces défauts pourraient être contrés par notre anticorps en augmentant l'efferocytose ceci conduisant à la résolution de l'inflammation. La PR elle, démontre un défaut de synthèse de SPM (RvD3) et une accumulation de neutrophiles sur le site inflammatoire, l'activation de la voie ChemR23 permettrait d'induire l'apoptose de ces neutrophiles puis de nettoyer le tissu afin de retrouver un état d'homéostasie. D'autres pathologies telles que la NASH ou le diabète de type 2 sont aussi envisagées pour évaluer l'action de notre anticorps. En effet, ces deux indications présentent des défauts de résolution de l'inflammation avec une accumulation de neutrophiles et de macrophages pro-inflammatoires qui peuvent être rétablis à la suite du traitement par notre anticorps anti-ChemR23. En parallèle, l'effet thérapeutique de notre anticorps va être évalué en cancérologie. La RvE1 ayant déjà démontré jouer un rôle favorable dans le contexte tumoral en diminuant le développement de la tumeur, nous envisageons à notre tour, d'étudier l'action de notre anticorps dans des modèles de cancérologie. Nous souhaitons d'abord cibler des modèles tumoraux avec une infiltration forte en neutrophiles, afin de maximiser l'effet thérapeutique de notre anticorps. Pour cela, nous avons caractérisé, au sein du laboratoire OSE Immunotherapeutics, le modèle LLC (cancer du poumon) chez la souris et observé une forte infiltration de neutrophiles ainsi que la présence accrue de ChemR23, ce qui correspond parfaitement aux bonnes conditions pour étudier notre anticorps. De plus, il est décrit que les cancers mammaires détiennent aussi

une forte infiltration en neutrophiles, ce qui favoriserait l'action thérapeutique de notre anticorps en nettoyant le tissu inflammé et diminuant l'inflammation [464,465]. En parallèle, il serait intéressant d'étudier l'action de notre anticorps dans un modèle de cancer du foie, par exemple l'Hepa1.6. En effet, ce cancer est défini par une inflammation chronique préalable conduisant à un hépatocarcinome, avec la présence accrue de ROS et de cytokines pro-inflammatoires dans les premières étapes. L'activation de la voie ChemR23 par notre anticorps pourrait résoudre cette inflammation exacerbée et ainsi empêcher un cancer de se développer.

En parallèle de l'étude sur nos modèles *in vivo*, nous allons évaluer l'efficacité de notre anticorps en préclinique chez le macaque. Cette étude préclinique nous permettra de définir la pharmacologie, la toxicité et la pharmacocinétique de notre produit. De plus, cette étude permettra d'évaluer l'effet clinique de notre anticorps sur la neutropénie. En effet, notre anticorps étant capable d'induire l'apoptose des neutrophiles sur le site inflammatoire, il est primordial d'étudier son action sur les populations cellulaires en périphérie. De plus, nous souhaitons mettre en évidence les effets néfastes et les doses optimales et toxiques chez le primate ce qui nous permettra de trouver la meilleure dose biologiquement active. Afin d'étudier ces effets en phase pré-clinique, un lot pilote de notre anticorps, aussi appelé CMC (*Chemical, Manufacturing and Controls*) devra être produit. Ce lot pilote sera contrôlé par les règles de la GMP (*Good Manufacturing Practices*) alors que l'étude pré-clinique sera dirigée sous le cahier des charges de la GLP (*Good Laboratory Practices*). Ensuite, si cette étude préclinique est validée, une phase I sera envisagée. Cette phase I pourrait être évaluée chez des volontaires sains dans un modèle « d'ampoule » [473,474]. Ce modèle est notamment bien caractérisé pour l'étude de la résolution de l'inflammation. En effet, l'infiltration leucocytaire dans ce modèle est parfaitement étudiée et cela permettra d'évaluer l'effet biologique de notre anticorps en plus de la toxicité chez l'Homme. Si cette phase I est validée, une phase II puis III sera envisagée. Afin de mener au mieux ces phase II et III, la meilleure indication thérapeutique doit être choisie. Compte tenu de nos effets thérapeutique *in vivo* dans des modèles de colites, nous envisageons, au premier abord, d'étudier les effets cliniques chez des sujets atteints de maladie de Crohn où pour rappel, les patients présentent un fort déficit de la résolution de l'inflammation.

CONCLUSION

Actuellement 41 millions de personnes décèdent par an de maladies inflammatoires chroniques, dont 6 à 8 millions de personnes atteintes de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) [475,476]. Cette prévalence a notamment augmenté de 85 % entre 1990 et 2017. Toutefois, l'incidence de mortalité a diminué ces dernières années passant de 0,61/100 000 en 1990 à 0,51/100 000 en 2017 représentant 0,07 % de la mortalité globale des MIC [476]. Ceci s'explique, en partie, par la découverte de nouveaux traitements notamment les anti-TNF α et les anti-intégrines [392,404,477]. Néanmoins, 33 % de ces patients ne répondent pas aux anti-TNF α ou aux anti-intégrines demeurant alors dans une impasse thérapeutique [10,427]. De plus, 50 % des patients répondeurs acquièrent une résistance secondaire après 52 semaines de traitement, les laissant eux aussi dans une impasse thérapeutique. Il est donc nécessaire de mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Nous avons mis en évidence une nouvelle cible thérapeutique chez des patients atteints de MICI (RCH et MC) en démontrant une surexpression du récepteur ChemR3 chez les patients réfractaires aux anti-TNF ou au Védolizumab avant et après traitement. Cette surexpression du récepteur ChemR23 est associée à une augmentation de la signature des neutrophiles et des macrophages pro-inflammatoires. Ceci suggère un échec de résolution de l'inflammation dans ces pathologies, qui serait donc une bonne cible thérapeutique par notre anticorps anti-ChemR23.

Compte tenu de l'efficacité préclinique de la Résolvine E1 dans des modèles de colite aiguë, nous avons évalué le potentiel thérapeutique d'un anticorps agoniste de ChemR23 dans ces mêmes indications. Nous avons, tout d'abord, mis en avant que l'activation de la voie ChemR23 par notre anticorps permet d'accélérer la phase de résolution de l'inflammation dans deux modèles de colite aiguë induite en accélérant la récupération du poids initial ainsi que la consistance des selles et en réduisant la rétractation du côlon reflétant l'effet pro-résolutif de notre anticorps sur ces modèles. De plus, nous avons évalué son potentiel thérapeutique dans un modèle utilisé comme modèle de référence pour étudier la résolution de l'inflammation, le modèle d'air-pouch. Dans ce modèle, nous avons identifié une accélération de la clairance du site inflammatoire, avec une diminution du nombre de neutrophiles associée à une augmentation du pourcentage de mortalité des neutrophiles. Nous avons également observé que

l'amplitude de l'inflammation est identique entre les souris contrôles et les souris ayant reçu l'injection de l'anticorps anti-ChemR23, suggérant que ce traitement n'agit pas comme un anti-inflammatoire mais bien comme un pro-résolutif.

Nous avons donc, par la suite, caractérisé le mode d'action de notre anticorps. Etant donné les effets pro-résolutifs de la RvE1 au travers ChemR23, nous avons évalué l'effet de notre anticorps sur les mêmes effets biologiques. Nous avons mis en évidence que notre anticorps permet d'activer les mêmes voies de signalisation que la RvE1 (ERK et Akt) en induisant les 3 mécanismes de la résolution de l'inflammation : 1) diminuer l'infiltration leucocytaire, 2) induire l'apoptose des neutrophiles et 3) augmenter l'efferocytose. De plus, nous avons observé une augmentation de la sécrétion des ROS par les neutrophiles suggérant un mode d'action supplémentaire de notre anticorps. Nous avons donc mis en évidence que notre anticorps active tous les mécanismes de la résolution de l'inflammation et permet de résoudre l'inflammation

Par la suite, nous avons testé le potentiel thérapeutique de notre anticorps dans des modèles de colites chroniques dépourvus de résolution, pour lesquels l'axe de ChemR23 n'a jamais été étudié auparavant. Nous avons observé une protection contre la chronicité de la pathologie lorsque les souris sont traitées avec un anticorps agoniste de ChemR23 en curatif dans deux modèles de colites chroniques, l'IL10-KO et le Rag1KO. Cette protection est associée à une diminution de l'infiltrat des LT et des neutrophiles dans le côlon. Cependant, cet effet reste restreint au site inflammatoire puisque nous avons observé que les populations ciblées par notre anticorps n'expriment ChemR23 que sur le site inflammatoire et ne sont pas affectées dans les organes lymphoïdes secondaires où elles sont présentes.

Les MICI semblent donc être de bonnes cibles thérapeutiques puisqu'ils présentent un défaut de résolution de l'inflammation associée à une surexpression d'une nouvelle cible thérapeutique, ChemR23. Ce récepteur de la résolution est non seulement présent/exprimé sur le site inflammatoire mais est également associé à un échec des thérapies conventionnelles le rendant attractif comme nouvelle cible thérapeutique très prometteuse.

ANNEXES

Annexe 1: Brevet 1: CMKLR1 agonists having a resolvins-like capability and their therapeutic applications

CMKLR1 AGONISTS HAVING A RESOLVINS E1-LIKE CAPABILITY AND THEIR THERAPEUTIC APPLICATION

Field of the invention

- [1] The invention pertains to the field of immunotherapy. The present invention provides anti-chemerin receptor antibodies which have a resolvin E1-like agonist activity on chemokine like receptor-1 (CMKLR1 or ChemR23), for use in the resolution of an inflammation in particular occurring during cancer, an autoimmune disease, an infection, a chronic inflammatory disease, a chronic infection or sepsis, by sustaining or initiating the resolution phase of inflammation.

Background of the invention

- [2] The critical role of inflammatory processes in health and diseases has long been recognized. The detailed molecular mechanisms and biological events that regulate the progression and the resolution of inflammation remain of critical interest. Recent investigations have provided strong evidence that the resolution of inflammation is not a passive process, as believed earlier. Resolution of the inflammation is instead a biosynthetically active process, regulated by biochemical mediators and receptors-signaling pathways. Resolution is therefore driven by specialized pro-resolving mediators. Inflammation is a physiological mechanism that occurs during an infection, an injury or a traumatism. Inflammation is inevitable and usually salutary, and its response is orchestrated by a delicate balance between positive and negative feedback loops. The inflammation is usually divided in 3 steps: initiation, amplification and resolution.
- [3] The resolution process which allows the ending of the inflammatory response is a complex process involving the sequential and chronological engagement of cellular (e.g. granulocytes or macrophages) and chemical (e.g. cytokines or specialized pro-solving mediators or factors) effectors.
- [4] Chemokine-like receptor 1 (CMKLR1), also known as ChemR23, and chemokine receptor-like 2 (CCRL2) are 7-transmembrane receptors identified by their homology to known G-protein-coupled receptors (AJ Kennedy and AP Davenport, 2018). The Chemokine-like Receptor 1 (CMKLR1; also named Dez in Murine animals), is an orphan G protein–coupled receptor related to GPR-1 (38% overall amino acid identity), C3a receptor (38%), C5a anaphylatoxin receptor (36%) and formyl Met-Leu-Phe receptors (35%). CMKLR1 is more distantly related to the chemokine receptors subfamily (Samson et al., 1998). CMKLR1 is expressed on

monocytes, on macrophages, on dendritic cells, and NK on cells, as well as on adipocytes and endothelial cells. At least two ligands have been identified. The first ligand is the protein Chemerin, which is a chemoattractant protein exerting a stimulation of dendritic cells and macrophages to the site of inflammation.

- [5] The second ligand of CMKLR1 is the lipid mediator Resolvin E1 (RvE1 - Formal Name: 5S,12R,18R-trihydroxy-6Z,8E,10E,14Z,16E-eicosapentaenoic acid; CAS Number: 552830-51-0) that belongs to the Resolvin family. The anti-inflammatory lipid mediator Resolvin E1 inhibits leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression.
- [6] Initially, the interest in the chemerin system (*i.e.* the signaling pathway(s) activated or not by Chemerin receptors by their ligands like Chemerin and Resolvin) was focused on its role in inflammation and chemotaxis of immune cells following its discovery in psoriasis disease. Most recently, in connection with its role in inflammation, in obesity, metabolic syndrome, its potential role in association with cardiovascular functions has been considered, as well as role in reproductive biology. Therefore, the chemerin system is of major interest for its role in the inflammation process, in particular for its role in the resolution of the inflammation. A number of diseases are related to delay or disruption of the resolution process. Most of the specialized pro-resolving factor mediators currently known are derived from polyunsaturated fatty acids, including lipoxins, the resolving family, including E-series resolvins and D-series resolvins, protectins, and maresins. Nonetheless, pro-resolving molecules are difficult to synthesize because of their lipidic nature. Production of pro-resolving molecules in sufficient quantities, for a clinical trial for example, is a burden, and very few SPM have gone through efficient production. Besides that, antibodies specifically targeting G-protein-coupled receptors are difficult to produce. There is therefore a need for molecules having the capability to take part, in particular to initiate or enhance the resolution stage of the inflammatory response like pro-resolving factors.
- [7] A number of diseases are related to delay or disruption of the resolution process.. There is therefore a need for molecules having the capability to take part, in particular to initiate or enhance the resolution stage of the inflammatory response like pro-resolving factors.
- [8] The present inventors showed for the first time that the use of an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability induces positive effects towards the

resolution of the inflammation. As illustrated in the present description of the invention, the CMKLR1-agonist compound of the invention exerts various effects in myeloid cells, leading to initiation and/or progression of the resolution stage of an inflammatory process. In the following description, without any contrary mention, agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability may be identified as the or a “agonist”; both terms include an antibody or antigen-bind fragment thereof (also reference anti-CMKLR1 antibody), a protein, a peptide or a polypeptide; the term compound or anti-CMKLR1 compound may also be used in the following description as a synonym of “agonist” (of the invention), thereby including an antibody or antigen-bind fragment thereof (also reference anti-CMKLR1 antibody), a protein, a peptide or a polypeptide. Among the effects provided by the use of such an agonist, the following particular effects have been demonstrated:

- an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability induces the apoptosis of polymorphonuclear neutrophils (also simply referenced neutrophils, PMN or PMNs herein), and/or the decrease or the inhibition of the migration capability of these cells, in particular through the inhibition of their capacity of transmigration through endothelium towards the site of inflammation as described later in the application
- an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability induces the internalization of different receptors expressed on the cell surface on various myeloid cells, notably macrophages and/or dendritic cells, thereby enhancing the processes which induce or sustain the resolution of the inflammation as described later in the application;
- in particular an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability induces the internalization of different receptors CMKLR1, and CXCR4 and/or CCR7 expressed on the cell surface of macrophages and/or dendritic cells, such internalization leading to the much lower targeting and recognition of the CXCR4, CCR7 receptors by cytokines known to induce the migration of the cells in direction to the site of inflammation, and as a consequence leading to the decrease or inhibition of the migration of macrophages and/or dendritic cells from the site of inflammation to secondary lymphoid organs and/or towards the site of inflammation;
- An agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability decreases or inhibits the capability of neutrophils and macrophages and/or dendritic cells to migrate; in particular, it decreases or inhibits the ability of neutrophils to transmigrate through

the site of inflammation by lowering the rolling capability of these cells due to the internalization and/or the decrease of cell surface expression of CD62L, reducing their ability to transmigrate through the endothelium;

- In a particular aspect of the invention, the inventors demonstrated that agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability comprising a domain suitable for interaction with a Fc receptor, like IgG constant domain, in particular IgG1 constant domain, are particularly efficient. The Fc Receptors of macrophages or neutrophils recognize particularly very efficiently the Fc fragment of the anti-CMKLR1 IgG-constant domain, or IgG1 constant domain, leading or contributing to the apoptosis of the neutrophils recognized by the anti-CMKLR1 IgG1-antibodies
- The inventors herein demonstrate that myeloid cells which are involved in the inflammation process (*i.e.* which sustain inflammation) and which express CMKLR1, and CXCR4 and/or CCR7, are particularly suitable targets for an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability, for the treatment of a pathological inflammation process.

[9] Therefore, agonists of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability represent a useful therapeutic tool to enhance or sustain the resolution of the inflammation, and/or inhibit negative effects of an inflammation, in particular in chronic inflammation. Some chemical agents have proven their pro-resolutive effect on acute inflammation but none of them is able to positively induce or sustain the resolution of a chronic inflammation.

Summary of the invention

[10] The invention relates to an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability for use in the therapeutic treatment of an inflammatory condition in a patient, in particular an inflammatory condition wherein the resolution phase of the inflammation is delayed or disrupted, in particular in a chronic inflammation, in particular said agonist being selected from the group consisting of an antibody or antigen-binding fragment thereof, a peptide, a polypeptide and a protein.

[11] In a first aspect, the invention relates to an agonist of anti-Chemerin Like Receptor 1 (CMKLR1) having a Resolvin E1-like capability, for use in the treatment of a patient suffering from an inflammatory condition, in particular an inflammatory condition wherein the resolution of inflammation is delayed or disrupted, wherein

the agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability is selected from the group consisting of an antibody or antigen-binding fragment thereof, a peptide, a polypeptide and a protein, and wherein the agonist :

- induces or activates the apoptosis of neutrophils at the site of inflammation, and/or
- inhibits or decreases the transmigration capability of neutrophils through endothelium towards the site of inflammation, and/or
- inhibits the migration of macrophages and/or of dendritic cells from the site of inflammation to secondary lymphoid organs and/or towards the site of inflammation. The invention relates to the use of an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability, like an antibody, in particular a humanized antibody, or antigen-binding fragment thereof, to induce or enhance or activate the apoptosis of neutrophils, in the treatment of an inflammatory condition, in particular an inflammatory condition wherein the resolution of inflammation is delayed or disrupted.

[12] In a second aspect, the invention relates to an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability in particular an antibody or a humanized antibody, or antigen-binding fragment thereof, for use in the treatment of an inflammatory condition, in particular an inflammatory condition wherein the resolution of inflammation is delayed or disrupted, wherein the condition may be improved or prevented by reducing or inhibiting the transmigration capability of neutrophils to a site of inflammation.

[13] The invention relates to the use of an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability, in particular an antibody or a humanized antibody, or antigen-binding fragment thereof, to reduce or inhibit the transmigration capability of neutrophils to a site of inflammation, for the treatment of an inflammatory condition, in particular an inflammatory condition wherein the resolution of inflammation is delayed or disrupted.

[14] In a particular aspect, the invention relates to an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability, in particular an antibody or a humanized antibody, or antigen-binding fragment thereof, to reduce or inhibit the capability of macrophages to migrate from a site of inflammation to secondary lymphoid organs, for use in the treatment of an inflammatory condition, in particular an inflammatory condition wherein the resolution of inflammation is delayed or disrupted.

- [15] In a particular aspect, the invention relates to an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability, in particular an antibody or humanized antibody, or antigen-binding fragment thereof, for use in the treatment of an inflammatory condition, in particular an inflammatory condition wherein the resolution of inflammation is delayed or disrupted, wherein the condition may be improved by decreasing the cell surface expression of CMKLR1 and CXCR4 and/or CCR7. In a particular embodiment, the cell surface expression is considered on macrophages and/or dendritic cells.
- [16] In a particular aspect, the invention relates to an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability, in particular an antibody or a humanized antibody, or antigen-binding fragment thereof, to decrease the cell surface expression of CMKLR1, and CXCR4 and/or CCR7, for use in the treatment of an inflammatory condition, in particular an inflammatory condition wherein the resolution of inflammation is delayed or disrupted. In a particular embodiment, the cell surface expression is considered on macrophages and/or dendritic cells.
- [17] In a particular aspect, the invention relates to an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability y, in particular an antibody or a humanized antibody, or antigen-binding fragment thereof, for use in the treatment of an inflammatory condition, in particular an inflammatory condition wherein the resolution of inflammation is delayed or disrupted, wherein the condition may be improved by inducing the internalization of CMKLR1, and CXCR4 and/or CCR7. In a particular embodiment, the internalization is considered on macrophages and/or dendritic cells.
- [18] In a particular aspect, the invention relates to the use of an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability, in particular an antibody or a humanized antibody, or antigen-binding fragment thereof, to induce the internalization of CMKLR1, and CXCR4 and/or CCR7, for use in the treatment of an inflammatory condition, in particular an inflammatory condition wherein the resolution of inflammation is delayed or disrupted. In a particular embodiment, the internalization is considered on macrophages and/or dendritic cells.
- [19] In a particular aspect, the invention relates to an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability, in particular an antibody or a humanized antibody, or antigen-binding fragment thereof, for use in the treatment of an inflammatory condition, in particular an inflammatory condition wherein the resolution of

inflammation is delayed or disrupted, wherein the condition may be improved by decreasing the cell surface expression/recognition of CD62L. In a particular embodiment, the cell surface expression is considered on neutrophils.

[20] In a particular aspect, the invention relates to an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability, in particular an antibody or a humanized antibody, or antigen-binding fragment thereof, to decrease the cell surface expression/recognition of CD62L, for use in the treatment of an inflammatory condition, in particular an inflammatory condition wherein the resolution of inflammation is delayed or disrupted. In a particular embodiment, the cell surface expression is considered on neutrophils.

[21] In a particular aspect, the invention relates to an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability, in particular an antibody or a humanized antibody, or antigen-binding fragment thereof, for use in the treatment of an inflammatory condition, in particular an inflammatory condition wherein the resolution of inflammation is delayed or disrupted, wherein the condition may be improved by inducing the internalization/or shedding of CD62L. In a particular embodiment, the internalization and/or shedding is considered on neutrophils.

[22] In a more particular embodiment, the agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability is an antibody which is or is issued or is derived from a human IgG1 isotype.

[23] In a particular aspect, the invention relates to an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability, in particular an antibody or a humanized antibody, or antigen-binding fragment thereof, to induce the internalization of CD62L, for use in the treatment of an inflammatory condition, in particular an inflammatory condition wherein the resolution of inflammation is delayed or disrupted. In a particular embodiment, the internalization is considered on neutrophils. In a more particular embodiment, the agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability is an antibody which is or is issued or is derived from a human IgG1 isotype.

[24] In a particular aspect, the invention also relates to a method for treating an inflammatory condition, in particular an inflammatory condition wherein the resolution of inflammation is delayed or disrupted by administering an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability.

[25] In a particular aspect, the invention relates to a method for treating an inflammatory condition, in particular an inflammatory condition wherein the

resolution of inflammation is delayed or disrupted, by inducing or enhancing or activating the apoptosis of neutrophils by administering an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability.

[26] In a particular aspect, the invention relates to a method for treating an inflammatory condition, in particular an inflammatory condition wherein the resolution of inflammation is delayed or disrupted, by reducing or inhibiting the transmigration capability of neutrophils to a site of inflammation by administering an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability.

[27] In a particular aspect, the invention relates to a method for treating an inflammatory condition, in particular an inflammatory condition wherein the resolution of inflammation is delayed or disrupted, by inducing the internalization and/or decrease of CMKLR1 and CXCR4 and/or CCR7 by administering an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability. In a more particular embodiment, the internalization/decrease is considered on macrophages.

[28] In a particular embodiment of the invention, the CMKLR1 is a human CMKLR1, which corresponds to NCBI Protein accession number Q99788.2.

Detailed description of the invention

[29] The invention concerns an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability, like but not limited to an antibody, for use in the treatment of a pathological condition wherein inflammation is concerned. In the following description, an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability is an anti-CMKLR1 antibody, or antigen-binding fragment thereof, peptide, polypeptide or protein which binds to CMKLR1 (also known as Chemerin Like Receptor 1 or ChemR23) and has an agonist capability as compared to the binding of Resolvin E1 to CMKLR1; *i.e.* the agonist has an effect on CMKLR1-positive cells comparable to at least one effect provided by the binding on these cells of resolvin E1. In particular embodiment, the compound may be considered as an anti-CMKLR1 agonist having a Resolvin E1-like capability when the G-protein signaling pathway is activated in CMKLR1-positive cells stimulated with the agonist of the invention, and in a more particular embodiment, also when the B-arrestin pathway is not activated, and in particular conditions, the B-arrestin pathway is inhibited. In

particular, the invention concerns an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability for use in the treatment of a pathological condition wherein the resolution of the inflammation is delayed or disrupted. "A delay or a disruption in the resolution of an inflammatory condition" occurs when the resolution of inflammation is delayed or disrupted as compared to a normal resolution (i.e. the resolution occurring in a patient who experiences normal resolution after an inflammatory event). A resolution delay or defect can result in an increased penetration of granulocytes at the inflammatory site. Hence, a resolution delay or defect may be assessed by quantification of granulocytes at the inflammatory site. Granulocyte population may be measured for example by histology, cytometry or indirect biochemical techniques such as elastase quantification by enzyme immunoassay or molecular quantification by PCR of granulocyte receptor 1). A resolution delay or defect may also be assessed by the determination of a delay in the apoptosis of granulocytes, measured for example by cytology using specific antibodies against annexin 5. A defect or a delay in the resolution of the inflammation may also be determined by assessing by quantifying the synthesis of pro-inflammatory cytokines such as TNF-alpha, IL8 or IL12 and anti-inflammatory cytokines such as IL-10. Cytokine secretion may be assessed by enzyme immunoassay or by PCR. A defect or a delay in the resolution of the inflammation may also be determined by assessing the activation of transcription factors involved in the synthesis of inflammatory cytokines, such as NF-kappaB which can be measured for example by nuclear translocation or by Western blot and/or by quantification of the level of degradation of IkappaB). A defect or a delay in the resolution of the inflammation may also be determined by quantifying specialized pro-resolving mediators (such as lipoxins, resolvins, protectins or maresins) or their precursors (like 17-HDOHE or 14-HDOHE) by mass spectrometry or enzyme immunoassay. A defect or a delay of the resolution then results in a defect of the synthesis of one or more of these mediators. A resolution defect or delay can also be determined when expression of the receptors of the resolution molecules is decreased. These receptors may be selected from the group comprising ALX, CMK1R1, GPR32 or GPR18. Alternatively or complementarily, the internalization and processing of those receptors into the cytoplasm may also be assessed. Alternatively or complementarily, expression of some receptors of inflammatory cytokines or lipids may also be assessed, an overexpression compared to a normal condition being significant of a delay or a

defect in the resolution of the inflammation. These conditions may be measured by histology, cytology or PCR. The resolution defect can also result in a decreased or inhibited switch of proinflammatory to proresolutive macrophages, a damage in phagocytosis or efferocytosis of the same cells. Hence, a delay or a defect of the resolution may be assessed by analyzing the switch of proinflammatory to proresolutive macrophages in a particular condition as compared to a normal condition, as exemplified in the examples of the present invention.

[30] In a preferred embodiment of the invention, the agonist is an antibody, or an antigen-binding fragment thereof.

[31] An “agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability” may also be defined as an antibody or antigen-binding fragment thereof, a peptide, a polypeptide or protein, able to bind CMKLR1, and thereby able to induce the phosphorylation of the Akt and/or Erk protein(s), as compared to a control antibody. A control antibody may be an antibody which does not specifically bind CMKLR1. Human CMKLR1 corresponds to the amino acid sequence of SEQ ID No. 1.

[32] Phosphorylation of a protein may be determined according to methods well known by the skilled artisan, for example by the method disclosed in the examples of the present description. In a particular embodiment, a compound of the invention is a RvE1-like agonist, i.e. a compound of the invention is an agonist of CMKLR1 signaling pathway induced by RvE1. In other words, the anti-CMKLR1 compound of the invention is an agonist of the interaction between RvE1 and CMKLR1, in particular between human RvE1 and human CMKLR1. In a particular embodiment, the compound of the invention enhances activation of the G protein pathway induced by CMKLR1. In another embodiment, the compound of the invention does not induce the activation of the β -arrestin pathway induced by CMKLR1. In another embodiment, the compound of the invention inhibits the β -arrestin pathway induced by CMKLR1. In another embodiment, since a compound of the invention induces at least one agonist effect of the binding of RvE1 to CMKLR1, and since RvE1 is a pro-resolution factor or pro-resolution mediator, a compound of the invention is a pro-resolution factor or a pro-resolution mediator.

[33] As a result of binding and activation of the receptor to produce a biological response, the compounds of the invention may lead to the activation of the G protein signaling pathway, in particular $G\alpha_i$ signaling pathway and/or $G\alpha_o$, without activating the β -arrestin pathway, in particular the compound of the invention may

lead to the inhibition of the β -arrestin pathway. In particular, the binding of a compound according to the invention induces the activation of Akt and/or Erk protein(s) *in vitro* and/or *in vivo*, in particular in myeloid cells, and more particularly in macrophages. The antibody is able to induce the phosphorylation of the Akt and/or Erk protein(s), as compared to a control antibody. Phosphorylation of a protein may be determined according to methods well known by the skilled artisan. In other words, a Resolvin-E1 like agonist antibody may be defined as an antibody able to bind CMKLR1, and thereby able to induce the phosphorylation of the Akt and/or Erk protein(s), as compared to a control antibody. A control antibody may be an antibody which does not specifically bind CMKLR1.

[34] In a preferred embodiment of the invention, the agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability binds specifically to the third extra loop of CMKLR1 which corresponds to the amino acid sequence of SEQ ID No. 2, and more particularly to an epitope localized within the third extra-loop of CMKLR1, in particular to an epitope located within amino acid residue sequences set forth in SEQ ID No: 2 or consisting of SEQ ID No: 3 or consisting of SEQ ID No. 4. An anti-CMKLR1 compound binding within this particular region of CMKLR1 may have an agonist property on CMKLR1, thereby mimicking the binding of RvE1 to CMKLR1.

[35] It should be noted that, on the contrary to a resolvin mimetic, the provision of an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability as defined herein provides an interesting pharmacokinetic profile, as well as a long-lasting effects due its better half-life, which is advantageous when the condition to be treated is related to a chronic inflammatory condition.

[36] In some embodiments, the antibody is a humanized antibody, in particular a humanized monoclonal antibody. As used herein, "humanized" describes antibodies issued from non-human species whose protein sequences have been modified to increase their identity to antibody variants produced naturally in human. Accordingly having been originally obtained in animals, especially in rodents and in particular in rats, following immunization of animals and production of antibodies, particularly monoclonal antibodies from hybridoma, the antibodies are then modified in their VH and/or VL sequences by substitution of amino acid residues, in the framework and optionally in addition in the CDR sequences to obtain humanized antibodies. Particularly, said humanized antibody has less than 10% of mutated amino acid residues, preferably one or no mutated amino acid residue, in

individually considered CDR regions with respect to the original CDRs regions. Methods of humanization include, but are not limited to, those described in U.S. Pat. Nos. 4,816,567, 5,225,539, 5,585,089, 5,693,761, 5,693,762 and 5,859,205.

[37] In some embodiments, the antibody is a fully human antibody, in particular a fully human monoclonal antibody. Fully human monoclonal antibodies also can be prepared by immunizing mice transgenic for large portions of human immunoglobulin heavy and light chain loci. See, e.g., U.S. Pat. Nos. 5,591,669, 5,598,369, 5,545,806, 5,545,807, 6,150,584, and references cited therein. These animals have been genetically modified such that there is a functional deletion in the production of endogenous (e.g., murine) antibodies. The animals are further modified to contain all or a portion of the human germ-line immunoglobulin gene locus such that immunization of these animals will result in the production of fully human antibodies to the antigen of interest. Following immunization of these mice (e.g., XenoMouse(Abgenix), HuMAb mice (Medarex/GenPharm)), monoclonal antibodies can be prepared according to standard hybridoma technology. These monoclonal antibodies will have human immunoglobulin amino acid sequences and therefore will not provoke human anti-mouse antibody (KAMA) responses when administered to humans. In vitro methods also exist for producing human antibodies. These include phage display technology (U.S. Pat. Nos. 5,565,332 and 5,573,905) and in vitro stimulation of human B cells (U.S. Pat. Nos. 5,229,275 and 5,567,610).

[38] In a particular embodiment, a compound of the invention does not interfere with the binding of Chemerin to CMKLR1. Chemerin is one of the natural ligand of CMKLR1. In other words, a compound according to the invention is not an agonist nor an antagonist of the interaction between Chemerin and CMKLR1.

[39] The various antibody molecules and fragments may derive from any of the commonly known immunoglobulin classes (isotypes), including but not limited to IgA, secretory IgA, IgE, IgG and IgM. IgG subclasses are also well known to those in the art and include but are not limited to human IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4.

[40] The inventors assessed the effect of an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability in different myeloid cells and demonstrated for the first time that the use of such agonist compound increases the apoptosis of polymorphonuclear neutrophils, referenced herein under the acronym PMN or PMNs, on the inflammation site. PMN cells are a category of blood cells known to contribute to

the inflammatory response. Neutrophils are usually located at the site of inflammation and their presence sustain the inflammatory process, thereby preventing the resolution of the inflammation to be initiated or to be actively sustained, which may lead to chronic inflammation. Neutrophils are the most abundant cell type involved in the innate immune response. They are rapidly recruited to sites of injury or infection where they engulf and kill invading microorganisms. Neutrophil apoptosis, the process of programmed cell death that prevents the release of neutrophil histotoxic contents, is tightly regulated and limits the destructive capacity of neutrophil products to surrounding tissue. The induction of apoptosis of neutrophil itself exerts an anti-inflammatory effect through modulation of surrounding cell responses, particularly macrophage phagocytosis. The regulation of apoptosis of neutrophils is crucial for therapeutic intervention in inflammatory related-diseases. As illustrated in the examples of the invention, the use of an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability on PMNs induces a strong apoptosis of neutrophils, as compared to a control compound, like an antibody, during the inflammation induction. The use of an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability may therefore lead to reduce the adverse effects of inflammation, especially when its resolution is delayed or disrupted. It should be noted that, in a particular embodiment of the invention, the effect on the apoptosis of neutrophils is not accompanied by any other irreversible negative effect on immune cells, in particular on immune cells not located on the site of inflammation. Except the induced apoptosis of neutrophils on the site of inflammation, a treatment with the compound of the invention does not lead to the apoptosis of all neutrophil population. This feature may be very advantageous to reduce side-effect(s) of a therapy with the compounds described herein. The effect on neutrophils apoptosis may therefore be limited, *i.e.* the apoptosis of neutrophils may be limited to a portion of the overall population of neutrophils, thereby limiting the side effects associated with depletion of neutrophils, but having a sufficient effect to induce or sustain the resolution of the inflammation. Accordingly, in a preferred embodiment of the invention, the agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability induces a limited apoptosis of neutrophils, as compared to a control, between 20% and 60% of the overall number of neutrophils on the site of inflammation is induced into apoptosis.

[41] The apoptosis of neutrophils may be assessed according to the method described in the examples of the invention. It may be considered that apoptosis of neutrophils is enhanced or activated when the number of neutrophils at the site of inflammation is lower when the agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability is administered to the neutrophils, as compared to a negative control antibody. In a more particular embodiment, it may be considered that apoptosis of neutrophils is enhanced or activated when the percentage of dead neutrophils on the inflammation site is at least 20% higher, more particular at least 40% higher after 24 hours when the agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability is administered to the neutrophils, as compared to a negative control antibody.

[42] In a particular embodiment of the invention, the agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability enhances the cleavage of the active form of caspase-3 in neutrophils, thereby leading to caspase-3 dependent apoptosis. The inventors indeed found that the agonists of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability have a positive effect on the apoptosis of neutrophils through the activation of caspase-3 (e.g. by enhancing the cleavage of the active form of caspase-3). It may be considered that apoptosis is enhanced or induced when the expression of caspase-3 is over 1-log, more preferably 2-log, and most preferably 3-log, after 11 hours of treatment with an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability as compared to a negative control. In a particular embodiment, more than 50% of neutrophils are depleted when a agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability is in contact with neutrophils after 24 hours of treatment, as compared to control antibodies or non-humanized anti-CMKLR1 antibody of the prior art. Apoptosis of neutrophils induced by agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability is also illustrated by the rise of the reactive oxygen species (ROS) in neutrophils treated with the antibody. Rise of ROS is known to have a role in apoptosis. Induced or enhanced apoptosis of neutrophils may be considered positive when, in a define sample, the ROS positive cells is over 10% after 5 hours of treatment with an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability. The method for determining the ROS positive cells may be performed by methods known in the art, like but not limited to the one described in the examples of the present invention.

[43] The inventors also examined the effect of an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability on the migration and transmigration of neutrophils.

Migration is the capability of neutrophils to reach the site of inflammation. Transmigration is the capability of neutrophils to migrate towards the site of inflammation through the endothelium.

[44] Neutrophils migrate after recruitment to the inflammatory site, thereby initiating, enhancing and/or sustaining the inflammatory process, and prevent the initiation of the resolution process. The agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability have the capability to reduce or inhibit the capability of neutrophils to migrate to the site of inflammation. The agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability have the capability to reduce or inhibit of PMNs towards the site of inflammation, through endothelium. When neutrophils are in contact with an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability, their transmigration capability and/or migration capability is greatly reduced, preventing them to relocate to the site of inflammation, and exert their pro-inflammatory effects. The regulation of neutrophils migration into inflamed tissue or infected tissue may be useful to effectively treat these conditions. The inhibition of this migration capability for treating inflammatory diseases, like but not limited to chronic inflammatory diseases, is a leverage for reducing negative effects of inflammation or infection.

[45] In a particular embodiment of the invention, the migration and transmigration of neutrophils towards the site of inflammation is prevented or reduced by the administration of an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability which comprises a humanized protein able to interact with Fc Receptors found on the surface of certain cells (including, among others, B lymphocytes, follicular dendritic cells, natural killer cells, macrophages, neutrophils, eosinophils, basophils, human platelets, and mast cells) in particular neutrophil or dendritic cells that contribute to the protective functions of the immune system. These receptors interact with the IgG portion of antibodies. IgG domains, like IgG, IgE, IgA and IgM. In a particular embodiment of the invention the agonist comprises at least a portion of an IgG domain, more particularly a IgG domain, and most particularly a IgG1 domain, or a humanized IgG1 domain. Therefore, in a particular embodiment, the agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability is a humanized antibody with human constant regions derived or issued from human IgG1. In a particular embodiment, the agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability antibody is of the human IgG1 isotype, *i.e.* the constant fragment of the heavy chain and of the light chain are derived or issued from a human IgG1 antibody constant heavy chain and

light chain fragment. Accordingly, the agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability antibody of the present invention comprises a Fc domain of IgG isotype, more particularly of human IgG1 isotype.

[46] As illustrated in the working examples of the invention, the inventor found that when the agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability is an antibody which comprises a Fc domain of human IgG1, it may interact with FcReceptor (FcR) expressed on the cell surface of macrophages and neutrophils along with its interaction with CMKLR1. This double interaction leads to lower the cell membrane availability (through internalization and/or shedding) of L-selectin, also known as CD62L, a cell adhesion molecule found on neutrophils, thereby reducing the migration and transmigration capability of neutrophils treated with an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability antibody. Indeed, the reduction of CD62L availability on the cell surface of neutrophils reduces the rolling capability of these cells on the endothelium; these cells have therefore a reduced capability to transmigrate through the endothelium. It may be considered that a neutrophil has a reduced migration and/or transmigration capability when the cell surface expression of CD62L is reduced by at least 1-log in a staining experiment, as compared to a negative control. The staining of CD62L may be performed by methods known in the art, like but not limited to the method illustrated in the examples of the invention.

[47] In a particular embodiment of the invention, the variable regions of the antibody may be associated with antibody constant regions, like IgG1, IgG2, IgG3 or IgG4 constant regions. These constant regions may be further mutated or modified, by methods known in the art, for modifying their binding capability towards Fc receptor. In a particular embodiment, the antibody or antigen-binding fragment thereof according to the invention is a humanized monoclonal antibody, in particular wherein the antibody light chain constant domain is derived from a human kappa light chain constant domain, in particular wherein the light chain constant domain comprises or consists of the sequence of SEQ ID No: 9, and wherein the antibody heavy chain constant domain is derived from a human IgG1, IgG2, IgG3, or IgG4 heavy chain constant domain, in particular wherein the antibody heavy chain constant domain comprises or consists of the amino acid sequence of SEQ ID 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13 or SEQ ID No. 14, in particular from a human IgG1 heavy chain constant domain, in particular wherein the antibody

heavy chain constant domain comprises or consists of the amino acid sequence of SEQ ID No:10 or SEQ ID No. 13.

[48] The agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability induces internalization, or reduction, of cell surface expression of CD62L, and may therefore contribute to increase efficiency of the agonist when it is an antibody with a IgG domain. Disclosed herein is antibody compound representing a preferred embodiment, wherein in the presence of the agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability, the cell surface expression of CD62L, and preferably of CD62L and CMKLR1, is significantly decreased. As used herein, a compound which induces the internalization and/or shedding of CD62L, and preferably of CD62L and CMKLR1 means that cells, in particular neutrophils, incubated in the presence of a compound of the invention display decreased cell surface expression of CD62L, and preferably of CD62L and CMKLR1 as compared to cells incubated in the absence of the compound of the invention. Cell surface expression is preferably measured *in vitro* after a limited incubation time and in temperature conditions as mentioned in the examples of the invention. In a preferred embodiment, the compound of the invention does induce the internalization and/or shedding of CD62L, and preferably of CD62L and CMKLR1. Thus, the cell surface expression of CD62L, and preferably of CD62L and CMKLR1 in cells incubated in the presence of the compound of the invention is reduced, or is significantly reduced, relatively to cell surface expression in cells incubated in otherwise identical conditions, but in the absence of the agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability. In particular embodiments, when incubated at 37 °C for 30 to 45 minutes in the presence of 10 µg/mL of the agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability, the level of CD62L, and preferably of CD62L and CMKLR1 cell surface expression is lower than 80 %, preferably lesser than 60%, and most preferably lesser than 50 %, of its level in cells incubated in the absence of the agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability.

[49] In a surprising manner, the inventors found that humanized IgG1 antibodies of the invention that are agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability do not induce cytotoxicity *in vivo*. In a preferred embodiment, such antibody does not induce cytotoxicity since no decrease in CMKLR1-positive cells is observed after administration of the compound of the invention. The use of an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability that is a humanized IgG1 antibody may not

exhibit a cytotoxic activity on CMKLR1-positive cells. The inventors illustrated that the treatment of an inflammatory condition with a IgG1 antibody of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability does not deplete CMKLR1+ cells, including myeloid cells, despite the known adverse effect usually associated with IgG1 derived antibody.

[50] According to this embodiment, there is no depletion of myeloid cells, in particular neutrophils and macrophages, in patients/animals treated with IgG1 antibody agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability humanized.

[51] In another particular embodiment of the invention, the agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability favors the concentration of macrophages at a site of inflammation. Macrophages are known to help the restoration of tissue function after injury, highlighting their important role in the modification of the local microenvironment of the inflammation site to restore homeostasis. The agonist compound (e.g. the antibody or antigen-binding fragment thereof, a protein, a peptide or a polypeptide) may increase the overall number of macrophages at the site of inflammation and/or modify the polarization of macrophages to favor pro-resolutive macrophages. Overall number of macrophages may be assessed by method known in the art, like but not limited to the method used in the examples of the present invention. It may be considered that the agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability favors the concentration of macrophages at a site of inflammation when the percentage of macrophages is at least 10 % higher in a sample, like an exudate from a biological sample from a patient, treated with the compound as compared to a negative control.

[52] In another particular embodiment of the invention, the agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability decreases the cell surface expression of CMKLR1 and CXCR4 and/or CCR7. In a particular embodiment, the cell surface expression is considered on neutrophils and/or macrophages and/or dendritic cells. CXCR4, or chemokine receptor type 4 (CXCR-4) also known as fusin or CD184, is an alpha-chemokine receptor. CXCR4's expression is low or absent in many healthy tissues, it was demonstrated to be expressed in over 23 types of cancer, including breast cancer, ovarian cancer, melanoma, and prostate cancer. Expression of this receptor in cancer cells has been linked to metastasis to tissues. CCR7, chemokine receptor type 7, a member of the G protein-coupled receptor family is expressed in various lymphoid tissues and activates B and T lymphocytes.

CCR7 has been shown to stimulate dendritic cell maturation. CCR7 is also involved in homing of T cells to various secondary lymphoid organs such as lymph nodes and the spleen as well as trafficking of T cells within the spleen. CCR7 is expressed by various cancer cells, such as nonsmall lung cancer, gastric cancer and esophageal cancer. Expression of CCR7 by cancer cells is linked with metastasis to lymph nodes.

[53] When the agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability binds to its target, CMKLR1, and CCR7 and/or CXCR4 are internalized. This internalization is a potent leverage for treating inflammatory related diseases, in particular in antigen presenting cells (APCs), and more particularly in dendritic cells. The internalization/decrease of these receptors leads to an efficient resolution of the inflammation. The decrease of chemokine receptors after binding of the compound of the invention to its target at the macrophage and/or dendritic cells surface limits and or prevents their migration through CXCR4 and/or CCR7 sensing.

[54] The internalization, or the reduction of cell surface expression of one or a plurality of these receptors, induced or favored by the agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability may contribute to increase efficiency of the agonist of the invention. Disclosed herein is an agonist representing a preferred embodiment, wherein in the presence of the agonist, the cell surface expression of CMKLR1, and CXCR4 and/or CCR7, is significantly decreased. As used herein, "agonist compound inducing the internalization of CMKLR1, and CXCR4 and/or CCR7" means that cells, in particular neutrophils and/or macrophages and/or dendritic cells, incubated in the presence of the agonist display decreased cell surface expression of CMKLR1, and CXCR4 and/or CCR7 as compared to cells incubated in the absence of the agonist of the invention. Cell surface expression is preferably measured in vitro after a limited incubation time and in temperature conditions as mentioned in the examples of the invention. In a preferred embodiment, the agonist of the invention does induce the internalization of CMKLR1 and CXCR4 and CCR7. In a preferred embodiment, the agonist of the invention reduces the cells surface expression of CMKLR1 and CXCR4 and/or CCR7. Thus, the cell surface expression of CMKLR1, and CXCR4 and/or CCR7 in cells incubated in the presence of the agonist is reduced, or is significantly reduced, relatively to cell surface expression in cells incubated in otherwise identical conditions, but in the absence of the agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability. In

particular embodiments, when incubated at 37 °C for 30 to 45 minutes in the presence of 10 µg/mL of the agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability, the level of CMKLR1 and CXCR4 and/or CCR7 cell surface expression is lesser than 80 %, preferably lesser than 60%, and most preferably lesser than 50 %, of its level in cells incubated in the absence of the agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability.

[55] In a particular aspect of the invention, the inflammatory condition which is to be treated is a condition wherein the inflammation is delayed or disrupted. The inflammatory condition may be associated to a disease to be treated selected from the group consisting of inflammatory diseases, acute respiratory distress syndrome (ARDS), cancer, diabetes, immune diseases, autoimmune diseases, chronic pulmonary obstructive disease (COPD), viral pneumonia, sepsis, burn, acute coronary artery disease, rheumatoid arthritis, cystic fibrosis, infectious diseases, leukemia/lymphoma, metabolic disorders, neuroinflammation.

[56] In a particular aspect of the invention, the inflammatory condition which is to be treated is associated with the treatment of:

- an inflammatory disease, in particular acute inflammatory diseases, chronic inflammatory diseases such as asthma, keratoconjunctivitis, periodontal disease, eczema, inflammatory bowel disease, in particular Crohn's disease or colitis, in particular ulcerative colitis or spontaneous colitis, cystic fibrosis, NASH (Nonalcoholic steatohepatitis), hepatic fibrosis, lung fibrosis, vasculitis in particular ANCA mediated vasculitis, anti-neutrophil cytoplasm antibodies-related disease (ANCA), scleroderma, in particular wherein, as a result of the administration of the treatment, the resolution of inflammation is enhanced;
- an autoimmune disease such as diabetes, in particular type I diabetes, psoriasis, lupus, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, Sjögren's syndrome, celiac disease, vasculitis, myasthenia gravis, or an infection disease such as sepsis, peritonitis, degenerative diseases, wound healing disorders or dry eye syndrome, in particular wherein, as a result of the administration of the treatment, the resolution of inflammation is enhanced;
- a cancer, in particular metastatic cancers, solid or liquid cancers such as carcinoma, more particularly hepatocarcinoma, in particular mammary carcinoma or colon carcinoma, or lung cancer or myeloid cancer such as leukemia, in particular a cancer wherein cancer cells express CMKLR1 or where

the microenvironment of the tumor is invaded by cells expressing or overexpressing CMKLR1, in particular wherein, as a result of the administration of the treatment, the resolution of inflammation is enhanced.

[57] In a particular aspect of the invention, the agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability is used in the treatment of a patient suffering from NASH, hepatic fibrosis, lung fibrosis, vasculitis in particular ANCA mediated vasculitis, colitis, a colon inflammation related disease, colorectal cancer, inflammation-linked carcinogenesis, colon cancer, mesothelioma, autoimmune encephalomyelitis, psoriasis, Sjögren disease, Cutaneous inflammation, pulmonary fibrosis, neutrophil-associated diseases, sclerosis, cystic fibrosis, multiple sclerosis.

[58] In a particular embodiment, the agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability is associated with a further therapeutic ingredient, selected from the activators of the resolution of the inflammation. In another aspect, the invention relates to a composition comprising an anti-CMKLR1 compound as described herein, in particular a pharmaceutical composition comprising an anti-CMKLR1 compound according to the invention and a further therapeutic agent, or pharmaceutical acceptable carrier. In a particular embodiment, the invention relates to a composition comprising an anti-CMKLR1 compound according to the invention and a therapeutic agent selected from the group consisting of immunomodulatory agent, immune checkpoint blocker, and immune checkpoint activator. The term "immunotherapeutic agent," as used herein, refers to a compound, composition or treatment that indirectly or directly enhances, stimulates or increases the body's immune response against cancer cells and/or that decreases the side effects of other anticancer therapies. Immunotherapy is thus a therapy that directly or indirectly stimulates or enhances the immune system's responses to cancer cells and/or lessens the side effects that may have been caused by other anti-cancer agents. Immunotherapy is also referred to in the art as immunologic therapy, biological therapy biological response modifier therapy and biotherapy. Examples of common immunotherapeutic agents known in the art include, but are not limited to, cytokines, cancer vaccines, monoclonal antibodies and non-cytokine adjuvants. Alternatively, the immunotherapeutic treatment may consist of administering the subject with an amount of immune cells (T cells, NK, cells, dendritic cells, B cells...). Immunotherapeutic agents can be non-specific, i.e. boost the immune system generally so that the human body becomes more effective in fighting the growth

and/or spread of cancer cells, or they can be specific, i.e. targeted to the cancer cells themselves immunotherapy regimens may combine the use of non-specific and specific immunotherapeutic agents. Non-specific immunotherapeutic agents are substances that stimulate or indirectly improve the immune system. Non-specific immunotherapeutic agents have been used alone as a main therapy for the treatment of cancer, as well as in addition to a main therapy, in which case the non-specific immunotherapeutic agent functions as an adjuvant to enhance the effectiveness of other therapies (e.g. cancer vaccines). Non-specific immunotherapeutic agents can also function in this latter context to reduce the side effects of other therapies, for example, bone marrow suppression induced by certain chemotherapeutic agents. Non-specific immunotherapeutic agents can act on key immune system cells and cause secondary responses, such as increased production of cytokines and immunoglobulins.

[59] In some embodiments, the agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability of the present invention is administered with a pharmaceutically acceptable carrier or excipient. Pharmaceutically acceptable carrier or excipient refers to a non-toxic solid, semi-solid or liquid filler, diluent, encapsulating material or formulation auxiliary of any type. The carrier can also be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), suitable mixtures thereof, and vegetable oils. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. The prevention of the action of microorganisms can be brought about by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars or sodium chloride. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by the use in the compositions of agents delaying absorption, for example, aluminium monostearate and gelatin.

[60] In some embodiments, the agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability of the present invention is administered to the subject in combination with at least one further therapeutic agent, e.g. for treating cancers, autoimmune diseases or inflammatory diseases. Such administration may be simultaneous, separate or sequential. For simultaneous administration, the agents may be

administered as one composition or as separate compositions, as appropriate. The further therapeutic agent is typically relevant for the disorder to be treated. Exemplary therapeutic agents include other anti-cancer antibodies, cytotoxic agents, chemotherapeutic agents, anti-angiogenic agents, anti-cancer immunogens, cell cycle control/apoptosis regulating agents, hormonal regulating agents, and other agents described below.

[61] In another aspect, the invention concerns the therapeutic use of the anti-CMKLR1 agonist of the invention, especially for inducing and/or enhancing the resolution of inflammation by enhancing the apoptosis of neutrophils, in particular for inducing and/or enhancing the resolution of inflammation when said resolution is delayed or disrupted, in view of treating diseases wherein the extension over time of the inflammation is pathologic, or wherein the duration of the resolution of inflammation is pathologic.

[62] The invention also concerns a method for promoting neutrophil apoptosis at a site of inflammation in a subject in need thereof comprising the administration to the subject a therapeutically effective amount of an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability. In a particular embodiment, the subject suffers from a condition associated with the inflammation. In a more particular embodiment, the subject suffers from a disease selected from, the group consisting of:

- an inflammatory disease, in particular acute inflammatory diseases, chronic inflammatory diseases such as asthma, keratoconjunctivitis, periodontal disease, eczema, inflammatory bowel disease, in particular Crohn's disease or colitis, in particular ulcerative colitis or spontaneous colitis, cystic fibrosis, NASH (Nonalcoholic steatohepatitis), hepatic fibrosis, lung fibrosis, vasculitis in particular ANCA mediated vasculitis, anti-neutrophil cytoplasm antibodies-related disease (ANCA), scleroderma, in particular wherein, as a result of the administration of the treatment, the resolution of inflammation is enhanced;
- an autoimmune disease such as diabetes, in particular type I diabetes, psoriasis, lupus, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, Sjögren's syndrome, celiac disease, vasculitis, myasthenia gravis, or an infection disease such as sepsis, peritonitis, degenerative diseases, wound healing disorders or dry eye syndrome, in particular wherein, as a result of the administration of the treatment, the resolution of inflammation is enhanced;

- a cancer, in particular metastatic cancers, solid or liquid cancers such as carcinoma, more particularly hepatocarcinoma, in particular mammary carcinoma or colon carcinoma, or lung cancer or myeloid cancer such as leukemia, in particular a cancer wherein cancer cells express CMKLR1 or where the microenvironment of the tumor is invaded by cells expressing or overexpressing CMKLR1, in particular wherein, as a result of the administration of the treatment, the resolution of inflammation is enhanced,
- and more particularly a disease selected from the group consisting of NASH, colitis, hepatic fibrosis, lung fibrosis, vasculitis in particular ANCA mediated vasculitis, a colon inflammation related disease, colorectal cancer, inflammation-linked carcinogenesis, colon cancer, mesothelioma, autoimmune encephalomyelitis, psoriasis, Sjögren disease, Cutaneous inflammation, pulmonary fibrosis, neutrophil-associated diseases, sclerosis, multiple sclerosis.

[63] The invention also concerns a method for inhibiting neutrophil transmigration in a subject in need thereof comprising the administration to the subject a therapeutically effective amount of an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability. In a particular embodiment, the subject suffers from a condition associated with the inflammation as described herein. The invention also concerns a method for promoting macrophages proliferation at a site of inflammation in a subject in need thereof comprising the administration to the subject a therapeutically effective amount of an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability.

[64] The invention also concerns a method for decreasing the cell surface expression of CMKLR1 and CCR7 and/or CXCR4 on myeloid cells, in particular macrophages and/or neutrophils and or dendritic cells, in a subject in need thereof comprising the administration to the subject a therapeutically effective amount of an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability.

[65] The invention also concerns a method for promoting neutrophil apoptosis at a site of inflammation in a subject in need thereof comprising the administration to the subject a therapeutically effective amount of an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability. In a particular embodiment, the subject suffers from a condition associated with the inflammation. In a more particular embodiment, the subject suffers from a cancer selected from, the group consisting of primary and

metastatic cancers. Examples of cancers that may be treated by methods and compositions of the invention include, but are not limited to, cancer cells from the bladder, blood, bone, bone marrow, brain, breast, colon, esophagus, gastrointestinal, gum, head, kidney, liver, lung, nasopharynx, neck, ovary, prostate, skin, stomach, testis, tongue, or uterus. In addition, the cancer may specifically be of the following histological type, though it is not limited to these: neoplasm, malignant; carcinoma; carcinoma, undifferentiated; giant and spindle cell carcinoma; small cell carcinoma; papillary carcinoma; squamous cell carcinoma; lympho epithelial carcinoma; basal cell carcinoma; pilomatrix carcinoma; transitional cell carcinoma; papillary transitional cell carcinoma; adenocarcinoma; gastrinoma, malignant; cholangiocarcinoma; hepatocellular carcinoma; combined hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma; trabecular adenocarcinoma; adenoid cystic carcinoma; adenocarcinoma in adenomatous polyp; adenocarcinoma, familial polyposis coli; solid carcinoma; carcinoid tumor, malignant; bronchiole-alveolar adenocarcinoma; papillary adenocarcinoma; chromophobe carcinoma; acidophil carcinoma; oxyphilic adenocarcinoma; basophil carcinoma; clear cell adenocarcinoma; granular cell carcinoma; follicular adenocarcinoma; papillary and follicular adenocarcinoma; non encapsulating sclerosing carcinoma; adrenal cortical carcinoma; endometrioid carcinoma; skin appendage carcinoma; apocrine adenocarcinoma; sebaceous adenocarcinoma; ceruminous; adenocarcinoma; muco epidermoid carcinoma; cystadenocarcinoma; papillary cystadenocarcinoma; papillary serous cystadenocarcinoma; mucinous cystadenocarcinoma; mucinous adenocarcinoma; signet ring cell carcinoma; infiltrating duct carcinoma; medullary carcinoma; lobular carcinoma; inflammatory carcinoma; paget's disease, mammary; acinar cell carcinoma; adenosquamous carcinoma; adenocarcinoma w/squamous metaplasia; thymoma, malignant; ovarian stromal tumor, malignant; thecoma, malignant; granulosa cell tumor, malignant; and rhabdomyosarcoma, malignant; Sertoli cell carcinoma; leydig cell tumor, malignant; lipid cell tumor, malignant; paraganglioma, malignant; extra-mammary paraganglioma, malignant; pheochromocytoma; glomangiosarcoma; malignant melanoma; amelanotic melanoma; superficial spreading melanoma; malignant melanoma in giant pigmented nevus; epithelioid cell melanoma; blue nevus, malignant; sarcoma; fibrosarcoma; fibrous histiocytoma, malignant; myxosarcoma; liposarcoma; leiomyosarcoma; rhabdomyosarcoma; embryonal

rhabdomyosarcoma; alveolar rhabdomyosarcoma; stromal sarcoma; mixed tumor, malignant; mullerian mixed tumor; nephroblastoma; hepatoblastoma; carcinosarcoma; mesenchymoma, malignant; brennertumor, malignant; phyllodestumor, malignant; synovial sarcoma; mesothelioma, malignant; dysgerminoma; embryonal carcinoma; teratoma, malignant; strumaovarii, malignant; choriocarcinoma; mesonephroma, malignant; hemangio sarcoma; hemangioendothelioma, malignant; kaposi's sarcoma; hemangiopericytoma, malignant; lymphangiosarcoma; osteosarcoma; juxtacortical osteosarcoma; chondrosarcoma; chondroblastoma, malignant; mesenchymal chondrosarcoma; giant cell tumor of bone; ewing's sarcoma; odontogenic tumor, malignant; ameloblasticodontosarcoma; ameloblastoma, malignant; ameloblasticfibrosarcoma; pinealoma, malignant; chordoma; glioma, malignant; ependymoma; astrocytoma; protoplasmic astrocytoma; fibrillary astrocytoma; astroblastoma; glioblastoma; oligodendroglioma; oligodendroblastoma; primitive neuroectodermal; cerebellar sarcoma; ganglioneuroblastoma; neuroblastoma; retinoblastoma; olfactory neurogenic tumor; meningioma, malignant; neurofibrosarcoma; neurilemmoma, malignant; granular cell tumor, malignant; malignant lymphoma; Hodgkin's disease; Hodgkin's lymphoma; paragranuloma; malignant lymphoma, small lymphocytic; malignant lymphoma, large cell, diffuse; malignant lymphoma, follicular; mycosis fungoides; other specified non-Hodgkin's lymphomas; malignant histiocytosis; multiple myeloma; mast cell sarcoma; immunoproliferative small intestinal disease; leukemia; lymphoid leukemia; plasma cell leukemia; erythro leukemia; lymphosarcoma cell leukemia; myeloid leukemia; basophilic leukemia; eosinophilic leukemia; monocyticleukemia; mast cell leukemia; megakaryoblasticleukemia; myeloid sarcoma; and hairy cell leukemia.

- [66] The invention also concerns a method for promoting neutrophil apoptosis at a site of inflammation in a subject in need thereof comprising the administration to the subject a therapeutically effective amount of an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability. In a particular embodiment, the subject suffers from a condition associated with the inflammation. In a more particular embodiment, the subject suffers from an autoimmune disease selected from the group consisting of Achalasia, Addison's disease, Adult Still's disease, Agammaglobulinemia, Alopecia areata, Amyloidosis, Ankylosing spondylitis, Anti-GBM/Anti-TBM nephritis, Antiphospholipid syndrome, Autoimmune angioedema, Autoimmune

dysautonomia, Autoimmune encephalomyelitis, Autoimmune hepatitis, Autoimmune inner ear disease (AIED), Autoimmune myocarditis, Autoimmune oophoritis, Autoimmune orchitis, Autoimmune pancreatitis, Autoimmune retinopathy, Autoimmune urticaria, Axonal & neuronal neuropathy (AMAN), Baló disease, Behcet's disease, Benign mucosal pemphigoid, Bullous pemphigoid, Castleman disease (CD), Celiac disease, Chagas disease, Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP), Chronic recurrent multifocal osteomyelitis (CRMO), Churg-Strauss Syndrome (CSS) or Eosinophilic Granulomatosis (EGPA), Cicatricial pemphigoid, Cogan's syndrome, Cold agglutinin disease, Congenital heart block Coxsackie myocarditis, CREST syndrome, Crohn's disease, Dermatitis herpetiformis, Dermatomyositis, Devic's disease (neuromyelitis optica), Discoid lupus, Dressler's syndrome, Endometriosis, Eosinophilic esophagitis (EoE), Eosinophilic fasciitis, Erythema nodosum, Essential mixed cryoglobulinemia, Evans syndrome, Fibromyalgia, Fibrosing alveolitis, Giant cell arteritis (temporal arteritis), Giant cell myocarditis, Glomerulonephritis, Goodpasture's syndrome, Granulomatosis with Polyangiitis, Graves' disease, Guillain-Barre syndrome, Hashimoto's thyroiditis, Hemolytic anemia, Henoch-Schonlein purpura (HSP), Herpes gestationis or pemphigoid gestationis (PG), Hidradenitis Suppurativa (HS) (Acne Inversa), Hypogammaglobulinemia, IgA Nephropathy, IgG4-related sclerosing disease, Immune thrombocytopenic purpura (ITP), Inclusion body myositis (IBM), Interstitial cystitis (IC), Juvenile arthritis, Juvenile diabetes (Type 1 diabetes), Juvenile myositis (JM), Kawasaki disease, Lambert-Eaton syndrome, Leukocytoclastic vasculitis, Lichen planus, Lichen sclerosus, Ligneous conjunctivitis, Linear IgA disease (LAD), Lupus, Lyme disease chronic, Meniere's disease, Microscopic polyangiitis (MPA), Mixed connective tissue disease (MCTD), Mooren's ulcer, Mucha-Habermann disease, Multifocal Motor Neuropathy (MMN) or MMNCB, Multiple sclerosis, Myasthenia gravis, Myositis, Narcolepsy, Neonatal Lupus, Neuromyelitis optica, Neutropenia, Ocular cicatricial pemphigoid, Optic neuritisPalindromic rheumatism (PR), PANDAS, Paraneoplastic cerebellar degeneration (PCD), Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH), Parry Romberg syndrome, Pars planitis (peripheral uveitis), Parsonage-Turner syndrome, Pemphigus, Peripheral neuropathy, Perivenous encephalomyelitis, Pernicious anemia (PA), POEMS syndrome, Polyarteritis nodosa, Polyglandular syndromes type I, II, III, Polymyalgia rheumatica, Polymyositis, Postmyocardial infarction

syndrome, Postpericardiotomy syndrome, Primary biliary cirrhosis, Primary sclerosing cholangitis, Progesterone dermatitis, Psoriasis, Psoriatic arthritis, Pure red cell aplasia (PRCA), Pyoderma gangrenosum, Raynaud's phenomenon, Reactive Arthritis, Reflex sympathetic dystrophy, Relapsing polychondritis, Restless legs syndrome (RLS), Retroperitoneal fibrosis, Rheumatic fever, Rheumatoid arthritis, Sarcoidosis, Schmidt syndrome, Scleritis, Scleroderma, Sjögren's syndrome, Sperm & testicular autoimmunity, Stiff person syndrome (SPS), Subacute bacterial endocarditis (SBE), Susac's syndrome, Sympathetic ophthalmia (SO), Takayasu's arteritis, Temporal arteritis/Giant cell arteritis, Thrombocytopenic purpura (TTP), Tolosa-Hunt syndrome (THS), Transverse myelitis, Type 1 diabetes, Ulcerative colitis (UC), Undifferentiated connective tissue disease (UCTD), Uveitis, Vasculitis, Vitiligo, Vogt-Koyanagi-Harada Disease.

[67] In another embodiment, the invention, also concerns a method for *in vitro* determining if an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability is likely to be effective in the treatment of inflammation in a human subject. The agonist may be selected among the group consisting of an antibody or an antigen-binding fragment thereof, a peptide, a polypeptide or protein. The method comprises the steps of:

- Incubating neutrophils, in particular human neutrophils, with an effective amount of an agonist candidate;
- Quantifying the neutrophil apoptosis; in particular the apoptosis of human neutrophils,
- Selecting an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability candidate that enables apoptosis of neutrophils at a level of at least 20% higher as compared to a negative control.

The neutrophils may be incubated and stimulated according to the method disclosed in the examples of the invention. It may be considered that a candidate is a suitable agonist when it enhances the neutrophil apoptosis by at least 20% as compared to the neutrophil apoptosis in a control sample stimulated with a control compound (e.g. which is known to have no effect on neutrophil apoptosis). In a particular embodiment, a candidate is considered as a potent agonist when the apoptosis of neutrophils is enhanced by at least 50 % as compared to the control sample.

[68] The method of selection may also comprise further steps. At least one further step of selection of an agonist candidate may be performed, wherein the at least one further step comprises:

- the quantification of the cell surface expression of CD62L expressed by neutrophils, in particular human neutrophils, a candidate being selected when the cell surface expression of CD62L is reduced as compared to a control;
- the quantification of the cell surface expression of CMKLR1 and CCR7 and/or CXCR4 expressed by neutrophils and/or macrophages and/or dendritic cells, a candidate being selected when the cell surface expression of CMKLR1 and CCR7 and/or CXCR4 is reduced as compared to a control.

[69] The candidate may be considered as an agonist when the cell surface expression of CD62L expressed by neutrophils is reduced by at least 20 %, more particularly by at least 50 %, as compared to a control experiment. CD62L cell surface expression may be assessed according to the method disclosed in the examples of the present invention.

[70] The candidate may be considered as an agonist when the cell surface expression of CMKLR1 and CCR7 and/or CXCR4 expressed by neutrophils and/or macrophages and/or dendritic cells, in particular human cells thereof, is reduced by at least 20 %, more particularly by at least 50 %, as compared to a control experiment. CMKLR1 and CCR7 and/or CXCR4 cell surface expression may be assessed according to the method disclosed in the examples of the present invention.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 – CMKLR1 signaling triggering on human inflammatory macrophages

Inflammatory macrophages were generated from monocytes with 5 days of culture with M-CSF (100ng/mL) and polarized 2 days with IFN γ (20ng/mL) were then cultured with coated Isotype (black cross) or 2G1 (square) for different times. Whole proteins of each condition were extracted and an ELISA of pErk or pAkt was performed on those lysates.

Figure 2 – CMKLR1-positive myeloid cells in a LPS model

LPS was injected intraperitoneally (5mg/kg) and cells from the peritoneum and the spleen were collected after 24h for flow cytometry analysis of ChemR23 expression.

Figure 3 – Neutrophil apoptosis. A) Survival/Mortality of neutrophils B) Caspase-3 expression C) ROS production

Neutrophils were isolated from blood of healthy volunteers and cultured for 24h (Mortality analysis), or 4h, 6h, 11h (Caspase-3 assay), or 5h (ROS assay) on coated Iso ctrl (cross), chimeric anti-ChemR23 2G1 (square) or different humanized versions of the 2G1 (diamonds). Mortality of PMN was analyzed by incubating PMN with specific markers of the mortality and viability and then counting by picture analysis. Caspase-3 is revealed by western blot and intensity of signals was determined with a software. ROS production was revealed with a specific marker and analyzed on pictures.

Figure 4 – in vivo neutrophils apoptosis - A) Experimental proceedings - B) ChemR23 expression C) neutrophils frequency in exudates D) macrophages frequency in exudates G) neutrophils mortality F) Ratio dead/living neutrophils

Sterile air was injected two times at d3 and d6 and inflammation was initiated with the injection of carrageenan. Exudates were collected at different times and stained for flow cytometry analysis.

Figure 5 – CD62L expression on neutrophils

PMN were incubated for different times on coated Ab and then stained for CD62L expression analyzed by flow cytometry.

Figure 6 – Neutrophils transmigration ratio– A) transmigration ratio of PMNs in healthy patients – B) Ratio PMNs in inflamed patients suffering from ANCA

Endothelial cells were coated and +/- activated with 100U/mL of TNFa overnight. Then PMN were added with or without TNFa at 100U/mL and Ab for two hours. The transmigrated PMN were collected and analyzed by flow cytometry.

Figure 7 – Cell surface expression of CXCR4 and CCR7 – A) Expression in inflammatory macrophages of CXCR4 and CCR7 incubated with different antibodies – B) Expression of CCR7 in dendritic cells

Inflammatory macrophages were generated from monocytes with 5 days of culture with M-CSF (100ng/mL) and polarized 2 days with IFNg (20ng/mL) and then cultured with coated Ab. Dendritic cells were induced with GM-CSF (50ng/mL) and IL-4 (20ng/mL) for 6 days and cultured with coated Ab during the differentiation. CXCR4 and CCR7 were revealed by flow cytometry.

Figure 8 – CRC model A) Tumor cell inoculated model of CRC : tumor development and survival B) Chemically and inflammation induced CRC

Tumor inoculation was performed with 0.5M of MC38 CRC cell line subcutaneously. Mice were injected three times a week with 1mg/kg of 2G1 or Ctrl Ab for 3 weeks starting at d4 after tumor induction. Cyclophosphamide was injected I.P. once at 100mg/kg. Tumor development was assessed three times a week and survival curves were established when mice developed a tumor > 1000mm³.

Figure 9 - Mesothelioma model – Survival

AK-7 cells (3M) were injected in the pleural cavity and mice received either Iso ctrl or 2G1 three times a week for 3 weeks starting at d4 at 1mg/kg.

Figure 10 - Effect of CMKLR1 agonist (2G1) on an autoimmune disease such as mice psoriasis model. Aldara treated mice for 4 to 6 consecutive days were injected intra-peritoneally with: 2G1 (●) or isotype control antibody (x). **A.** thicknesses and **B** weight.

Figure 11 - autoimmune encephalomyelitis experimental model. – A) Weight variation over time B) illness score

Lesions in the central nervous system were induced by injection of the immunogenic MOG peptide combined with adjuvants. Treatment (2G1) or Isotype control were administered at 1mg/kg when animals had a clinical score equal to 2 meaning the central nervous system is already affected by T cell activity, until the end of the experiment.

Figure 12. Effect of an anti-CMKLR1 antibody in the CD45Rb^{high} T-cell transfer chronic colitis mouse model.

Weight variation of treated animals was followed up to sixty days. Animals were treated with isotype control hlgG1 (x) or anti-CMKLR1 antibody (■).

Figure 13 – Effect of an anti-CMKLR1 antibody on an Hepatocarcinoma mice model (HCC model). Anti-tumor effect of anti-CMKLR1 antibody (2G1, 0.8mg/kg) i.p. administration three times a week for 2 weeks in combination (▲) or not (●) with two injections on day 4 and 8 of anti-PD1 mAb (*RMP1-14* clone, 8mg/kg) or with injections (twice a week) of anti-PD-1 antibody alone (Δ). Mice have been treated during 2 weeks in an orthotropic model of murine hepatoma (2.5.10⁶ of Hepa 1.6 cells injected through the portal vein on day 0). Isotype control antibody was used at 0,8 mg/kg three times a week for 2 weeks. Mice response were considered partial (PR) when mice

survive few days to 1 month after stop of treatment or complete (CR) when mice survive over 1 month or cured when they survive three times longer than the time necessary to all control mice die.

Figure 14. Competition study on chemerin-CMKLR1 interaction with anti-CMKLR1 antibodies. **A.** Inhibition of the cAMP by Chemerin from two different providers were tested from DiscoverX (•) or R&D System (▲) or combined with anti-CMKLR1 antibody (2G1) alone (□) or combined with chemerin from DiscoverX (□). **B.** beta Arrestin activation in presence of anti-CMKLR1 antibody at different concentrations from 1μM to 1nM and Chemerin 2nM (□) or 6nM (•).

EXAMPLES

In the following examples, anti-CMKLR1 antibody 2G1 of the applicant comprises the heavy chain variable domain of SEQ ID No. 5, and the light chain variable domain of SEQ ID No. 6; antibody HALA comprises the heavy chain variable domain of SEQ ID No. 7, and the light chain variable domain of SEQ ID No. 8. Other antibodies comprising HB, HC or HD heavy chain variable domain and VL VC or VD light variable domains are derived from HA the heavy chain variable domain HA. And the light chain variable domain LA, respectively.

Example 1. CMKLR1 signaling induced by the agonist of the invention (Figure 1)

As illustrated in Fig. 1A, the use of an agonist of CMKLR1 (2G1 and HALA) induces the phosphorylation of ERK and Akt when cells are stimulated with an agonist of CMKLR1 (**Fig. 1B**).

Example 2. Effect of the use of an agonist of CMKLR1 in a LPS inflammation model (Figure 2)

MATERIAL AND METHODS. 8-weeks old male C57Bl/6J mice were injected intraperitoneally with LPS at 5 mg/kg. Peritoneal fluid & spleen were harvested 24h later and stained for ChemR23 expression by flow cytometry.

RESULTS. A few proportion of splenic macrophages (F4/80+), PMN (CD11b+/Ly6G+) and Dendritic cells (CD11c+) expressed ChemR23, 10%, 5% and 0% respectively (white squares). The proportion is much more elevated at the inflammation site where 100% of macrophages,

40% of PMN and 10% of DCs expressed CMKLR1 (black squares). This demonstrates the impact of LPS inflammation on the CMKLR1 resolution receptor expression by myeloid cells, thereby indicating that an agonist of this receptor interacts with cells implicated in the inflammation process.

Example 3. Neutrophils apoptosis and mortality induced by a CMKLR1 agonist (Figure 3 and Figure 4)

MATERIAL AND METHODS. PMNs from healthy volunteers were incubated in culture medium with coated Ab at 10µg/mL for different times and collected for Caspase-3 staining analyzed by Western Blot. The intensity of Caspase-3 expression was calculated on WB. For the ROS test, PMNs from healthy volunteers were incubated in culture medium with coated Ab at 10µg/mL for 24h or 5h and stained either with a dead/viability kit or a specific marker of reactive oxygen species (ROS) respectively.

RESULTS. As illustrated on **Fig. 3A**, neutrophils life/death ratio is higher in cells treated with an antibody of the invention, thereby illustrating the effect on these cells of the agonist of the invention. As illustrated on **Fig. 3B**, the administration of an anti-CMKLR1 agonist enhances caspase-3 activity, as compared to cells treated with a control antibody. The antibody HALA exhibits higher effect on caspase 3 activity as compared to the 2G1 antibody. 2G1 WT and HALA increases caspase-3 cleavage, which means that ChemR23 triggering leads to Caspase-3-dependent apoptosis. On **Fig. 3C**, it can be seen that the percentages of positive cells obtained by analyzing the pictures with ImageJ software is higher when cells are treated with an agonist of CMKLR1. 2G1 and all humanized variants of 2G1 increase the mortality of PMN after 24 hours. 2G1 and HALA variants increase the ROS production by PMN after 5h.

In another model, which is illustrated on **Fig. 4A**, confirmative data on neutrophil apoptosis have been obtained. As illustrated on **Fig. 4B**, the percentage of ChemR23-positive cells (macrophages and neutrophils) is increased when inflammation is induced. But, the percentage of neutrophils in exudates is not significantly decreased in animals treated with the anti-CMKLR1 antibody (**Fig. 4C**; black square), while the overall percentage of macrophages in exudates is slightly enhanced (**Fig. 4D**). This indicates that the administration of the CMKLR1 agonist does not reduce the overall number of myeloid cells in the exudates, and has an effect on apoptosis of the

neutrophils mainly at the site of inflammation. As illustrated on **Fig. 4E** and **Fig. 4F**, the percentage of dead neutrophils is increased when the agonist of CMKLR1 is administered, as well as their death. These results illustrate the positive effect of the agonist of CMKLR1 for treating a delay in the resolution of the inflammation, since the neutrophil population is impacted not in exudates but at the site of inflammation.

Example 4. CD62L expression (Figure 5)

MATERIAL AND METHODS. PMN from healthy volunteers were incubated in culture medium with coated Ab at 10µg/mL for different times and collected for CD62L staining analyzed by flow cytometry.

RESULTS. only the IgG1 format of 2G1 leads to the decrease of CD62L on the PMN surface over the time as illustrated on **Fig. 5**.

Example 5. Neutrophils transmigration capability (Figure 6)

MATERIAL AND METHODS. Human endothelial cells (HDMEC) were incubated for 24h in the transwell coated with gelatin and activated overnight with TNF-alpha at 100U/mL or without inflammatory conditions. Then, PMN from healthy volunteers or ANCA patients were incubated in transwell containing the monolayer of HDMEC for 4 hours. Antibodies (Iso Ctrl and 2G1) were added at 10µg/mL +/- TNF-alpha at 100U/mL during the 4hours of the transmigration assay. The lower transmigrated part of the transwell was collected and the transmigrated PMN were counted by flow cytometry using counting beads.

RESULTS. Neutrophils treated with a CMKLR1 agonist have a lower transmigration capability as compared to cells treated with control compounds (**Fig. 6A**). 2G1 avoids PMN transmigration through endothelial monolayer especially under inflammatory condition when PMN and endothelial cells were activated with TNFa in healthy volunteers and in AIDs' patients (**Fig. 6B**).

Example 6. CCR7 / CXCR4 cell surface expression (Figure 7)

MATERIAL AND METHODS. Macrophages were generated from monocytes of healthy volunteers with 100ng/mL of M-CSF for 5 days. Then, macrophages were collected and incubated with coated mAb at 10mg/mL in presence of 20ng/mL of IFNγ in order to obtain M1 inflammatory macrophages. Then, M1 were phenotyped for CXCR4 and CCR7 by flow cytometry and cytokines released in the supernatant were

dosed by ELISA. Dendritic cells were generated from monocytes of healthy volunteers with 50ng/mL of GM-CSF and 20ng/mL of IL-4 for 6 days. Then, DC were phenotyped for CCR7 by flow cytometry.

RESULTS. On **Fig. 7A**, it is clear that CMKLR1 agonist (2G1 and HALA) induces a reduction in the expression of CXCR4 and CCR7 (**Fig. 7A**). When ChemR23 is targeted with a specific IgG1 format, the expression of chemokine receptors CXCR4 and CCR7, which are known to heterodimerize with ChemR23, is reduced on macrophages and Dendritic Cells which are efficient antigen presenting cells (**Fig. 7B**). This means that 2G1 and humanized variants therefore prevent migration of inflammatory APC from inflammatory site to secondary lymphoid organs.

Example 7. Effect of CMKLR1 agonist on CRC model (Figure 8)

As illustrated on **Fig. 8A**, the tumor volume is reduced in animals treated with the anti-CMKLR1 antibody of the invention, as compared to the control antibody. In several cases, complete remission is also observed, thereby illustrating the positive effect of a compound according to the invention for treating CRC. As shown, the percent survival is also enhanced in animals treated with an agonist of CMKLR1.

Moreover, as exemplified on **Fig. 8B**, the treatment with an anti-CMKLR1 monoclonal antibody (OSE-230) leads to a reduction of the stool score, and the reduction of tumor number.

Example 8. Effect of CMKLR1 agonist on mesothelioma model (Figure 9)

Mice treated according to the method explained in the description of the figure with an agonist of CMKLR1 have a higher survival rate than mice treated with a control antibody, thereby illustrating the positive effect of a compound according to the invention for treating mesothelioma (**Fig. 9**).

Example 9. Effect of CMKLR1 agonist on Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation model (Figure 10)

Aldara® cream which is known to induce psoriasis in mice was used on male C57Bl/6 mice (8-10-week old). Mice received a daily topical dose of Aldara. Treatments (anti-CMKLR1 agonist or control compound) were injected intra-peritoneally:

RESULTS: Anti-CMKLR1 agonist (2G1) reduces the thickness of the skin (**Fig. 10A**) after Aldara administration (see for example on day 15), while the weight of the animals is not impacted by the administration of the agonist (**Fig. 10B**). These results suggest an application for agonist anti-CMKLR1 compound therapy on psoriasis mice model, illustrative of an autoimmune disease.

Example 10. Effect of CMKLR1 agonist on autoimmune encephalomyelitis experimental model (Figure 11)

In this model, the curative administration of the antibody of the invention in EAE model does not lead to the reduction of the weight (**Fig. 11A**), as compared to animals treated with a control antibody. But the illness score is significantly reduced when the treatment is performed with the anti-CMKLR1 antibody (**Fig. 11B**). The anti-CMKLR1 antibody leads to a great improvement of the illness score as soon as ten-day post treatment as compared to the control, since the score is approximately 30 % lower in animals treated with the agonist compound. It is therefore illustrated that a treatment with an anti-CMKLR1 compound is effective for treating autoimmune encephalomyelitis.

Example 11. CD45Rb^{high} T-cell transfer chronic colitis mouse model (Figure 12)

METHOD. CD45Rb^{high} CD4 T cells were isolated from the spleen of naive mice and sorted on an ARIA FACS after a negative selection of the CD4 T cells by magnetic sorting, then injected intraperitoneally at $0,5 \cdot 10^6$ cells in 100 μ L of PBS into 6-weeks old female Rag1 knock-out mice. Anti-CMKLR1 antibody (2G1) or an isotype control were administered from day 32 after the CD45Rb^{high} CD4 T cell transfer for 3 weeks three times a week at 1mg/kg. The follow-up of weight was evaluated three times a week and the weight variation was determined over the initial weight. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

RESULTS. **Fig. 12** presents the percentage of weight variation over the time post antibody administration, of animals treated with anti-CMLKR1 antibody or an isotype control. Both groups presented the same initial weight evolution over the first 30 days after treatment and started to differentiate at day 35. Mice treated with the anti-CMKLR1 continue to gain weight while, in contrast, control mice start to lose weight indicating development of chronic colitis as anticipated in this control group. The inventors confirm in a third model of colitis, here in a chronic model of inflammation, that anti-CMKLR1 antibodies of the invention could be of interest to treat chronic inflammatory and auto-immune diseases such as colitis.

Example 12. Anti-tumor effect on the overall survival of mice hepatocarcinoma tumor model (Figure 13)

METHOD. Mice were anesthetized with a cocktail of xylazine/ketamine. After a laparotomy, tumoral Hepa 1.6 cells were injected in PBS through the portal vein (2.5×10^6 cells/100 μ L) in PBS. The treatment was started 4 days after tumor injection. The anti-CMKLR1 antibody (2G1clone) and the hIgG1 isotype control were injected at 0.8mg/kg three times per week during 2 weeks. The anti-PD1 monoclonal antibody was injected twice a week during 2 weeks intraperitoneally in PBS (8mg/kg). Combination anti-CMKLR1 and anti-PD1 antibodies was tested as well (0.8 mg/kg and 8mg/kg respectively). The Overall survival was followed during sixty days and the percentage of survival in each condition was reported Figure 22.

RESULTS. As shown in **Figure 13**, animals treated with the anti-CMKLR1 or the anti-PD1 antibodies had seen their survival rate prolonged only for 1 animal on 7 treated (15% of treated animals) indicating a partial response (PR). However, animals treated with a combination of anti-PD1 and anti-CMKLR1 antibodies allows a significant increase of the survival rate (from 15% to 45%) with animals alive 60 days after treatment, indicating a complete response (CR). This result indicates an unexpected efficiency of the therapeutic combination (anti-PD1/antiCMKLR1 antibodies) on HCC tumor model.

Example 13. Effect of an Agonist of CMKLR1 on the beta—arrestin pathay (Figure 14)

The day before the experiment CHO-K1 CMKLR1 Gi cells (Discover'X ref 95-0080C2) were plated in pre-warmed cell reagent then plated in a 96-well plate at 100 μ L/well of cells as (Discover'X ref 15-103) and incubated 24 hours at 37°C, in a 5% CO₂ humidified incubator for 24 hours.

A mix of Chemerin agonist (6x in 7-point series of 3-fold dilutions from 10^{-7} μ M to 10^{-10} M) (Discover'x ref 92-1036 or 2324-CM-025 from R&D Systems) and forskolin (40 μ M) (a cAMP activator) (Discover'x ref 92-0005) was added to the cells during 30 min at 37°C; or cells were pre-incubated 30 min at 37°C with anti-CMKLR1 antibody (serial dilution : 6X in 7-point series of 3-fold dilutions from 1 μ M to 1nM). Then a mix of chemerin (2nM) + forskolin (60nM) was

added to the cells 30 min at 37°C. For the detection cAMP, antibody reagent and cAMP working detection solution was added to the plate for 1 hour at room temperature, then cAMP solution A was added, and cells incubated 3 hours at room temperature in the dark. Bioluminescence was read with a plate reader with 0,5s integration.

RESULTS. In order to test if the antibody of the invention is an antagonist of the Chemerin-induced CMKLR1 activation, two assays were performed, and the results are presented on **Figure 14**. Chemerin-induced inhibition of forskolin-dependent cAMP production is shown on **Figure 14A (black circles or white squares)**; anti-CMLKR1 antibody of the invention could not revert this inhibition of production (**black circles or white squares**) as compared to the control (grey diamonds). Chemerin-induced activation of the beta-arrestin presented **Figure 14B**, show that the anti-CMKLR1 antibody of the invention did not significantly modify chemerin-dependent activation of the beta-arrestin (white circles as compared to black diamonds). The antibodies of the invention do not have an antagonist activity of the CMLKR1-Chemerin interaction. Furthermore, the antibodies of the invention are not able to induce chemerin-induced CMKLR1 signaling pathway, confirming that these antibodies are not agonist of chemerin of the CMLKR1 pathway.

CLAIMS

1. An agonist of anti-Chemerin Like Receptor 1 (CMKLR1) having a Resolvin E1-like capability, for use in the treatment of a patient suffering from an inflammatory condition, in particular an inflammatory condition wherein the resolution phase of the inflammation is delayed or disrupted, wherein the agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability is selected from the group consisting of an antibody or antigen-binding fragment thereof, a peptide, a polypeptide and a protein, and wherein the agonist:
 - induces or activates the apoptosis of neutrophils at the site of inflammation, and/or
 - inhibits or decreases the transmigration capability of neutrophils through endothelium towards the site of inflammation, and/or
 - inhibits or decreases the migration of macrophages, and/or of dendritic cells, from the site of inflammation to secondary lymphoid organs and/or towards the site of inflammation.
2. The agonist according to claim 1 for use according to claim 1 which binds to the third extra cellular loop of CMKLR1.
3. The agonist according to claim 1 or 2, for use according to claim 1 or 2, wherein the agonist is an antibody, in particular a humanized antibody, or antigen-binding fragment thereof.
4. The agonist according to any one of claims 1 to 3, for the use of any one of claims 1 to 3, wherein the inflammatory condition is related to a cancer, an autoimmune disease, an infection, a chronic inflammatory disease, a chronic infection or sepsis, diagnosed in the patient.
5. The agonist according to any one of claims 1 to 4, for use according to any one of claims 1 to 4, wherein the agonist increases the concentration of pro-resolutive inflammation macrophages at the site of inflammation.

6. The agonist according to any one of claims 1 to 5, for use according to any one of claims 1 to 5, wherein the agonist antibody induces the internalization of CMKLR1 and CCR7 and/or CXCR4, in particular of CMKLR1 and CCR7 and CXCR4, expressed by myeloid cells, in particular by macrophages and/or dendritic cells.
7. The agonist according to any one of claims 1 to 6, for use according to any one of claims 1 to 6, wherein the agonist antibody reduces the cells surface expression of CMKLR1 and CCR7 and/or CXCR4, in particular of CMKLR1 and CCR7 and CXCR4, expressed by myeloid cells, in particular by macrophages and/or dendritic cells.
8. The agonist according to any one of claims 1 to 7, for use according to any one of claims 1 to 7, wherein the agonist induces the internalization and/or shedding of CD62L expressed by myeloid cells, in particular by neutrophils.
9. The agonist according to any one of claims 1 to 8, for use according to any one of claims 1 to 8, wherein the agonist reduces the cell surface expression of CD62L expressed by myeloid cells, in particular by neutrophils.
10. The agonist according to any one of claims 1 to 9, for use according to any one of claims 1 to 9, wherein the agonist is a humanized antibody comprising a domain suitable for interaction with a Fc receptor, particularly a IgG domain, and more particularly a IgG1 constant fragment or a constant fragment issued or derived from a human IgG1.
11. The agonist according to any one of claims 1 to 10, for use according to any one of claims 1 to 10, which does not activate the β -arrestin signaling pathway in CMKLR1-positive cells *in vitro* and/or *in vivo*.
12. The agonist according to any one of claims 1 to 11, for use according to any one of claims 1 to 11, wherein the administration of the agonist induces or sustains the resolution stage of the inflammation.

13. The agonist according to any one of claims 1 to 12, for use according to any one of claims 1 to 12, wherein the inflammatory condition is selected from the group consisting of:

- an inflammatory disease or a chronic inflammatory disease, in particular acute inflammatory diseases, such as asthma, keratoconjunctivitis, periodontal disease, eczema, inflammatory bowel disease, in particular Crohn's disease or colitis, in particular ulcerative colitis or spontaneous colitis, cystic fibrosis, NASH (Nonalcoholic steatohepatitis), hepatic fibrosis, lung fibrosis, vasculitis in particular ANCA mediated vasculitis, anti-neutrophil cytoplasm antibodies-related disease (ANCA), scleroderma, in particular wherein, as a result of the administration of the treatment, the resolution of inflammation is enhanced;
- an autoimmune disease such as diabetes, in particular type I diabetes, psoriasis, lupus, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, Sjögren's syndrome, celiac disease, vasculitis, myasthenia gravis, or an infection disease such as sepsis, peritonitis, degenerative diseases, wound healing disorders or dry eye syndrome, in particular wherein, as a result of the administration of the treatment, the resolution of inflammation is enhanced;
- a cancer, in particular metastatic cancers, solid or liquid cancers such as carcinoma, more particularly hepatocarcinoma, in particular mammary carcinoma or colon carcinoma, or lung cancer or myeloid cancer such as leukemia, in particular a cancer wherein cancer cells express CMKLR1 or where the microenvironment of the tumor is invaded by cells expressing or overexpressing CMKLR1, in particular wherein, as a result of the administration of the treatment, the resolution of inflammation is enhanced,
- and more particularly a disease selected from the group consisting of NASH, colitis, hepatic fibrosis, lung fibrosis, vasculitis in particular ANCA mediated vasculitis, a colon inflammation related disease, colorectal cancer, inflammation-linked carcinogenesis, colon cancer, mesothelioma, autoimmune encephalomyelitis, psoriasis, Sjögren disease, Cutaneous inflammation, pulmonary fibrosis, neutrophil-associated diseases, sclerosis, multiple sclerosis.

14. A method for *in vitro* determining if an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability is likely to be effective in the treatment of inflammation in a human subject, the method comprising the steps of:

- Incubating neutrophils with an effective amount of an agonist candidate;
- Quantifying the neutrophil apoptosis; in particular the apoptosis of human neutrophils,
- Selecting an agonist of CMKLR1 having a Resolvin E1-like capability candidate that enables apoptosis of neutrophils at a level of at least 20% higher as compared to a negative control.

15. The method according to claim 14, wherein at least one further step of selection of an agonist candidate is performed, wherein the at least one further step comprises:

- the quantification of the cell surface expression of CD62L expressed by neutrophils, a candidate being selected when the cell surface expression of CD62L is reduced as compared to a control;
- the quantification of the cell surface expression of CMKLR1 and CCR7 and/or CXCR4 expressed by neutrophils and/or macrophages and/or dendritic cells, a candidate being selected when the cell surface expression of CMKLR1 and CCR7 and/or CXCR4 is reduced as compared to a control.

ABSTRACT

CMKLR1 AGONISTS HAVING A RESOLVIN E1-LIKE CAPABILITY AND THEIR THERAPEUTIC APPLICATIONS

The present invention provides anti-chemerin receptor antibodies which have a resolvin E1-like agonist activity on chemokine like receptor-1 (CMKLR1) for use in the resolution of an inflammation occurring during autoimmune diseases, chronic inflammatory diseases, infectious diseases, cancers, by sustaining or initiating the resolution phase of inflammation.

(No figure)

Annexe 2: **Article 1: Selective SIRP α blockade reinvigorates myeloid cells in the tumor microenvironment and prevents T-cell exclusion**

Selective SIRP α blockade reinvigorates myeloid cells in the tumor microenvironment and prevents T-cell exclusion

Selective SIRP α blockade reinvigorates myeloid cells in the tumor microenvironment and prevents T-cell exclusion

Vanessa Gauttier¹, Sabrina Pengam¹, Justine Durand¹, Caroline Mary¹, Aurore Morello¹, Kevin Biteau²⁻³, Mélanie Neel²⁻³, Georgia Porto²⁻³, Géraldine Teppaz¹, Virginie Thepenier¹, Richard Danger²⁻³, Nicolas Vince²⁻³, Riad Abes¹, Catherine Ruiz¹, Charlene Trilleaud¹⁻³, Alexandra Garcia²⁻³, Virginie Vignard⁴⁻⁶, Bernard Martinet²⁻³, Alexandre Glémain²⁻³, Sarah Bruneau²⁻³, Fabienne Haspot²⁻³, Safa Dehmani¹⁻³, Pierre Duplouye²⁻³, Masayuki Miyasaka⁸, Nathalie Labarrière⁴⁻⁵, David Laplaud^{2-3,6}, Christophe Blanquart⁴, Véronique Catros⁷, Pierre-Antoine Gouraud²⁻³, Isabelle Archambeaud^{6,9}, Hélène Aublé^{6,9-10}, Sylvie Metairie^{6,9}, Jean-François Mosnier^{2-3,11}, Dominique Costantini¹, Gilles Blancho^{2-3,6}, Sophie Conchon^{2-3,†}, Bernard Vanhove^{1-3,†}, Nicolas Poirier^{1,†,*}.

¹OSE Immunotherapeutics, Nantes, France

²Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie (CRTI), UMR 1064, Inserm, Université de Nantes, Nantes, France

³Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), CHU Nantes, Nantes, France

⁴CRCINA, INSERM, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France,

⁵LabEx IGO "Immunotherapy, Graft, Oncology", Nantes, France,

⁶CHU Nantes, Nantes, France

⁷Univ Rennes, Inserm, CHU Rennes, Institut NUMECAN (Nutrition Metabolisms and Cancer) UMR _S 1241, CRB Santé Rennes, F-35000 Rennes, France

⁸Immunology Frontier Research Center, Osaka University, Yamada-oka, Suita, 565-0871, Japan

⁹Chirurgie Cancérologique Digestive et Endocrinienne CHU Nantes, France

¹⁰Centre d'investigation Clinique, CHU Nantes, Nantes, France

¹¹Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, CHU Nantes, Nantes, France

[†]These authors contributed equally to the senior authorship of this study.

*Correspondence should be addressed to:

Dr. Nicolas Poirier
OSE Immunotherapeutics
22 Boulevard Benoni Goullin
44200 Nantes, France
Tel: +33(0) 228 291 010
Email: nicolas.poirier@ose-immuno.com

Key words: SIRP α , SIRP γ , CD47, tumor microenvironment, cross-presentation, chemokine, T-cell exclusion;

The authors of this manuscript have conflicts of interest to disclose: V.G., C.M., V.T., S.P., B.V. and N.P. are authors of patents related to SIRP α /CD47/SIRP γ . V.G., C.M., D.C., B.V. and N.P. are shareholders of OSE Immunotherapeutics, a company owning SIRP α antagonists.

Abstract

T-cell exclusion causes resistance to cancer immunotherapies via immune checkpoint blockade (ICB). Myeloid cells contribute to resistance by expressing SIRP α , an inhibitory membrane receptor that interacts with ubiquitous receptor CD47 to control macrophage phagocytosis in the tumor microenvironment. Although CD47/SIRP α -targeting drugs have been assessed *in vitro* and in mouse models, the therapeutic efficacy of selectively blocking SIRP α in humans remains unclear. We report a potent synergy between selective SIRP α blockade and ICB in increasing memory T-cell responses and reverting exclusion in syngeneic and orthotopic mouse tumor models. Mechanistically, selective SIRP α blockade stimulates tumor nest T-cell recruitment by restoring murine and human macrophage chemokine secretion, and increases anti-tumor T-cell responses by promoting tumor-antigen cross-presentation by dendritic cells. However, non-selective SIRP α /SIRP γ blockade targeting CD47 impairs human T-cell activation, proliferation, and endothelial transmigration. Thus, SIRP α /ICB-targeted combination therapies show great potential for overcoming resistance in patients with elevated myeloid cell infiltration in solid tumors.

Introduction

Cancer immunotherapy with programmed death-ligand 1 (PD-L1)/programmed death-1 (PD-1) antibodies induces robust responses across multiple types of cancers (1–3). However, only a limited fraction of patients is responsive, in particular those with pre-existing T-cell infiltrates and inflammatory signatures in the tumor (4). Tumors in non-responders typically lack T-cells or have T-cells preferentially located around the tumor region, a process named “immune-exclusion” (5–7). Multiple mechanisms have been associated with resistance to PD-(L)1 therapies, such as defective generation of tumor-specific T-cells, impaired formation of memory T-cells, restrained T-cell infiltration, inadequate T-cell function, and local immunosuppression induced by regulatory T or myeloid cells (8–11). Improved therapy efficacy may therefore be achieved by targeting myeloid cells that positively and negatively orchestrate T-cell responses.

Cells of the myeloid lineage are a major component of the tumor microenvironment (TME) (12). Pro-tumoral M2 macrophages and myeloid-derived suppressive cells (MDSC) reduce cancer therapy efficacy by inhibiting anti-tumor T-cell responses or by modulating tumor angiogenesis, survival, spread and metastasis (13, 14). Accumulation of these myeloid cells correlates with poor prognosis and immune checkpoint blockade (ICB) resistance (15–20). Preclinical research and clinical correlational studies suggest that several stromal cell types, such as cancer-associated fibroblast (CAFs), tumor-associated macrophages (TAM) and MDSCs, prevent T-cells from reaching the tumor nest, ultimately limiting the efficacy of ICB (21–24). Conversely, other myeloid cell subsets, such as dendritic cells and anti-tumoral M1 macrophages, exert anti-tumor functions, including antigen cross-presentation and tumor cell phagocytosis (25–28). However, these processes are limited by CD47 upregulation in tumor cells. CD47 (or IAP for integrin-associated protein) is a ubiquitous membrane protein which

binds the innate myeloid immune checkpoint Signal Regulatory Protein- α (SIRP α ; CD172a or SHPS-1) (29–32). SIRP α is an inhibitory membrane receptor of the immunoglobulin superfamily that is expressed on the surface of myeloid cells in the hematopoietic compartment (33). CD47 is a multifaceted protein that also interacts with SIRP γ (a SIRP homolog unique to primates), several integrins, thrombospondin-1 (TSP-1), thrombospondin receptor (CD36), VEGF receptor 2, Serpin A1, and Fas (CD95) (34). Binding of CD47 to SIRP α on myeloid cells induces tyrosine phosphorylation of the ITIMs cytoplasmic domain of SIRP α , with subsequent recruitment of SH2-containing tyrosine phosphatase (SHP-1/2). SHP-1/2 then mediates inhibitory signaling events through protein dephosphorylation, ultimately leading to the inhibition of phagocytosis in macrophages (33, 35). High CD47 expression is a mechanism used by malignant cells to evade the immune system that correlates with poor clinical outcomes (29, 36, 37). Blockade of the CD47-SIRP α interaction with anti-CD47 monoclonal antibodies (mAbs) promotes tumor elimination by macrophages and decreases cancer cell dissemination in both immunodeficient (T-cell lacking) and immunocompetent mice (30, 38–44). Moreover, due to SIRP α 's roles in regulating the cGAS/STING pathway and antigen cross-presentation by dendritic cells (31, 45), anti-CD47 mAbs can also increase cross-priming of CD8 T-cells and induce T-cell-dependent tumor elimination, as shown in preclinical syngeneic rodent models (30, 44). However, whether these mechanisms also function in humans remains unclear (46). Unlike mice (47), humans and higher primates express SIRP γ on T-cells. The interaction of SIRP γ with CD47 has been associated with cell-cell adhesion, T-cell transendothelial migration, and support of T-cell co-stimulation with dendritic cells (48, 49). Preclinical efficacy of CD47/SIRP α -targeting drugs has been assessed *in vitro* in macrophage phagocytosis assays, and *in vivo* using xenograft T-cell immunodeficient mice models (50–55). However, the therapeutic potential of selectively targeting SIRP α to promote T-cell responses in the context of T-cell ICB has not been evaluated in higher species.

In this study, we show that selective SIRP α blockade promotes efficient anti-tumor immune responses and modifies the TME in various syngeneic and orthotopic tumor models. We find a potent synergy between SIRP α blockade and T-cell ICB in inducing memory T-cell responses and preventing T-cell exclusion. Moreover, SIRP α blockade allows T-cell recruitment to the tumor nest by restoring macrophage chemokine secretion and increases human anti-tumor T-cell response by promoting tumor-antigen cross-presentation by dendritic cells, as previously described in rodents. In contrast, targeting CD47 or blocking SIRP α and SIRP γ simultaneously reduces human T-cell activation, proliferation, and transmigration across the human endothelium, highlighting the importance of selectively targeting SIRP α in humans.

Results

Anti-mouse SIRP α mAb monotherapy inhibits tumor growth in orthotopic syngeneic models

The preclinical efficacy of SIRP α blockage in immunocompetent mice was previously reported in heterotopic SIRP α ⁺ tumor models (56), whereby an antagonist anti-mSIRP α mAb antibody (MY1 clone (57), rat IgG2a) with Fc-effector functions promoted antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and phagocytosis (ADCP). To further investigate the importance of target cells opsonization versus SIRP α signaling and interaction with CD47 for the therapeutic efficacy in orthotopic tumor mouse models, a mouse Fc IgG1 was used to engineer a MY1 orthosteric inhibitor that blocks SIRP α /CD47 interaction (MY1-G1, **Extended Figure 1**). Comparisons were also performed with a rat IgG1 P84 allosteric inhibitor that blocks SIRP α signaling without preventing its interaction with CD47. In addition, genetically modified SIRP α mutant mice expressing a truncated SIRP α protein that lacks most of the cytoplasmic signaling domain were examined (58).

Two weeks of P84 and MY1-G1 monotherapies initiated four days after tumor implantation significantly reduced primary mammary tumor growth and prevented lung metastasis development in the orthotopic 4T1 triple-negative breast cancer model in BALB/c mice (**Figure 1A-B**). Tumor-infiltrating leukocyte analysis on day 14 showed an increase in F4/80⁺ MHC-II⁺ CCR7⁺ CD206⁻ M1-macrophage frequency and in the M1/M2 (CCR7⁻ CD206⁺) macrophage ratio, as well as in NK and memory T-cells, thereby confirming that TME modification occurred after anti-SIRP α monotherapy (**Figure 1C**). SIRP α blockade also modified peripheral immune responses, as revealed by the increased frequency of central memory CD44⁺ CD62L⁺ CD4⁺ T lymphocytes in draining lymph nodes, a higher M1/M2 ratio, and a reduction in the frequency of regulatory T-cells (Tregs, CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ CD127^{low}) in the spleen. Surgical resection of primary 4T1 mammary tumors after 10 days of treatment confirmed the significant reduction

in tumor spread and metastasis. Indeed, transient SIRP α blockade with P84 or MY1-G1 resulted in 71% survival when compared to 14% survival in the isotype control group (**Figure 1D**). Moreover, MY1-G1 administration in AK7 orthotopic mesothelioma C57bl/6 mice model significantly prolonged survival (**Figure 1E**). Finally, mutant mice lacking SIRP α signaling and injected with AK-7 mesothelioma tumor cells exhibited prolonged survival by 55%, when compared with wild type (WT) animals. Interestingly, surviving SIRP α -mutant mice were also protected against a second AK7 heterotopic tumor challenge in the peritoneum, suggesting that inhibition of SIRP α signaling produces a robust and durable anti-tumoral response (**Figure 1F**).

Anti-mouse SIRP α mAbs induce durable adaptive immune responses in combination with T-cell immune checkpoint agents

Preclinical syngeneic models with suboptimal response to T-cell ICB were used to assess the efficacy of combined immunotherapies targeting both the innate and adaptive immune checkpoints. Monotherapy with anti-PD-L1 or MY1-G1 anti-mSIRP α mAb significantly inhibited tumor growth in immunocompetent mice implanted subcutaneously with the colon adenocarcinoma MC38 cell line, although a complete response (CR) was only observed in 15-30% of mice (**Figure 2A**). However, the combination of MY1-G1 and anti-PD-L1 mAbs strongly inhibited tumor growth in all mice and induced durable CR in 79% of mice. After complete elimination of the drugs, 90% of the cured mice were resistant to a secondary tumor challenge with the same cell line, suggesting that combined anti-mSIRP α and anti-PD-L1 mAb therapy induces memory immune responses (**Figure 2B**). Similarly, monotherapy with P84 anti-mSIRP α mAb, anti-PD-L1 blocking mAb, or anti-4-1BB agonist mAb significantly prolonged survival in the orthotopic Hepa1.6 hepatocellular carcinoma syngeneic model, albeit with low CR rates (0%, 7%, and 26% respectively, **Figure 2C**). On the other hand, treatment with P84 anti-mSIRP α mAb combined with either anti-PD-L1 or anti-4-1BB induced durable

CRs in 61% and 80% of mice, respectively. MY1-G1 anti-mSIRP α combined with a PD-L1 antagonist or 4-1BB agonist induced durable CR in 100% of mice (**Extended Figure 3 A, B**). Moreover, after the treatment was completed, all of the cured mice successfully rejected a second Hepa1.6 tumor challenge in the absence of any treatment (**Figure 2D, Extended Figure 4C**). Intravenous adoptive transfer of spleen T lymphocytes (2.5×10^6) or whole isolated tumor leukocytes (2×10^6) from anti-mSIRP α + anti-4-1BB cured mice significantly protected naïve and untreated mice after Hepa1.6 orthotopic implantation, further suggesting that this combined treatment induces robust memory immune responses (**Figure 2E**). These results were corroborated by similar adoptive transfer experiments in SIRP α mutant mice treated with anti-4-1BB mAbs (**Extended Figure 4**). Surprisingly, while anti-mSIRP α + anti-PD-L1 cured mice displayed spleen tumor-specific memory T-cells responses *ex vivo* (**Extended Figure 5A**), adoptive transfer of spleen T-cells from these mice had no significant impact on survival (**Figure 2E**). Nonetheless, adoptive intravenous transfer of plasma from anti-mSIRP α + anti-PD-L1 cured mice protected naïve untreated mice (**Figure 2F**). Indeed, mice initially treated with anti-PD-L1 alone or in combination with anti-mSIRP α exhibited plasmatic anti-Hepa1.6 and anti-hepatocyte IgG responses (**Extended Figure 5B, C**). Tumor-infiltrating leukocyte (TIL) analysis after 10 days of treatment confirmed that the combination of SIRP α blockade with anti-PD-L1 or anti-4-1BB modified the TME (**Extended Figure 6**). Specifically, both these combination therapies significantly increased T-cell frequency in the TME and reduced the frequency of immunosuppressive Tregs and MDSCs. However, while combining anti-mSIRP α mAb with anti-4-1BB mAb favored CD8⁺ T-cells, the combination of anti-mSIRP α with anti-PD-L1 favored CD4⁺ T-cells responses. Moreover, SIRP α /PD-L1 combined therapy significantly reduced the frequency of immature transitional B cells but increased plasmablast infiltration.

Anti-mouse and -human SIRP α mAbs promote chemokine secretion and T-cell migration in the tumor nest

Tumor-associated stromal cells (eg. macrophages) have been recently implicated in the immune exclusion phenotype observed in a subcutaneous MC38 tumor model (21). In agreement with these data, we found that after anti-PD-L1 therapy CD3⁺ T-cells weakly infiltrated the tumor nest in the MC38 model (**Figure 2G**). In contrast, SIRP α blockade in combination with T-cell ICB induced T-cell infiltration in the tumor nest, which is consistent with the observed high rates of CR (**Figure 2A**). In the orthotopic Hepa1.6 model, T-cell infiltration increased in the liver after 10 days of treatment with anti-PD-L1 or anti-4-1BB monotherapy. However, these T-cells were mainly on the margin of tumor nodules, in regions where macrophages could also be found (**Figure 2H**). Similar to the MC38 model, anti-mSIRP α + anti-PD-L1 or anti-4-1BB combinations significantly increased CD3⁺ T-cell and F4/80⁺ macrophage infiltration within tumor nodules (**Figure 2H**). Nanostring transcriptomic analysis in the liver (murine PCIP panel) revealed that both SIRP α /PD-L1 and SIRP α /4-1BB combination treatments modified the TME extensively (**Figure 3, Extended Figure 7**) and induced similar changes in gene expression. STRING analysis of the upregulated gene cluster identified increased expression of genes associated with chemokine and cytokine pathways (**Figure 3B, C**) and down-regulation of genes involved in metastasis and the TGF β pathway (**Extended Figure 8**).

Histological and transcriptomic analyses of the TME in our mouse models indicated that, in addition to inhibiting phagocytosis, SIRP α also seems to control the secretion of chemokines by myeloid cells upon interaction with CD47⁺ tumors. Thus, anti-mSIRP α mAbs appear to reinvigorate tumor-associated myeloid cells and promote T-cell attraction to the tumor nest. To assess whether this SIRP α function is conserved in humans, surgically dissociated tumor explants from hepatocellular carcinoma (HCC, n=7), colorectal carcinoma (CRC, n=1),

pancreatic ductal carcinoma (PDAC, n=1), and renal cell carcinoma (RCC, n=2) patients, as well as cells of mesothelioma pleural effusion (Meso, n=7), were cultured *ex vivo* with a selective antagonist human anti-SIRP α mAb (OSE-172, binds selectively SIRP α but not SIRP γ) or an isotype control mAb (**Figure 4A**). Transcriptomic NanoString analysis (Human PCIP panel) conducted after 48 hours revealed that selective anti-hSIRP α mAb alone significantly modified gene expression in a variety of human TMEs (**Figure 4B**, **Extended Figure 9**). Notably, selective anti-hSIRP α mAb induced over-expression of genes involved in chemotaxis and adaptive immune functions (**Figure 4C**). To assess whether chemokine gene expression upregulation induced by SIRP α inhibition is related to tumor-associated myeloid cell modification, isolated CD14⁺ myeloid cells from human ovarian cancer ascites (n=8) were cultured *ex vivo* for 48 hours with selective anti-hSIRP α or isotype mAbs (**Figure 4D**). Transcriptomic (NanoString Human MII_v2 panel) and GSEA analyses showed that selective SIRP α blockade significantly enriches chemokine and cytokine gene expression in myeloid cells, when compared to the isotype control condition (**Figure 4E**). Consistent with this, clustering of the 100 most overexpressed genes in anti-hSIRP α versus isotype conditions identified two clusters of genes associated with chemokine and cytokine functions (**Figure 4F**).

Finally, anti-hSIRP α mAbs restored the CD47-induced reduction in chemokine secretion (*eg.* CCL3, CCL4) by human GM-CSF-derived macrophages from primary blood monocytes of healthy donors *in vitro* (**Figure 5A**). Similarly, selective SIRP α blockade significantly increased CCL4 secretion by human monocytes cultured with different human tumor cell lines (**Figure 5B**). To assess whether human macrophages immunosuppressed by SIRP α signaling affect T-cell migration *in vivo*, we injected monocyte-derived human macrophages intradermally in the ear of immunodeficient mice previously infused intraperitoneally with autologous human peripheral blood leukocytes (**Figure 5C**). Ear immunohistological analysis

performed six hours after macrophage injection showed that human T-cell infiltration is significantly increased by selective anti-hSIRP α mAbs (**Figure 5D,E**). Interestingly, although a non-selective antagonist anti-hSIRP α/γ mAb (Kwar23, binds to both hSIRP α and hSIRP γ and blocks their interaction with CD47) restored chemokine secretion in human macrophages *in vitro* (**Extended Figure 10**), T-cell migration *in vivo* was not affected by this SIRP α/γ antagonist (**Figure 5D**). These data are consistent with previous research suggesting that SIRP γ plays an important role in cell-cell adhesion and/or T-cell transendothelial migration in human T lymphocytes (48, 49).

Selective targeting of human SIRP α without affecting SIRP γ /CD47 interaction increases human T-cell responses

Recently, it has been shown that SIRP α /CD47 blockage using CD47^{-/-} mutant mice or anti-CD47 mAbs (which could opsonize tumor cells) promote antigen cross-presentation by dendritic cells and, consequently, antigen-specific T-cell activation (31, 45). Notably, we found that while type 2 conventional dendritic cells (cDC2, CD11c⁺ CD11b⁺ CD8⁻) express high levels of SIRP α , cDC1 (CD11c⁺ CD11b^{low} CD8⁺) express very low levels of the receptor (**Extended Figure 11A**). Consistent with these SIRP α expression patterns, cDC1 were more efficient than cDC2 in promoting antigen cross-priming of OT-I CD8⁺ T-cells *in vitro* (**Extended Figure 11B**). Moreover, anti-mSIRP α (P84, MY1-G1) and anti-CD47 mAbs significantly increased OT-I T-cells cross-priming by cDC2 but not with cDC1 (**Extended Figure 11C**). To determine a potential function of SIRP α in promoting antigen cross-priming of OT-I CD8⁺ T-cells *in vivo*, anti-mSIRP α (MY1-G1)-treated mice were infused intravenously with OT-I CD8⁺ T-cells. At 48 hours after intraperitoneal challenge with ovalbumin antigen, these mice overexpressed class I MHC, CD86 costimulatory molecule, and CD103 integrin in both cDC1 and cDC2 subsets (**Extended Figure 11D**). Moreover, proliferation of OT-I T-cells

was significantly increased *in vivo* after anti-mSIRP α mAb (MY1-G1) treatment, confirming that inhibiting SIRP α signaling increases CD8⁺ T-cells cross-priming by dendritic cells in mouse.

The potential role of the SIRP γ homologue (**Extended Figure 12**) in human T cell biology raises the question of whether the efficacy of anti-SIRP α antibodies and CD47-targeting drugs in increasing T-cell activity in mice translates similarly to humans. To test this, human tumor Melan-A-specific HLA-A2⁺ CD8⁺ cytotoxic T-cell clones (Melan-A-specific CTL) isolated from melanoma patients (59) were re-stimulated with HLA-A2⁺ monocyte-derived human dendritic cells loaded with a Melan-A 25-mer long peptide. We found that incubation with a selective anti-hSIRP α (OSE-172) mAb significantly increased IFN γ secretion by human Melan-A-specific CTL, whereas a non-selective anti-hSIRP α/γ mAb (Kwar23) and different anti-CD47 mAbs did not (**Figure 6A-B**). Interestingly, the non-selective anti-hSIRP α/γ mAb prevented the beneficial effect of OSE-172 in promoting IFN γ secretion, suggesting that blocking SIRP γ reduces T-cell cross-priming responses. To understand the mechanisms underlying this process, we tested these antibodies using a mouse thymoma T cell line lacking SIRP γ expression and transfected with the TCR of Melan-A-specific human CTL and human CD8. Notably, both the selective anti-hSIRP α mAb alone and the combination of anti-hCD47 + anti-mCD47 mAbs increased T cell response when the thymoma T-cells were co-cultured with HLA-A2⁺ monocyte-derived human dendritic cells loaded with the Melan-A 25-mer long-peptide (**Figure 6C**). Taken together, these results demonstrate that while blocking SIRP α increases antigen-specific cross-presentation by human dendritic cells, blocking the SIRP γ /CD47 interface decreases the cross-priming response of human T lymphocytes. In addition, targeting CD47 on human T-cells with anti-CD47 mAbs also inhibited conventional

anti-CD3 + anti-CD28 polyclonal stimulation, allogeneic stimulation, mixed lymphocyte reaction, and trans-endothelial T-cell migration (**Figure 6 D-G**).

Discussion

ICB therapies targeting T-cells show broad clinical efficacy in oncology, however, the medical needs remain high as up to 70% of patients do not show a long-term response, with the exception of some rare indications. Combination therapies using two types of ICB targeting T-cells have already demonstrated superior clinical efficacy, albeit with increased immune-related adverse events (60). The identification of alternative therapeutic approaches is therefore needed for extending the benefits of immunotherapy beyond inflamed tumors. Simultaneously activating adaptive and innate immune responses otherwise inhibited in the tumor microenvironment (TME) is likely to overcome this limitation. Our study uncovers a previously unknown role of the SIRP α innate immune checkpoint in controlling macrophage chemokine secretion in the TME, and hence in preventing T-cell exclusion from the tumor nest. Moreover, we show that blocking SIRP α signaling synergizes with T-cell immune checkpoint blockade and T-cell co-stimulatory agonists *in vivo*. Importantly, we revealed significant differences in the activity of mAbs targeting either CD47 or SIRP α in humans. Indeed, while selectively blocking SIRP α preserves and enhances T-cells responses, interfering with the SIRP γ /CD47 axis inhibits human T-cell activation, cytokine secretion, and T-cell migration.

Preclinical research mainly using human tumor-xenograft models in immunodeficient mice shows that CD47 blockade effectively promotes tumor elimination by increasing macrophage phagocytosis (50–54). It was also shown that CD47 blockade synergizes with therapeutic anti-tumor antigen antibodies by enhancing antibody-dependent macrophage phagocytosis (42). A recent phase 1b clinical trial on relapsed and refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma patients showed that anti-CD47 mAbs have very promising activity when used in combination with the rituximab anti-CD20 mAb (61). However, due to the ubiquitous expression of CD47, including in erythrocytes and platelets, anti-CD47 therapeutic strategies have limited therapeutic window, as the high dosages needed to overcome antigen sink entail safety risks for

the patients. Moreover, while anti-CD47 mAbs increase macrophage phagocytosis of CD47-expressing tumor cells, they also affect other CD47-ligand pathways, and we currently have limited knowledge of the clinical consequences of interfering with these pathways. Although the preclinical efficacy of anti-SIRP α mAbs has been previously reported (56), the therapeutic potential of SIRP α antagonists in SIRP α -negative tumors was not addressed. Indeed, monotherapy with anti-SIRP α mAbs (with Fc-effector ADCC and ADCP function) has been assessed in heterotopic models of melanoma and renal carcinoma, which are tumors that express unusually high levels of SIRP α (56). Moreover, in SIRP α -negative tumor xenograft models, anti-SIRP α mAbs have only been tested in combination with cytotoxic antibodies (Rituximab, Cetuximab) that are known to induce antibody-dependent macrophage phagocytosis (55, 62).

To evaluate the clinical potential of anti-SIRP α mAbs and understand how SIRP α signals modify the TME, we tested non-cytotoxic antagonist anti-SIRP α mAbs on SIRP α -negative tumor syngeneic and orthotopic mouse models. We found that blocking SIRP α signaling was sufficient to modify the TME. Moreover, anti-SIRP α monotherapy was effective in inhibiting tumor growth and preventing tumor metastasis in triple-negative breast cancer and mesothelioma orthotopic models that are highly enriched in myeloid cells. In models where anti-SIRP α monotherapy showed weak efficacy (e.g. orthotopic hepatocellular carcinoma or subcutaneous colorectal carcinoma models), a strong synergistic association was found with immunotherapies promoting T-cells responses, such as PD1/PD-L1 antagonists or a 4-1BB co-stimulatory agonist. Most of the mice (60-80%) treated with SIRP α /PD-L1 or SIRP α /4-1BB combination therapy eradicated the primary tumor and developed robust and durable adaptive immune memory.

Transcriptomic and histological analyses revealed major TME modification upon SIRP α blockade, including T lymphocyte accumulation within the tumor nest that were otherwise found restricted to the tumor margin. In parallel, significant over-expression of genes encoding for chemokines and cytokines were measured in the TME. These results suggest that anti-SIRP α mAbs may re-invigorate the chemokine secretion by myeloid cells in the TME. Indeed, *ex vivo* experiments using a human whole tumor organoid model or purified CD14⁺ myeloid cells from ovarian carcinoma ascites showed that anti-hSIRP α mAbs induce significant up-regulation of chemokine gene expression. Finally, human macrophages cultured *in vitro* on CD47-coated plates or with different human tumor cell lines exhibited significant inhibition of chemokine secretion, which was reversed by selective anti-hSIRP α mAb. Administration of the selective anti-hSIRP α mAb *in vivo* in humanized mice promoted human T-cell infiltration where human macrophages were implanted. Altogether, these results demonstrate that a high CD47-expression environment, such as a solid tumor microenvironment, may inhibit not only macrophage phagocytosis but also chemokine secretion by myeloid cells via the SIRP α /CD47 axis, thereby contributing to T cell exclusion from the tumor nest and resistance to anti-PD1/PD-L1 immunotherapies.

Anti-CD47 mAbs promote antigen cross-presentation by dendritic cells and increase antigen-specific T-cell activation in mouse (31, 44). In addition, it was recently reported that anti-CD47 antibody-mediated phagocytosis of cancer cells by macrophages can also generate cytotoxic CD8⁺ antitumor T-cell responses in immunocompetent mice (30). Consistent with these data, we found that anti-mSIRP α mAbs promoted antigen-specific CD8⁺ T-cells proliferation by SIRP α ⁺ dendritic cells in mouse. However, these mechanisms could not be translated to human models, likely due to the poorly understood role of the SIRP γ homologue in human T-cell biology. Preliminary reports indicate that SIRP γ may be involved in T cell adhesion, co-

stimulation, and transendothelial migration processes (48, 49). We found that a selective human SIRP α antagonist antibody (i.e. which does not bind to SIRP γ) enhances cross priming by human dendritic cells and antigen-specific human IFN γ T cell response. In contrast, human T-cell response remained unchanged in this cross-priming assay with anti-CD47 mAbs or a non-selective anti-hSIRP α/γ mAb, contradicting our findings in mouse models. This discrepancy between the activity of anti-SIRP α mAb in mice and humans might be explained by differences in dendritic cell biology or, alternatively, by a potential deleterious effect of these antibodies on human T cells. Indeed, experiments using chimeric mouse T-cell clones lacking SIRP γ expression and cultured with human dendritic cells showed that anti-CD47 and anti-hSIRP α mAbs can trigger T-cell responses. Consistent with this, polyclonal and allogeneic human T cell stimulation assays showed that anti-CD47 mAbs induced immunosuppressive effects, whereas the selective anti-hSIRP α mAb preserved T cell responses. Moreover, anti-CD47 mAbs also had a negative impact on human T cell transendothelial migration *in vitro*, in agreement with our *in vivo* data in humanized mice showing that selective anti-hSIRP α mAb promoted human T-cell migration in tissue infiltrated with human macrophages while the non-selective anti-human SIRP α/γ antagonist mAb did not. Altogether, these results reveal that the SIRP γ /CD47 axis plays a previously underappreciated role in human T-cell biology, and suggest that in humans immunotherapies selectively targeting SIRP α differ mechanistically from those targeting CD47.

This study shows that selectively blocking SIRP α on myeloid cells without tumor cell opsonization promotes anti-tumor responses and positively modifies the TME. Notably, the SIRP α /CD47 axis inhibits not only macrophage phagocytosis, but also chemokine secretion in mouse and human myeloid cells, thereby inducing T-cell exclusion from the tumor nest and contributing to resistance to anti-PD1/PD-L1 immunotherapies. Finally, we uncover a novel

role for the human-specific SIRP γ /CD47 axis in promoting human anti-tumor T-cell responses. Thus, selective blockade of SIRP α signaling may open novel treatment avenues to reinstate efficient adaptive immune responses against tumor antigens while offering different therapeutic index than current anti-CD47-based approaches.

Author contributions

Conceived the study: NP, BV

Designed and supervised the experiments: VG, BV, NP

Performed experiments: VG, SP, CM, AM, JD, KB, MC, GP, VT, GT, CT, NV, BM,

Analyzed data and/or provided samples: VG, SP, CM, RA, AG, VV, CB, VC, PAG, CR, JFM, NL, DL, SC, TM, GB

Wrote the manuscript: VG, BV, NP

Competing Interests

The authors of this manuscript have conflicts of interest to disclose: V.G., C.M., B.V. and N.P. are authors of a patent related to SIRP α /CD47. V.G., C.M., D.C., B.V. and N.P. are shareholders of OSE Immunotherapeutics, a company developing SIRP α antagonists.

References

1. Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science* 2015;348(6230):56–61.
2. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 2011;480(7378):480–489.
3. Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* 2018;359(6382):1350–1355.
4. Galluzzi L, Chan TA, Kroemer G, Wolchok JD, López-Soto A. The hallmarks of successful anticancer immunotherapy. *Sci Transl Med* 2018;10(459). doi:10.1126/scitranslmed.aat7807
5. Joyce JA, Fearon DT. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science* 2015;348(6230):74–80.
6. Jiang P et al. Signatures of T cell dysfunction and exclusion predict cancer immunotherapy response. *Nature Medicine* 2018;24(10):1550.
7. Binnewies M et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat. Med.* 2018;24(5):541–550.
8. Jenkins RW, Barbie DA, Flaherty KT. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *British Journal of Cancer* 2018;118(1):9–16.
9. Wei SC, Duffy CR, Allison JP. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discov* 2018;8(9):1069–1086.
10. Cogdill AP, Andrews MC, Wargo JA. Hallmarks of response to immune checkpoint blockade. *British Journal of Cancer* 2017;117(1):1–7.
11. Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, Adaptive and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell* 2017;168(4):707–723.
12. Gentles AJ et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat. Med.* 2015;21(8):938–945.
13. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14(7):399–416.
14. Veglia F, Perego M, Gabrilovich D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat. Immunol.* 2018;19(2):108–119.
15. De Henau O et al. Overcoming resistance to checkpoint blockade therapy by targeting PI3K γ in myeloid cells. *Nature* 2016;539(7629):443–447.
16. Meyer C et al. Frequencies of circulating MDSC correlate with clinical outcome of melanoma patients treated with ipilimumab. *Cancer Immunol. Immunother.* 2014;63(3):247–257.
17. Highfill SL et al. Disruption of CXCR2-mediated MDSC tumor trafficking enhances anti-PD1 efficacy. *Sci Transl Med* 2014;6(237):237ra67.
18. Weber R et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells Hinder the Anti-Cancer Activity of Immune Checkpoint Inhibitors [Internet]. *Front Immunol* 2018;9. doi:10.3389/fimmu.2018.01310

19. Bjoern J et al. Immunological correlates of treatment and response in stage IV malignant melanoma patients treated with Ipilimumab. *Oncoimmunology* 2016;5(4):e1100788.
20. Fridman WH, Zitvogel L, Sautès-Fridman C, Kroemer G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14(12):717–734.
21. Mariathasan S et al. TGF β attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. *Nature* 2018;554(7693):544–548.
22. Peranzoni E et al. Macrophages impede CD8 T cells from reaching tumor cells and limit the efficacy of anti-PD-1 treatment. *PNAS* 2018;115(17):E4041–E4050.
23. Lesokhin AM et al. Monocytic CCR2(+) myeloid-derived suppressor cells promote immune escape by limiting activated CD8 T-cell infiltration into the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 2012;72(4):876–886.
24. Zhu Y et al. CSF1/CSF1R blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models. *Cancer Res.* 2014;74(18):5057–5069.
25. Sánchez-Paulete AR et al. Cancer Immunotherapy with Immunomodulatory Anti-CD137 and Anti-PD-1 Monoclonal Antibodies Requires BATF3-Dependent Dendritic Cells. *Cancer Discov* 2016;6(1):71–79.
26. Salmon H et al. Expansion and Activation of CD103(+) Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition. *Immunity* 2016;44(4):924–938.
27. Spranger S, Dai D, Horton B, Gajewski TF. Tumor-Residing Batf3 Dendritic Cells Are Required for Effector T Cell Trafficking and Adoptive T Cell Therapy. *Cancer Cell* 2017;31(5):711–723.e4.
28. Simpson TR et al. Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J. Exp. Med.* 2013;210(9):1695–1710.
29. Willingham SB et al. The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRP α) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012;109(17):6662–6667.
30. Tseng D et al. Anti-CD47 antibody-mediated phagocytosis of cancer by macrophages primes an effective antitumor T-cell response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013;110(27):11103–11108.
31. Xu MM et al. Dendritic Cells but Not Macrophages Sense Tumor Mitochondrial DNA for Cross-priming through Signal Regulatory Protein α Signaling. *Immunity* 2017;47(2):363–373.e5.
32. Matlung HL, Szilagyi K, Barclay NA, van den Berg TK. The CD47-SIRP α signaling axis as an innate immune checkpoint in cancer. *Immunol. Rev.* 2017;276(1):145–164.
33. Barclay AN, Van den Berg TK. The interaction between signal regulatory protein alpha (SIRP α) and CD47: structure, function, and therapeutic target. *Annu. Rev. Immunol.* 2014;32:25–50.
34. Sick E et al. CD47 update: a multifaceted actor in the tumour microenvironment of potential therapeutic interest. *Br J Pharmacol* 2012;167(7):1415–1430.

35. Oldenborg PA et al. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* 2000;288(5473):2051–2054.
36. Zhao XW et al. CD47-signal regulatory protein- α (SIRP α) interactions form a barrier for antibody-mediated tumor cell destruction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011;108(45):18342–18347.
37. Majeti R et al. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell* 2009;138(2):286–299.
38. Uluçkan O et al. CD47 regulates bone mass and tumor metastasis to bone. *Cancer Res.* 2009;69(7):3196–3204.
39. Chao MP et al. Extranodal dissemination of non-Hodgkin lymphoma requires CD47 and is inhibited by anti-CD47 antibody therapy. *Blood* 2011;118(18):4890–4901.
40. Edris B et al. Antibody therapy targeting the CD47 protein is effective in a model of aggressive metastatic leiomyosarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012;109(17):6656–6661.
41. Theocharides APA et al. Disruption of SIRP α signaling in macrophages eliminates human acute myeloid leukemia stem cells in xenografts. *Journal of Experimental Medicine* 2012;209(10):1883–1899.
42. Weiskopf K et al. Engineered SIRP α variants as immunotherapeutic adjuvants to anticancer antibodies. *Science* 2013;341(6141):88–91.
43. Weiskopf K et al. CD47-blocking immunotherapies stimulate macrophage-mediated destruction of small-cell lung cancer. *J. Clin. Invest.* 2016;126(7):2610–2620.
44. Liu X et al. CD47 blockade triggers T cell-mediated destruction of immunogenic tumors. *Nat Med* 2015;21(10):1209–1215.
45. Liu Q et al. Inhibition of SIRP α in dendritic cells potentiates potent antitumor immunity. *Oncoimmunology* 2016;5(9):e1183850.
46. Veillette A, Chen J. SIRP α –CD47 Immune Checkpoint Blockade in Anticancer Therapy. *Trends in Immunology* 2018;39(3):173–184.
47. Brooke G, Holbrook JD, Brown MH, Barclay AN. Human lymphocytes interact directly with CD47 through a novel member of the signal regulatory protein (SIRP) family. *J. Immunol.* 2004;173(4):2562–2570.
48. Stefanidakis M, Newton G, Lee WY, Parkos CA, Luscinskas FW. Endothelial CD47 interaction with SIRP γ is required for human T-cell transendothelial migration under shear flow conditions in vitro. *Blood* 2008;112(4):1280–1289.
49. Piccio L et al. Adhesion of human T cells to antigen-presenting cells through SIRP β 2-CD47 interaction costimulates T-cell proliferation. *Blood* 2005;105(6):2421–2427.
50. Gholamin S et al. Disrupting the CD47-SIRP α anti-phagocytic axis by a humanized anti-CD47 antibody is an efficacious treatment for malignant pediatric brain tumors. *Science Translational Medicine* 2017;9(381):eaaf2968.

51. Zeng D et al. A fully human anti-CD47 blocking antibody with therapeutic potential for cancer. *Oncotarget* 2016;7(50):83040–83050.
52. Liu J et al. Pre-Clinical Development of a Humanized Anti-CD47 Antibody with Anti-Cancer Therapeutic Potential [Internet]. *PLoS One* 2015;10(9). doi:10.1371/journal.pone.0137345
53. Petrova PS et al. TTI-621 (SIRP α Fc): A CD47-Blocking Innate Immune Checkpoint Inhibitor with Broad Antitumor Activity and Minimal Erythrocyte Binding. *Clin. Cancer Res.* 2017;23(4):1068–1079.
54. Piccione EC et al. SIRP α -Antibody Fusion Proteins Selectively Bind and Eliminate Dual Antigen-Expressing Tumor Cells. *Clin. Cancer Res.* 2016;22(20):5109–5119.
55. Ring NG et al. Anti-SIRP α antibody immunotherapy enhances neutrophil and macrophage antitumor activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2017;114(49):E10578–E10585.
56. Yanagita T et al. Anti-SIRP α antibodies as a potential new tool for cancer immunotherapy. *JCI Insight* 2017;2(1):e89140.
57. Verjan Garcia N et al. SIRP α /CD172a regulates eosinophil homeostasis. *J. Immunol.* 2011;187(5):2268–2277.
58. Inagaki K et al. SHPS-1 regulates integrin-mediated cytoskeletal reorganization and cell motility. *EMBO J* 2000;19(24):6721–6731.
59. Vignard V et al. Adoptive transfer of tumor-reactive Melan-A-specific CTL clones in melanoma patients is followed by increased frequencies of additional Melan-A-specific T cells. *J. Immunol.* 2005;175(7):4797–4805.
60. Postow MA, Sidlow R, Hellmann MD. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *New England Journal of Medicine* 2018;378(2):158–168.
61. Advani R et al. CD47 Blockade by Hu5F9-G4 and Rituximab in Non-Hodgkin's Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 2018;379(18):1711–1721.
62. Murata Y et al. Anti-human SIRP α antibody is a new tool for cancer immunotherapy. *Cancer Sci.* 2018;109(5):1300–1308.

Figures legends (legend < 250 words for each figure)

Figure 1: Anti-SIRP α monotherapy efficacy in orthotopic syngeneic tumor models

(A) Primary tumor volume and (B) lung metastasis count in the 4T1 triple-negative breast orthotopic tumor model (0.25×10^6 cells injected in the mammary fat gland) of mice treated i.p. with a control mAb (black, n=7), the P84 (red, n=8) or MY1-G1 (blue, n=6) anti-SIRP α antagonist mAbs at 10mg/kg three times from day 4 to day 18. (C) Tumor infiltrating and peripheral leukocyte phenotype modification after treatment with P84 (red, n=7) or control (black, n=9) mAbs 15 days after tumor implantation. (D) Same protocols and symbols as in (A), but a surgical resection of the primary tumor was performed 13 days after tumor implantation and the survival of mice (n=7 per group) was analyzed. (E) Survival of WT (black, n=23) and SIRP α mutant (purple, n=11) untreated mice injected on day 0 in the pleural cavity with AK-7 mesothelioma tumor cells (3×10^6). Some WT mice were also treated i.p. with the MY-1-mG1 anti-SIRP α mAb (blue, n=16) from d4 to d32 at 10mg/kg three times a week. Three independent experiments were performed. (F) Cured-SIRP α mutant mice from the AK7 model were rechallenged i.p. with a new load of 3×10^6 AK-7 cells (n=6). Same injection was performed in untreated WT mice as control (n=7). CR: Complete Response. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005 (unpaired Mann-Whitney or log-rank for survival).

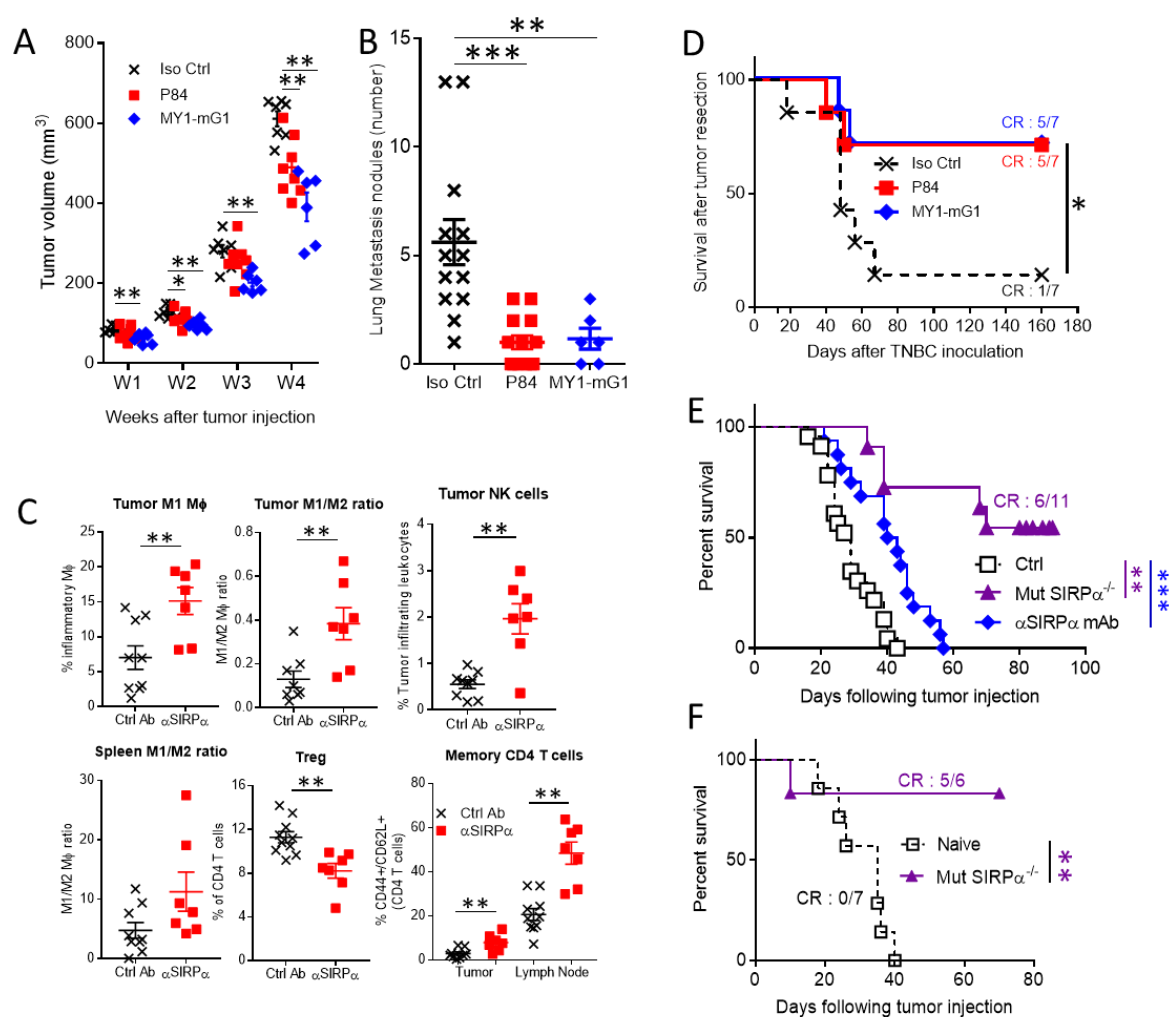


Figure 2: Anti-SIRP α synergizes with anti-PD-L1 and anti-4-1BB mAbs and prevents T-cell exclusion

(A) Tumor volume in the MC38 colorectal carcinoma model of mice treated i.p. three times a week (day 4-28) with a control mAb (black, n=6), MY1-G1 anti-SIRP α mAb (blue, 10 mg/kg, n =13), an anti-PD-L1 mAbs (10F-9G2, empty green triangle, 6 mg/kg, n=12) or the combination of MY1-G1 and anti-PD-L1 (full green triangle, n=28). (B) Survival of untreated naïve mice (black, n=7) or MC38 tumor-free mice treated with the anti-SIRP α +PD-L1 combination (green, n=10) and rechallenged with MC38 cells 2 months after first tumor inoculation. (C) Survival of mice in the Hepa1.6 hepatocellular carcinoma orthotopic model treated i.p. from (day4-28) three times a week with control mAb (black, n=48), the P84 anti-SIRP α mAb (red, 10 mg/kg, n=48), anti-PD-L1 (empty green triangle, 6 mg/kg, n=14) or P84+ anti-PDL-1 (full green triangle, n=18). Some mice received two i.p. injection (day 4 & 8) of 3 mg/kg of an anti-4-1BB agonist (3H3, empty blue round, n=15) alone or in combination with P84 (full blue round, n=15). Three independent experiments are represented. (D) Survival of untreated naïve mice or Hepa1.6-cured mice in combination rechallenged with Hepa 1.6 cells injection in the spleen 3-4 months after first tumor inoculation. Same symbols as in (C). (E) Survival of untreated naïve mice implanted with Hepa 1.6 cells in the portal vein after adoptive transfer of 10×10^6 splenocytes or 2.5×10^6 spleen T-cells isolated from cured mice in (D). (F) Same as in (E) after adoptive transfer of 200 μ L of plasma from PD-L1/SIRP α -cured mice. (G) T-cell infiltrates histological quantification in the MC38 model three weeks after tumor inoculation, same treatment as in (A). blue: nucleus, green: CD3. (H) T-cell and macrophage infiltrates histological quantification in the Hepa1.6 model two weeks after tumor inoculation, same treatment as in (C). blue: nucleus, green: CD3, red: F4/80. CR: Complete Response. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005, ****P < 0.001 (unpaired Kruskal-Wallis, Mann-Whitney or log-rank for survival).

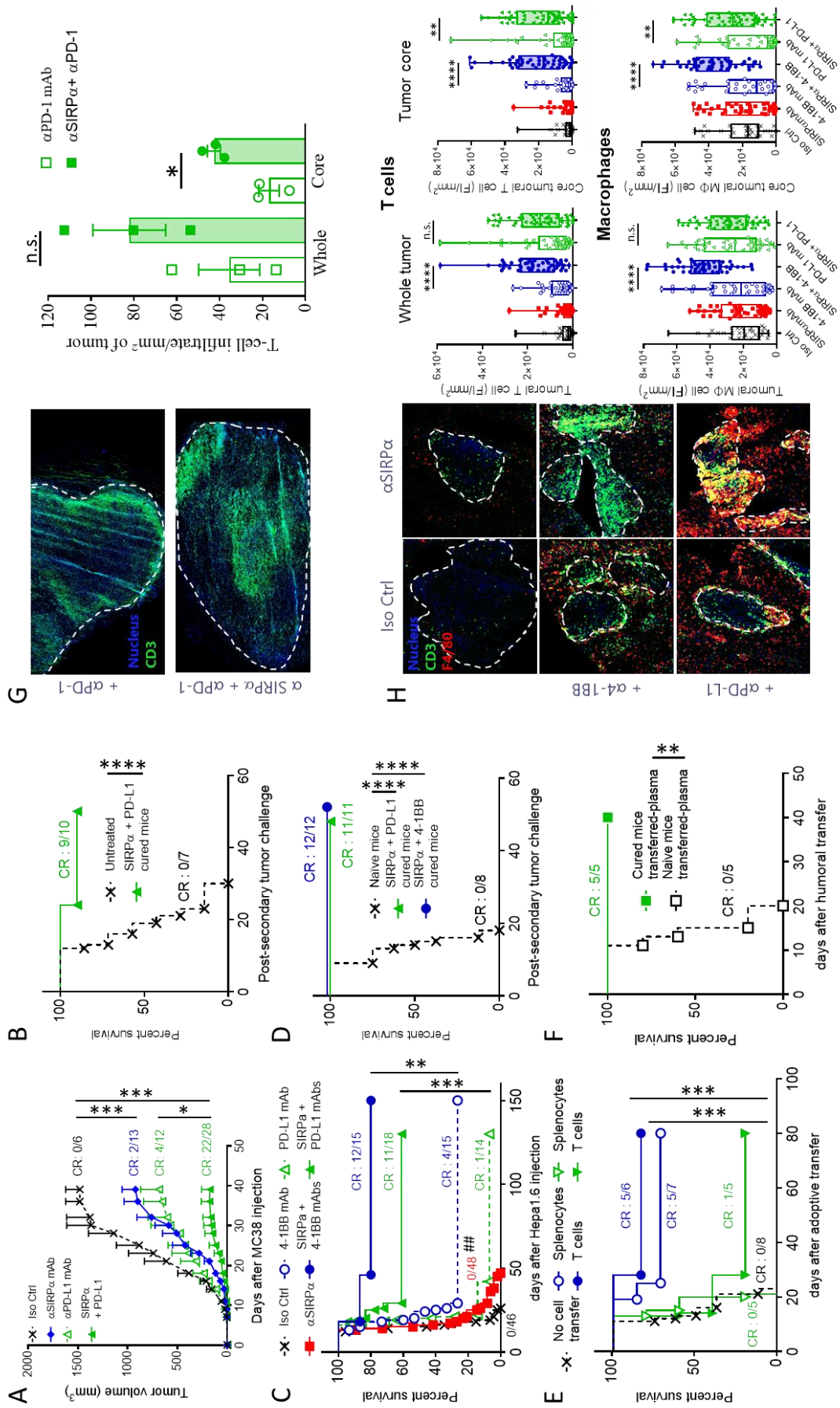


Figure 3: Tumor microenvironment transcriptomic modifications after anti-SIRP α combination therapy in mouse

Transcriptomic NanoString (PanCancer Immune Profiling panel) analysis of the liver of mice in the orthotopic Hepa1.6 hepatocellular carcinoma model ten days after treatment initiation. Same color and symbols as Figure 2C. **(A)** nSolver relative gene expression analysis and heatmap representation (normalized to the median of control group) of mice treated with control Ab (n=5), P84 anti-SIRP α mAb (n=4), 4-1BB agonist +/- P84 (*Up*, n=6/group) or anti-PD-L1 mAb +/- P84 (*Bottom*, n=6/group). The solid line rectangle surrounds the cluster of gene expression increased with P84 combination, while the dotted line rectangle surrounds the cluster of gene expression decreased with P84 combination (see Extended Figure 8 for detailed list). **(B)** STRING protein-protein network analysis of upregulated gene cluster surrounds by the solid line rectangle in (A). **(C)** Transcriptomic gene expression signature as annotated by NanoString according the related function obtained using nSolver advanced analysis. *P < 0.05, **P < 0.01 (unpaired Kruskal-Wallis).

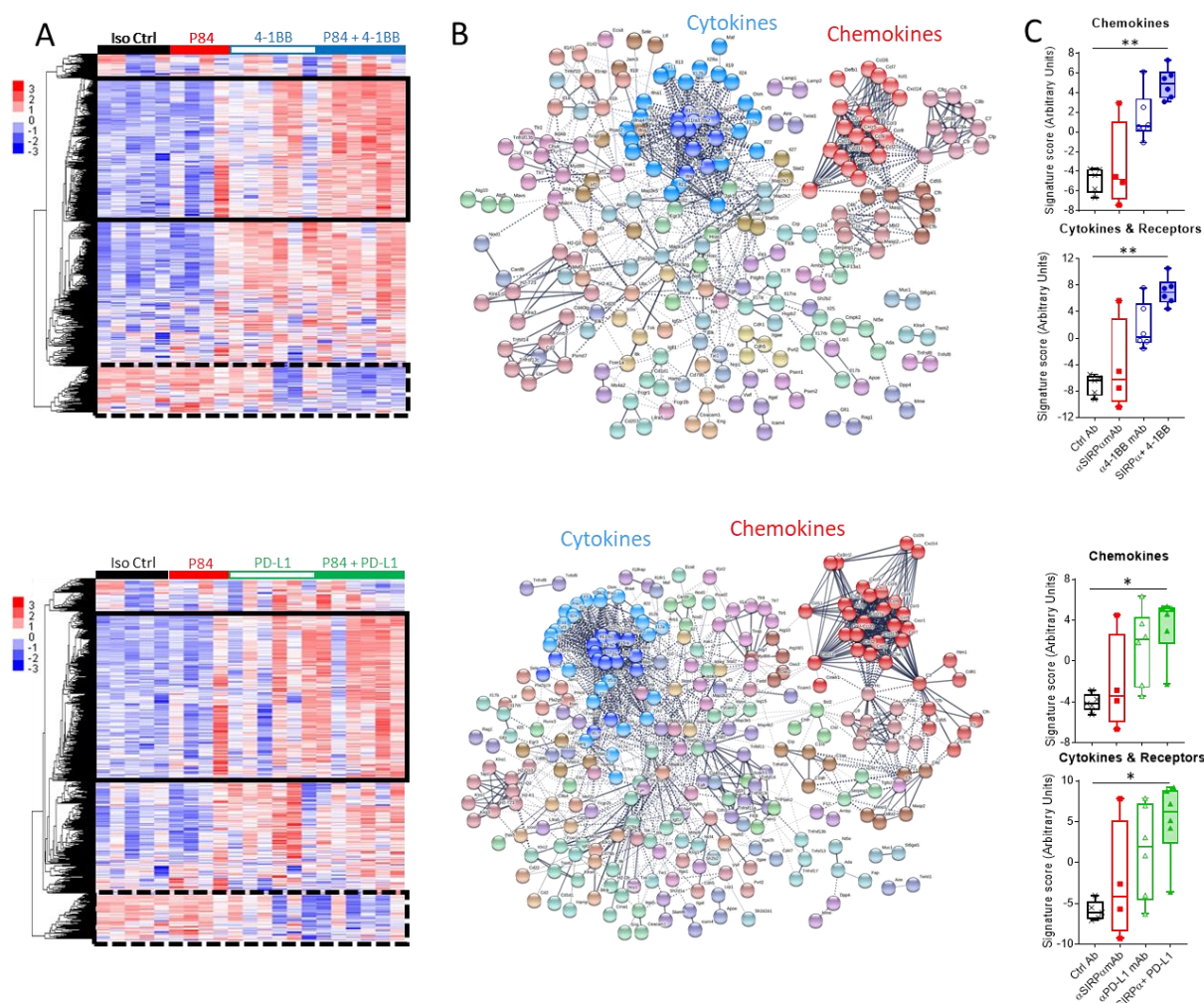


Figure 4: Anti-SIRPα mAb reinvigorates myeloid cells in the human tumor microenvironment

(A) Fresh human surgical tumor explants (HCC n=7, RCC n=2, CRC n=1, PDAC n=1) dissociated in small organoids by enzymatic and mechanical digestion or cells from mesothelioma pleural effusion (n=7), were cultured for 48 hours with 10 µg/ml of selective anti-SIRPα (OSE-172) or irrelevant control mAbs. Transcriptomic analysis was performed using the Human PanCancer Immune Profiling panel (NanoString). (B) nSolver relative gene expression analysis and Volcano plot representation using the Benjamini-Hochberg method to adjust the p-value and the tumor origin as a confounding factor. (C) Heatmap representation of the significantly overexpressed genes after treatment with anti-SIRPα (*Left*). Gene expression signatures of main function identified in overexpressed genes as annotated by NanoString (*Right*). (D) Myeloid cells from ovarian cancer ascites were isolated after Ficoll separation of ascites fluid and magnetic separation of CD14+ cells. Isolated myeloid cells were cultured for 48 hours with 10 µg/ml of selective anti-SIRPα (OSE-172) or irrelevant control mAbs. Transcriptomic analysis was performed using the Myeloid Innate Immunity panel_v2 (NanoString). (E) Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of functional gene expression signatures identified by nSolver analysis as significantly over-expressed after anti-SIRPα treatment. (F) STRING protein-protein network analysis top 100 most overexpressed genes after anti-SIRPα treatment (*Left*). Heatmap representation of individual patient gene expression from the two main functional clusters (chemokine and cytokines) identified by the STRING analysis (*Right*). *P < 0.05, ****P < 0.0001 (paired Mann-Whitney).

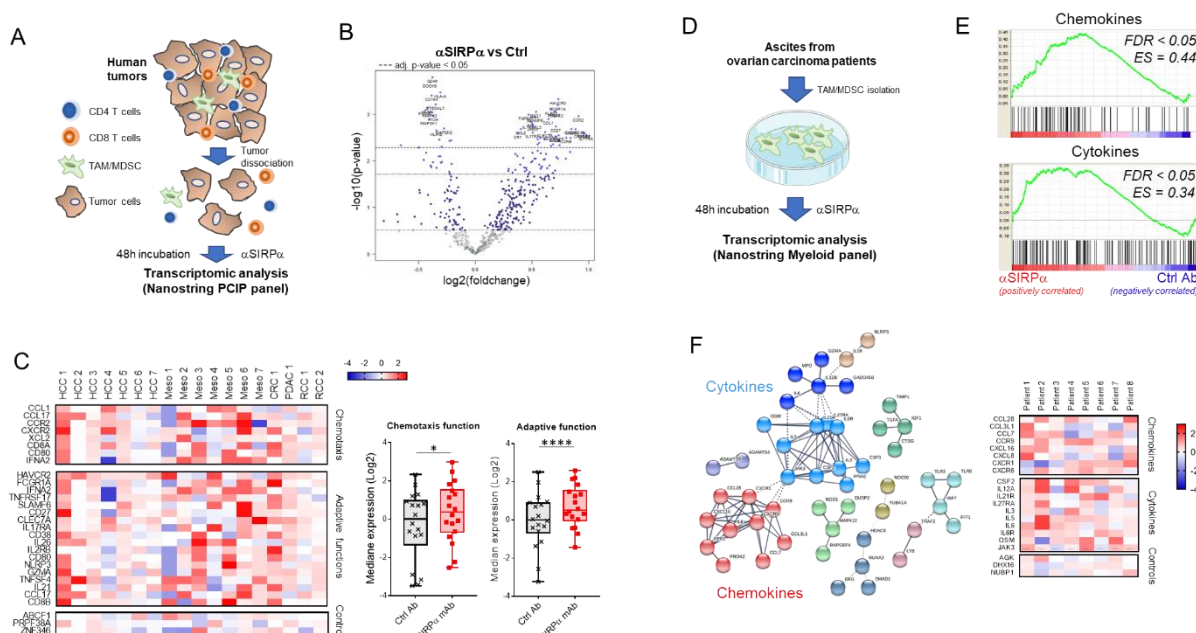


Figure 5: Anti-SIRP α mAb reinstates myeloid cell chemokine secretion and human T-cell migration

(A) CCL3 (n=7) and CCL4 (n=6) chemokines secretion of human macrophages cultured for 24 hours on normal or CD47-coated plate with or without anti-SIRP α mAb (OSE-172, 10 μ g/ml). (B) CCL4 secretion of human monocytes cultured 24 hours in contact with different human tumor cell lines and 10 μ g/ml of anti-SIRP α mAb (OSE-172) or irrelevant control Ab (one representative donor over n=5). (C) Immunodeficient NSG-SGM3 mice (expressing human IL3, GM-CSF and SCF) humanized with 30.10⁶ human PBMC injected intraperitoneally were treated i.p. on day 4 with 10 mg/kg of a selective anti-SIRP α mAb (OSE-172, n=10), a non-selective anti-SIRP α/γ mAb (Kwar23, n=3) or an irrelevant control mAb (n=11). Intradermal injection in the ear of autologous human macrophages (generated in vitro from blood monocytes cultured 5 days with 100ng/ml M-CSF) was performed on day 5. (D) The ear was collected for immunohistological analysis 6 hours after macrophages injection. T-cell infiltration was quantified per mm³ of tissue using quantification of CD3⁺ cells on serial sections from each individual mouse (E) Representative example of human CD3 staining (green) and nucleus (blue) from each group. (D-E). *P < 0.05, **P < 0.01 (unpaired Mann-Whitney).

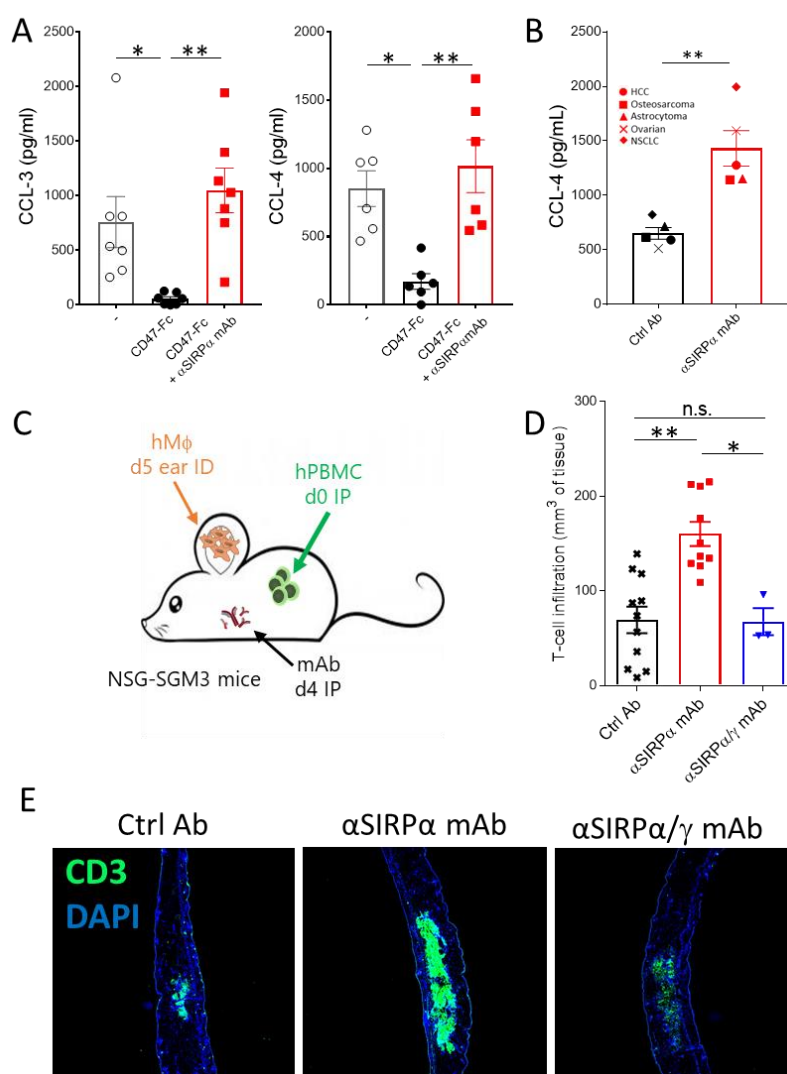
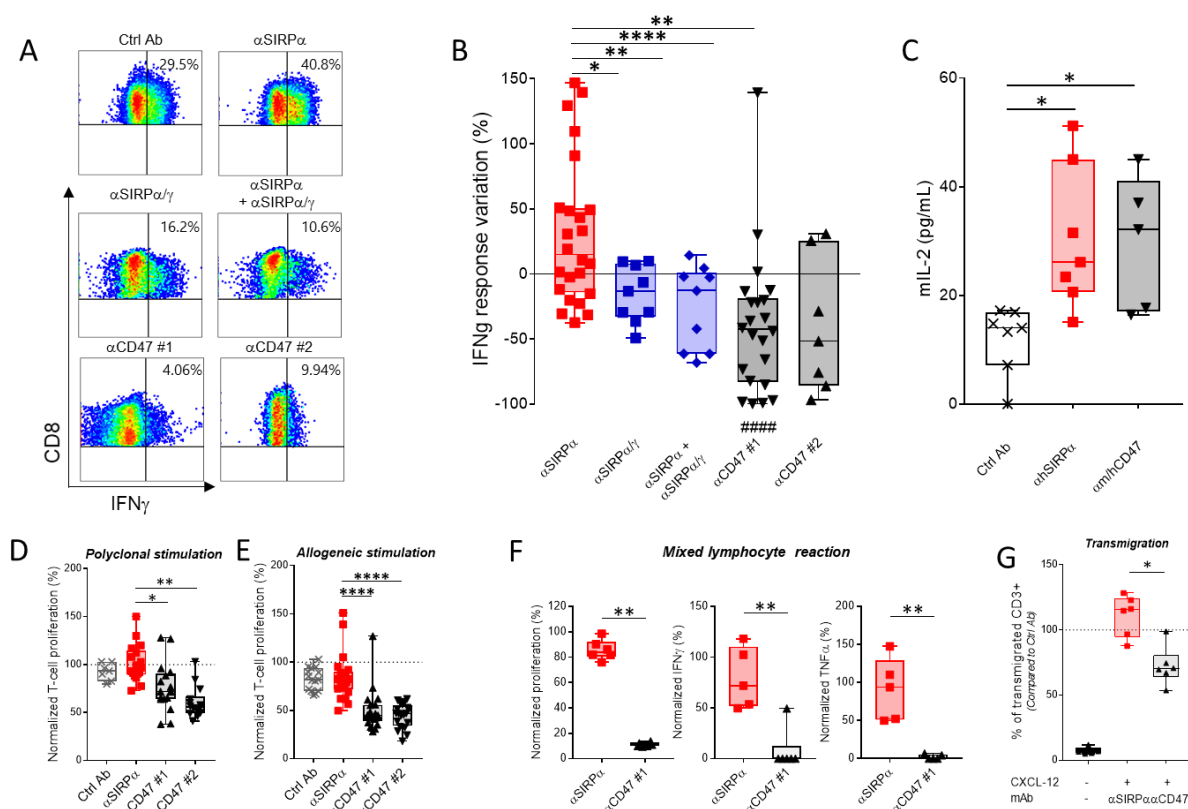


Figure 6: Selective targeting of SIRP α sparing SIRP γ /CD47 preserves human T-cell responses

(A) Representative IFN γ response of human HLA-A2/Melan-A-specific CD8 $^{+}$ T clones stimulated for 6 hours with human HLA-A2 $^{+}$ dendritic cells cross-presenting the long peptide Melan-A/MART-1 and pre-incubated for 24 hours with the peptide and 10 μ g/ml of different mAbs targeting the SIRP α /SIRP γ /CD47 pathway. (B) Quantification of the IFN γ response as in (A) in indicated mAbs conditions normalized to the irrelevant control mAb condition for each dendritic cell donors. (C) IL-2 secretion by a mouse chimeric thymoma cell line transfected with human CD8 and the HLA-A2/Melan-A TCR cultured for 48 hours with human HLA-A2 $^{+}$ dendritic cells loaded with Melan-A long peptide and cultured with different mAb targeting at SIRP α or CD47 as in (A). (D) Proliferation of isolated human T-cells from human PBMC cultured with 10 μ g/ml of indicated anti-SIRP α or CD47 mAbs for 3 days with anti-CD3/anti-CD28 coated beads or (E) for 5 days with allogeneic LPS-matured human dendritic cells. Proliferation was measured by thymidine incorporation and normalized with the control condition. (F) Human PBMCs from allogeneic healthy donors were cultured for 5 days with the indicated mAbs at 10 μ g/mL. T-cell proliferation was assessed by H 3 thymidine incorporation, and TNF α and IFN γ secretion was quantified by ELISA in the supernatant and normalized to the control condition. (G) Human T-cell migration across a monolayer of TNF α -activated endothelial cells in the presence of 10 μ g/ml of indicated mAbs and CXCL-12 (50 ng/ml) as chemoattractant. The number of transmigrated T-cells was determined by flow cytometry after 4 hours of co-cultured and normalized with the control condition. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.005, **** P < 0.001 between indicated conditions (unpaired Kruskal-Wallis, Mann-Whitney). ##### P < 0.001 as compare to control Ab condition.



BIBLIOGRAPHIE

1. Bennett JE, Stevens GA, Mathers CD, Bonita R, Rehm J, Kruk ME, et al. NCD Countdown 2030: worldwide trends in non-communicable disease mortality and progress towards Sustainable Development Goal target 3.4. *The Lancet* 2018;392:1072–88.
2. Boutayeb A, Boutayeb S. The burden of non communicable diseases in developing countries. *Int. J. Equity Health* 2005;4:2.
3. Reddy K. Srinath, Yusuf Salim. Emerging Epidemic of Cardiovascular Disease in Developing Countries. *Circulation* 1998;97:596–601.
4. Allender S, Foster C, Hutchinson L, Arambepola C. Quantification of Urbanization in Relation to Chronic Diseases in Developing Countries: A Systematic Review. *J. Urban Health Bull. N. Y. Acad. Med.* 2008;85:938–51.
5. Diabetes [Internet]. [cited 2020 Feb 20];Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
6. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res. Clin. Pract.* [Internet] 2019 [cited 2020 Feb 20];157. Available from: [https://www.diabetesresearchclinicalpractice.com/article/S0168-8227\(19\)31230-6/abstract](https://www.diabetesresearchclinicalpractice.com/article/S0168-8227(19)31230-6/abstract)
7. WHO | Noncommunicable diseases country profiles 2018 [Internet]. WHO [cited 2020 Feb 18];Available from: <http://www.who.int/nmh/publications/ncd-profiles-2018/en/>
8. Furman D, Campisi J, Verdin E, Carrera-Bastos P, Targ S, Franceschi C, et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat. Med.* 2019;25:1822–32.
9. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* 2017;9:7204–18.
10. Roda G, Jharap B, Neeraj N, Colombel J-F. Loss of Response to Anti-TNFs: Definition, Epidemiology, and Management. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 2016;7:e135.
11. Antoni C, Braun J. Side effects of anti-TNF therapy: Current knowledge. :6.
12. Opie EL. EXPERIMENTAL PLEURISY-RESOLUTION OF A FIBRINOUS EXUDATE. *J. Exp. Med.* 1907;9:391–413.
13. Serhan CN, Clish CB, Brannon J, Colgan SP, Chiang N, Gronert K. Novel Functional Sets of Lipid-Derived Mediators with Antiinflammatory Actions Generated from Omega-3 Fatty Acids via Cyclooxygenase 2–Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs and Transcellular Processing. *J. Exp. Med.* 2000;192:1197–204.

14. Sugimoto MA, Sousa LP, Pinho V, Perretti M, Teixeira MM. Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset? *Front. Immunol.* [Internet] 2016 [cited 2019 Sep 13];7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4845539/>
15. Ortega-Gómez A, Perretti M, Soehnlein O. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol. Med.* 2013;5:661–74.
16. Serhan CN. Resolution Phase of Inflammation: Novel Endogenous Anti-Inflammatory and Proresolving Lipid Mediators and Pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 2007;25:101–37.
17. Lawrence T, Gilroy DW. Chronic inflammation: a failure of resolution? *Int. J. Exp. Pathol.* 2007;88:85–94.
18. Nathan C, Ding A. Nonresolving Inflammation. *Cell* 2010;140:871–82.
19. Fullerton JN, Gilroy DW. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2016;15:551–67.
20. Arita M, Bianchini F, Aliberti J, Sher A, Chiang N, Hong S, et al. Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. *J. Exp. Med.* 2005;201:713–22.
21. Ishida T, Yoshida M, Arita M, Nishitani Y, Nishiumi S, Masuda A, et al. Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from eicosapentaenoic acid, prevents dextran sulfate sodium induced colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 2010;16:87–95.
22. Lee C-T, Teles R, Kantarci A, Chen T, McCafferty J, Starr JR, et al. Resolvin E1 Reverses Experimental Periodontitis and Dysbiosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2016;197:2796–806.
23. Kebir DE, Gjorstrup P, Filep JG. Resolvin E1 promotes phagocytosis-induced neutrophil apoptosis and accelerates resolution of pulmonary inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012;109:14983–8.
24. Tracy RP. The Five Cardinal Signs of Inflammation: Calor, Dolor, Rubor, Tumor ... and Penuria (Apologies to Aulus Cornelius Celsus, *De medicina*, c. A.D. 25). *J. Gerontol. Ser. A* 2006;61:1051–2.
25. Muller WA. Getting Leukocytes to the Site of Inflammation. *Vet. Pathol.* 2013;50:7–22.
26. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 2010;140:805–20.
27. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000;406:782–7.
28. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* 2010;10:826–37.
29. Mossman BT, Churg A. Mechanisms in the Pathogenesis of Asbestosis and Silicosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998;157:1666–80.
30. Weiner HL, Frenkel D. Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2006;6:404–16.

31. Ross R. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease [Internet]. <http://dx.doi.org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1056/NEJM1999011434002072008> [cited 2020 Feb 3]; Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM199901143400207>
32. Freire MO, Van Dyke TE. Natural resolution of inflammation. *Periodontol.* 2000 2013;63:149–64.
33. Abdulkhaleq LA, Assi MA, Abdullah R, Zamri-Saad M, Taufiq-Yap YH, Hezmee MNM. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Vet. World* 2018;11:627–35.
34. Branco ACCC, Yoshikawa FSY, Pietrobon AJ, Sato MN. Role of Histamine in Modulating the Immune Response and Inflammation [Internet]. *Mediators Inflamm.* 2018 [cited 2020 Feb 20]; Available from: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2018/9524075/>
35. Herr N, Bode C, Duerschmied D. The Effects of Serotonin in Immune Cells. *Front. Cardiovasc. Med.* [Internet] 2017 [cited 2020 Feb 20];4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5517399/>
36. Dray A, Perkins M. Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosci.* 1993;16:99–104.
37. Paterson KJ, Zambreanu L, Bennett DLH, McMahon SB. Characterisation and mechanisms of bradykinin-evoked pain in man using iontophoresis. *Pain* 2013;154:782–92.
38. Weisel JW, Litvinov RI. Fibrin Formation, Structure and Properties [Internet]. In: Parry DAD, Squire JM, editors. *Fibrous Proteins: Structures and Mechanisms*. Cham: Springer International Publishing; 2017 [cited 2020 Jan 29]. page 405–56. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-49674-0_13
39. Klos A, Tenner AJ, Johswich K-O, Ager RR, Reis ES, Köhl J. The Role of the Anaphylatoxins in Health and Disease. *Mol. Immunol.* 2009;46:2753.
40. Oppenheim JJ, Biragyn A, Kwak LW, Yang D. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann. Rheum. Dis.* 2003;62:ii17–21.
41. GAO S, ZHU H, ZUO X, LUO H. Cathepsin G and Its Role in Inflammation and Autoimmune Diseases. *Arch. Rheumatol.* 2018;33:498–504.
42. Manicone AM, McGuire JK. Matrix Metalloproteinases as Modulators of Inflammation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2008;19:34–41.
43. Szabo KA, Ablin RJ, Singh G. Matrix metalloproteinases and the immune response. *Clin. Appl. Immunol. Rev.* 2004;4:295–319.
44. Funk CD. Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. *Science* 2001;294:1871–5.
45. Gao L, Zackert WE, Hasford JJ, Danekis ME, Milne GL, Remmert C, et al. Formation of Prostaglandins E2 and D2 via the Isoprostane Pathway A MECHANISM FOR THE GENERATION OF BIOACTIVE PROSTAGLANDINS INDEPENDENT OF CYCLOOXYGENASE. *J. Biol. Chem.* 2003;278:28479–89.

46. Kalinski P. Regulation of Immune Responses by Prostaglandin E2. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2012;188:21–8.
47. Lipsky PE. Role of cyclooxygenase-1 and -2 in health and disease. *Am. J. Orthop. Belle Mead NJ* 1999;28:8–12.
48. Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene* 1999;18:7908–16.
49. Camussi G, Tetta C, Baglioni C. The role of platelet-activating factor in inflammation. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1990;57:331–8.
50. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 2014;1843:2563–82.
51. Hanada T, Yoshimura A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002;13:413–21.
52. Ren K, Torres R. Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. *Brain Res. Rev.* 2009;60:57–64.
53. Zetterström M, Sundgren-Andersson AK, Ostlund P, Bartfai T. Delineation of the proinflammatory cytokine cascade in fever induction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1998;856:48–52.
54. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* [Internet] 2014 [cited 2020 Feb 20];6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4176007/>
55. Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem. J.* 1990;265:621–36.
56. Zelová H, Hošek J. TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. AI* 2013;62:641–51.
57. Parameswaran N, Patial S. Tumor Necrosis Factor- α Signaling in Macrophages. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 2010;20:87–103.
58. Zabel BA, Rott A, Butcher EC. Leukocyte Chemoattractant Receptors in Human Disease Pathogenesis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2015;10:51–81.
59. Proost P, Wuyts A, van Damme J. The role of chemokines in inflammation. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 1996;26:211–23.
60. de Oliveira S, Reyes-Aldasoro CC, Candel S, Renshaw SA, Mulero V, Calado Â. Cxcl8 (Interleukin-8) mediates neutrophil recruitment and behavior in the zebrafish inflammatory response. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2013;190:4349–59.
61. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* 2010;31:318–24.

62. Lieschke GJ, Grail D, Hodgson G, Metcalf D, Stanley E, Cheers C, et al. Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood* 1994;84:1737–46.
63. Liu F, Wu HY, Wesselschmidt R, Kornaga T, Link DC. Impaired production and increased apoptosis of neutrophils in granulocyte colony-stimulating factor receptor-deficient mice. *Immunity* 1996;5:491–501.
64. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects. *Lab. Invest.* 2000;80:617–53.
65. Lee WL, Harrison RE, Grinstein S. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect.* 2003;5:1299–306.
66. Nguyen GT, Green ER, Mecsas J. Neutrophils to the ROScue: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* [Internet] 2017 [cited 2019 Sep 18];7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5574878/>
67. Lacy P. Mechanisms of Degranulation in Neutrophils. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* 2006;2:98.
68. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* 2004;303:1532–5.
69. Pruchniak MP, Arazna M, Demkow U. Life of neutrophil: From stem cell to neutrophil extracellular trap. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2013;187:68–73.
70. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2018;18:134–47.
71. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 2007;176:231–41.
72. Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BNV, Zbytnuik LD, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat. Med.* 2012;18:1386–93.
73. Ostanin DV, Kurmaeva E, Furr K, Bao R, Hoffman J, Berney S, et al. Acquisition of Antigen-Presenting Functions by Neutrophils Isolated from Mice with Chronic Colitis. *J. Immunol.* 2012;188:1491–502.
74. Vono M, Lin A, Norrby-Teglund A, Koup RA, Liang F, Loré K. Neutrophils acquire the capacity for antigen presentation to memory CD4+ T cells in vitro and ex vivo. *Blood* 2017;129:1991–2001.
75. Jones HR, Robb CT, Perretti M, Rossi AG. The role of neutrophils in inflammation resolution. *Semin. Immunol.* 2016;28:137–45.
76. Barletta KE, Ley K, Mehrad B. Regulation of neutrophil function by adenosine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012;32:856–64.
77. Cadieux J-S, Leclerc P, St-Onge M, Dussault A-A, Laflamme C, Picard S, et al. Potentiation of neutrophil cyclooxygenase-2 by adenosine: an early anti-inflammatory signal. *J. Cell Sci.* 2005;118:1437–47.

78. Basil MC, Levy BD. Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2016;16:51–67.
79. Perretti M, Solito E. Annexin 1 and neutrophil apoptosis. *Biochem. Soc. Trans.* 2004;32:507–10.
80. McCracken JM, Allen L-AH. Regulation of Human Neutrophil Apoptosis and Lifespan in Health and Disease. *J. Cell Death* 2014;7:15–23.
81. Elliott MR, Koster KM, Murphy PS. Efferocytosis Signaling in the Regulation of Macrophage Inflammatory Responses. *J. Immunol.* 2017;198:1387–94.
82. Martin JC, Chang C, Boschetti G, Ungaro R, Giri M, Grout JA, et al. Single-Cell Analysis of Crohn's Disease Lesions Identifies a Pathogenic Cellular Module Associated with Resistance to Anti-TNF Therapy. *Cell* 2019;178:1493-1508.e20.
83. the Immunological Genome Consortium, Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, et al. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat. Immunol.* 2012;13:1118–28.
84. Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* [Internet] 2018 [cited 2020 Feb 20];19. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6032107/>
85. Jaguin M, Houlbert N, Fardel O, Lecureur V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell. Immunol.* 2013;281:51–61.
86. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.* 2010;11:889–96.
87. Watanabe S, Alexander M, Misharin AV, Budinger GRS. The role of macrophages in the resolution of inflammation. *J. Clin. Invest.* 2019;129:2619–28.
88. Jegalian AG, Facchetti F, Jaffe ES. Plasmacytoid Dendritic Cells: Physiologic Roles and Pathologic States. *Adv. Anat. Pathol.* 2009;16:392–404.
89. Steinman RM, Inaba K. Myeloid dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 1999;66:205–8.
90. Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology* 2018;154:3–20.
91. Tal O, Lim HY, Gurevich I, Milo I, Shipony Z, Ng LG, et al. DC mobilization from the skin requires docking to immobilized CCL21 on lymphatic endothelium and intralymphatic crawling. *J. Exp. Med.* 2011;208:2141–53.
92. Worbs T, Hammerschmidt SI, Förster R. Dendritic cell migration in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2017;17:30–48.
93. Hildner K, Edelson BT, Purtha WE, Diamond M, Matsushita H, Kohyama M, et al. Batf3 Deficiency Reveals a Critical Role for CD8 α ⁺ Dendritic Cells in Cytotoxic T Cell Immunity. *Science* 2008;322:1097–100.

94. Plantinga M, Guillems M, Vanheerswynghe M, Deswarte K, Branco-Madeira F, Toussaint W, et al. Conventional and Monocyte-Derived CD11b⁺ Dendritic Cells Initiate and Maintain T Helper 2 Cell-Mediated Immunity to House Dust Mite Allergen. *Immunity* 2013;38:322–35.
95. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. B Cells and Antibodies. *Mol. Biol. Cell* 4th Ed. [Internet] 2002 [cited 2020 Feb 20]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26884/>
96. Pereira HA, Hosking CS. The role of complement and antibody in opsonization and intracellular killing of *Candida albicans*. *Clin. Exp. Immunol.* 1984;57:307–14.
97. Li Y, Mariuzza R. Structural and Biophysical Insights into the Role of CD4 and CD8 in T Cell Activation. *Front. Immunol.* [Internet] 2013 [cited 2020 Jan 9];4. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2013.00206/full>
98. Golubovskaya V, Wu L. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers* [Internet] 2016 [cited 2020 Feb 20];8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4810120/>
99. Bellac CL, Dufour A, Krisinger MJ, Loonchanta A, Starr AE, auf dem Keller U, et al. Macrophage Matrix Metalloproteinase-12 Dampens Inflammation and Neutrophil Influx in Arthritis. *Cell Rep.* 2014;9:618–32.
100. Ariel A, Fredman G, Sun Y-P, Kantarci A, Dyke TEV, Luster AD, et al. Apoptotic neutrophils and T cells sequester chemokines during immune response resolution through modulation of CCR5 expression. *Nat. Immunol.* 2006;7:1209–16.
101. Jamieson T, Cook DN, Nibbs RJB, Rot A, Nixon C, Mclean P, et al. The chemokine receptor D6 limits the inflammatory response in vivo. *Nat. Immunol.* 2005;6:403–11.
102. Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J. Clin. Invest.* 1989;83:865–75.
103. Renshaw SA, Timmons SJ, Eaton V, Usher LR, Akil M, Bingle CD, et al. Inflammatory neutrophils retain susceptibility to apoptosis mediated via the Fas death receptor. *J. Leukoc. Biol.* 2000;67:662–8.
104. Geering B, Gurzeler U, Federzoni E, Kaufmann T, Simon H-U. A novel TNFR1-triggered apoptosis pathway mediated by class IA PI3Ks in neutrophils. *Blood* 2011;117:5953–62.
105. Conus S, Perozzo R, Reinheckel T, Peters C, Scapozza L, Yousefi S, et al. Caspase-8 is activated by cathepsin D initiating neutrophil apoptosis during the resolution of inflammation. *J. Exp. Med.* 2008;205:685–98.
106. Serhan CN, Hong S, Gronert K, Colgan SP, Devchand PR, Mirick G, et al. Resolvins. *J. Exp. Med.* 2002;196:1025–37.
107. Serhan CN. Discovery of Specialized Pro-Resolving Mediators Marks the Dawn of Resolution Physiology and Pharmacology. *Mol. Aspects Med.* 2017;58:1–11.
108. Dalli J, Jones CP, Cavalcanti DM, Farsky SH, Perretti M, Rankin SM. Annexin A1 regulates neutrophil clearance by macrophages in the mouse bone marrow. *FASEB J.* 2012;26:387–96.

109. Li X, Liu D, Chen H, Pan X, Kong Q, Pang Q. Lactoferrin protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Int. Immunopharmacol.* 2012;12:460–4.
110. Elliott MR, Cheken FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, et al. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 2009;461:282–6.
111. Truman LA, Ford CA, Pasikowska M, Pound JD, Wilkinson SJ, Dumitriu IE, et al. CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. *Blood* 2008;112:5026–36.
112. Weigert A, Johann AM, von Knethen A, Schmidt H, Geisslinger G, Brüne B. Apoptotic cells promote macrophage survival by releasing the antiapoptotic mediator sphingosine-1-phosphate. *Blood* 2006;108:1635–42.
113. Regulation of macrophage function by sphingosine-1-phosphate. *Immunobiology* 2009;214:748–60.
114. Lauber K, Bohn E, Kröber SM, Xiao Y, Blumenthal SG, Lindemann RK, et al. Apoptotic Cells Induce Migration of Phagocytes via Caspase-3-Mediated Release of a Lipid Attraction Signal. *Cell* 2003;113:717–30.
115. Park D, Tosello-Trampont A-C, Elliott MR, Lu M, Haney LB, Ma Z, et al. BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature* 2007;450:430–4.
116. Freeman GJ, Casasnovas JM, Umetsu DT, DeKruyff RH. TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. *Immunol. Rev.* 2010;235:172–89.
117. Voss OH, Tian L, Murakami Y, Coligan JE, Krzewski K. Emerging role of CD300 receptors in regulating myeloid cell efferocytosis. *Mol. Cell. Oncol.* 2015;2:e964625.
118. Park S-Y, Jung M-Y, Kim H-J, Lee S-J, Kim S-Y, Lee B-H, et al. Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor. *Cell Death Differ.* 2008;15:192–201.
119. Park S-Y, Jung M-Y, Lee S-J, Kang K-B, Gratchev A, Riabov V, et al. Stabilin-1 mediates phosphatidylserine-dependent clearance of cell corpses in alternatively activated macrophages. *J. Cell Sci.* 2009;122:3365–73.
120. Savill J, Hogg N, Ren Y, Haslett C. Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J. Clin. Invest.* 1992;90:1513–22.
121. Hanayama R, Tanaka M, Miyasaka K, Aozasa K, Koike M, Uchiyama Y, et al. Autoimmune Disease and Impaired Uptake of Apoptotic Cells in MFG-E8-Deficient Mice. *Science* 2004;304:1147–50.
122. Seitz HM, Camenisch TD, Lemke G, Earp HS, Matsushima GK. Macrophages and Dendritic Cells Use Different Axl/Mertk/Tyro3 Receptors in Clearance of Apoptotic Cells. *J. Immunol.* 2007;178:5635–42.

123. Proto JD, Doran AC, Gusarova G, Yurdagul A, Sozen E, Subramanian M, et al. Regulatory T Cells Promote Macrophage Efferocytosis during Inflammation Resolution. *Immunity* 2018;49:666-677.e6.
124. McDonald B, Kubes P. Chemokines: Sirens of Neutrophil Recruitment—but Is It Just One Song? *Immunity* 2010;33:148–9.
125. Buckley CD, Gilroy DW, Serhan CN. Proresolving Lipid Mediators and Mechanisms in the Resolution of Acute Inflammation. *Immunity* 2014;40:315–27.
126. Serhan CN, Levy BD. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. *J. Clin. Invest.* 2018;128:2657–69.
127. Serhan CN, Yacoubian S, Yang R. Anti-Inflammatory and Pro-Resolving Lipid Mediators. *Annu. Rev. Pathol.* 2008;3:279–312.
128. Calder PC, Grimble RF. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2002;56:S14–9.
129. Biancheri P, Giuffrida P, Docena GH, MacDonald TT, Corazza GR, Di Sabatino A. The role of transforming growth factor (TGF)- β in modulating the immune response and fibrogenesis in the gut. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014;25:45–55.
130. Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, et al. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010;21:331–44.
131. Serhan CN, Hamberg M, Samuelsson B. Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1984;81:5335–9.
132. Bannenberg GL, Aliberti J, Hong S, Sher A, Serhan C. Exogenous Pathogen and Plant 15-Lipoxygenase Initiate Endogenous Lipoxin A4 Biosynthesis. *J. Exp. Med.* 2004;199:515–23.
133. Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat. Immunol.* 2001;2:612–9.
134. Hodges RR, Li D, Shatos MA, Bair JA, Lippestad M, Serhan CN, et al. Lipoxin A4 activates ALX/FPR2 receptor to regulate conjunctival goblet cell secretion. *Mucosal Immunol.* 2017;10:46–57.
135. Aliberti J, Serhan C, Sher A. Parasite-induced Lipoxin A4 Is an Endogenous Regulator of IL-12 Production and Immunopathology in *Toxoplasma gondii* Infection. *J. Exp. Med.* 2002;196:1253–62.
136. Godson C, Mitchell S, Harvey K, Petasis NA, Hogg N, Brady HR. Cutting Edge: Lipoxins Rapidly Stimulate Nonphagocytic Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils by Monocyte-Derived Macrophages. *J. Immunol.* 2000;164:1663–7.
137. Ariel A, Chiang N, Arita M, Petasis NA, Serhan CN. Aspirin-Triggered Lipoxin A4 and B4 Analogs Block Extracellular Signal-Regulated Kinase-Dependent TNF- α Secretion from Human T Cells. *J. Immunol.* 2003;170:6266–72.

138. Gewirtz AT, Collier-Hyams LS, Young AN, Kucharzik T, Guilford WJ, Parkinson JF, et al. Lipoxin A4 Analogs Attenuate Induction of Intestinal Epithelial Proinflammatory Gene Expression and Reduce the Severity of Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis. *J. Immunol.* 2002;168:5260–7.
139. Mangino MJ, Brounts L, Harms B, Heise C. Lipoxin biosynthesis in inflammatory bowel disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2006;79:84–92.
140. Serhan CN, Arita M, Hong S, Gotlinger K. Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their endogenous aspirin-triggered epimers. *Lipids* 2004;39:1125–32.
141. Serhan CN, Petasis NA. Resolvins and Protectins in Inflammation-Resolution. *Chem. Rev.* 2011;111:5922–43.
142. Tjonahen E, Oh SF, Siegelman J, Elangovan S, Percarpio KB, Hong S, et al. Resolvin E2: Identification and Anti-Inflammatory Actions: Pivotal Role of Human 5-Lipoxygenase in Resolvin E Series Biosynthesis. *Chem. Biol.* 2006;13:1193–202.
143. Isobe Y, Arita M, Iwamoto R, Urabe D, Todoroki H, Masuda K, et al. Stereochemical assignment and anti-inflammatory properties of the omega-3 lipid mediator resolvin E3. *J. Biochem. (Tokyo)* 2013;153:355–60.
144. Isobe Y, Arita M, Matsueda S, Iwamoto R, Fujihara T, Nakanishi H, et al. Identification and Structure Determination of Novel Anti-inflammatory Mediator Resolvin E3, 17,18-Dihydroxyeicosapentaenoic Acid. *J. Biol. Chem.* 2012;287:10525–34.
145. Arita M, Ohira T, Sun Y-P, Elangovan S, Chiang N, Serhan CN. Resolvin E1 Selectively Interacts with Leukotriene B4 Receptor BLT1 and ChemR23 to Regulate Inflammation. *J. Immunol.* 2007;178:3912–7.
146. Oh SF, Pillai PS, Recchiuti A, Yang R, Serhan CN. Pro-resolving actions and stereoselective biosynthesis of 18S E-series resolvins in human leukocytes and murine inflammation. *J. Clin. Invest.* 2011;121:569–81.
147. Arita M, Yoshida M, Hong S, Tjonahen E, Glickman JN, Petasis NA, et al. Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005;102:7671–6.
148. Bannenberg GL, Chiang N, Ariel A, Arita M, Tjonahen E, Gotlinger KH, et al. Molecular Circuits of Resolution: Formation and Actions of Resolvins and Protectins. *J. Immunol.* 2005;174:4345–55.
149. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol.* 2008;8:349–61.
150. Arita M, Oh SF, Chonan T, Hong S, Elangovan S, Sun Y-P, et al. Metabolic inactivation of resolvin E1 and stabilization of its anti-inflammatory actions. *J. Biol. Chem.* 2006;281:22847–54.
151. Oh SF, Dona M, Fredman G, Krishnamoorthy S, Irimia D, Serhan CN. Resolvin E2 Formation and Impact in Inflammation Resolution. *J. Immunol.* 2012;188:4527–34.

152. Sato M, Aoki-Saito H, Fukuda H, Ikeda H, Koga Y, Yatomi M, et al. Resolvin E3 attenuates House Dust Mite (HDM) -induced asthmatic inflammation in a murine model. *Eur. Respir. J.* [Internet] 2018 [cited 2020 Feb 12];52. Available from: https://erj.ersjournals.com/content/52/suppl_62/PA1111
153. Sato M, Aoki-Saito H, Fukuda H, Ikeda H, Koga Y, Yatomi M, et al. Resolvin E3 dampens asthmatic inflammation in a murine model through IL-23 pathway. *Eur. Respir. J.* [Internet] 2019 [cited 2020 Feb 12];54. Available from: https://erj.ersjournals.com/content/54/suppl_63/OA1627
154. Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N, Yacoubian S, Lee C-H, Yang R, et al. Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010;107:1660–5.
155. Sun Y-P, Oh SF, Uddin J, Yang R, Gotlinger K, Campbell E, et al. Resolvin D1 and Its Aspirin-triggered 17R Epimer STEREOCHEMICAL ASSIGNMENTS, ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES, AND ENZYMATIC INACTIVATION. *J. Biol. Chem.* 2007;282:9323–34.
156. Kasuga K, Yang R, Porter TF, Agrawal N, Petasis NA, Irimia D, et al. Rapid Appearance of Resolvin Precursors in Inflammatory Exudates: Novel Mechanisms in Resolution. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2008;181:8677–87.
157. Dalli J, Serhan CN. Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. *Blood* 2012;120:e60–72.
158. Hong S, Gronert K, Devchand PR, Moussignac R-L, Serhan CN. Novel Docosatrienes and 17S-Resolvins Generated from Docosahexaenoic Acid in Murine Brain, Human Blood, and Glial Cells AUTACOIDS IN ANTI-INFLAMMATION. *J. Biol. Chem.* 2003;278:14677–87.
159. Titos E, Rius B, González-Pérez A, López-Vicario C, Morán-Salvador E, Martínez-Clemente M, et al. Resolvin D1 and its precursor docosahexaenoic acid promote resolution of adipose tissue inflammation by eliciting macrophage polarization toward an M2-like phenotype. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2011;187:5408–18.
160. Eickmeier O, Fussbroich D, Mueller K, Serve F, Smaczny C, Zielen S, et al. Pro-resolving lipid mediator Resolvin D1 serves as a marker of lung disease in cystic fibrosis. *PLoS ONE* [Internet] 2017 [cited 2020 Feb 7];12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5291435/>
161. Bento AF, Claudino RF, Dutra RC, Marcon R, Calixto JB. Omega-3 fatty acid-derived mediators 17(R)-hydroxy docosahexaenoic acid, aspirin-triggered resolvin D1 and resolvin D2 prevent experimental colitis in mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2011;187:1957–69.
162. Norling LV, Headland SE, Dalli J, Arnardottir HH, Haworth O, Jones HR, et al. Proresolving and cartilage-protective actions of resolvin D1 in inflammatory arthritis. *JCI Insight* 2016;1:e85922.
163. Dartt DA, Hodges RR, Li D, Shatos MA, Lashkari K, Serhan CN. Conjunctival Goblet Cell Secretion Stimulated by Leukotrienes Is Reduced by Resolvins D1 and E1 To Promote Resolution of Inflammation. *J. Immunol.* 2011;186:4455–66.
164. Fredman G, Serhan CN. Specialized proresolving mediator targets for RvE1 and RvD1 in peripheral blood and mechanisms of resolution. *Biochem. J.* 2011;437:185–97.

165. Spite M, Norling LV, Summers L, Yang R, Cooper D, Petasis NA, et al. Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. *Nature* 2009;461:1287–91.
166. Dalli J, Winkler JW, Colas RA, Arnardottir H, Cheng C-YC, Chiang N, et al. Resolvin D3 and Aspirin-Triggered Resolvin D3 Are Potent Immunoresolvents. *Chem. Biol.* 2013;20:188–201.
167. Norris PC, Arnardottir H, Sanger JM, Fichtner D, Keyes GS, Serhan CN. Resolvin D3 multi-level proresolving actions are host protective during infection. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 2018;138:81–9.
168. Arnardottir HH, Dalli J, Norling LV, Colas RA, Perretti M, Serhan CN. Resolvin D3 Is Dysregulated in Arthritis and Reduces Arthritic Inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2016;197:2362–8.
169. Dalli J, Zhu M, Vlasenko NA, Deng B, Haeggström JZ, Petasis NA, et al. The novel 13S,14S-epoxy-maresin is converted by human macrophages to maresin 1 (MaR1), inhibits leukotriene A4 hydrolase (LTA4H), and shifts macrophage phenotype. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 2013;27:2573–83.
170. Deng B, Wang C-W, Arnardottir HH, Li Y, Cheng C-YC, Dalli J, et al. Maresin biosynthesis and identification of maresin 2, a new anti-inflammatory and pro-resolving mediator from human macrophages. *PloS One* 2014;9:e102362.
171. Serhan CN, Gotlinger K, Hong S, Lu Y, Siegelman J, Baer T, et al. Anti-inflammatory actions of neuroprotectin D1/protectin D1 and its natural stereoisomers: assignments of dihydroxy-containing docosatrienes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2006;176:1848–59.
172. Ariel A, Li P-L, Wang W, Tang W-X, Fredman G, Hong S, et al. The docosatriene protectin D1 is produced by TH2 skewing and promotes human T cell apoptosis via lipid raft clustering. *J. Biol. Chem.* 2005;280:43079–86.
173. Masterson JC, McNamee EN, Fillon SA, Hosford L, Harris R, Fernando SD, et al. Eosinophil-mediated signalling attenuates inflammatory responses in experimental colitis. *Gut* 2015;64:1236–47.
174. Stark DT, Bazan NG. Neuroprotectin D1 induces neuronal survival and downregulation of amyloidogenic processing in Alzheimer's disease cellular models. *Mol. Neurobiol.* 2011;43:131–8.
175. Serhan CN, Fredman G, Yang R, Karamnov S, Belayev LS, Bazan NG, et al. Novel Pro-resolving Aspirin-Triggered DHA Pathway. *Chem. Biol.* 2011;18:976–87.
176. Miyata J, Fukunaga K, Iwamoto R, Isobe Y, Niimi K, Takamiya R, et al. Dysregulated synthesis of protectin D1 in eosinophils from patients with severe asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013;131:353-360.e2.
177. Levy BD, Kohli P, Gotlinger K, Haworth O, Hong S, Kazani S, et al. Protectin D1 is generated in asthma and dampens airway inflammation and hyperresponsiveness. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2007;178:496–502.
178. Serhan CN, Yang R, Martinod K, Kasuga K, Pillai PS, Porter TF, et al. Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. *J. Exp. Med.* 2009;206:15–23.

179. Chiang N, Libreros S, Norris PC, Rosa X de la, Serhan CN. Maresin 1 activates LGR6 receptor promoting phagocyte immunoresolvent functions. *J. Clin. Invest.* 2019;129:5294–311.
180. Serhan CN, Dalli J, Karamnov S, Choi A, Park C-K, Xu Z-Z, et al. Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration and controls pain. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 2012;26:1755–65.
181. Francos-Quijorna I, Santos-Nogueira E, Gronert K, Sullivan AB, Kopp MA, Brommer B, et al. Maresin 1 Promotes Inflammatory Resolution, Neuroprotection, and Functional Neurological Recovery After Spinal Cord Injury. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 2017;37:11731–43.
182. Zhu M, Wang X, Hjorth E, Colas RA, Schroeder L, Granholm A-C, et al. Pro-Resolving Lipid Mediators Improve Neuronal Survival and Increase A β 42 Phagocytosis. *Mol. Neurobiol.* 2016;53:2733–49.
183. Kennedy AJ, Davenport AP. International Union of Basic and Clinical Pharmacology CIII: Chemerin Receptors CMKLR1 (Chemerin₁) and GPR1 (Chemerin₂) Nomenclature, Pharmacology, and Function. *Pharmacol. Rev.* 2018;70:174–96.
184. Herová M, Schmid M, Gemperle C, Hersberger M. ChemR23, the Receptor for Chemerin and Resolvin E1, Is Expressed and Functional on M1 but Not on M2 Macrophages. *J. Immunol.* 2015;194:2330–7.
185. Methner A, Hermey G, Schinke B, Hermans-Borgmeyer I. A Novel G Protein-Coupled Receptor with Homology to Neuropeptide and Chemoattractant Receptors Expressed during Bone Development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997;233:336–42.
186. Luangsay S, Wittamer V, Bondue B, Henau OD, Rouger L, Brait M, et al. Mouse ChemR23 Is Expressed in Dendritic Cell Subsets and Macrophages, and Mediates an Anti-Inflammatory Activity of Chemerin in a Lung Disease Model. *J. Immunol.* 2009;183:6489–99.
187. Yoshimura T, Oppenheim JJ. Chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) and chemokine (C–C motif) receptor-like 2 (CCRL2); Two multifunctional receptors with unusual properties. *Exp. Cell Res.* 2011;317:674–84.
188. Cash JL, Bena S, Headland SE, McArthur S, Brancialeone V, Perretti M. Chemerin15 inhibits neutrophil-mediated vascular inflammation and myocardial ischemia-reperfusion injury through ChemR23. *EMBO Rep.* 2013;14:999–1007.
189. Carracedo M, Artiach G, Witasp A, Clària J, Carlström M, Laguna-Fernandez A, et al. The G-protein coupled receptor ChemR23 determines smooth muscle cell phenotypic switching to enhance high phosphate-induced vascular calcification. *Cardiovasc. Res.* 2019;115:1557–66.
190. Kumar JD, Kandola S, Tiszlavicz L, Reisz Z, Dockray GJ, Varro A. The role of chemerin and ChemR23 in stimulating the invasion of squamous oesophageal cancer cells. *Br. J. Cancer* 2016;114:1152–9.
191. Kaur J, Adya R, Tan BK, Chen J, Randeva HS. Identification of chemerin receptor (ChemR23) in human endothelial cells: Chemerin-induced endothelial angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010;391:1762–8.

192. Goralski KB, McCarthy TC, Hanniman EA, Zabel BA, Butcher EC, Parlee SD, et al. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *J. Biol. Chem.* 2007;282:28175–88.
193. de Poorter C, Baertsoen K, Lannoy V, Parmentier M, Springael J-Y. Consequences of ChemR23 Heteromerization with the Chemokine Receptors CXCR4 and CCR7. *PLoS ONE* [Internet] 2013 [cited 2019 Jun 5];8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3585228/>
194. Corbisier J, Galès C, Huszagh A, Parmentier M, Springael J-Y. Biased Signaling at Chemokine Receptors. *J. Biol. Chem.* 2015;290:9542–54.
195. Conn PJ, Christopoulos A, Lindsley CW. Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2009;8:41–54.
196. Sebag JA, Pantel J. Ciblage thérapeutique des récepteurs couplés aux protéines G - La voie allostérique. *médecine/sciences* 2012;28:845–51.
197. Hutchings CJ, Koglin M, Olson WC, Marshall FH. Opportunities for therapeutic antibodies directed at G-protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2017;16:787–810.
198. De Henau O, Degroot G-N, Imbault V, Robert V, De Poorter C, Mcheik S, et al. Signaling Properties of Chemerin Receptors CMKLR1, GPR1 and CCRL2. *PLoS ONE* [Internet] 2016 [cited 2020 Feb 13];11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5055294/>
199. Wittamer V, Franssen J-D, Vulcano M, Mirjolet J-F, Poul EL, Migeotte I, et al. Specific Recruitment of Antigen-presenting Cells by Chemerin, a Novel Processed Ligand from Human Inflammatory Fluids. *J. Exp. Med.* 2003;198:977–85.
200. Ohira T, Arita M, Omori K, Recchiuti A, Dyke TEV, Serhan CN. Resolvin E1 Receptor Activation Signals Phosphorylation and Phagocytosis. *J. Biol. Chem.* 2010;285:3451–61.
201. Gao L, Faibish D, Fredman G, Herrera BS, Chiang N, Serhan CN, et al. Resolvin E1 and Chemokine-like Receptor 1 Mediate Bone Preservation. *J. Immunol.* 2013;190:689–94.
202. Sima C, Montero E, Nguyen D, Freire M, Norris P, Serhan CN, et al. ERV1 Overexpression in Myeloid Cells Protects against High Fat Diet Induced Obesity and Glucose Intolerance. *Sci. Rep.* 2017;7:1–14.
203. Freire M, Dalli J, Charles SN, Van Dyke TE. Neutrophil Resolvin E1 Receptor Expression and Function in Type 2 Diabetes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2017;198:718–28.
204. Wang X, Zhu M, Hjorth E, Cortés-Toro V, Eyjolfssdottir H, Graff C, et al. Resolution of inflammation is altered in Alzheimer’s disease. *Alzheimers Dement.* 2015;11:40-50.e2.
205. López-Vicario C, Rius B, Alcaraz-Quiles J, González-Pérez A, Martínez-Puchol AI, Casulleras M, et al. Association of a variant in the gene encoding for ERV1/ChemR23 with reduced inflammation in visceral adipose tissue from morbidly obese individuals. *Sci. Rep.* 2017;7:1–11.
206. Herrera BS, Hasturk H, Kantarci A, Freire MO, Nguyen O, Kansal S, et al. Impact of Resolvin E1 on Murine Neutrophil Phagocytosis in Type 2 Diabetes. *Infect. Immun.* 2015;83:792–801.

207. Laguna-Fernandez Andres, Checa Antonio, Carracedo Miguel, Artiach Gonzalo, Petri Marcelo H., Baumgartner Roland, et al. ERV1/ChemR23 Signaling Protects Against Atherosclerosis by Modifying Oxidized Low-Density Lipoprotein Uptake and Phagocytosis in Macrophages. *Circulation* 2018;138:1693–705.
208. Samson M, Edinger AL, Stordeur P, Rucker J, Verhasselt V, Sharron M, et al. ChemR23, a putative chemoattractant receptor, is expressed in monocyte-derived dendritic cells and macrophages and is a coreceptor for SIV and some primary HIV-1 strains. *Eur. J. Immunol.* 1998;28:1689–700.
209. Shimamura K, Matsuda M, Miyamoto Y, Yoshimoto R, Seo T, Tokita S. Identification of a stable chemerin analog with potent activity toward ChemR23. *Peptides* 2009;30:1529–38.
210. Wittamer V, Bondue B, Guillabert A, Vassart G, Parmentier M, Communi D. Neutrophil-Mediated Maturation of Chemerin: A Link between Innate and Adaptive Immunity. *J. Immunol.* 2005;175:487–93.
211. Zabel BA, Kwitniewski M, Banas M, Zabieglo K, Murzyn K. Chemerin regulation and role in host defense. :19.
212. Reverchon M, Ramé C, Dupont J. La chémérine - Une adipocytokine pro-inflammatoire impliquée dans la fonction de reproduction ? *médecine/sciences* 2015;31:493–8.
213. Barnea G, Strapps W, Herrada G, Berman Y, Ong J, Kloss B, et al. The genetic design of signaling cascades to record receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008;105:64–9.
214. Zabel BA, Nakae S, Zúñiga L, Kim J-Y, Ohyama T, Alt C, et al. Mast cell-expressed orphan receptor CCRL2 binds chemerin and is required for optimal induction of IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis. *J. Exp. Med.* 2008;205:2207–20.
215. Dimitriadis GK, Kaur J, Adya R, Miras AD, Mattu HS, Hattersley JG, et al. Chemerin induces endothelial cell inflammation: activation of nuclear factor-kappa beta and monocyte-endothelial adhesion. *Oncotarget* 2018;9:16678–90.
216. Zabel BA, Silverio AM, Butcher EC. Chemokine-like receptor 1 expression and chemerin-directed chemotaxis distinguish plasmacytoid from myeloid dendritic cells in human blood. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 2005;174:244–51.
217. Wittamer V, Grégoire F, Robberecht P, Vassart G, Communi D, Parmentier M. The C-terminal Nonapeptide of Mature Chemerin Activates the Chemerin Receptor with Low Nanomolar Potency. *J. Biol. Chem.* 2004;279:9956–62.
218. Doyle JR, Krishnaji ST, Zhu G, Xu Z-Z, Heller D, Ji R-R, et al. Development of a Membrane-anchored Chemerin Receptor Agonist as a Novel Modulator of Allergic Airway Inflammation and Neuropathic Pain. *J. Biol. Chem.* 2014;289:13385–96.
219. Zhou J, Liao D, Zhang S, Cheng N, He H, Ye RD. Chemerin C9 peptide induces receptor internalization through a clathrin-independent pathway. *Acta Pharmacol. Sin.* 2014;35:653–63.
220. Sato K, Yoshizawa H, Seki T, Shirai R, Yamashita T, Okano T, et al. Chemerin-9, a potent agonist of chemerin receptor (ChemR23), prevents atherogenesis. *Clin. Sci.* 2019;133:1779–96.

221. Cash JL, Bass MD, Campbell J, Barnes M, Kubes P, Martin P. Resolution mediator chemerin15 reprograms the wound microenvironment to promote repair and reduce scarring. *Curr. Biol. CB* 2014;24:1406–14.
222. Cash JL, Christian AR, Greaves DR. Chemerin Peptides Promote Phagocytosis in a ChemR23- and Syk-Dependent Manner. *J. Immunol.* 2010;184:5315–24.
223. Provoost S, Grove KCD, Fraser GL, Lannoy VJ, Tournoy KG, Brusselle GG, et al. Pro- and Anti-Inflammatory Role of ChemR23 Signaling in Pollutant-Induced Inflammatory Lung Responses. *J. Immunol.* 2016;196:1882–90.
224. Carracedo M, Witasz A, Qureshi AR, Laguna-Fernandez A, Brismar T, Stenvinkel P, et al. Chemerin inhibits vascular calcification through ChemR23 and is associated with lower coronary calcium in chronic kidney disease. *J. Intern. Med.* 2019;286:449–57.
225. Kennedy AJ, Yang P, Read C, Kuc RE, Yang L, Taylor EJA, et al. Chemerin Elicits Potent Constrictor Actions via Chemokine-Like Receptor 1 (CMKLR1), not G-Protein-Coupled Receptor 1 (GPR1), in Human and Rat Vasculature. *J. Am. Heart Assoc.* [Internet] 2016 [cited 2020 Jan 8];5. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/JAHA.116.004421>
226. Lin Y, Yang X, Liu W, Li B, Yin W, Shi Y, et al. Chemerin has a protective role in hepatocellular carcinoma by inhibiting the expression of IL-6 and GM-CSF and MDSC accumulation. *Oncogene* 2017;36:3599–608.
227. Pachynski RK, Zabel BA, Kohrt HE, Tejeda NM, Monnier J, Swanson CD, et al. The chemoattractant chemerin suppresses melanoma by recruiting natural killer cell antitumor defenses. *J. Exp. Med.* 2012;209:1427–35.
228. Song Y, Yin W, Dan Y, Sheng J, Zeng Y, He R. Chemerin partly mediates tumor-inhibitory effect of all-trans retinoic acid via CMKLR1-dependent natural killer cell recruitment. *Immunology* 2019;157:248–56.
229. Chyl-Surdacka KM, Gerkowicz A, Bartosińska J, Kowal M, Przepiórka-Kosińska J, Surdacki G, et al. Analysis of serum chemerin concentrations in psoriatic patients in relation to metabolic abnormalities. *Adv. Dermatol. Allergol. Dermatol. Alergol.* 2019;36:531–7.
230. Albanesi C, Scarponi C, Pallotta S, Daniele R, Bosisio D, Madonna S, et al. Chemerin expression marks early psoriatic skin lesions and correlates with plasmacytoid dendritic cell recruitment. *J. Exp. Med.* 2009;206:249–58.
231. Parolini S, Santoro A, Marcenaro E, Luini W, Massardi L, Facchetti F, et al. The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues. *Blood* 2007;109:3625–32.
232. Zhao L, Yamaguchi Y, Sharif S, Du X-Y, Song JJ, Lee DM, et al. Chemerin158K Protein Is the Dominant Chemerin Isoform in Synovial and Cerebrospinal Fluids but Not in Plasma. *J. Biol. Chem.* 2011;286:39520–7.
233. Ha Y-J, Kang E-J, Song J-S, Park Y-B, Lee S-K, Choi ST. Plasma chemerin levels in rheumatoid arthritis are correlated with disease activity rather than obesity. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* 2014;81:189–90.

234. Weigert J, Neumeier M, Wanninger J, Filarsky M, Bauer S, Wiest R, et al. Systemic chemerin is related to inflammation rather than obesity in type 2 diabetes. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 2010;72:342–8.
235. Shin WJ, Zabel BA, Pachynski RK. Mechanisms and Functions of Chemerin in Cancer: Potential Roles in Therapeutic Intervention. *Front. Immunol.* [Internet] 2018 [cited 2020 Feb 13];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.02772/full>
236. Arita M, Clish CB, Serhan CN. The contributions of aspirin and microbial oxygenase to the biosynthesis of anti-inflammatory resolvins: Novel oxygenase products from ω -3 polyunsaturated fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005;338:149–57.
237. Lundeen KA, Sun B, Karlsson L, Fourie AM. Leukotriene B4 Receptors BLT1 and BLT2: Expression and Function in Human and Murine Mast Cells. *J. Immunol.* 2006;177:3439–47.
238. Yokomizo T, Izumi T, Chang K, Takuwa Y, Shimizu T. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B 4 that mediates chemotaxis. *Nature* 1997;387:620–4.
239. Unno Y, Sato Y, Fukuda H, Ishimura K, Ikeda H, Watanabe M, et al. Resolvin E1, but not resolvins E2 and E3, promotes fMLF-induced ROS generation in human neutrophils. *FEBS Lett.* 2018;592:2706–15.
240. Haworth O, Cernadas M, Yang R, Serhan CN, Levy BD. Resolvin E1 regulates interleukin-23, interferon- γ and lipoxin A4 to promote resolution of allergic airway inflammation. *Nat. Immunol.* 2008;9:873–9.
241. Xu Z-Z, Zhang L, Liu T, Park JY, Berta T, Rong-Yang, et al. Resolvins RvE1 and RvD1 Attenuate Inflammatory Pain via Central and Peripheral Actions. *Nat. Med.* 2010;16:592–7.
242. Harrison JL, Rowe RK, Ellis TW, Yee NS, O'Hara BF, Adelson PD, et al. Resolvins AT-D1 and E1 differentially impact functional outcome, post-traumatic sleep, and microglial activation following diffuse brain injury in the mouse. *Brain. Behav. Immun.* 2015;47:131–40.
243. Ji R-R, Xu Z-Z, Strichartz G, Serhan CN. Emerging Roles of Resolvins in the Resolution of Inflammation and Pain. *Trends Neurosci.* 2011;34:599–609.
244. Schwab JM, Chiang N, Arita M, Serhan CN. Resolvin E1 and Protectin D1 Activate Inflammation-Resolution Programs. *Nature* 2007;447:869–74.
245. Fredman G, Oh SF, Ayilavarapu S, Hasturk H, Serhan CN, Dyke TEV. Impaired Phagocytosis in Localized Aggressive Periodontitis: Rescue by Resolvin E1. *PLOS ONE* 2011;6:e24422.
246. MacRitchie N, Maffia P. Resolvin E1 for reducing vascular calcification. *Cardiovasc. Res.* [Internet] [cited 2019 Jun 5]; Available from: <http://academic.oup.com/cardiavasres/advance-article/doi/10.1093/cvr/cvz101/5466451>
247. Liu G, Liu Q, Shen Y, Kong D, Gong Y, Tao B, et al. Early treatment with Resolvin E1 facilitates myocardial recovery from ischaemia in mice: Early therapy with RvE1 improves cardiac recovery after MI. *Br. J. Pharmacol.* 2018;175:1205–16.
248. Jo YY, Lee JY, Park C-K. Resolvin E1 Inhibits Substance P-Induced Potentiation of TRPV1 in Primary Sensory Neurons [Internet]. *Mediators Inflamm.* 2016 [cited 2020 Feb 13]; Available from: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2016/5259321/>

249. Kantarci A, Aytan N, Palaska I, Stephens D, Crabtree L, Benincasa C, et al. Combined administration of resolvin E1 and lipoxin A4 resolves inflammation in a murine model of Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 2018;300:111–20.
250. Kim T-H, Kim G-D, Jin Y-H, Park YS, Park C-S. Omega-3 fatty acid-derived mediator, Resolvin E1, ameliorates 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Int. Immunopharmacol.* 2012;14:384–91.
251. Sima C, Paster B, Van Dyke TE. Function of Pro-Resolving Lipid Mediator Resolvin E1 in Type 2 Diabetes. *Crit. Rev. Immunol.* 2018;38:343–65.
252. Sulciner ML, Serhan CN, Gilligan MM, Mudge DK, Chang J, Gartung A, et al. Resolvins suppress tumor growth and enhance cancer therapy. *J. Exp. Med.* 2018;215:115–40.
253. Panigrahy D, Gartung A, Yang J, Yang H, Gilligan MM, Sulciner ML, et al. Preoperative stimulation of resolution and inflammation blockade eradicates micrometastases. *J. Clin. Invest.* 2019;129:2964–79.
254. Demoor T, Bracke KR, Dupont LL, Plantinga M, Bondue B, Roy M-O, et al. The Role of ChemR23 in the Induction and Resolution of Cigarette Smoke-Induced Inflammation. *J. Immunol.* 2011;186:5457–67.
255. Paiva C de, Schwartz C, Gjørstrup P, Pflugfelder S. Resolvin E1 (RX-10001) Reduces Corneal Epithelial Barrier Disruption and Protects Against Goblet Cell Loss in a Murine Model of Dry Eye. *Cornea* 2012;31:1299–303.
256. Gjørstrup P, Pflugfelder SP, Pangelinan S, Paiva CSD. Resolvins Protect Against Goblet Cell Loss and Reduce Corneal Epithelial Barrier Disruption in a Murine Model of KCS. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008;49:122–122.
257. Safety and Efficacy Study of RX-10045 on the Signs and Symptoms of Dry Eye - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2020 Feb 5];Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00799552>
258. Hesselink JMK, Chiosi F, Costagliola C. Resolvins and aliamides: lipid autacoids in ophthalmology – what promise do they hold? [Internet]. *Drug Des. Devel. Ther.* 2016 [cited 2020 Feb 7];Available from: <https://www.dovepress.com/resolvins-and-aliamides-lipid-autacoids-in-ophthalmology-ndash-what-pr-peer-reviewed-fulltext-article-DDDT>
259. Resolvyx Announces Initiation of Phase I/II Clinical trial of Novel Resolvin Therapeutic RX-10045 in Patients with Dry Eye [Internet]. 2008 [cited 2020 Feb 7];Available from: <https://www.businesswire.com/news/home/20081218005251/en/Resolvyx-Announces-Initiation-Phase-III-Clinical-trial>
260. Resolvyx Announces Positive Data from Phase 2 Clinical Trial of the Resolvin RX-10045 in Patients with Dry Eye Syndrome [Internet]. 2009 [cited 2020 Feb 5];Available from: <https://www.businesswire.com/news/home/20090824005320/en/Resolvyx-Announces-Positive-Data-Phase-2-Clinical>
261. Kennedy BK, Berger SL, Brunet A, Campisi J, Cuervo AM, Epel ES, et al. Geroscience: Linking Aging to Chronic Disease. *Cell* 2014;159:709–13.

262. Gowshall M, Taylor-Robinson SD. The increasing prevalence of non-communicable diseases in low-middle income countries: the view from Malawi. *Int. J. Gen. Med.* 2018;11:255–64.
263. Wahid Ahad, Manek Nishma, Nichols Melanie, Kelly Paul, Foster Charlie, Webster Premila, et al. Quantifying the Association Between Physical Activity and Cardiovascular Disease and Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Am. Heart Assoc.* 5:e002495.
264. Santos-Lozano A, Pareja-Galeano H, Sanchis-Gomar F, Quindós-Rubial M, Fiuza-Luces C, Cristi-Montero C, et al. Physical Activity and Alzheimer Disease: A Protective Association. *Mayo Clin. Proc.* 2016;91:999–1020.
265. Franceschi C, Garagnani P, Vitale G, Capri M, Salvioli S. Inflammaging and ‘Garb-aging’. *Trends Endocrinol. Metab.* 2017;28:199–212.
266. Yuan J, Liu Y, Wang J, Zhao Y, Li K, Jing Y, et al. Long-term Persistent Organic Pollutants Exposure Induced Telomere Dysfunction and Senescence-Associated Secretary Phenotype. *J. Gerontol. Ser. A* 2018;73:1027–35.
267. Zitvogel L, Pietrocola F, Kroemer G. Nutrition, inflammation and cancer. *Nat. Immunol.* 2017;18:843–50.
268. McDade TW. Early environments and the ecology of inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012;109:17281–8.
269. Carrera-Bastos P, Fontes, O’Keefe, Lindeberg, Cordain. The western diet and lifestyle and diseases of civilization. *Res. Rep. Clin. Cardiol.* 2011;15.
270. Non communicable diseases [Internet]. [cited 2020 Feb 14];Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>
271. Pahwa R, Singh A, Jialal I. Chronic Inflammation [Internet]. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 [cited 2020 Feb 14]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493173/>
272. Song YW, Kang EH. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies. *QJM Int. J. Med.* 2010;103:139–46.
273. Derksen VFAM, Huizinga TWJ, van der Woude D. The role of autoantibodies in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Semin. Immunopathol.* 2017;39:437–46.
274. van Steenbergen HW, Ajeganova S, Forslind K, Svensson B, van der Helm-van Mil AHM. The effects of rheumatoid factor and anticitrullinated peptide antibodies on bone erosions in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2015;74:e3.
275. Hecht C, Englbrecht M, Rech J, Schmidt S, Araujo E, Engelke K, et al. Additive effect of anti-citrullinated protein antibodies and rheumatoid factor on bone erosions in patients with RA. *Ann. Rheum. Dis.* 2015;74:2151–6.
276. Kinne RW, Bräuer R, Stuhlmüller B, Palombo-Kinne E, Burmester G-R. Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2000;2:189–202.
277. Gálvez J. Role of Th17 Cells in the Pathogenesis of Human IBD [Internet]. *ISRN Inflamm.* 2014 [cited 2020 Feb 6];Available from: <https://www.hindawi.com/journals/isrn/2014/928461/>

278. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2011;474:307–17.
279. Sartor RB. Mechanisms of Disease: pathogenesis of Crohn’s disease and ulcerative colitis. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 2006;3:390–407.
280. Brannigan AE, O’Connell PR, Hurley H, O’Neill A, Brady HR, Fitzpatrick JM, et al. Neutrophil apoptosis is delayed in patients with inflammatory bowel disease. *Shock Augusta Ga* 2000;13:361–6.
281. Wéra O, Lancellotti P, Oury C. The Dual Role of Neutrophils in Inflammatory Bowel Diseases. *J. Clin. Med.* [Internet] 2016 [cited 2018 Feb 12];5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5184791/>
282. Celius EG, Smestad C. Change in sex ratio, disease course and age at diagnosis in Oslo MS patients through seven decades. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 2009;27–9.
283. Huang W-J, Chen W-W, Zhang X. Multiple sclerosis: Pathology, diagnosis and treatments. *Exp. Ther. Med.* 2017;13:3163–6.
284. Magliozzi R, Howell O, Vora A, Serafini B, Nicholas R, Puopolo M, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain J. Neurol.* 2007;130:1089–104.
285. Crowson CS, Liao KP, Davis JM, Solomon DH, Matteson EL, Knutson KL, et al. Rheumatoid Arthritis and Cardiovascular Disease. *Am. Heart J.* 2013;166:622-628.e1.
286. Lu M-C, Yan S-T, Yin W-Y, Koo M, Lai N-S. Risk of Rheumatoid Arthritis in Patients with Type 2 Diabetes: A Nationwide Population-Based Case-Control Study. *PLoS ONE* [Internet] 2014 [cited 2020 Feb 15];9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4079714/>
287. Axelrad JE, Lichtiger S, Yajnik V. Inflammatory bowel disease and cancer: The role of inflammation, immunosuppression, and cancer treatment. *World J. Gastroenterol.* 2016;22:4794–801.
288. Liu CH, Abrams ND, Carrick DM, Chander P, Dwyer J, Hamlet MRJ, et al. Biomarkers of chronic inflammation in disease development and prevention: challenges and opportunities. *Nat. Immunol.* 2017;18:1175–80.
289. Garlisi CG, Kung TT, Wang P, Minnicozzi M, Umland SP, Chapman RW, et al. Effects of chronic anti-interleukin-5 monoclonal antibody treatment in a murine model of pulmonary inflammation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1999;20:248–55.
290. Jeon C, Sekhon S, Yan D, Afifi L, Nakamura M, Bhutani T. Monoclonal antibodies inhibiting IL-12, -23, and -17 for the treatment of psoriasis. *Hum. Vaccines Immunother.* 2017;13:2247–59.
291. Beringer A, Noack M, Miossec P. IL-17 in Chronic Inflammation: From Discovery to Targeting. *Trends Mol. Med.* 2016;22:230–41.
292. Lord JD, Long SA, Shows DM, Thorpe J, Schwedhelm K, Chen J, et al. Circulating integrin alpha4/beta7+ lymphocytes targeted by vedolizumab have a pro-inflammatory phenotype. *Clin. Immunol.* 2018;193:24–32.

293. Singh S, George J, Boland BS, Vande Casteele N, Sandborn WJ. Primary Non-Response to Tumor Necrosis Factor Antagonists is Associated with Inferior Response to Second-line Biologics in Patients with Inflammatory Bowel Diseases: A Systematic Review and Meta-analysis. *J. Crohns Colitis* 2018;12:635–43.
294. Glocker E-O, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schäffer AA, Noyan F, et al. Inflammatory Bowel Disease and Mutations Affecting the Interleukin-10 Receptor. *N. Engl. J. Med.* 2009;361:2033–45.
295. Sheehan NJ. The ramifications of HLA-B27. *J. R. Soc. Med.* 2004;97:10–4.
296. Jordan S, Tung N, Casanova-Acebes M, Chang C, Cantoni C, Zhang D, et al. Dietary Intake Regulates the Circulating Inflammatory Monocyte Pool. *Cell* 2019;178:1102-1114.e17.
297. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 2009;139:485–98.
298. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* 2012;336:1268–73.
299. Yamada R, Suzuki A, Chang X, Yamamoto K. Citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 2005;10:54–64.
300. Schett G, Neurath MF. Resolution of chronic inflammatory disease: universal and tissue-specific concepts. *Nat. Commun.* [Internet] 2018 [cited 2019 Nov 28];9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6093916/>
301. Walport MJ, Davies KA, Botto M. C1q and Systemic Lupus Erythematosus. *Immunobiology* 1998;199:265–85.
302. Ren Y, Tang J, Mok MY, Chan AWK, Wu A, Lau CS. Increased apoptotic neutrophils and macrophages and impaired macrophage phagocytic clearance of apoptotic neutrophils in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2003;48:2888–97.
303. Muñoz LE, Lauber K, Schiller M, Manfredi AA, Herrmann M. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2010;6:280–9.
304. Khanna S, Biswas S, Shang Y, Collard E, Azad A, Kauh C, et al. Macrophage Dysfunction Impairs Resolution of Inflammation in the Wounds of Diabetic Mice. *PLoS ONE* 2010;5:e9539.
305. Atherosclerosis – A matter of unresolved inflammation. *Semin. Immunol.* 2015;27:184–93.
306. Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2014;14:667–85.
307. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell* 2014;157:121–41.
308. Hooper LV, Macpherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat. Rev. Immunol.* 2010;10:159–69.
309. Specian RD, Oliver MG. Functional biology of intestinal goblet cells. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 1991;260:C183–93.

310. Gassler N. Paneth cells in intestinal physiology and pathophysiology. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 2017;8:150–60.
311. Pabst O, Mowat AM. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol.* 2012;5:232–9.
312. Houston SA, Cerovic V, Thomson C, Brewer J, Mowat AM, Milling S. The lymph nodes draining the small intestine and colon are anatomically separate and immunologically distinct. *Mucosal Immunol.* 2016;9:468–78.
313. Annacker O, Coombes JL, Malmstrom V, Uhlig HH, Bourne T, Johansson-Lindbom B, et al. Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *J. Exp. Med.* 2005;202:1051–61.
314. Jaensson E, Uronen-Hansson H, Pabst O, Eksteen B, Tian J, Coombes JL, et al. Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *J. Exp. Med.* 2008;205:2139–49.
315. Zabel BA, Agace WW, Campbell JJ, Heath HM, Parent D, Roberts AI, et al. Human G Protein–Coupled Receptor Gpr-9-6/Cc Chemokine Receptor 9 Is Selectively Expressed on Intestinal Homing T Lymphocytes, Mucosal Lymphocytes, and Thymocytes and Is Required for Thymus-Expressed Chemokine–Mediated Chemotaxis. *J. Exp. Med.* 1999;190:1241–56.
316. Gutzeit C, Magri G, Cerutti A. Intestinal IgA production and its role in host-microbe interaction. *Immunol. Rev.* 2014;260:76–85.
317. Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D’Amato M, Taylor KD, et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat. Genet.* 2011;43:246–52.
318. Franke A, McGovern DPB, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T, et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn’s disease susceptibility loci. *Nat. Genet.* 2010;42:1118–25.
319. Piovani D, Danese S, Peyrin-Biroulet L, Nikolopoulos GK, Lytras T, Bonovas S. Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: An Umbrella Review of Meta-analyses. *Gastroenterology* 2019;157:647-659.e4.
320. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 2012;142:46-54.e42; quiz e30.
321. Loftus EV. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004;126:1504–17.
322. Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2015;12:205–17.
323. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011;140:1785–94.
324. Bernstein CN, Wajda A, Svenson LW, MacKenzie A, Koehoorn M, Jackson M, et al. The epidemiology of inflammatory bowel disease in Canada: a population-based study. *Am. J. Gastroenterol.* 2006;101:1559–68.

325. Bengtson M-B, Solberg C, Aamodt G, Sauar J, Jahnsen J, Moum B, et al. Familial aggregation in Crohn's disease and ulcerative colitis in a Norwegian population-based cohort followed for ten years. *J. Crohns Colitis* 2009;3:92–9.
326. Ng WK, Wong SH, Ng SC. Changing epidemiological trends of inflammatory bowel disease in Asia. *Intest. Res.* 2016;14:111–9.
327. M'Koma AE. Inflammatory Bowel Disease: An Expanding Global Health Problem. *Clin. Med. Insights Gastroenterol.* 2013;6:33–47.
328. Singh P, Ananthakrishnan A, Ahuja V. Pivot to Asia: inflammatory bowel disease burden. *Intest. Res.* 2017;15:138–41.
329. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet Lond. Engl.* 2018;390:2769–78.
330. Darsigny M, Babeu J-P, Dupuis A-A, Furth EE, Seidman EG, Lévy É, et al. Loss of Hepatocyte-Nuclear-Factor-4 α Affects Colonic Ion Transport and Causes Chronic Inflammation Resembling Inflammatory Bowel Disease in Mice. *PLoS ONE [Internet]* 2009 [cited 2020 Feb 15];4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2764139/>
331. Luo W, Fedda F, Lynch P, Tan D. CDH1 Gene and Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: Molecular and Histological Alterations and Implications for Diagnosis And Treatment. *Front. Pharmacol. [Internet]* 2018 [cited 2020 Feb 15];9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6290068/>
332. Mahid SS, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin. Proc.* 2006;81:1462–71.
333. Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, Peyrin-Biroulet L, Colombel J-F. Ulcerative colitis. *Lancet Lond. Engl.* 2017;389:1756–70.
334. Berg DJ, Zhang J, Weinstock JV, Ismail HF, Earle KA, Alila H, et al. Rapid development of colitis in NSAID-treated IL-10–deficient mice. *Gastroenterology* 2002;123:1527–42.
335. Sahami S, Kooij IA, Meijer SL, Van den Brink GR, Buskens CJ, Te Velde AA. The Link between the Appendix and Ulcerative Colitis: Clinical Relevance and Potential Immunological Mechanisms. *Am. J. Gastroenterol.* 2016;111:163–9.
336. Xu L, Lochhead P, Ko Y, Claggett B, Leong RW, Ananthakrishnan AN. Systematic review with meta-analysis: breastfeeding and the risk of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2017;46:780–9.
337. M'Rabet L, Vos AP, Boehm G, Garssen J. Breast-Feeding and Its Role in Early Development of the Immune System in Infants: Consequences for Health Later in Life. *J. Nutr.* 2008;138:1782S-1790S.
338. Dubuquoy L, Jansson EA, Deeb S, Rakotobe S, Karoui M, Colombel J-F, et al. Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2003;124:1265–76.

339. Kaser A, Lee A-H, Franke A, Glickman JN, Zeissig S, Tilg H, et al. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* 2008;134:743–56.
340. Schoonjans K, Martin G, Staels B, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptors, orphans with ligands and functions. *Curr. Opin. Lipidol.* 1997;8:159–66.
341. Dubuquoy L, Rousseaux C, Thuru X, Peyrin-Biroulet L, Romano O, Chavatte P, et al. PPAR γ as a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases. *Gut* 2006;55:1341–9.
342. Zhang Y-J, Li S, Gan R-Y, Zhou T, Xu D-P, Li H-B. Impacts of gut bacteria on human health and diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2015;16:7493–519.
343. Ni J, Wu GD, Albenberg L, Tomov VT. Gut microbiota and IBD: causation or correlation? *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2017;14:573–84.
344. Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, et al. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN- γ , whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 1996;157:1261–70.
345. Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, et al. Interleukin-13 Is the Key Effector Th2 Cytokine in Ulcerative Colitis That Affects Epithelial Tight Junctions, Apoptosis, and Cell Restitution. *Gastroenterology* 2005;129:550–64.
346. Gerlach K, Hwang Y, Nikolaev A, Atreya R, Dornhoff H, Steiner S, et al. T H 9 cells that express the transcription factor PU.1 drive T cell–mediated colitis via IL-9 receptor signaling in intestinal epithelial cells. *Nat. Immunol.* 2014;15:676–86.
347. Neurath MF, Kaplan MH. Th9 cells in immunity and immunopathological diseases. *Semin. Immunopathol.* 2017;39:1–4.
348. Gerlach K, McKenzie AN, Neurath MF, Weigmann B. IL-9 regulates intestinal barrier function in experimental T cell-mediated colitis. *Tissue Barriers* [Internet] 2015 [cited 2020 Feb 15];3. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4372018/>
349. Vyas SP, Goswami R. A Decade of Th9 Cells: Role of Th9 Cells in Inflammatory Bowel Disease. *Front. Immunol.* [Internet] 2018 [cited 2020 Feb 15];9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5976801/>
350. Conrad K, Roggenbuck D, Laass MW. Diagnosis and classification of ulcerative colitis. *Autoimmun. Rev.* 2014;13:463–6.
351. Reese GE, Constantinides VA, Simillis C, Darzi AW, Orchard TR, Fazio VW, et al. Diagnostic precision of anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies and perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 2006;101:2410–22.
352. Abraham C, Cho JH. Inflammatory Bowel Disease. *N. Engl. J. Med.* 2009;361:2066–78.
353. Blumberg RS, Strober W. Prospects for Research in Inflammatory Bowel Disease. *JAMA* 2001;285:643–7.

354. Molodecky NA, Kaplan GG. Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol. Hepatol.* 2010;6:339–46.
355. Shen B, Remzi FH, Hammel JP, Lashner BA, Bevins CL, Lavery IC, et al. Family History of Crohn's Disease Is Associated with an Increased Risk for Crohn's Disease of the Pouch. *Inflamm. Bowel Dis.* 2009;15:163–70.
356. Levine AP, Pontikos N, Schiff ER, Jostins L, Speed D, Lovat LB, et al. Genetic Complexity of Crohn's Disease in Two Large Ashkenazi Jewish Families. *Gastroenterology* 2016;151:698–709.
357. Kurata JH, Kantor-Fish S, Frankl H, Godby P, Vadheim CM. Crohn's disease among ethnic groups in a large health maintenance organization. *Gastroenterology* 1992;102:1940–8.
358. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, et al. A Genome-Wide Association Study Identifies IL23R as an Inflammatory Bowel Disease Gene. *Science* 2006;314:1461–3.
359. Dam AN, Berg AM, Farraye FA. Environmental Influences on the Onset and Clinical Course of Crohn's Disease—Part 1: An Overview of External Risk Factors. *Gastroenterol. Hepatol.* 2013;9:711–7.
360. Torres J, Mehandru S, Colombel J-F, Peyrin-Biroulet L. Crohn's disease. *The Lancet* 2017;389:1741–55.
361. Boyapati R, Satsangi J, Ho G-T. Pathogenesis of Crohn's disease. F1000Prime Rep. [Internet] 2015 [cited 2020 Feb 17];7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4447044/>
362. Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, Croucher PJP, et al. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:867–74.
363. Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, et al. Host Recognition of Bacterial Muramyl Dipeptide Mediated through NOD2 IMPLICATIONS FOR CROHN'S DISEASE. *J. Biol. Chem.* 2003;278:5509–12.
364. Ogura Y, Lala S, Xin W, Smith E, Dowds TA, Chen FF, et al. Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut* 2003;52:1591–7.
365. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nuñez G, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005;307:731–4.
366. Jiang W, Wang X, Zeng B, Liu L, Tardivel A, Wei H, et al. Recognition of gut microbiota by NOD2 is essential for the homeostasis of intestinal intraepithelial lymphocytes. *J. Exp. Med.* 2013;210:2465–76.
367. Bevins CL, Stange EF, Wehkamp J. Decreased Paneth cell defensin expression in ileal Crohn's disease is independent of inflammation, but linked to the NOD2 1007fs genotype. *Gut* 2009;58:882–3; discussion 883-884.

368. Lapaquette P, Bringer M-A, Darfeuille-Michaud A. Defects in autophagy favour adherent-invasive *Escherichia coli* persistence within macrophages leading to increased pro-inflammatory response. *Cell. Microbiol.* 2012;14:791–807.
369. van Heel DA, Ghosh S, Hunt KA, Mathew CG, Forbes A, Jewell DP, et al. Synergy between TLR9 and NOD2 innate immune responses is lost in genetic Crohn's disease. *Gut* 2005;54:1553–7.
370. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008;132:27–42.
371. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat. Genet.* 2007;39:207–11.
372. McCarroll SA, Kuruvilla FG, Korn JM, Cawley S, Nemesh J, Wysoker A, et al. Integrated detection and population-genetic analysis of SNPs and copy number variation. *Nat. Genet.* 2008;40:1166–74.
373. Coombes JL, Robinson NJ, Maloy KJ, Uhlig HH, Powrie F. Regulatory T cells and intestinal homeostasis. *Immunol. Rev.* 2005;204:184–94.
374. Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat. Immunol.* 2001;2:816–22.
375. Castellanos-Rubio A, Santin I, Irastorza I, Castaño L, Vitoria JC, Bilbao JR. TH17 (and TH1) signatures of intestinal biopsies of CD patients in response to gliadin. *Autoimmunity* 2009;42:69–73.
376. Fouser LA, Wright JF, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M. Th17 cytokines and their emerging roles in inflammation and autoimmunity. *Immunol. Rev.* 2008;226:87–102.
377. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003;52:65–70.
378. Hue S, Ahern P, Buonocore S, Kullberg MC, Cua DJ, McKenzie BS, et al. Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 2006;203:2473–83.
379. Kullberg MC, Jankovic D, Feng CG, Hue S, Gorelick PL, McKenzie BS, et al. IL-23 plays a key role in *Helicobacter hepaticus*-induced T cell-dependent colitis. *J. Exp. Med.* 2006;203:2485–94.
380. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006;24:179–89.
381. Geremia A, Arancibia-Cárcamo CV, Fleming MPP, Rust N, Singh B, Mortensen NJ, et al. IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease. *J. Exp. Med.* 2011;208:1127–33.
382. Strober W, Fuss IJ. Pro-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of IBD. *Gastroenterology* 2011;140:1756–67.
383. Hanai H, Takeuchi K, Iida T, Kashiwagi N, Saniabadi AR, Matsushita I, et al. Relationship between fecal calprotectin, intestinal inflammation, and peripheral blood neutrophils in patients with active ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.* 2004;49:1438–43.

384. Thiesen S, Janciauskiene S, Uronen-Hansson H, Agace W, Högerkorp C-M, Spee P, et al. CD14^{hi}HLA-DR^{dim} macrophages, with a resemblance to classical blood monocytes, dominate inflamed mucosa in Crohn's disease. *J. Leukoc. Biol.* 2014;95:531–41.
385. HARBORD MWN, MARKS DJB, FORBES A, BLOOM SL, DAY RM, SEGAL AW. Impaired neutrophil chemotaxis in Crohn's disease relates to reduced production of chemokines and can be augmented by granulocyte-colony stimulating factor. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2006;24:651–60.
386. Smith AM, Rahman FZ, Hayee B, Graham SJ, Marks DJB, Sewell GW, et al. Disordered macrophage cytokine secretion underlies impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn's disease. *J. Exp. Med.* 2009;206:1883–97.
387. Bressenot A, Salleron J, Bastien C, Danese S, Boulagnon-Rombi C, Peyrin-Biroulet L. Comparing histological activity indexes in UC. *Gut* 2015;64:1412–8.
388. Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kobayashi T, Sato T, et al. Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *J. Clin. Invest.* 2008;118:2269–80.
389. Liu H, Dasgupta S, Fu Y, Bailey B, Roy C, Lightcap E, et al. Subsets of mononuclear phagocytes are enriched in the inflamed colons of patients with IBD. *BMC Immunol.* 2019;20:42.
390. Sena A, Grishina I, Thai A, Goulart L, Macal M, Fenton A, et al. Dysregulation of Anti-Inflammatory Annexin A1 Expression in Progressive Crohns Disease. *PLoS ONE* [Internet] 2013 [cited 2020 Feb 5];8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3794972/>
391. Na YR, Stakenborg M, Seok SH, Matteoli G. Macrophages in intestinal inflammation and resolution: a potential therapeutic target in IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2019;16:531–43.
392. Pithadia AB, Jain S. Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). *Pharmacol. Rep.* 2011;63:629–42.
393. Williams C, Panaccione R, Ghosh S, Rioux K. Optimizing clinical use of mesalazine (5-aminosalicylic acid) in inflammatory bowel disease. *Ther. Adv. Gastroenterol.* 2011;4:237–48.
394. Curkovic I, Egbring M, Kullak-Ublick GA. Risks of inflammatory bowel disease treatment with glucocorticosteroids and aminosaliclates. *Dig. Dis.* 2013;31:368–73.
395. Grevenitis P, Thomas A, Lodhia N. Medical Therapy for Inflammatory Bowel Disease. *Surg. Clin. North Am.* 2015;95:1159–82.
396. Hanauer SB. Medical therapy for ulcerative colitis 2004. *Gastroenterology* 2004;126:1582–92.
397. Faubion WA, Loftus EV, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology* 2001;121:255–60.
398. Chande N, Tsoulis DJ, MacDonald JK. Azathioprine or 6-mercaptopurine for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2013;CD000545.

399. Bär F, Sina C, Fellermann K. Thiopurines in inflammatory bowel disease revisited. *World J. Gastroenterol.* 2013;19:1699–706.
400. Martínez-Montiel M, Casis-Herce B, Gómez-Gómez G, Masedo-González A, Yela-San Bernardino C, Piedracoba C, et al. Pharmacologic therapy for inflammatory bowel disease refractory to steroids. *Clin. Exp. Gastroenterol.* 2015;8:257–69.
401. Braegger CP, Nicholls S, Murch SH, Stephens S, MacDonald TT. Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. *Lancet Lond. Engl.* 1992;339:89–91.
402. MacDonald TT, Hutchings P, Choy MY, Murch S, Cooke A. Tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma production measured at the single cell level in normal and inflamed human intestine. *Clin. Exp. Immunol.* 1990;81:301–5.
403. Adegbola SO, Sahnan K, Warusavitarne J, Hart A, Tozer P. Anti-TNF Therapy in Crohn's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* [Internet] 2018 [cited 2019 Nov 19];19. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6121417/>
404. Levin AD, Wildenberg ME, van den Brink GR. Mechanism of Action of Anti-TNF Therapy in Inflammatory Bowel Disease. *J. Crohns Colitis* 2016;10:989–97.
405. Maini RN, Taylor PC, Paleolog E, Charles P, Ballara S, Brennan FM, et al. Anti-tumour necrosis factor specific antibody (infliximab) treatment provides insights into the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 1999;58 Suppl 1:I56-60.
406. Rostholder E, Ahmed A, Cheifetz AS, Moss AC. Outcomes after escalation of infliximab therapy in ambulatory patients with moderately active ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2012;35:562–7.
407. Shealy DJ, Cai A, Staquet K, Baker A, Lacy ER, Johns L, et al. Characterization of golimumab, a human monoclonal antibody specific for human tumor necrosis factor α . *mAbs* 2010;2:428–39.
408. Haraoui B, Bykerk V. Etanercept in the treatment of rheumatoid arthritis. *Ther. Clin. Risk Manag.* 2007;3:99–105.
409. Chimenti MS, Saraceno R, Chiricozzi A, Giunta A, Chimenti S, Perricone R. Profile of certolizumab and its potential in the treatment of psoriatic arthritis. *Drug Des. Devel. Ther.* 2013;7:339–48.
410. Allez M, Karmiris K, Louis E, Van Assche G, Ben-Horin S, Klein A, et al. Report of the ECCO pathogenesis workshop on anti-TNF therapy failures in inflammatory bowel diseases: Definitions, frequency and pharmacological aspects. *J. Crohns Colitis* 2010;4:355–66.
411. Targan SR, Feagan BG, Fedorak RN, Lashner BA, Panaccione R, Present DH, et al. Natalizumab for the Treatment of Active Crohn's Disease: Results of the ENCORE Trial. *Gastroenterology* 2007;132:1672–83.
412. Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, Kagechika H, Kato C, Song S-Y. Retinoic Acid Imprints Gut-Homing Specificity on T Cells. *Immunity* 2004;21:527–38.

413. Sands BE, Feagan BG, Rutgeerts P, Colombel J-F, Sandborn WJ, Sy R, et al. Effects of vedolizumab induction therapy for patients with Crohn's disease in whom tumor necrosis factor antagonist treatment failed. *Gastroenterology* 2014;147:618-627.e3.
414. Scribano ML. Vedolizumab for inflammatory bowel disease: From randomized controlled trials to real-life evidence. *World J. Gastroenterol.* 2018;24:2457–67.
415. Sands BE, Peyrin-Biroulet L, Loftus EV, Danese S, Colombel J-F, Törüner M, et al. Vedolizumab versus Adalimumab for Moderate-to-Severe Ulcerative Colitis. *N. Engl. J. Med.* 2019;381:1215–26.
416. Fiorino G, Gilardi D, Danese S. The clinical potential of etrolizumab in ulcerative colitis: hypes and hopes. *Ther. Adv. Gastroenterol.* 2016;9:503–12.
417. Stefanich EG, Danilenko DM, Wang H, O'Byrne S, Erickson R, Gelzleichter T, et al. A humanized monoclonal antibody targeting the $\beta 7$ integrin selectively blocks intestinal homing of T lymphocytes. *Br. J. Pharmacol.* 2011;162:1855–70.
418. Belarif L, Danger R, Kermarrec L, Nerrière-Daguin V, Pengam S, Durand T, et al. IL-7 receptor influences anti-TNF responsiveness and T cell gut homing in inflammatory bowel disease. *J. Clin. Invest.* 2019;129:1910–25.
419. Arijis I, Li K, Toedter G, Quintens R, Lommel LV, Steen KV, et al. Mucosal gene signatures to predict response to infliximab in patients with ulcerative colitis. *Gut* 2009;58:1612–9.
420. Therrien A, Chapuy L, Bsat M, Rubio M, Bernard G, Arslanian E, et al. Recruitment of activated neutrophils correlates with disease severity in adult Crohn's disease. *Clin. Exp. Immunol.* 2019;195:251–64.
421. Bain CC, Scott CL, Uronen-Hansson H, Gudjonsson S, Jansson O, Grip O, et al. Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal Immunol.* 2013;6:498–510.
422. Glasser A-L, Darfeuille-Michaud A. Abnormalities in the handling of intracellular bacteria in Crohn's disease: a link between infectious etiology and host genetic susceptibility. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 2008;56:237–44.
423. Arandjelovic S, Ravichandran KS. Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nat. Immunol.* 2015;16:907–17.
424. Vos ACW, Wildenberg ME, Duijvestein M, Verhaar AP, van den Brink GR, Hommes DW. Anti-tumor necrosis factor- α antibodies induce regulatory macrophages in an Fc region-dependent manner. *Gastroenterology* 2011;140:221–30.
425. Lucas M, Zhang X, Prasanna V, Mosser DM. ERK Activation Following Macrophage Fc γ R Ligation Leads to Chromatin Modifications at the IL-10 Locus. *J. Immunol.* 2005;175:469–77.
426. Kopylov U, Seidman E. Predicting durable response or resistance to antitumor necrosis factor therapy in inflammatory bowel disease. *Ther. Adv. Gastroenterol.* 2016;9:513–26.
427. Soendergaard C, Seidelin JB, Steenholdt C, Nielsen OH. Putative biomarkers of vedolizumab resistance and underlying inflammatory pathways involved in IBD. *BMJ Open Gastroenterol.* 2018;5:e000208.

428. Neurath MF. New targets for mucosal healing and therapy in inflammatory bowel diseases. *Mucosal Immunol.* 2014;7:6–19.
429. Medina-Contreras O, Harusato A, Nishio H, Flannigan KL, Ngo V, Leoni G, et al. IL-36 receptor promotes resolution of intestinal damage. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2016;196:34–8.
430. Gobbetti T, Dalli J, Colas RA, Federici Canova D, Aursnes M, Bonnet D, et al. Protectin D1 _{n-3 DPA} and resolvin D5 _{n-3 DPA} are effectors of intestinal protection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2017;114:3963–8.
431. Marcon R, Bento AF, Dutra RC, Bicca MA, Leite DFP, Calixto JB. Maresin 1, a Proresolving Lipid Mediator Derived from Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids, Exerts Protective Actions in Murine Models of Colitis. *J. Immunol.* 2013;191:4288–98.
432. Steinbach EC, Gipson GR, Sheikh SZ. Induction of Murine Intestinal Inflammation by Adoptive Transfer of Effector CD4⁺CD45RB^{high} T Cells into Immunodeficient Mice. *J. Vis. Exp. JoVE* [Internet] 2015 [cited 2018 Oct 8];Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4541583/>
433. Burich A, Hershberg R, Waggle K, Zeng W, Brabb T, Westrich G, et al. Helicobacter-induced inflammatory bowel disease in IL-10- and T cell-deficient mice. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 2001;281:G764–78.
434. Ali T, Kaitha S, Mahmood S, Ftesi A, Stone J, Bronze MS. Clinical use of anti-TNF therapy and increased risk of infections. *Drug Healthc. Patient Saf.* 2013;5:79–99.
435. Koo S, Marty FM, Baden LR. Infectious complications associated with immunomodulating biologic agents. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2010;24:285–306.
436. Hastings R, Ding T, Butt S, Gadsby K, Zhang W, Moots RJ, et al. Neutropenia in patients receiving anti-tumor necrosis factor therapy. *Arthritis Care Res.* 2010;62:764–9.
437. Boxer L, Dale DC. Neutropenia: causes and consequences. *Semin. Hematol.* 2002;39:75–81.
438. Sebastian S, Ashton K, Houston Y, Diggory TM, Dore P. Anti-TNF therapy induced immune neutropenia in Crohns disease- report of 2 cases and review of literature. *J. Crohns Colitis* 2012;6:713–6.
439. Guiddir T, Frémond M-L, Triki TB, Candon S, Croisille L, Leblanc T, et al. Anti-TNF- α therapy may cause neonatal neutropenia. *Pediatrics* 2014;134:e1189-1193.
440. Levy BD, Bonnans C, Silverman ES, Palmer LJ, Marigowda G, Israel E, et al. Diminished lipoxin biosynthesis in severe asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2005;172:824–30.
441. Marée AFM, Komba M, Dyck C, Łabęcki M, Finegood DT, Edelstein-Keshet L. Quantifying macrophage defects in type 1 diabetes. *J. Theor. Biol.* 2005;233:533–51.
442. O'Brien BA, Fieldus WE, Field CJ, Finegood DT. Clearance of apoptotic β -cells is reduced in neonatal autoimmune diabetes-prone rats. *Cell Death Differ.* 2002;9:457–64.
443. Bogie JFJ, Stinissen P, Hendriks JJA. Macrophage subsets and microglia in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 2014;128:191–213.

444. Grajchen E, Hendriks JJA, Bogie JFJ. The physiology of foamy phagocytes in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol. Commun.* [Internet] 2018 [cited 2020 Feb 7];6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6240956/>
445. Wang X, Jiao W, Lin M, Lu C, Liu C, Wang Y, et al. Resolution of inflammation in neuromyelitis optica spectrum disorders. *Mult. Scler. Relat. Disord.* 2019;27:34–41.
446. Poisson LM, Suhail H, Singh J, Datta I, Denic A, Labuzek K, et al. Untargeted Plasma Metabolomics Identifies Endogenous Metabolite with Drug-like Properties in Chronic Animal Model of Multiple Sclerosis. *J. Biol. Chem.* 2015;290:30697–712.
447. Yates M, Watts R. ANCA-associated vasculitis. *Clin. Med.* 2017;17:60–4.
448. Kallenberg CGM. Pathogenesis of ANCA-associated vasculitides. *Ann. Rheum. Dis.* 2011;70 Suppl 1:i59-63.
449. Millet A, Martin KR, Bonnefoy F, Saas P, Mocek J, Alkan M, et al. Proteinase 3 on apoptotic cells disrupts immune silencing in autoimmune vasculitis. *J. Clin. Invest.* 125:4107–21.
450. Söderberg D, Segelmark M. Neutrophil Extracellular Traps in ANCA-Associated Vasculitis. *Front. Immunol.* 2016;7:256.
451. Ohlsson SM, Ohlsson S, Söderberg D, Gunnarsson L, Pettersson Å, Segelmark M, et al. Neutrophils from vasculitis patients exhibit an increased propensity for activation by anti-neutrophil cytoplasmic antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* 2014;176:363–72.
452. Harper L, Cockwell P, Adu D, Savage CO. Neutrophil priming and apoptosis in anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis. *Kidney Int.* 2001;59:1729–38.
453. Abdgawad M, Pettersson Å, Gunnarsson L, Bengtsson AA, Geborek P, Nilsson L, et al. Decreased Neutrophil Apoptosis in Quiescent ANCA-Associated Systemic Vasculitis. *PLoS ONE* [Internet] 2012 [cited 2020 Feb 11];7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3293802/>
454. Bai Y, Tong Y, Liu Y, Hu H. Self-dsDNA in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 2018;191:1–10.
455. Philippe R, Urbach V. Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators in Cystic Fibrosis. *Int. J. Mol. Sci.* [Internet] 2018 [cited 2020 Feb 5];19. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6213393/>
456. Recchiuti A, Mattoscio D, Isopi E. Roles, Actions, and Therapeutic Potential of Specialized Pro-resolving Lipid Mediators for the Treatment of Inflammation in Cystic Fibrosis. *Front. Pharmacol.* [Internet] 2019 [cited 2020 Feb 4];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2019.00252/full>
457. Painter RG, Bonvillain RW, Valentine VG, Lombard GA, LaPlace SG, Nauseef WM, et al. THE ROLE OF CHLORIDE ANION AND CFTR IN KILLING OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA BY NORMAL AND CF NEUTROPHILS. *J. Leukoc. Biol.* 2008;83:1345–53.
458. Karp CL, Flick LM, Park KW, Softic S, Greer TM, Keledjian R, et al. Defective lipoxin-mediated anti-inflammatory activity in the cystic fibrosis airway. *Nat. Immunol.* 2004;5:388–92.

459. Ringholz FC, Buchanan PJ, Clarke DT, Millar RG, McDermott M, Linnane B, et al. Reduced 15-lipoxygenase 2 and lipoxin A4/leukotriene B4 ratio in children with cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* 2014;44:394–404.
460. Mattoscio D, Evangelista V, De Cristofaro R, Recchiuti A, Pandolfi A, Di Silvestre S, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) expression in human platelets: impact on mediators and mechanisms of the inflammatory response. *FASEB J.* 2010;24:3970–80.
461. Sayiner M, Koenig A, Henry L, Younossi ZM. Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in the United States and the Rest of the World. *Clin. Liver Dis.* 2016;20:205–14.
462. Koyama Y, Brenner DA. Liver inflammation and fibrosis. *J. Clin. Invest.* 127:55–64.
463. Wan J, Benkdane M, Teixeira-Clerc F, Bonnafous S, Louvet A, Lafdil F, et al. M2 Kupffer cells promote M1 Kupffer cell apoptosis: a protective mechanism against alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol. Baltim. Md* 2014;59:130–42.
464. Wculek SK, Malanchi I. Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells. *Nature* 2015;528:413–7.
465. Casbon A-J, Reynaud D, Park C, Khuc E, Gan DD, Schepers K, et al. Invasive breast cancer reprograms early myeloid differentiation in the bone marrow to generate immunosuppressive neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015;112:E566-575.
466. Gonda K, Shibata M, Sato Y, Washio M, Takeshita H, Shigeta H, et al. Elevated neutrophil-to-lymphocyte ratio is associated with nutritional impairment, immune suppression, resistance to S-1 plus cisplatin, and poor prognosis in patients with stage IV gastric cancer. *Mol. Clin. Oncol.* 2017;7:1073–8.
467. Nywening TM, Belt BA, Cullinan DR, Panni RZ, Han BJ, Sanford DE, et al. Targeting both tumour-associated CXCR2+ neutrophils and CCR2+ macrophages disrupts myeloid recruitment and improves chemotherapeutic responses in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gut* 2018;67:1112–23.
468. Foekens JA, Ries C, Look MP, Gippner-Steppert C, Klijn JGM, Jochum M. Elevated expression of polymorphonuclear leukocyte elastase in breast cancer tissue is associated with tamoxifen failure in patients with advanced disease. *Br. J. Cancer* 2003;88:1084–90.
469. Single and Multiple Ascending Oral Dose Study of RX-10001 in Healthy Volunteers - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2020 Feb 11];Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00941018>
470. Cholkar K, Gilger BC, Mitra AK. Topical delivery of aqueous micellar Resolvin E1 analog (RX-10045). *Int. J. Pharm.* 2016;498:326–34.
471. Schwartz CE, Savinainen A, Gjorstrup P. Resolvin Analogs With Pharmacokinetic Properties Suitable for Topical Administration to Treat Ocular Diseases. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008;49:3179–3179.
472. Ryman JT, Meibohm B. Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies. *CPT Pharmacomet. Syst. Pharmacol.* 2017;6:576–88.

473. Jenner WJ, Gilroy DW. Assessment of Leukocyte Trafficking in Humans using the Cantharidin Blister Model. *JRSM Cardiovasc. Dis.* 2012;1:1–5.
474. Jenner W, Motwani M, Veighey K, Newson J, Audzevich T, Nicolaou A, et al. Characterisation of Leukocytes in a Human Skin Blister Model of Acute Inflammation and Resolution. *PLoS ONE* 2014;9:e89375.
475. Jairath V, Feagan BG. Global burden of inflammatory bowel disease. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 2020;5:2–3.
476. Alatab S, Sepanlou SG, Ikuta K, Vahedi H, Bisignano C, Safiri S, et al. The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 2020;5:17–30.
477. Seyedian SS, Nokhostin F, Malamir MD. A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease. *J. Med. Life* 2019;12:113–22.

RESUME

Titre : Développement d'un agoniste anti-ChemR23 comme vecteur de la résolution de l'inflammation.

Mots clés : Résolution de l'inflammation, ChemR23, inflammation chronique, Neutrophiles, Efferocytose, Résolvine E1

Résumé : La résolution de l'inflammation est un mécanisme actif qui met en jeu 3 phénomènes : réduire la migration leucocytaire, induire l'apoptose des neutrophiles et activer l'efferocytose par les macrophages. Elle est orchestrée par des médiateurs lipidiques de l'inflammation (SPM), parmi lesquels la Résolvine E1 ciblant ChemR23 accélère la résolution de l'inflammation dans des modèles d'inflammation aiguës. L'échec de la résolution de l'inflammation est fortement associé au déclenchement de maladies inflammatoires chroniques. Nous avons identifié une surexpression du récepteur ChemR23 ainsi qu'une accumulation de neutrophiles dans la muqueuse des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) et qui ne répondent pas aux anticorps anti-TNF, soulevant l'intérêt d'une telle cible dans ces pathologies.

L'impact thérapeutique d'un anticorps agoniste de ChemR23 (α ChemR23) a été évalué. Nous avons déterminé que l'expression de ChemR23 sur les cellules myéloïdes est inductible par des signaux inflammatoires. Son activation par un α ChemR23 augmente la production de ROS, l'apoptose des PMN, ainsi que l'efferocytose, démontrant son effet pro-résolutif. Nous avons observé une accélération de la résolution de l'inflammation dans deux modèles de colites aiguës. De plus, dans 2 modèles de colites chroniques, qui ne présentent pas de résolution, un effet clinique majeur a été observé après traitement avec un α ChemR23. Pour finir, un effet thérapeutique de l' α ChemR23 a pu être observé dans des modèles expérimentaux d'auto-immunités suggérant que l'activation de la voie ChemR23 comme traitement ne se limite pas aux seules MICI.

ABSTRACT

Title: Development of an agonistic anti-ChemR23 antibody to activate the resolution of inflammation

Keywords: Resolution of inflammation, ChemR23, Chronic inflammation, Neutrophils, Efferocytosis, Resolvin

Abstract: Resolution of the inflammation is an active process divided in 3 phases: (1) preventing the leukocyte migration, (2) increasing neutrophils apoptosis and (3) the induction of macrophage mediated-efferocytosis. This mechanism is induced by specialized pro-resolving mediator (SPM), such as Resolvin E1 targeting ChemR23 receptor, that stimulates the resolution of inflammation in acute inflammation models justifying the therapeutics potential of this strategy. A failure in the resolution phase is strongly associated with several chronic inflammatory diseases. We identified an overexpression of ChemR23 associated with neutrophil infiltration in the intestine mucosa of IBD patients non-responders to anti-TNF biotherapy. We characterized the impact of an agonist anti-ChemR23 antibody (α ChemR23 mAb)

to activate the resolution of inflammation. We observed an upregulation of ChemR23 expression by myeloid cells after inflammatory stimulation. Its activation with the α ChemR23 improves the ROS production and PMN's (polymorphonuclear neutrophil) apoptosis, as well as efferocytosis demonstrating the pro-resolutive effects of the antibody. Moreover, the resolution was accelerated in two acute colitis models, to similar extent to the natural ligand of ChemR23 (RvE1). In two chronic colitis models without spontaneous resolution, a major clinic effect was also demonstrated after treatment with α ChemR23 by triggering the resolution. Moreover, a therapeutic effect was observed in auto-immune models suggesting a potential role of ChemR23 in several chronic inflammatory diseases.