

UNIVERSITE PARIS 13 – SORBONNE PARIS CITE
UFR DE SANTE-MEDECINE-BIOLOGIE HUMAINE

Année 2018

THESE

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 13

Discipline : Biologie, Mention Biologie Moléculaire et Cellulaire

Rôle du TNFR2 exprimé à la surface des lymphocytes T régulateurs dans l'inflammation dépendante du TNF α

Présentée par

François SANTINON

Soutenue publiquement le 4 Avril 2018

Jury

Dr Nabila SEDDIKI (Université Paris Est Créteil)	Rapporteur
Pr Olivier VITTECOQ (Université de Rouen)	Rapporteur
Pr Karim ASEHNOUNE (Université de Nantes)	Examineur
Pr Natacha BESSIS (Université Paris 13)	Directrice de Thèse
Pr Luca SEMERANO (Université Paris 13)	Co-directeur de Thèse

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je tiens à remercier le Dr Nabila SEDDIKI, le Pr Olivier VITTECOQ et le Pr Karim ASEHNOUNE d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci pour le temps passé à la lecture de ce manuscrit ainsi qu'aux conseils et remarques que vous m'avez apportés.

Je remercie le Pr Marie Christophe BOISSIER de m'avoir accueilli dans son équipe durant cette thèse et de m'avoir permis de la terminer dans les meilleures conditions possibles. De plus, vous avez offert l'opportunité à un petit provincial de monter à Paris. Grâce à vous, je sais enfin ce qu'est la vraie vie. J'espère que vous ne serez pas trop dur avec les prochains étudiants afin que, comme moi, ils finissent par apprécier Paris et ses habitants.

Je remercie le Pr Natacha BESSIS, ma directrice de thèse qui m'a fait confiance durant ce doctorat. Ces trois ans et quelques mois n'ont pas été un long fleuve tranquille mais heureusement jalonnés de bons moments. Je ne me permettrais pas d'énumérer les écueils que nous avons rencontrés car cela serait bien trop long et ennuerait probablement le lecteur. Malgré toutes ces péripéties, tu as su adapter mon projet et me permettre d'avancer. Pour cela je t'en suis très reconnaissant. Merci pour ta disponibilité quasi permanente et ta rigueur scientifique que j'espère avoir acquise. Je te remercie pour l'autonomie que tu m'as laissée durant notre travail commun. Enfin, merci de m'avoir supporté pour toutes les fois où je suis venu te voir pour t'informer que je t'avais envoyé un mail !!

Je remercie le Pr Luca SEMERANO mon co-directeur de thèse qui fut indispensable à la mise en place et à la réalisation de l'étude humaine. Merci pour tes conseils toujours judicieux ainsi que pour les discussions scientifiques que nous avons pu avoir. Tes connaissances cliniques et statistiques m'ont apporté une aide précieuse à l'interprétation des résultats. Je te remercie pour ta disponibilité malgré ton emploi du temps souvent surchargé.

Je remercie le Dr Jorg TÖST et Florence BUSATO pour la réalisation des expériences de méthylation de l'ADN qui ont permis d'aboutir à une collaboration efficace et productive.

Je remercie le Pr Benoit SALOMON de m'avoir permis d'utiliser les souris FoxP3^{CRE} TNFR2^{LOX} et pour sa collaboration active tout au long de mon travail de thèse.

Je remercie le Pr Frédéric CAUX qui a apporté le modèle expérimental de psoriasis au sein du laboratoire. Merci pour tes connaissances dermatologiques qui ont été d'une grande utilité pour la réalisation de ce travail.

Je remercie également les autres chercheurs du laboratoire. Le Pr Patrice DECKER pour avoir eu un regard critique et constructif sur les résultats obtenus et avoir permis de faire avancer le projet. Merci aussi pour les bons moments passés durant les apéritifs du mois d'août ainsi que pendant l'EWRR à Athènes. Je remercie le Dr Éric ASSIER pour sa bonne humeur quotidienne et ses anecdotes toujours très succinctes qui m'ont rendu incollable sur la fabrication du champagne. Enfin, merci au Dr Jérôme BITON pour ses remarques scientifiques toujours très constructives et judicieuses bien que nous nous soyons côtoyés que très peu de temps.

Je remercie Mylène PETIT pour son implication dans la mise en place de l'étude humaine. Ta présence au sein du service de rhumatologie fût très précieuse. Malheureusement pour toi, la majorité de mes messages étaient constitués de la phrase « Des nouvelles du patient ? ». Merci pour tout, car synchroniser l'action du personnel d'un service pour obtenir des tubes de sang n'est pas une mince affaire.

Je tiens à remercier très chaleureusement les ingénieures du laboratoire Delphine LEMEITER, Roxane HERVE et Magali BRECKLER sans qui cette thèse n'aurait pu être réalisée.

Delphine, ma maman du laboratoire, qui a su m'apprendre les rudiments de la cytométrie en trois semaines grâce à sa grande capacité de transmission de connaissances et son expérience. Je ne compte plus les journées entières de sacrifice passées à purifier les Treg et à se lamenter sur la lenteur de la chute des gouttes. Merci d'avoir toujours été d'un professionnalisme exemplaire et d'avoir supporté mes sarcasmes permanents durant ces longues journées.

Roxane, la professionnelle des souris. Merci d'avoir géré les lignées de souris (qui furent multiples) durant ma thèse. Ton organisation quasi parfaite (presque obsessionnelle) a grandement facilité mon travail et optimisée mon temps bien que l'hébergement des souris dans deux animaleries différentes ne t'ait pas rendu la tâche aisée. Merci pour toutes tes venues le week-end pour scorer les souris. Le dévouement que tu as pour ton travail est rare et très appréciable. Cependant, et malgré tout tes efforts, tu n'as pas réussi à changer mon aversion au rangement et désolé pour le pare-brise arrière de ta voiture qui n'a pas survécu à une soirée dans le 93. Je finirai par un merci tout particulier concernant la relecture de ma thèse que tu as effectué, permettant l'élimination d'un grand nombre de fautes d'orthographe.

Magali, qui a sacrifié un bon nombre de ses week-ends pour s'occuper des souris avec moi. Je suis très fier d'avoir pu mettre au point avec toi l'extraction des cellules immunitaires de la peau. Tes connaissances en biochimie furent d'une grande aide durant cette période. La gentillesse est probablement le trait de caractère qui te représente le mieux ce qui a rendu le travail beaucoup plus agréable. Attention, à partir de maintenant il va falloir que tu trouves d'autres personnes pour mettre de la musique durant les grandes journées de manip afin que tu puisses chanter et danser pendant les temps d'incubation (choisis judicieusement...).

Je tiens à remercier mon collègue et ami Maxime BATIGNES pour sa bonne humeur quasi permanente. Merci pour toute l'aide apportée concernant l'étude humaine et les purifications de Treg lors de nos expériences en commun. La majorité de nos discussions scientifiques furent constructives même si parfois nous divaguions sur la nature ondulatoire ou particulière de la lumière. Merci pour les soirées bière, pizza et jeu vidéo où tu as pu constater mon niveau plus que médiocre. Je ne désespère pas à l'idée que tu trouveras un autre acolyte avec qui tu pourras apprécier des vidéos de blagues toutes pourries avec l'accent québécois (je te déconseille Roxane, elle n'est pas très bon public !!) et j'espère te recroiser au détour d'un congrès dans les années futures. Merci d'avoir rendu cette thèse encore plus cool qu'elle ne l'était déjà !!

Merci à Sarra Sabrina SENNET pour son aide ponctuelle mais si précieuse. Je dois bien avouer que nos premières semaines de cohabitation au laboratoire ne me laissent pas des souvenirs impérissables. Deux caractères forts dans une pièce fonctionnent rarement bien. Cependant les mois passant, nous avons appris à nous connaître et à nous apprécier. Je te souhaite bon courage pour la suite car ta fin de thèse arrive aussi à grand pas et j'imagine ton futur rempli de NET et de robes de princesse !!

Je remercie Eliès RE et Dyhia MELBOUCI, qui m'ont supporté en tant que voisin de bureau. Eliès, les repas avec toi étaient toujours très informatifs. Ta capacité à connaître la composition nutritionnelle de chaque aliment m'étonnera toujours tout comme ta capacité stomacale !! Comme tu le sais, je

suis bien attentionné et tu remarqueras que je n'ai fait aucune allusion aux phytosanitaires dans ces quelques lignes. Dyhia, ma voisine directe, tu ne m'entendras plus parler ou plutôt insulter mon ordinateur dès que j'en avais l'occasion et envahir ton bureau avec mon bazar permanent. Tu n'es qu'au début de ta thèse alors je te souhaite bon courage.

Je remercie Kirari SUEMITSU ma voisine nippone. Tu es probablement une des plus belles personnes que j'ai eu à rencontrer durant ma thèse. Ta gentillesse et ton attention sont inégalables. Je me rappelle que ton apprentissage rapide de la langue française a commencé par les mots « souris numéro ... ». En quittant ce laboratoire, j'emporte avec moi l'avocatier que nous avons planté ensemble, symbole de notre rencontre.

Je remercie chaleureusement les deux historiques du laboratoire Julie MUSSARD et Matthieu RIBON. Merci d'avoir partagé votre expérience avec moi et facilité mon intégration au sein de l'équipe.

Je tiens à remercier l'intégralité du personnel du service de rhumatologie de l'hôpital Avicenne qui a mis toute sa bonne volonté à la mise en place des prélèvements sanguins chez les patients et les patients qui ont acceptés de participer à l'étude. Je remercie toutes les équipes de l'Etablissement Français du Sang ainsi que les donateurs qui permettent par leurs actions, l'avancement de la recherche.

Je tiens à remercier mes amis de l'Université Claude Bernard Lyon 1 : Clémence, Ivana, Lucie, Boris et Philippe. Vous retrouver lors de week-ends à Lyon m'a fait le plus grand bien à chaque fois. Grâce à vous j'ai évité de devenir le stéréotype du parisien qui part en province les week-ends et qui devient condescendant. J'espère que notre amitié ne s'arrêtera pas avec la fin de nos études universitaires.

Un grand merci à Charlotte, qui fût ma confidente pendant cette thèse. Tu as toujours été là pour me prêter une oreille attentive dans les moments difficiles comme dans les moments d'euphorie. Merci pour ton attention permanente et ta gentillesse qui te caractérisent tant. Heureusement pour nous, notre forfait téléphonique était illimité car deux personnes bavardes ne permettent pas d'avoir des conversations brèves.

Pour terminer, je tiens à remercier mes parents Nicole et Gilles ainsi que mon frère Pierre sans qui je ne suis pas grand-chose. Merci pour vos bonnes adresses parisiennes datant de votre jeunesse (mais toujours actuelles). Je vous remercie d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir soutenu dans mes choix et apporté un soutien psychologique et financier quand il le fallait. Pour tout ça, je vous dis merci !!

« Maintenant, jeune encore et souvent éprouvé,
J'ai plus d'un souvenir profondément gravé,
Et l'on peut distinguer bien des choses passées
Dans ces plis de mon front que creusent mes pensées. »

Victor Hugo

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	1
SOMMAIRE	5
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	11
LISTE DES ABREVIATIONS	15
I. INTRODUCTION	19
A. Les lymphocytes T régulateurs.....	20
1. La découverte des lymphocytes T régulateurs.....	21
2. La différenciation des lymphocytes T régulateurs FoxP3 ⁺	21
a) Implication du TCR dans la différenciation des Treg thymiques	21
b) Rôle des cytokines dans la différenciation des Treg thymiques.....	23
c) Importance du TCR dans la différenciation des Treg périphériques	24
d) Rôle des cytokines dans la différenciation des Treg périphériques	24
e) Les sites de génération des Treg périphériques	25
f) Les marqueurs majeurs des Treg.....	25
3. Les lymphocytes T régulateurs FoxP3 ⁻	26
a) Les Tr1.....	26
b) Les Th3	27
4. Le facteur de transcription FoxP3.....	27
a) Le gène <i>FoxP3</i>	27
b) Rôle des cytokines dans la régulation de <i>FoxP3</i>	29
c) Modifications post traductionnelles de FoxP3	30
5. Les fonctions immunosuppressives des lymphocytes T régulateurs	31
a) Les interactions avec les cellules présentatrices d'antigènes	31
b) Les cytokines anti-inflammatoires et les granzymes	32
c) Modification du métabolisme et autres mécanismes d'immunosuppression	33
6. Les sous populations de Treg présentes lors de la réponse T.....	34
B. Le Tumor Necrosis Factor α	36
1. Le TNF α et ses récepteurs	36
2. Régulation du TNF α	36

a)	Régulation transcriptionnelle du gène <i>Tnfa</i>	36
b)	Mécanismes post-transcriptionnels de régulation du <i>Tnfa</i>	38
3.	La signalisation du TNFR1	39
a)	Le TNFR1	39
b)	L'implication de la signalisation TNFR1 dans la survie et la prolifération cellulaire	39
c)	Rôle de la signalisation TNFR1 dans le mécanisme d'apoptose	41
d)	Rôle de la signalisation TNFR1 dans le processus de nécroptose	43
4.	La signalisation TNFR2	45
a)	Le TNFR2	45
b)	Le rôle de la signalisation TNFR2 dans la survie et la prolifération cellulaire	45
5.	L'interférence fonctionnelle entre la signalisation TNFR1 et TNFR2	46
6.	La régulation des gènes par le TNF α	47
a)	Le TNF α et le remodelage de la chromatine.....	47
b)	Les cinétiques d'expression des gènes induits par le TNF α	48
c)	Altération de la réponse cellulaire aux stimuli extérieurs.....	50
7.	Les lymphocytes T régulateurs et le TNF α	51
C.	La polyarthrite rhumatoïde et le psoriasis : deux pathologies dans lesquelles le TNF α joue un rôle central	52
1.	Généralités.....	52
2.	Historique	53
3.	Manifestations cliniques et diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde	53
4.	Rôle du TNF α et des Treg dans le développement de la PR.....	55
5.	Modifications génétiques et conditions environnementales dans le développement de la polyarthrite rhumatoïde	57
6.	Le processus inflammatoire dans la polyarthrite rhumatoïde	60
a)	Implication de la réponse immunitaire adaptative dans la physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde.....	60
b)	La réponse immunitaire innée dans la polyarthrite rhumatoïde	62
c)	Rôles des cytokines dans la physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde.....	63
d)	L'importance du TNF α dans la polyarthrite rhumatoïde	64
e)	La réponse du tissu mésenchymateux face à l'inflammation	64
7.	La destruction articulaire.....	65

a)	L'impact de l'inflammation sur le cartilage	65
b)	L'érosion osseuse	66
8.	Les conséquences systémiques de la polyarthrite rhumatoïde	67
9.	Historique des traitements de fond dans la polyarthrite rhumatoïde.....	69
10.	Les thérapies ciblées	71
a)	L'inactivation des lymphocytes B.....	71
b)	Le ciblage des lymphocytes T.....	72
c)	Les anti-IL-6 récepteur et les anti-IL-1	73
d)	Les thérapies anti-TNF α	74
e)	Les inhibiteurs de la voie JAK/STAT	75
11.	Le psoriasis, une maladie dépendante du TNF α	75
a)	Généralités	76
a)	L'importance des facteurs génétiques dans le psoriasis	76
b)	Implication des lymphocytes T effecteurs dans la réponse inflammatoire psoriasique	78
c)	Les lymphocytes T régulateurs dans le psoriasis	79
d)	Le rôle des cytokines dans le développement du psoriasis.....	80
e)	Les traitements	81
D.	Les modèles animaux utilisés pour l'étude des maladies inflammatoires	83
1.	Modèle expérimentaux de polyarthrite rhumatoïde	83
a)	L'arthrite au collagène	83
b)	L'arthrite induite par des anticorps anti-collagène	84
c)	L'arthrite à la mBSA.....	84
d)	Le modèle DTHA.....	85
e)	Le modèle SCW	85
f)	Les souris SCID	85
g)	Les souris transgéniques.....	85
2.	Modèles d'inflammation cutanée induit par l'imiquod	86
II.	OBJECTIFS.....	89
III.	RESULTATS	91
A.	Résultats Partie 1 : TNFR2 ⁺ Tregs play an important role in skin immune cell infiltration and keratinocyte proliferation	92

1. Introduction.....	92
2. Matériels et Méthodes.....	93
3. Résultats.....	95
a) Contrôle de l'intensité de l'inflammation cutanée par la dose d'imiquimod appliquée.....	95
b) L'absence du TNFR2 conduit à une exacerbation des paramètres cliniques et histologiques de l'inflammation cutanée induite par l'imiquimod.....	97
c) L'absence de TNFR2 entraîne une diminution de la fréquence des Treg et des Treg CD39 ⁺	98
d) Les Treg TNFR2 ⁺ protègent partiellement les souris TNFR2 ^{-/-} de l'inflammation cutanée.....	99
e) L'expression du TNFR2 est liée à une moindre infiltration leucocytaire et macrophagique dans la peau.....	101
f) Etude de l'inflammation cutanée chez des souris n'exprimant pas le TNFR2 uniquement sur les Treg.....	103
g) L'absence de TNFR2 sur les Treg est suffisante pour diminuer leur fréquence ainsi que l'infiltrat leucocytaire cutané.....	104
B. Résultats Partie 2 : TNFR2 ⁺ regulatory T cells (Tregs) are a stable and highly suppressive population and are increased on anti-TNF- α treatment in rheumatoid arthritis (RA).	107
IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	141
A. La signalisation TNF α -TNFR2 augmente la stabilité et l'activité immunosuppressive des Treg.....	142
B. Le TNFR2, un élément essentiel dans le contrôle de l'inflammation dépendante du TNF α	147
C. Implication du TNFR2 dans le recrutement des cellules immunitaires lors de l'inflammation dépendante du TNF α	149
D. Le TNFR2, un récepteur important dans l'activité des cellules immunitaires.....	151
1. Le rôle controversé du TNFR2 à la surface cellules inflammatoires.....	152
2. Les Treg TNFR2 ⁺ des acteurs importants dans le contrôle de l'inflammation dépendante du TNF α	154
E. Les Treg TNFR2 ⁺ sont liés à l'efficacité des traitements anti-TNF α dans la polyarthrite rhumatoïde.....	157
V. CONCLUSION.....	163
VI. REFERENCES.....	165

VII. ANNEXE 195

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : La différenciation des T effecteurs	20
Figure 2 : Rôle du TCR dans la différenciation des tTreg.....	22
Figure 3 : Le gène <i>FoxP3</i> et son promoteur	28
Figure 4 : Rôle de l'interaction avec les CPA dans les mécanismes d'immunosuppression des Treg.....	32
Figure 5 : Rôle des cytokines pro-inflammatoires et du système perforine/granzyme dans les mécanismes d'immunosuppression des Treg	33
Figure 6 : La modification du métabolisme et le rôle du CD25 dans les mécanismes d'immunosuppression des Treg.....	34
Figure 7 : Les populations de Treg présentes lors de la réponse T	35
Figure 8 : Implication de la voie de signalisation du TNFR1 dans la prolifération et la survie cellulaire.....	40
Figure 9 : La signalisation TNFR1 dans le déclenchement de l'apoptose dépendant du Complexe IIa	42
Figure 10 : La signalisation TNFR1 dans le déclenchement de l'apoptose dépendant du Complexe IIb	43
Figure 11 : Implication de la voie de signalisation du TNFR1 dans la nécroptose	44
Figure 12 : La signalisation du TNFR2.....	46
Figure 13 : Activation rapide de l'expression de gènes par le TNF α	48
Figure 14 : Activation intermédiaire des gènes par le TNF α	49
Figure 15 : Répression des gènes inductibles par le TNF α	50
Figure 16 : Comparaison d'une articulation normale (gauche) avec une articulation arthritique (droite)	52
Figure 17 : Facteurs prédisposant à la polyarthrite rhumatoïde	58
Figure 18 : L'immunité adaptative dans la polyarthrite rhumatoïde	61
Figure 19 : L'immunité innée dans la polyarthrite rhumatoïde.....	62
Figure 20 : Mécanisme de destruction articulaire et cartilagineuse dans la polyarthrite rhumatoïde	67
Figure 21: Mécanisme inflammatoire mis en place dans le psoriasis	79
Figure 22 : Contrôle de l'intensité de l'inflammation cutanée par la dose d'imiquimod appliquée	96
Figure 23 : L'absence du TNFR2 conduit à une exacerbation des paramètres cliniques et histologiques de l'inflammation cutanée induite par l'Imiquimod.....	97
Figure 24 : L'absence de TNFR2 en cas d'inflammation cutanée entraîne une diminution des Treg et des Treg CD39 ⁺	99
Figure 25 : Les Treg TNFR2 ⁺ protègent partiellement les souris TNFR2 ^{-/-} de l'inflammation cutanée.....	100
Figure 26 : L'expression du TNFR2 est liée à une moindre infiltration leucocytaire et macrophagique dans la peau	102
Figure 27 : Etude de l'inflammation cutanée chez des souris n'exprimant pas le TNFR2 uniquement sur les Treg.....	103

Figure 28 : L'absence de TNFR2 sur les Treg est suffisante pour diminuer leur fréquence ainsi que l'infiltrat leucocytaire cutané	105
Figure 29 : Mécanisme d'induction de l'expression de <i>FoxP3</i> par le TNFR2	144

Tableau 1 : Récapitulatifs des thérapies ciblées utilisées dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde	75
Tableau 2: Ensemble des traitements utilisés dans le psoriasis	82
Tableau 3 : Modèles expérimentaux de la polyarthrite rhumatoïde	86
Tableau 4 : Amorces utilisées pour le génotypage des souris TNFR1^{-/-} et TNFR2^{-/-}	93
Tableau 5 : Synthèse des travaux étudiant le rôle de la signalisation TNFα-TNFR2 sur les Treg.....	161

LISTE DES ABREVIATIONS

ACPA : Anti-citrullinated protein antibody, anticorps anti-protéines citrullinées

ACR : American College of Rheumatology

ADP : Adénosine Di Phosphate

AEC : Arthrite Expérimentale au Collagène

AIRE : Auto-Immune REgulator

ARNm : Acide Ribonucléique message

ATP : Adénosine Tri Phosphate

CAIA : Collagene Antibody-Induced Arthritis, arthrite induite par des anticorps anti-collagène

CFA : “Complete Freund Adjuvant”, adjuvant complet de Freund

CMH : Complexe Majeur d’Histocompatibilité

CPA : Cellule Présentatrice d’Antigène

CRP : C Reactive Protein, protéine C réactive

CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4

DAS28 : Disease Activity Score 28

DC : Cellule dendritique

DMARD : Disease-Modifying Antirheumatic Drug

DTHA : Delay-Type Hypersensitivity Arthritis

EULAR : European League Against Rheumatism

FoxP3 : Forkhead box P3

GC : Glucocorticoïde

GITR : Glucocorticoid-Induced TNFR-Related protein

GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

GWAS : Genome-Wide Association Study, étude d’association pan-génomique

HAT : Histone Acetyl Transférase

HLA : Human Leucocyte Antigen

ICOS : Inducible T-cell COStimulator

IDO : Indoléamine 2,3 dioxygénase

IFN : Interféron

IL : Interleukine

IRF : Interferon Receptor

iTreg : Treg induit

LB : Lymphocytes B

LPS : Lipopolysaccharide

LT : Lymphocytes T

LTfh : Lymphocyte T folliculaire

LUBAC : linear ubiquitin assembly complex

MBD2 : Methyl-CpG-Binding Domain protein 2

M-CSF : Macrophage Colony-Stimulating Factor

miRNA : micro ARN

MMP : Métalloprotéinase

mTNF α : TNF α membranaire

MTX : Méthotrexate

NEMO : NF κ B Essential MOdulator

NF κ B : Nuclear Factor-Kappa K

NK : Natural Killer

PADI : Peptidylarginine Deiminase

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell, cellules mononucléées du sang

PR : Polyarthrite rhumatoïde

pTreg : Treg périphérique

RANK : Receptor Activator of NF κ B

RANKL : Receptor Activator of NF κ B Ligand

ROS : Reactive Oxygen-Species : espèces réactives de l'oxygène

SPA : Spondyloarthritis

STAT : Signal Transducer and Activator Transcription

sTNF α : TNF α soluble

TCR : T Cell Receptor, récepteur des cellules T

TEC : Thymic Epithelial Cell

Teff : Lymphocyte T effecteur

TGF β : Transforming Growth Factor β

Th : T helper

TLR : Toll-Like Receptor, récepteur de type Toll

TNFR : TNF α receptor, récepteur du TNF α

TNF α : Tumor Necrosis Factor α

TRADD : Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein

TRAF : TNF Receptor Associated Factor

Treg : Lymphocyte T régulateur

TSDR : Treg-Specific Demethylated Region

tTreg : Treg thymique

VS : Vitesse de Sédimentation

I. INTRODUCTION

A. Les lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T (LT) $CD4^+$ sont divisés en deux grandes familles : les T effecteurs (Teff) et les T régulateurs (Treg). Les Teff participent à la mise en place de la réponse inflammatoire et sont divisés en trois populations : les Th1, les Th2 et les Th17 (**Figure 1**). Ces trois types cellulaires dérivent du même précurseur appelé Th0 mais ont des rôles bien distincts.

Les Th1 interviennent lors d'une infection par un pathogène intracellulaire. Ils sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription T-bet et produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL (Interleukine)-12 et l'IFN (Interféron) γ . Les Th2 sont mobilisés lors d'infections parasitaires (Pearce et al., 2012). Ils expriment le facteur de transcription GATA3 et produisent de l'IL-4. Enfin, les Th17 s'activent lors d'une infection intracellulaire. Ils sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription ROR γ T et par la production d'IL-17 (Ivanov et al., 2006).

Ces trois types cellulaires sont capables de se réguler afin de favoriser leur propre expansion mais ne participent pas à la résolution, ni au contrôle de l'inflammation. Les cellules impliquées dans l'équilibre inflammatoires sont les Treg.

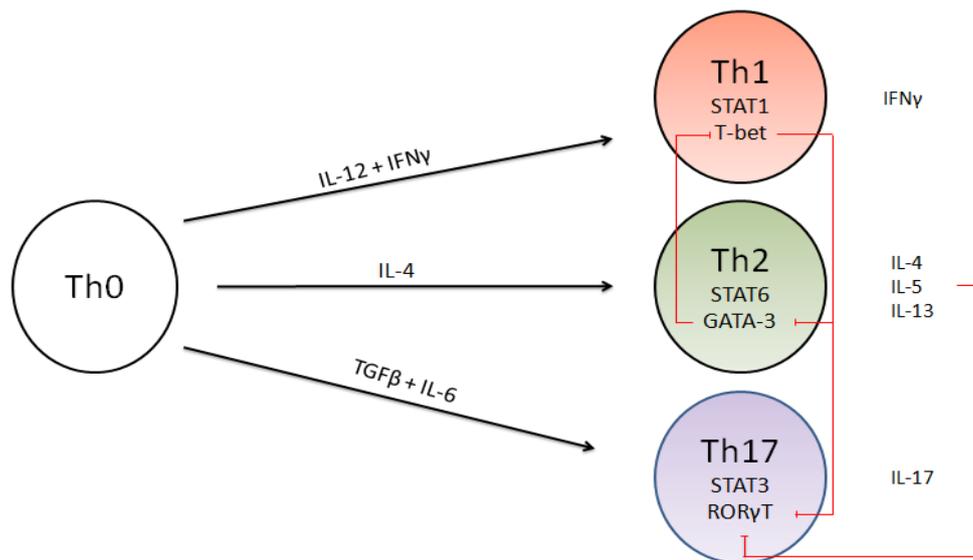


Figure 1 : La différenciation des T effecteurs

1. La découverte des lymphocytes T régulateurs

L'étude des lymphocytes T inhibant le système immunitaire, qu'on appelle actuellement les Treg, a débuté au début des années 1970 dans le but de comprendre le phénomène de tolérance chez la souris (Gershon and Kondo, 1970). Plus tard, entre le milieu des années 1980 et le milieu des années 1990, la forte expression de CD5 et de CD25 ont été identifiées comme des marqueurs des Treg chez la souris (Powrie and Mason, 1990; Sakaguchi et al., 1985, 1995). Il faudra attendre la fin des années 1990 pour avoir la première preuve de l'activité suppressive des Treg (Takahashi et al., 1998). Les années 2000 font émerger l'importance du facteur de transcription « Forkhead box P3 » (FoxP3) dans les capacités immunosuppressives des Treg chez l'homme (Bennett et al., 2001, 2001; Wildin et al., 2001). A cette même époque, des chercheurs mettent en évidence l'implication de la mutation de *FoxP3* dans le développement du syndrome IPEX (Immunodérégulation, Polyendocrinopathie, Entéropathie auto-immune lié au chromosome X) (Bennett et al., 2001). A la suite de cette découverte, les Treg ont été définis comme $CD4^+ FoxP3^+$. L'expression d'ICOS (Inducible T-cell COStimulator) à la surface de ces cellules a été démontrée par la suite (Ito et al., 2008).

2. La différenciation des lymphocytes T régulateurs FoxP3⁺

Les lymphocytes T régulateurs FoxP3⁺ sont aussi appelés Treg conventionnels. Comme tous les LT ils trouvent directement ou indirectement leur origine dans le thymus. Certains vont directement se différencier dans l'organe lymphoïde primaire, ce sont les Treg thymiques (tTreg). Alors que d'autres sont issus de Th0 qui par l'environnement cytokinique se différencieront en Treg une fois en périphérie. Ils sont appelés Treg périphériques (pTreg). Enfin, il est possible d'obtenir des Treg *in vitro*, appelé Treg induits (iTreg).

a) Implication du TCR dans la différenciation des Treg thymiques

Durant la différenciation des LT dans le thymus, la stimulation TCR joue un rôle primordial. La durée et l'intensité de cette stimulation orientent la différenciation cellulaire et modifient les cytokines produites (Singer et al., 2008). La première sélection qui a lieu dans le thymus est la sélection négative. Elle permet d'éliminer les LT $CD4^+$ qui possèdent un TCR auto-réactif. Ce mécanisme est basé sur la capacité d'interaction du TCR et du complexe CMH II/peptide exprimé par les cellules épithéliales thymiques (TEC). Ces cellules expriment une grande diversité de peptides antigéniques du soi grâce à l'expression du facteur de

transcription AIRE (Auto-Immune REgulator) (Malchow et al., 2016). Si le TCR a une interaction trop forte avec le complexe CMH II/peptide, le LT est considéré comme auto-réactif et est éliminé. En revanche si le LT CD4⁺ a une faible interaction il continue sa maturation. En cas d'interaction intermédiaire et en présence d'IL-2, le LT CD4⁺ peut se transformer en tTreg et exprimer FoxP3 (**Figure 2**).

Une analyse plus approfondie des TCR présents à la surface des Treg a été effectuée. Le répertoire de TCR des T effecteurs (Teff) et des Treg ont été comparés, les décrivant comme très différents (Pacholczyk et al., 2006). Pour continuer dans ce sens, une étude a montré que l'expression de TCR de Teff issus de Treg entraîne le développement de maladies auto-immunes confirmant la reconnaissance d'un antigène du soi par les TCR des tTreg (Hsieh et al., 2004).

L'importance de la stimulation TCR dans la différenciation des tTreg a aussi été suggérée par les fortes expressions de CD25, de CD5 ainsi que de CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte-associated protein 4) qui sont dépendantes de cette stimulation. De plus, l'absence d'une régulation négative de la signalisation TCR par CD5 ou SHP-1 conduit à une augmentation de la fréquence des Treg dans le thymus (Carter et al., 2005).

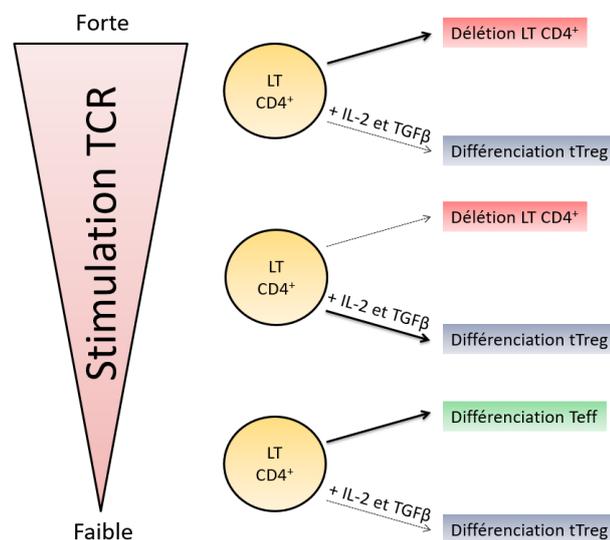


Figure 2 : Rôle du TCR dans la différenciation des tTreg

b) Rôle des cytokines dans la différenciation des Treg thymiques

Le TCR est donc indispensable pour la différenciation thymique des Treg mais plusieurs études ont montré que ce signal n'est pas suffisant pour la génération des tTreg. Les cytokines jouent également un rôle important dans cette différenciation (Burchill et al., 2008).

L'IL-2 est la cytokine majeure qui intervient dans la différenciation des tTreg. L'absence de cette cytokine entraîne une diminution de la fréquence de ces cellules dans le thymus (Fontenot et al., 2005). Le modèle actuellement proposé quant à l'action de l'IL-2 dans la différenciation des tTreg est directement lié à la stimulation TCR. Le signal TCR permettrait une augmentation de l'expression de la sous unité α du récepteur à l'IL-2, le CD25. L'IL-2 pourrait alors stimuler le futur tTreg, entraînant l'activation de STAT5 et conduisant à l'expression de FoxP3 (Lio and Hsieh, 2008). L'absence de STAT5 diminue drastiquement le nombre de tTreg alors que son expression constitutive l'augmente, montrant ainsi sa nécessité dans ce mécanisme de différenciation (Burchill et al., 2007).

Le TGF β a aussi été suggéré comme jouant un rôle dans la différenciation des tTreg. Cette hypothèse a pu paraître intrigante au départ puisque le TGF β -R1, le récepteur du TGF β , est sous le contrôle de FoxP3. Cependant il a été montré que cette cytokine est importante dans la génération des tTreg surtout à la naissance. La suppression du TGF β -R1 entraîne une déficience transitoire des cellules CD4⁺ FoxP3⁺ dans les premières semaines de la vie. Le retour à la normale du nombre de CD4⁺ FoxP3⁺ dans le thymus après quelques semaines est expliqué par l'augmentation de la quantité thymique d'IL-2. Cette cytokine n'est que peu présente dans le thymus au début de la vie. C'est à ce moment que le TGF β joue son rôle dans la différenciation des tTreg mais en vieillissant, l'IL-2 augmente et devient suffisante pour la génération de ces derniers (Liu et al., 2008a). Le TGF β intervient aussi dans la survie des précurseurs des tTreg dans le thymus. En 2010, Ouyang et ses collègues ont montré que le TGF β était capable d'inhiber l'apoptose dépendante de la protéine Bim dans les précurseurs des tTreg, favorisant ainsi leur différenciation (Ouyang et al., 2010).

c) Importance du TCR dans la différenciation des Treg périphériques

Les pTreg contrairement aux tTreg sont générés en périphérie et issus de la différenciation de LT CD4⁺ conventionnels (Th0). De plus, la nature de leur TCR leur confère un rôle différent des tTreg. Les tTreg se différencient suite à l'interaction du TCR avec un peptide antigénique du soi présenté par le CMH II. En revanche, les pTreg présentent un TCR qui reconnaît un peptide antigénique du non soi issu par exemple de la nourriture, d'un allergène ou de la flore commensale. Les pTreg jouent donc un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire vis-à-vis d'un antigène du non soi. D'ailleurs des comparaisons du répertoire TCR des pTreg et des tTreg ont été effectuées et ne montrent qu'une faible homologie (Lathrop et al., 2011).

La stimulation du TCR pour la différenciation des pTreg est indispensable et permet l'expression de FoxP3 (Waldmann et al., 2008). De plus, elle entraîne l'expression de CTLA-4 par les Treg, un antagoniste de CD28. Cependant, le CD28 est aussi exprimé par les pTreg donnant à ces cellules la possibilité d'être des cellules co-stimulatrices de Teff. Le modèle actuel suppose donc que l'activation du TCR permet l'augmentation de l'expression de CTLA-4 en diminuant l'expression du CD28 et favorise ainsi l'action anti-inflammatoire.

d) Rôle des cytokines dans la différenciation des Treg périphériques

Il a été montré qu'en plus d'une stimulation TCR et d'une co-stimulation, une grande quantité de TGF β favorise la différenciation des pTreg. Cette cytokine est fortement impliquée dans l'expression du facteur de transcription FoxP3 (Kretschmer et al., 2005). Le TGF β via son récepteur TGF β -R1 active Smad3 qui se fixe sur le gène *FoxP3* permettant son expression (Horwitz et al., 2008). L'activation de TGF β R réprime Gfi-1, un répresseur transcriptionnel qui inhibe la différenciation des pTreg et des Th17 (Zhu et al., 2009). De plus, cette cytokine agit directement sur la régulation épigénétique de *FoxP3* par l'inhibition de la Dnmt1 (DNA methyltransferase I) (Josefowicz et al., 2009). Cette importance du TGF β dans l'induction des pTreg a été détournée par l'helminthe *Heligmosomoide polygyrus*. Ce parasite favorise son développement en activant le TGF β R induisant la génération des pTreg (Grainger et al., 2010).

Comme pour les tTreg, l'IL-2 joue un rôle important dans la différenciation des pTreg. Il permet l'expression de *FoxP3* par l'activation de STAT5 ainsi que la prolifération et la survie cellulaire. Il agit aussi de concert avec le TGF β . Ce dernier est une cytokine impliquée à la fois dans la différenciation des Th17 et des pTreg, deux populations dont les rôles sont diamétralement opposés. Lorsque l'IL-2 et le TGF β agissent ensemble, l'IL-2 est capable de réprimer la différenciation Th17 en faveur de la différenciation pTreg. Cette inhibition des Th17 s'explique par le rôle inhibiteur de STAT5 induit par l'IL-2 sur l'expression de *ROR γ T* (Laurence et al., 2007).

e) Les sites de génération des Treg périphériques

Pour aboutir à la formation des pTreg, il faut réunir plusieurs paramètres : une stimulation TCR, une co-stimulation, du TGF β , de l'IL-2 ainsi qu'un peptide antigénique du non soi issu de l'alimentation, de la flore commensale ou d'un allergène présenté sur le CMH II.

A la naissance, la flore commensale et la diversité alimentaire ne sont que très peu développées et les sites favorisant la formation de pTreg sont donc rares. Il a été montré qu'au début de la vie, le site préférentiel pour la génération de ces derniers est le même que celui des tTreg, le thymus. Cela a été montré par l'existence d'une forte homologie des répertoires TCR des Treg périphériques et des Treg thymiques à la naissance (Hsieh et al., 2006). Au cours de la vie, la flore commensale se développe et l'alimentation se diversifie. L'endroit propice à la génération des pTreg se trouve alors au niveau des muqueuses. Parmi les sites de l'immunité des muqueuse, les GALT (Gut-Associated Lymphoid tissues) ou plaques de Peyer jouent un rôle important dans la génération des pTreg. La capacité des GALT à favoriser les pTreg est due à la présence de cellules dendritiques CD103⁺. Elles présentent les peptides antigéniques du non soi et produisent une grande quantité de TGF β et d'acide rétinoïque favorisant le développement des pTreg (Benson et al., 2007; Coombes et al., 2007).

f) Les marqueurs majeurs des Treg

Bien que tous les Treg ne soient pas générés de la même manière, ils partagent tous l'expression de certains marqueurs caractéristiques que ce soit chez l'homme ou chez la souris.

Chez la souris l'identification des Treg est très bien définie. Ce sont des cellules CD4⁺ FoxP3⁺. Ces deux marqueurs suffisent à définir un Treg. Cependant chez l'homme, la caractérisation de ces derniers est un peu plus complexe. Cela est en partie dû à l'expression de FoxP3 par certains LT CD8⁺, NKT (Natural Killer T cells) ou Teff (Allan et al., 2007). Il a donc fallu trouver d'autres marqueurs pour affiner l'identification de ces cellules. Le CD25 a été identifié comme un marqueur des Treg. Il n'est pas spécifique de cette population cellulaire mais elle est la seule à l'exprimer fortement. Cette caractéristique est aussi valable pour les Treg murins. Les Treg humains ont aussi été caractérisés comme exprimant faiblement CD127, la sous unité α du récepteur à l'IL-7 (Hartigan-O'Connor et al., 2007; Liu et al., 2006).

Même si l'identification des Treg murins et humains est différente, ils partagent tout de même certains marqueurs essentiels pour leur activité immunosuppressive. C'est le cas de CTLA-4, directement corrélé à l'activité suppressive des Treg. Le TNFR2 (Tumor Necrosis Factor Receptor 2) est présent sur la majorité des tTreg que soit chez l'homme ou chez la souris. Il est directement lié à l'efficacité des Treg puisque les Treg murins TNFR2⁺ sont plus immunosuppresseurs que les Treg TNFR2⁻ (Chen et al., 2008). C'est aussi le cas du CD39 qui intervient directement dans la perturbation locale du métabolisme due aux Treg ou encore l'expression du GITR (Glucocorticoid-induced TNFR-Related protein) même si ce dernier n'est pas directement lié à l'efficacité des Treg (Liao et al., 2012). Cependant, des marqueurs partagés sur les Treg murins et humains peuvent avoir des rôles différents, c'est le cas d'ICOS. Les Treg murin ICOS⁺ sont plus suppressifs que les Treg ICOS⁻ alors que chez l'homme l'expression d'ICOS n'a pas été montrée comme modulant l'activité des Treg (Ito et al., 2008).

3. Les lymphocytes T régulateurs FoxP3⁻

Il existe d'autres populations de lymphocytes régulateurs caractérisées par l'absence d'expression de FoxP3.

a) Les Tr1

Les Tr1 sont des LT CD4⁺ qui sécrètent de l'IL-10 et du TGF β mais n'expriment pas FoxP3 (Roncarolo et al., 2014). Ils sont issus de LT CD4⁺ stimulés avec de l'IL-10 et de l'IL-27 (Awasthi et al., 2007; Groux et al., 1997). Ces cytokines anti-inflammatoires produites par les Tr1 permettent l'inhibition de l'activité Th1 et Th2 (Barrat et al., 2002). Le rôle des Tr1 a été

décrit dans la régulation de la réaction immunitaire après une transplantation. Ces cellules sont bénéfiques dans l'acceptation du greffon par l'hôte mais aussi dans la sclérose en plaque (SEP) pour le maintien de l'homéostasie immunitaire (Astier et al., 2006; Gagliani et al., 2010). Plus récemment il a été montré que les Tr1 régulaient l'activité immunitaire innée par une modulation de l'activation de l'inflammasome ce qui n'est pas le cas des Treg FoxP3⁺ (Yao et al., 2015).

b) Les Th3

Les Th3 sont des LT CD4⁺ caractérisés par leur forte sécrétion de TGFβ. Ces cellules sont générées après ingestion d'un antigène par voie orale. Les Th3 sont les principales cellules T à produire du TGFβ permettant ainsi la sécrétion d'Ig (Immunoglobuline) A qui supprime l'activité Th1 et Th2 (Fukaura et al., 1996). Les Th3 n'expriment pas FoxP3 et leur développement est indépendant des Treg conventionnels (Apostolou et al., 2002). Cependant, ils présentent des récepteurs communs à ces derniers comme CD25 ou CTLA-4 (Takahashi et al., 2000).

4. Le facteur de transcription FoxP3

Les Treg sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription FoxP3. Il est essentiel pour le bon développement des Treg ainsi que pour la mise en place et l'efficacité de l'activité suppressive de ces derniers.

a) Le gène *FoxP3*

Le gène *FoxP3* est situé sur le bras p du chromosome X. Il est composé de 11 exons qui présentent un grand degré de conservation entre la souris et l'homme (Brunkow et al., 2001). *FoxP3* est gouverné par un promoteur et de nombreuses séquences non codantes (CNS) qui servent de sites de fixation pour des molécules indispensables à l'initiation et au maintien de la transcription de ce gène (**Figure 3**).

Le promoteur du gène *FoxP3* est situé en amont de ce dernier. Lors de la stimulation TCR, les facteurs de transcription NFAT et AP-1 se fixent sur le promoteur et l'active (Mantel et al., 2006). La fixation additionnelle de Foxo1 et Foxo2 favorise aussi la transcription de *FoxP3*. Le promoteur de *FoxP3* présente un faible potentiel d'activation ce qui rend la transcription de ce dernier fortement dépendante des régions activatrices présentes dans le gène.

La séquence CNS3 est située entre l'exon 1 et l'exon 2 du gène *FoxP3*. Ce site est lié aux modifications épigénétiques du gène. CNS3 permet la modification des histones qui est indispensable à la transcription de *FoxP3* et est connue pour être l'interrupteur de son expression. Elle est stimulée par la protéine Rel, nécessaire au développement des Treg (Feng et al., 2015). CNS3 a été montré comme jouant un rôle dans l'initiation de l'expression de *FoxP3* mais ne paraît pas indispensable à son maintien, contrairement à CNS2.

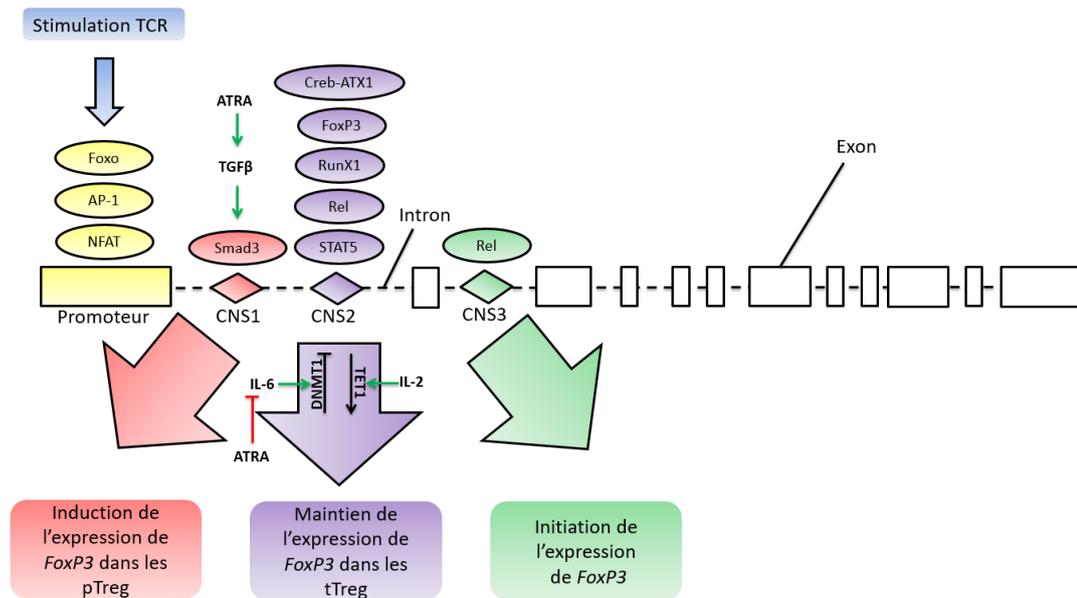


Figure 3 : Le gène *FoxP3* et son promoteur adaptée de (Lu et al., 2017)

La séquence CNS2 est importante dans le maintien de l'expression de *FoxP3* surtout chez les tTreg. Cette séquence est située au sein du premier intron de *FoxP3*. Lors de la différenciation des Treg, les îlots CpG de cette séquence sont déméthylées (Toker et al., 2013). Cette modification épigénétique permet la fixation des molécules Rel, Creb-ATF1, Runx1, STAT5 ou encore FoxP3 lui-même, permettant le maintien de *FoxP3* (Ouyang et al., 2010). *In vitro*, les iTreg obtenus après différenciation de LT CD4⁺ conventionnels présentent des capacités immunosuppressives plus faibles associées à une plus forte méthylation de CNS2 comparés aux Treg *ex vivo*. Ces travaux démontrent le rôle important du statut de méthylation de CNS2 dans le maintien de *FoxP3* (Zheng et al., 2010). Cette modification épigénétique est permise par la fixation de MBD2 (Methyl-CpG-Binding Domain protein 2) qui recrute la déméthylase TET1 maintenant le statut hypométhylé de CNS2. L'absence de MBD2 diminue le nombre de Treg ainsi que leurs capacités suppressives (Wang et al., 2013). Ce mécanisme est finement régulé par des molécules antagonistes de MBD2 telle que

Dnmt1 (DNA methyltransferase 1). Dnmt1 méthyle CNS2 déstabilisant l'expression de *FoxP3*. Cette action de Dnmt1 a récemment été montrée comme induite par l'IL-6 (Nair et al., 2016).

La séquence CNS1 est particulièrement impliquée dans la présence de FoxP3 dans les pTreg. Tout comme pour CNS2, CNS1 est située dans la partie intronique de *FoxP3*. Ce site est indispensable à l'activation de l'expression de *FoxP3* après une stimulation par le TGF β (Schlenner et al., 2012). Cela est dû au recrutement de Smad3 qui est capable de se fixer à CNS1 pour induire l'expression de *FoxP3*. Une déficience en CNS1 conduit à une absence de pTreg mais n'entraîne pas le développement de maladies auto-immunes démontrant son rôle indispensable dans la génération des Treg périphériques mais pas dans celle des Treg thymiques (Josefowicz et al., 2012).

b) Rôle des cytokines dans la régulation de *FoxP3*

L'IL-2 joue un rôle prépondérant dans l'expression de *FoxP3*. La stimulation du récepteur de l'IL-2, active la voie JAK (Janus Kinase) qui phosphoryle STAT5. Cela permet à STAT5 de se fixer au promoteur de *FoxP3* ainsi qu'à sa séquence CNS2 activant la transcription. La suppression de JAK3 ou de STAT5 entraîne une diminution de l'expression de *FoxP3* dans le thymus. Cependant, des souris déficientes pour l'IL-2 et surexprimant STAT5 présentent un niveau de Treg normal (Thornton et al., 2004). Cette cytokine intervient aussi dans le maintien de l'expression de *FoxP3*. Cela est dû à la présence importante du CD25 à la surface des Treg. Plus l'expression de CD25 par les Treg est élevée, plus l'expression de *FoxP3* est stable. Cette cytokine est aussi capable de contrer les actions de l'IL-6. Comme il est expliqué précédemment, l'IL-6 peut induire l'expression de Dnmt1 qui méthyle CNS2 diminuant la transcription de *FoxP3* (Miyara et al., 2009). Cependant, l'IL-2 permet de recruter TET1 pour favoriser la déméthylation de CNS2 (Nair et al., 2016). L'IL-6 ainsi que d'autres cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-21 peuvent contrecarrer l'action de IL-2 par activation de STAT3. Ce dernier peut occuper les sites de liaisons de l'IL-2 sur STAT5 diminuant la transcription de *FoxP3* (Laurence et al., 2012). De manière étonnante, le TNF α (Tumor Necrosis Factor α), une cytokine pro-inflammatoire, a été montré comme favorisant la voie STAT5 et l'expansion des Treg (Nguyen and Ehrenstein, 2016).

Le TGF β est aussi impliqué dans la régulation de *FoxP3* en activant la voie Smad. Smad 3 et Smad 4 peuvent alors se fixer sur la séquence CSN1 et activer la transcription de *FoxP3*. Ce mécanisme est indispensable pour l'acquisition du phénotype et des fonctions des Treg en périphérie (Josefowicz et al., 2012). Le rôle du TGF β sur les tTreg est encore peu compris. Certaines études montrent qu'il n'est pas indispensable à leur développement mais qu'une exposition prolongée au TGF β permettrait un meilleur maintien de l'expression de *FoxP3*.

L'acide tout-trans-rétinoïque (ATRA) a été identifié comme jouant un rôle dans la différenciation des pTreg. Il agirait en augmentant l'activité du TGF β sur la déphosphorylation de Smad 3 ou en diminuant l'activité pro-inflammatoire dépendante de l'IL-6 (Benson et al., 2007).

c) Modifications post traductionnelles de FoxP3

Après sa traduction, la protéine FoxP3 peut subir différentes modifications qui vont moduler son action ainsi que sa présence au sein de la cellule.

L'acétylation est le processus qui permet l'ajout d'un groupement acétyle sur la protéine. Dans le cas de FoxP3, ce groupement est ajouté sur une lysine par une lysine acétyle-transferase (KAT). Cette modification permet une meilleure stabilité de FoxP3 et augmente sa capacité à lier la chromatine lui permettant de jouer son rôle de régulateur de la transcription (van Loosdregt et al., 2010). En plus des KAT, FoxP3 s'associe à p300 et TIP60 pour augmenter sa stabilité. Les sites privilégiés pour l'acétylation de la protéine FoxP3 sont les lysines 63, 263 et 268. L'absence de p300 entraîne une diminution de l'acétylation de FoxP3 ainsi que des Treg totaux. L'absence de TIP60 conduit au développement de maladies auto-immunes par une diminution de la fréquence des Treg dans le thymus et de leur expression de CTLA-4 (Wang et al., 2016). Il a aussi été montré que les lysine déacétyl-transferases favorisent l'instabilité de FoxP3, indiquant ainsi le rôle important de l'acétylation dans le maintien de cette protéine (van Loosdregt et al., 2010). Cette modification post traductionnelle est aussi utilisée par les bactéries de la flore commensale afin de déclencher la différenciation des pTreg (Furusawa et al., 2013).

La sérine 418 située dans la partie C terminale de FoxP3 est sensible à la phosphorylation. La kinase impliquée dans ce mécanisme est encore inconnue. Cependant,

ce processus a été montré comme important dans le maintien de FoxP3. Dans la polyarthrite rhumatoïde (PR), le TNF α présent en grande quantité, est capable d'activer la phosphatase 1 (PP1) conduisant à une déphosphorylation de FoxP3 et empêchant son bon fonctionnement (Nie et al., 2013). Cependant la phosphorylation de la partie N terminale de FoxP3 par CDK2, après une stimulation TCR, empêche le développement des Treg (Chunder et al., 2012). Il y a peu, deux kinases PIM1 et PIM2 ont été identifiées comme pouvant phosphoryler la partie N terminale de FoxP3 entraînant une diminution de son activité et donc de l'expression des gènes qu'il régule, comme ceux du CD25, de GITR ou encore de CTLA-4 (Deng et al., 2015; Li et al., 2014).

L'ubiquitination est une modification post traductionnelle intervenant dans la régulation protéique. Ce mécanisme permet l'ajout d'ubiquitines sur la partie N terminale des protéines conduisant à leur dégradation par le protéasome. La protéine HIF1 est capable de polyubiquitiner FoxP3 entraînant une diminution de cette protéine dans la cellule (Dang et al., 2011). L'ubiquitination est aussi favorisée par des facteurs pro-inflammatoires tels que les cytokines et le lipopolysaccharide (LPS). Cependant, le phénomène inverse existe, c'est la désubiquitination. Elle est possible par l'activité de déubiquitinases et intervient dans le maintien de FoxP3. La suppression de certaines de ces protéines comme USP7 diminue les capacités immunosuppressives et le nombre des Treg en périphérie mais pas le nombre de Treg thymique (van Loosdregt et al., 2013). L'ubiquitination semble donc jouer un rôle plus important dans le maintien des pTreg que des tTreg.

5. Les fonctions immunosuppressives des lymphocytes T régulateurs

Les Treg sont capables de diminuer l'inflammation par de multiples mécanismes de différentes natures. Ils peuvent interagir de manière directe avec les CPA, produire des cytokines anti-inflammatoires ou encore modifier le métabolisme environnant. L'utilisation de tous ces mécanismes n'est pas systématique mais est fonction du lieu d'action et de l'environnement cellulaire.

a) Les interactions avec les cellules présentatrices d'antigènes

La molécule impliquée dans le mécanisme d'interaction du Treg avec les CPA est CTLA-4. L'absence de cette molécule diminue grandement la capacité immunosuppressive des Treg conduisant à des maladies auto-immunes dépendantes des LT (Tai et al., 2012). Le

CTLA-4 est capable d'endocyter le CD80 et le CD86 des CPA et de les dégrader dans les lysosomes. Ces deux molécules sont indispensables à la co-stimulation des lymphocytes (Qureshi et al., 2011). Sans elles, les LT ne peuvent être activés correctement. Lors de sa fixation au CD80, le CTLA-4 est capable d'augmenter la production de certaines enzymes telles que l'indolamine 2, 3 dioxygénase (IDO) ou la nitric oxyde synthase 2 (Cobbold et al., 2009). Les CPA IDO⁺ sont régulatrices chez l'homme et leur action entraîne la dégradation du tryptophane en kynurénine, privant les Teff d'un acide aminé essentiel (**Figure 4**). La kynurénine est capable d'inhiber la prolifération des Teff et d'augmenter l'expression de *FoxP3* par une inhibition de la voie PI3K/mTOR.

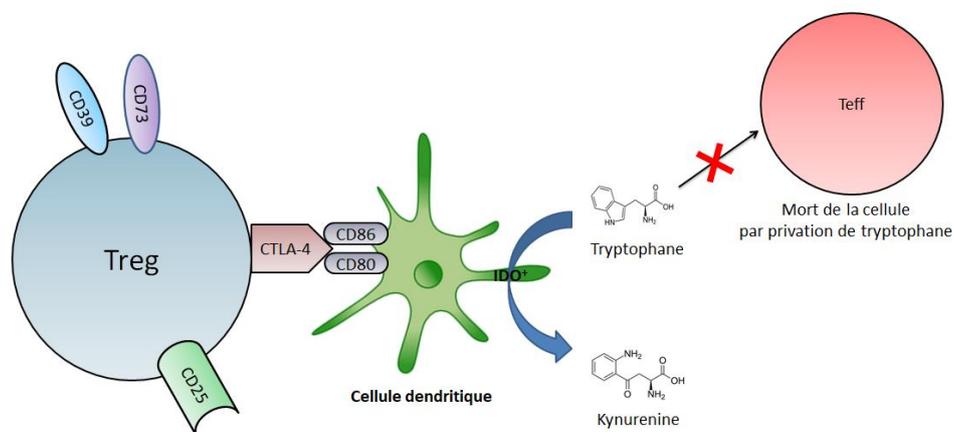


Figure 4 : Rôle de l'interaction avec les CPA dans les mécanismes d'immunosuppression des Treg

b) Les cytokines anti-inflammatoires et les granzymes

Le TGF β est une cytokine anti-inflammatoire intervenant directement dans le maintien de l'expression de *FoxP3*. Il joue aussi un rôle essentiel dans la régulation des Teff. Dans un premier temps, il est capable de favoriser la différenciation des Treg au détriment de la différenciation des Th17 (Bettelli et al., 2006). Dans un second temps, il permet aux Treg de produire des enzymes telles qu'IDO, favorisant ainsi la mort des Teff. L'IL-10 joue sensiblement le même rôle mais n'intervient pas dans la différenciation des Th17 (**Figure 5**).

Les Treg sont aussi capables d'inhiber les Teff par un mécanisme faisant intervenir le système perforine/granzyme (Grossman et al., 2004). Ce dernier est généralement utilisé par les LT CD8⁺ cytotoxiques pour détruire les cellules infectées. Il consiste en la libération de microvésicules contenant des molécules de granzyme et de perforine, après une stimulation TCR. La perforine troue la membrane plasmique, formant des pores et permettant l'entrée

de la granzyme dans le cytosol de la cellule. Elle clive alors la pro-caspase 3 déclenchant une cascade de signalisation conduisant à l'apoptose par relargage du cytochrome c de la mitochondrie dans le cytosol. Pour les Treg, le mécanisme est encore peu compris car ils tuent directement les Teff sans engagement de leur TCR par ces derniers (**Figure 5**). De plus, il a été montré que la granzyme pouvait avoir une action en absence de perforine dans ce mécanisme d'immunosuppression (Gondek et al., 2005).

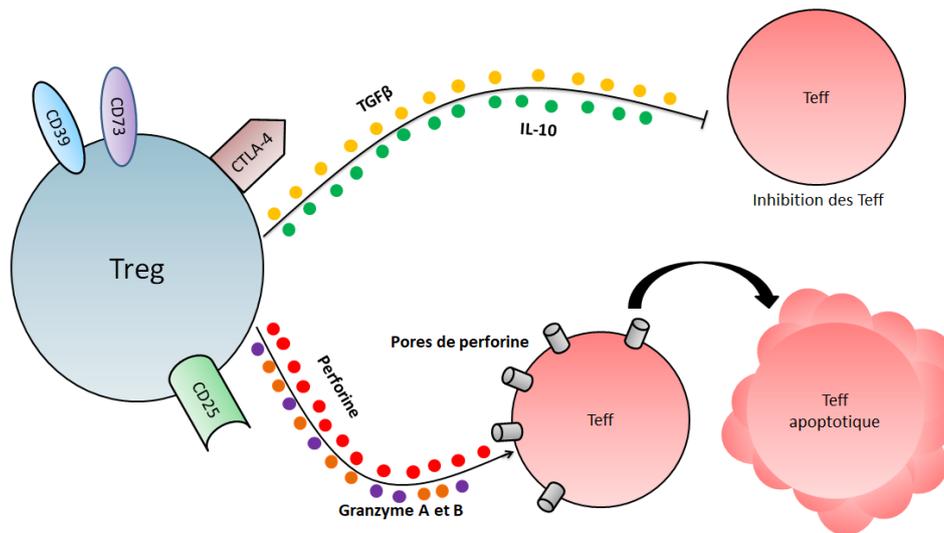


Figure 5 : Rôle des cytokines pro-inflammatoires et du système perforine/granzyme dans les mécanismes d'immunosuppression des Treg

c) Modification du métabolisme et autres mécanismes d'immunosuppression

La modification du métabolisme passe par l'action des ectonucléotidases, CD39 et CD73 qui interviennent dans l'hydrolyse de l'ATP (Adénosine Tri Phosphate). La présence de ces deux enzymes associée à l'expression du récepteur à l'adénosine 2A2 par les Teff permet l'activation d'une boucle immunosuppressive. L'ATP joue un rôle de chemoattractant en cas d'inflammation, favorisant le recrutement des lymphocytes (Bours et al., 2006). Les Treg peuvent hydrolyser de l'ATP en adénosine grâce au CD39 et au CD73. L'adénosine possède des propriétés anti-inflammatoires et se fixe au récepteur à l'adénosine 2A2 (**Figure 6**). Lorsque ce récepteur est exprimé par les Teff, l'adénosine inhibe la prolifération de ces cellules (Airas et al., 1995).

Il existe un dernier mécanisme qui permet aux Treg d'inhiber les Teff. Il fait intervenir le CD25, la sous unité α du récepteur à l'IL-2. La forte expression du CD25 permet aux Treg

de fixer l'IL-2 de manière très efficace. Cette cytokine est nécessaire à la prolifération des LT en général. Par leur forte expression de CD25, les Treg sont capables de consommer une grande partie de l'IL-2 du milieu, favorisant leur maintien et diminuant la survie et la prolifération des Teff (Höfer et al., 2012) (**Figure 6**).

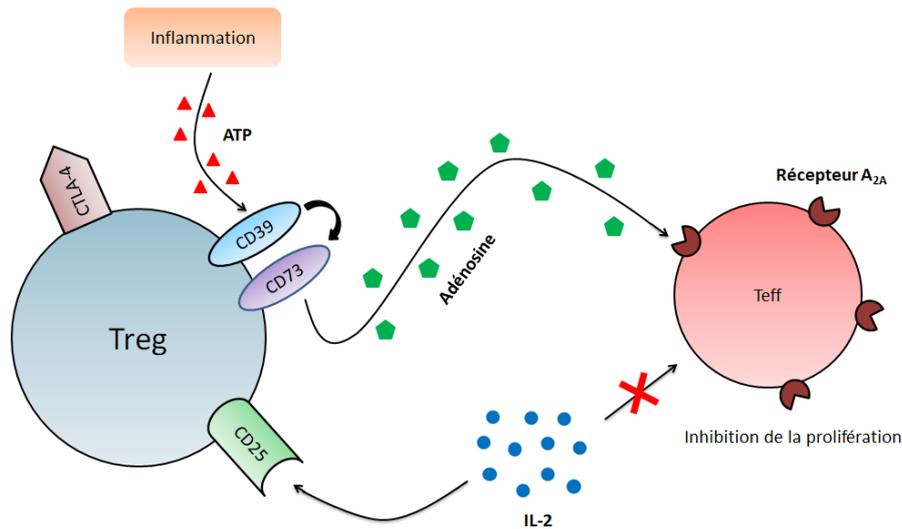


Figure 6 : La modification du métabolisme et le rôle du CD25 dans les mécanismes d'immunosuppression des Treg

6. Les sous populations de Treg présentes lors de la réponse T

Les Treg sont les principaux acteurs dans la régulation de l'inflammation et particulièrement celle concernant les Teff. Ces derniers sont subdivisés en plusieurs populations : les Th1, les Th2 et les Th17. Il a récemment été montré que les caractéristiques des Treg étaient différentes selon le type de Teff à inhiber (**Figure 7**).

Les Th1 sont des Teff caractérisés par l'expression du facteur de transcription T-bet. Des études ont montré que les Treg étaient aussi capables d'exprimer ce facteur de transcription. De manière intéressante, l'expression de T-bet par les Treg déclenche la production de CXCR3. Cette famille de molécules permet d'aiguiller les cellules dans l'organisme pour les mener jusqu'au lieu de l'inflammation. Les Treg CXCR3⁺ ont donc une plus grande capacité à migrer jusqu'au site d'inflammation et plus particulièrement à ceux riches en Th1 (Koch et al., 2009). De plus, l'absence de T-bet seulement dans les Treg empêche spécifiquement la régulation des Th1 par les Treg.

Les Treg permettant l'inhibition de la réponse Th2 ont aussi des caractéristiques particulières. Ils ont été identifiés par l'étude d'IRF4 (Interferon Regulatory Factor 4). Ce facteur de transcription est essentiel dans la différenciation des Th2. En 2009, la démonstration a été faite que les Treg étaient capables d'exprimer IRF4 (Zheng et al., 2009). Il s'associe avec FoxP3 pour former un complexe qui active l'expression de gènes impliqués dans la régulation des Th2. La suppression d'IRF4 dans les Treg entraîne une augmentation pathogénique des Th2 et de la concentration d'IL-4.

Les Treg permettant l'inhibition de la réponse Th17 expriment STAT3. Ce facteur de transcription est la clé de voûte de la différenciation des Th17. Tout comme les deux précédentes populations de Treg, la suppression spécifique de STAT3 seulement dans les Treg conduit à une augmentation des Th17 dans l'organisme (Chaudhry et al., 2009).

L'activité des LT folliculaires (Tfh) est aussi régulée par les Treg. Les Tfh sont résidents des centres germinatifs des ganglions lymphatiques, participant à l'activation des lymphocytes B (LB) et à la mise en place des LB mémoires. Ils sont donc très importants pour l'immunité humorale. Les Treg régulant les Tfh ont comme particularité d'exprimer Bcl-6, le facteur de transcription nécessaire à la génération des Tfh. Bcl-6 augmente l'expression de CXCR5 favorisant le recrutement des Treg dans les centres germinatifs (Chung et al., 2011).

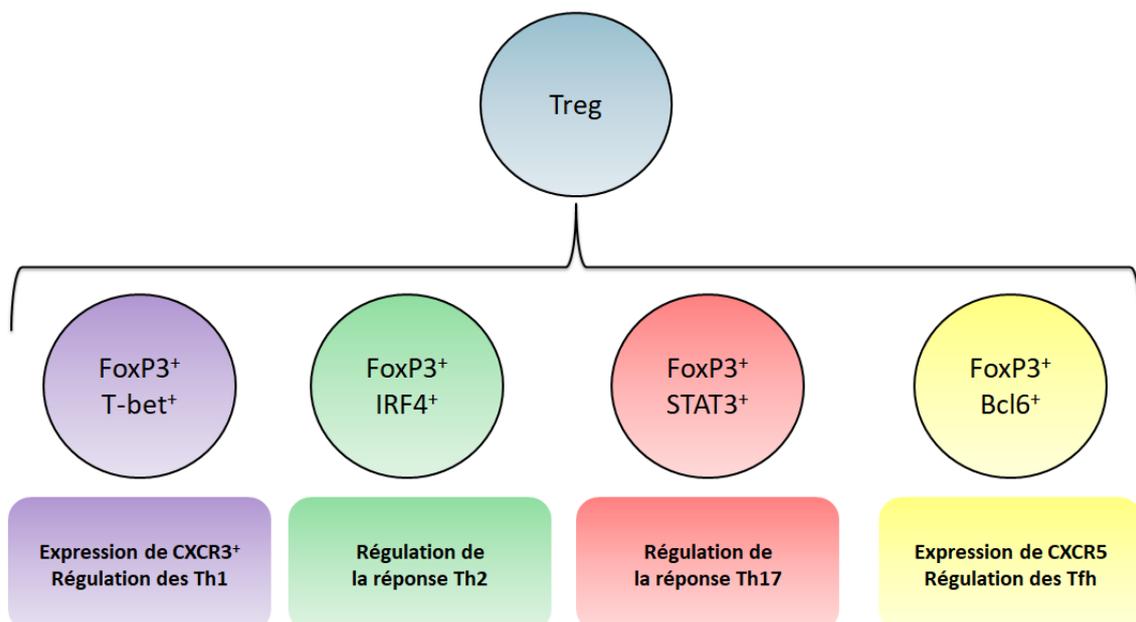


Figure 7 : Les populations de Treg présentes lors de la réponse T

B. Le Tumor Necrosis Factor α

La super famille des TNF (Tumor Necrosis Factor) est composée de 19 ligands et de 29 récepteurs. Ces protéines interviennent dans des mécanismes très différents tels que l'apoptose, la prolifération cellulaire ou la morphogenèse mais présentent toutes une activité pro-inflammatoire (Aggarwal, 2003). Le TNF α est la protéine la mieux caractérisée de cette super famille.

1. Le TNF α et ses récepteurs

Le TNF α est une cytokine dont le gène est situé sur le chromosome 6. Elle est caractérisée par son action pro-inflammatoire et son implication dans le développement de maladies inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde ou la maladie de Crohn. Le TNF α est une protéine transmembranaire de type II de 26 kDa (mTNF α). Les 76 premiers acides aminés servent de peptide signal pour adresser la protéine à la membrane plasmique (Kriegler et al., 1988). Le mTNF α peut alors être clivé par l'enzyme TACE (TNF α Converting Enzyme) entre son alanine 66 et sa valine 67 pour obtenir le TNF α soluble (sTNF α). Le mTNF α et le sTNF α existent sous forme de mono, di et trimère. Le TNF α exerce son activité biologique sous forme trimérique (Black et al., 1997).

Le TNF α est capable de se fixer à deux récepteurs : le TNFR1 et le TNFR2. Le TNFR1 fixe majoritairement le sTNF α alors que le TNFR2 fixe majoritairement le mTNF α . Le TNFR1 est une protéine transmembranaire de 55 kDa possédant un domaine de mort sur sa partie intracellulaire et est exprimée sur la majorité des types cellulaires. Le TNFR2 est quant à lui, une protéine transmembranaire de 75 kDa exprimée à la surface des astrocytes, des cellules immunitaires, des myocytes, des cellules endothéliales ainsi que sur les cellules souches mésenchymateuses humaines (Irwin et al., 1999; Ware et al., 1991). Contrairement au TNFR1, le TNFR2 ne possède pas de domaine de mort dans sa partie intracellulaire.

2. Régulation du TNF α

a) Régulation transcriptionnelle du gène *Tnfa*

Le *Tnfa* est l'un des premiers gènes à être activé après une stimulation du TCR sur les LT ou une activation des monocytes ou des macrophages. Il est à noter que cette cytokine peut être produite par les LT par le seul engagement du TCR, la présence du CD28 étant facultative (Goldfeld et al., 1993). Il a été montré que le flux de calcium est suffisant pour

induire l'expression du *Tnfa*. Cependant, d'autres mécanismes sont mis en jeu pour réguler l'expression de ce gène.

La région proximale du promoteur du *Tnfa* est sensible à divers stimuli, entraînant son expression. Ces stimuli sont générés au cours d'infections bactériennes, d'infections virales ou encore de stress osmotique. Cette région proximale est très bien conservée chez les mammifères et quasiment identique chez tous les primates. La transcription du *Tnfa* est fortement régulée par la présence de multiples « Histone Acetyl Transférase » (HAT) comme CBP. Cette protéine est spécifiquement requise lors de l'expression du *Tnfa* après une stimulation TCR (Brinkman et al., 1999). La première HAT à avoir été identifiée comme régulatrice du *Tnfa* est AFT-2. Elle se fixe à l'AMP cyclique sur la partie proximale du promoteur déclenchant ainsi l'expression du *Tnfa*. Ce mécanisme est présent dans de nombreux types cellulaires et est la réponse à de multiples stimuli comme une infection par *Mycobacterium tuberculosis*, conduisant à la production de TNF α (Barthel et al., 2003). Cette partie proximale fait aussi l'objet de modifications épigénétiques. Ces évènements sont souvent des acétylations d'histones comme dans le cas de l'activation de cellules Jurkat T où il a été observé une acétylation de l'histone H4, favorisant la production de TNF α (Ranjbar et al., 2006). D'autres études ont aussi montré l'importance de ce mécanisme d'acétylation des histones lors d'une stimulation au LPS. Ce stimulus entraîne une acétylation des histones H3 et H4 favorisant ainsi la production de TNF α dans la lignée de monocytes humains THP-1 (Miao et al., 2004).

En plus de modifications épigénétiques de type acétylation des histones, le *Tnfa* peut aussi subir des méthylations. Il a en effet été montré que la méthylation de la partie proximale du promoteur était liée à la régulation du *Tnfa*. Ce mécanisme est mis en place pour réprimer l'expression de ce gène. Ainsi, dans les granulocytes, une production de TNF α est associée à une déméthylation du promoteur (Kochanek et al., 1990). A l'inverse, l'hyperméthylation du promoteur du *Tnfa* inhibe l'expression de ce dernier dans les cellules HeLa (Kochanek et al., 1991).

Pour terminer, il existe un dernier mécanisme permettant de réguler l'expression du *Tnfa*. C'est l'interaction intra-chromosomique. Ce mécanisme est mis en place *via* des sites hypersensibles (HSS) présents sur le gène et permet l'interaction entre deux régions ou sites

présents sur le même chromosome. Plusieurs interactions concernant le *Tnfa* ont été montrées. La première a lieu entre le promoteur du *Tnfa* et le HSS-9, le second entre le promoteur du *Tnfa* et le HSS+3 et enfin la troisième entre le HSS-9 et HSS+3 (Tsytsykova et al., 2007). Ces trois associations permettent la formation d'une double boucle d'ADN favorisant la fixation de NFAT aux régions régulatrices du promoteur du *Tnfa* déclenchant sa transcription.

b) Mécanismes post-transcriptionnels de régulation du *Tnfa*

Les modifications ayant lieu après la transcription permettent de maintenir un équilibre dans la production de TNF α . Le premier mécanisme qui intervient est celui qui stabilise l'ARNm. Les ARNm sont des molécules très instables. Leur stabilité est liée à la présence ou non d'éléments déstabilisants. Les plus connus, sont des éléments riches en adénosine et en uracile (ARE) situés dans la région 3' non transcrite du gène. Dans le cas de la régulation de l'ARNm du *Tnfa*, l'élément ARE permet le contrôle du transport, de la stabilité et de la traduction de l'ARNm (Espel, 2005). L'absence de l'ARE du *Tnfa* entraîne une augmentation de la production de TNF α et est impliquée dans le développement de modèle d'arthrite ou de maladie de Crohn chez la souris (Mijatovic et al., 2000). La tristetraproline, une protéine naturelle, a été identifiée comme déstabilisant l'ARNm du *Tnfa*. Elle permet l'inhibition de la production de la protéine dans les macrophages. L'absence de la tristetraproline chez la souris conduit au développement d'un phénotype inflammatoire complexe composé d'arthrite, de dermatite, de conjonctivite et d'une hyperplasie myéloïde étant la résultante d'un excès chronique de TNF α (Taylor et al., 1996).

D'autres mécanismes de régulations du *Tnfa* font intervenir des micro ARN (miRNA). Les miRNA interagissent avec l'ARNm déclenchant la suppression, l'activation ou la destruction de ce dernier. Le miR-125b a été identifié comme ciblant directement l'ARNm du *Tnfa* diminuant fortement sa traduction. A contrario, le miR-369-3p a été montré comme favorisant la traduction de l'ARNm. Toutes ces études montrent les multiples mécanismes permettant la régulation fine de la production de TNF α (Vasudevan et al., 2007).

3. La signalisation du TNFR1

a) Le TNFR1

Le TNFR1 est un récepteur transmembranaire composé d'un domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire. Ils sont respectivement composés de 190, 23 et 221 acides aminés. La partie extracellulaire du TNFR1 comprend 4 domaines riches en cystéine, directement impliqués dans la fixation du TNF α , qui sont la signature des récepteurs de la superfamille du TNF (Tuma et al., 1995). Les parties N-terminales de ces domaines jouent aussi un rôle dans la formation d'un complexe d'assemblage qui favorise la trimérisation du récepteur. La partie intracellulaire est caractérisée par la présence de domaine de mort.

Lorsque le TNF α se fixe au TNFR1, il peut entraîner la formation de deux complexes de signalisation bien distincts. Le premier d'entre eux est le Complexe I. Il contrôle l'expression de protéines anti-apoptotiques afin d'empêcher la mise en place du mécanisme de mort cellulaire. En revanche, le second complexe, appelé Complexe II (IIa et IIb) ou DISC (Death Inducing Signaling Complex), déclenche l'apoptose après internalisation du récepteur (Micheau and Tschopp, 2003).

b) L'implication de la signalisation TNFR1 dans la survie et la prolifération cellulaire

Le TNFR1 possède une partie extracellulaire riche en cystéine qui lui permet la fixation du sTNF α . La partie intracellulaire de ce récepteur présente une séquence conservée de 80 acides aminés appelée domaine de mort. La fixation du sTNF α sur le TNFR1 entraîne une translocation du récepteur dans les rafts lipidiques de la membrane plasmique. Cette étape est essentielle pour l'activation de la voie NF κ B (Legler et al., 2003). Cela permet le recrutement de la molécule TRADD (TNFR1-Associated Death Domain) via le domaine de mort déclenchant la liaison de la sérine/thréonine kinase RIPK1 au domaine de mort (Hsu et al., 1995). Ce processus est la première étape vers l'assemblage du Complexe I.

Par la suite, RIPK1 favorise le recrutement de TRAF2 (TNFR Associated Factor 2) qui se lie à son domaine de fixation situé sur la partie amino terminale de TRADD. Cette cascade de signalisation se poursuit en facilitant l'interaction entre TRAF2 et des inhibiteurs de l'apoptose : cIAP1 et cIAP2. Ces deux molécules sont importantes dans l'activation de la voie

NFκB (Fotin-Mleczek et al., 2002). Elles favorisent le recrutement de LUBAC (Linear Ubiquin Assembling Complexe) qui lui-même facilite l'interaction de RIPK1 avec le complexe IKK. Ce dernier est composé de 3 molécules : IKKα, IKKβ et NEMO (NFκB Essential MOdulator). Une fois activé, le complexe IKK phosphoryle l'inhibiteur de la voie NFκB, IκBα. Cet inhibiteur permet de garder la molécule NFκB dans le cytoplasme, empêchant l'activation de la voie de signalisation. La phosphorylation d'IκBα entraîne la libération de NFκB et sa translocation dans le noyau conduit à l'activation de la voie de signalisation de la survie cellulaire (Israël, 2010) (**Figure 8**).

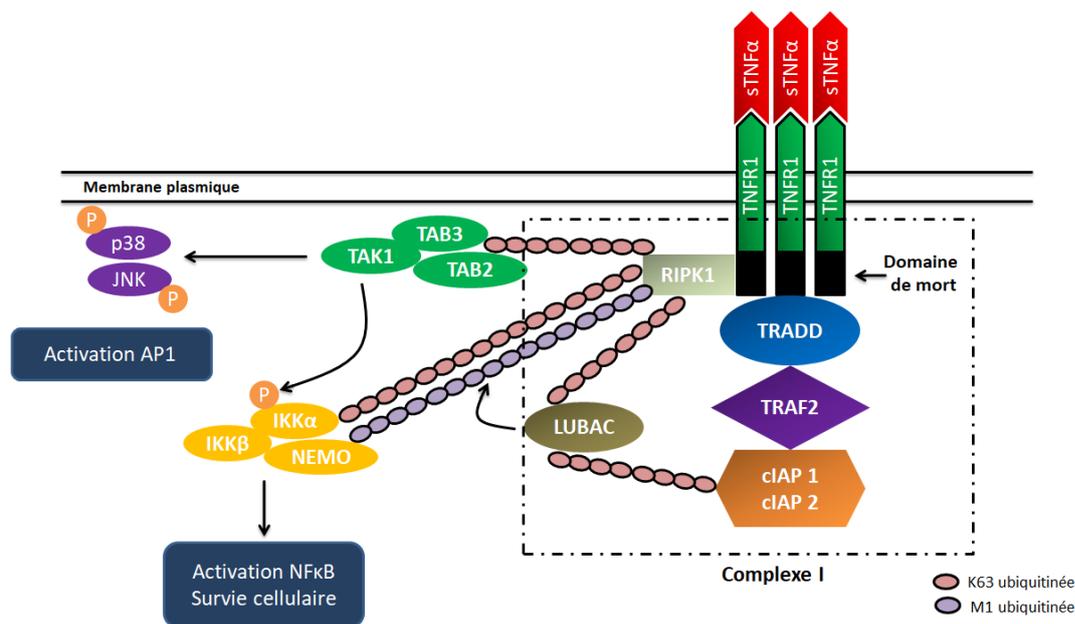


Figure 8 : Implication de la voie de signalisation du TNFR1 dans la prolifération et la survie cellulaire adaptée de (Kalliolas and Ivashkiv, 2015)

RIPK1 n'intervient pas seulement dans l'activation de la voie NFκB. Il peut aussi entraîner l'activation de la voie des MAPKK. Pour cela, il interagit avec TAK1 (TGFβ Activated Kinase 1), TAB2 (MAP3K16 binding Protein 2) et TAB3 (MAP3K16 binding Protein 3). TAK1 est alors capable de phosphoryler les protéines MAPKK qui phosphorylent Junc (JNK). La voie de signalisation JNK permet la libération du facteur de transcription AP1 favorisant l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la réponse inflammatoire ou dans la survie cellulaire. TAK1 ne joue pas qu'un rôle dans l'activation de la voie JNK, c'est aussi un inhibiteur naturel de la voie NFκB (Wang et al., 2001). Il maintient la phosphorylation d'IKKα, empêchant ainsi l'activation de la voie NFκB. L'interaction de TAK1 avec RIPK1 stoppe l'inhibition d'IKKα. L'activation de la voie de signalisation du TNFR1 par le

Complexe I permet donc à la fois l'activation de la voie NFκB et de la voie JNK favorisant la prolifération cellulaire, la survie cellulaire ainsi que l'inflammation (**Figure 8**).

Certaines modifications post-traductionnelles jouent un rôle essentiel dans la signalisation du TNFR1. C'est le cas de l'ubiquitination. Ce processus est majoritairement connu pour la dégradation des protéines par le protéasome en polyubiquitinant la valine en position 48 de la protéine à dégrader. Dans notre cas, l'ubiquitination va avoir pour but de renforcer les interactions entre certaines molécules afin d'en augmenter la stabilité en modifiant des résidus de lysine (K63) ou de méthionine (M1). Le mécanisme fait intervenir de manière séquentielle trois ubiquitinases : E1, E2 et E3. E1 permet d'activer le mécanisme d'ubiquitination, E2 permet l'ajout de l'ubiquitine et E3 attache la chaîne de résidus ubiquitinés à la protéine cible (Hsu et al., 1995). La formation de ces chaînes de molécules ubiquitinées permet de créer un réseau entre les protéines et favorise le recrutement de certains complexes comme LUBAC. Il est recruté grâce à des chaînes de K63 ubiquitinées associées à cIAP1 et cIAP2 et favorise l'interaction entre RIPK1 et NEMO par une chaîne de M1 ubiquitinée (Haas et al., 2009). Sans la présence de ces chaînes, il n'y a pas d'activation de la voie JNK ni de la voie NFκB par RIPK1. Le statut d'ubiquitination des protéines de la voie du TNFR1 est donc clé dans la signalisation dépendante du Complexe I.

c) Rôle de la signalisation TNFR1 dans le mécanisme d'apoptose

Le domaine de mort est une séquence conservée qui a aussi été identifiée sur la partie intracellulaire du récepteur FAS. L'activation de ce récepteur entraîne le recrutement du complexe DISC conduisant à l'activation de la caspase 8 et au déclenchement de l'apoptose de manière classique. Concernant le TNFR1, ce n'est pas aussi simple car comme décrit précédemment, le domaine de mort de ce récepteur est capable d'induire la prolifération cellulaire. Le mécanisme qui induit la mort cellulaire par le TNFR1 est autrement plus complexe que celui de FAS. Il fait intervenir le Complexe IIa et le Complexe IIb.

La molécule clé qui définit si l'activation du TNFR1 conduira à l'apoptose ou à la survie cellulaire est RIPK1. Cette molécule peut modifier son statut d'ubiquitination et ainsi influencer la signalisation du TNFR1. Comme exposé précédemment, une ubiquitination de RIPK1 permet l'interaction avec NEMO et IKK mais inhibe aussi de la formation des

Complexes IIa et IIb (Enesa et al., 2008). L'absence d'ubiquitination de RIPK1 détache RIPK1 de la membrane. Une fois libre dans le cytosol, elle va s'associer avec d'autres protéines pour déclencher la mort de la cellule. Le statut d'ubiquitination de RIPK1 est gouverné par plusieurs protéines mais la plus importante est la déubiquitinase CLYD. Elle empêche l'activation de la voie NFκB (Wang et al., 2008b). CLYD agit directement sur la destruction des chaînes de lysine et de méthionine ubiquitinées entraînant un désassemblage entre RIPK1 et les complexes IKK et JNK. Une fois libre dans le cytosol, RIPK1 s'associe avec TRADD, FADD, un homodimère de la pro-caspase 8 ainsi qu'avec FLIP_L pour former le Complexe IIa. La formation de ce dernier est initiée par RIPK1 mais est cependant inhibé par FLIP_L facilitant ainsi la mise en place de l'apoptose. Une fois le Complexe IIa assemblé, la pro-caspase 8 par son activité auto catalytique libère la caspase 8 dans le cytosol déclenchant ainsi le mécanisme apoptotique classique (Micheau and Tschopp, 2003) (**Figure 9**).

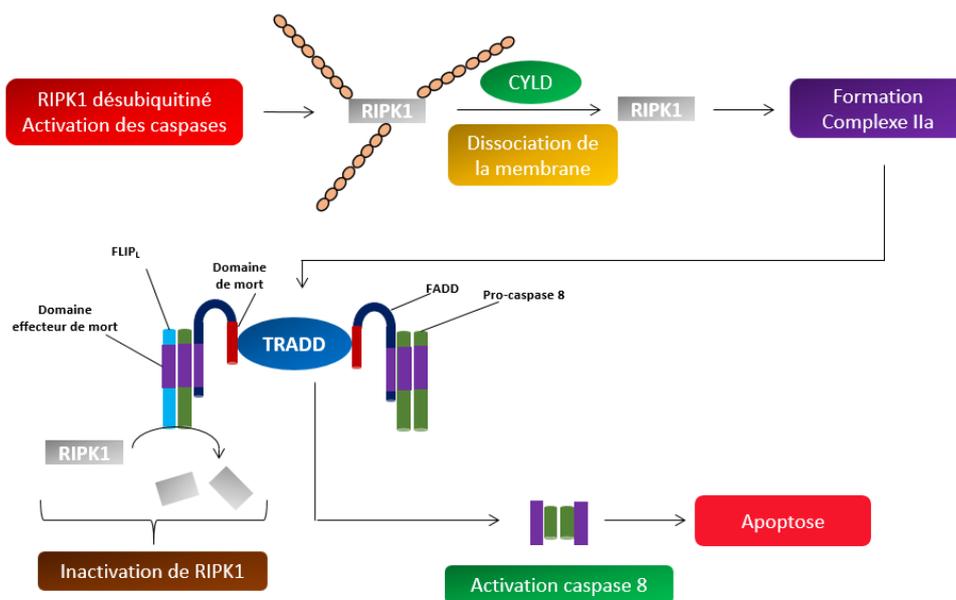


Figure 9 : La signalisation TNFR1 dans le déclenchement de l'apoptose dépendant du Complexe IIa adaptée de (Brenner et al., 2015)

Un mécanisme alternatif au Complexe IIa existe pour déclencher l'apoptose. Ce processus se met en place lorsqu'il y a absence des protéines cIAP1 et cIAP2. L'absence de ces deux molécules empêche l'ubiquitination de RIPK1 et permet son détachement du Complexe I au niveau de la membrane. La grande différence entre la formation du Complexe IIa et du Complexe IIb est l'implication de la protéine TRADD. L'assemblage du Complexe IIb est totalement indépendant de TRADD. Ce complexe est le résultat de l'interaction entre RIPK1, RIPK3, la pro-caspase 8 et FLIP_L (Tenev et al., 2011). L'apoptose est ensuite

déclenchée de manière similaire au Complexe IIa. De plus, il faut un clivage et une inactivation de RIPK1 et RIPK3 pour que l'apoptose puisse être effective (**Figure 10**).

L'élément déclencheur de la formation du Complexe IIb est l'absence des protéines cIAP. Cet évènement peut apparaître en présence de la protéine DIABLO. C'est une molécule activatrice des caspases provenant des mitochondries. Elle est capable de déclencher la polyubiquitination de cIAP1 et cIAP2 conduisant à leur dégradation par le protéasome (Du et al., 2000).

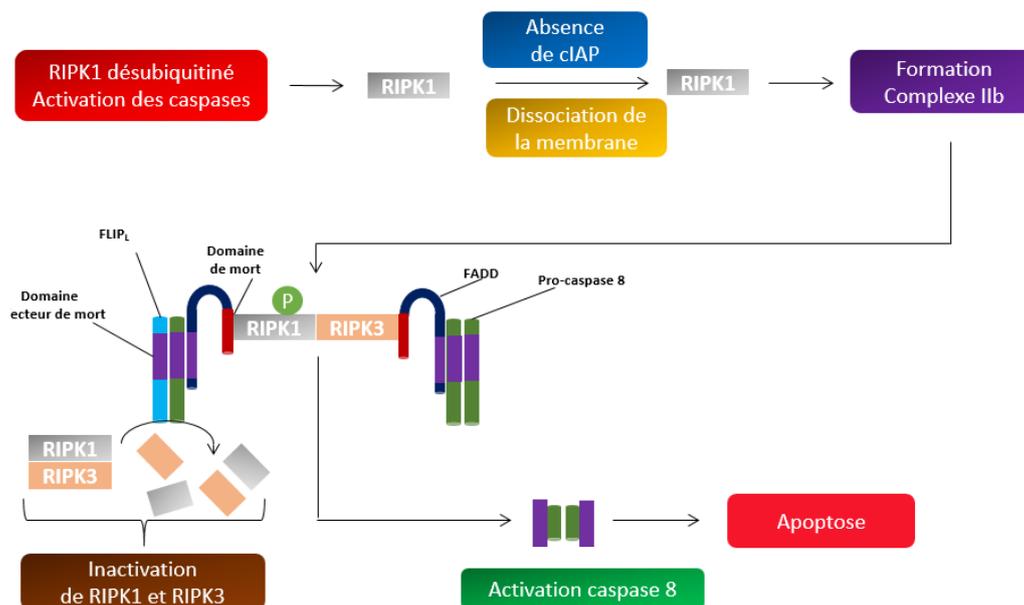


Figure 10 : La signalisation TNFR1 dans le déclenchement de l'apoptose dépendant du Complexe IIb adaptée de (Brenner et al., 2015)

d) Rôle de la signalisation TNFR1 dans le processus de nécroptose

La signalisation TNFR1 est capable de déclencher un autre mécanisme de mort cellulaire, la nécroptose. Contrairement à l'apoptose qui n'est pas inflammatoire, la nécroptose entraîne une forte inflammation lors de la mort de la cellule et est indépendante des caspases. Le processus de nécroptose conduit à un gonflement de la cellule jusqu'à la rupture de la membrane plasmique et à la libération du contenu cellulaire dans le milieu extracellulaire (Galluzzi et al., 2012).

Tout comme dans l'induction de l'apoptose, c'est la protéine RIPK1 qui est maîtresse dans le déclenchement de la nécroptose. Ce mécanisme se met en place lorsque que RIPK1

n'est pas ubiquitiné et quand RIPK1 et RIPK3 ne sont pas dégradés par FLIP_L (Zheng et al., 2006). De plus, il a été montré que FLIP_S est capable de s'associer à la pro-caspase 8 inhibant totalement l'activité catalytique de cet hétérodimère, laissant RIPK1 et RIPK3 actifs. Le processus de nécroptose se poursuit par l'assemblage de plusieurs protéines RIPK3 entre elle et de RIPK1 formant le complexe appelé nécrosome (Li et al., 2012). La formation de ce complexe est fortement liée à l'activité kinase de RIPK1 et RIPK3. Le nécrosome ne peut être formé que si ces protéines sont phosphorylées.

La nécroptose peut aussi être déclenchée en cas d'absence de la protéine cIAP2 et de l'inactivation des caspases. Comme décrit précédemment, cIAP2 peut être inhibé par CLYD entraînant le détachement de RIPK1 du Complexe I. La modification du complexe LUBAC est aussi une des causes du déclenchement de la nécroptose. Il a été montré que l'absence de la protéine Sharpin, un composant du complexe LUBAC, empêche la formation de la chaîne de méthionines ubiquitinées sur RIPK1 déclenchant ainsi la nécroptose. LUBAC a donc été identifié comme un inhibiteur de la nécroptose (Vanlangenakker et al., 2011). L'étape finale avant le déclenchement de la nécroptose est la phosphorylation de MLKL. Il a été montré que cette modification est due à l'activité kinase de RIPK3 (Murphy et al., 2013). Par la suite MLKL se multimérise pour s'associer au phosphatidylinositol et déclencher la nécroptose (Cai et al., 2014) (**Figure 11**).

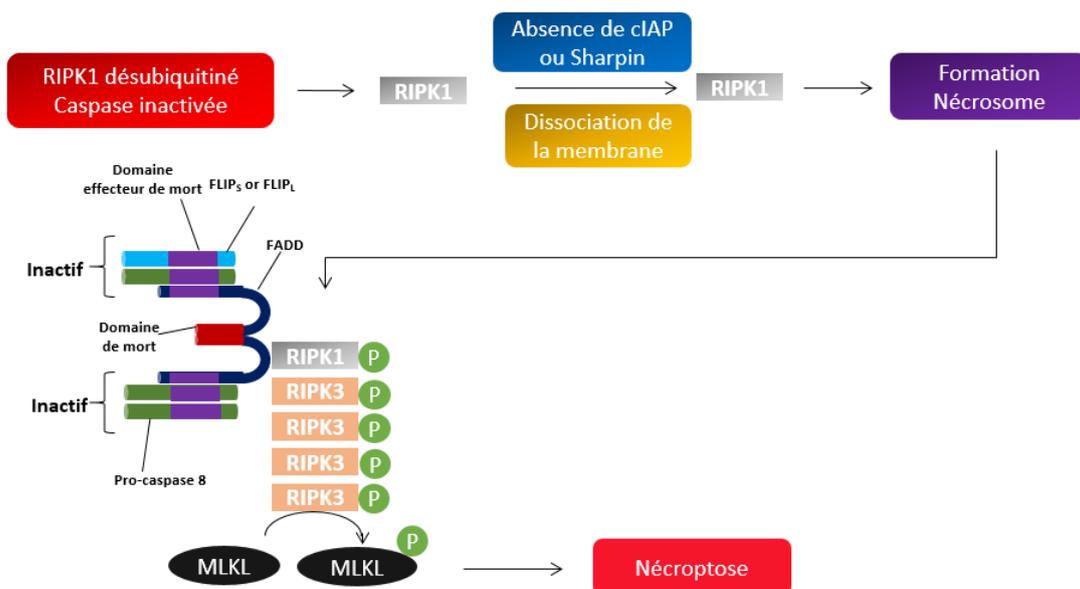


Figure 11 : Implication de la voie de signalisation du TNFR1 dans la nécroptose adaptée de (Brenner et al., 2015)

4. La signalisation TNFR2

a) Le TNFR2

Le TNFR2 est le second récepteur du TNF α . C'est une protéine de 439 acides aminés dont la partie intracellulaire est très conservée entre les espèces. Le TNFR2 a été montré comme important dans la régulation de l'inflammation dans le poumon ou dans le cas de la malaria chez la souris (Stoelcker et al., 2002). L'implication du TNFR2 a aussi été démontrée dans plusieurs maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn ou encore la sclérodermie (Dieudé et al., 2002). Contrairement au TNFR1, le TNFR2 est présent seulement sur les cellules immunitaires, les cellules endothéliales et les cellules nerveuses.

b) Le rôle de la signalisation TNFR2 dans la survie et la prolifération cellulaire

La signalisation du TNFR2 est activée par la trimérisation du mTNF α . Cette multimérisation est indispensable pour permettre la transduction du signal via le TNFR2. Cela permet le recrutement de TRAF2 et sa fixation sur la partie intracellulaire du TNFR2. Cette protéine est le principal régulateur de la signalisation du TNFR2 permettant l'activation de gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire (Rothe et al., 1995). La fixation de TRAF2 au TNFR2 permet le recrutement de cIAP1 et cIAP2. La suite de la voie de signalisation permet l'activation de la voie NF κ B ainsi que la production du facteur de transcription AP1 conduisant à l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire. Le TNFR2 permet donc une activation similaire à celle permise par le TNFR1 mais indépendamment des domaines de morts (Hauer et al., 2005) (**Figure 12**).

La protéine clé de la signalisation du TNFR2 est TRAF2. Sa présence est indispensable à l'activation de la voie NF κ B. La régulation de cette protéine est donc intimement liée à la régulation de la voie de signalisation du TNFR2. Il a d'ailleurs été montré que l'augmentation de l'expression du TNFR2 entraînait une diminution de la quantité de TRAF2 dans la cellule permettant l'autorégulation de la voie de signalisation (Rodríguez et al., 2011). Cette dégradation est en partie due aux acides aminés 343-379 du TNFR2. La mutation de cette partie du récepteur empêche la régulation de TRAF2. Cependant la fixation de TRAF2 à cette séquence d'acides aminés n'est pas nécessaire pour entraîner sa dégradation. Cette

séquence favorise l'interaction entre TRAF2 et la polyubiquitine E2. Cette protéine permet l'ajout d'une chaîne d'ubiquitine sur TRAF2 entraînant sa dégradation par le protéasome (Wu et al., 2005). Il a aussi été montré que les protéines cIAP1 et cIAP2 sont capables de dégrader TRAF2. Plusieurs études ont identifié des protéines intermédiaires telles que AIMP2, qui favorisent l'interaction de TRAF2 avec les protéines cIAP conduisant à sa polyubiquitination et à sa dégradation par le protéasome (Choi et al., 2009). Cependant cette modification post-traductionnelle de TRAF2 peut favoriser l'activation de la voie de signalisation. C'est le cas lorsque l'ubiquitination est due à la polyubiquitine USP31. Elle permet l'ajout de plusieurs ubiquitines sur la lysine 43 contrairement à la polyubiquitine E2 qui les ajoute sur la lysine 38. Cette modification de la lysine 43 entraîne l'activation de la voie JNK conduisant à l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire (Tzimas et al., 2006).

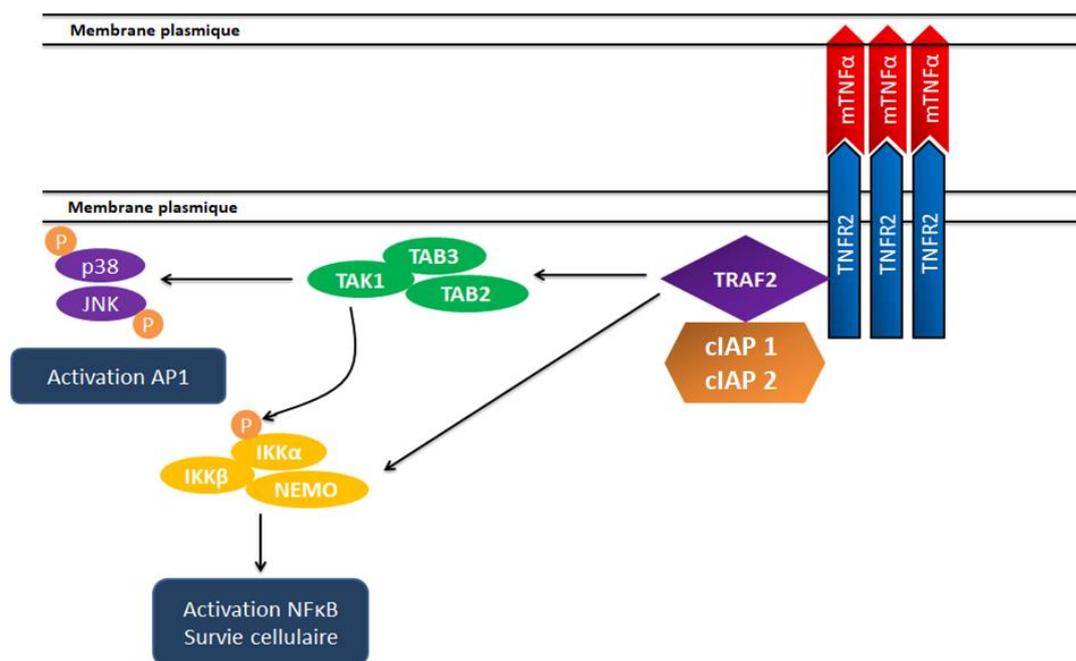


Figure 12 : La signalisation du TNFR2 adaptée de (Brenner et al., 2015)

5. L'interférence fonctionnelle entre la signalisation TNFR1 et TNFR2

Les deux récepteurs du TNFα partagent plusieurs molécules au sein de leurs voies de signalisation respectives. Le TNFR2 conduit à la survie et à la prolifération cellulaire. Il n'est pas lié à l'effet cytotoxique du TNFα. Cependant de nouvelles études portent à croire que le TNFR2 pourrait permettre le déclenchement de la voie du TNFR1 conduisant à l'apoptose quand les deux récepteurs sont exprimés par la cellule. Ce processus est dû à la capacité du

TNFR2 à induire la dégradation de TRAF2 et à annuler l'effet anti-apoptotique de sa voie de signalisation. TRAF2 est la pierre angulaire de l'effet cytotoxique de la voie de signalisation du TNFR1. Lorsque que TRAF2 vient se fixer sur le TNFR1 cela inhibe l'activité du récepteur empêchant ainsi la mort cellulaire (Fotin-Mleczek et al., 2002). Quand le TNFR1 et le TNFR2 sont activés de manière simultanée, le TNFR2 dégrade TRAF2, empêchant la liaison de cette protéine aux protéines cIAP déclenchant l'apoptose *via* la signalisation du TNFR1. L'ensemble de ces travaux montre la subtilité des signalisations cellulaires induites par le TNF α conduisant directement à la mort cellulaire par le TNFR1.

6. La régulation des gènes par le TNF α

Le TNF α étant une protéine pléiotrope, les gènes qu'il régule dépendent autant du type cellulaire sur lequel il agit que des conditions environnementales. Cette cytokine est aussi capable d'induire l'expression de gènes en fonction de sa cinétique de production et de modifier la réaction de certaines cellules aux stimuli extérieurs.

a) Le TNF α et le remodelage de la chromatine

Au niveau cellulaire, le TNF α est capable de moduler l'expression de multiples gènes. Par exemple, il permet l'augmentation de l'expression de l'IL-6 par les macrophages et les fibroblastes de types synoviocytes (FLS) mais diminue la production d'IL-6 des neutrophiles (Zimmermann et al., 2015). Cette modification de l'expression des gènes est majoritairement due à la capacité de modification de l'état de condensation de la chromatine.

Le TNF α peut modifier l'état de condensation de la chromatine en particulier dans les FLS. Ces cellules sont présentes dans les articulations de patients atteints de PR. Le TNF α est capable d'augmenter le niveau d'expression de gènes directement impliqués dans la production de cytokines et de chimiokines inflammatoires (Lee et al., 2013). Cependant, le microenvironnement joue aussi un rôle important dans la réponse de certaines cellules au TNF α et cela indépendamment du remodelage de la chromatine. Dans le cas des macrophages, des monocytes et des cellules dendritiques, il a été montré qu'un engagement des TLR et des récepteurs des prostaglandines en association avec le TNF α permettait une modification du transcriptome aboutissant à un état inflammatoire de ces cellules (Nakano et al., 2013). L'ensemble de ces travaux met en évidence un rôle important du TNF α dans la mise en place d'une situation inflammatoire par la régulation des gènes.

b) Les cinétiques d'expression des gènes induits par le TNF α

Le TNF α est capable d'induire l'expression de gènes de manière plus ou moins rapide selon l'état de condensation de la chromatine. Le cas le plus simple et le plus rapide se présente lorsque la chromatine du gène cible est déjà accessible. Dans cette situation, le TNF α permet l'activation de la voie NF κ B conduisant à la transcription du gène (**Figure 13**).

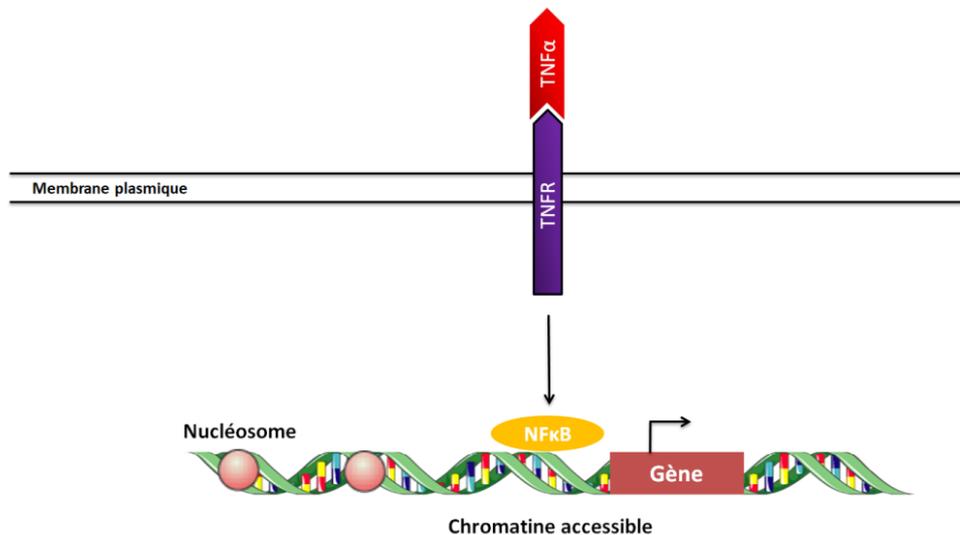


Figure 13 : Activation rapide de l'expression de gènes par le TNF α adaptée de (Kallioliias and Ivashkiv, 2015)

Le TNF α est aussi capable d'entraîner l'expression de gènes dont la chromatine n'est pas accessible au moment de l'activation de la voie de signalisation. La vitesse d'expression de ces gènes est dite intermédiaire. Lors de ce processus, le TNF α entraîne indirectement un remodelage de la chromatine. Actuellement deux mécanismes distincts ont été identifiés comme intervenant dans la modification de la condensation de l'ADN après une activation de la cellule par le TNF α . Le premier fait intervenir la production d'IFN β . La voie de signalisation du TNF α est capable d'entraîner la production d'IFN β . Cette cytokine peut ensuite par action autocrine se fixer sur son récepteur IFNR (Yarilina et al., 2008). La voie de signalisation découlant de l'activation de ce récepteur active la voie JAK/STAT et particulièrement STAT1. Cette dernière collabore ensuite avec le complexe d'activation de la voie NF κ B, aboutissant à un remodelage de la chromatine et à l'expression de gènes cibles. Ce mécanisme est notamment utilisé pour l'induction de l'expression des gènes codants pour CXCL9 ou CXCL10 (Yarilina et al., 2008). Le second mécanisme fait intervenir la protéine I κ B ζ . Il a été montré que le TNF α , en synergie avec des agonistes du TLR8 ou des cytokines, induit la production de cette protéine (Zimmermann et al., 2015). I κ B ζ est un co-activateur

recruté au niveau du promoteur du gène cible par NFκB et favorise le remodelage de la chromatine permettant l'expression du gène (**Figure 14**).

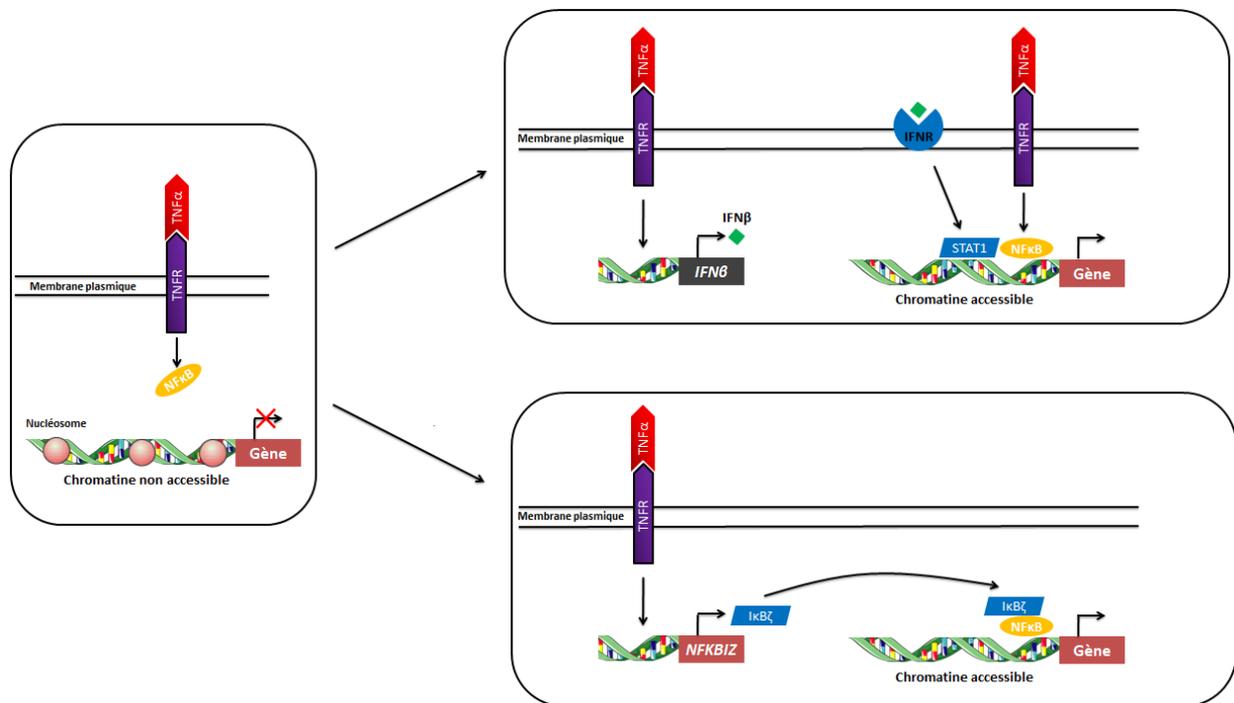


Figure 14 : Activation intermédiaire des gènes par le TNFα adaptée de (Kalliolias and Ivashkiv, 2015)

Les derniers types de gènes que le TNFα est capable d'induire, sont dits à expression tardive. Ce phénomène est dû au grand nombre de modifications de la chromatine nécessaire à la transcription ainsi qu'à la présence de répresseurs nucléaires comme NCoR1. Cette protéine permet de réprimer l'expression d'un ensemble de gènes gouvernés par le TNFα (Hargreaves et al., 2009). NCoR1 favorise le recrutement d'histones désacétylases (HDAC) et particulièrement la HDAC3 ainsi que de MeC2P (Methyl CpG Binding Protein 2). HDAC3 élimine les groupements acétyles présents sur les histones du promoteur du gène cible, rendant inaccessible la chromatine. Cela permet de retarder l'expression de gènes induits par le TNFα et expliquant un délai avant leur expression malgré la stimulation (**Figure 15**). L'importance de ce mécanisme a été démontrée dans des macrophages. L'absence de MeC2P dans ces cellules conduit à une forte augmentation de l'expression de gènes pro-inflammatoires après une stimulation par du TNFα (Cronk et al., 2015).

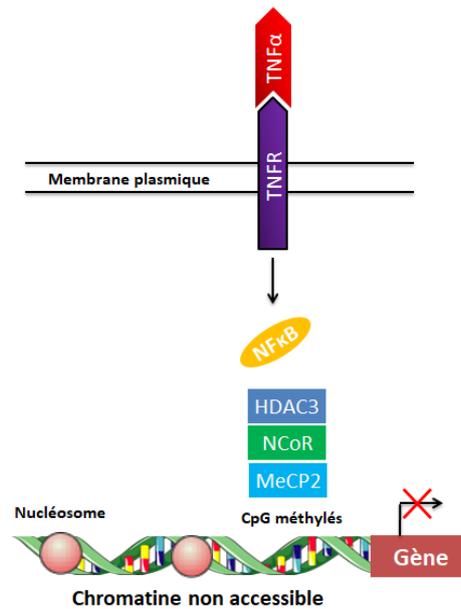


Figure 15 : Répression des gènes inductibles par le TNFα adaptée de (Kalliolas and Ivashkiv, 2015)

c) Altération de la réponse cellulaire aux stimuli extérieurs

L'environnement et les stimuli extérieurs permettent de modifier l'état d'activation de la cellule. Cependant, certaines molécules sont capables de faire varier la réponse cellulaire face à un même stimulus. C'est le cas du TNFα. Il a été montré que cette cytokine peut par exemple augmenter la réaction inflammatoire des FLS après une stimulation avec des IFN. De manière opposée, le TNFα est capable de diminuer la réponse inflammatoire des macrophages face à une stimulation LPS, diminuant ainsi le risque d'une réaction inflammatoire létale (Park et al., 2011).

Les mécanismes permettant ces modifications de réactions cellulaires sont majoritairement dus à la capacité de remodelage de la chromatine du TNFα. Une stimulation par cette cytokine favorise la production de protéines telles que CXCL10 conduisant à la production de l'ARNm IP-10. Cet ARNm est très important dans la réponse cellulaire aux IFN. La production d'IP-10 en amont de la stimulation IFN, permet d'avoir une réponse plus rapide et plus forte de la signalisation IFN lorsque celle-ci est activée (Sohn et al., 2015). De plus, une présence permanente de TNFα peut entraîner l'accumulation de STAT1 dans la cellule et ainsi favoriser de manière permanente ou prolongée, l'expression de gènes pro-inflammatoires. Cependant, le TNFα est aussi capable de réprimer le remodelage de la chromatine de certains gènes. C'est le cas lors de la stimulation des macrophages par du LPS.

La présence de TNF α favorise la production d'I κ B α qui régule négativement la voie d'activation dépendante du LPS (Park et al., 2011).

7. Les lymphocytes T régulateurs et le TNF α

Les Treg sont les cellules maitresses dans la régulation de l'inflammation. Tout comme les autres cellules immunitaires, ils expriment les deux récepteurs du TNF α : le TNFR1 et le TNFR2. Il est à noter, que l'expression du TNFR1 est particulièrement faible et à peine détectable à la surface des Treg. En revanche, 30 à 40% des Treg expriment le TNFR2 dans la rate de souris naïve. Ces cellules sont donc potentiellement sensibles à l'action du TNF α .

Depuis une dizaine d'année, plusieurs études se sont intéressées à l'action du TNF α sur l'activité des Treg. Les premiers travaux ont mis en évidence un rôle important du TNFR2 à la surface de ces cellules. L'expression de ce récepteur a été identifiée comme un meilleur marqueur d'activité des Treg que le CD25 qui était auparavant utilisé (Chen et al., 2008). La co-expression du TNFR2 et du CD25 par les Treg permet d'identifier les Treg les plus immunosuppresseurs chez la souris (Chen et al., 2010). L'expression du TNFR2 a aussi été montrée à la surface des Treg chez l'homme (Annunziato et al., 2002). Dans le cas de la malaria, une augmentation de la fréquence des Treg TNFR2⁺ en condition inflammatoire peut être considérée comme un indicateur de l'augmentation de l'activité suppressive des Treg (Minigo et al., 2009). Cette idée des Treg TNFR2⁺, plus actifs que les autres, est corroborée par le fait que dans certains cancers, une infiltration de cette population de Treg est augmentée dans des tumeurs solides (Kryczek et al., 2009). Par la suite les marqueurs d'immunosuppression à la surface des Treg TNFR2⁺ ont été étudiés et il a été montré que ces Treg, que ce soit chez l'homme ou chez la souris, ont une expression du CTLA-4 plus importante que les Treg TNFR2⁻ (Chen et al., 2008).

Après avoir caractérisé ces Treg, l'action directe du TNF α a été étudiée afin de mieux comprendre ce mécanisme. Il a été montré que le TNF α est capable d'activer les Treg et de les faire proliférer *via* le TNFR2 (Chen et al., 2007). Cette cytokine pro-inflammatoire favorise aussi la survie des Treg par ce même récepteur en augmentant la production de la protéine Trx-1, une molécule anti-oxydante (Mougiakakos et al., 2011). Pour terminer, le TNF α agit en synergie avec l'IL-2 pour augmenter l'expression du CD25 ainsi que de STAT5 phosphorylé

dans les Treg. De plus, ces deux cytokines permettent l'augmentation de l'expression du TNFR2 permettant une amplification du signal dépendant du TNF α (Hamano et al., 2011).

L'intégralité de ces études démontre un rôle ambivalent de la cytokine pro-inflammatoire qu'est le TNF α puisqu'il est capable de favoriser les Treg et donc l'activité anti-inflammatoire.

C. La polyarthrite rhumatoïde et le psoriasis : deux pathologies dans lesquelles le TNF α joue un rôle central

Dans cette partie, la polyarthrite rhumatoïde sera présentée de manière détaillée puisqu'elle a fait l'objet de la majeure partie de nos recherches. En revanche, le psoriasis sera décrit de manière plus succincte.

1. Généralités

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie auto-immune, systémique et chronique d'origine inconnue. Sa prévalence est estimée entre 0,3 et 1%, elle atteint la population adulte et est deux fois plus fréquente chez la femme. La PR est caractérisée par une inflammation et une hyperplasie synoviale associées à des destructions articulaires et osseuses ainsi qu'à une forte production d'auto-anticorps. Les principaux auto-anticorps de la PR sont les facteurs rhumatoïdes, des anticorps (de classe IgG, IgM, plus rarement IgA) dirigés contre la partie constante des immunoglobulines et les anticorps anti-peptides citrullinés ou ACPA (anti-citrullinated peptide antibody), qui reconnaissent des résidus citrullinés sur plusieurs protéines.

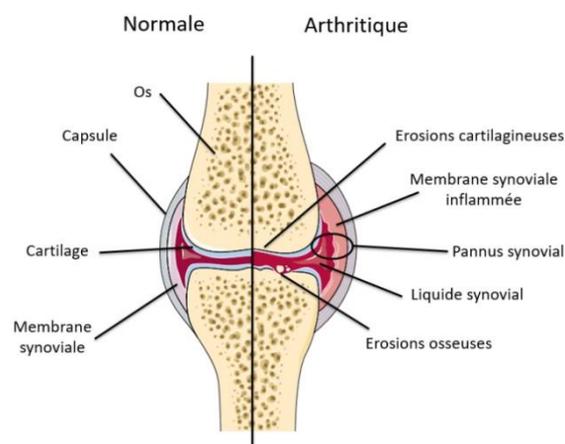


Figure 16 : Comparaison d'une articulation normale (gauche) avec une articulation arthritique (droite)

La PR est une arthrite dite polyarticulaire (touchant plus de 3 articulations) et symétrique. Elle se déclare en premier dans les petites articulations diarthrodiales des mains et des pieds. Cette inflammation articulaire est caractérisée par une infiltration dans le tissu synovial de cellules de l'immunité innée et adaptative et par la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse). Ces phénomènes conduisent à la prolifération du tissu synovial inflammatoire qui acquiert la capacité d'envahir l'os et le cartilage et qui est appelé « pannus ». Les cellules majoritairement présentes au sein du pannus sont les LT CD4⁺, les macrophages et les LB (**Figure 16**).

2. Historique

Les premières observations datent de l'antiquité. Les pathologies rhumatismales les plus anciennement identifiées (sur des squelettes en Europe et dans le nord de l'Afrique) sont la spondylarthrite ankylosante et la goutte (Aceves-Avila et al., 1998). Cependant, il n'y avait aucune présence d'érosion du cartilage ou de l'os caractéristiques de la PR. Des études paléo-pathologiques ont mis en évidence des cas de PR datant de plusieurs centaines d'années dans une tribu amérindienne du nord de l'Amérique (Rothschild et al., 1988), les Indiens Pima, qui, même de nos jours sont la population à plus haute prévalence de PR (environ 5%).

L'apparition de la PR en Europe, pourrait remonter au XVII^{ème} siècle. A cette époque sont reconnaissables dans plusieurs tableaux, des mains ayant les caractéristiques de la PR évoluée. La première description clinique compatible avec une PR fut rapportée par Sydenham en 1656. Ce fut Garrod en 1859, qui en définit pour la première fois les caractéristiques et qui la nomma polyarthrite rhumatoïde pour la distinguer des autres formes d'arthrites déjà connues, comme le rhumatisme articulaire aigu. Il faut attendre le XX^{ème} siècle pour que la PR soit définitivement décrite comme entité clinique à part entière par Charles Short. Cela permis de séparer définitivement la PR des autres maladies rhumatismales telles que l'arthrose, les spondylarthrites ou encore de maladies induites par des cristaux comme la goutte.

3. Manifestations cliniques et diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde

Les patients développant un début de PR viennent principalement consulter pour des douleurs articulaires apparaissant à fréquences régulières (souvent en fin de nuit). Ces

douleurs se localisent généralement au niveau du poignet, des épaules ou des articulations métacarpo-phalangiennes et métatarso-phalangiennes. Elles sont souvent bilatérales et symétriques. Le médecin établit le diagnostic de PR en constatant la présence d'articulations douloureuses, gonflées et rouges. Ces symptômes sont fréquemment associés à un gonflement des doigts qui sont douloureux lors d'une pression latérale. En cas d'atteinte du genou, ce dernier peut être tuméfié et présenter un épanchement souvent ponctionnable. Si un doute subsiste, des examens complémentaires comme une radiographie, une échographie ou une IRM peuvent être effectués. Le diagnostic peut être confirmé avec l'analyse de paramètres biologiques tels que la présence d'ACPA.

Afin de faciliter le diagnostic et débiter précocement le traitement, des critères de classification officiels de la PR ont été proposés en 1987 par l'ACR (American College of Rheumatology). En 2010, ces critères ont été actualisés afin de détecter plus précocement la maladie (Aletaha et al., 2010).

Actuellement, l'évolution de la PR chez un patient s'évalue par l'intermédiaire du DAS 28 (Disease Activity Score 28). Cette méthode fait à la fois intervenir des paramètres physiologiques et cliniques mais aussi le ressenti du patient. Il existe deux types de DAS 28 : le DAS 28 CRP et le DAS 28 VS. Le DAS 28 CRP prend en compte la concentration en CRP (C Reactive Protein) qui est retrouvée dans le sang lors d'inflammation aiguë (en mg/l) alors que le DAS 28 VS fait intervenir la vitesse de sédimentation (en mm/h). La VS est une technique couramment utilisée pour déterminer l'inflammation. Plus la vitesse est rapide, plus l'inflammation est importante. Pour obtenir ces deux scores, le patient doit indiquer le nombre d'articulations qui sont douloureuses (**ad**) (0 à 28), le médecin doit constater le nombre d'articulations gonflées (**ag**) et enfin, un constat général de la maladie est effectué par le patient. Cette évaluation va de 0 à 100 (**em**) avec 100, la gravité maximale de la maladie présente dans l'esprit du patient. Pour obtenir le score définitif, ces données sont rentrées dans une formule mathématique (van der Heijde, 1995).

$$DAS\ 28\ CRP = 0,56 * \sqrt{ad} + 0,28 * \sqrt{ag} + 0,36 * \ln(CRP + 1) + 0,014 * em + 0,96$$

$$DAS\ 28\ VS = 0,56 * \sqrt{ad} + 0,28 * \sqrt{ag} + 0,7 * \ln(VS) + 0,014 * em$$

4. Rôle du TNF α et des Treg dans le développement de la PR

Il existe des éléments de preuve qui indiquent que le processus physiopathologique de la PR se développe bien avant l'apparition des premiers signes cliniques. C'est la phase préclinique de la PR. Cette étape repose sur la mise en place d'une réaction auto-immune liée d'une part à une prédisposition génétique, et de l'autre à l'intervention sur ce terrain génétique, de facteurs environnementaux dont le tabac est le mieux identifié (Mahdi et al., 2009). Ce dernier a été montré comme en partie responsable de l'augmentation d'une modification post-traductionnelle des protéines : la citrullination. La présence importante de ces protéines citrullinées entraînent, chez certains individus, la production d'ACPA (Iobagiu et al., 2011). Ces anticorps peuvent être retrouvés jusqu'à 10 ans avant la manifestation des premiers signes cliniques de la PR (Rantapää-Dahlqvist et al., 2003). Cependant, la présence d'ACPA n'est pas suffisante pour entraîner une PR clinique, expliquant ainsi pourquoi certains sujets possédant des ACPA ne développent jamais de PR clinique. Durant ce stade préclinique, la production d'ACPA est favorisée par la présentation des peptides citrullinés par le CMH qui active les LT qui à leur tour activent les LB et la production d'anticorps (Muller and Radic, 2015). Le rôle des cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF α , lors de cette phase et très peu connue puisque les patients ne sont diagnostiqués qu'une fois les premiers signes cliniques survenus. Ce que l'on peut dire à l'heure actuelle est que durant le stade préclinique de la PR, le TNF α ne présente pas une activité biologique assez importante pour entraîner une inflammation articulaire. Pour ce qui est des Treg, ces cellules jouent un rôle important dans le contrôle de l'inflammation périphérique et dans le phénomène de tolérance. Un dysfonctionnement des Treg à ce stade de la maladie n'est pas exclue. Cela pourrait en partie expliquer le phénomène de rupture de la tolérance conduisant à la production d'ACPA.

Certains sujets peuvent ensuite présenter des arthralgies mais sans qu'une vraie inflammation articulaire soit détectée à l'examen clinique ou par les techniques d'imagerie comme l'échographie ou l'IRM. Dans le cas où la PR continue de se développer, elle se caractérise par un début d'inflammation synoviale. Ceci correspond à l'observation des premiers signes cliniques. Ce stade est appelé PR débutante. L'inflammation articulaire est la résultante d'une infiltration importante de cellules mononucléées, dans la membrane synoviale, dominée par les LT CD4⁺ et les macrophages. Les patients présentent une forte

quantité de cytokines pro-inflammatoires et de protéines dégradant la matrice extracellulaire au sein de l'articulation (Arend and Firestein, 2012). Ce stade de la PR est aussi associé à la propagation de l'auto-immunité, caractérisée par une augmentation de la diversité des auto-anticorps ciblant par exemple le collagène de type II. Il est à noter qu'à ce stade de progression, chez certains patients, la maladie peut se résoudre d'elle-même. Ce processus, et le rôle joué par les traitements précoces qui seraient capables à ce stade d'induire une rémission complète et persistante, restent à l'heure actuelle encore peu compris. Ce stade de la PR est caractérisé par une infiltration de cellules immunitaires dans la membrane synoviale. Le TNF α possède des activités chimioattractantes et pourrait jouer un rôle précoce dans la mise en place de l'inflammation articulaire en facilitant le recrutement des cellules inflammatoires et leur infiltration dans la membrane synoviale. D'un point de vue de la régulation de l'inflammation, l'augmentation de la diversité des auto-anticorps ainsi que l'infiltration synoviale laisse penser que les Treg peuvent présenter des défauts fonctionnels (Behrens et al., 2007). Il a été montré que la différenciation des Treg pouvait être diminuée en présence de TNF α et que ce dernier pouvait augmenter la résistance des Teff face au Treg (Chen et al., 2016; Zhang et al., 2013).

Le stade définitif de la PR, est la PR établie. L'une des caractéristiques majeures de cette phase est la mise en place du pannus articulaire qui conduira, dans les cas les plus sévères, à l'érosion osseuse. Ce stade de la PR est assez hétérogène. Certains patients présentent une inflammation persistante associée ou non à des destructions articulaires. Durant ce stade, le TNF α joue un rôle important qui constitue le rationnel pour l'utilisation des anti-TNF α dans le traitement de la PR. Le TNF α est capable d'activer des cellules inflammatoires elles-mêmes productrices de TNF α comme les macrophages ou les fibroblastes. De plus, cette cytokine est aussi capable d'augmenter l'activité des ostéoclastes favorisant ainsi l'érosion osseuse (Schett and Gravallese, 2012). Dans cette phase, le défaut des Treg peut varier selon les patients. Il est concevable que dans les formes les plus inflammatoires ce défaut soit prononcé mais il n'y a pas d'étude qui permettent de corréler l'activité ou la sévérité de la maladie à la fonction des Treg et de stratifier les patients de façon conséquente. De la même façon, il n'a pas été identifié de corrélation entre un infiltrat spécifique de cellules immunitaires dans la membrane synoviale, le phénotype de la maladie et la fonction des Treg. S'il est donc probable que la diminution de

l'activité anti-inflammatoire des Treg dans la PR soit un des facteurs impliqués dans l'évolution de la PR, leur rôle et leur activité dans les différentes phases de la maladie reste à définir.

5. Modifications génétiques et conditions environnementales dans le développement de la polyarthrite rhumatoïde

Bien que l'étiologie de la PR soit toujours inconnue, de nombreuses études se sont intéressées et s'intéressent encore à la présence de susceptibilités génétiques ou environnementales dans son développement (**Figure 17**).

Les études sur les jumeaux monozygotes ou dizygotes ont mis en évidence l'importance de la susceptibilité génétique dans le développement de la PR. Il a été montré que dans une population de jumeaux finnois, l'héritabilité de la PR s'élevait à 65% (MacGregor et al., 2000). Par la suite, l'analyse de génomes de patients PR présentant des facteurs rhumatoïdes ou des ACPA a mis en évidence l'importance du gène codant pour HLA-DRB1 (Human Leucocyte Antigen). Ces patients possèdent sur ce gène une séquence commune d'acides aminés (QKRAA), appelée épitope partagé, conférant une plus grande susceptibilité au développement de la PR (Gregersen et al., 1987). Ces travaux suggèrent un rôle important du répertoire T, de la présentation de l'antigène et de la reconnaissance peptidique dans le développement de la PR (Weyand and Goronzy, 1990). Des polymorphismes d'autres gènes ont ensuite été identifiés comme des facteurs de risque chez des patients ACPA positifs. Ces gènes interviennent majoritairement dans la voie de signalisation NFκB (*c-Rel* ou *Traf1-c5*) qui régule l'inflammation ou dans la différenciation et l'activation des LT, comme les gènes *Ctla-4* ou *Ptpn22* (Plenge et al., 2007). Cependant, l'impact de ces polymorphismes est beaucoup moins identifié chez les patients PR ACPA négatifs. De plus, les patients ACPA positifs présentent un pronostic moins favorable que les patients ACPA négatifs indiquant l'importance de ces gènes dans le contrôle de la maladie.

Suite à ces découvertes, des études se sont intéressées au rôle de l'environnement dans le développement de la PR et plus particulièrement à son association avec la présence de polymorphismes génétiques. Le tabagisme a été un des premiers facteurs environnementaux identifiés comme augmentant le risque de PR chez les personnes possédant un polymorphisme sur le gène codant pour HLA-DR4 (Symmons et al., 1997). De

plus, le tabagisme favorise la production d'ACPA en présence d'un polymorphisme sur *Hla-drb1*. Cela est en partie dû au stress pulmonaire induit par la fumée de cigarette qui augmente les modifications post-traductionnelles par l'intermédiaire de la protéine PADI4 (Peptidyl Arginine Deiminase, type IV) conduisant à la citrullination des protéines. Des individus génétiquement prédisposés pourraient alors développer, dans le contexte de l'inflammation pulmonaire induite par le tabac, une auto-immunité envers ces peptides citrullinés.

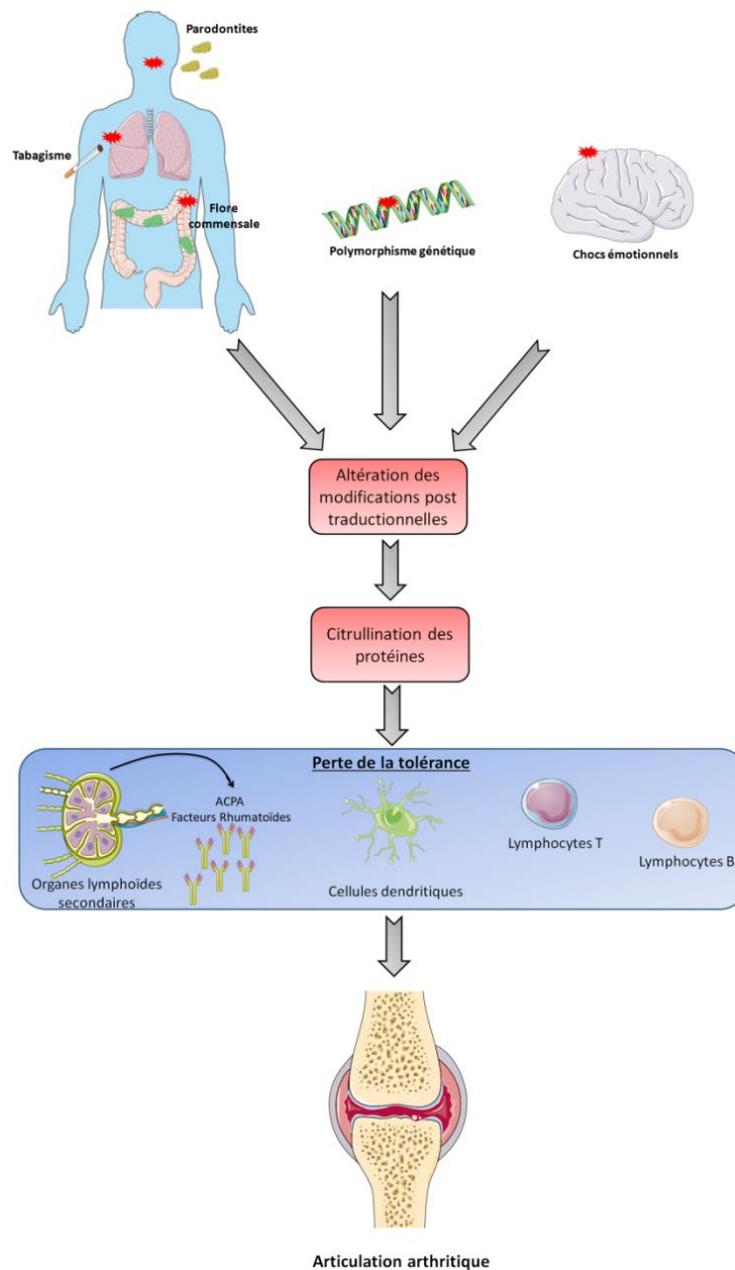


Figure 17 : Facteurs prédisposant à la polyarthrite rhumatoïde adaptée de (McInnes and Schett, 2011)

Un test diagnostique (anti-CCP) est utilisé chez les patients PR afin d'évaluer la présence d'ACPA. Les ACPA des différents patients peuvent reconnaître un grand nombre de protéines citrullinées comme l' α -énolase, la kératine, le fibrinogène, la fibronectine ou encore le collagène. Actuellement, il est estimé que 40 à 60% des patients ACPA positifs sont positifs pour l' α -énolase ce qui est fortement associé à un polymorphisme de *Hla-dr4* et *Ptpn22* ainsi qu'au tabagisme (Mahdi et al., 2009).

En plus du tabagisme, certaines infections virales ou bactériennes ont été montrées comme favorisant le développement de la PR. Les infections par le virus Epstein-Barr et le cytomégalovirus sont souvent associées à cette maladie mais les mécanismes impliqués restent encore inexpliqués. L'hypothèse actuelle suggère la mise en place d'un mimétisme moléculaire par le virus ainsi que la formation de complexes immuns facilitant la mise en place d'une réponse inflammatoire (Kamphuis et al., 2005). Cependant la preuve la plus importante quant à l'implication d'une infection dans le développement de la PR est liée à *Porphyromonas gingivalis*. Cette bactérie entraîne le développement de maladies parodontales qui sont fortement associées à la PR. Cela pourrait être dû à la capacité de cette bactérie à produire PADI4 augmentant ainsi la citrullination des protéines (Wegner et al., 2010) et en induisant ainsi, chez des individus prédisposés et dans un contexte d'inflammation orale, la production d'ACPA qui serait le premier pas vers le développement de l'auto-immunité de la PR. Récemment, des études se sont intéressées au rôle de la flore commensale dans la physiopathologie de la PR. La première constatation a été que la flore bactérienne des patients PR est moins diversifiée que celle des donneurs sains. Il semblerait que la faible diversité de cette flore soit corrélée avec une importante production d'auto-anticorps. Une analyse plus fine montre l'augmentation du taxon des Actinobactéries qui est normalement faiblement représenté dans la flore intestinale humaine. Cette étude est une des premières à identifier une disbiose de la flore bactérienne entre des individus sains et des patients atteints de PR (Chen et al., 2016a).

La survenue d'un évènement émotionnellement fort peut aussi être un des facteurs déclenchant la PR. Ce phénomène est expliqué par des mécanismes moléculaires associés à l'axe hypothalamo-hypophysaire et à la production de cytokines (Capellino et al., 2010). Il est connu que le système nerveux contrôle en partie le système immunitaire. Son action peut être locale par l'intermédiaire de neurotransmetteurs ou systémique *via* la production

de cytokines. Malgré tous ces travaux, la cause de la PR reste encore inconnue et la raison de sa localisation dans les articulations n'est pas totalement comprise. Actuellement, le rôle de facteurs microvasculaires, neurologiques ou biomécaniques sont à l'étude.

6. Le processus inflammatoire dans la polyarthrite rhumatoïde

L'inflammation de la membrane synoviale, la synovite, est la lésion fondamentale de la polyarthrite rhumatoïde. Elle est due à l'infiltration de leucocytes dans le compartiment synovial. Ce processus est dans un premier temps dû à la migration des cellules immunitaires et non à leur prolifération. Elle est facilitée par l'activation endothéliale des micro-vaisseaux de la membrane synoviale qui augmente l'expression de molécules d'adhésion et de chimiokines. Le développement d'une synovite est favorisé par la mise en place d'une néo-angiogenèse due à la présence de cytokines et d'un environnement hypoxique local (Polzer et al., 2008).

a) Implication de la réponse immunitaire adaptative dans la physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde

La PR est une maladie majoritairement présentée comme dépendante de la réponse Th1. Cependant, une attention particulière a été portée sur le rôle que pourraient jouer les Th17 dans le développement de cette maladie. Ces cellules ont la capacité de sécréter des cytokines pro-inflammatoires de la famille de l'IL-17 comme l'IL-17A et l'IL-17F mais aussi de l'IL-22 ou encore du TNF α (Chabaud et al., 1998). Ce type cellulaire est fortement présent au sein de l'articulation inflammée et est maintenu par la présence de macrophages et de cellules dendritiques qui sécrètent des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β ou l'IL-23. L'IL-17 est capable d'augmenter l'activité des fibroblastes conduisant à l'érosion osseuse ou cartilagineuse (Genovese et al., 2010). Afin de contrecarrer l'action des Th17, des biothérapies ciblées contre l'IL-17A ont été développées. Cependant, ces traitements n'ont montré que peu d'effet dans la résolution de la PR, suggérant que le rôle pathogénique des Th17 dans cette maladie ne se limite pas qu'à leur production d'IL-17.

A l'opposé des cellules T inflammatoires, il existe les Treg. La PR étant une maladie dans laquelle l'inflammation n'est pas contrôlée, plusieurs études se sont penchées sur le comportement de ces cellules. Ces travaux ont mis en évidence un défaut des Treg dans la PR. Cependant, ce défaut n'est pas quantitatif mais qualitatif. Les Treg présents dans les

tissus de patients ont une capacité plus faible à réguler l'inflammation que les Treg de donneurs sains (Behrens et al., 2007). Cette diminution de l'activité des Treg peut être expliquée par la forte concentration de TNF α retrouvée localement dans l'articulation favorisant leur inhibition (Nadkarni et al., 2007) (**Figure 18**).

La production d'auto-anticorps dans la PR met en lumière une importante activation de la réponse humorale. Les lymphocytes B sont retrouvés en grande quantité dans la membrane synoviale et forment des agrégats avec des LT. Ces cellules sont tellement présentes qu'il est parfois possible de voir apparaître des follicules lymphoïdes ectopiques sur certains tissus (Seyler et al., 2005). La formation de ces amas lymphocytaires est dépendante de l'expression de facteurs de prolifération comme APRIL et de l'expression de chimiokines comme CXCL14 et CXCL21. L'importance des LB dans le développement de la PR est supportée par l'efficacité du rituximab dans cette maladie. Cet anticorps monoclonal cytotoxique anti-CD20 permet la neutralisation des lymphocytes B (Edwards et al., 2004). Cependant, il est spécifique des lymphocytes B, mais pas des cellules productrices d'anticorps que sont les plasmocytes. Cela suggère que les LB ne sont pas pathogéniques que par leur capacité à se différencier en plasmocytes mais aussi par leurs aptitudes à présenter l'antigène et à stimuler les LT.

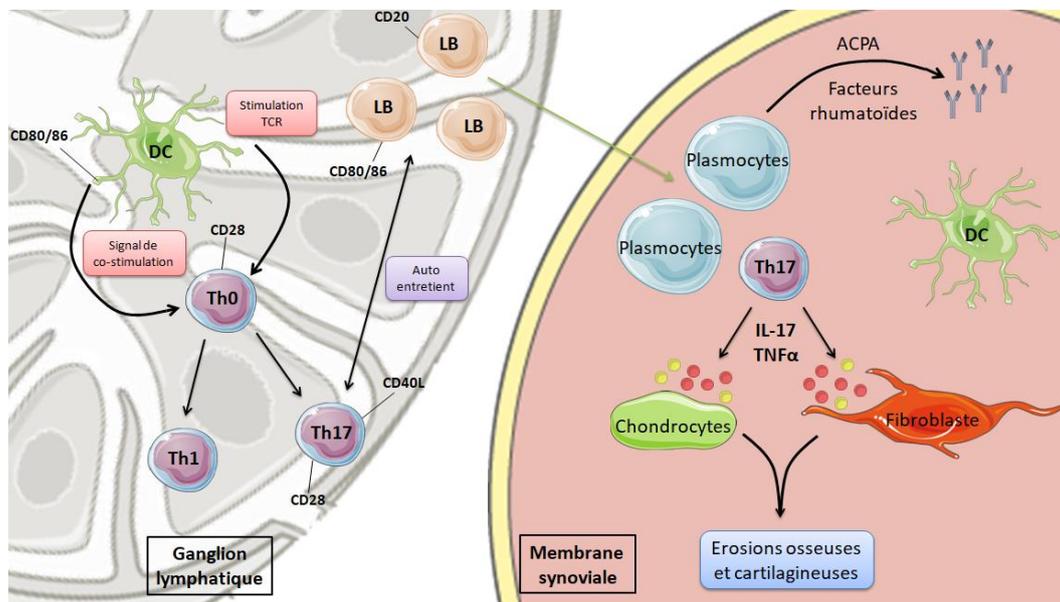


Figure 18 : L'immunité adaptative dans la polyarthrite rhumatoïde adaptée de (McInnes and Schett, 2011)

b) La réponse immunitaire innée dans la polyarthrite rhumatoïde

Une multitude de cellules innées effectrices telles que les macrophages ou les mastocytes sont retrouvées dans la membrane synoviale. En revanche, les neutrophiles se localisent préférentiellement dans le liquide synovial.

Les macrophages sont très présents dans la membrane synoviale et sont les principales cellules à intervenir dans la formation de la synovite. Leur maturation depuis les monocytes dans la membrane synoviale est favorisée par la présence locale de facteurs de maturation comme le G-CSF, le M-CSF et le GM-CSF. Les traitements actuels permettent une diminution de l'infiltration de ces cellules dans la membrane synoviale et cela a été utilisé comme bio-marqueur de réponse au traitement (Haringman et al., 2005). Le rôle majeur des macrophages dans la synovite rhumatoïde est lié à leur capacité à produire un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires telles que le $TNF\alpha$, l'IL-1 ou encore l'IL-23. Ils peuvent aussi sécréter des ROS (Reactive Oxygen Species), des NOS (Nitric Oxyde) mais aussi des prostaglandines et certaines enzymes dégradant la matrice conduisant à la dégradation de l'os et du cartilage. De plus, ces cellules peuvent pratiquer la phagocytose et servir de cellules présentatrices d'antigène. Les macrophages sont activés par leurs TLR et leur NLR (NOD-like receptor) qui reconnaissent une grande diversité de PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern) incluant des bactéries, des virus ou de potentiels ligands endogènes (Seibl et al., 2003) (Figure19).

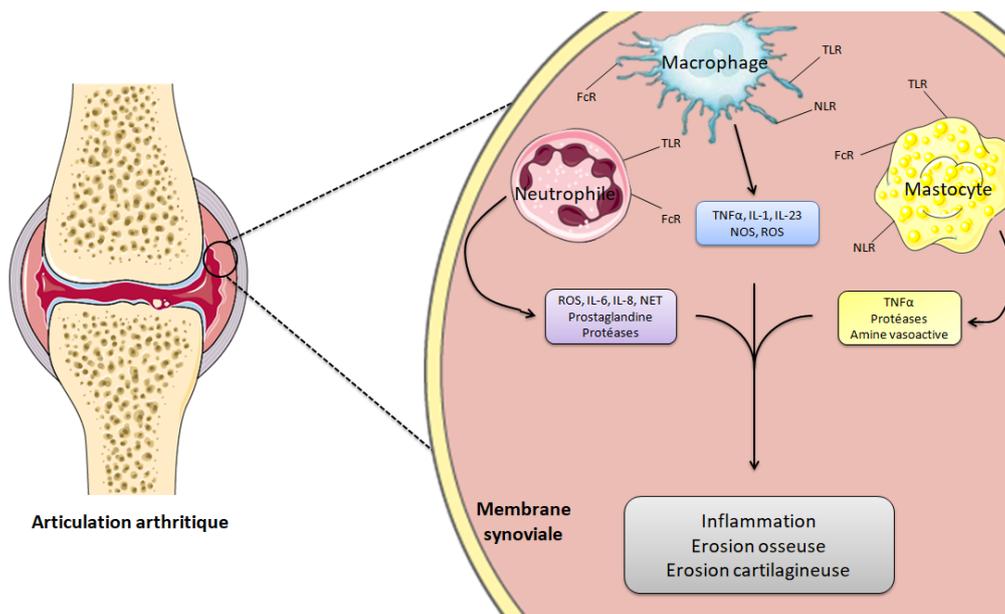


Figure 19 : L'immunité innée dans la polyarthrite rhumatoïde adaptée de (McInnes and Schett, 2011)

Les neutrophiles sont surtout présents dans le liquide synovial. Ils participent au développement de la synovite par leur production de prostaglandines, de protéases, de ROS, de NET (Neutrophil Extracellular Trap) mais aussi de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et l'IL-8 (Cascão et al., 2010). Les mastocytes, par leur production d'amines vasoactives et de cytokines favorisent l'inflammation. Ils peuvent être activés soit par les TLR qu'ils expriment soit par leurs récepteurs Fc. Ces récepteurs Fc leur permettent d'être activés en présence d'anticorps. Toutes ces études mettent en évidence le rôle majeur des TLR dans la mise en place de l'inflammation au niveau de la membrane synoviale. Cependant, aucune thérapie ciblant les TLR, ni les voies de signalisation qui en découlent, comme l'activation de l'inflammasome, n'est actuellement développée pour le traitement de la PR.

c) Rôles des cytokines dans la physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde

Les cytokines jouent un rôle essentiel dans l'inflammation dans la PR. L'importance de certaines cytokines varie en fonction de l'état d'avancement de la maladie. Concernant l'IL-4, 13 et 15, leur action est surtout impliquée dans la mise en place de la chronicité de la pathologie (Raza et al., 2005). En revanche, le TNF α joue un rôle prépondérant dans l'expression de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires. Il permet aussi l'augmentation de l'expression des protéines d'adhésion, de l'angiogenèse et est un des responsables de la douleur articulaire (Hess et al., 2011). De manière comparable, l'IL-6 est capable d'augmenter de manière locale l'activation des leucocytes ainsi que la production d'anticorps. Elle est aussi impliquée dans la mise en place de la phase aigüe de la PR ainsi que dans l'anémie inflammatoire parfois présente chez les patients. L'importance de ces deux cytokines en fait des cibles de choix dans les traitements de cette maladie.

Les cytokines de la famille des IL-1 (1 α , 1 β , 18 et 33) sont aussi très représentées dans la PR. Elles augmentent l'activation des leucocytes, des chondrocytes et des ostéoclastes (Nakae et al., 2003). Cependant une inhibition de ces cytokines n'a donné que de faibles résultats dans le traitement de la PR. Dans le but de développer des traitements ciblés efficaces, des études se sont intéressées aux voies d'activation induites par les cytokines. Il existe une multitude de voies de signalisation qui sont activées au sein de la membrane synoviale. Deux sont très importantes dans l'inflammation : la voie NF κ B et la

voie Janus kinase (JAK). L'inhibition des kinases JAK1 et JAK3 montre des résultats positifs dans le traitement de la PR (Kremer et al., 2009).

d) L'importance du TNF α dans la polyarthrite rhumatoïde

Le TNF α est l'une des cytokines importantes dans le développement de la PR. Elle régule la production de cytokines pro-inflammatoires au sein de la membrane synoviale. Elle est principalement produite par les macrophages mais peut être sécrétée par les cellules NK ou les neutrophiles. Le TNF α est retrouvé en grande quantité dans le liquide synovial des patients PR. Cette cytokine augmente l'activation des fibroblastes qui produisent alors des CTGF (Connective Tissue Growth Factor) conduisant entre autre, à une activation aberrante des ostéoclastes. Cela entraîne l'apparition d'érosion osseuse ou cartilagineuse caractéristique de la destruction articulaire dans la PR (Nozawa et al., 2014). D'autres études ont montré le rôle prépondérant du TNF α dans la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-1 ou le GM-CSF (Munker et al., 1986). De plus, le TNF α est capable d'augmenter la résistance des Teff face à l'activité suppressive des Treg (Chen et al., 2016b).

Le TNF α joue aussi un rôle majeur dans les processus conduisant à la destruction articulaire. Il est capable d'activer directement la différenciation des ostéoclastes à partir de macrophages provenant de la moelle osseuse en présence de RANKL (Receptor Activator Nuclear NF κ B Ligand) (Lam et al., 2000). Cette différenciation est possible car le TNF α active la production de RANKL par les LT et les LB, et permet la production et l'expression d'IL-1 et de RANK par les précurseurs des ostéoclastes (Wei et al., 2005). De plus, le TNF α agit directement sur la voie de signalisation Wnt qui intervient dans la formation et la réparation osseuse (Diarra et al., 2007). Le TNF α entraîne la production de Dkk-1, un inhibiteur de Wnt. Des études ont aussi montré un lien entre les ACPA et la production de TNF α . Ces auto-anticorps stimuleraient la sécrétion du TNF α et favoriseraient ainsi la formation des ostéoclastes (Harre et al., 2012).

e) La réponse du tissu mésenchymateux face à l'inflammation

La membrane synoviale contient des FLS et des macrophages résidents du tissu. Dans la PR, la membrane synoviale s'épaissit et cela est majoritairement le fait des FLS. Ces cellules perdent leur inhibition de contact entraînant une prolifération anarchique de ces

dernières. Ceci est associé à une augmentation de la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires mais aussi à l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésions et de métalloprotéinases matricielles (MMP) (Bradfield et al., 2003). Le phénotype de ces FLS en fait des acteurs importants dans les processus de destruction articulaire. En sécrétant les cytokines pro-inflammatoires, ils participent activement au phénomène de chronicité de la PR en maintenant des conditions optimales à la survie et la prolifération des LT et des LB (Filer et al., 2006).

Actuellement les mécanismes permettant le maintien des FLS donc de l'hyperplasie de la membrane synoviale restent peu compris. Une des hypothèses serait que les FLS deviendraient résistants à l'apoptose (Schett et al., 1998). De plus, les cytokines pro-inflammatoires présentes dans la membrane synoviale active la voie NFκB et augmentent la survie cellulaire des FLS après la fixation du TNFα.

Dans certains modèles murins d'arthrite, il a été montré l'importance des FLS dans la destruction articulaire. Ces cellules sont capables de migrer dans d'autres articulations saines afin de propager l'inflammation (Lefèvre et al., 2009). De nouveaux indices émergent quant aux processus moléculaires impliqués dans l'hyperplasie synoviale. En 2007, il a été montré que la présence de cadherine-11 modifiait le comportement des FLS en les orientant vers un phénotype pro-inflammatoire (Lee et al., 2007).

7. La destruction articulaire

Le caractère invalidant de la PR provient majoritairement de la destruction articulaire résultant de l'inflammation permanente de la membrane synoviale. Au sein de l'articulation, deux composants majeurs sont susceptibles d'être endommagés ou détruits : le cartilage et l'os (**Figure 20**).

a) L'impact de l'inflammation sur le cartilage

La raison principale de l'apparition de la destruction cartilagineuse est l'hyperplasie de la membrane synoviale. Dans la PR, elle perd son rôle protecteur de l'articulation, caractérisée par la diminution de la production de lubriline (Rhee et al., 2005). Ces modifications altèrent les cellules composant l'articulation. Le cas le plus étudié est celui des FLS. Comme mentionné précédemment, l'inflammation permanente de la membrane synoviale entraîne une hyper prolifération de ces cellules qui sécrètent des MMP comme les

MMP-1, 3 ou encore 14. Ces protéines provoquent la dislocation du réseau de collagène de type II. Elles modifient aussi la composition en glycosaminoglycane de l'articulation ainsi que sa capacité à retenir l'eau. La somme de toutes ces dérégulations conduit au développement de problèmes biomécaniques majeurs. La MMP-13 joue un rôle prédominant dans l'érosion du cartilage articulaire. Une étude a mis en évidence que dans un modèle d'arthrose chez des souris déficientes pour la MMP-13 aucune dégradation du cartilage n'était observée. Même si l'arthrose est une pathologie différente de la PR, ces résultats mettent en exergue l'importance de la MMP-13 dans la dégradation cartilagineuse (Little et al., 2009).

Cependant il existe des inhibiteurs d'enzymes appelés TIMP (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase) permettant la régulation des MMP. Il semblerait que ces inhibiteurs soient incapables de contrôler les MMP, ceci malgré leur présence en grande quantité chez les patients PR comparé à des donneurs sains (Clark et al., 1993). En plus d'un défaut des MMP, il existe un défaut de génération du cartilage du fait d'un dysfonctionnement des chondrocytes. Ces cellules sont les principaux régulateurs de la matrice. Dans la PR, la présence de ROS et de cytokines pro-inflammatoires, particulièrement l'IL-1 et l'IL-17, entraîne la mort des chondrocytes (Blanco et al., 1995).

b) L'érosion osseuse

La destruction osseuse apparaît très rapidement dans la PR. Dans des cohortes « historiques » jusqu'à 80% des patients présentaient des lésions osseuses seulement un an après le diagnostic (van der Heijde, 1995). Le développement de lésions osseuses montre une association très forte avec une inflammation articulaire prolongée. Les principaux responsables de l'érosion osseuse sont les cytokines de la membrane synoviale et particulièrement le M-CSF et RANKL. Ils déclenchent la différenciation des ostéoclastes et facilitent l'invasion du périoste adjacent au cartilage articulaire par ces cellules (Gravallese et al., 1998). Le TNF α , l'IL-6, l'IL-1 et dans une moindre mesure l'IL-17 favorisent la différenciation ostéoclastogénique. La neutralisation de ces cytokines par des biothérapies ciblées diminue la destruction osseuse. Cependant, le blocage de RANKL ne montre que des effets partiels puisqu'il agit exclusivement dans la diminution de l'érosion osseuse mais n'a aucun effet sur l'inflammation ou la destruction du cartilage (Tanaka, 2013). Les ostéoclastes sont capables de détruire l'os grâce à leur machinerie enzymatique. Ils produisent des enzymes acidifiantes entraînant la destruction des tissus minéralisés. La disparition de ces

derniers fait apparaître des trous au sein de l'os qui sont ensuite comblés par le tissu inflammatoire.

Le phénomène de destruction osseuse ne se développe pas dans toutes les articulations. Certaines présentent des prédispositions mécaniques à l'érosion osseuse. C'est le cas des articulations du deuxième et du troisième métacarpe qui sont sensibles à la destruction articulaire (McGonagle et al., 2009). Une destruction osseuse importante, peut endommager l'os cortical et permettre aux cellules inflammatoires d'investir la moelle osseuse. L'inflammation de ce compartiment est caractérisée par une forte densité de LT et de LB qui remplacent progressivement le gras présent dans la moelle (Hetland et al., 2009). Ce phénomène pourrait entraîner une exacerbation de l'inflammation articulaire en favorisant la formation des ostéoclastes à partir de précurseurs directement présents dans la moelle osseuse.

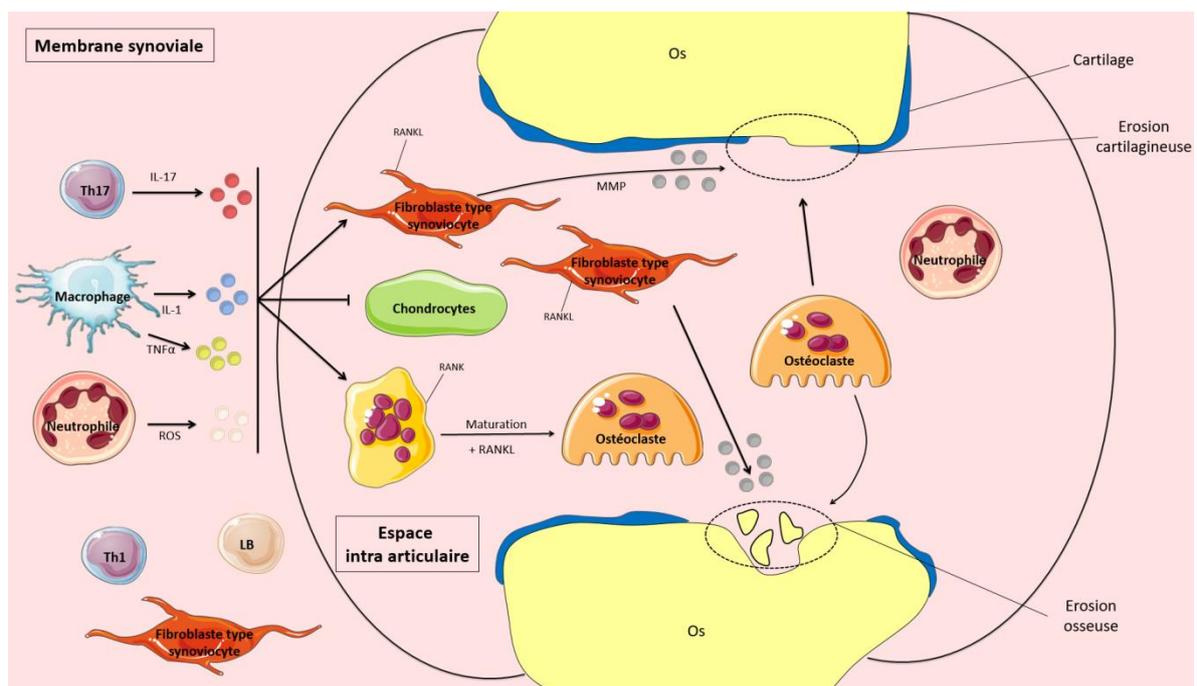


Figure 20 : Mécanisme de destruction articulaire et cartilagineuse dans la polyarthrite rhumatoïde adaptée de (McInnes and Schett, 2011)

8. Les conséquences systémiques de la polyarthrite rhumatoïde

La PR a comme principale conséquence d'entraîner une hyperplasie de la membrane synoviale conduisant à une destruction articulaire. Cependant, la maladie se caractérise aussi par une inflammation systémique chronique qui entraîne des comorbidités

importantes et est aussi responsable d'une mortalité augmentée par rapport à la population générale.

La PR est associée à une augmentation de la morbidité cardiovasculaire avec un risque augmenté d'accidents vasculaires cérébraux ou d'infarctus du myocarde (Solomon et al., 2003). Les facteurs de risque cardio-vasculaires dits « classiques » comme le tabac, le diabète, l'hypertension artérielle et les facteurs génétiques ne sont pas plus fréquents chez les patients PR. En revanche l'inflammation systémique est chez ces patients un facteur de risque indépendant. Dans la PR, les cytokines pro-inflammatoires augmentent l'activation des cellules endothéliales et rendent instables les plaques d'athérome (Sattar and McInnes, 2005).

La PR sévère et active est aussi associée à une diminution du cholestérol tant de la fraction LDL (Low Density Lipoprotein) que HDL (High Density Polyprotein). Les patients PR qui ont les taux de cholestérol les plus bas sont ceux qui ont aussi une mortalité cardio-vasculaire la plus importante. Ceci est défini par le « lipid paradox » de la PR. Chez ces patients, les traitements dans la PR augmentent le taux de cholestérol sérique mais diminuent les risques cardio-vasculaires (Jacobsson et al., 2005). En réalité, la relation entre cholestérol et mortalité dans la PR semble décrire une courbe en « U ». Aussi, les sujets avec les taux de cholestérol les plus bas et les plus élevés sont ceux à plus haut risque cardio-vasculaire. En revanche, ceux qui ont des valeurs de cholestérol intermédiaires ont le risque le plus bas. Il a aussi été montré que les statines sont modérément efficaces dans la PR. Ces molécules permettent de réduire le taux de cholestérol LDL et semblent aussi moduler certains facteurs inflammatoires présents dans la PR (Peters et al., 2010).

La PR augmente aussi le risque de développer un lymphome. Cela est fortement associé à la présence d'une inflammation chronique. Le risque de lymphome est donc une conséquence potentielle des maladies inflammatoires en général (Baecklund et al., 2003). Certaines études ont montré un risque plus élevé de développement du cancer du poumon chez les patients PR. Cela est probablement lié, en grande partie, au fait que le tabagisme est un des facteurs favorisant le développement de la PR ainsi que celui du cancer du poumon. Cependant, un rôle indépendant de l'inflammation sur le développement du cancer du poumon ne peut pas être formellement exclu sur la base des éléments de preuves actuels.

9. Historique des traitements de fond dans la polyarthrite rhumatoïde

La PR étant une maladie depuis longtemps décrite, les traitements ont évolué de manière conjointe à la compréhension de la pathologie. Dans les années 1930, l'un des pionniers dans l'utilisation de traitements pour la PR est Forestier en utilisant des sels d'or (Forestier, 1934). A l'époque, personne ne comprenait le fonctionnement de ces sels. Actuellement, il a été montré que l'or est capable d'interagir avec les cellules immunitaires comme les lymphocytes ou les monocytes mais peut aussi réduire la formation des complexes immuns et la production de facteurs rhumatoïdes. Les injections intramusculaires d'or avaient des effets bénéfiques chez les patients à court et long terme. Ce traitement a été considéré comme la référence des DMARD (Disease Modifying Anti-Rheumatic Drug) jusqu'à l'utilisation du méthotrexate (MTX)(Wolfe, 1993).

Dans les années 1960, la D-pénicillamine a été utilisée dans le traitement de la PR. Il s'agit d'un produit issu de la dégradation de la pénicilline. Cette molécule est un chélateur du cuivre et permet la dissociation des complexes immuns. Cependant ce traitement n'a jamais montré d'efficacité sur les dommages radiographiques dans la PR et il est la source de nombreux effets indésirables comme des diarrhées, des vomissements ou encore de l'anorexie. Des conséquences plus graves ont pu être observées dans le cadre de son utilisation telles que des néphropathies, des glomérulonéphrites ou mêmes des lupus médicamenteux (Drosos et al., 1993).

Un autre traitement est la sulfasalazine (SSZ). C'est la première molécule qui fut synthétisée spécifiquement pour traiter la PR. Ce traitement est une association entre l'acide salicylique et un agent antibactérien, la sulfapyridine. Cette molécule a été montrée comme efficace dans la PR mais aussi dans les spondyloarthrites et dans les maladies intestinales inflammatoires chroniques. Le mécanisme d'action de la SSZ est inconnu mais elle possède des propriétés antibactériennes et anti-inflammatoires. Elle peut directement agir sur les LT, entraînant une diminution de la production de TNF α et d'IL-1 (Danis et al., 1992).

Dans les années 1950, les glucocorticoïdes (GC) ont commencé à être utilisés dans le traitement de la PR. A cette époque, les GC étaient administrés en forte dose. Rétrospectivement la posologie utilisée pendant cette période rendait le traitement beaucoup plus dangereux que la PR elle-même. Dans les années 1960, les GC ont de

nouveaux été utilisés mais à faible dose, montrant des effets bénéfiques dans la PR. Actuellement, ce sont les rares molécules qui ont un effet rapide sur les symptômes de la PR. Leurs effets passent par la diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires, de molécules d'adhésion et de MMP (Case, 2001). Cependant, le timing d'utilisation des GC est très important. Actuellement l'EULAR (European League Against Rheumatism) recommande d'administrer les GC tôt le matin car la production de cytokines suit un rythme circadien (Hoes et al., 2007).

Dans les années 1980, le DMARD de référence n'est plus les sels d'or mais le MTX qui l'est toujours actuellement. Le MTX est composé d'aminoptérine qui fut développée dans les années 1940 par Farber et ses collègues dans le but de traiter le cancer. Le MTX a été montré comme efficace dans la PR en 1951 par Gubner (Gubner et al., 1951). La FDA (Food and Drug Administration) approuve l'utilisation de ce médicament dans la PR en 1988. Dans les années 1990, le MTX était devenu le traitement de choix dans la PR. Les effets du MTX dans la PR se caractérisent par une diminution des manifestations symptomatiques et un ralentissement de la progression radiographique de la maladie (Drosos et al., 1997). Le MTX est un anti-métabolite qui inhibe la dihydrofolate réductase, augmente l'adénosine et diminue l'accumulation de leucocytes dans des modèles *in vivo* d'inflammation. Aux doses utilisées actuellement, le MTX n'est que faiblement immunosuppresseur diminuant ainsi le risque d'infections opportunistes. Cependant, il n'est pas rare que ce traitement soit toxique mais contrairement aux drogues qui l'ont précédé, il est aisé de moduler la dose tout en gardant un effet thérapeutique convenable (Sandoval et al., 1995). Le MTX peut entraîner une toxicité hépatique et hématologique, rare aux posologies utilisées dans la PR (entre 7,7 et 25 mg par semaine) et encore plus rare si une supplémentation en acide folique est co-administrée tout au long du traitement. Comme il est éliminé par voie rénale, le MTX est contre-indiqué en cas d'insuffisance rénale grave. La complication la plus grave observée lors d'un traitement au MTX est la fibrose pulmonaire qui peut apparaître chez 3 à 4% des patients surtout en début de traitement (Zitnik and Cooper, 1990).

Bien que le MTX ait émergé dans les années 1980 et soit devenu le DMARD de référence, d'autres traitements ont fait leur apparition au même moment. C'est le cas de la cyclosporine A. Elle permet l'inhibition de la translocation nucléaire de NFAT, un élément indispensable à l'activation des LT. L'effet principal de cette molécule est de diminuer la

transcription du gène codant pour l'IL-2 ainsi que des gènes impliqués directement dans l'activation des LT (Tsokos, 1987). Tout comme pour les GC, la cyclosporine A est toxique à forte dose mais garde un effet thérapeutique à faible dose (Case, 2001). Pour terminer, le leflunomide a été approuvé par la FDA en 1998 dans le traitement de la PR. Il inhibe la synthèse de pyrimidine. Son effet thérapeutique dans l'inflammation articulaire a été montré dans des modèles murins de PR et semble lié à une inhibition des LT activés (Xu et al., 1997).

10. Les thérapies ciblées

Les études sur la PR ont mis en évidence la mise en place d'une réponse immunitaire complexe dans le développement de la physiopathologie de cette maladie. Afin de traiter de manière spécifique les patients atteints de PR, les traitements de nouvelle génération s'attellent à cibler les acteurs clés de la PR que sont les LB, les LT, et les cytokines (**Tableau 1**).

a) L'inactivation des lymphocytes B

Les LB sont des acteurs importants de la physiopathologie de la PR. Ils sont les précurseurs des cellules potentiellement productrices d'ACPA ou de facteurs rhumatoïdes mais interviennent aussi dans les mécanismes de présentation de l'antigène et dans l'activation des LT.

Le rituximab est le principal traitement ciblant les LB. C'est un anticorps monoclonal chimérique anti-CD20. Le CD20 est présent à la surface des pré-B ainsi que sur les LB mémoire. Le rituximab permet donc une inhibition de ces deux types de cellule mais pas des plasmocytes. Il induit aussi le mécanisme d'ADCC (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity), augmente l'activité du complément et peut entraîner la mort des LB facilitant ainsi la résolution de l'inflammation (Buch et al., 2011). L'efficacité du rituximab dans la PR a été mise en évidence en 2004 (Edwards et al., 2004). Le marqueur d'efficacité de ce traitement est la diminution de la concentration sérique d'ACPA ou de facteurs rhumatoïdes ainsi qu'une forte diminution des LB (Marston et al., 2010). Cependant, les patients séronégatifs pour les ACPA ou les facteurs rhumatoïdes ne répondent que très faiblement au rituximab, indiquant une faible implication des LB dans leur maladie et demandant une approche thérapeutique différente (Isaacs et al., 2013). Lorsque ce traitement fonctionne, il

est associé à une diminution de l'activité clinique de la maladie, une diminution de l'inflammation systémique, un ralentissement de la dégradation articulaire et à une qualité de vie meilleure pour le patient. Le rituximab peut être utilisé en monothérapie mais son association avec du MTX le rend plus efficace (Emery et al., 2006). En Europe, le rituximab est utilisé après l'échec d'au moins un traitement anti-TNF α . Cependant, en 2012, l'ACR a recommandé l'utilisation de l'anti-CD20 directement après l'échec des DMARD en cas de maladie modérée ou sévère.

b) Le ciblage des lymphocytes T

Les lymphocytes sont de grands producteurs de cytokines pro-inflammatoires et sont très importants dans les mécanismes inflammatoires de la PR. Pour que ces cellules soient activées, il leur faut deux signaux : l'activation de leur TCR et un signal de co-stimulation passant par le CD80/86.

Il est très difficile d'empêcher la stimulation du TCR car elle est intimement liée à la présentation de l'antigène. C'est pour cela que le traitement principalement utilisé pour cibler les LT dans la PR s'attèle à inhiber le signal de co-stimulation. La molécule utilisée est l'abatacept, qui est une protéine fusionnant le CTLA-4 et la partie Fc d'une immunoglobuline. Le CTLA-4 est une protéine naturellement présente dans l'organisme qui fixe le CD80/86 pour empêcher le signal de la co-stimulation. L'abatacept permet donc de diminuer l'activation des LT. Cela se caractérise par une baisse de la concentration des cytokines pro-inflammatoires et de l'ostéoclastogenèse (Buch et al., 2009). Les effets cliniques suite à ce traitement se traduisent par une diminution de l'activité de la maladie et des marqueurs inflammatoires associée à un ralentissement de l'érosion osseuse (von Kempis et al., 2012). Les patients séropositifs pour les ACPA répondent mieux à l'abatacept mais les raisons de cette meilleure efficacité ne sont pas encore comprises (Gottenberg et al., 2012).

La neutralisation des LT passe aussi par l'inhibition de leur voie de signalisation à l'intérieur de la cellule. C'est la stratégie adoptée par l'utilisation de la cyclosporine A. Cependant, ce traitement n'a montré que des effets limités dans la PR. Il a pour but d'empêcher la production de cytokines par les LT en inhibant la transcription des gènes. La cyclosporine A permet d'inhiber la calcineurine, une enzyme déclenchant la transcription des gènes codant pour les cytokines par une activation de NFAT. L'inactivation de la calcineurine

empêche NFAT d'être transloqué dans le noyau et bloque la réponse inflammatoire (Matsuda and Koyasu, 2000). Le tacrolimus est un traitement qui agit sur le même principe d'inhibition que la calcineurine. Dans la PR, le tacrolimus est souvent utilisé en association avec le MTX mais seulement après une résistance au DMARD ou lorsque d'autres traitements ne sont pas envisageables (Dutta and Ahmad, 2011).

c) Les anti-IL-6 récepteur et les anti-IL-1

L'inhibition des cytokines pro-inflammatoires est une des stratégies les plus efficaces dans les traitements de la PR. Leurs implications dans de nombreux mécanismes inflammatoires en fait des cibles de choix.

L'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire présente en forte concentration chez les patients atteints de PR. Le niveau sérique d'IL-6 et de récepteur soluble à l'IL-6 (IL-6R) est corrélé avec l'activité de la maladie, en faisant une cible de choix pour un traitement. Le tocilizumab a été développé dans ce but. Il s'agit d'un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le récepteur de l'IL-6 (IL-6R). Cette molécule est efficace dans la PR en monothérapie ou associée à un DMARD. En 2017, le sarilumab, un autre anticorps anti-IL-6R a eu l'accord de la FDA et de l'union européenne pour être utilisé comme traitement dans la PR. D'autres anti-IL-6R sont en développement. C'est le cas de l'olokizumab et du sirukumab qui sont actuellement en essai clinique de phase III.

Tout comme l'IL-6, le niveau d'IL-1 est corrélé avec l'activité de la PR (Tanaka and Martin Mola, 2014). Le ciblage majeur pour cette cytokine est son récepteur de type 2. Il fixe IL-1 circulant mais n'est pas impliqué dans la transduction du signal (Bresnihan et al., 1998). Un antagoniste de récepteur (IL-1RN) a été identifié comme inhibant l'action de l'IL-1. Pour obtenir une inhibition totale de l'IL-1, l'IL-1RN doit être présent en quantité dix à cent fois plus élevée que l'IL-1. Ce qui n'est pas le cas dans un état physiologique normal. C'est dans ce but qu'a été développé l'anakinra. Il s'agit de la forme recombinante humaine de l'IL1-RN. L'administration de ce médicament est quotidienne au vue de sa demi-vie très courte (4 à 6h). Dans la PR, ce médicament a montré des effets bien moins importants que les biothérapies anti-TNF α et il est très rarement utilisé (Singh et al., 2009; Turkstra et al., 2011). En revanche, l'anakinra est souvent utilisé dans la forme systémique de l'arthrite juvénile idiopathique et dans des maladies dites auto-inflammatoires (Turkstra et al., 2011).

d) Les thérapies anti-TNF α

Le TNF α a été la première cytokine à être ciblée dans la PR (Keffer et al., 1991). Le TNF α est impliqué dans la majeure partie des mécanismes inflammatoires de la PR ainsi que dans l'ostéoclastogenèse. Cette protéine est présente en très grande quantité au sein des articulations de patients PR et une surexpression de TNF α conduit à l'apparition d'arthrite chez la souris.

L'infliximab a été le premier anti-TNF α développé et testé dans la PR. Il s'agit d'un anticorps monoclonal chimérique humain/souris dirigé contre le TNF α . Le traitement est une perfusion intraveineuse toutes les quatre à huit semaines. En association avec le MTX, l'infliximab diminue rapidement les signes cliniques. A plus long terme il est très efficace dans la prévention de l'érosion osseuse. Il restaure aussi les aptitudes physiques des patients répondeurs. En 2016, l'inflectra, premier bio-similaire de l'infliximab, a obtenu l'autorisation de mise sur le marché pour le traitement de la PR.

Contrairement à l'infliximab, l'etanercept n'est pas un anticorps mais une protéine recombinante fusionnant deux molécules de la partie extracellulaire du TNFR2 avec un fragment Fc d'IgG1 humaine. Ce traitement a été approuvé en 1998 dans le traitement de la PR. L'etanercept agit comme un inhibiteur du TNF α soluble et diminue la réponse inflammatoire qui lui est associée. La demi-vie de l'etanercept est de 4 à 6 jours ce qui demande une injection hebdomadaire pour un traitement efficace. Cet anti-TNF α peut être utilisé en monothérapie mais son association au MTX permet d'augmenter son activité (Emery et al., 2006).

L'adalimumab, fut le premier anticorps anti-TNF α complètement humain. Il est injecté en sous cutané et sa demi-vie est d'environ 13 jours. Les effets de l'adalimumab associés au MTX ont été montrés chez des patients développant une PR agressive ainsi que chez des patients non répondeurs aux DMARD (Burmester et al., 2007). Après 76 semaines de traitement, une étude a montré que 90% des patients répondaient positivement au traitement par un maintien d'un faible score de la maladie. Le golimumab est la version humaine de l'infliximab. Il s'agit d'un anticorps humain ciblant le TNF α . Cet anti-TNF α est efficace chez des patients développant une PR modérée ou sévère étant non répondeurs au MTX ou totalement naïfs de traitements (Smolen et al., 2009).

Pour terminer, il existe le certolizumab pegol. Il s'agit d'un fragment d'anticorps anti-TNF α humain ne possédant pas de partie Fc mais seulement le fragment Fab. L'ajout du pegol permet une meilleure stabilité de la molécule et augmente sa demi-vie (14 jours). Le certolizumab est administré par injection sous cutanée toutes les semaines en monothérapie ou en association avec du MTX.

e) Les inhibiteurs de la voie JAK/STAT

La voie JAK/STAT est impliquée dans l'activation des macrophages. Ces cellules sont les principales productrices de TNF α . Dans le but de diminuer l'inflammation, des traitements ont été développés pour inhiber cette voie de signalisation. Actuellement, il existe deux molécules qui inhibent la voie JAK/STAT et qui sont utilisées dans le traitement de la PR. Le tofacitinib est un inhibiteur de JAK1, JAK2 et JAK3. Son approbation par la FDA pour traiter la PR date de 2012 alors que son autorisation en Europe ne date que de janvier 2017. Ce médicament est un comprimé à prendre deux fois par jour en association avec du MTX. Ce traitement est utilisé dans des cas de PR modérées ou sévères. La seconde molécule est le baricitinib, son autorisation de mise sur le marché date de juin 2017. C'est un inhibiteur de JAK1 et JAK2. Tout comme le tofacitinib, il est utilisé en association avec le MTX et se présente sous la forme d'un comprimé à prendre une fois par jour.

Traitement	Nature de la molécule	Mode d'action
Infliximab	Anticorps monoclonal chimérique anti-TNF α	Inhibition du TNF α
Adalimumab	Anticorps humanisé anti-TNF α	Inhibition du TNF α
Etanercept	Protéines de fusion entre le TNFR2 humaine et une la fraction Fc d'un IgG1 humain	Inhibition du TNF α
Golimumab	Anticorps monoclonal humain anti-TNF α	Inhibition du TNF α
Certolizumab Pegol	Pegylation du fragment Fab d'un anticorps monoclonal anti-TNF α	Inhibition du TNF α
Tocilizumab	Anticorps recombinant humain anti IL-6R	Blocage de la signalisation et de l'activation des LB
Anakinra	Antagoniste du récepteur à l'IL-1	Inhibition de l'action de l'IL-1
Tofacitinib	Inhibiteur de JAK1/2/3	Inhibition de la voie JAK/STAT
Baricitinib	Inhibiteur de JAK1/2	Inhibition de la voie JAK/STAT

Tableau 1 : Récapitulatifs des thérapies ciblées utilisées dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde

11. Le psoriasis, une maladie dépendante du TNF α

Dans ce chapitre nous traiterons de manière succincte la physiopathologie du psoriasis, les cytokines ainsi que les cellules immunitaires principalement impliquées dans

cette pathologie. Nous terminerons par un tour d'horizon des différents traitements de cette maladie.

a) Généralités

Le psoriasis est une maladie inflammatoire auto-immune provoquant des dermatites. Cette pathologie est fortement influencée par des facteurs génétiques et environnementaux. C'est une maladie assez fréquente touchant 2% de la population mondiale. Elle présente des caractéristiques cliniques assez diverses en raison de l'absence de bio-marqueurs spécifiques. La forme la plus commune du psoriasis est psoriasis vulgaris qui représente 85 à 90% des cas de psoriasis.

Histologiquement, le psoriasis se caractérise par une hyper-prolifération et une différenciation anarchique des kératinocytes mais aussi par une hyper-plasticité des vaisseaux sanguins et une infiltration de leucocytes inflammatoires dans le derme. Les plaques apparaissant sur la peau sont pour la plupart rouges et entraînent des démangeaisons et des squames. Dans certains cas, l'inflammation chronique due au psoriasis peut entraîner des dommages articulaires.

a) L'importance des facteurs génétiques dans le psoriasis

Les facteurs génétiques jouent un rôle très important dans le développement du psoriasis. L'étude du génome de patients psoriasiques a montré la présence de polymorphismes de gènes directement liés au système immunitaire tels que le CMH (Liu et al., 2008b). Cependant, ces polymorphismes chez un individu n'induisent pas à eux seuls le psoriasis. Il existe en effet d'autres facteurs favorisant des modifications épigénétiques comme certains facteurs environnementaux.

Le psoriasis n'est pas une maladie transmise par hérédité mendélienne mais il existe des prédispositions familiales. Actuellement, le gène codant pour HLA-Cw6 est la cause principale de l'héritabilité du psoriasis (Park et al., 2010). Des études GWAS (Genome-Wide Association Study) ont permis l'identification d'une cinquantaine de gènes impliqués dans le psoriasis, répartissant la maladie en deux catégories bien distinctes : le psoriasis lié à des gènes spécifiques de la peau ou lié à des gènes de l'immunité (Alwan and Nestle, 2015).

Les premiers polymorphismes génétiques liés au psoriasis ont été identifiés sur des gènes impliqués dans la formation de l'enveloppe cornée, celle-ci jouant un rôle dans la formation des cellules épithéliales (de Cid et al., 2009).

Les autres gènes augmentant le risque de développement du psoriasis sont liés à la réponse immunitaire. Ils interviennent majoritairement dans les mécanismes de présentation de l'antigène ainsi que dans la voie de différenciation des Th17 dépendante de l'IL-23. C'est le cas de la mutation du gène *Hla-Cw6* qui est impliqué dans la présentation de l'antigène aux LT CD8⁺ (Elder, 2006). *Erap1* a aussi été identifié comme un gène de susceptibilité dans le développement du psoriasis. Il participe la présentation de l'antigène par le CMH I (Genetic Analysis of Psoriasis Consortium & the Wellcome Trust Case Control Consortium 2 et al., 2010). En plus de ces modifications de présentation de l'antigène, des polymorphismes ont été identifiés sur des gènes directement impliqués dans la signalisation de l'IL-23 et des Th17 tels que les gènes codant pour l'IL-12B, l'IL-23R ou encore l'IL-23A (Nair et al., 2009). Ces cellules et ces cytokines ont été identifiées pour leurs capacités inflammatoires importantes.

Des modifications de gènes impliqués dans des voies de signalisation ont aussi été identifiées. C'est le cas en particulier des gènes régulant la voie NFκB. Cette voie de signalisation est cruciale dans la mise en place de la réponse inflammatoire et intervient dans les processus d'activation de la majorité des cellules composant le système immunitaire. La voie NFκB est en partie régulée par la TNFAIP3 (alpha induced protein 3) et TNIP1 (TNFAIP3-interacting protein1). Des polymorphismes des deux gènes codant pour ces régulateurs sont associés à une augmentation du développement de plusieurs maladies auto-immunes telles que le psoriasis, le lupus érythémateux systémique ou encore la PR (Zhang et al., 2009).

En plus de la présence de polymorphismes génétiques dans le psoriasis, des équipes ont mis en évidence la présence de modifications épigénétiques. Han et ses collègues ont montré la présence de 26 régions hypométhylées dans le génome de patients psoriasiques par rapport à des donneurs sains. Ces sites peuvent fixer des facteurs de transcription et sont sensibles à la méthylation des histones mettant en évidence une possible régulation épigénétique dans le psoriasis (ENCODE Project Consortium et al., 2007). Certaines de ces modifications altèrent l'expression de gènes et peuvent être corrélées avec le score de la

maladie mesuré grâce au PASI (Psoriasis Area and Psoriasis Index). C'est le cas de l'hypo-acétylation de l'histone H4 qui est négativement corrélée avec le score de la maladie ou encore de la diminution de l'expression de SIRT1 qui entraîne une hyper-prolifération des kératinocytes (Zhang et al., 2011).

b) Implication des lymphocytes T effecteurs dans la réponse inflammatoire psoriasique

A l'origine, les Th1 étaient considérés comme les principaux acteurs de l'inflammation dans le psoriasis. Ces conclusions s'appuyaient sur une augmentation des ARNm de l'IL-12, du TNF α et de l'IFN γ chez les patients développant cette maladie (Szabo et al., 1998). Il a aussi été montré que les cellules souches mésenchymateuse (CSM) à l'origine des kératinocytes exprimaient plus fortement des gènes liés au Th1 chez des patients que chez des donneurs sains, caractérisant un déséquilibre du système immunitaire favorable à la réponse Th1. Actuellement il est connu que, dans le psoriasis, les Th1 produisent de l'IFN γ en grande quantité. Cette cytokine permet d'augmenter la capacité de présentation des antigènes initiant l'inflammation cutanée (Kryczek et al., 2008). L'IFN γ augmente l'expression de CCL20 à la surface des CPA qui favorise le recrutement des Th17. Il agit aussi avec l'IL-17 pour déclencher la production de chimiokines qui sont surexprimées par les kératinocytes dans le psoriasis (Kryczek et al., 2008).

Les études actuelles placent les Th17 au centre de la réaction inflammatoire dans le psoriasis. Ces cellules sont caractérisées par l'expression de ROR γ T. Leur différenciation est en partie dépendante de l'IL-6 et de l'IL-23 (Ivanov et al., 2006). Plusieurs études se sont intéressées au rôle de ces cellules dans l'inflammation cutanée. Pour commencer il a été montré que dans la peau psoriasique, les LT CD4⁺ produisant de l'IL-17 étaient présent en grande quantité par rapport à des donneurs sains (Chizzolini et al., 2008). Le rôle principal des Th17 est de produire des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-17, l'IL-12 ou encore l'IL-22. En réponse à cette inflammation, les kératinocyte sécrètent des chimiokines et cytokines qui favorisent le recrutement des Th17 (Ottaviani et al., 2006). Cette augmentation de l'inflammation est donc associée à un déséquilibre de l'activation de l'axe IL-23/Th17.

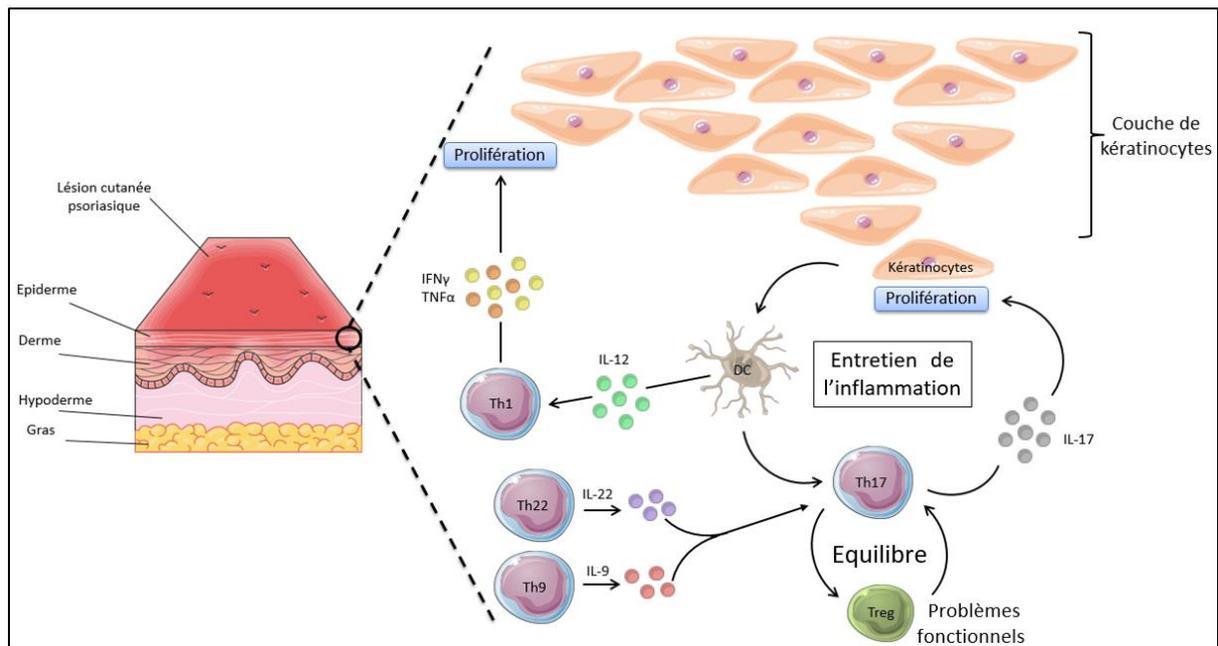


Figure 21: Mécanisme inflammatoire mis en place dans le psoriasis adaptée de (Deng et al., 2016)

D'autres classes de LT ont été identifiées dans l'inflammation cutanée. C'est le cas des Th22. Leur principale activité est de produire de l'IL-22. Cette cytokine favorise le recrutement des Th17. La production d'IL-22 est majoritairement contrôlée par l'axe IL-23/IL-17. Cela permet un entretien de l'inflammation dans le psoriasis. Les Th9 jouent sensiblement le même rôle mais leur action passe par l'IL-9 qui favorise le recrutement des Th17. Ces cellules sont présentes en grande quantité dans la peau psoriasique. Pour terminer, les LT CD8⁺ sont importants dans la physiopathologie du psoriasis. La raison de cela est la prédisposition à développer un psoriasis chez les personnes possédant un polymorphisme sur le gène *Psor1*. Il code pour une région du CMH de classe I qui permet l'activation des LT CD8⁺. Johnson et ses collègues ont montré que les LT CD8⁺ étaient capables de reconnaître des auto-antigènes provenant des kératinocytes indiquant un potentiel rôle pathogène (Johnston et al., 2004).

c) Les lymphocytes T régulateurs dans le psoriasis

L'IL-6 est une des cytokines importantes dans la différenciation des Treg. Cependant, elle intervient aussi dans celle des Th17 (Pasare and Medzhitov, 2003). Ce lien entre Treg et Th17 indique la mise en place d'un équilibre entre ces deux types cellulaires. Bien que l'inflammation soit très importante dans la peau de patient psoriasique, il a été montré que les patients présentent de grandes quantités de Treg au sein des lésions cutanées suggérant

un défaut fonctionnel et non numérique des Treg dans le psoriasis (Sugiyama et al., 2005). De plus, l'utilisation de modèles expérimentaux de psoriasis a permis la mise en évidence de l'importance du CD18 à la surface des Treg. L'absence de ce marqueur conduit à une hyperprolifération des LT dans la peau de ces souris due à un défaut d'activité immunosuppressive des Treg. La dérégulation des Teff conduit alors à une aggravation du psoriasis chez ces souris (Wang et al., 2008a). Pour terminer, il a été montré que les Treg issus de la différenciation de cellules hématopoïétiques de patients atteints de psoriasis perdent leur capacités immunosuppressives (Zhang et al., 2008). L'ensemble de ces résultats met en évidence l'importance des Treg dans le contrôle de l'inflammation psoriasique.

d) Le rôle des cytokines dans le développement du psoriasis

Le TNF α et l'IFN γ sont deux cytokines pro-inflammatoires très présentes dans le psoriasis. Elles agissent directement sur les kératinocytes entraînant ainsi leur activation et leur prolifération. L'IFN γ joue un rôle prépondérant dans la phase précoce de la maladie. Il permet la phosphorylation de JAK1 et JAK2 (voie JAK/STAT), conduisant à l'activation des facteurs STAT qui sont directement impliqués dans la croissance et la prolifération cellulaire. Cette voie de signalisation permet aussi l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires présentes dans les lésions cutanées du psoriasis (Johnson-Huang et al., 2012). Certaines études indiquent que la concentration sérique d'IFN γ pourrait être utilisée comme un bio-marqueur de l'activité de la maladie car corrélée avec le PASI (Abdallah et al., 2009). De son côté, le TNF α est fortement impliqué dans la capacité des DC à présenter l'antigène mais augmente aussi l'activation des LT par la phosphorylation de NF κ B. Cette voie d'activation est anormalement suractivée dans le psoriasis (Lizzul et al., 2005). De plus, le TNF α est fortement impliqué dans les mécanismes pro-inflammatoires présents dans le psoriasis. Il favorise la sécrétion d'IL-23 par les DC qui conduit à la différenciation et à l'activation des Th17. Cette cytokine est donc une cible de choix dans le traitement de cette pathologie. L'utilisation de traitements anti-TNF α entraîne une régression de la maladie, associée à une diminution de la présence des Th17 et de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-23 ou l'IL-17 (Zaba et al., 2007).

L'hyper-activation de l'axe IL-23/IL-17 est une des caractéristiques immunitaires de l'inflammation dans le psoriasis. L'ARNm de l'IL-17 est fortement présent dans les lésions cutanées chez les patients (Johansen et al., 2009). La principale cellule productrice d'IL-17

est le lymphocyte Th17. Cependant, il a récemment été montré que les neutrophiles et les mastocytes pouvaient aussi produire cette cytokine dans le psoriasis (Hou et al., 2015). L'IL-17 est une famille de cytokines comprenant 6 isoformes allant de l'IL-17A à l'IL-17F. Dans le cas du psoriasis, l'IL-17A et l'IL-17F sont les deux isoformes les plus représentées. L'IL-17 est capable d'induire directement la prolifération des kératinocytes et d'inhiber leur différenciation (Lai et al., 2012). De plus, en réponse à une stimulation par l'IL-17, les kératinocytes produisent à leur tour de l'IL-17 et favorisent le recrutement des Th17. Ce mécanisme permet un auto-entretien de l'inflammation dépendante de l'IL-17 (Ramirez-Carrozzi et al., 2011).

Cette forte présence d'IL-17 dans le psoriasis est intimement liée à une altération de l'équilibre entre l'IL-23 et les Th17. L'IL-23 est la cytokine majeure impliquée dans la survie et la prolifération des Th17. De plus, elle contribue à la prolifération des kératinocytes favorisant ainsi le développement du psoriasis. Les principales sources d'IL-23 sont les DC et les macrophages, suggérant l'importance du mécanisme de la présentation de l'antigène dans le développement de cette pathologie. Le rôle important de l'IL-23 dans le psoriasis a été renforcé lorsqu'il a été montré que cette cytokine était présente en plus forte quantité dans les lésions cutanées que dans la peau indemne de patients psoriasiques (Yawalkar et al., 2009).

D'autres cytokines sont augmentées dans le sang de patients développant un psoriasis. C'est le cas de l'IL-22. Cette protéine est sécrétée par les Th17 et les Th22. Elle permet la production d'IL-23 favorisant ainsi la survie des Th17. Elle augmente aussi la prolifération des kératinocytes dépendamment de la phosphorylation de STAT3 (Zheng et al., 2007). L'IL-9 présente le même profil que l'IL-22. Elle est présente en grande quantité dans les lésions cutanées de patients. Elle augmente la sécrétion d'IL-17, de TNF α et d'IL-13 au cours du psoriasis. L'inhibition de cette cytokine conduit à la diminution de l'inflammation par un affaiblissement de la production d'IL-17, permettant ainsi un rééquilibrage de la réponse immunitaire (Elyaman et al., 2009).

e) Les traitements

Les traitements classiques du psoriasis se basent sur l'administration de corticostéroïdes, d'analogues de la vitamine D ou de la mise en place de photothérapie

(Tableau 2). Un traitement local est généralement suffisant pour traiter des psoriasis peu sévères. Les corticostéroïdes constituent les traitements classiques les plus efficaces. Ils diminuent rapidement l'inflammation et la prolifération des kératinocytes (Van Der Meer et al., 1999). Une utilisation prolongée de ces traitements peut conduire à une atrophie cutanée et à une diminution de l'effet thérapeutique (Cornell and Stoughton, 1981). Les analogues de la vitamine D sont des traitements efficaces sur le long terme et n'entraînent pas d'effets secondaires. Cependant, les bénéfices de ces traitements n'apparaissent que plusieurs semaines après les avoir débutés. Dans des cas de psoriasis sévères, de la photothérapie à base d'ultraviolet peut être utilisée en association avec du MTX. Ce dernier est souvent utilisé car il est très peu onéreux et très efficace dans le psoriasis (Heydendael et al., 2003).

Suite à une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques du psoriasis, des traitements ciblés ont été développés afin de pallier à une potentielle résistance des patients aux traitements classiques (Strohal et al., 2013). Ces biothérapies sont classées en quatre groupes : les anti-TNF α , les inhibiteurs de l'axe IL-23/IL-17, les anti-IL-17 et les inhibiteurs des LT **(Tableau 2)**.

Traitement	Mécanisme d'action	Effets indésirables
Corticostéroïdes	Vasoconstriction Immunosuppression	Atrophie cutanée
Analogue de la vitamine D		Effets thérapeutiques tardifs
Photothérapie	Inhibition de l'hyper-prolifération épidermique	Vieillessement de la peau Cancer de la peau
Méthotrexate (MTX)	Immunosuppression	Fibrose hépatique
Cyclosporine	Immunosuppression	Hypertension artérielle
Etanercept	Inhibiteur du TNF α	Augmente le risque d'infection
Infliximab	Inhibiteur du TNF α	Augmente le risque d'infection
Adalimumab	Inhibiteur du TNF α	Augmente le risque d'infection Lupus
Ustekinumab	Inhibiteur de la voie IL-12/IL/23	Augmente le risque d'infection
Secukinumab	Inhibiteur de l'IL-17	Nasopharyngite

Tableau 2: Ensemble des traitements utilisés dans le psoriasis

Actuellement, les anti-TNF α autorisés dans le traitement du psoriasis sont l'etanercept, l'infliximab et le golimumab (Gilbert et al., 2015). Même si l'importance du TNF α dans cette pathologie a été avérée, il n'a pas été montré d'effet bénéfique supérieur de l'etanercept en comparaison au MTX. En revanche, les biothérapies les plus utilisées dans le psoriasis sont les inhibiteurs de l'axe IL-12/IL-23 comme l'ustekinumab et sont d'une grande efficacité tout comme les anti-IL-17. De manière identique à la PR, des inhibiteurs de la voie JAK/STAT sont en cours de développement pour traiter le psoriasis.

D. Les modèles animaux utilisés pour l'étude des maladies inflammatoires

Dans le but de mieux comprendre et disséquer les mécanismes impliqués dans le PR ou dans le psoriasis, de multiples modèles expérimentaux ont été développés. Nous distinguons les modèles induits et les modèles d'animaux génétiquement modifiés. Les caractéristiques des différents modèles présentés sont résumées dans le tableau 3.

1. Modèle expérimentaux de polyarthrite rhumatoïde

a) L'arthrite au collagène

L'arthrite expérimentale au collagène (AEC) est probablement le modèle expérimental de PR le plus utilisé et le mieux caractérisé. L'AEC partage beaucoup de points communs avec la PR puisque dans ce modèle il y a une rupture de la tolérance et une production d'auto-anticorps. Ce modèle a d'abord été développé chez le rat et par la suite dans différentes souches de souris (Trentham et al., 1977). L'AEC est basée sur une injection de collagène de type II (CII) bovin (b) émulsionné avec de l'adjuvant complet de Freund (CFA) suivi d'un rappel 3 semaines plus tard dans de l'adjuvant incomplet de Freund (IFA). Les souris les plus sensibles à l'AEC sont les DBA/1 et sont les plus utilisées dans ce modèle de PR. L'AEC est aussi inductible chez les souris C57BL/6 mais cette lignée est plus résistante que la lignée DBA/1.

Les signes cliniques de la maladie apparaissent après une vingtaine de jour suivant l'injection de CIIb. Ils se caractérisent par l'apparition d'érythèmes, d'œdèmes et de déformations au niveau des articulations. Ces symptômes sont associés à une inflammation de la membrane synoviale, une hyperplasie synoviale et une érosion du cartilage et de l'os. Ces mêmes caractéristiques sont retrouvées dans la PR chez l'homme. Ces symptômes sont

associés à l'activation de LB produisant des anticorps dirigés contre le CII et de LT spécifiques eux aussi de ce collagène. Les auto-anticorps présents dans l'AEC sont principalement des IgG2 et particulièrement des IgG2a et des IgG2b. La pathologie atteint un pic environ trente-cinq jours après l'injection de collagène et diminue par la suite. Cette rémission est associée à une augmentation de la quantité de TGF β et à une diminution de l'activité Th1 (Marinova-Mutafchieva et al., 2006; Mauri et al., 1996).

b) L'arthrite induite par des anticorps anti-collagène

Des études chez la souris ont montré que l'injection d'anticorps de souris AEC, permettrait d'induire l'arthrite chez des souris non immunisées (Stuart and Dixon, 1983). Par la suite, des cocktails d'anticorps ciblant le collagène ont été mis au point pour induire l'arthrite. Ce modèle est maintenant utilisé régulièrement en laboratoire et est appelé CAIA (Collagen Antibody Induced Arthritis). Le modèle CAIA est caractérisé par une forte infiltration de macrophages et de neutrophiles mais n'entraîne pas d'activation des LT et des LB (Santos et al., 1997). Le développement rapide de l'arthrite est l'un des avantages de ce modèle. Les premiers signes cliniques, semblables à ceux de l'AEC, apparaissent 48h après l'injection des anticorps avec une incidence de 100% et cela quel que soit le fond génétique de la souris. Ces symptômes sont associés à une forte infiltration des macrophages et des neutrophiles dans l'articulation. Cependant, l'un des principaux inconvénients de ce modèle est qu'il n'y a pas de mise en place de réponse B et de réponse T (Bessis et al., 2017).

c) L'arthrite à la mBSA

Ce modèle s'appuie sur une injection de méthyl BSA (mBSA) émulsionnée dans du CFA suivie une semaine plus tard par une injection intra-articulaire de mBSA dans du PBS. Ce type d'approche permet d'étudier les mécanismes de l'arthrite quelle que soit la souche de souris utilisée. Cependant, le rappel ayant lieu, la majeure partie des cas, dans le genou rend l'évaluation des paramètres cliniques délicate. En revanche, ce modèle permet l'observation histologique de l'érosion osseuse et cartilagineuse. La réaction inflammatoire présente dans ce modèle est majoritairement due à l'activation de la réponse T et à l'apparition de complexes immuns.

d) Le modèle DTHA

L'induction de la DTHA (Delayed-Type Hypersensitivity Arthritis) est réalisée par injection de mBSA émulsionnée avec du CFA en intra dermique, d'une injection d'anticorps anti-collagène et d'un rappel de mBSA (Atkinson et al., 2012). Contrairement au modèle mBSA, ici le rappel est effectué dans le coussinet plantaire de la souris. Cela permet l'évaluation de l'arthrite selon des paramètres cliniques. Le pic d'arthrite se déclare dès le lendemain du rappel et les signes cliniques peuvent perdurer pendant encore une dizaine de jours. Ce modèle inclut des érosions articulaires analysables en histologie. Les mécanismes inflammatoires mis en place durant ce modèle sont dépendants du TNF α et de l'IL-17 (Atkinson et al., 2016).

e) Le modèle SCW

Le modèle SCW (Streptococcal Cell Wall) est utilisé autant chez la BALB/c que chez la DBA/1. L'induction de l'arthrite s'effectue par une seule injection intra articulaire de fragments de parois cellulaires de Streptocoque et l'arthrite apparait dès le lendemain. Il est possible d'obtenir une arthrite destructive chronique en répétant les injections intra articulaires de SCW. L'arthrite se caractérise par une inflammation articulaire ainsi que par la mort des chondrocytes. Ce modèle conduit à la production d'anticorps anti-SCW (Bessis et al., 2017).

f) Les souris SCID

Les souris SCID sont des animaux possédant une mutation spontanée du gène *Prkdc* qui conduit à une absence de LT et d'immunoglobuline. Ces souris peuvent être greffées avec des tissus synoviaux de patients PR. Cette opération s'effectue dans la capsule rénale de la souris. Trente-cinq jours après l'opération, le tissu synovial se fixe au cartilage. Cent-cinq jours après, les fibroblastes synoviaux envahissent et entraînent sa destruction (Geiler et al., 1994). Ce modèle permet l'étude des mécanismes d'invasion du cartilage et sa destruction dans la PR.

g) Les souris transgéniques

Des animaux génétiquement modifiés peuvent développer des arthrites de manière spontanée. Les modèles de PR chez des souris sur-exprimant le TNF α humain ont été créés par Kollias et ses collègues en 1991 (Keffer et al., 1991). Ces souris présentent une

inflammation chronique entraînant des polyarthrites et des érosions articulaires. Un traitement précoce avec un anticorps monoclonal ciblant le TNF α protège totalement ces souris de la maladie.

Les souris K/BxN sont aussi connues pour développer des arthrites spontanées. Ces animaux ont été décrits pour la première fois en 1996 par Kouskoff et ses collègues (Kouskoff et al., 1996). Ces souris ont été obtenues par croisement d'une lignée transgénique pour le TCR et une lignée exprimant le CMH II A^{g7}. Les souris K/BxN développent spontanément des arthrites sévères et destructrices. De plus, leur sérum est riche en auto-anticorps dirigés contre la glucose-6-phosphate isomérase. Les mécanismes immunitaires mis en place sont dépendants du TNF α mais aussi de l'IL-1. Il est à noter que le sérum de ces souris est suffisant pour induire une arthrite.

Modèle	Induction	Caractéristiques
Arthrite au collagène	Immunsation avec du CII (bœuf ou poulet)	Incidence variable en fonction de la lignée murine Evaluation clinique aisée Modèle de référence dans l'étude de la PR
CAIA	Injection d'anticorps anti-CII	100% d'incidence quel que soit la lignée de souris Evaluation clinique aisée Modèle rapide
Méthyl BSA	Immunsation avec de la mBSA Rappel intra-articulaire de mBSA dans le genou	100% d'incidence quel que soit la lignée de souris Evaluation clinique compliquée Modèle rapide
DTHA	Immunsation avec mBSA Injection d'anticorps anti-CII Rappel de mBSA dans le coussinet plantaire	100% d'incidence quel que soit la lignée de souris Evaluation clinique aisée Modèle rapide
Modèle SCW	Injection intra articulaire de Streptococcal Cell Wall	100% d'incidence quel que soit la lignée de souris Modèle rapide Production d'anticorps anti-SCW
Souris SCID	Souris SCID + xéno greffe	Difficulté pour étudier le rôle spécifique de certains gènes dans le développement de l'arthrite
Souris transgéniques	Transgénique pour le TNF α humain Lignée K/BxN	Développement spontané d'arthrite Difficulté pour étudier le rôle spécifique de certains gènes dans le développement de l'arthrite

Tableau 3 : Modèles expérimentaux de la polyarthrite rhumatoïde

2. Modèles d'inflammation cutanée induite par l'imiquod

Il existe de nombreux modèles murins d'étude du psoriasis. La maladie peut être développée de manière spontanée ou induite tout comme pour les modèles de la PR. Dans ce chapitre nous décrivons le modèle de psoriasis que nous avons utilisé au cours de notre étude, le psoriasis induit par l'imiquimod.

L'imiquimod est un ligand du TLR7 et du TLR8 présent dans l'Aldara. Ce médicament est une crème couramment utilisée dans le traitement de petits carcinomes basocellulaires ou encore pour des verrues génitales (Beutner and Tying, 1997). Il a été montré que des patients traités par Aldara développent des psoriasis en cas d'application prolongée (Rajan and Langtry, 2006). Cette crème est utilisée dans l'induction de l'inflammation cutanée chez la souris.

Une application cutanée quotidienne d'Aldara chez la souris entraîne l'apparition d'érythème, de squames et un épaissement de la peau. De plus, un épaissement de l'épiderme est constaté en histologie montrant une prolifération des kératinocytes. L'inflammation mise en place dans ce modèle est liée à la stimulation des pDC par l'imiquimod. L'activation du TLR7 à la surface de ces cellules entraîne la production d'IL-23. Cette cytokine favorise la différenciation et le maintien des Th17 (van der Fits et al., 2009; Wagner et al., 1999). Ces cellules sont les principaux producteurs d'IL-17. Cette cytokine est impliquée dans la mise en place de l'inflammation cutanée. L'Aldara permet aussi l'infiltration des cellules de Langerhans dans les ganglions lymphatiques (Suzuki et al., 2000). Ce modèle permet d'observer l'apparition d'érythème, d'infiltration et de squames cutanées, deux à trois jours après le début de l'application d'Aldara. De plus, l'arrêt de l'application de cette crème conduit à une rémission totale après quelques jours.

II. OBJECTIFS

La polyarthrite rhumatoïde et le psoriasis sont deux maladies auto-immunes dépendantes du TNF α . Ces pathologies sont associées à un défaut des capacités immunosuppressives des Treg. Il est à présent admis que le TNF α peut induire une expansion des Treg *via* l'activation du TNFR2, ce qui suggère un rôle important des Treg TNFR2⁺ dans la résolution de l'inflammation dépendante du TNF α . Actuellement, cette sous population de cellules est identifiée comme les Treg les plus immunosuppresseurs. A la lumière de ces résultats, la PR et le psoriasis pourraient être des pathologies dans lesquelles les Treg TNFR2⁺ jouent un rôle prépondérant.

Les mécanismes d'activation des Treg par le TNF α et le rôle exact des sous-populations de Tregs exprimant le TNFR2⁺ dans l'inflammation ne sont cependant pas clairement élucidés.

Notre premier objectif a été de comprendre le rôle du TNFR2 et plus spécifiquement celui qu'il joue à la surface des Treg dans l'inflammation dépendante du TNF α . Pour cela nous avons étudié l'effet direct de cette cytokine sur l'activité des Treg chez des souris sauvages ainsi que chez des souris déficientes pour le TNFR2 (TNFR2^{-/-}). Par la suite, nous avons étudié le rôle de ce récepteur dans deux modèles d'inflammation dépendants du TNF α , que sont l'arthrite DTHA et l'inflammation cutanée induite par imiquimod. Ces deux pathologies ont été induites chez des souris TNFR2^{-/-}. Puis nous avons analysé l'évolution de la maladie ainsi que la réponse immunitaire mise en place, et particulièrement l'action des Treg. Enfin, pour mieux comprendre le rôle spécifique des Treg TNFR2⁺, nous avons réalisé ces mêmes expériences chez des souris déficientes pour le TNFR2 seulement sur les Treg.

Le deuxième objectif a été de comprendre les mécanismes mis en jeu lors de traitements anti-TNF α dans la PR. Les études actuelles suggèrent en effet, qu'ils n'ont pas comme seule action d'inhiber le TNF α circulant, mais qu'ils pourraient aussi modifier le nombre, le phénotype et l'activation de certaines cellules comme les Treg. Notre hypothèse de travail est que les Tregs exprimant le TNFR2 jouent un rôle important dans la rémission de la PR. Nous avons donc étudié l'impact des traitements anti-TNF α sur les populations de Tregs et en particulier les Tregs TNFR2⁺.

III. RESULTATS

A. Résultats Partie 1 : TNFR2⁺ Tregs play an important role in skin immune cell infiltration and keratinocyte proliferation

Article en préparation

1. Introduction

Le psoriasis est une maladie auto-immune dépendante des Th17 et également caractérisée par une inaptitude des Treg à inhiber l'inflammation. De plus, cette maladie est associée à une présence importante de TNF α . Actuellement, il est connu que cette cytokine peut avoir une activité anti-inflammatoire lorsqu'elle se fixe au TNFR2 pouvant ainsi favoriser le maintien des Treg. Nous avons donc étudié le rôle de ce récepteur dans le modèle de psoriasis, induit par l'imiquimod.

Pour mener à bien cette étude, nous avons, dans un premier temps, induit le psoriasis chez des souris déficientes pour le gène du TNFR2 et évalué l'évolution clinique et histologique de la maladie. Au cours de la même expérience nous avons analysé la réponse immunitaire mise en place et avons porté une attention particulière au comportement des Treg. Ces expériences ont montré un rôle important du TNFR2 dans le contrôle de l'inflammation cutanée et de l'épaississement épidermique. Ces phénomènes étaient associés à une diminution de la fréquence des Treg et à une augmentation de l'infiltrat leucocytaire dans la peau.

Dans un deuxième temps, nous avons effectué un transfert adoptif de Treg WT chez des souris TNFR2^{-/-} dans le but de mieux comprendre le rôle des Treg TNFR2⁺ dans le contrôle de l'inflammation cutanée. Ces expériences ont permis de mettre en évidence le rôle important des Treg TNFR2⁺ dans le contrôle de l'épaississement de l'épiderme.

Pour terminer et afin d'identifier spécifiquement le rôle des Treg TNFR2⁺ dans le contrôle de l'inflammation cutanée dans notre modèle, nous avons induit la maladie chez des souris déficientes pour le TNFR2 mais seulement sur les Treg (FoxP3^{CRE} TNFR2^{LOX}). Ces travaux ont permis de confirmer le rôle des Treg TNFR2⁺ dans un modèle d'inflammation cutanée induit par l'imiquimod.

Cette étude a permis de mettre en évidence le rôle anti-inflammatoire du TNFR2 ainsi que l'importance des Treg TNFR2⁺ dans le contrôle de l'inflammation, dans notre modèle de psoriasis dépendant du TNF α .

2. Matériels et Méthodes

Souris

Les souris TNFR1^{-/-} et TNFR2^{-/-} ont été générées à partir de souris double déficientes TNFR1/TNFR2, don du Dr Muazzam Jacob. Ces souris doubles déficientes ont été croisées avec des souris C57BL/6 (Le Genest-Saint-Isle, France) afin d'obtenir des souris homozygotes TNFR1^{-/-} ou homozygotes TNFR2^{-/-}. Le génotype de ces souris a été confirmé par PCR en utilisant les amorces ci-dessous (**Tableau 4**). Les souris FoxP3^{CRE} x TNFR2^{LOX} et leurs contrôles ont été données par le Pr Benoit Salomon de l'unité U1135. Le phénotype de ces souris a été validé par cytométrie en flux après un marquage CD4, FoxP3 et TNFR2. Tous les protocoles utilisés dans cette étude ont été validés par le comité éthique de l'Université Paris 13 (comité Charles Darwin) ainsi que par le comité CEE40, rattaché à l'animalerie Buffon de l'Université Paris 6.

Gene	Orientation	Primer (5'-3')	Taille amplicon
TNFR1 WT	Forward	TGTGGAAAGGGCACCTTTACGGC	470bp
	Reverse	GGCTGCAGTCCACGCACTGG	
TNFR1 ^{-/-}	Forward	TGTGGAAAGGGCACCTTTACGGC	300bp
	Reverse	ATTCGCCAATGACAAGACGCTGG	
TNFR2 WT	Forward	AGCTCCAGGCACAAGGGCGGG	200bp
	Reverse	CCTCTCATGCTGTCCCGGAAT	
TNFR2 ^{-/-}	Forward	GCCCTGAATGAACTGCAGGACG	500bp
	Reverse	CACGGGTAGCCAACGCTATGTC	

Tableau 4 : Amorces utilisées pour le génotypage des souris TNFR1^{-/-} et TNFR2^{-/-}

Induction de l'inflammation cutanée

L'inflammation cutanée induite par l'Imiquimod a été effectuée par application de la crème Aldara sur des souris C57BL/6 de chez Janvier, TNFR2^{-/-} ou FoxP3^{CRE} TNFR2^{LOX} âgées de 8 à 12 semaines. Le dos des souris a été rasé et épilé 3 jours avant la première application d'Aldara.

Le score de la maladie a été évalué selon l'importance de l'érythème, de l'infiltration et des squames. Une pesée quotidienne des animaux a été effectuée pendant toute la durée de l'expérience.

Préparation des cellules et des tissus :

Les leucocytes de la rate ont été obtenus par broyage de la rate et lyse des globules rouges avec un tampon hémolysant (NH₄CL, KHCO₃ et EDTA). Les ganglions inguinaux ont été prélevés et les leucocytes ont été obtenus après broyage des ganglions. Le sang a été prélevé par ponction intracardiaque et les leucocytes sanguins ont été obtenus après lyse des globules rouges avec le tampon hémolysant. Les cellules immunitaires cutanées ont été obtenues après digestion de la peau dans du PBS contenant de la collagénase IV (Worthington), de la hyaluronidase (Sigma) et de la DNase (Sigma) pendant 3h sous agitation à 37°C. Le tissu digéré a été passé dans un tamis 70µM et les enzymes ont été neutralisées avec de l'EDTA.

Cytométrie en flux :

Les marquages de surface ont été effectués à l'aide des anticorps anti-CD4-APC Cy7 (clone RM4-5; BD Bioscience), anti-CD39-PE (clone 24DMS1; eBioscience), anti-CD39-PE Cy7 (clone Duha59; BioLegend), anti-CD25-PE (Miltenyi 130-102-593), anti-CTLA-4-PerCP Cy5.5 (clone UCD10-4B9; BioLegend), anti-CD120b-PE (clone TR-75-89; BD Bioscience), anti-CD45-APC (clone 30F-11; BioLegend), anti-F4/80-PE (clone Cl.A3.1; BioLegend) et anti-CD3-PerCP Cy5.5 (clone 17.A2; BD Bioscience).

Les marquages membranaires ont été effectués à 4°C et à l'obscurité dans du PBS contenant 5% de SVF, 0,02M de sodium azide et 100µg/mL de γ globulines humaines (Calbiochem), incubé pendant 30 min avec les concentrations requises d'anticorps ou les isotypes correspondants.

Pour le marquage intranucléaire de FoxP3, les cellules ont été fixées et perméabilisées avec le kit « FoxP3 Transcription Factor Staining Buffer Set » (eBioscience). Le marquage a été effectué à l'aide de l'anticorps anti-FoxP3-eFluor 450 (clone FJK.16s; eBioscience) ou avec l'isotype correspondant pendant 30 min dans le tampon de perméabilisation à la concentration requise.

Pour le marquage intracellulaire des cytokines, les cellules des ganglions ont été stimulées pendant 4h avec de la PMA (Sigma P1585), de la ionomycine (I9657) et de la Brefeldin A (BD Pharmingen, San Diego, CA). Les cellules ont ensuite été marquées avec un anti-CD4-PerCP.Cy5.5 (clone RM4-5; BioLegend), un anti-IL-17-PE (clone TC11-18H10; BD Bioscience) et un anti-IFN γ -APC (clone XMG1.2; BD Bioscience). Pour le marquage intracellulaire de l'IL-17 et de l'IFN γ , les cellules ont été fixées et perméabilisées avec le kit de chez BD Bioscience (554714).

Les résultats ont été générés avec le BD FACS CANTO II et le logiciel BD FACS DIVA Software.

Analyse histologique

Les échantillons de peau ont été fixés dans du formol puis déshydratés dans des bains d'alcool à concentrations croissantes. Puis, ils ont été inclus en paraffine et des coupes de 4 μ m ont été effectuées au microtome. Ces dernières ont ensuite été colorées à l'hématoxyline et à l'éosine. Les mesures de l'épiderme et les photographies ont été réalisées à l'aide du microscope Zeiss Axio Observer D1 et le logiciel Archimed de chez Microvision.

Transfert adoptif de Treg

Les lymphocytes T régulateurs (CD4⁺ CD25⁺) de rates de souris WT ont été purifiés par tri magnétique avec une pureté d'au moins 90% (Kit Miltenyi : 130-091-041). 100 μ L de PBS 1X contenant 10⁶ Treg ou non ont été injectés en intraveineuse 3 jours avant la première application d'Aldara.

3. Résultats

a) Contrôle de l'intensité de l'inflammation cutanée par la dose d'imiquimod appliquée

Dans le but d'étudier le rôle du TNFR2 dans le développement du psoriasis, nous avons utilisé un modèle expérimental induit par l'imiquimod, un ligand du TLR7. Pour cela nous avons utilisé de l'Aldara, une crème contenant cette molécule. L'hypothèse que nous avons formulée était que l'absence de TNFR2 conduisait à une exacerbation de l'inflammation cutanée. Afin de voir une potentielle augmentation des symptômes cliniques, nous avons appliqué sur des souris C57BL/6, différentes doses d'Aldara pour tenter d'induire

une inflammation modérée (**Figure 22**). Nous montrons que le score clinique des souris traitées par la plus forte dose d'Aldara (62,5 mg) conduit à un score total de $5,8 \pm 0,5$ au bout de cinq jours de traitement consécutifs alors que les souris en ayant reçu deux fois moins (31,25mg d'Aldara + 31,25 mg de Cold Cream) présentent un score de seulement $2 \pm 0,8$ (**Figure 22A**). L'étude des paramètres cliniques composant le score total que sont l'érythème, l'infiltration et les squames montre la même tendance (**Figure 22B-D**).

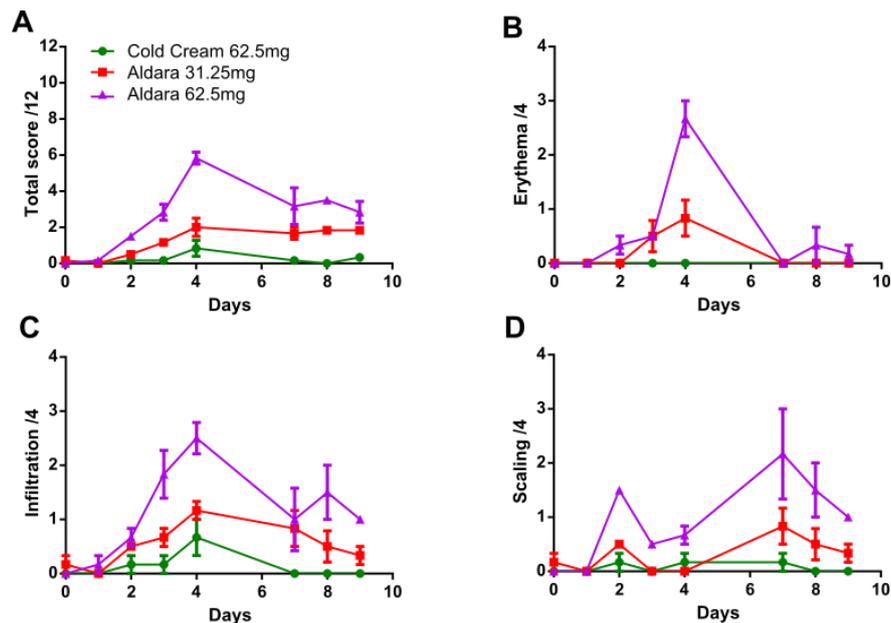


Figure 22 : Contrôle de l'intensité de l'inflammation cutanée par la dose d'imiquimod appliquée

(A) score cumulé des trois paramètres utilisés pour l'évaluation clinique de la maladie : (B) érythème, (C) infiltration et (D) squames. L'application d'Aldara a été effectuée pendant 9 jours avec un arrêt aux jours 5 et 6. Les souris du groupe Aldara ont reçu une application de 62,5 mg d'Aldara. Celles du groupe Aldara 31,25mg ont reçu une application de 31,25 mg d'Aldara mélangés à 31,25 mg de Cold Cream et le groupe contrôle a reçu 62,5 mg de Cold Cream. Chaque groupe est composé de 3 souris.

Ces expériences indiquent aussi que l'utilisation de Cold Cream n'induit pas d'inflammation cutanée et peut donc être utilisée pour diluer l'Aldara (**Figure 22**). Il est à noter que l'arrêt du traitement pendant deux jours consécutifs entraîne une diminution importante du score clinique (**Figure 22A**) caractérisée par une baisse de l'érythème et de l'infiltration (**Figure 22B-C**).

Ces résultats montrent qu'il est possible de moduler le score clinique du psoriasis en faisant varier la quantité d'imiquimod appliquée. De plus, une application quotidienne est recommandée pour obtenir une inflammation cutanée persistante. A la lumière de ces

résultats, un traitement quotidien pendant 5 jours avec 31,25 mg d'Aldara mélangée avec 31,25 mg de Cold Cream a été utilisé dans la suite de notre étude.

b) L'absence du TNFR2 conduit à une exacerbation des paramètres cliniques et histologiques de l'inflammation cutanée induite par l'imiquimod

Pour étudier le rôle du TNFR2 dans le développement de l'inflammation cutanée dépendante de l'imiquimod, nous avons induit la maladie chez des souris TNFR2^{-/-}. La figure 2A montre que l'absence du TNFR2 entraîne une exacerbation du score total de la maladie. Plus précisément, ces souris présentent une infiltration et des squames plus importantes que les souris WT (**Figure 23C-D**). En revanche, nous n'observons aucune différence concernant l'érythème (**Figure 23B**).

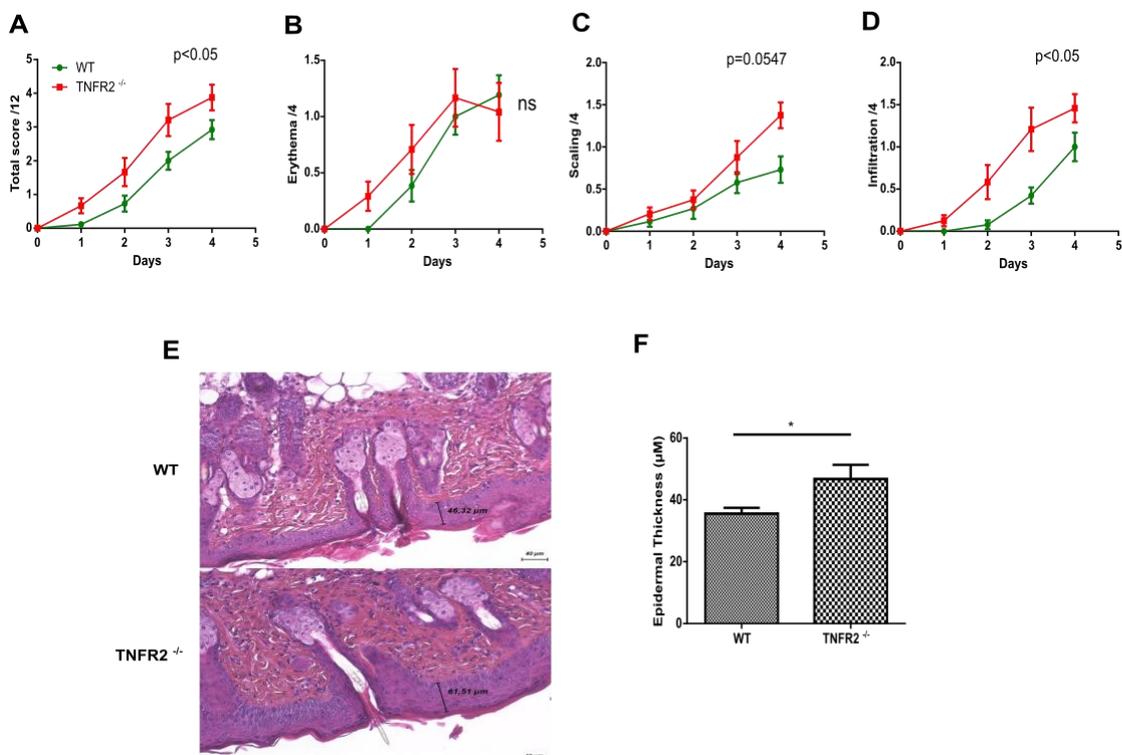


Figure 23 : L'absence du TNFR2 conduit à une exacerbation des paramètres cliniques et histologiques de l'inflammation cutanée induite par l'Imiquimod

(A) score cumulé des trois paramètres utilisés pour l'évaluation clinique de la maladie : (B) érythème, (C) squames et (D) infiltration. (E) Coupe histologique de la peau représentative de souris WT et TNFR2^{-/-}, au grossissement x400, dans un contexte d'inflammation cutanée. (F) Moyenne des mesures de l'épiderme sur des coupes de peau de souris WT ou TNFR2^{-/-}. Chaque groupe est composé de 12 souris. Toutes les souris ont reçu quotidiennement 31,25 mg d'Aldara mélangés à 31,25 mg de Cold Cream pendant 5 jours. L'analyse statistique des scores cliniques a été effectuée en calculant l'aire sous la courbe pour chaque groupe puis elles ont été comparées avec un test t de Student. L'analyse statistique de l'épaisseur de l'épiderme a été effectuée en utilisant un test t de Student. *p<0,05.

Le psoriasis est caractérisé par une hyper prolifération des kératinocytes conduisant à un épaissement de l'épiderme. L'analyse histologique de la peau montre que l'Aldara entraîne un épaissement plus important de l'épiderme chez les souris TNFR2^{-/-} que chez les souris WT (**Figure 23E-F**).

L'ensemble de ces résultats met en évidence le rôle important du TNFR2 dans le contrôle de l'inflammation cutanée et particulièrement dans le mécanisme d'infiltration et de formation des squames. De plus, le TNFR2 semble intervenir dans la régulation de la prolifération des kératinocytes puisque son absence augmente l'épaissement de l'épiderme après application d'Aldara.

c) L'absence de TNFR2 entraîne une diminution de la fréquence des Treg et des Treg CD39⁺

Par la suite, nous avons analysé les fréquences et les phénotypes des cellules immunitaires chez des souris déficientes pour le TNFR2 au cours de l'inflammation cutanée. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux Treg qui sont des cellules clé dans la régulation de l'inflammation. Nous montrons qu'après application d'Aldara, la fréquence des Treg est plus faible dans la rate et dans les ganglions lymphatiques des souris TNFR2^{-/-} par rapport aux souris WT (**Figure 24A**). De plus, le nombre absolu des Treg spléniques et ganglionnaires est plus faible chez les souris TNFR2^{-/-} que chez les souris WT (**Figure 24B**). La baisse de la fréquence et du nombre des Treg dans la rate des souris TNFR2^{-/-} est associée à une diminution de l'expression de FoxP3 par ces mêmes cellules (**Figure 24C**). La diminution des Treg n'est pas la seule conséquence d'une déficience en TNFR2. Nous avons étudié l'expression de marqueurs impliqués dans les mécanismes immunosuppresseurs des Treg tels que le CD39. Nous montrons que l'absence de TNFR2 conduit à une diminution de la fréquence et du nombre des Treg CD39⁺ dans la rate et les ganglions (**Figure 24D-F**).

Ces analyses cellulaires mettent en lumière le rôle important du TNFR2 dans la régulation de la fréquence des Treg dans la rate et dans les ganglions lymphatiques. De plus, le TNFR2 semble jouer un rôle dans le maintien de l'expression de FoxP3, caractérisé par la diminution de la MFI de FoxP3 chez les souris déficiente pour le TNFR2. Enfin, la diminution de la fréquence des Treg CD39⁺ chez les souris TNFR2^{-/-} indiquent une potentielle diminution de la capacité immunosuppressive des Treg.

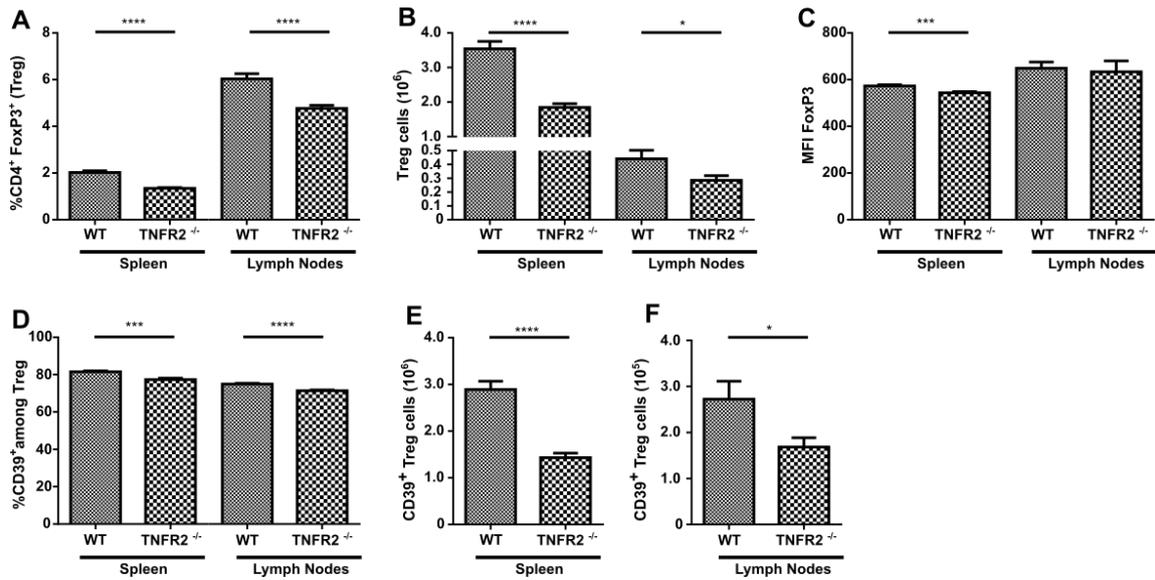


Figure 24 : L'absence de TNFR2 en cas d'inflammation cutanée entraîne une diminution des Treg et des Treg CD39⁺

(A)(B) Analyse de la fréquence et du nombre absolu des Treg dans la rate et les ganglions lymphatiques. (C) Analyse de MFI (Mean Fluorescence Intensity) de FoxP3 sur les Treg. (D)(E)(F) Analyse de la fréquence et du nombre absolu des Treg CD39⁺ dans la rate et les ganglions lymphatiques. Chaque groupe est composé de 12 souris. Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant un test t de Student. *p<0,05 ; ***p<0,001 ; ****p<0,0001.

d) Les Treg TNFR2⁺ protègent partiellement les souris TNFR2^{-/-} de l'inflammation cutanée

Les principales cellules impliquées dans la régulation de l'inflammation sont les Treg. Actuellement, il est connu que les Treg TNFR2⁺ représentent une population de Treg plus immunosuppressive. Nous avons donc étudié le rôle des Treg TNFR2⁺ dans notre modèle d'inflammation cutanée. Pour cela nous avons effectué un transfert adoptif de Treg issus de souris WT chez des souris TNFR2^{-/-} trois jours avant l'induction de l'inflammation cutanée (**Figure 25A**). Nous montrons que les paramètres cliniques ne sont que très peu modifiés entre des souris TNFR2^{-/-} ayant reçu des Treg WT et celles ayant reçu du PBS (**Figure 25B-D**). Seule l'infiltration est augmentée chez les souris TNFR2^{-/-} PBS et cela seulement au dernier jour de l'expérience (**Figure 25E**). L'analyse histologique de ces souris montre une augmentation de l'épaisseur de l'épiderme chez des souris TNFR2^{-/-} PBS comparées au WT PBS comme montré précédemment (**Figure 25F-G**). Cependant, il est à noter que l'injection de Treg WT chez les souris TNFR2^{-/-} induit une diminution de l'épaisseur de l'épiderme par rapport au souris TNFR2^{-/-} ayant reçu du PBS (**Figure 25F-G**).

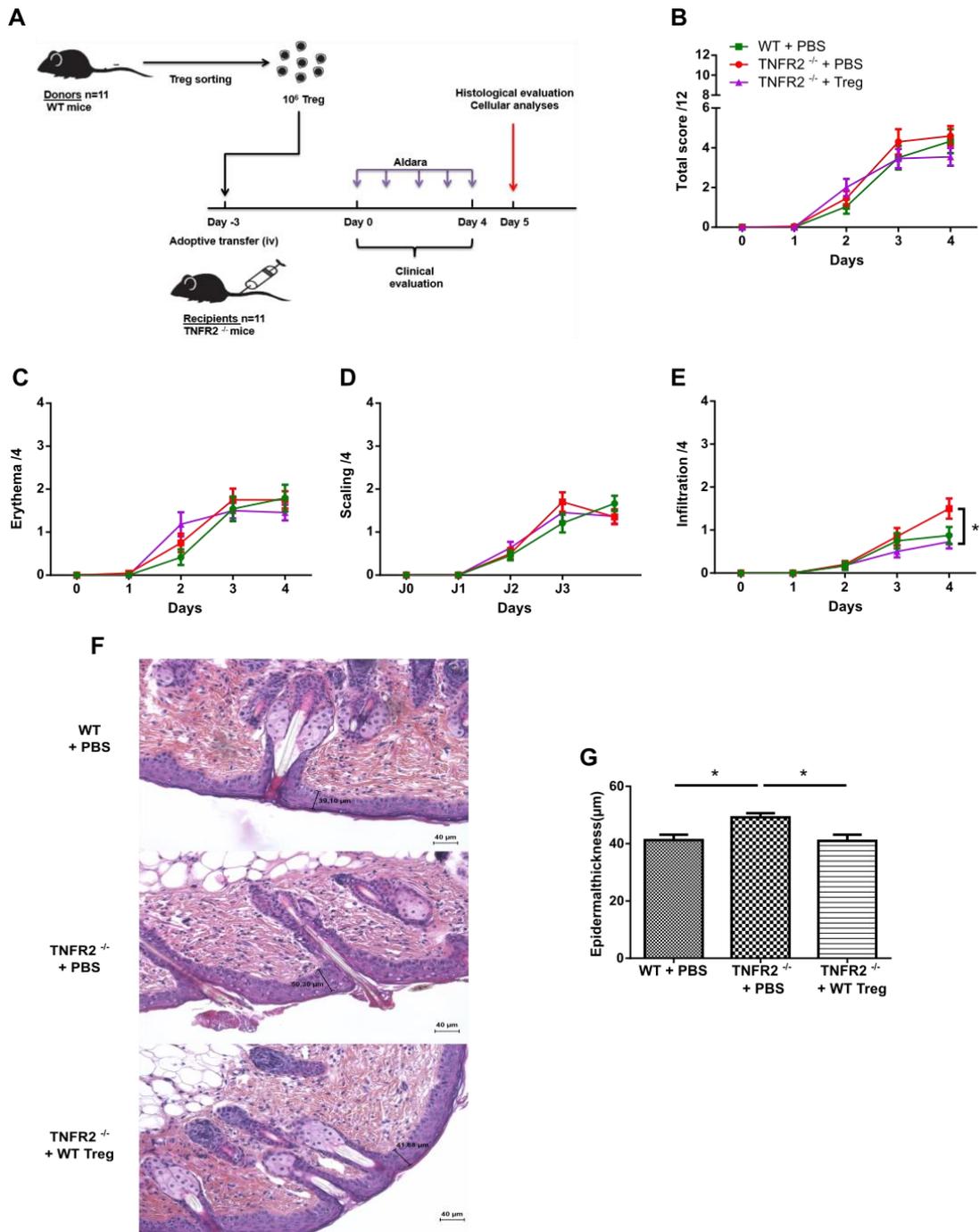


Figure 25 : Les Treg TNFR2⁺ protègent partiellement les souris TNFR2^{-/-} de l'inflammation cutanée

(A) Protocole de transfert adoptif de Treg WT chez des souris TNFR2^{-/-}. (B) Score cumulé des trois paramètres utilisés pour l'évaluation clinique de la maladie : (C) érythème, (D) squames et (E) infiltration. (F) Coupe histologique de la peau représentative de souris WT et TNFR2^{-/-} ayant reçu du PBS ou des Treg WT, au grossissement x400, dans un contexte d'inflammation cutanée. (G) Moyenne des mesures de l'épiderme sur des coupes de peau de souris WT ou TNFR2^{-/-} ayant reçu du PBS ou des Treg WT. Le groupe de souris WT est composé de 12 individus et les deux groupes de souris TNFR2^{-/-} sont composés de 11 individus. Toutes les souris ont reçu quotidiennement 31,25 mg d'Aldara mélangés à 31,25 mg de Cold Cream pendant 5 jours. Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant un One-Way ANOVA. *p<0,05.

Ces résultats indiquent que les Treg WT sont capables de diminuer partiellement les paramètres cliniques de l'inflammation cutanée induite par l'Aldara et particulièrement la mise en place de l'infiltration chez des souris TNFR2^{-/-}. Cependant, ces Treg semblent jouer un rôle important dans la régulation de la prolifération des kératinocytes de l'épiderme. L'ensemble de ces données met en évidence l'importance des Treg TNFR2⁺ dans la régulation de l'épaississement épidermique.

e) L'expression du TNFR2 est liée à une moindre infiltration leucocytaire et macrophagique dans la peau

Afin de mieux comprendre le rôle des Treg TNFR2⁺ dans la régulation de l'inflammation cutanée, nous avons effectué des analyses cellulaires après le transfert de Treg WT dans des souris TNFR2^{-/-}.

Nous montrons en premier lieu que nous retrouvons les Treg TNFR2⁺ chez des souris TNFR2^{-/-} ayant reçu des Treg de souris WT, validant notre méthode de transfert de Treg WT (**Figure 26A**). Cette injection ne permet pas d'augmenter la fréquence des Treg dans la rate et les ganglions des souris TNFR2^{-/-} (**Figure 26B**). C'est aussi le cas pour les Treg CD39⁺, les souris TNFR2^{-/-} ayant reçu des Treg WT présentent toujours un déficit de cette population par rapport aux souris WT que ce soit dans la rate ou dans les ganglions (**Figure 26C**). Cependant, un autre facteur dans le développement de l'inflammation cutanée est l'infiltration de cellules immunitaires dans la peau. Ce phénomène favorise le développement et le maintien de l'inflammation. Nous montrons que l'infiltration des leucocytes dans la peau de souris TNFR2^{-/-} est plus élevée que chez les souris WT. Cependant l'injection de Treg WT n'est pas suffisante pour réduire de manière significative cette infiltration leucocytaire chez les souris TNFR2^{-/-} même si une tendance à la baisse est observée (**Figure 26D**). Afin de mieux caractériser cet infiltrat leucocytaire nous avons marqué les lymphocytes T et les macrophages présents dans la peau. Il est connu que ces populations sont fortement impliquées dans le développement du psoriasis chez l'homme. Nous mettons en évidence une augmentation significative de l'infiltration macrophagique chez les souris TNFR2^{-/-} par rapport au souris WT (**Figure 26F**). Tout comme pour les leucocytes, l'injection de Treg WT ne conduit pas une diminution significative de l'infiltration macrophagique dans la peau chez les souris TNFR2^{-/-} même si une baisse est observée

(Figure 26F). En revanche, l'infiltration des lymphocytes T dans la peau ne semble pas être affectée par l'absence de TNFR2 (Figure 26E).

Ces résultats montrent l'importance du TNFR2 dans le contrôle de l'infiltration leucocytaire dans la peau et particulièrement celle des macrophages en cas d'inflammation cutanée. De plus, il semblerait que les Treg TNFR2⁺ puissent aussi intervenir dans le contrôle de l'infiltrat immunitaire cutané.

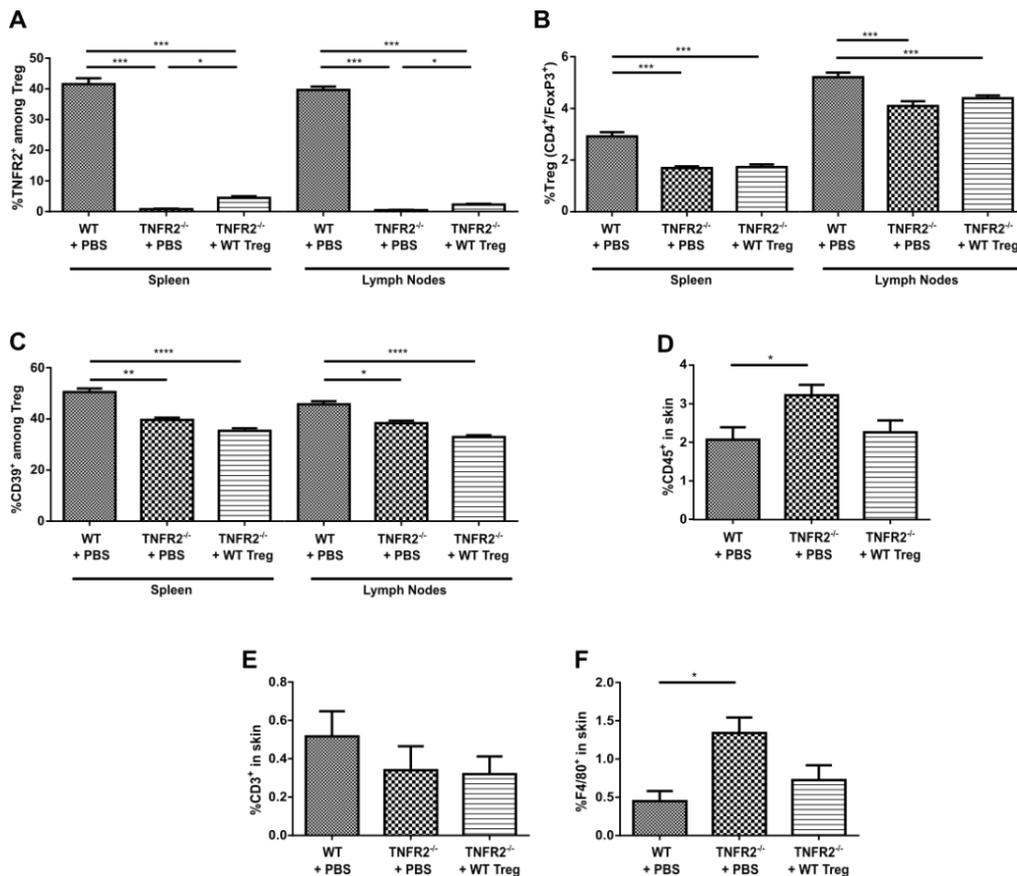


Figure 26 : L'expression du TNFR2 est liée à une moindre infiltration leucocytaire et macrophagique dans la peau

(A)(B) Analyse de la fréquence et du nombre absolu des Treg dans la rate et les ganglions lymphatiques. (C)(D) Analyse de la fréquence et du nombre absolu des Treg CD39⁺ dans la rate et les ganglions lymphatiques. Le groupe de souris WT est composé de 12 individus et les deux groupes de souris TNFR2^{-/-} sont composés de 11 individus. (D)(E)(F) Analyse de l'infiltration des leucocytes (CD45⁺), des lymphocytes T (CD3⁺) et des macrophages (F4/80⁺) dans la peau. Le groupe de souris WT est composé de 5 individus et les deux groupes de souris TNFR2^{-/-} sont composés de 4 individus. Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant un One-Way ANOVA. *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 et ****p<0,0001.

f) Etude de l'inflammation cutanée chez des souris n'exprimant pas le TNFR2 uniquement sur les Treg

Les expériences de transfert de Treg WT dans des souris TNFR2^{-/-} suggèrent que les Treg TNFR2⁺ pourraient jouer un rôle dans le contrôle de l'inflammation cutanée. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons induit le psoriasis chez des souris déficientes pour le TNFR2 mais seulement sur les Treg (FoxP3^{CRE} TNFR2^{LOX}) et chez des souris contrôle (FoxP3^{CRE}). Nous montrons ici que l'absence de ce récepteur sur les Treg n'entraîne pas de modification du développement de l'inflammation en termes de paramètres cliniques (**Figure 27A-D**). Cependant, l'analyse histologique indique que l'absence du TNFR2 sur les Treg est liée à une augmentation significative de l'épaisseur de l'épiderme après application d'Aldara par rapport aux souris contrôles (**Figure 27E-F**).

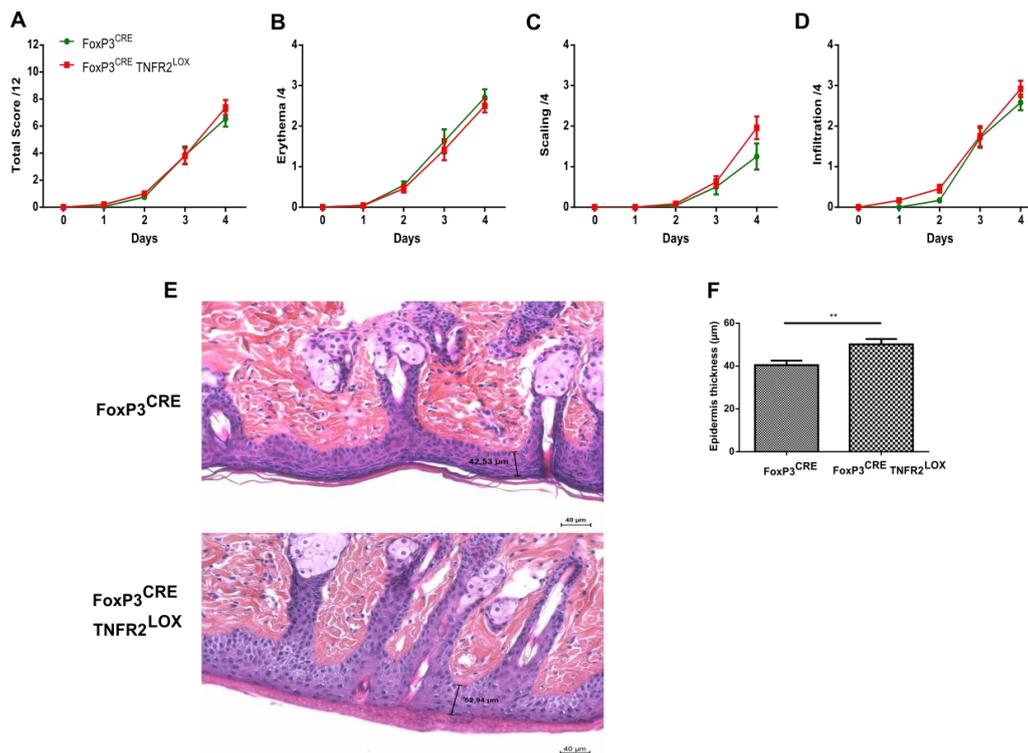


Figure 27 : Etude de l'inflammation cutanée chez des souris n'exprimant pas le TNFR2 uniquement sur les Treg

(A) score cumulé des trois paramètres utilisés pour l'évaluation clinique de la maladie : (B) érythème, (C) squames et (D) infiltration. (E) Coupe histologique de la peau représentative de souris FoxP3^{CRE} et FoxP3^{CRE} TNFR2^{LOX}, au grossissement x400, dans un contexte d'inflammation cutanée. (F) Moyenne des mesures de l'épiderme sur des coupes de peau de souris FoxP3^{CRE} ou FoxP3^{CRE} TNFR2^{LOX}. Chaque groupe est composé de 12 souris. Toutes les souris ont reçu quotidiennement 31,25 mg d'Aldara mélangés à 31,25 mg de Cold Cream pendant 5 jours. L'analyse statistique des scores cliniques a été effectuée en réalisant l'aire sous la courbe de chaque groupe puis elles ont été comparées avec un test t de Student. L'analyse statistique de l'épaisseur de l'épiderme a été effectuée en utilisant un test t de Student. **p<0,01.

Ces analyses cliniques et histologiques montrent un rôle important des Treg TNFR2⁺ dans le contrôle de la prolifération des kératinocytes et de l'épaississement de l'épiderme. Ces cellules protègent partiellement de l'inflammation cutanée dans notre modèle. Ces résultats sont en adéquation avec ceux obtenus lors du transfert de Treg WT chez les souris TNFR2^{-/-}.

g) L'absence de TNFR2 sur les Treg est suffisante pour diminuer leur fréquence ainsi que l'infiltrat leucocytaire cutané

Afin de mieux comprendre l'impact de l'absence du TNFR2 sur les Treg dans le contrôle de l'inflammation cutanée, nous avons effectué des analyses cellulaires chez des souris FoxP3^{CRE} et FoxP3^{CRE} TNFR2^{LOX} après application d'Aldara. Nous montrons que l'absence de TNFR2 à la surface des Treg entraîne une diminution de la fréquence de ces derniers que ce soit dans la rate ou dans les ganglions lymphatiques (**Figure 28A**). Ce phénomène est associé à une diminution de l'expression de FoxP3 par les Treg n'exprimant pas le TNFR2 (**Figure 28B**). Chez les TNFR2^{-/-}, nous avons observés une diminution des Treg exprimant le CD39. Nous montrons chez les souris FoxP3^{CRE} TNFR2^{LOX} une diminution de la fréquence des Treg CD39⁺ dans la rate par rapport aux souris FoxP3^{CRE} (**Figure 28C**). De plus, nous montrons que l'absence de TNFR2 à la surface des Treg augmente l'infiltration leucocytaire dans la peau (**Figure 28D**).

Actuellement, il est connu que les Th17 et les Th1 jouent des rôles prépondérants dans la mise en place et le maintien de l'inflammation dans le psoriasis chez l'homme. Afin de mieux caractériser l'origine de l'exacerbation de l'inflammation chez les souris FoxP3^{CRE} TNFR2^{LOX}, nous avons analysé la capacité des LT CD4⁺ à produire de l'IFN γ et de l'IL-17. Ces données indiquent que les LT CD4⁺ issus de la rate de souris FoxP3^{CRE} TNFR2^{LOX} produise plus d'IL-17 que les LT CD4⁺ de souris FoxP3^{CRE} (**Figure 28E**). En revanche, aucune différence significative n'est observée concernant la production d'IFN γ (**Figure 28F**).

L'ensemble de ces résultats indique que la seule absence du TNFR2 à la surface des Treg suffit à diminuer la fréquence de ces derniers ainsi qu'à diminuer la stabilité de leur expression de FoxP3. De plus, le TNFR2 semble lié à l'expression du CD39 par les Treg puisqu'en son absence, ces derniers sont moins nombreux à exprimer le CD39, les rendant potentiellement moins immunosuppresseurs. Nous montrons aussi que les Treg TNFR2⁺

jouent un rôle très important dans le contrôle de l'inflammation cutanée puis qu'ils participent à l'inhibition de la production d'IL-17 par les LT CD4⁺. Pour terminer, cette sous population de Treg participe au contrôle de l'infiltration leucocytaire dans la peau des souris ayant reçu de l'Aldara.

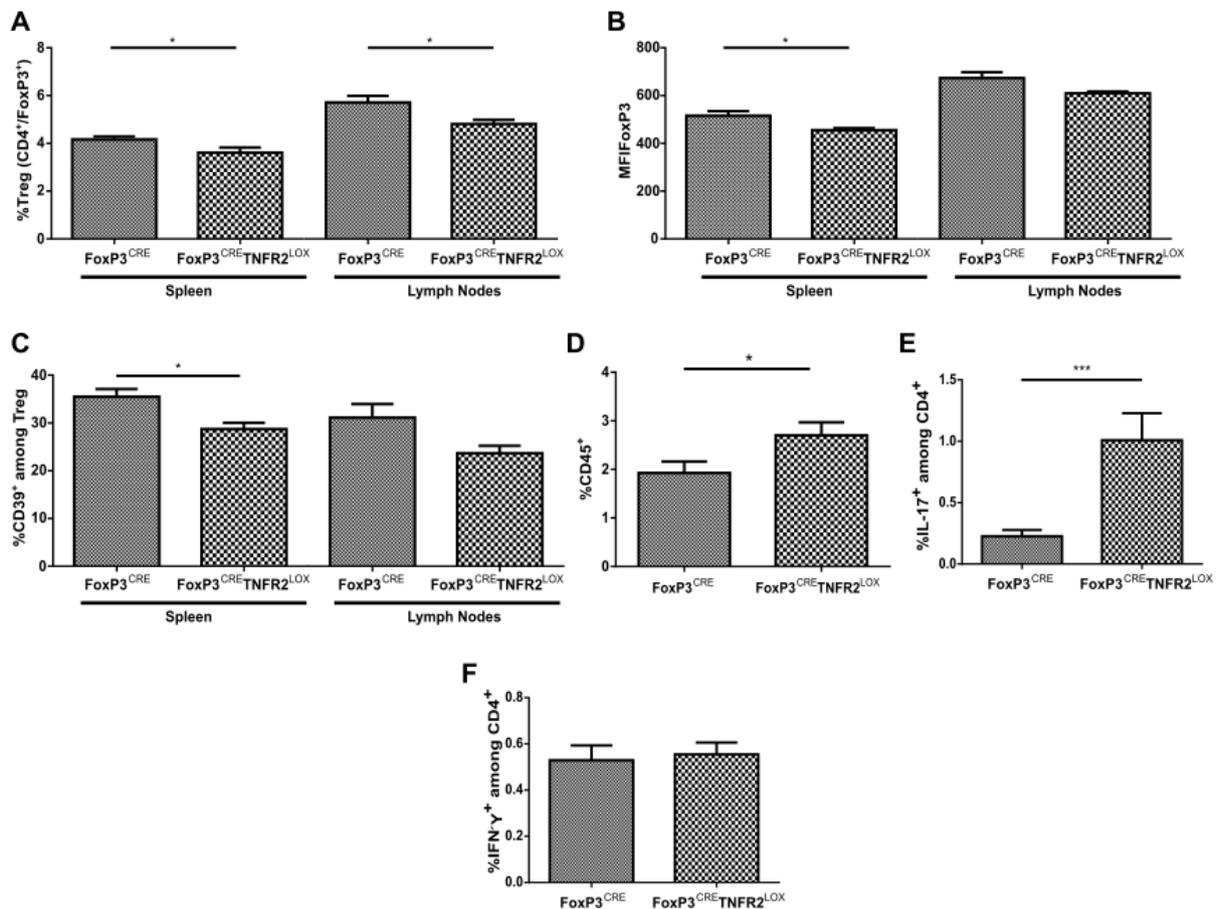


Figure 28 : L'absence de TNFR2 sur les Treg est suffisante pour diminuer leur fréquence ainsi que l'infiltrat leucocytaire cutané

(A) Analyse de la fréquence des Treg dans la rate et les ganglions lymphatiques. (B) Analyse de MFI (Mean Fluorescence Intensity) de FoxP3 sur les Treg dans la rate et les ganglions lymphatiques. (C) Analyse de la fréquence des Treg CD39⁺ dans la rate et les ganglions lymphatiques. (E) Analyse de l'infiltration des leucocytes (CD45⁺) dans la peau. (F)(G) Analyse de l'expression de l'IL-17A et de l'IFN γ par les LT CD4⁺ (CD4⁺) des ganglions lymphatiques. Chaque groupe est composé de 12 souris. Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant un test t de Student. *p<0,05 ; ***p<0,001.

B. Résultats Partie 2 : TNFR2⁺ regulatory T cells (Tregs) are a stable and highly suppressive population and are increased on anti-TNF- α treatment in rheumatoid arthritis (RA).

TNFR2⁺ regulatory T cells (Tregs) are a stable and highly suppressive population and are increased on anti-TNF treatment in rheumatoid arthritis (RA).

François Santinon ^{a,b}, Maxime Batignes ^{a,b}, Florence Busato ^c, Jorg Tost ^c, Benoit Salomon ^d, Marie-Christophe Boissier ^{a,b,c}, Patrice Decker ^{a,b}, Luca Semerano ^{a,b,e} and Natacha Bessis ^{a,b}

^a INSERM, U1125, F-93017, Bobigny, France; ^b Sorbonne Paris Cité Université Paris 13, F-93017, Bobigny, France; ^c Laboratory for Epigenetics and Environment, Centre National de Recherche en Génomique Humaine, CEA-Institut de Biologie François Jacob, Evry, France ; Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, INSERM, Centre National de la Recherche Scientifique, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris), Paris, France; ^e Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Avicenne, Service de Rhumatologie, F-93009, Bobigny, France.

Corresponding author: Natacha Bessis, INSERM U1125, Sorbonne Paris Cité, Université Paris-13, 74 rue Marcel Cachin, 93000, Bobigny, France

Telephone: +33 1 48 38 73 02; Fax +33 1 48 38 88 93

E-mail: natacha.bessis@univ-paris13.fr

Key words: TNF, regulatory T cells, TNF receptors, rheumatoid arthritis

Competing interests: none

Funding: This work was funded by the Société Française de Rhumatologie and Pfizer.

Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease in which regulatory T cells (Treg) fail to control chronic inflammation. While TNF- α plays a major role in rheumatoid inflammation, it can also promote Treg expansion through TNFR2 signaling.

In the present work, we studied the role of TNFR2 on Tregs in control of inflammation. We showed that in vitro, TNF- α enhanced Foxp3 maintenance in cultured Tregs. With two models of TNFR2 inactivation (a TNFR2-blocking antibody and a TNFR2 knock-out mouse) we showed that this effect was mediated by TNF- α -TNFR2 -and not TNFR1- interaction. Moreover, *FoxP3* methylation was higher in Tregs from TNFR2^{-/-} mice than *wt* mice, suggesting that TNFR2 expression confers higher stability to Tregs. Delayed type hypersensitivity arthritis (DTHA), a model of RA, was exacerbated in TNFR2^{-/-} mice, and this was associated with decreased Treg frequencies in spleen. Arthritis was also aggravated in Foxp3^{CRE} x TNFR2^{LOX} mice (in which only Tregs are deficient for TNFR2), showing the importance of TNFR2⁺ Tregs in protection from inflammation. Moreover, Treg suppressive capacities from Foxp3^{CRE} x TNFR2^{LOX} mice were decreased as compared to control Foxp3^{CRE} mice.

Eventually, we monitored the evolution of TNFR2⁺ Tregs from RA patients during anti-TNF- α treatment. We showed an increase in TNFR2-expressing-Treg frequencies at 3 months of treatment vs. the baseline. Conversely, no variation was observed in patients treated with the anti- Il6 R.

To conclude, our study demonstrated TNFR2 signaling on Tregs may play a major role in inflammation control and can be activated both by TNF- α and anti-TNF- α treatment.

Introduction

Tumor necrosis factor (TNF)- α is a potent inflammatory cytokine mainly produced by activated macrophages, lymphocytes, and other cell types (Aggarwal, 2003). It is involved in the initiation, coordination and perpetuation of inflammation and immune response (Kallioliias and Ivashkiv, 2015). TNF- α exerts its effects by binding as a trimer to two cell membrane TNF- α receptors (TNFRs), TNFR1 (p55) and TNFR2 (p75) (Beutler and Cerami, 1986). Its pro-inflammatory role is attested by the over-whelming therapeutic success of anti-TNF- α agents in an increasingly broad spectrum of chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis (RA), spondyloarthritis (SpA), inflammatory bowel diseases and psoriasis (Deng et al., 2016; Sieper et al., 2013; Suenart et al., 2002; Zampeli et al., 2015). However, only a proportion of patients achieve a long-term clinical response, with evidence of primary and secondary treatment inefficacy. Secondary failure of anti-TNF- α biologics are mainly attributed to anti-drug antibodies (Haraoui et al., 2006), but primary resistances raise unanswered questions.

One of the hypothesis is that besides its well-characterized pro-inflammatory role, TNF- α also exerts anti-inflammatory and immunosuppressive effects (Liu et al., 1998). TNF- α administration delays diabetes recurrence in diabetic NOD mice (Rabinovitch et al., 1997), ameliorates lupus in NZW mice (Jacob and McDevitt, 1988) while anti-TNF- α aggravates multiple sclerosis (Kemanetzoglou and Andreadou, 2017).

It is generally considered that most of the pro-inflammatory effects of TNF- α is mediated by TNFR1 (Rickard et al., 2014), while immunosuppressive effect of TNF- α is mediated by TNFR2 (Fischer et al.). Interestingly, the anti-inflammatory effects of TNF- α particularly refer to its abilities to activate and expand TNFR2-expressing regulatory T cells (Tregs) (Biton et al., 2011; Chen et al., 2007, 2013). Tregs are essential in the control of a variety of

immune responses including allergy, autoimmunity, inflammation, and tumors immunity. Tregs play a vital role in tolerance to self and are defective in a number of autoimmune diseases, including RA (Behrens et al., 2007). We and others have shown that anti-TNF- α biologics restore Treg suppressive capacities in experimental models of RA (Biton et al., 2011) and in RA patients (Ehrenstein et al., 2004). In this context, N'Guyen et al has recently shown that, *in vitro*, a monoclonal antibody against TNF- α , but not its soluble receptor etanercept, binds to membrane TNF- α on RA monocytes and promotes Tregs expansion through enhanced TNFR2 signaling (Nguyen and Ehrenstein, 2016). It is however unclear how anti-TNF- α agents act on TNFR2-expressing Tregs *in vivo*, during the course of RA, and how TNF- α acts on Tregs to shape their stability and suppressive functions in inflammatory environments.

In the present study we used a translational approach to dissect the role of TNFR2 signaling on Tregs at multiple levels. First, by studying, *in vitro*, the effect of TNFR2 on Treg survival and *FoxP3* methylation. Second, by studying, *in vivo*, the effect of TNFR2 deletion on Tregs in experimental arthritis. Third, by studying the effect of anti-TNF treatments on TNFR2 Treg subpopulations in RA patients.

Materials and Methods

Patients and healthy donors

Patients meeting the American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism (EULAR) revised criteria for RA and qualifying for biologic treatment were selected. Eligible patients were required to have a 28-joint Disease Activity Score (DAS28) of ≥ 3.2 or evidence of erosive disease at imaging whatever their DAS28 score. A total of 16 patients starting an anti-TNF α agent (7 etanercept, 5 infliximab, 2 golimumab, 1 adalimumab, 1 certolizumab) and 6 starting tocilizumab were recruited. All treatments were

administered according to label dosing recommendation. According to EULAR response criteria patients were considered good responders if their DAS28 fell by more than 1.2 points, moderate responders if the fall was between 0.6 and 1.2 points, and if their DAS28 was, stable, increased or if the fall was <0.6 points.

We also recruited 20 patients fulfilling the ASAS criteria for axial or peripheral spondyloarthritis (5 etanercept, 9 infliximab, 1 adalimumab, 2 certolizumab, 3 golimumab) starting an anti-TNF- α treatment. According to EULAR recommendations patients received anti-TNF- α treatment if they had a BASDAI <40 or if they needed daily treatment with NSAIDs independently of the BASDAI score. Patients were considered responders if their BASDAI score fell below 40/100.

All patients underwent two blood sample collection: one before the first biologic administration, the second after three months of treatment, at the moment when clinical response was evaluated. The study was approved by the local ethics committee (approval no. NI-2016-11-01), and informed consent was obtained from all patients prior to study entry.

EDTA-blood from random, healthy subjects (blood bank of Bobigny, France) was also used for *in vitro* culture experiments.

Mice

TNFR2^{-/-} and TNFR1^{-/-} mice were generated from double-deficient TNFR1/TNFR2 mice generated and kindly given by Dr Muazzam Jacobs (Keeton et al., 2014). These C57BL/6 double deficient mice were crossed with wild-type C57BL/6 mice (Le Genest-Saint-Isle, France) to produce homozygous TNFR1^{-/-} and TNFR2^{-/-} mice. The genotypes of the different mouse strains were confirmed by PCR on tail biopsies using the primer sequences listed in table 1. Single deficient mice were incrossed, bred and housed in our animal facility.

FoxP3^{CRE} and FoxP3^{CRE} x TNFR2^{LOX} mice were generated and kindly provided by Benoit Salomon (Université Pierre et Marie Curie). The phenotype of these mice was confirmed by flow cytometry using APC-Cy7-labeled anti-CD4 (clone RM4-5; BD Bioscience), PE-labeled anti-TNFR2 (clone TR75-89; BD Bioscience) and eFluor450-labeled anti-FoxP3 (clone FJK.16s; eBioscience) on leucocytes from blood samples.

In some experiments, we used mice aged 6–12 weeks belonging to the C57BL/6 strain and purchased from Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France). All procedures were approved by the Animal Care Use Committee of the Paris 13 University (Bobigny, France) and the ethical committee Charles Darwin.

Gene	Orientation	Primer (5'-3')	Size amplicon
TNFR1 WT	Forward	TGTGGAAAGGGCACCTTTACGGC	470bp
	Reverse	GGCTGCAGTCCACGCACTGG	
TNFR1 ^{-/-}	Forward	TGTGGAAAGGGCACCTTTACGGC	300bp
	Reverse	ATTCGCCAATGACAAGACGCTGG	
TNFR2 WT	Forward	AGCTCCAGGCACAAGGGCGGG	200bp
	Reverse	CCTCTCATGCTGTCCCGGAAT	
TNFR2 ^{-/-}	Forward	GCCCTGAATGAACTGCAGGACG	500bp
	Reverse	CACGGGTAGCCAACGCTATGTC	

Table 1: Primer sequences used to genotype TNFR1^{-/-} TNFR2^{-/-} mice

Induction and assessment of delayed-type hypersensitivity arthritis

On day (d) -7, 10 weeks old C57BL/6 mice were injected intradermally at the base of the tail with methylated bovine serum albumin (mBSA) emulsified in CFA (Difco, Detroit, MI). Four days later (d-3), the mice received 200µg anti-mouse type II collagen antibody (anti-CII) cocktail (Chondrex, Redmond, WA) containing the clones A2-10 (IgG2a), F10-21 (IgG2a), D8-6 (IgG2a), D1-2G (IgG2b) and D2-112 (IgG2b) intravenously in 100 µl phosphate-buffered saline (PBS). On d0, the mice were challenged with 200 µg mBSA

subcutaneously in 20 μ l PBS in the left foot pad. The right foot pad received 20 μ l PBS only and was used as control. Baseline paw and ankle thickness were measured on the left paw on day 0 just prior to mBSA challenge. Paw and ankle swelling was measured using an electronic caliper (Miltutoyo) and was calculated as the difference between the measure of the left paw or ankle thickness minus baseline measurement.

Cell and tissue preparation

Mice

Spleen leukocytes were prepared using a homogenizer, and red blood cells (RBC) were lysed in hemolysis buffer (NH₄CL, KHCO₃, and EDTA). Afferent popliteal and axillary lymph nodes were dissected out of the limbs, and node leukocytes were prepared using a homogenizer. Blood was collected by heart puncture, and for cell analysis, RBCs were lysed in hemolysis buffer.

Patients. Blood samples from RA and SpA patients were collected as previously described. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were freshly isolated by dextran sedimentation (Axis Shield).

Flow cytometry

Mice. The cell surfaces were stained with: PE-labeled anti-CD25 (clone 7D4; Miltenyi), APC-Cy7-labeled anti-CD4 (clone RM4-5; BD Bioscience) and PE-Cy7-labeled anti-CD39 (clone Duha59; BioLegend).

Cells were stained at 4°C in PBS containing 5% heat-inactivated FCS, 0.02 M sodium azide and 100 μ g/mL human immunoglobulin (Calbiochem), and incubated for 30 min with appropriate dilutions of various mAbs or corresponding isotype control coupled to PE, APC-Cy7 and PE-Cy7.

For intranuclear FoxP3 staining, cells were fixed and permeabilized with eBioscience FoxP3 Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience). The staining were performed with eFluor450-labeled anti-FoxP3 (clone FJK.16s; eBioscience) or corresponding isotype control coupled to eFluor450 and incubated for 30 min at 4°C in permeabilization buffer with appropriate dilution.

For intracellular cytokine staining, cells were stimulated for 5 h with PMA and ionomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and Brefeldin A (BD Pharmingen, San Diego, CA). For surface staining, cells were incubated with PerCP.Cy5.5-labeled anti-CD4 (clone RM4-5; BioLegend) for 30 min at 4°C in the dark, then washed. The cells were then permeabilized using Fixation/Permeabilization solution and stained with APC-labeled anti-IFN γ (clone XMG1.2; BD Bioscience) and PE-labeled anti-IL-17A (clone TC11-18H10; BD Bioscience) for 30 min at 4°C in the dark.

Patients and healthy donors For assessment of Tregs from RA or SpA patients and from healthy donors, we used antibodies to surface markers: APC-Cy7-labeled anti-CD3 (clone GK1.5; BD Bioscience), BV510-labeled anti-CD4 (clone RPA.T4; BioLegend), BV421-labeled anti-CD39 (clone A1; BioLegend), PerCP-Cy5.5-labeled anti-CD25 (clone M-A251; BioLegend), APC-labeled anti-TNFR2 (clone 3G7A02; BioLegend) and PE-Cy7-labeled anti-CD127 (clone A019D5; BioLegend).

For intranuclear FoxP3 staining, cells were fixed and permeabilized with FoxP3 Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience). The staining were performed with PE-labeled anti-FoxP3 (clone PCH 101; eBioscience) or corresponding isotype control coupled to PE and incubated for 30 min at 4°C in dark with appropriate dilution.

All flow cytometry experiments were performed on a BD FACS CANTO II cell analyzer (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Dead cells were excluded based on forward and

side scatter characteristics. Reported statistical data are based on at least 1000 events gated on the population of interest. Results were analyzed using FACS Diva software (BD Biosciences).

Lymphocyte purification

CD4⁺CD25⁻ and CD4⁺CD25⁺ T cells from the mice spleen were purified using the Regulatory T Cell Isolation Kit according to the manufacturer's protocol (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) as previously described (Biton et al., 2016). To increase purity, two consecutive column runs were performed. Flow cytometry analysis showed that purity of the CD4⁺CD25⁻ and CD4⁺CD25⁺ cell-enriched fractions was 90–95% (data not shown).

CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T cells from healthy donors PBMC were purified using the Regulatory T Cell Isolation Kit II human according to the manufacturer's protocol (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Flow cytometry analysis showed that purity of the CD4⁺CD25⁺CD127⁻ cell-enriched fractions was 90–95% (data not shown).

***In vitro* experiments**

Tregs were purified from indicated strain of mice and seeded (5×10^4) in RPMI 1640 with 10% FCS, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 50 mM 2-ME, 1 M HEPES, 5 mg/ml soluble anti-CD3 (clone 2C11; BD Biosciences) and 2 mg/ml anti-CD28 (clone 37.51; BD Bioscience), in U-bottom 96-well plates. Cells were incubated for 72 h or 96h with or without rmTNF- α (R&D Systems) or rmIL-2 (Miltenyi) at indicated concentrations at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. In some experiments, antagonist anti-TNFR1 (clone 55R-170; BioLegend) and anti-TNFR2 (clone TR.75.35-4; BioLegend) antibodies and isotype controls (clone RTK.2071; BioLegend) were added at indicated concentrations. Human Tregs were cultured using the same conditions with rhTNF- α (Immunotools) and an antagonist anti-TNFR2 antibody (clone 367A02; BioLegend) and its isotype control (clone RTK2758; BioLegend).

Measurement of Treg proliferation and viability

CD4⁺CD25⁺ (Tregs) were purified as described above from spleen of mice. Tregs were pre-labeled with 5mM CFSE (Invitrogen, Carlsbad, CA) for 10 min à 37°C. CFSE-labeled Treg (5x10⁴) were cultured in U bottom 96-well plates in RPMI 1640 with 10% FCS, 100 U/ml penicillin, 100mg/ml streptomycin, 50 mM 2-Me, 1 M HEPES, 5mg/ml anti-CD3 (clone 2C11; BD Biosciences) and 2 mg/ml ant-CD28 (clone 37.51; BD Bioscience). Cells were incubated with or without 20 ng/ml rmTNF α (Miltenyi). After 4 days, Tregs were stained as described above. Treg proliferation was then determined using flow cytometry to measure the CFSE dilution. Data were analyzed using FACS Diva software (BD Biosciences).

CD4⁺CD25⁺ (Treg) were purified as described above from spleen of mice. Treg (5x10⁴) were cultured in U bottom 96-well plates in RPMI 1640 with 10% FCS, 100 U/ml penicillin, 100mg/ml streptomycin, 50 mM 2-Me, 1 M HEPES, 5mg/ml anti-CD3 (clone 2C11; BD Biosciences) and 2 mg/ml anti-CD28 (clone 37.51; BD Bioscience). Cells were incubated with or without 20 ng/ml rmTNF- α (Miltenyi) for 72h. Viability measurement was performed with Zombie Green (BioLegend) before surface staining. Cells has been incubated with Zombie Green in PBS 1X for 20 min at room temperature in dark. Cells have been washed twice with surface staining buffer as describe above. Treg were stained as described above.

Assessment of Treg suppressive effect on CD4⁺CD25⁺ Teff cells

CD4⁺CD25⁻ (Teff) and CD4⁺CD25⁺ (Tregs) T cells were purified as described above from the spleen of mice with DTHA at euthanasia. Teff were pre-labeled with 5 mM CFSE (Invitrogen, Carlsbad, CA) for 10 min at 37°C. CFSE-labeled Tconv (1 x 10⁵) were cocultured in flat bottom 96-well plates with Tregs (1 x 10⁵) (ratio 1:1) in RPMI 1640 with 10% FCS, 100 U/ml

penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 50 mM 2-ME, 1 M HEPES, and 5 mg/ml soluble anti-CD3 (clone 2C11; BD Biosciences) In all co-cultures, Teff and Tregs were purified from the same mouse. Controls were performed using non-CFSE labeled Teff cells ($CD4^+CD25^-$ (1×10^5)) instead of Tregs. APCs (1×10^5) (splenocytes of naive C57BL/6 mice) (1×10^5), previously treated with mitomycin (50 mg/ml) for 45 min at 37°C, were added to the culture medium. The cells were then incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. After 3 days of culture, the cells were stained with APC-labeled anti-CD4 (clone RM4-5; BioLegend), and Teff proliferation was then determined using flow cytometry to measure the CFSE dilution. Data were analyzed using FACS Diva software (BD Biosciences).

IFN- γ levels in culture supernatants were measured using commercially available ELISA kits (Quantikine; R&D Systems, Abingdon, U.K.), according to the manufacturer's instructions. The sensitivity of the cytokine assays was 2 pg/ml.

DNA Methylation analysis by pyrosequencing

Genomic DNA was extracted from purified $CD4^+CD25^+$ Tregs or $CD4^+CD25^-$ Teff using the All Prep DNA/RNA mini Kit (Qiagen). Quantitative DNA methylation analysis was performed by pyrosequencing of bisulfite treated DNA (Tost 2007 Nat Protoc 2: 2265-75). 650 ng to one μ g of DNA were bisulfite converted using the EpiTect 96 Fast Bisulfite kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The *Foxp3* TSDR was amplified using 30 ng of bisulfite treated mouse genomic DNA and 5 pmol of forward and reverse primer, one of them being biotinylated. Sequences for oligonucleotides for PCR amplification and pyrosequencing are shown in Table 2. Reaction conditions were 1x HotStar Taq buffer supplemented with 1.6 mM MgCl₂, 400 μ M dNTPs and 1.8 U HotStar Taq polymerase (Qiagen) in a 25 μ l volume. The PCR program consisted of a denaturing step of 15 min at 95°C followed by 50 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 61°C and 15 s at 72°C, with a

final extension of 5 min at 72°C. 10 to 15 µl of PCR product were rendered single-stranded as previously described (Tost and Gut, 2007) and 4 pmol of the respective sequencing primer were used for analysis. Quantitative DNA methylation analysis was carried out on a PyroMark Q24 Advanced with the PyroMark Q24 Advanced CpG Reagent Kit (Qiagen) and results were analyzed using the PyroMark Q24 Advanced Software (Version 3.0.0).

Gene	Size	PCR primer forward	PCR primer reverse	Pyrosequencing primers	CpGs
Foxp3 (NM_054039.2) chrX:7583912-7584196	285	GGTTTTGTTGTTATAATTTG AATTTG	Biotin- CAACCTTAAACCCCTCTAA CATC	TGTTGTTATAATTTGA ATTT	2,3,4
				GGGGTAGATAATTTAT TTTA	5,6,7
				GGTGATGTGGGTGTTA G	8,9,10

Table 2: Oligonucleotide sequences for PCR amplification and pyrosequencing

Statistical analysis

Data distribution was preliminary checked for normality with the Kolmogorov–Smirnov test. For *in vitro* and *in vivo* experiments, according to data distribution and number of groups, a parametric [analysis of variance (ANOVA), *t*-test] or non-parametric (Kruskal–Wallis, Mann–Whitney) test was performed. *Post-hoc* comparisons were performed with the appropriate test according to data distribution (Dunn test for parametric data, corrected Mann–Whitney test for non-parametric data). For some culture cell experiments, a two-way ANOVA was used. For the study of patient parameters (disease activity scores, Treg frequencies) before and after biologic treatment, paired T-test (Wilcoxon) was used. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. Data are shown as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using Graphpad prism 6.0.

Results

TNF- α induces maintenance of *FoxP3* expression and Treg proliferation *in vitro* through TNFR2, but not TNFR1, signaling.

Reduced Treg frequencies are observed in mice deficient in TNFR2 (Chen Oppenheim 2013), suggesting that TNF- α -TNFR2 signaling may stabilize *FoxP3* expression by Tregs. We showed that Treg frequency was decreased in the spleen of TNFR2^{-/-} mice (figure 1A), that CD39⁺ Treg proportions were lower as compared to wild-type littermates (*wt*)(figure 1B).

To assess the direct effect of TNF- α on *FoxP3* stabilization, we evaluated the effect of exogenous TNF- α on purified Tregs stimulated with soluble anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. Solely TCR and co-stimulation signals were not sufficient to maintain *FoxP3* expression after 72h culture. In contrast, the addition of TNF- α partly restored *FoxP3* expression with a dose response effect (figure 2A). We then checked that TNF- α effect on Tregs was mediated through TNFR2, and not TNFR1, by using anti-TNFR1 or anti-TNFR2 neutralizing antibodies (Abs). The increase in TNF- α -induced *FoxP3* expression was abolished by anti-TNFR2 but not by anti-TNFR1 Abs (figure 2B). Similarly, *FoxP3* expression was comparable in anti-CD3 + anti-CD28 stimulated Tregs from *wt* mice, TNFR2^{-/-} mice and TNFR1^{-/-} TNFR2^{+/-} mice, but the addition TNF- α sustained *FoxP3* expression only in *wt* and TNFR1^{-/-} TNFR2^{+/-} mice (figure 2C).

To find out if TNF- α only prevented from the loss of *FoxP3* expression or if it also induced Treg proliferation, we performed a CFSE labeling assay on Tregs from FoxP3^{CRE} or FoxP3^{CRE} TNFR2^{LOX} mice stimulated with TNF- α for 96h. IL-2, used as a positive control, induced the proliferation of 94.5% of Tregs (figure 2D). TNF- α had comparable effect since it induced the proliferation of 83.4% of Tregs. TNF- α -induced Treg proliferation was mediated through TNFR2, since no increase in CFSE^{dim} Treg cells expression was observed on Tregs

from FOXP3^{CRE} TNFR2^{LOX} mice (figure 2D). TNF- α also prevented Tregs from death, as it reduced a decreased dead–zombie cell frequency (figure 2E).

In addition, TNF- α modified CD25 expression by Tregs as it induced almost a doubling of CD25⁺ Treg proportion (figure 2F) (Miyara et al., 2009). Again, this effect was mediated through TNFR2 since it only occurred in Tregs from *wt* and TNFR1^{-/-} mice (figure 2G) and not in TNFR2^{-/-} mice (figure 2H).

Eventually, TNF- α also sustained *FoxP3* expression in human Tregs, through a TNFR2 dependent pathway (figure 2I).

TNFR2 expression allows TSDR demethylation, increasing *FoxP3* stability

Tregs with stable suppressive functions are characterized by an unmethylated *FoxP3* TSDR and stable expression of *FoxP3* (Polansky et al., 2008). Since, as shown above, TNFR2 expression influences *FoxP3* maintenance and Treg proliferative capacities, we investigated the effect of TNFR2 deletion on methylation of the TSDR site. As a control, figure 3A shows that *FoxP3* demethylation was 94.7% in isolated CD4⁺ CD25⁻ Teff cells versus 36.7% in isolated CD4⁺ CD25⁺ Tregs cells. We thus compared the methylation state of the *FoxP3* TSDR of freshly isolated CD4⁺ CD25⁺ Tregs from *wt* and TNFR2^{-/-} mice and in various culture conditions. Figure 3A shows that the percentage of methylation in the *FoxP3* TSDR is higher in *ex vivo* Tregs from TNFR2^{-/-} mice compared to *wt* mice. This difference was even more pronounced on cultured cells, especially on unstimulated Tregs (average methylation of all tested CpG 41.3 % in *wt* Tregs vs 65.2 % in TNFR2^{-/-} Tregs, figure 3B). Thus, TNFR2 deficiency confers higher *FoxP3* TSDR methylation.

TNFR2 deficiency results in aggravated experimental arthritis

To assess the role of TNFR2 in the development of arthritis, the effect of TNFR2 deficiency on the development of DTHA was examined. All mice of both *wt* and TNFR2^{-/-} genotype developed arthritis as soon as day 1 after mBSA boost in the foot pad, which is usual in the DTHA model (Atkinson et al., 2012). However, arthritis was aggravated in TNFR2^{-/-} mice, since both ankle and tarsus thicknesses were significantly increased compared to their control *wt* littermates (figure 4A-D). To evaluate the impact of TNFR2 full deficiency (in all cells) on Tregs in mice with arthritis, we examined the frequency and the suppressive capacity of these cells in both groups. Figure 4E shows that, as in naïve mice, Treg frequency is decreased in the spleen of TNFR2^{-/-} mice. However, Treg suppressive function, evaluated as their capacity to inhibit Teff proliferation (figure 4F) and IFN γ production (data not shown), was not altered by TNFR2 full deficiency.

Specific ablation of Treg TNFR2 results in arthritis exacerbation

To evaluate the involvement of Tregs in the exacerbation of DTHA observed in TNFR2^{-/-} animals, we evaluated arthritis progression in mice that have the TNFR2 specifically deleted from Tregs. There was 100% incidence of arthritis in the immunized paw, in both groups. We found that FOXP3^{CRE} TNFR2^{LOX} mice developed a more severe disease compared to their littermate controls expressing TNFR2 (FOXP3^{CRE}), when comparing ankle and tarsus swelling (Figure 5A-B). To evaluate the impact of TNFR2 lack only on Tregs in mice with arthritis, we evaluated Treg frequency in spleen. We show in figure 5C, absence of TNFR2 only on Tregs is sufficient to decrease Treg frequency compared to FoxP3^{CRE} mice. We finally determined *ex vivo* the ability of Tregs to suppress Teff proliferation. In contrast with Tregs from TNFR2^{-/-} mice, the capacity of Tregs to inhibit Teff proliferation was more than two

times higher in control FOXP3^{CRE} than in FOXP3^{CRE} TNFR2^{LOX} mice (figure 5D). Moreover, Tregs from FOXP3^{CRE} TNFR2^{LOX} mice had lower ability to suppress IFN- γ secretion by TefFs than Tregs from control mice (Fig. 5E).

TNFR2-expressing Tregs frequency increases in RA, but not SpA, patients only during anti-TNF α treatment.

In anti-TNF- α -treated RA patients there was a significant increase of peripheral blood Tregs, and, more specifically of the TNFR2-positive subpopulation, after 3 months of treatment vs. the baseline (fig 6A). Of the 16 treated patients, two were classified as nonresponders, one had stable low disease activity, 8 were good responders 5 were moderate responders (fig 6C). There was no clear association, in individual patients, between clinical response and Treg frequency modification, nevertheless the number of true nonresponders was probably too low to detect a difference.

As opposed to RA, in SpA patients anti-TNF- α treatment was not associated with significant modification of Treg or TNFR2 Treg subpopulation (Fig 6, D and E). The clinical response was variable (Fig 6F), and did not correlate with Treg frequency.

In tocilizumab-treated RA patients there was a significant increase in Treg frequencies at 3 months of treatment (Figure 7A). Importantly, TNFR2 Tregs were not affected by tocilizumab treatment (Figure 7B), suggesting that the rise of this Treg subpopulation in RA may be specific of TNF inhibitors.

Discussion

Our study shows a crucial role of TNFR2 on Treg biology. Its expression is not only related to an increased stability and a strengthened immunosuppressive activity of those cells in

experimental arthritis, but it is also linked to the therapeutic response to anti-TNF- α biologics, including etanercept, in RA patients.

By showing that TNF- α prevented from loss of *FoxP3* expression and induced Treg proliferation through TNFR2 *in vitro*, our results confirm previous studies both in mouse and humans (Chen et al., 2007, 2013). Moreover we showed that TNF- α -TNFR2 signaling was associated to an enhanced expression of CD25 by Tregs in mice. Interestingly, Tregs expressing both CD25 and TNFR2 were found to be the most suppressive sub-population regarding these markers expression in mice (Chen et al., 2008) and human (Chen et al., 2010).

It is not clearly understood how TNFR2 signaling mediates *FoxP3* expression. The most likely hypothesis is that TNF- α , through TNFR2 and in concert with IL-2, up-regulates CD25 expression on Tregs, and consequently increases the phospho-STAT5 level. Yet, STAT5 is required for optimal induction of *Foxp3* and binds directly to the *Foxp3* gene (Laurence et al., 2007). Furthermore, STAT5/STAT3 balance controls the fate of CD4⁺ T cells. A predominance of STAT5 lead to Treg and in contrast high level of STAT3 triggers Th17 differentiation (Laurence et al., 2007). We can hypothesize that increase of CD25 and phospho-STAT5 through TNFR2 signaling up--regulates Treg proliferation in presence of IL-2 and decreases Th17 differentiation to facilitate the control of TNF- α mediated inflammation.

Treg stability is regulated by numerous microenvironment inputs, including transcriptional and epigenetic programs and posttranslational modifications (Lu et al., 2017). In our study, we show for the first time that TNFR2 expression is related to TSDR hypomethylation, and consequently increased Treg stability. Yet, phosphorylated STAT5 binds to demethylated CNS2, containing the TSDR (Rainbow et al., 2015), and may thus stabilizes *FoxP3* expression and Treg efficiency (Alvarez Salazar et al., 2017). So it may be assumed that

TNFR2 expression induces TSDR hypomethylation, which, through a STAT5 phosphorylation dependent mechanism, leads to high suppressive capacities of TNFR2⁺ Treg subpopulation.

Our results show an exacerbation of arthritis in TNFR2 deficient mice, which suggests that TNFR2 signaling pathways are protective in inflammation. The anti-inflammatory role of TNF- α signaling through TNFR2 was also demonstrated in other disorders such as experimental allergic encephalomyelitis (Madsen et al., 2016; Tsakiri et al., 2012), TNF-induced arthritis (Blüml et al., 2010), allergic airway inflammation (Li et al., 2017) and in by *Mycobacterium tuberculosis* infection (Schmid et al., 2017). However, TNFR2 signaling can also mediate pro-inflammatory signals as shown in a model of colitis (Holtmann et al., 2002), in CNS-induced inflammation (Akassoglou et al., 2003), in experimental cerebral malaria (Stoelcker et al., 2002), in idiopathic pneumonia syndrome (Hildebrandt et al., 2008), in smoke-induced pulmonary inflammation (D'hulst et al., 2006) or in experimental glomerulonephritis (Pfeifer et al., 2012). This apparent discrepancy raises the question of what TNFR2-expressing cell type responds to TNF- α . By using mice conditionally deleted for TNFR2 expression in Tregs, we have shown that TNFR2 signaling in those cells was associated to protection in experimental arthritis. This is a direct evidence for the anti-inflammatory effect of TNF- α through TNFR2 on Tregs. This was illustrated in other experimental models such as GVHD, since a blocking antibody against TNFR2 abolishes control of the disease by Tregs (Leclerc et al., 2016), while a TNFR2 agonist protects from GVHD by promoting Treg expansion (Chopra et al., 2016). TNFR2 expression by other immunomodulatory cells such as myeloid-derived suppressor cells (MDSC) could also be associated to protection against inflammation since TNFR2-deficient MDSC are less suppressive (Hu et al., 2014; Zhao et al., 2012). There is thus a delicate balance between the pro and anti-inflammatory effect of TNFR2 signaling, depending on the cell type involved. If

TNF- α effect via TNFR2 can expand Tregs and confers higher suppressive effect to MDSC, the same does not apply to all cells. Non-myeloid cells expressing TNFR2 such as endothelial cells can mediate an inflammatory signal upon TNF- α stimulation (Stoelcker et al., 2002). Moreover, it was very recently shown that TNFR2 expression by pathogenic Teff cells was important for their proliferative expansion in experimental colitis (Chen et al., 2016)).

In RA patients (Ehrenstein et al., 2004; Nadkarni et al., 2007) and in experimental arthritis (Biton et al., 2011), anti-TNF- α mAbs restore Treg functions, and TNF- α boosts Treg expansion and function. This makes wonder how comes that both TNF- α and anti-TNF- α can boost Treg cell activity. Since TNFR2 is involved in TNF- α mediated Treg expansion, we wondered in our present work if TNFR2⁺ Treg cells were associated to the therapeutic response to anti-TNF- α biologics in RA patients. Our results show an increased frequency of TNFR2⁺ Tregs during anti-TNF- α treatments in RA patients. Moreover, this effect seems to be treatment-specific, as tocilizumab treatment did not affect this cell population. Moreover, the influence of anti-TNF- α treatments on Tregs may be at least partially disease-specific, since anti-TNF- α treatments had no effect on Tregs nor on TNFR2⁺ subpopulations in SpA. In a recent paper, N'Guyen et al have shown that, *in vitro*, an anti-TNF- α mAbs, but not etanercept, can bind to membrane TNF- α on RA monocytes and promotes Treg expansion through enhanced TNFR2 signaling (Nguyen and Ehrenstein, 2016). This was considered the mechanistic explanation for the finding, from the same group, that only adalimumab, and not etanercept treatment, was associated with an expansion of Tregs.

In the present study, we found that all anti-TNF- α agents, including etanercept, induced an expansion of Tregs expressing TNFR2, compared to baseline. This discrepancy with other works may be due to the fact that the design of our study used each patient as its own control. Hence, Treg frequencies were compared *within each patient* before and after treatment. This is of critical importance if one considers that the distribution of Treg frequencies in the

peripheral have a wide range of distribution. This kind of design seems then then the most appropriate, and may have led us to identify differences that may not be detected when comparing the patients before and after treatment as a pool. This results also suggests that other mechanisms than mTNF upregulation on monocytes may be involved in the anti-TNF- α mediated Treg expansion. Actually, anti-TNF- α mAbs and etanercept may both protect from RA and induce Treg expansion through different mechanisms.

TNFR2 being critical in promoting Treg activity and in preventing inflammation, TNFR2 signaling may be an interesting potential therapeutic target in RA and other TNF- α -dependent pathologies. However, given the complexity of TNFR2 signaling on other cell types, such as Teffs or ECs, further studies to dissect TNFR2-dependent pathways on cells involved in the resolution of inflammation are warranted.

References

- Aggarwal, B.B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 745–756.
- Akassoglou, K., Douni, E., Bauer, J., Lassmann, H., Kollias, G., and Probert, L. (2003). Exclusive tumor necrosis factor (TNF) signaling by the p75TNF receptor triggers inflammatory ischemia in the CNS of transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 709–714.
- Alvarez Salazar, E.K., Cortés-Hernández, A., Alemán-Muench, G.R., Alberú, J., Rodríguez-Aguilera, J.R., Recillas-Targa, F., Chagoya de Sánchez, V., Cuevas, E., Mancilla-Urrea, E., Pérez García, M., et al. (2017). Methylation of FOXP3 TSDR Underlies the Impaired Suppressive Function of Tregs from Long-term Belatacept-Treated Kidney Transplant Patients. *Front. Immunol.* *8*.
- Atkinson, S.M., Usher, P.A., Kvist, P.H., Markholst, H., Haase, C., and Nansen, A. (2012). Establishment and characterization of a sustained delayed-type hypersensitivity model with arthritic manifestations in C57BL/6J mice. *Arthritis Res. Ther.* *14*, R134.
- Behrens, F., Himsel, A., Rehart, S., Stanczyk, J., Beutel, B., Zimmermann, S.Y., Koehl, U., Möller, B., Gay, S., Kaltwasser, J.P., et al. (2007). Imbalance in distribution of functional autologous regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *66*, 1151–1156.
- Beutler, B., and Cerami, A. (1986). Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* *320*, 584.
- Biton, J., Semerano, L., Delavallée, L., Lemeiter, D., Laborie, M., Grouard-Vogel, G., Boissier, M.-C., and Bessis, N. (2011). Interplay between TNF and Regulatory T Cells in a TNF-Driven Murine Model of Arthritis. *J. Immunol.* *186*, 3899–3910.
- Biton, J., Khaleghparast Athari, S., Thiolat, A., Santinon, F., Lemeiter, D., Hervé, R., Delavallée, L., Levescot, A., Roga, S., Decker, P., et al. (2016). In Vivo Expansion of Activated Foxp3+ Regulatory T Cells and Establishment of a Type 2 Immune Response upon IL-33 Treatment Protect against Experimental Arthritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *197*, 1708–1719.
- Blüml, S., Binder, N.B., Niederreiter, B., Polzer, K., Hayer, S., Tauber, S., Schett, G., Scheinecker, C., Kollias, G., Selzer, E., et al. (2010). Antiinflammatory effects of tumor necrosis factor on hematopoietic cells in a murine model of erosive arthritis. *Arthritis Rheum.* *62*, 1608–1619.
- Chen, X., Baumel, M., Mannel, D.N., Howard, O.M.Z., and Oppenheim, J.J. (2007). Interaction of TNF with TNF Receptor Type 2 Promotes Expansion and Function of Mouse CD4+CD25+ T Regulatory Cells. *J. Immunol.* *179*, 154–161.
- Chen, X., Subleski, J.J., Kopf, H., Howard, O.M.Z., Mannel, D.N., and Oppenheim, J.J. (2008). Cutting Edge: Expression of TNFR2 Defines a Maximally Suppressive Subset of Mouse CD4+CD25+FoxP3+ T Regulatory Cells: Applicability to Tumor-Infiltrating T Regulatory Cells. *J. Immunol.* *180*, 6467–6471.

- Chen, X., Subleski, J.J., Hamano, R., Howard, O.M.Z., Wiltrout, R.H., and Oppenheim, J.J. (2010). Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4⁺ FOXP3⁺ regulatory T cells in human peripheral blood: Immunomodulation. *Eur. J. Immunol.* *40*, 1099–1106.
- Chen, X., Wu, X., Zhou, Q., Howard, O.M.Z., Netea, M.G., and Oppenheim, J.J. (2013). TNFR2 Is Critical for the Stabilization of the CD4⁺Foxp3⁺ Regulatory T Cell Phenotype in the Inflammatory Environment. *J. Immunol.* *190*, 1076–1084.
- Chen, X., Nie, Y., Xiao, H., Bian, Z., Scarzello, A.J., Song, N.-Y., Trivett, A.L., Yang, D., and Oppenheim, J.J. (2016). TNFR2 expression by CD4 effector T cells is required to induce full-fledged experimental colitis. *Sci. Rep.* *6*.
- Chopra, M., Biehl, M., Steinfatt, T., Brandl, A., Kums, J., Amich, J., Vaeth, M., Kuen, J., Holtappels, R., Podlech, J., et al. (2016). Exogenous TNFR2 activation protects from acute GvHD via host T reg cell expansion. *J. Exp. Med.* *jem.20151563*.
- Deng, Y., Chang, C., and Lu, Q. (2016). The Inflammatory Response in Psoriasis: a Comprehensive Review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* *50*, 377–389.
- D’hulst, A.I., Bracke, K.R., Maes, T., De Bleecker, J.L., Pauwels, R.A., Joos, G.F., and Brusselle, G.G. (2006). Role of tumour necrosis factor-alpha receptor p75 in cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and emphysema. *Eur. Respir. J.* *28*, 102–112.
- Ehrenstein, M.R., Evans, J.G., Singh, A., Moore, S., Warnes, G., Isenberg, D.A., and Mauri, C. (2004). Compromised Function of Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis and Reversal by Anti-TNF α Therapy. *J. Exp. Med.* *200*, 277–285.
- Fischer, R., Proske, M., Duffey, M., Stangl, H., Martinez, G.F., Peters, N., Kraske, A., Straub, R.H., Bethea, J.R., Kontermann, R.E., et al. Selective activation of tumor necrosis factor receptor 2 induces anti-inflammatory responses and alleviates experimental arthritis. *Arthritis Rheumatol.* n/a-n/a.
- Haraoui, B., Cameron, L., Ouellet, M., and White, B. (2006). Anti-infliximab antibodies in patients with rheumatoid arthritis who require higher doses of infliximab to achieve or maintain a clinical response. *J. Rheumatol.* *33*, 31–36.
- Hildebrandt, G.C., Olkiewicz, K.M., Corrion, L., Clouthier, S.G., Pierce, E.M., Liu, C., and Cooke, K.R. (2008). A role for TNF receptor type II in leukocyte infiltration into the lung during experimental idiopathic pneumonia syndrome. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* *14*, 385–396.
- Holtmann, M.H., Douni, E., Schütz, M., Zeller, G., Mudter, J., Lehr, H.-A., Gerspach, J., Scheurich, P., Galle, P.R., Kollias, G., et al. (2002). Tumor necrosis factor-receptor 2 is up-regulated on lamina propria T cells in Crohn’s disease and promotes experimental colitis in vivo. *Eur. J. Immunol.* *32*, 3142–3151.
- Hu, X., Li, B., Li, X., Zhao, X., Wan, L., Lin, G., Yu, M., Wang, J., Jiang, X., Feng, W., et al. (2014). Transmembrane TNF- α Promotes Suppressive Activities of Myeloid-Derived Suppressor Cells via TNFR2. *J. Immunol.* *192*, 1320–1331.

- Jacob, C.O., and McDevitt, H.O. (1988). Tumour necrosis factor-alpha in murine autoimmune “lupus” nephritis. *Nature* 331, 356–358.
- Kallioliass, G.D., and Ivashkiv, L.B. (2015). TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat. Rev. Rheumatol.* 12, nrrheum.2015.169.
- Keeton, R., Allie, N., Dambuza, I., Abel, B., Hsu, N.-J., Sebesho, B., Randall, P., Burger, P., Fick, E., Quesniaux, V.F.J., et al. (2014). Soluble TNFRp75 regulates host protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Invest.* 124, 1537–1551.
- Kemanetzoglou, E., and Andreadou, E. (2017). CNS Demyelination with TNF- α Blockers. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 17, 36.
- Laurence, A., Tato, C.M., Davidson, T.S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R.B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., et al. (2007). Interleukin-2 Signaling via STAT5 Constrains T Helper 17 Cell Generation. *Immunity* 26, 371–381.
- Leclerc, M., Naserian, S., Pilon, C., Thiolat, A., Martin, G.H., Pouchy, C., Dominique, C., Belkacemi, Y., Charlotte, F., Maury, S., et al. (2016). Control of GVHD by regulatory T cells depends on TNF produced by T cells and TNFR2 expressed by regulatory T cells. *Blood* 128, 1651–1659.
- Li, X.-M., Chen, X., Gu, W., Guo, Y.-J., Cheng, Y., Peng, J., and Guo, X.-J. (2017). Impaired TNF/TNFR2 signaling enhances Th2 and Th17 polarization and aggravates allergic airway inflammation. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 313, L592–L601.
- Liu, J., Marino, M.W., Wong, G., Grail, D., Dunn, A., Bettadapura, J., Slavin, A.J., Old, L., and Bernard, C.C.A. (1998). TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in autoimmune-mediated demyelination. *Nat. Med.* 4, 78.
- Lu, L., Barbi, J., and Pan, F. (2017). The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nat. Rev. Immunol.*
- Madsen, P.M., Motti, D., Karmally, S., Szymkowski, D.E., Lambertsen, K.L., Bethea, J.R., and Brambilla, R. (2016). Oligodendroglial TNFR2 Mediates Membrane TNF-Dependent Repair in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Promoting Oligodendrocyte Differentiation and Remyelination. *J. Neurosci.* 36, 5128–5143.
- Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., et al. (2009). Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 30, 899–911.
- Nadkarni, S., Mauri, C., and Ehrenstein, M.R. (2007). Anti-TNF- α therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF- β . *J. Exp. Med.* 204, 33–39.
- Nguyen, D.X., and Ehrenstein, M.R. (2016). Anti-TNF drives regulatory T cell expansion by paradoxically promoting membrane TNF-TNF-RII binding in rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* 213, 1241–1253.
- Pfeifer, E., Polz, J., Griebl, S., Mostböck, S., Hehlhans, T., and Männel, D.N. (2012). Mechanisms of immune complex-mediated experimental glomerulonephritis: possible role of

the balance between endogenous TNF and soluble TNF receptor type 2. *Eur. Cytokine Netw.* 23, 15–20.

Polansky, J.K., Kretschmer, K., Freyer, J., Floess, S., Garbe, A., Baron, U., Olek, S., Hamann, A., von Boehmer, H., and Huehn, J. (2008). DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur. J. Immunol.* 38, 1654–1663.

Rabinovitch, A., Suarez-Pinzon, W.L., Sorensen, O., Rajotte, R.V., and Power, R.F. (1997). TNF-alpha down-regulates type 1 cytokines and prolongs survival of syngeneic islet grafts in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* 159, 6298–6303.

Rainbow, D.B., Yang, X., Burren, O., Pekalski, M.L., Smyth, D.J., Klarqvist, M.D.R., Penkett, C.J., Brugger, K., Martin, H., Todd, J.A., et al. (2015). Epigenetic analysis of regulatory T cells using multiplex bisulfite sequencing. *Eur. J. Immunol.* 45, 3200–3203.

Rickard, J.A., Anderton, H., Etemadi, N., Nachbur, U., Darding, M., Peltzer, N., Lalaoui, N., Lawlor, K.E., Vanyai, H., Hall, C., et al. (2014). TNFR1-dependent cell death drives inflammation in Sharpin-deficient mice. *ELife* 3, e03464.

Schmid, T., Falter, L., Weber, S., Müller, N., Molitor, K., Zeller, D., Weber-Steffens, D., Hehlgans, T., Wajant, H., Mostböck, S., et al. (2017). Chronic Inflammation Increases the Sensitivity of Mouse Treg for TNFR2 Costimulation. *Front. Immunol.* 8.

Sieper, J., Heijde, D. van der, Dougados, M., Mease, P.J., Maksymowych, W.P., Brown, M.A., Arora, V., and Pangan, A.L. (2013). Efficacy and safety of adalimumab in patients with non-radiographic axial spondyloarthritis: results of a randomised placebo-controlled trial (ABILITY-1). *Ann. Rheum. Dis.* 72, 815–822.

Stoelcker, B., Hehlgans, T., Weigl, K., Bluethmann, H., Grau, G.E., and Männel, D.N. (2002). Requirement for tumor necrosis factor receptor 2 expression on vascular cells to induce experimental cerebral malaria. *Infect. Immun.* 70, 5857–5859.

Suenaert, P., Bulteel, V., Lemmens, L., Noman, M., Geypens, B., Assche, G.V., Geboes, K., Ceuppens, J.L., and Rutgeerts, P. (2002). Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. *Am. J. Gastroenterol.* 97, 2000.

Tost, J., and Gut, I.G. (2007). DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nat. Protoc.* 2, 2265–2275.

Tsakiri, N., Papadopoulos, D., Denis, M.C., Mitsikostas, D.-D., and Kollias, G. (2012). TNFR2 on non-haematopoietic cells is required for Foxp3⁺ Treg-cell function and disease suppression in EAE: Immunomodulation. *Eur. J. Immunol.* 42, 403–412.

Zampeli, E., Vlachoyiannopoulos, P.G., and Tzioufas, A.G. (2015). Treatment of rheumatoid arthritis: Unraveling the conundrum. *J. Autoimmun.* 65, 1–18.

Zhao, X., Rong, L., Zhao, X., Li, X., Liu, X., Deng, J., Wu, H., Xu, X., Erben, U., Wu, P., et al. (2012). TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation. *J. Clin. Invest.* 122, 4094–4104.

Figures

Figure 1

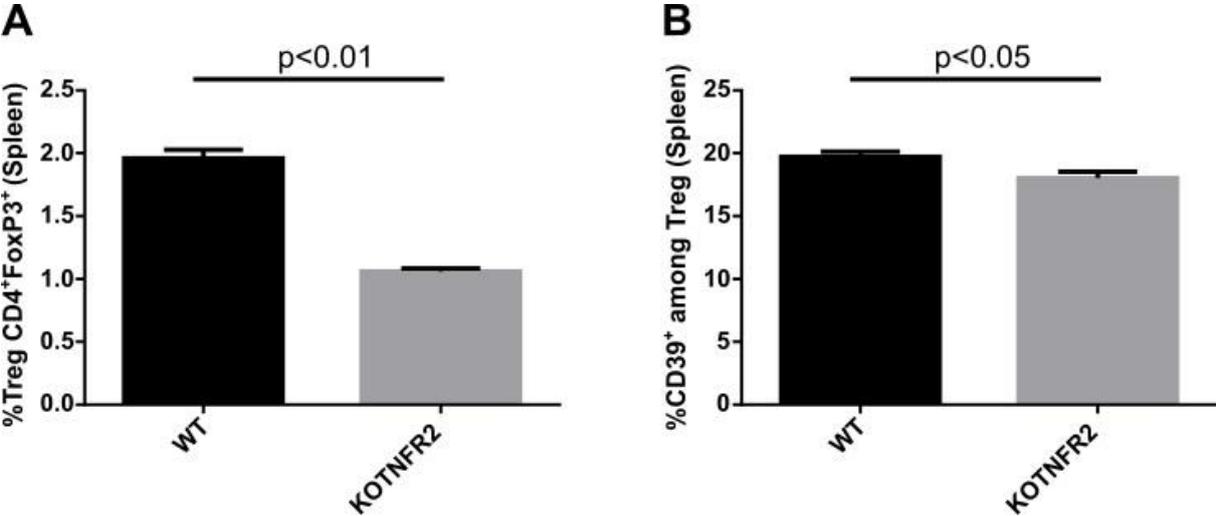


Figure 2

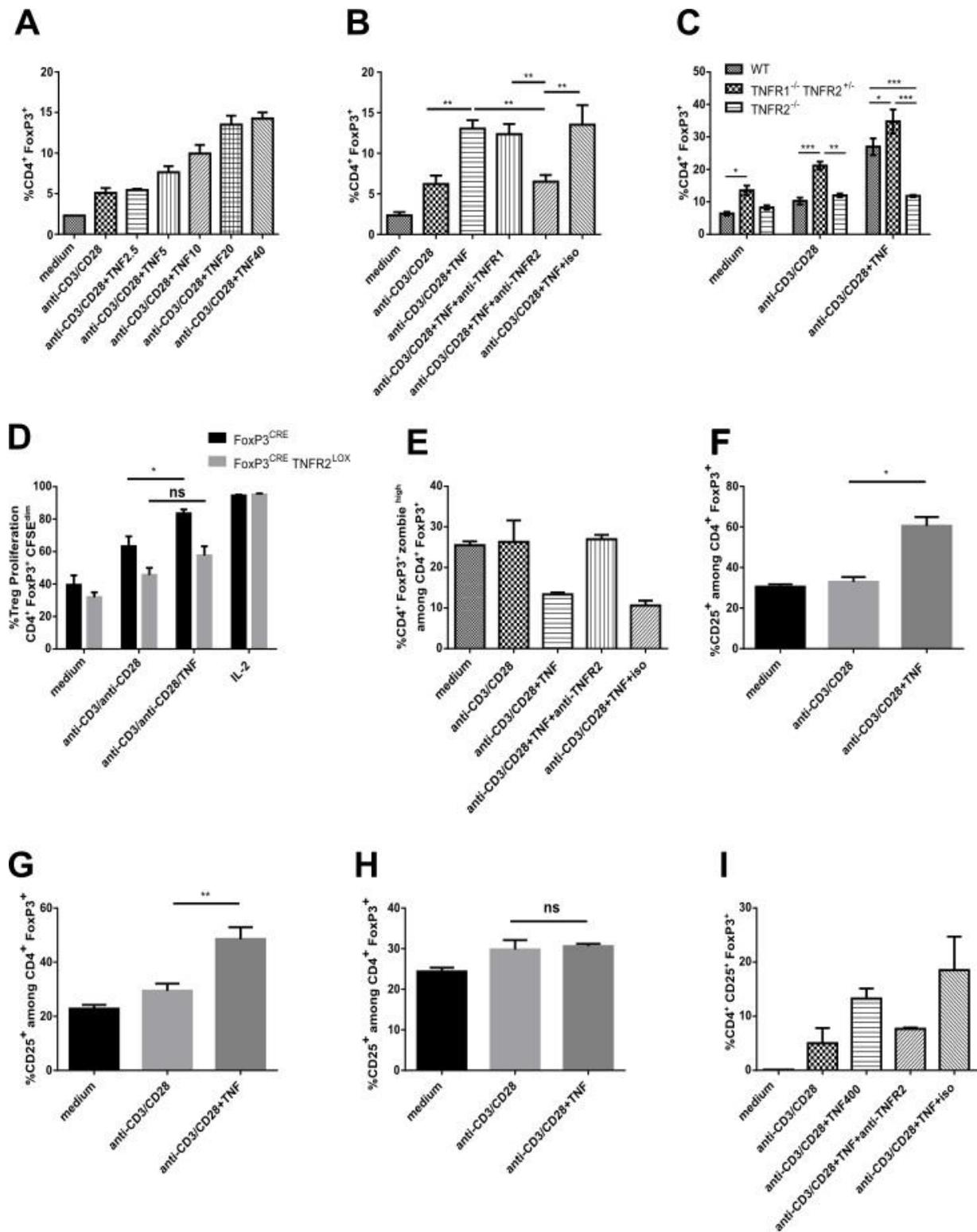


Figure 3

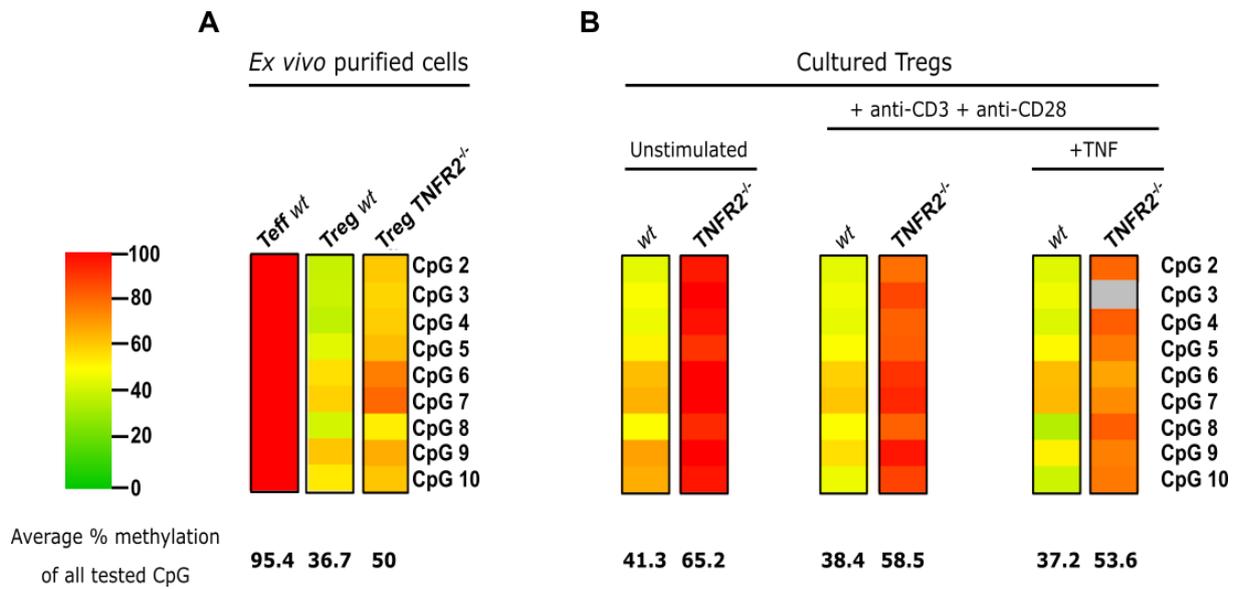


Figure 4

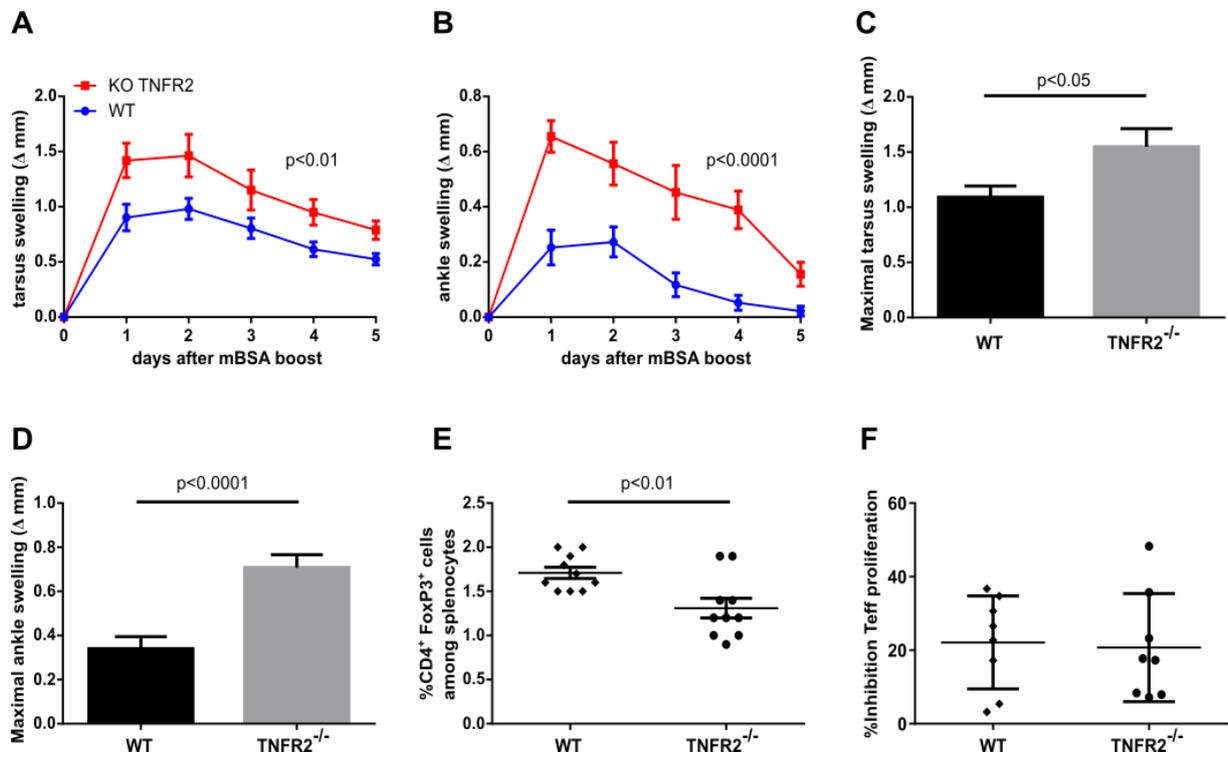


Figure 5

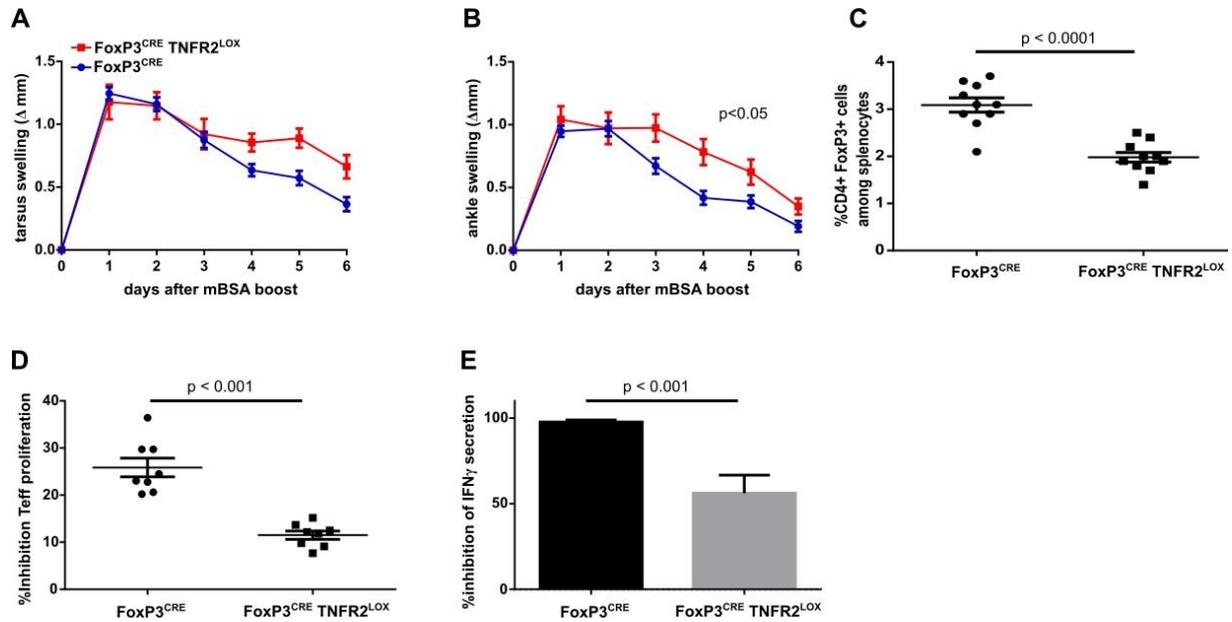


Figure 6

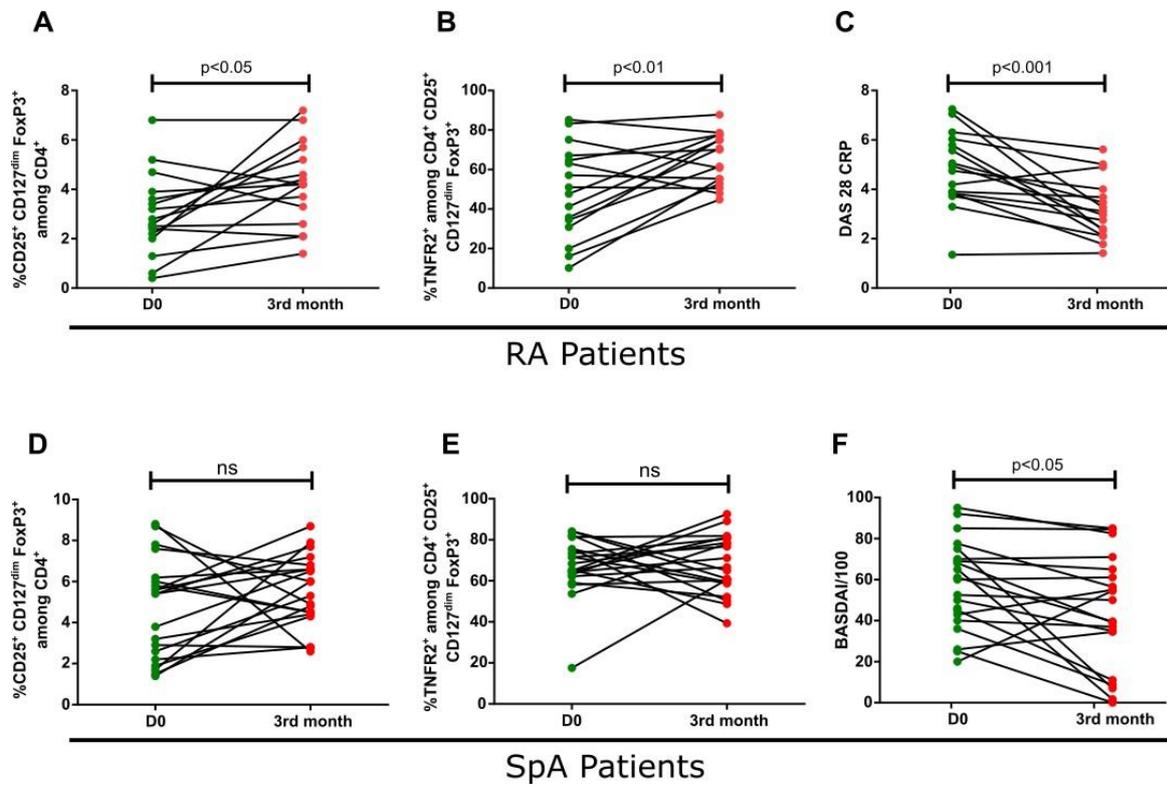
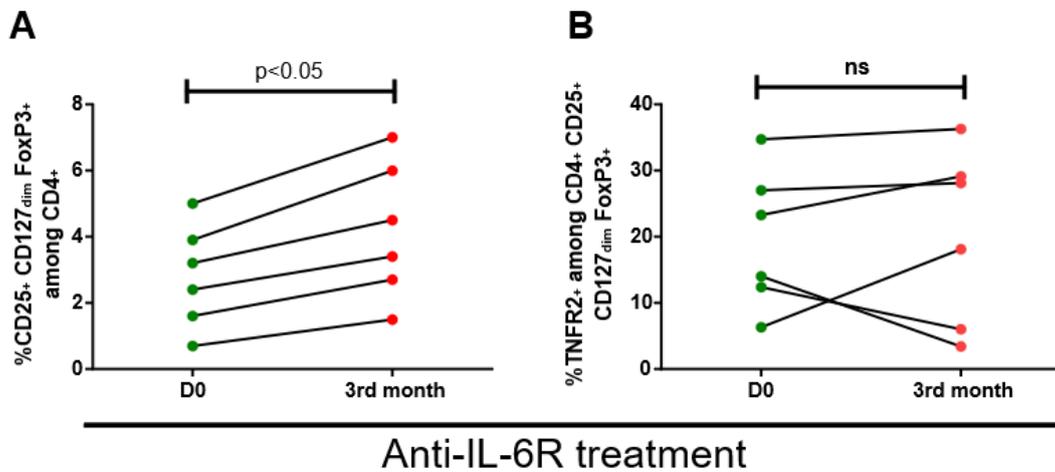


Figure 7



Legends

Figure 1: Decreased frequency of Tregs in TNFR2^{-/-} mice. Splenocytes from *wt* littermates and TNFR2^{-/-} mice were stained with CD4, FoxP3 and CD39 Abs. Expression was analyzed by FACS. (A) Proportion of CD4⁺FoxP3⁺ cells in the total splenocytes from *wt* (n=5) or TNFR2^{-/-} mice (n=5). (B) Percentage of CD39⁺ cells among CD4⁺FoxP3⁺ from *wt* (n=5) or TNFR2^{-/-} mice (n=5). Mann Withney test was used for statistical analysis.

Figure 2: Effect of TNF on cultured mouse and human Tregs. CD4⁺CD25⁺ cells were purified from mice spleen from *wt* (A-D, E, F), FOXP3^{CRE}TNFR2^{LOX} and FOXP3^{CRE} (D), TNFR1^{-/-} TNFR2^{+/-} (C, G) or TNFR2^{-/-} (C, H) mice. CD4⁺CD25⁺CD127⁻ cells were purified from healthy donors PBMC (I). Cells were cultured for 72h (A-C, E-I) or 96h (D), with anti-CD3 + anti-CD28 Abs in presence of increasing concentrations of rmTNF- α (A) or 20 ng/ml rmTNF (B-H) , or 250 pg/ml rmIL-2 (D), or 400 ng/ml rh TNF (I). In some experiments 10 ug/ml (B, E) of anti-TNFR1, anti-TNFR2 or control isotype, or 40 μ g/ml of anti-TNFR2 or

control isotype (I) were added. (A-C) CD4⁺FoxP3⁺ frequency among all cultured cells. (D) Proliferated CFSE^{dim} CD4⁺FoxP3⁺ cells among CFSE⁺ cells. (E) Frequency of dead (zombie^{high}) CD4⁺FoxP3⁺ cells among CD4⁺FoxP3⁺ cells. (F-H) Frequency of CD25⁺ cells among CD4⁺FoxP3⁺ cells. (I) Frequency of CD4⁺FoxP3⁺ CD25⁺ cells among all cultured cells. Data are representative of 2 (A) or 3 (I) independent experiments with similar results. One way ANOVA associated with Dunn's multiple comparison test (B, F-H) or two way ANOVA (C-D) was used for statistical analysis. * p< 0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Figure 3: TSDR methylation in Tregs from *wt* and *TNFR2*^{-/-} mice. Genomic DNA was extracted from CD4⁺CD25⁺ Tregs isolated from *wt* and *TNFR2*^{-/-} mice spleen (A) or from Tregs cultured for 72h in the indicated conditions (B). A control was performed on DNA from CD4⁺CD25⁻ Teff cells isolated from *wt* mice spleen (A). The amplicons are subdivided by horizontal lines, each representing an individual CpG motif. The methylation status of individual CpG motifs is color coded according to the degree of methylation at that site. The color code ranges from green (0% methylation) to red (100% methylation) according to the color scale on the left. Due to sequencing problems, the CpG motif 3 in the culture condition with anti-CD3 + anti-CD28 Abs + TNF- α from *TNFR2*^{-/-} Tregs appears in grey. Average % methylation of all tested CpG are indicated at the bottom of each column. One representative experiment of two independent experiments is shown.

Figure 4: Exacerbation of arthritis in *TNFR2*^{-/-} mice. DTHA was induced in *wt* (n=15) and *TNFR2*^{-/-} (n=13) mice. Tarsus (A) and ankle (B) swelling shown over the duration of the study. Maximal tarsus (C) and ankle (D) swelling reached during the course of the disease for each individual mouse was calculated. At euthanasia (day 6 after mBSA boost), CD4⁺FoxP3⁺

Tregs frequency among splenocytes (E) and Tregs suppressive effect on CD4⁺CD25⁺ Teff cells proliferation (F) were determined in all mice (E) or in 8 mice per group (F). Data are expressed as mean ± SEM. (A-D) Data are representative of one experiment of two similar experiments. Student t test on area under curve from each mouse (A, B) or on cell frequencies (C-F) was used for statistical analysis.

Figure 5: Aggravated arthritis and decreased Tregs suppressive capacities in FOXP3^{CRE}TNFR2^{LOX} mice. DTHA was induced in FOXP3^{CRE} (n=20) and FOXP3^{CRE}TNFR2^{LOX} (n=15) mice. (A) tarsus and (B) ankle swelling shown over the duration of the study. At euthanasia (day 6 after mBSA boost), CD4⁺FoxP3⁺ Tregs frequency among splenocytes (C), Tregs suppressive effect on CD4⁺CD25⁺ Teff cells proliferation (D) and IFN γ secretion (E) were determined in 10 (C) or 8 (D, E) mice per group. Data are expressed as mean ± SEM. Student t test on area under curve from each mice (A, B) or on cell frequencies (C) and Mann Whitney test (E, F) were used for statistical analysis.

Figure 6: Evolution of peripheral blood Treg subpopulations on anti-TNF treatment in RA and SpA patients.

Significant increase, after 3 months of anti-TNF treatment, of Total Treg (A) and TNFR2⁺ Treg subpopulation (B) in the peripheral blood of RA patients, with different degrees of clinical response to treatment (C). No significant variation of total Treg (D) or TNFR2⁺ Tregs (E) in SpA patients treated by anti-TNF agents with different degrees of clinical response (F). ns: not significant.

Figure 7: Evolution of peripheral blood Treg subpopulations on tocilizumab treatment in RA patients.

Significant increase, after 3 months of tocilizumab treatment, of Total Tregs in the peripheral blood of RA patients (A). No significant variation of TNFR2⁺ Treg subpopulation in the same patients (B).

IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Au cours de nos études, nous avons pu mettre en évidence un rôle important du TNF α dans le maintien de l'expression de FoxP3 ainsi que dans la prolifération des Treg. Nous avons montré que la signalisation TNF α -TNFR2 sur les Treg permettait de diminuer la méthylation du TSDR et d'augmenter la prolifération des Treg. Par la suite, nous avons pu mettre en évidence que les Treg TNFR2⁺ étaient important pour le contrôle de l'inflammation dépendante du TNF α dans deux modèles expérimentaux différents que sont l'arthrite DTHA et l'inflammation cutanée induit par l'imiquimod. Pour terminer, nous avons montré que les traitements anti-TNF α entraînaient une augmentation de la fréquence des Treg TNFR2⁺ circulants trois mois après le début du traitement et cela spécifiquement dans la PR. L'ensemble de nos résultats mettent en évidence un rôle prépondérant des Treg TNFR2⁺ dans le contrôle de l'inflammation dépendante du TNF α .

A. La signalisation TNF α -TNFR2 augmente la stabilité et l'activité immunosuppressive des Treg

Actuellement, le TNF α est majoritairement connu comme étant une cytokine pro-inflammatoire. Cependant, nos résultats ainsi que ceux parus dans la littérature actuelle suggèrent qu'il pourrait jouer un rôle anti-inflammatoire en agissant sur les Treg.

Dans notre étude, nous avons montré que le TNF α est capable de maintenir l'expression de FoxP3 en culture par une activation du TNFR2 que ce soit chez l'homme ou chez la souris. Nous avons mis en évidence que le maintien des Treg murins était associé à une augmentation de la prolifération des Treg, à une augmentation de l'expression du CD25 par ces derniers ainsi qu'à une diminution de leur mort cellulaire. De plus, nous avons montré que la présence du TNFR2 à la surface des Treg est associée à une méthylation du TSDR moins importante, et donc à une stabilité accrue de l'expression de *FoxP3*. L'hypothèse que nous formulons suite à ces résultats est que l'interaction TNF α -TNFR2 confère une stabilité plus élevée aux Treg.

Nos travaux rejoignent ceux d'Oppenheim et de son équipe. Nous savons actuellement que le TNF α est capable de maintenir l'expression de *FoxP3* en interagissant avec le TNFR2 chez la souris (Chen et al., 2013). Le mécanisme mis en œuvre par cette voie de signalisation n'est encore que très peu compris. La signalisation du TNFR2 est connue pour déclencher la prolifération cellulaire et inhiber l'apoptose mais le lien avec le maintien

de l'expression de *FoxP3* n'a pas encore été établi (Rothe et al., 1995). L'hypothèse actuellement avancée est une implication de la signalisation TNFR2 dans l'activation de la voie JAK/STAT et plus particulièrement sur l'augmentation de la présence de STAT5. Cette molécule est primordiale dans l'expression de *FoxP3* ainsi que dans la stabilisation des Treg. Il a été décrit que la balance STAT5/STAT3 déterminait le destin du lymphocyte T. L'expression prédominante de STAT5 induit une différenciation en Treg ; en revanche si STAT3 prédomine, la différenciation se fait en Th17 (Laurence et al., 2007) Il a été montré que chez des souris déficientes pour le gène du TNFR2, l'expression de STAT5 était fortement diminuée et associée à une diminution de la fréquence des Treg. Ceci suggérant un lien entre l'expression du TNFR2 et celle de STAT5 (Chen et al., 2013; Miller et al., 2015). En 2007, Oppenheim a mis en évidence une augmentation de la phosphorylation de STAT5 dans les Treg en présence d'IL-2 et de TNF α mais il n'a pas encore été montré que le TNF α , à lui seul, était capable d'augmenter la phosphorylation de STAT5 (Chen et al., 2007). De plus, il a été montré qu'en cas d'absence du ligand du TNFR2, la fréquence des Treg était plus faible dans les organes lymphoïdes secondaires (Chen et al., 2013). Cette étude suggère que le TNFR2 participe à la stabilisation de l'expression de *FoxP3*. Notre étude apporte un élément de compréhension important de l'implication de la voie de signalisation du TNFR2 et le maintien de l'expression de *FoxP3*. En effet, nous montrons que le TNFR2 est capable de diminuer la méthylation de la séquence TSDR (Treg Specific Demethylated Region) du gène *FoxP3*. Cette séquence, située dans le premier intron du gène *FoxP3*, est très importante pour la stabilité de l'expression de ce dernier et son hyperméthylation diminue la capacité immunosuppressive des Treg murin (Polansky et al., 2008; Toker et al., 2013). Les conclusions que nous pouvons formuler à l'heure actuelle sont que la signalisation du TNFR2 est capable à la fois d'augmenter la présence de STAT5 phosphorylée et de diminuer la méthylation de la séquence TSDR de *FoxP3*. Il est à noter que la séquence TSDR, une fois déméthylée, est capable de fixer STAT5 phosphorylée afin de stabiliser l'expression de *FoxP3* (Burchill et al., 2007). Nous pouvons donc penser que la signalisation du TNFR2 maintient un niveau peu élevé de méthylation du TSDR permettant la fixation de STAT5 phosphorylée elle-même induite par le TNFR2 et conduisant à la stabilisation de l'expression de *FoxP3* **(Figure 29)**.

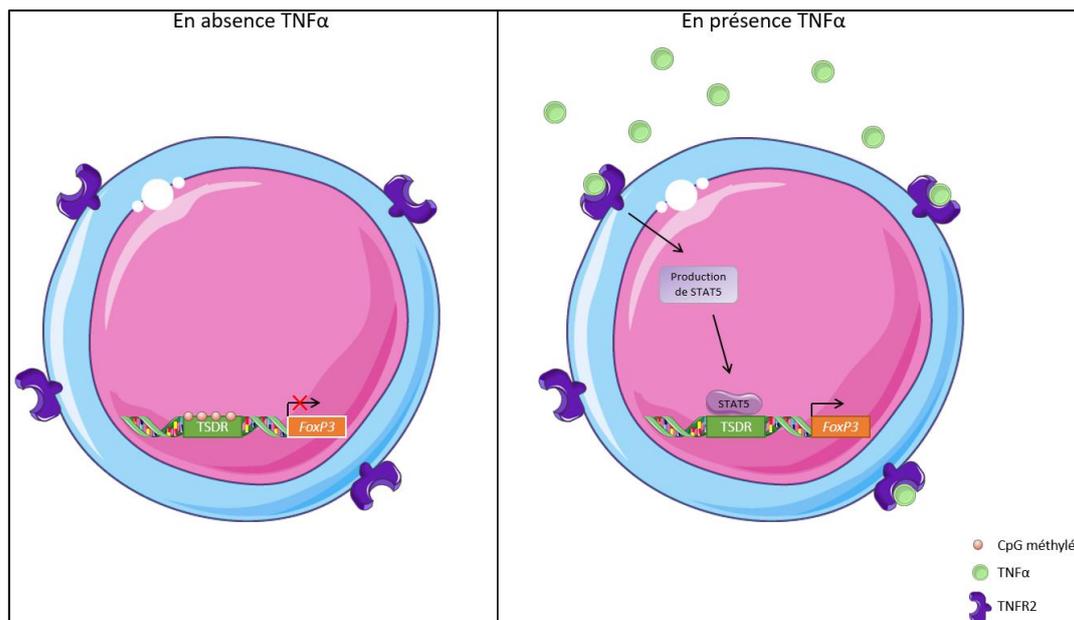


Figure 29 : Mécanisme d'induction de l'expression de *FoxP3* par le TNFR2

Chez l'homme, la stimulation du TNFR2 à la surface des Treg permet aussi le maintien de l'expression de *FoxP3*. L'étude menée par Faustman et ses collègues en 2017 a montré que le TNF α augmentait la fréquence des Treg humains en culture et que l'utilisation d'un agoniste du TNFR2 conduisait au même effet. En revanche l'utilisation d'un antagoniste de ce dernier entraînait une diminution de la fréquence des Treg en culture (Torrey et al., 2017). Cependant, il est à noter que l'intégralité de ces expériences a été effectuée sur des LT CD4⁺ issus du sang de donneurs sains et non sur des Treg purifiés. Nous montrons dans notre étude que le TNF α est capable, via le TNFR2, d'augmenter le maintien de l'expression de *FoxP3* dans des cultures de Treg purifiés issus du sang de donneurs sains. Les études épigénétiques ainsi que celles concernant la phosphorylation de STAT5 après une activation de la voie du TNFR2 ne sont encore qu'à leurs débuts chez l'homme. L'une des premières études épigénétiques s'intéressant à la méthylation de la région TSDR du gène *FoxP3* chez l'homme a été publiée en 2017 (Alvarez Salazar et al., 2017). Ce travail met en évidence qu'au cours de traitement, de patients greffés, par une molécule CTLA-4 de fusion on observait une méthylation accrue de la séquence TSDR diminuant ainsi la capacité immunosuppressive des Treg. Ces premiers résultats confirment le rôle important de cette région de *FoxP3* dans le maintien de l'activité des Treg. Cependant aucune étude n'a encore été menée sur l'état de méthylation du TSDR ou sur l'état de phosphorylation de STAT5 après stimulation par du TNF α . Au vue des effets similaires de la voie de signalisation du

TNFR2 sur l'expression de *FoxP3* et de l'importance du TSDR dans le maintien de son expression, nous pouvons supposer que cette voie de signalisation jouerait un rôle comparable à celui décrit chez la souris.

L'étude de l'équipe de Soldevila en 2017 est l'une des premières à établir un lien direct entre le statut de méthylation de la région TSDR de *FoxP3* et la capacité suppressive des Treg. Dans notre étude, nous n'avons pas pu mettre en évidence une modification de l'activité immunosuppressive des Treg en présence de TNF α (résultats non montrés). Cependant, des travaux précédents ont montré une augmentation de l'activité anti-proliférative des Treg vis-à-vis des Teff en présence de TNF α chez la souris (Chen et al., 2007). Chez l'homme, des résultats similaires ont pu être observés en utilisant un agoniste du TNFR2 (Torrey et al., 2017). Ces résultats laissent à penser que la déméthylation du TSDR induite par le TNF α via le TNFR2 semble importante pour le maintien de l'activité immunosuppressive des Treg puisque cette dernière est dépendante de l'expression de *FoxP3* (Hori et al., 2003). D'autres arguments portent à croire que le TNFR2 est important pour l'activité immunosuppressive des Treg puisque nous montrons ici une diminution de l'expression du CD39 par ces cellules en absence de TNFR2. Cette ectonucléotidase est indispensable au mécanisme d'immunosuppression entraînant la dégradation de l'ATP en ADP. Il semblerait donc que l'expression du CD39 par les Treg soit liée à celle du TNFR2 chez la souris. Le lien entre le CD39 et le TNFR2 pourrait être *FoxP3*. Il a été montré que ce facteur de transcription favorisait l'expression du CD39 et que les Treg étaient les principales cellules exprimant cette ectonucléotidase (Deaglio et al., 2007). Ces résultats suggèrent donc que la diminution de CD39 à la surface des Treg TNFR2⁻ serait liée à la diminution de la présence de *FoxP3* due à une augmentation de la méthylation du TSDR. Chez l'homme, le CD39 n'a pas été montré comme augmenté sur les Treg TNFR2⁺. Cependant, cette sous-population de Treg exprime plus de CTLA-4 que les autres Treg mais aucune corrélation n'a été démontrée. Nous pouvons supposer que la variation de l'expression de CTLA-4 est due à la plus faible présence de *FoxP3* dans les Treg TNFR2⁻. Cette hypothèse repose en partie sur le fait que l'expression de *FoxP3* dans des LT CD4⁺ CD25⁻ entraîne l'expression de CTLA-4 (Hori et al., 2003).

Le TNF α est non seulement capable d'augmenter le maintien de l'expression de *FoxP3* et l'activité immunosuppressive des Treg, mais il induit de plus la prolifération de ces

derniers. Cela a été montré pour la première fois chez la souris en 2007 (Chen et al., 2007). Notre étude apporte une nouvelle information quant aux mécanismes impliqués dans la prolifération des Treg dépendante du TNF α . Nous montrons que cette action proliférative du TNF α passe par l'activation de la voie de signalisation du TNFR2. Il est connu que cette voie entraîne l'activation de la voie MAPK et inhibe l'apoptose pouvant ainsi expliquer le rôle important du TNFR2 dans l'action proliférative du TNF α . Il a aussi été montré que le TNF α , en association avec l'IL-2, augmente l'expression de CD25 ainsi que de FoxP3 (Chen et al., 2007). Nous montrons dans notre étude, que le TNF α seul, en interagissant avec le TNFR2, est capable d'augmenter la fréquence des CD4⁺ FoxP3⁺ exprimant le CD25. Nous pouvons donc penser que le TNF α induit une capacité accrue des Treg à répondre à l'IL-2 en augmentant l'expression de CD25. Cela favoriserait la prolifération des Treg ainsi que l'expression de FoxP3. Pour continuer dans ce sens, il a été montré que l'expression de CD25 permettait d'obtenir des Treg plus stables, caractérisés par une plus forte expression de FoxP3 (Miyara et al., 2009). Cela suggère que dans des contextes inflammatoires dépendants du TNF α , les Treg TNFR2⁺ seraient plus sensibles à l'IL-2 et potentiellement plus facilement activables. Chez l'homme, le TNF α ou un agoniste du TNFR2 entraînent aussi une prolifération des Treg, suggérant un mécanisme similaire à celui observé chez la souris (Okubo et al., 2013). Cependant, l'analyse de l'expression du CD25 à la surface des Treg humains est plus compliquée que chez la souris. Les Treg murins peuvent être identifiés comme des cellules exprimant CD4 et FoxP3, ce qui n'est pas le cas des Treg humains. Chez l'homme, les Treg se définissent par l'expression de CD4⁺, CD25⁺ et FoxP3⁺ voir l'absence de CD127 ou CD127^{low}. L'augmentation des Treg humains que nous observons, *in vitro*, en présence de TNF α est nécessairement associée à une augmentation des cellules exprimant le CD25 puisque ce dernier est un marqueur d'identification des Treg humains. Nous ne pouvons donc pas suggérer une augmentation de la sensibilité des Treg vis-à-vis de l'IL-2 en présence de TNF α . Cette hypothèse ne serait plausible que si nous considérons les Treg humains comme des cellules CD4⁺ FoxP3⁺. En revanche, il est à noter que le TNF α est capable d'avoir un effet prolifératif additif à celui de l'IL-2 sur des LT CD4⁺ (Okubo et al., 2013). Il serait intéressant d'étudier l'effet combiné du TNF α et de l'IL-2 sur des Treg humains purifiés afin de savoir si ces deux cytokines agissent de manière semblable sur la prolifération des Treg chez la souris et chez l'homme.

L'ensemble de nos résultats, associé à d'autres études déjà publiées permette de mettre en évidence le rôle important du TNFR2 à la surface des Treg chez la souris et chez l'homme. Ce récepteur, lorsqu'il est activé par le TNF α , permet un maintien accru de l'expression de *FoxP3* en entraînant une diminution de la méthylation du TSDR ainsi qu'une augmentation de STAT5 sous sa forme phosphorylée. De plus, il permet la prolifération des Treg et semble augmenter leurs capacités immunosuppressives ainsi que leur sensibilité à l'IL-2. Pour conclure, l'activation du TNFR2 par le TNF α à la surface des Treg conduit à la mise en place de Treg plus stables et plus efficaces.

B. Le TNFR2, un élément essentiel dans le contrôle de l'inflammation dépendante du TNF α

Le TNFR2, l'un des deux récepteurs du TNF α , est majoritairement activé par le TNF α membranaire. Cette voie de signalisation est connue pour déclencher la prolifération cellulaire tout en inhibant l'apoptose. A contrario, le TNFR1 conduit plutôt à la mise en place de l'apoptose et est fortement inflammatoire.

Dans notre étude nous avons mis en évidence une implication du TNFR2 dans deux modèles d'inflammation dépendant du TNF α : l'arthrite DTHA et l'inflammation cutanée induite par l'imiquimod. Nous avons montré que l'absence de TNFR2 conduisait à l'exacerbation des paramètres cliniques de ces maladies. L'hypothèse que nous formulons face à ces résultats, est que le TNFR2 serait un élément essentiel dans la régulation de l'inflammation dépendante du TNF α .

De nombreuses études ont porté sur le rôle des récepteurs du TNF α dans des modèles inflammatoires expérimentaux. A l'heure actuelle, une dichotomie semble clairement émerger. Le TNFR1 serait lié à un entretien de l'inflammation alors que le TNFR2 jouerait un rôle inverse et favoriserait un contrôle de cette dernière. Cette idée s'appuie sur de multiples travaux qui mettent en évidence une exacerbation de l'inflammation en absence de TNFR2. C'est ce qui a été montré par l'équipe de Kollias en 2012. Dans ce travail, il a été mis en évidence une exacerbation de l'encéphalomyélite expérimentale (EAE) chez la souris en absence de TNFR2 (Tsakiri et al., 2012). Il est à noter que ce modèle n'est que partiellement dépendant du TNF α (Schiffenbauer et al., 2000). De même, il a été montré qu'au cours d'inflammation chronique dépendante du TNF α , comme l'infection par

Mycobacterium tuberculosis, l'activation du TNFR2 conduisait à une diminution de l'inflammation (Schmid et al., 2017). De récents travaux ont aussi mis en évidence le rôle du TNFR2 dans le contrôle de la réaction immunitaire lors de greffe (GvHD). Cette réponse immunitaire entraîne une production importante de TNF α (Remberger et al., 1995). Il semblerait même qu'elle soit associée à l'ampleur de la GvHD. L'équipe de Beilhack a montré que l'activation du TNFR2 entraînait une diminution de la GvHD, favorisant ainsi l'acceptation du greffon par l'hôte (Chopra et al., 2016). Ces études renforcent nos résultats qui montrent une exacerbation de l'inflammation au cours de l'arthrite et de l'inflammation cutanée dépendante du TNF α chez des souris déficientes pour le TNFR2. Cependant, l'absence de TNFR2 peut aussi conduire à l'exacerbation de l'inflammation dans des modèles qui ne sont pas encore décrits comme dépendants du TNF α . C'est le cas de la colite chez la souris déficiente pour l'IL-10 (Punit et al., 2015).

Bien que la majorité des études s'intéressant au TNFR2 montrent un rôle anti-inflammatoire, quelques publications indiquent l'effet inverse. C'est le cas d'une étude de 2017, montrant que l'inhibition du TNFR2 par un anticorps neutralisant conduit à une diminution de l'arthrite dans un modèle d'arthrite septique induit par *Staphylococcus Aureus* (Sultana et al., 2017). Ce modèle a été montré comme dépendant du TNF α , l'absence de la cytokine entraînant une résistance à l'arthrite septique chez la souris (Hultgren et al., 1998). Ces résultats suggèrent que le TNFR2 a un rôle aggravant dans le développement de l'inflammation. Cette hypothèse n'est pas à exclure puisque qu'il a été montré que le TNFR2 était important pour la prolifération des Teff (Chen et al., 2016b). L'ensemble de ces données met en évidence un rôle ambivalent du TNFR2 dans la régulation de l'inflammation dépendante du TNF α même si la majorité des publications suggère un rôle anti-inflammatoire de ce récepteur.

Le TNFR1 fait aussi partie de la signalisation du TNF α . Nous avons montré dans notre étude *in vitro* que l'absence de ce récepteur ne semblait pas impacter l'effet du TNF α sur les Treg. Cependant, de nombreuses études ont mis en évidence son effet inflammatoire dans de nombreux modèles d'inflammation dépendants du TNF α . A l'inverse du TNFR2, l'absence de TNFR1 conduit à une diminution des symptômes cliniques dans l'EAE (Eugster et al., 1999). Ces résultats ont été confirmés en 2014 par Williams et ses collègues en montrant que l'inhibition du TNFR1 par des anticorps neutralisant diminuait les symptômes dans ce

même modèle (Williams et al., 2014). Ceci n'est pas spécifique de l'EAE puisque le rôle inflammatoire du TNFR1 a aussi été montré dans l'arthrite expérimentale au collagène (Tada et al., 2001). Il est à noter que des travaux sur le TNFR1 ont été menés dans des modèles de cancer. Ces études ont montré que l'activation de ce récepteur favorisait dans la majorité des cas, la prolifération des cellules cancéreuses (Charles et al., 2009; Rivas et al., 2008). Ces résultats peuvent paraître paradoxaux puisque le développement du cancer est en partie dû à un échappement des cellules tumorales. Le TNFR1 pourrait donc permettre une réponse inflammatoire plus forte et diminuer la progression cancéreuse. L'hypothèse actuellement envisagée est que la signalisation TNFR1 pourrait activer la prolifération des cellules tumorales et ainsi favoriser le développement du cancer (Rivas et al., 2008). Ces résultats ne permettent pas de réfuter la capacité du TNFR1 à favoriser l'inflammation. Il est probable que celle-ci ne soit pas suffisante pour contrôler la prolifération des cellules cancéreuses en présence de TNF α . L'ensemble de ces résultats ainsi que ceux de notre étude mettent en évidence un rôle pro-inflammatoire de TNFR1 dans des modèles d'inflammation dépendants du TNF α ainsi qu'un impact négligeable de sa signalisation sur les Treg.

C. Implication du TNFR2 dans le recrutement des cellules immunitaires lors de l'inflammation dépendante du TNF α

Comme discuté précédemment, le TNFR2 est un récepteur important pour le contrôle de l'inflammation dépendante du TNF α . Cependant, les mécanismes mis en place par ce récepteur pour réguler l'inflammation ne sont que très peu compris. Dans notre étude nous montrons que l'absence du TNFR2 au cours d'une inflammation dépendante du TNF α entraîne une diminution de la fréquence des Treg et des Treg CD39⁺ ainsi qu'une augmentation de l'infiltrat inflammatoire dans la peau. L'hypothèse que nous formulons suite à ces résultats, est que le TNFR2 serait un élément essentiel dans la mise en place d'une réponse anti-inflammatoire au cours d'une inflammation dépendante du TNF α .

Les premiers effets liés à l'absence de TNFR2 que nous avons pu observer au cours de nos deux modèles d'inflammation sont une diminution de la fréquence des Treg dans les organes lymphoïdes secondaires ainsi qu'une augmentation de l'infiltrat inflammatoire au cours de l'inflammation cutanée. Ces résultats font émerger deux hypothèses, non exclusives, quant au rôle du TNFR2 dans le contrôle de l'inflammation. La première est que le TNFR2 pourrait intervenir dans les mécanismes de recrutement des cellules immunitaires

et la seconde, que ce récepteur pourrait être directement impliqué dans le maintien des Treg *in vivo*.

Le TNFR2 n'est pas un récepteur ubiquitaire comme le TNFR1. Il est exprimé à la surface des cellules immunitaires, des cellules endothéliales et des cellules nerveuses (Sasi et al., 2014). Les cellules endothéliales ont été identifiées comme des acteurs majeurs intervenant dans les mécanismes de migration des cellules immunitaires. Ce processus est essentiel pour le stockage de ces dernières dans les organes lymphoïdes secondaires ainsi que pour leur recrutement sur le site inflammatoire (Luster et al., 2005). L'équipe de Kollias a mis en évidence en 2012 que l'absence de TNFR2 à la surface des cellules non hématopoïétiques conduisait à une exacerbation de l'EAE (Tsakiri et al., 2012). Ces résultats mettent en évidence un rôle non négligeable des cellules non hématopoïétiques dans le contrôle de l'inflammation. Cette étude montre que l'absence de TNFR2 diminue le recrutement des Treg dans le site inflammatoire conduisant à une exacerbation de l'inflammation. Dans notre étude, nous avons observé une diminution de la fréquence des Treg dans les ganglions et la rate des souris TNFR2^{-/-} au cours de l'inflammation. Ces résultats pourraient en partie être expliqués par un défaut de recrutement des Treg dû à l'absence de TNFR2 sur les cellules endothéliales. Cependant, comme mentionné précédemment, les cellules neuronales sont aussi capables d'exprimer le TNFR2. Il n'est donc pas à exclure que ces dernières puissent jouer un rôle dans le contrôle de l'inflammation lors de l'EAE. En revanche, il est peu probable qu'elles interviennent dans notre modèle d'inflammation cutanée ou dans notre modèle d'arthrite. Une étude plus ancienne a spécifiquement porté sur le rôle du TNFR1 et du TNFR2 à la surface des cellules endothéliales. Ce travail indique que la signalisation du TNFR1 est suffisante pour l'activation des cellules endothéliales favorisant ainsi l'adhérence et la migration des cellules immunitaires (Slowik et al., 1993). A contrario, le TNFR2 permettrait de diminuer la concentration de TNF α circulant et ainsi réduire l'inflammation. Cette hypothèse repose sur l'action de l'enzyme TACE sur le clivage du TNFR2 membranaire. Ce récepteur une fois soluble, devient alors un inhibiteur du TNF α . Il est à noter qu'une étude de 2014 a mis en évidence qu'une stimulation spécifique du TNFR2 exprimé à la surface des cellules endothéliales augmentait la migration des monocytes. Ces résultats vont à l'encontre de ceux du travail précédent (Venkatesh et al., 2013). Le faible nombre d'études dans ce domaine ne

permet pas de conclure clairement quant au rôle du TNFR2 à la surface des cellules endothéliales dans la migration des cellules immunitaires. Cependant, l'augmentation de l'infiltrat leucocytaire que nous observons au cours de l'inflammation cutanée en absence de TNFR2, nous laisse penser que ce récepteur diminuerait la migration des cellules immunitaire au site de l'inflammation tout comme l'équipe de Pober le suggère (Slowik et al., 1993). Utiliser notre modèle d'inflammation cutanée chez des souris déficientes conditionnelles pour le TNFR2 dans les cellules endothéliales serait un très bon moyen de confirmer cette hypothèse.

Le second processus pouvant expliquer la diminution du nombre et de la fréquence des Treg dans les organes lymphoïdes secondaires en absence de TNFR2 est le rôle de ce récepteur dans la stabilité des Treg. Ce mécanisme a été discuté longuement dans la première partie de cette discussion. Cependant, nous montrons ici la répercussion directe de l'absence de TNFR2 sur le maintien des Treg *in vivo* dans deux modèles inflammatoires dépendants du TNF α . Nous confirmons les résultats que l'équipe d'Oppenheim a publié en 2012 dans un modèle de colite (Chen et al., 2013).

Ainsi, les études précédemment décrites suggèrent que le TNFR2 à la surface des cellules endothéliales jouerait un rôle majeur dans le contrôle de l'inflammation en diminuant la migration des cellules inflammatoires. En parallèle de ce processus, le TNFR2 agirait aussi sur les Treg en les stabilisant. L'association de ces deux mécanismes pourrait en partie expliquer l'exacerbation des paramètres cliniques observés dans nos deux modèles inflammatoires en absence de ce récepteur.

D. Le TNFR2, un récepteur important dans l'activité des cellules immunitaires

Comme mentionné précédemment, le TNFR2 est exprimé par les cellules immunitaires, neuronales et endothéliales. L'absence de ce récepteur conduisant à une exacerbation de l'inflammation, nous avons étudié le comportement des cellules immunitaires en absence de TNFR2. La polyarthrite rhumatoïde et le psoriasis, les maladies que nous avons étudiées par le moyen de nos modèles expérimentaux, sont caractérisées par une défaillance des Treg à réguler l'inflammation. De ce fait, nous nous sommes attachés à étudier le comportement de ces cellules au cours de nos modèles inflammatoires

dépendants du TNF α . Nous avons montré qu'une déficience en TNFR2 ainsi que son absence seulement à la surface des Treg est suffisante pour aggraver les paramètres cliniques ou histologiques dans nos modèles inflammatoires. Cependant l'absence de ce récepteur ne semble pas impacter la fréquence des cellules inflammatoires dans les organes lymphoïdes secondaires au cours de l'inflammation (résultats non montrés). Ces résultats suggèrent que les Treg TNFR2⁺ sont des acteurs importants de la régulation de l'inflammation dépendante du TNF α .

1. Le rôle controversé du TNFR2 à la surface cellules inflammatoires

Bien que notre étude se soit penchée spécifiquement sur le comportement des Treg en absence de TNFR2, il semble important de comprendre le rôle du TNFR2 à la surface des cellules inflammatoires. Durant notre travail, nous n'avons pas observé de différence de fréquences de ces cellules dans nos modèles (résultats non montrés). Cependant, plusieurs travaux traitent actuellement de l'importance de ce récepteur à la surface des cellules inflammatoires.

Les monocytes sont les premières cellules productrices de TNF α et expriment ses deux récepteurs. Les quelques études visant à comprendre l'effet du TNF α à la surface des monocytes montrent que l'activation du TNFR1 et du TNFR2 par le TNF α membranaire conduirait à leur activation et favoriserait l'inflammation (Rossol et al., 2007). Ces cellules sont surtout connues pour activer la signalisation TNFR1 ou TNFR2 sur les autres cellules immunitaires puisqu'elles produisent une grande quantité de TNF α . Dans notre étude, nous n'avons pas mis en évidence de différence de fréquence des monocytes dans le sang en absence de TNFR2. Il est à noter qu'aucune étude ne s'est encore intéressée au rôle du TNFR2 à la surface des monocytes. La seule chose connue actuellement est que le TNFR2 faciliterait la migration des monocytes en condition inflammatoire (Venkatesh et al., 2013). Les neutrophiles sont fortement impliqués dans les premières étapes de l'inflammation et expriment les deux récepteurs du TNF α . Les quelques études traitant du lien entre le TNF α et les neutrophiles ont mis en évidence un rôle anti-apoptotique du TNF α *via* le TNFR1 (Kilpatrick et al., 2006). Dans notre étude, nous n'avons pas mis en évidence de variation de fréquence des neutrophiles en absence de TNFR2 (résultats non montrés). Cela suggère que l'expression de ce récepteur à la surface des neutrophiles n'impacte pas la survie ou le recrutement de ces cellules. Les cellules dendritiques (DC) ont aussi fait l'objet de recherche

concernant le rôle du TNFR2 à leur surface. Ces travaux montrent que le TNF α par l'activation du TNFR2 permettrait aux DC de produire de l'IL-12 et favoriserait ainsi la différenciation des Th1 et l'inflammation (Martin et al., 2014).

Au vu de ces résultats, le TNF α semble conduire à une activation des cellules inflammatoires myéloïdes pour favoriser l'inflammation mais le rôle du TNFR2 est très peu compris. Cependant, il a récemment été montré que l'absence de TNFR2 à la surface des cellules myéloïdes ne diminuait pas l'inflammation après une immunisation avec *Mycobacterium tuberculosis* (Schmid et al., 2017). L'ensemble de ces études ne permet pas de conclure quant au rôle du TNFR2 à la surface des cellules myéloïdes inflammatoires. Ce dernier pourrait intervenir dans la mise en place de l'inflammation mais ne serait pas indispensable. En revanche il semble jouer un rôle important sur les cellules inflammatoires de l'immunité adaptative.

Au cours de notre étude, nous avons analysé la fréquence des LB, des LT CD8⁺ et des LT helper dans nos modèles inflammatoires en absence de TNFR2 (résultats non montrés). Nous n'avons pas observé de différences de fréquences de ces cellules en absence de ce récepteur. Le rôle du TNFR2 sur les cellules inflammatoires lymphoïdes commence à être étudié même si sa fonction à la surface des LB ne fait l'objet d'aucune recherche à l'heure actuelle. En revanche le rôle du TNFR2 à la surface des LT CD8⁺ a déjà fait l'objet de plusieurs articles. En 2006, Kim et ses collègues ont mis en évidence le rôle pro-inflammatoire du TNFR2 sur les LT CD8⁺ *in vitro* (Kim et al., 2006). Ils ont montré que l'expression du TNFR2 était liée à une survie accrue de ces cellules et qu'il favorisait une prolifération plus importante de ces dernières après une stimulation antigénique. Ces résultats suggèrent ainsi un rôle pro-inflammatoire du TNFR2 pour les LT CD8⁺. Cependant, en 2015, l'équipe de Polk a montré un rôle anti-inflammatoire du TNFR2 sur ces mêmes cellules (Punit et al., 2015). A la différence de l'étude de Kim, le rôle du TNFR2 a ici été étudié dans un modèle de colite. Ce travail a mis en évidence que ce récepteur était capable de diminuer l'activité des LT CD8⁺ pathogéniques sans en diminuer la fréquence. Ces résultats pourraient en partie expliquer pourquoi nous n'avons pas observé de différence de fréquence de ces cellules entre des souris sauvages et celles déficientes pour le TNFR2 dans nos modèles inflammatoires. N'ayant pas fait d'analyses plus poussées sur ce type cellulaire, il serait intéressant d'analyser les quantités de TNF α et d'IFN γ produites par les LT CD8⁺ dans nos modèles

inflammatoires en absence de TNFR2. Enfin, nous n'avons pas montré de différence quant à la capacité des LT CD4⁺ à produire de l'IFN γ ou de l'IL-17 en absence de TNFR2. Ces résultats suggèrent que ce récepteur ne modifierait pas la production de cytokines pro-inflammatoires des Th1 et des Th17. Cependant il a été montré que l'absence de TNFR2 diminuait la prolifération des Th1 ainsi que leur production d'IFN γ n'excluant pas un rôle pro-inflammatoire du TNFR2 (Li et al., 2017). Concernant l'impact de TNFR2 sur les Th17, deux études ont mis en évidence que la signalisation TNFR2 inhibait les Th17 (Li et al., 2017; Miller et al., 2015). Dans la publication de 2017, il a été montré qu'en cas d'allergie, une inhibition du TNFR2 était associée à une diminution de la production d'IL-17 par les LT CD4⁺ ainsi qu'à une diminution de la différenciation des Th17. Des résultats identiques avaient déjà été mis en évidence en 2015 dans un modèle de colite. Cependant l'information supplémentaire de cette étude était que la signalisation TNF α -TNFR2 permettait la production d'IL-2 par les LT CD4⁺ diminuant ainsi la différenciation Th17. Ces travaux mettent en évidence le rôle anti-inflammatoire du TNFR2 vis à vis des Th17.

A la lumière de la littérature actuelle et de nos résultats, le rôle du TNFR2 à la surface des cellules inflammatoires lymphoïdes reste assez ambigu. En revanche, une étude a mis en évidence que la suppression du TNFR2 à la surface des cellules lymphoïdes conduit à une exacerbation de l'inflammation, suggérant un rôle important de ce récepteur à la surface des cellules régulatrices lymphoïdes telles que les Treg (Schmid et al., 2017).

2. Les Treg TNFR2⁺ des acteurs importants dans le contrôle de l'inflammation dépendante du TNF α

Les Treg TNFR2⁺ sont des cellules très étudiées dans le développement du cancer ainsi que dans certaines maladies auto-immunes. Il a été montré que cette sous-population est fortement présente au sein des ascites ovariennes chez les patientes (Govindaraj et al., 2013). De plus, une étude a mis en évidence une forte expression du TNFR2 à la surface des Treg chez des patients atteints de cancers du poumon. Cette équipe a montré que l'expression de ce récepteur à la surface des Treg était corrélée au développement de ce type de cancer (Yan et al., 2015). Des travaux se sont aussi intéressés au développement de cancer en cas d'absence de TNFR2. L'équipe de Plebanski a mis en évidence en 2014 que la diminution de l'expression du TNFR2 à la surface des Treg était bénéfique en cas de leucémie myéloïde (Govindaraj et al., 2014). Ces études laissent à penser que les Treg

TNFR2⁺ posséderaient un effet anti-inflammatoire très important. Cette hypothèse a aussi été avancée grâce à l'étude de cette sous population dans des maladies inflammatoires comme l'allergie ou la GvHD. Il a été montré que l'augmentation des Treg TNFR2⁺ dans le poumon diminuait l'allergie chez la souris favorisant ainsi l'activité anti-inflammatoire. (Mohamud et al., 2017). Ce même effet anti-inflammatoire des Treg TNFR2⁺ a été mis en évidence dans la GvHD puisque l'inhibition du TNFR2 conduit à la diminution de l'activité des Treg (Leclerc et al., 2016). Actuellement, la majorité des travaux portant sur ce sujet mettent en évidence une activité anti-inflammatoire accrue en cas de présence de Treg TNFR2⁺. Ces résultats sont en accord avec l'exacerbation de l'inflammation dans nos deux modèles inflammatoires en absence de TNFR2 seulement à la surface des Treg. Il est cependant à noter, qu'à l'heure actuelle, une seule étude associe la présence de Treg TNFR2⁺ avec une exacerbation de l'inflammation. Ce travail a été mené en 2011 et met en évidence une augmentation des conditions inflammatoires dans le diabète de type 1 lorsque les Treg TNFR2⁺ sont fortement présent dans le sang (Ryba et al., 2011). Cela peut être expliqué par un défaut de recrutement des Treg TNFR2⁺ au site inflammatoire, entraînant une exacerbation de l'inflammation. Ce résultat reste cependant assez isolé car l'utilisation d'agoniste du TNFR2 dans le traitement du diabète de type 1 est actuellement à l'étude (Faustman, 2017).

Afin d'expliquer pourquoi les Treg TNFR2⁺ semblent si important dans la régulation de l'inflammation, plusieurs études se sont penchées sur leur rôle et leur phénotype au cours de l'inflammation. Dans notre étude, nous montrons que l'absence de TNFR2 sur les Treg est suffisante pour diminuer la fréquence de ces derniers dans nos modèles expérimentaux. Cependant nous n'avons pas observé de modulation de la fréquence des cellules inflammatoires en absence de ces cellules. Ces résultats suggèrent que les Treg TNFR2⁺ sont importants dans le contrôle de l'activation des cellules inflammatoires. Cette hypothèse s'appuie sur différentes études qui ont caractérisé l'activité anti-inflammatoire ainsi que le phénotype de ces Treg TNFR2⁺. En 2008, l'équipe d'Oppenheim fut la première à montrer que les Treg TNFR2⁺ murins étaient la population de Treg la plus immunosuppressive (Chen et al., 2008). Nous confirmons les résultats de cette étude dans notre modèle d'arthrite en montrant que les Treg n'exprimant pas le TNFR2 sont moins immunosuppresseurs que les Treg TNFR2⁺. En 2013, l'équipe de Plebanski montra que les

cellules TNFR2⁺ CD25^{high} chez l'homme exprimaient plus fortement le CD39, le CD73 ainsi que le TGFβ (Govindaraj et al., 2013). Ces résultats suggèrent que ces Treg présentent un fort potentiel immunosuppresseur. D'autres études ont montré que ces mêmes Treg TNFR2⁺ exprimaient plus le CTLA-4 que les autres Treg renforçant cette idée que ces cellules sont les plus immunosuppressives (Chen et al., 2010). Dans ces mêmes études, il a été montré que les Treg TNFR2⁺ sont fortement impliqués dans la régulation de la réponse T puisqu'ils diminuent la production d'IFNγ par les Th1 et LT CD8⁺ (Govindaraj et al., 2013; Yan et al., 2015). Nos résultats montrent exactement la même chose, nous observons une diminution de la prolifération des Teff et de leur production d'IFNγ en présence de Treg TNFR2⁺. Nos résultats ainsi que la littérature suggèrent donc que les Treg TNFR2⁺ seraient fortement impliqués dans le contrôle de la réponse Th1. Ceci pourrait en partie expliquer l'augmentation de l'inflammation dans notre modèle d'arthrite puisqu'une réponse Th1 est mise en place dans ce type d'inflammation (Atkinson et al.). Il est à noter que nous avons aussi observé une augmentation de la capacité des LT CD4⁺ à produire de l'IL-17 en absence de Treg TNFR2⁺ dans notre modèle de psoriasis. Il est actuellement connu que ce modèle est basé sur l'activation de l'inflammation dépendante des Th17. Il est donc possible que les Treg TNFR2⁺ puissent aussi conduire à une régulation de l'inflammation associée aux Th17. L'intégralité de nos résultats ainsi que la littérature actuelle montrent clairement une implication des Treg TNFR2⁺ dans le contrôle de l'inflammation en présence de TNFα.

Pour terminer, des études ont fait émerger un nouveau type de cellules myéloïdes que sont les cellules myéloïdes suppressives (MDSC). Elles sont caractérisées par l'expression de CD11b et de Gr-1 et semblent fortement impliquées dans la mise en place d'un environnement anti-inflammatoire tumoral. La première étude ayant regardé le rôle des récepteurs du TNFα sur le comportement des MDSC date de 2012. Ce travail a mis en évidence que l'absence de TNFR empêchait l'accumulation de MDSC au niveau de la tumeur et facilitait ainsi la mise en place de la réponse anti-tumorale (Zhao et al., 2012). En 2014, des travaux plus poussés ont montré l'importance de l'expression du TNFR2 à la surface des MDSC (Hu et al., 2014). Les MDSC TNFR2⁺ ont une capacité suppressive supérieure aux autres MDSC et cela est caractérisé par une augmentation de la production d'IL-10 et de TGFβ. Ces études ainsi que nos résultats laissent à penser que l'expression du TNFR2 à la

surface des cellules régulatrices, qu'elles soient d'origines myéloïdes ou lymphoïdes, faciliterait le contrôle de l'inflammation lorsqu'elle fait intervenir le TNF α .

E. Les Treg TNFR2⁺ sont liés à l'efficacité des traitements anti-TNF α dans la polyarthrite rhumatoïde

La PR est associée à une incapacité fonctionnelle des Treg à réguler l'inflammation (Behrens et al., 2007). Parmi les traitements les plus efficaces dans cette maladie, les anti-TNF α ont été développés pour neutraliser l'action du TNF α . En outre, ces traitements modifient aussi l'action et le phénotype des cellules immunitaires. Dans notre étude, nous avons montré que les anti-TNF α , quels qu'ils soient, induisaient une augmentation de la fréquence des Treg ainsi que celle des Treg TNFR2⁺ lorsque le patient est répondeur après trois mois de traitement. De plus, cet effet sur les Treg TNFR2⁺ est spécifique de la PR et spécifique des anti-TNF α puisque nous n'avons pas observé ce phénomène chez des patients PR traités avec du certolizumab (anti-IL-6 récepteur) ou chez des patients atteints de spondylarthrites (SPA) traités par anti-TNF α . L'hypothèse que nous formulons est que les Treg TNFR2⁺ joueraient un rôle déterminant dans les mécanismes d'action des traitements anti-TNF α dans la PR.

Les études concernant l'impact des anti-TNF α sur les Treg sont peu nombreuses et sont quasiment toutes produites par l'équipe d'Ehrenstein. La complexité de ces études réside dans le nombre important d'anti-TNF α disponibles pour traiter la PR. Cette équipe fût donc la première en 2004 à essayer de comprendre le mécanisme des anti-TNF α dans le traitement de la PR. Ce premier travail a mis en évidence que les Treg de patients PR étaient incapables de réduire la production d'IFN γ , de TNF α et d'IL-2 par les Teff avant un traitement anti-TNF α (Ehrenstein et al., 2004). Cependant, un traitement par anticorps monoclonal anti-TNF α (infliximab) augmentait la fréquence des Treg et restaurait leur capacité à inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires par les Teff. En 2007, cette même équipe a caractérisé plus précisément les Treg induits par un traitement par l'infliximab. Ces Treg ont une plus grande capacité à sécréter l'IL-10 ainsi que du TGF β et perdent l'expression de CD62L (Nadkarni et al., 2007). Comme nous l'avons vu précédemment, les Treg TNFR2⁺ jouent un rôle majeur dans la régulation de la production de cytokines pro-inflammatoires et particulièrement celles sécrétées par les Th1. Nous pouvons donc penser que les Treg induits par l'infliximab soient des Treg TNFR2⁺. C'est ce que nous avons mis en évidence dans

notre étude. Nous avons observé une augmentation de la fréquence des Treg TNFR2⁺ circulant après traitement anti-TNF α . Nous pouvons donc supposer que l'augmentation de l'activité immunosuppressive des Treg observée par Ehrenstein après traitement avec l'infliximab est associée à une augmentation des Treg TNFR2⁺. De plus, notre étude a permis de montrer que l'augmentation des Treg TNFR2⁺ était présente quel que soit l'anti-TNF α utilisé suggérant que l'augmentation de l'activité immunosuppressive des Treg n'est pas spécifique du traitement avec l'infliximab.

La description des mécanismes des anti-TNF α dans la PR a été approfondie en 2012. Cette fois ci, l'équipe d'Ehrenstein a montré pour la première fois que tous les anti-TNF α ne fonctionnaient pas de la même manière. Cette étude a ainsi montré que l'utilisation d'adalimumab (anticorps anti-TNF α humanisé) augmentait la fréquence des Treg dans la PR (McGovern et al., 2012). En revanche, cette augmentation n'a pas été observée chez des patients PR traités par l'etanercept (dimère TNFR2 soluble + chaîne lourde d'Ig dimérisée). Ces résultats sont en contradiction avec ceux que nous avons observés au cours de notre étude. Nous avons montré que quel que soit l'anti-TNF α utilisé, il y avait une augmentation de la fréquence des Treg dans le sang si le patient était répondeur après trois mois de traitement. Cette divergence de résultat peut s'expliquer par la méthodologie utilisée pour arriver à ces conclusions. Lors de l'étude de 2012, l'équipe d'Ehrenstein a effectué une étude transversale. Il a comparé des patients PR traités avec de l'adalimumab avec des patients traités avec de l'etanercept. Dans notre étude, nous avons utilisé une approche longitudinale où chaque patient est son propre contrôle. Cette méthode a permis de prendre en compte la variabilité inter-individuelle. Il n'est pas à exclure que les patients traités par adalimumab de l'étude d'Ehrenstein, présentaient un pourcentage de Treg supérieur à celui des patients traités par etanercept avant le début du traitement, empêchant ainsi de mettre en évidence une augmentation des Treg chez les patients traités par etanercept. L'autre message de cette étude de 2012, était que les Treg produisaient de l'IL-17 en condition inflammatoire et que cette production pouvait être diminuée par un traitement avec de l'adalimumab. Comme discuté précédemment, les Th17 et les Treg sont en partie gouvernés par la balance STAT5/STAT3. De plus, l'expression du TNFR2 a été montré comme augmentant l'expression de STAT5 (Laurence et al., 2007; Miller et al., 2015). Nous pouvons donc penser que l'augmentation de la fréquence des Treg exprimant le TNFR2 que nous observons pourrait

favoriser l'expression de STAT5 et être responsable de la diminution de la sécrétion de l'IL-17 par les Treg. Cependant, reste à savoir comment les anti-TNF α augmentent la fréquence des Treg TNFR2⁺.

Une partie de la réponse à cette question a été donnée en 2016 par une nouvelle étude d'Ehrenstein. Il a mis en évidence qu'*in vitro* l'adalimumab augmentait la fréquence des Treg dans des cultures de PBMC, contrairement à l'etanercept (Nguyen and Ehrenstein, 2016). Selon cette étude, l'adalimumab se fixerait au TNF α membranaire des monocytes, entraînant une augmentation de l'expression de ce dernier. Ces monocytes exprimant fortement le TNF α membranaire pourraient interagir avec le TNFR2 présent à la surface des Treg et ainsi conduire à leur expansion. Ce mécanisme expliquerait pourquoi nous observons une augmentation des Treg TNFR2⁺ au cours de traitement faisant intervenir des anticorps anti-TNF α monoclonaux. Cependant, nous observons aussi une augmentation de la fréquence des Treg en cas de traitement avec l'etanercept contrairement à Ehrenstein. Il est possible que les anti-TNF α n'aient pas un seul mode d'action, même si le mécanisme précédent est le seul décrit à l'heure actuelle. Un mécanisme que nous pouvons proposer quant à l'action de l'etanercept pour augmenter les Treg TNFR2⁺ est en lien direct avec la concentration plasmatique, tissulaire ou articulaire de TNF α . Nous suggérons que l'etanercept pourrait principalement neutraliser le TNF α soluble présent dans la PR (Barrera et al., 1993). Cela permettrait de diminuer l'activation de la signalisation du TNFR1 puisque ce dernier est majoritairement activé par le TNF α soluble. Cette diminution de la disponibilité du TNF α soluble favoriserait la fixation du TNF α membranaire sur le TNFR2 des Treg et, comme dans le modèle précédemment décrit, permettrait l'expansion des Treg. Ce mécanisme pourrait ainsi expliquer pourquoi nous observons une augmentation des Treg TNFR2⁺ chez des patients PR lorsqu'ils sont traités avec de l'etanercept. Cette étude ainsi que nos résultats montrent que les anti-TNF α n'ont pas comme seul rôle d'inhiber le TNF α mais peuvent aussi moduler le phénotype et l'action des cellules immunitaires et particulièrement celui des Treg. De plus, il semblerait que les mécanismes d'action varient selon le type d'anti-TNF α . Si, dans la même pathologie les anti-TNF α agissent de manière différente, nous pouvons nous poser la question du mode d'action des anti-TNF α dans des pathologies inflammatoires autres que la PR.

Au cours de nos études, nous avons pu suivre l'évolution des populations de Treg et de Treg TNFR2⁺ chez des patients PR traités avec des anti-IL6R ou chez des patients SPA traités par anti-TNF α . Nous n'avons pas observé d'augmentation des Treg TNFR2⁺ dans ces deux groupes de patients. Cela indique que l'effet des anti-TNF α sur les Treg TNFR2⁺ semble spécifique des anti-TNF α dans le traitement de la PR, et que ces traitements n'agissent pas de la même manière en fonction de la pathologie. Concernant l'action des anti-IL-6R dans le traitement de la PR, notre équipe avait déjà montré que cette molécule entraînait une augmentation de la fréquence des Treg CD39⁺ dans le sang de patients PR après 3 mois (Thiolat et al., 2014). Nous confirmons ces résultats sur notre groupe de patients indiquant ainsi un rôle des anti-IL6R dans l'augmentation des Treg CD39⁺ dans le traitement de la PR (résultats non montrés).

Actuellement, aucune étude n'avait encore été effectuée sur l'impact des anti-TNF α sur les Treg et les Treg TNFR2⁺ dans le traitement de la SPA. Nous avons pu montrer que les anti-TNF α n'entraînaient ni une augmentation des Treg (même si une tendance à l'augmentation est observée) ni des Treg TNFR2⁺ après trois mois de traitement. Un des paramètres qui pourrait expliquer l'absence d'augmentation des Treg TNFR2⁺ est le niveau élevé de Treg TNFR2⁺ déjà présent avant le début du traitement chez les patients SPA. Nous avons en effet observé que la fréquence de ces Treg dans le sang des patients SPA était significativement plus élevée avant le traitement que chez les patients PR (résultats non montrés). Ceci nous suggère que, les anti-TNF α dans le cadre du traitement de la PR permettraient de restaurer un niveau de Treg TNFR2⁺ comparable à celui mis en place lors d'une inflammation.

L'ensemble de nos résultats ainsi que les travaux déjà publiés, nous indiquent que les Treg TNFR2⁺ sont des acteurs essentiels de la régulation de l'inflammation dans la PR. La présence du TNFR2 à la surface des Treg permettrait d'augmenter la prolifération de ces derniers. L'activation de cette voie de signalisation semble donc une cible de choix dans le traitement de la PR. Il est cependant à noter que le TNFR2 peut aussi permettre au Teff de proliférer favorisant ainsi l'inflammation (Chen et al., 2016b). Cette étude de 2016 a montré que l'absence de TNFR2 chez la souris entraînait une diminution de la prolifération des Teff dans un modèle de colite. Ces Teff produisent moins d'IFN γ et prolifèrent moins après une stimulation TCR. Ces résultats mettent en évidence un rôle pro-inflammatoire du TNFR2. Il

reste donc à savoir si l'utilisation d'agoniste du TNFR2 aura globalement un effet plus anti-inflammatoire que pro-inflammatoire. Un début de réponse a été apporté tout récemment, puisqu'en janvier 2018, deux équipes ont montré que l'activation du TNFR2 par un anticorps agoniste diminuait les paramètres cliniques et histologiques dans l'arthrite expérimentale au collagène (Fischer et al.; Lamontain et al., 2018). Ces études portent à croire que l'activation du TNFR2 favoriserait la réponse anti-inflammatoire comme nous le suggérons tout au long de notre étude.

Notions	Littérature	Thèse
La signalisation TNF α -TNFR2 induit une augmentation de la stabilité de FoxP3	(Chen et al., 2013; Okubo et al., 2013)	Page 133
La signalisation TNF α -TNFR2 induit une augmentation de la prolifération des Treg	(Chen et al., 2013)	Page 133
La signalisation TNF α -TNFR2 induit une augmentation de l'expression du CD25		Page 133
Les Treg TNFR2 ⁺ présentent un fort potentiel immunosuppresseur	(Chen et al., 2008)	
Le TSDR de FoxP3 est hyperméthylé dans les Teff et hypométhylé dans les Treg	(Toker et al., 2013)	Page 134
L'expression du TNFR2 à la surface des Treg favorise la déméthylation du TSDR de FoxP3		Page 134
Les anti-TNF α restaurent les capacités suppressives des Treg chez les patients PR	(Ehrenstein et al., 2004)	
La fréquence des Treg est plus importante chez les patients PR traités par infliximab que chez des donneurs sains ou des patients présentant une PR active	(Nadkarni et al., 2007)	
L'adalimumab induit une augmentation de la fréquence des Treg dans les PBMC de patients PR <i>in vitro</i> contrairement à l'etanercept	(Nguyen and Ehrenstein, 2016)	
L'adalimumab augmente l'activation du TNFR2 à la surface des Treg via le TNF α membranaire des monocytes	(Nguyen and Ehrenstein, 2016)	
Les anti-TNF α , y compris l'etanercept, induisent une augmentation des Treg et des Treg TNFR2 ⁺ au cours du traitement chez les patients PR (étude longitudinale)		Page 135

Tableau 5 : Synthèse des travaux étudiant le rôle de la signalisation TNF α -TNFR2 sur les Treg

V. CONCLUSION

L'hypothèse principale de mon travail était que les Treg TNFR2⁺ pouvaient avoir un rôle important dans le contrôle de l'inflammation lorsque cette dernière est dépendante du TNF α . Durant cette thèse, je me suis employé à disséquer l'action du TNF α sur les Treg *in vitro* afin de mieux comprendre le comportement de ces cellules en condition inflammatoire. Par la suite, j'ai étudié le rôle du TNFR2 au cours de l'inflammation dépendante du TNF α par l'intermédiaire de deux modèles expérimentaux que sont l'arthrite DTHA et le psoriasis induit par l'imiquimod. Cela m'a permis de mieux comprendre l'influence que peut avoir ce récepteur sur les Treg *in vivo* et en condition inflammatoire. Pour terminer, j'ai étudié les effets des traitements anti-TNF α , dans la polyarthrite rhumatoïde, sur les Treg TNFR2⁺.

Nous avons pu mettre en évidence que l'expression du TNFR2 à la surface des Treg était primordial pour la stabilité des Treg en agissant sur la méthylation du TSDR et donc sur la stabilité de l'expression de *FoxP3*. Par la suite, grâce à nos deux modèles expérimentaux nous avons démontré l'importance capitale des Treg TNFR2⁺ dans le contrôle de l'inflammation dépendante du TNF α . Enfin, le travail effectué sur le sang de patients PR a permis de mettre en évidence le rôle important des Treg TNFR2⁺ dans l'efficacité des traitements anti-TNF α dans la PR. Pour conclure, l'ensemble de notre étude a mis en lumière le rôle majeur des Treg TNFR2⁺ dans le contrôle de l'inflammation dépendante du TNF α .

VI. REFERENCES

- Abdallah, M.A., Abdel-Hamid, M.F., Kotb, A.M., and Mabrouk, E.A. (2009). Serum interferon-gamma is a psoriasis severity and prognostic marker. *Cutis* 84, 163–168.
- Aceves-Avila, F.J., Báez-Molgado, S., Medina, F., and Fraga, A. (1998). Paleopathology in osseous remains from the 16th century. A survey of rheumatic diseases. *J. Rheumatol.* 25, 776–782.
- Aggarwal, B.B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 745–756.
- Airas, L., Hellman, J., Salmi, M., Bono, P., Puurunen, T., Smith, D.J., and Jalkanen, S. (1995). CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73. *J. Exp. Med.* 182, 1603–1608.
- Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A.J., Funovits, J., Felson, D.T., Bingham, C.O., Birnbaum, N.S., Burmester, G.R., Bykerk, V.P., Cohen, M.D., et al. (2010). 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 62, 2569–2581.
- Allan, S.E., Crome, S.Q., Crellin, N.K., Passerini, L., Steiner, T.S., Bacchetta, R., Roncarolo, M.G., and Levings, M.K. (2007). Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int. Immunol.* 19, 345–354.
- Alvarez Salazar, E.K., Cortés-Hernández, A., Alemán-Muench, G.R., Alberú, J., Rodríguez-Aguilera, J.R., Recillas-Targa, F., Chagoya de Sánchez, V., Cuevas, E., Mancilla-Urrea, E., Pérez García, M., et al. (2017). Methylation of FOXP3 TSDR Underlies the Impaired Suppressive Function of Tregs from Long-term Belatacept-Treated Kidney Transplant Patients. *Front. Immunol.* 8.
- Alwan, W., and Nestle, F.O. (2015). Pathogenesis and treatment of psoriasis: exploiting pathophysiological pathways for precision medicine. *Clin. Exp. Rheumatol.* 33, S2-6.
- Annunziato, F., Cosmi, L., Liotta, F., Lazzeri, E., Manetti, R., Vanini, V., Romagnani, P., Maggi, E., and Romagnani, S. (2002). Phenotype, Localization, and Mechanism of Suppression of CD4+CD25+ Human Thymocytes. *J. Exp. Med.* 196, 379–387.
- Apostolou, I., Sarukhan, A., Klein, L., and von Boehmer, H. (2002). Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat. Immunol.* 3, 756–763.
- Arend, W.P., and Firestein, G.S. (2012). Pre-rheumatoid arthritis: predisposition and transition to clinical synovitis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 8, 573–586.
- Astier, A.L., Meiffren, G., Freeman, S., and Hafler, D.A. (2006). Alterations in CD46-mediated Tr1 regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* 116, 3252–3257.
- Atkinson, S.M., Usher, P.A., Kvist, P.H., Markholst, H., Haase, C., and Nansen, A. (2012). Establishment and characterization of a sustained delayed-type hypersensitivity model with arthritic manifestations in C57BL/6J mice. *Arthritis Res. Ther.* 14, R134.

Atkinson, S.M., Hoffmann, U., Hamann, A., Bach, E., Danneskiold-Samsøe, N.B., Kristiansen, K., Serikawa, K., Fox, B., Kruse, K., Haase, C., et al. (2016). Depletion of regulatory T cells leads to an exacerbation of delayed-type hypersensitivity arthritis in C57BL/6 mice that can be counteracted by IL-17 blockade. *Dis. Model. Mech.* *9*, 427–440.

Awasthi, A., Carrier, Y., Peron, J.P.S., Bettelli, E., Kamanaka, M., Flavell, R.A., Kuchroo, V.K., Oukka, M., and Weiner, H.L. (2007). A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat. Immunol.* *8*, 1380–1389.

Baecklund, E., Sundström, C., Ekblom, A., Catrina, A.I., Biberfeld, P., Feltelius, N., and Klareskog, L. (2003). Lymphoma subtypes in patients with rheumatoid arthritis: increased proportion of diffuse large B cell lymphoma. *Arthritis Rheum.* *48*, 1543–1550.

Barrat, F.J., Cua, D.J., Boonstra, A., Richards, D.F., Crain, C., Savelkoul, H.F., de Waal-Malefyt, R., Coffman, R.L., Hawrylowicz, C.M., and O'Garra, A. (2002). In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J. Exp. Med.* *195*, 603–616.

Barrera, P., Th. Boerbooms, A.M., Janssen, E.M., Sauerwein, R.W., Gallati, H., Mulder, J., Boo, T.D., Demacker, P.N.M., Van De Putte, L.B.A., and Van Der Meer, J.W.M. (1993). Circulating soluble tumor necrosis factor receptors, interleukin-2 receptors, tumor necrosis factor α , and interleukin-6 levels in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *36*, 1070–1079.

Barthel, R., Tsytsykova, A.V., Barczak, A.K., Tsai, E.Y., Dascher, C.C., Brenner, M.B., and Goldfeld, A.E. (2003). Regulation of tumor necrosis factor alpha gene expression by mycobacteria involves the assembly of a unique enhanceosome dependent on the coactivator proteins CBP/p300. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 526–533.

Behrens, F., Himsel, A., Rehart, S., Stanczyk, J., Beutel, B., Zimmermann, S.Y., Koehl, U., Möller, B., Gay, S., Kaltwasser, J.P., et al. (2007). Imbalance in distribution of functional autologous regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *66*, 1151–1156.

Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., Whitesell, L., Kelly, T.E., Saulsbury, F.T., Chance, P.F., and Ochs, H.D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* *27*, 20–21.

Benson, M.J., Pino-Lagos, K., Roseblatt, M., and Noelle, R.J. (2007). All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J. Exp. Med.* *204*, 1765–1774.

Bessis, N., Decker, P., Assier, E., Semerano, L., and Boissier, M.-C. (2017). Arthritis models: usefulness and interpretation. *Semin. Immunopathol.* *39*, 469–486.

Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* *441*, 235–238.

Beutner, K.R., and Tyring, S. (1997). Human papillomavirus and human disease. *Am. J. Med.* *102*, 9–15.

Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., et al. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* *385*, 729–733.

Blanco, F.J., Ochs, R.L., Schwarz, H., and Lotz, M. (1995). Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am. J. Pathol.* *146*, 75–85.

Bours, M.J.L., Swennen, E.L.R., Di Virgilio, F., Cronstein, B.N., and Dagnelie, P.C. (2006). Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol. Ther.* *112*, 358–404.

Bradfield, P.F., Amft, N., Vernon-Wilson, E., Exley, A.E., Parsonage, G., Rainger, G.E., Nash, G.B., Thomas, A.M.C., Simmons, D.L., Salmon, M., et al. (2003). Rheumatoid fibroblast-like synoviocytes overexpress the chemokine stromal cell-derived factor 1 (CXCL12), which supports distinct patterns and rates of CD4+ and CD8+ T cell migration within synovial tissue. *Arthritis Rheum.* *48*, 2472–2482.

Brenner, D., Blaser, H., and Mak, T.W. (2015). Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 362–374.

Bresnihan, B., Alvaro-Gracia, J.M., Cobby, M., Doherty, M., Domljan, Z., Emery, P., Nuki, G., Pavelka, K., Rau, R., Rozman, B., et al. (1998). Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum.* *41*, 2196–2204.

Brinkman, B.M., Telliez, J.B., Schievella, A.R., Lin, L.L., and Goldfeld, A.E. (1999). Engagement of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 leads to ATF-2- and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent TNF- α gene expression. *J. Biol. Chem.* *274*, 30882–30886.

Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paepers, B., Clark, L.B., Yasayko, S.A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F., and Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* *27*, 68–73.

Buch, M.H., Boyle, D.L., Rosengren, S., Saleem, B., Reece, R.J., Rhodes, L.A., Radjenovic, A., English, A., Tang, H., Vratsanos, G., et al. (2009). Mode of action of abatacept in rheumatoid arthritis patients having failed tumour necrosis factor blockade: a histological, gene expression and dynamic magnetic resonance imaging pilot study. *Ann. Rheum. Dis.* *68*, 1220–1227.

Buch, M.H., Smolen, J.S., Betteridge, N., Breedveld, F.C., Burmester, G., Dörner, T., Ferraccioli, G., Gottenberg, J.-E., Isaacs, J., Kvien, T.K., et al. (2011). Updated consensus statement on the use of rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *70*, 909–920.

Burchill, M.A., Yang, J., Vogtenhuber, C., Blazar, B.R., and Farrar, M.A. (2007). IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3⁺ regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 280–290.

Burchill, M.A., Yang, J., Vang, K.B., Moon, J.J., Chu, H.H., Lio, C.-W.J., Vegoe, A.L., Hsieh, C.-S., Jenkins, M.K., and Farrar, M.A. (2008). Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity* *28*, 112–121.

Burmester, G.R., Mariette, X., Montecucco, C., Monteagudo-Sáez, I., Malaise, M., Tzioufas, A.G., Bijlsma, J.W.J., Unnebrink, K., Kary, S., and Kupper, H. (2007). Adalimumab alone and in combination with disease-modifying antirheumatic drugs for the treatment of rheumatoid arthritis in clinical practice: the Research in Active Rheumatoid Arthritis (ReAct) trial. *Ann. Rheum. Dis.* *66*, 732–739.

Cai, Z., Jitkaew, S., Zhao, J., Chiang, H.-C., Choksi, S., Liu, J., Ward, Y., Wu, L.-G., and Liu, Z.-G. (2014). Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nat. Cell Biol.* *16*, 55–65.

Capellino, S., Cosentino, M., Wolff, C., Schmidt, M., Grifka, J., and Straub, R.H. (2010). Catecholamine-producing cells in the synovial tissue during arthritis: modulation of sympathetic neurotransmitters as new therapeutic target. *Ann. Rheum. Dis.* *69*, 1853–1860.

Carter, J.D., Calabrese, G.M., Naganuma, M., and Lorenz, U. (2005). Deficiency of the Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1 (SHP-1) causes enrichment of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 6627–6638.

Cascão, R., Rosário, H.S., Souto-Carneiro, M.M., and Fonseca, J.E. (2010). Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. *Autoimmun. Rev.* *9*, 531–535.

Case, J.P. (2001). Old and new drugs used in rheumatoid arthritis: a historical perspective. Part 1: the older drugs. *Am. J. Ther.* *8*, 123–143.

Chabaud, M., Fossiez, F., Taupin, J.L., and Miossec, P. (1998). Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *161*, 409–414.

Charles, K.A., Kulbe, H., Soper, R., Escorcio-Correia, M., Lawrence, T., Schultheis, A., Chakravarty, P., Thompson, R.G., Kollias, G., Smyth, J.F., et al. (2009). The tumor-promoting actions of TNF- α involve TNFR1 and IL-17 in ovarian cancer in mice and humans. *J. Clin. Invest.* *119*, 3011–3023.

Chaudhry, A., Rudra, D., Treuting, P., Samstein, R.M., Liang, Y., Kas, A., and Rudensky, A.Y. (2009). CD4⁺ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science* *326*, 986–991.

Chen, J., Wright, K., Davis, J.M., Jeraldo, P., Marietta, E.V., Murray, J., Nelson, H., Matteson, E.L., and Taneja, V. (2016a). An expansion of rare lineage intestinal microbes characterizes rheumatoid arthritis. *Genome Med.* *8*, 43.

Chen, X., Baumel, M., Mannel, D.N., Howard, O.M.Z., and Oppenheim, J.J. (2007). Interaction of TNF with TNF Receptor Type 2 Promotes Expansion and Function of Mouse CD4+CD25+ T Regulatory Cells. *J. Immunol.* *179*, 154–161.

Chen, X., Subleski, J.J., Kopf, H., Howard, O.M.Z., Mannel, D.N., and Oppenheim, J.J. (2008). Cutting Edge: Expression of TNFR2 Defines a Maximally Suppressive Subset of Mouse CD4+CD25+FoxP3+ T Regulatory Cells: Applicability to Tumor-Infiltrating T Regulatory Cells. *J. Immunol.* *180*, 6467–6471.

Chen, X., Subleski, J.J., Hamano, R., Howard, O.M.Z., Wiltrot, R.H., and Oppenheim, J.J. (2010). Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4⁺ FOXP3⁺ regulatory T cells in human peripheral blood: Immunomodulation. *Eur. J. Immunol.* *40*, 1099–1106.

Chen, X., Wu, X., Zhou, Q., Howard, O.M.Z., Netea, M.G., and Oppenheim, J.J. (2013). TNFR2 Is Critical for the Stabilization of the CD4+Foxp3+ Regulatory T Cell Phenotype in the Inflammatory Environment. *J. Immunol.* *190*, 1076–1084.

Chen, X., Nie, Y., Xiao, H., Bian, Z., Scarzello, A.J., Song, N.-Y., Trivett, A.L., Yang, D., and Oppenheim, J.J. (2016b). TNFR2 expression by CD4 effector T cells is required to induce full-fledged experimental colitis. *Sci. Rep.* *6*.

Chizzolini, C., Chicheportiche, R., Alvarez, M., de Rham, C., Roux-Lombard, P., Ferrari-Lacraz, S., and Dayer, J.-M. (2008). Prostaglandin E2 synergistically with interleukin-23 favors human Th17 expansion. *Blood* *112*, 3696–3703.

Choi, J.W., Kim, D.G., Park, M.C., Um, J.Y., Han, J.M., Park, S.G., Choi, E.-C., and Kim, S. (2009). AIMP2 promotes TNF α -dependent apoptosis via ubiquitin-mediated degradation of TRAF2. *J. Cell Sci.* *122*, 2710–2715.

Chopra, M., Biehl, M., Steinfatt, T., Brandl, A., Kums, J., Amich, J., Vaeth, M., Kuen, J., Holtappels, R., Podlech, J., et al. (2016). Exogenous TNFR2 activation protects from acute GvHD via host T reg cell expansion. *J. Exp. Med.* *jem.20151563*.

Chunder, N., Wang, L., Chen, C., Hancock, W.W., and Wells, A.D. (2012). Cyclin-dependent kinase 2 controls peripheral immune tolerance. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *189*, 5659–5666.

Chung, Y., Tanaka, S., Chu, F., Nurieva, R.I., Martinez, G.J., Rawal, S., Wang, Y.-H., Lim, H., Reynolds, J.M., Zhou, X., et al. (2011). Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat. Med.* *17*, 983–988.

de Cid, R., Riveira-Munoz, E., Zeeuwen, P.L.J.M., Robarge, J., Liao, W., Dannhauser, E.N., Giardina, E., Stuart, P.E., Nair, R., Helms, C., et al. (2009). Deletion of the late cornified envelope LCE3B and LCE3C genes as a susceptibility factor for psoriasis. *Nat. Genet.* *41*, 211–215.

Clark, I.M., Powell, L.K., Ramsey, S., Hazleman, B.L., and Cawston, T.E. (1993). The measurement of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP), and collagenase-

TIMP complex in synovial fluids from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *36*, 372–379.

Cobbold, S.P., Adams, E., Farquhar, C.A., Nolan, K.F., Howie, D., Lui, K.O., Fairchild, P.J., Mellor, A.L., Ron, D., and Waldmann, H. (2009). Infectious tolerance via the consumption of essential amino acids and mTOR signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 12055–12060.

Coombes, J.L., Siddiqui, K.R.R., Arancibia-Cárcamo, C.V., Hall, J., Sun, C.-M., Belkaid, Y., and Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* *204*, 1757–1764.

Cornell, R.C., and Stoughton, R.B. (1981). Six-month controlled study of effect of desoximetasone and betamethasone 17-valerate on the pituitary-adrenal axis. *Br. J. Dermatol.* *105*, 91–95.

Cronk, J.C., Derecki, N.C., Ji, E., Xu, Y., Lampano, A.E., Smirnov, I., Baker, W., Norris, G.T., Marin, I., Coddington, N., et al. (2015). Methyl-CpG Binding Protein 2 Regulates Microglia and Macrophage Gene Expression in Response to Inflammatory Stimuli. *Immunity* *42*, 679–691.

Dang, E.V., Barbi, J., Yang, H.-Y., Jinasena, D., Yu, H., Zheng, Y., Bordman, Z., Fu, J., Kim, Y., Yen, H.-R., et al. (2011). Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell* *146*, 772–784.

Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J.-F., Enjyoji, K., Linden, J., Oukka, M., et al. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* *204*, 1257–1265.

Deng, G., Nagai, Y., Xiao, Y., Li, Z., Dai, S., Ohtani, T., Banham, A., Li, B., Wu, S.-L., Hancock, W., et al. (2015). Pim-2 Kinase Influences Regulatory T Cell Function and Stability by Mediating Foxp3 Protein N-terminal Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* *290*, 20211–20220.

Deng, Y., Chang, C., and Lu, Q. (2016). The Inflammatory Response in Psoriasis: a Comprehensive Review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* *50*, 377–389.

Diarra, D., Stolina, M., Polzer, K., Zwerina, J., Ominsky, M.S., Dwyer, D., Korb, A., Smolen, J., Hoffmann, M., Scheinecker, C., et al. (2007). Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat. Med.* *13*, 156–163.

Dieudé, P., Petit, E., Cailleau-Moindrault, S., Osorio, J., Pierlot, C., Martinez, M., Fauré, S., Alibert, O., Lasbleiz, S., De Toma, C., et al. (2002). Association between tumor necrosis factor receptor II and familial, but not sporadic, rheumatoid arthritis: evidence for genetic heterogeneity. *Arthritis Rheum.* *46*, 2039–2044.

Drosos, A.A., Christou, L., Galanopoulou, V., Tzioufas, A.G., and Tsiakou, E.K. (1993). D-penicillamine induced myasthenia gravis: clinical, serological and genetic findings. *Clin. Exp. Rheumatol.* *11*, 387–391.

- Drosos, A.A., Tsifetaki, N., Tsiakou, E.K., Timpanidou, M., Tsampoulas, C., Tatsis, C.K., Kotoulas, K., and Moutsopoulos, H.M. (1997). Influence of methotrexate on radiographic progression in rheumatoid arthritis: a sixty-month prospective study. *Clin. Exp. Rheumatol.* *15*, 263–267.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* *102*, 33–42.
- Dutta, S., and Ahmad, Y. (2011). The efficacy and safety of tacrolimus in rheumatoid arthritis. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* *3*, 283–291.
- Edwards, J.C.W., Szczepanski, L., Szechinski, J., Filipowicz-Sosnowska, A., Emery, P., Close, D.R., Stevens, R.M., and Shaw, T. (2004). Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* *350*, 2572–2581.
- Ehrenstein, M.R., Evans, J.G., Singh, A., Moore, S., Warnes, G., Isenberg, D.A., and Mauri, C. (2004). Compromised Function of Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis and Reversal by Anti-TNF α Therapy. *J. Exp. Med.* *200*, 277–285.
- Elder, J.T. (2006). PSORS1: linking genetics and immunology. *J. Invest. Dermatol.* *126*, 1205–1206.
- Elyaman, W., Bradshaw, E.M., Uyttenhove, C., Dardalhon, V., Awasthi, A., Imitola, J., Bettelli, E., Oukka, M., van Snick, J., Renaud, J.-C., et al. (2009). IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3⁺ natural regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 12885–12890.
- Emery, P., Fleischmann, R., Filipowicz-Sosnowska, A., Schechtman, J., Szczepanski, L., Kavanaugh, A., Racewicz, A.J., van Vollenhoven, R.F., Li, N.F., Agarwal, S., et al. (2006). The efficacy and safety of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate treatment: results of a phase IIB randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial. *Arthritis Rheum.* *54*, 1390–1400.
- ENCODE Project Consortium, Birney, E., Stamatoyannopoulos, J.A., Dutta, A., Guigó, R., Gingeras, T.R., Margulies, E.H., Weng, Z., Snyder, M., Dermitzakis, E.T., et al. (2007). Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* *447*, 799–816.
- Enesa, K., Zakkar, M., Chaudhury, H., Luong, L.A., Rawlinson, L., Mason, J.C., Haskard, D.O., Dean, J.L.E., and Evans, P.C. (2008). NF-kappaB suppression by the deubiquitinating enzyme Cezanne: a novel negative feedback loop in pro-inflammatory signaling. *J. Biol. Chem.* *283*, 7036–7045.
- Espel, E. (2005). The role of the AU-rich elements of mRNAs in controlling translation. *Semin. Cell Dev. Biol.* *16*, 59–67.

Eugster, H.-P., Frei, K., Bachmann, R., Bluethmann, H., Lassmann, H., and Fontana, A. (1999). Severity of symptoms and demyelination in MOG-induced EAE depends on TNFR1. *Eur. J. Immunol.* *29*, 626–632.

Faustman, D.L. (2017). TNF, TNF inducers, and TNFR2 agonists: A new path to type 1 diabetes treatment. *Diabetes Metab. Res. Rev.*

Feng, Y., van der Veecken, J., Shugay, M., Putintseva, E.V., Osmanbeyoglu, H.U., Dikiy, S., Hoyos, B.E., Moltedo, B., Hemmers, S., Treuting, P., et al. (2015). A mechanism for expansion of regulatory T-cell repertoire and its role in self-tolerance. *Nature* *528*, 132–136.

Filer, A., Parsonage, G., Smith, E., Osborne, C., Thomas, A.M.C., Curnow, S.J., Rainger, G.E., Raza, K., Nash, G.B., Lord, J., et al. (2006). Differential survival of leukocyte subsets mediated by synovial, bone marrow, and skin fibroblasts: site-specific versus activation-dependent survival of T cells and neutrophils. *Arthritis Rheum.* *54*, 2096–2108.

Fischer, R., Proske, M., Duffey, M., Stangl, H., Martinez, G.F., Peters, N., Kraske, A., Straub, R.H., Bethea, J.R., Kontermann, R.E., et al. Selective activation of tumor necrosis factor receptor 2 induces anti-inflammatory responses and alleviates experimental arthritis. *Arthritis Rheumatol.* n/a-n/a.

van der Fits, L., Mourits, S., Voerman, J.S.A., Kant, M., Boon, L., Laman, J.D., Cornelissen, F., Mus, A.-M., Floencia, E., Prens, E.P., et al. (2009). Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 5836–5845.

Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2005). A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *6*, 1142–1151.

Forestier, J. (1934). RHEUMATOID ARTHRITIS AND ITS TREATMENT BY GOLD SALTS. *The Lancet* *224*, 646–648.

Fotin-Mleczek, M., Henkler, F., Samel, D., Reichwein, M., Hausser, A., Parmryd, I., Scheurich, P., Schmid, J.A., and Wajant, H. (2002). Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. *J. Cell Sci.* *115*, 2757–2770.

Fukaura, H., Kent, S.C., Pietrusewicz, M.J., Khoury, S.J., Weiner, H.L., and Hafler, D.A. (1996). Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. *J. Clin. Invest.* *98*, 70–77.

Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T.A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., et al. (2013). Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* *504*, 446–450.

Gagliani, N., Jofra, T., Stabilini, A., Valle, A., Atkinson, M., Roncarolo, M.-G., and Battaglia, M. (2010). Antigen-specific dependence of Tr1-cell therapy in preclinical models of islet transplant. *Diabetes* *59*, 433–439.

Geiler, T., Kriegsmann, J., Keyszer, G.M., Gay, R.E., and Gay, S. (1994). A new model for rheumatoid arthritis generated by engraftment of rheumatoid synovial tissue and normal human cartilage into SCID mice. *Arthritis Rheum.* *37*, 1664–1671.

Genetic Analysis of Psoriasis Consortium & the Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Strange, A., Capon, F., Spencer, C.C.A., Knight, J., Weale, M.E., Allen, M.H., Barton, A., Band, G., Bellenguez, C., et al. (2010). A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1. *Nat. Genet.* *42*, 985–990.

Genovese, M.C., Van den Bosch, F., Roberson, S.A., Bojin, S., Biagini, I.M., Ryan, P., and Sloan-Lancaster, J. (2010). LY2439821, a humanized anti-interleukin-17 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: A phase I randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept study. *Arthritis Rheum.* *62*, 929–939.

Gershon, R.K., and Kondo, K. (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* *18*, 723–737.

Gilbert, K.E., Manalo, I.F., and Wu, J.J. (2015). Efficacy and safety of etanercept and adalimumab with and without a loading dose for psoriasis: A systematic review. *J. Am. Acad. Dermatol.* *73*, 329–331.

Goldfeld, A.E., McCaffrey, P.G., Strominger, J.L., and Rao, A. (1993). Identification of a novel cyclosporin-sensitive element in the human tumor necrosis factor alpha gene promoter. *J. Exp. Med.* *178*, 1365–1379.

Gondek, D.C., Lu, L.-F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S., and Noelle, R.J. (2005). Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 1783–1786.

Gottenberg, J.E., Ravaut, P., Cantagrel, A., Combe, B., Flipo, R.M., Schaefferbeke, T., Houvenagel, E., Gaudin, P., Loeuille, D., Rist, S., et al. (2012). Positivity for anti-cyclic citrullinated peptide is associated with a better response to abatacept: data from the “Orencia and Rheumatoid Arthritis” registry. *Ann. Rheum. Dis.* *71*, 1815–1819.

Govindaraj, C., Scalzo-Inguanti, K., Madondo, M., Hallo, J., Flanagan, K., Quinn, M., and Plebanski, M. (2013). Impaired Th1 immunity in ovarian cancer patients is mediated by TNFR2+ Tregs within the tumor microenvironment. *Clin. Immunol.* *149*, 97–110.

Govindaraj, C., Tan, P., Walker, P., Wei, A., Spencer, A., and Plebanski, M. (2014). Reducing TNF receptor 2+ regulatory T cells via the combined action of azacitidine and the HDAC inhibitor, panobinostat for clinical benefit in acute myeloid leukemia patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *20*, 724–735.

Grainger, J.R., Smith, K.A., Hewitson, J.P., McSorley, H.J., Marcus, Y., Filbey, K.J., Finney, C.A.M., Greenwood, E.J.D., Knox, D.P., Wilson, M.S., et al. (2010). Helminth secretions induce de novo T cell Foxp3 expression and regulatory function through the TGF- β pathway. *J. Exp. Med.* *207*, 2331–2341.

Gravallese, E.M., Harada, Y., Wang, J.T., Gorn, A.H., Thornhill, T.S., and Goldring, S.R. (1998). Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Am. J. Pathol.* *152*, 943–951.

Gregersen, P.K., Silver, J., and Winchester, R.J. (1987). The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *30*, 1205–1213.

Grossman, W.J., Verbsky, J.W., Barchet, W., Colonna, M., Atkinson, J.P., and Ley, T.J. (2004). Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* *21*, 589–601.

Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E., and Roncarolo, M.G. (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* *389*, 737–742.

Gubner, R., August, S., and Ginsberg, V. (1951). Therapeutic suppression of tissue reactivity. II. Effect of aminopterin in rheumatoid arthritis and psoriasis. *Am. J. Med. Sci.* *221*, 176–182.

Haas, T.L., Emmerich, C.H., Gerlach, B., Schmukle, A.C., Cordier, S.M., Rieser, E., Feltham, R., Vince, J., Warnken, U., Wenger, T., et al. (2009). Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction. *Mol. Cell* *36*, 831–844.

Hamano, R., Huang, J., Yoshimura, T., Oppenheim, J.J., and Chen, X. (2011). TNF optimally activates regulatory T cells by inducing TNF receptor superfamily members TNFR2, 4-1BB and OX40. *Eur. J. Immunol.* *41*, 2010–2020.

Hargreaves, D.C., Horng, T., and Medzhitov, R. (2009). Control of inducible gene expression by signal-dependent transcriptional elongation. *Cell* *138*, 129–145.

Haringman, J.J., Gerlag, D.M., Zwinderman, A.H., Smeets, T.J.M., Kraan, M.C., Baeten, D., McInnes, I.B., Bresnihan, B., and Tak, P.P. (2005). Synovial tissue macrophages: a sensitive biomarker for response to treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *64*, 834–838.

Harre, U., Georgess, D., Bang, H., Bozec, A., Axmann, R., Ossipova, E., Jakobsson, P.-J., Baum, W., Nimmerjahn, F., Szarka, E., et al. (2012). Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J. Clin. Invest.* *122*, 1791–1802.

Hartigan-O'Connor, D.J., Poon, C., Sinclair, E., and McCune, J.M. (2007). Human CD4+ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells. *J. Immunol. Methods* *319*, 41–52.

Hauer, J., Püschner, S., Ramakrishnan, P., Simon, U., Bongers, M., Federle, C., and Engelmann, H. (2005). TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by TRAF-binding TNFRs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 2874–2879.

- van der Heijde, D.M. (1995). Joint erosions and patients with early rheumatoid arthritis. *Br. J. Rheumatol.* *34 Suppl 2*, 74–78.
- Hess, A., Axmann, R., Rech, J., Finzel, S., Heindl, C., Kreitz, S., Sergeeva, M., Saake, M., Garcia, M., Kollias, G., et al. (2011). Blockade of TNF- α rapidly inhibits pain responses in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 3731–3736.
- Hetland, M.L., Ejbjerg, B., Hørslev-Petersen, K., Jacobsen, S., Vestergaard, A., Jurik, A.G., Stengaard-Pedersen, K., Junker, P., Lottenburger, T., Hansen, I., et al. (2009). MRI bone oedema is the strongest predictor of subsequent radiographic progression in early rheumatoid arthritis. Results from a 2-year randomised controlled trial (CIMESTRA). *Ann. Rheum. Dis.* *68*, 384–390.
- Heydendael, V.M.R., Spuls, P.I., Opmeer, B.C., de Borgie, C.A.J.M., Reitsma, J.B., Goldschmidt, W.F.M., Bossuyt, P.M.M., Bos, J.D., and de Rie, M.A. (2003). Methotrexate versus cyclosporine in moderate-to-severe chronic plaque psoriasis. *N. Engl. J. Med.* *349*, 658–665.
- Hoes, J.N., Jacobs, J.W.G., Boers, M., Boumpas, D., Buttgereit, F., Caeyers, N., Choy, E.H., Cutolo, M., Da Silva, J. a. P., Esselens, G., et al. (2007). EULAR evidence-based recommendations on the management of systemic glucocorticoid therapy in rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.* *66*, 1560–1567.
- Höfer, T., Krichevsky, O., and Altan-Bonnet, G. (2012). Competition for IL-2 between Regulatory and Effector T Cells to Chisel Immune Responses. *Front. Immunol.* *3*, 268.
- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* *299*, 1057–1061.
- Horwitz, D.A., Zheng, S.G., Wang, J., and Gray, J.D. (2008). Critical role of IL-2 and TGF-beta in generation, function and stabilization of Foxp3+CD4+ Treg. *Eur. J. Immunol.* *38*, 912–915.
- Hou, M.-S., Huang, S.-T., Tsai, M.-H., Yen, C.-C., Lai, Y.-G., Liou, Y.-H., Lin, C.-K., and Liao, N.-S. (2015). The interleukin-15 system suppresses T cell-mediated autoimmunity by regulating negative selection and nT(H)17 cell homeostasis in the thymus. *J. Autoimmun.* *56*, 118–129.
- Hsieh, C.-S., Liang, Y., Tyznik, A.J., Self, S.G., Liggitt, D., and Rudensky, A.Y. (2004). Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors. *Immunity* *21*, 267–277.
- Hsieh, C.-S., Zheng, Y., Liang, Y., Fontenot, J.D., and Rudensky, A.Y. (2006). An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat. Immunol.* *7*, 401–410.
- Hsu, H., Xiong, J., and Goeddel, D.V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* *81*, 495–504.

Hu, X., Li, B., Li, X., Zhao, X., Wan, L., Lin, G., Yu, M., Wang, J., Jiang, X., Feng, W., et al. (2014). Transmembrane TNF- α Promotes Suppressive Activities of Myeloid-Derived Suppressor Cells via TNFR2. *J. Immunol.* *192*, 1320–1331.

Hultgren, O., Eugster, H.-P., Sedgwick, J.D., Körner, H., and Tarkowski, A. (1998). TNF/Lymphotoxin- α Double-Mutant Mice Resist Septic Arthritis but Display Increased Mortality in Response to *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* *161*, 5937–5942.

Iobagiu, C., Magyar, A., Nogueira, L., Cornillet, M., Sebbag, M., Arnaud, J., Hudecz, F., and Serre, G. (2011). The antigen specificity of the rheumatoid arthritis-associated ACPA directed to citrullinated fibrin is very closely restricted. *J. Autoimmun.* *37*, 263–272.

Irwin, M.W., Mak, S., Mann, D.L., Qu, R., Penninger, J.M., Yan, A., Dawood, F., Wen, W.H., Shou, Z., and Liu, P. (1999). Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha in postinfarction dysfunctional myocardium. *Circulation* *99*, 1492–1498.

Isaacs, J.D., Cohen, S.B., Emery, P., Tak, P.P., Wang, J., Lei, G., Williams, S., Lal, P., and Read, S.J. (2013). Effect of baseline rheumatoid factor and anticitrullinated peptide antibody serotype on rituximab clinical response: a meta-analysis. *Ann. Rheum. Dis.* *72*, 329–336.

Israël, A. (2010). The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a000158.

Ito, T., Hanabuchi, S., Wang, Y.-H., Park, W.R., Arima, K., Bover, L., Qin, F.X.-F., Gilliet, M., and Liu, Y.-J. (2008). Two functional subsets of FOXP3⁺ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity* *28*, 870–880.

Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell* *126*, 1121–1133.

Jacobsson, L.T.H., Turesson, C., Gülfe, A., Kapetanovic, M.C., Petersson, I.F., Saxne, T., and Geborek, P. (2005). Treatment with tumor necrosis factor blockers is associated with a lower incidence of first cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* *32*, 1213–1218.

Johansen, C., Usher, P.A., Kjellerup, R.B., Lundsgaard, D., Iversen, L., and Kragballe, K. (2009). Characterization of the interleukin-17 isoforms and receptors in lesional psoriatic skin. *Br. J. Dermatol.* *160*, 319–324.

Johnson-Huang, L.M., Suárez-Fariñas, M., Pierson, K.C., Fuentes-Duculan, J., Cueto, I., Lentini, T., Sullivan-Whalen, M., Gilleaudeau, P., Krueger, J.G., Haider, A.S., et al. (2012). A single intradermal injection of IFN- γ induces an inflammatory state in both non-lesional psoriatic and healthy skin. *J. Invest. Dermatol.* *132*, 1177–1187.

Johnston, A., Gudjonsson, J.E., Sigmundsdottir, H., Love, T.J., and Valdimarsson, H. (2004). Peripheral blood T cell responses to keratin peptides that share sequences with streptococcal M proteins are largely restricted to skin-homing CD8⁽⁺⁾ T cells. *Clin. Exp. Immunol.* *138*, 83–93.

Josefowicz, S.Z., Wilson, C.B., and Rudensky, A.Y. (2009). Cutting edge: TCR stimulation is sufficient for induction of Foxp3 expression in the absence of DNA methyltransferase 1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 6648–6652.

Josefowicz, S.Z., Niec, R.E., Kim, H.Y., Treuting, P., Chinen, T., Zheng, Y., Umetsu, D.T., and Rudensky, A.Y. (2012). Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. *Nature* *482*, 395–399.

Kalliolias, G.D., and Ivashkiv, L.B. (2015). TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat. Rev. Rheumatol.* *12*, nrrheum.2015.169.

Kamphuis, S., Kuis, W., de Jager, W., Teklenburg, G., Massa, M., Gordon, G., Boerhof, M., Rijkers, G.T., Uiterwaal, C.S., Otten, H.G., et al. (2005). Tolerogenic immune responses to novel T-cell epitopes from heat-shock protein 60 in juvenile idiopathic arthritis. *Lancet Lond. Engl.* *366*, 50–56.

Keffer, J., Probert, L., Cazlaris, H., Georgopoulos, S., Kaslaris, E., Kioussis, D., and Kollias, G. (1991). Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J.* *10*, 4025–4031.

von Kempis, J., Dudler, J., Hasler, P., Kyburz, D., Tyndall, A., Zufferey, P., and Villiger, P.M. (2012). Use of abatacept in rheumatoid arthritis. *Swiss Med. Wkly.* *142*, w13581.

Kilpatrick, L.E., Sun, S., Mackie, D., Baik, F., Li, H., and Korchak, H.M. (2006). Regulation of TNF mediated antiapoptotic signaling in human neutrophils: role of delta-PKC and ERK1/2. *J. Leukoc. Biol.* *80*, 1512–1521.

Kim, E.Y., Priatel, J.J., Teh, S.-J., and Teh, H.-S. (2006). TNF Receptor Type 2 (p75) Functions as a Costimulator for Antigen-Driven T Cell Responses In Vivo. *J. Immunol.* *176*, 1026–1035.

Koch, M.A., Tucker-Heard, G., Perdue, N.R., Killebrew, J.R., Urdahl, K.B., and Campbell, D.J. (2009). The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat. Immunol.* *10*, 595–602.

Kochanek, S., Toth, M., Dehmel, A., Renz, D., and Doerfler, W. (1990). Interindividual concordance of methylation profiles in human genes for tumor necrosis factors alpha and beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 8830–8834.

Kochanek, S., Radbruch, A., Tesch, H., Renz, D., and Doerfler, W. (1991). DNA methylation profiles in the human genes for tumor necrosis factors alpha and beta in subpopulations of leukocytes and in leukemias. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 5759–5763.

Kouskoff, V., Korganow, A.S., Duchatelle, V., Degott, C., Benoist, C., and Mathis, D. (1996). Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* *87*, 811–822.

Kremer, J.M., Bloom, B.J., Breedveld, F.C., Coombs, J.H., Fletcher, M.P., Gruben, D., Krishnaswami, S., Burgos-Vargas, R., Wilkinson, B., Zerbini, C.A.F., et al. (2009). The safety and efficacy of a JAK inhibitor in patients with active rheumatoid arthritis: Results of a

double-blind, placebo-controlled phase IIa trial of three dosage levels of CP-690,550 versus placebo. *Arthritis Rheum.* *60*, 1895–1905.

Kretschmer, K., Apostolou, I., Hawiger, D., Khazaie, K., Nussenzweig, M.C., and von Boehmer, H. (2005). Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat. Immunol.* *6*, 1219–1227.

Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I., and Lu, S.D. (1988). A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* *53*, 45–53.

Kryczek, I., Bruce, A.T., Gudjonsson, J.E., Johnston, A., Aphale, A., Vatan, L., Szeliga, W., Wang, Y., Liu, Y., Welling, T.H., et al. (2008). Induction of IL-17+ T cell trafficking and development by IFN-gamma: mechanism and pathological relevance in psoriasis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 4733–4741.

Kryczek, I., Liu, R., Wang, G., Wu, K., Shu, X., Szeliga, W., Vatan, L., Finlayson, E., Huang, E., Simeone, D., et al. (2009). FOXP3 defines regulatory T cells in human tumor and autoimmune disease. *Cancer Res.* *69*, 3995–4000.

Lai, Y., Li, D., Li, C., Muehleisen, B., Radek, K.A., Park, H.J., Jiang, Z., Li, Z., Lei, H., Quan, Y., et al. (2012). The antimicrobial protein REG3A regulates keratinocyte proliferation and differentiation after skin injury. *Immunity* *37*, 74–84.

Lam, J., Takeshita, S., Barker, J.E., Kanagawa, O., Ross, F.P., and Teitelbaum, S.L. (2000). TNF- α induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J. Clin. Invest.* *106*, 1481–1488.

Lamontain, V., Schmid, T., Weber-Steffens, D., Zeller, D., Jenei-Lanzl, Z., Wajant, H., Straub, R.H., and Männel, D.N. (2018). Stimulation of TNF receptor type 2 expands regulatory T cells and ameliorates established collagen-induced arthritis in mice. *Cell. Mol. Immunol.*

Lathrop, S.K., Bloom, S.M., Rao, S.M., Nutsch, K., Lio, C.-W., Santacruz, N., Peterson, D.A., Stappenbeck, T.S., and Hsieh, C.-S. (2011). Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature* *478*, 250–254.

Laurence, A., Tato, C.M., Davidson, T.S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R.B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., et al. (2007). Interleukin-2 Signaling via STAT5 Constrains T Helper 17 Cell Generation. *Immunity* *26*, 371–381.

Laurence, A., Amarnath, S., Mariotti, J., Kim, Y.C., Foley, J., Eckhaus, M., O’Shea, J.J., and Fowler, D.H. (2012). STAT3 transcription factor promotes instability of nTreg cells and limits generation of iTreg cells during acute murine graft-versus-host disease. *Immunity* *37*, 209–222.

Leclerc, M., Naserian, S., Pilon, C., Thiolat, A., Martin, G.H., Pouchy, C., Dominique, C., Belkacemi, Y., Charlotte, F., Maury, S., et al. (2016). Control of GVHD by regulatory T cells depends on TNF produced by T cells and TNFR2 expressed by regulatory T cells. *Blood* *128*, 1651–1659.

Lee, A., Qiao, Y., Grigoriev, G., Chen, J., Park-Min, K.-H., Park, S.H., Ivashkiv, L.B., and Kalliolias, G.D. (2013). Tumor necrosis factor α induces sustained signaling and a prolonged and unremitting inflammatory response in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* *65*, 928–938.

Lee, D.M., Kiener, H.P., Agarwal, S.K., Noss, E.H., Watts, G.F.M., Chisaka, O., Takeichi, M., and Brenner, M.B. (2007). Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis. *Science* *315*, 1006–1010.

Lefèvre, S., Knedla, A., Tennie, C., Kampmann, A., Wunrau, C., Dinser, R., Korb, A., Schnäker, E.-M., Tärner, I.H., Robbins, P.D., et al. (2009). Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat. Med.* *15*, 1414–1420.

Legler, D.F., Micheau, O., Doucey, M.-A., Tschopp, J., and Bron, C. (2003). Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNF α -mediated NF- κ B activation. *Immunity* *18*, 655–664.

Li, J., McQuade, T., Siemer, A.B., Napetschnig, J., Moriwaki, K., Hsiao, Y.-S., Damko, E., Moquin, D., Walz, T., McDermott, A., et al. (2012). The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis. *Cell* *150*, 339–350.

Li, X.-M., Chen, X., Gu, W., Guo, Y.-J., Cheng, Y., Peng, J., and Guo, X.-J. (2017). Impaired TNF/TNFR2 signaling enhances Th2 and Th17 polarization and aggravates allergic airway inflammation. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* *313*, L592–L601.

Li, Z., Lin, F., Zhuo, C., Deng, G., Chen, Z., Yin, S., Gao, Z., Piccioni, M., Tsun, A., Cai, S., et al. (2014). PIM1 kinase phosphorylates the human transcription factor FOXP3 at serine 422 to negatively regulate its activity under inflammation. *J. Biol. Chem.* *289*, 26872–26881.

Liao, G., Detre, C., Berger, S.B., Engel, P., de Waal Malefyt, R., Herzog, R.W., Bhan, A.K., and Terhorst, C. (2012). Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related protein regulates CD4(+)T cell-mediated colitis in mice. *Gastroenterology* *142*, 582-591.e8.

Lio, C.-W.J., and Hsieh, C.-S. (2008). A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity* *28*, 100–111.

Little, C.B., Barai, A., Burkhardt, D., Smith, S.M., Fosang, A.J., Werb, Z., Shah, M., and Thompson, E.W. (2009). Matrix metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development. *Arthritis Rheum.* *60*, 3723–3733.

Liu, W., Putnam, A.L., Xu-Yu, Z., Szot, G.L., Lee, M.R., Zhu, S., Gottlieb, P.A., Kapranov, P., Gingeras, T.R., Fazekas de St Groth, B., et al. (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J. Exp. Med.* *203*, 1701–1711.

Liu, Y., Zhang, P., Li, J., Kulkarni, A.B., Perruche, S., and Chen, W. (2008a). A critical function for TGF- β signaling in the development of natural CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *9*, 632–640.

Liu, Y., Helms, C., Liao, W., Zaba, L.C., Duan, S., Gardner, J., Wise, C., Miner, A., Malloy, M.J., Pullinger, C.R., et al. (2008b). A genome-wide association study of psoriasis and psoriatic arthritis identifies new disease loci. *PLoS Genet.* *4*, e1000041.

Lizzul, P.F., Aphale, A., Malaviya, R., Sun, Y., Masud, S., Dombrovskiy, V., and Gottlieb, A.B. (2005). Differential expression of phosphorylated NF-kappaB/RelA in normal and psoriatic epidermis and downregulation of NF-kappaB in response to treatment with etanercept. *J. Invest. Dermatol.* *124*, 1275–1283.

van Loosdregt, J., Vercoulen, Y., Guichelaar, T., Gent, Y.Y.J., Beekman, J.M., van Beekum, O., Brenkman, A.B., Hijnen, D.-J., Mutis, T., Kalkhoven, E., et al. (2010). Regulation of Treg functionality by acetylation-mediated Foxp3 protein stabilization. *Blood* *115*, 965–974.

van Loosdregt, J., Fleskens, V., Fu, J., Brenkman, A.B., Bekker, C.P.J., Pals, C.E.G.M., Meerding, J., Berkers, C.R., Barbi, J., Gröne, A., et al. (2013). Stabilization of the transcription factor Foxp3 by the deubiquitinase USP7 increases Treg-cell-suppressive capacity. *Immunity* *39*, 259–271.

Lu, L., Barbi, J., and Pan, F. (2017). The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nat. Rev. Immunol.*

Luster, A.D., Alon, R., and Andrian, U.H. von (2005). Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat. Immunol.* *6*, 1182.

MacGregor, A.J., Snieder, H., Rigby, A.S., Koskenvuo, M., Kaprio, J., Aho, K., and Silman, A.J. (2000). Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum.* *43*, 30–37.

Mahdi, H., Fisher, B.A., Källberg, H., Plant, D., Malmström, V., Rönnelid, J., Charles, P., Ding, B., Alfredsson, L., Padyukov, L., et al. (2009). Specific interaction between genotype, smoking and autoimmunity to citrullinated alpha-enolase in the etiology of rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.* *41*, 1319–1324.

Malchow, S., Leventhal, D.S., Lee, V., Nishi, S., Socci, N.D., and Savage, P.A. (2016). Aire Enforces Immune Tolerance by Directing Autoreactive T Cells into the Regulatory T Cell Lineage. *Immunity* *44*, 1102–1113.

Mantel, P.-Y., Ouaked, N., Rückert, B., Karagiannidis, C., Welz, R., Blaser, K., and Schmidt-Weber, C.B. (2006). Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *176*, 3593–3602.

Marinova-Mutafchieva, L., Gabay, C., Funa, K., and Williams, R.O. (2006). Remission of collagen-induced arthritis is associated with high levels of transforming growth factor- β expression in the joint. *Clin. Exp. Immunol.* *146*, 287–293.

Marston, B., Palanichamy, A., and Anolik, J.H. (2010). B cells in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* *22*, 307–315.

- Martin, E.M., Remke, A., Pfeifer, E., Polz, J., Pietryga-Krieger, A., Steffens-Weber, D., Freudenberg, M.A., Mostbock, S., and Mannel, D.N. (2014). TNFR2 maintains adequate IL-12 production by dendritic cells in inflammatory responses by regulating endogenous TNF levels. *Innate Immun.* *20*, 712–720.
- Matsuda, S., and Koyasu, S. (2000). Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology* *47*, 119–125.
- Mauri, C., Williams, R.O., Walmsley, M., and Feldmann, M. (1996). Relationship between Th1/Th2 cytokine patterns and the arthritogenic response in collagen-induced arthritis. *Eur. J. Immunol.* *26*, 1511–1518.
- McGonagle, D., Tan, A.L., Møller Døhn, U., Ostergaard, M., and Benjamin, M. (2009). Microanatomic studies to define predictive factors for the topography of periarticular erosion formation in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* *60*, 1042–1051.
- McGovern, J.L., Nguyen, D.X., Notley, C.A., Mauri, C., Isenberg, D.A., and Ehrenstein, M.R. (2012). Th17 cells are restrained by Treg cells via the inhibition of interleukin-6 in patients with rheumatoid arthritis responding to anti-tumor necrosis factor antibody therapy. *Arthritis Rheum.* *64*, 3129–3138.
- McInnes, I.B., and Schett, G. (2011). The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N. Engl. J. Med.* *365*, 2205–2219.
- Miao, F., Gonzalo, I.G., Lanting, L., and Natarajan, R. (2004). In vivo chromatin remodeling events leading to inflammatory gene transcription under diabetic conditions. *J. Biol. Chem.* *279*, 18091–18097.
- Micheau, O., and Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* *114*, 181–190.
- Mijatovic, T., Houzet, L., Defrance, P., Droogmans, L., Huez, G., and Kruys, V. (2000). Tumor necrosis factor- α mRNA remains unstable and hypoadenylated upon stimulation of macrophages by lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.* *267*, 6004–6012.
- Miller, P.G., Bonn, M.B., and McKarns, S.C. (2015). Transmembrane TNF-TNFR2 Impairs Th17 Differentiation by Promoting IL2 Expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *195*, 2633–2647.
- Minigo, G., Woodberry, T., Piera, K.A., Salwati, E., Tjitra, E., Kenangalem, E., Price, R.N., Engwerda, C.R., Anstey, N.M., and Plebanski, M. (2009). Parasite-Dependent Expansion of TNF Receptor II-Positive Regulatory T Cells with Enhanced Suppressive Activity in Adults with Severe Malaria. *PLoS Pathog.* *5*.
- Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., et al. (2009). Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* *30*, 899–911.
- Mohamud, R., LeMasurier, J.S., Boer, J.C., Sieow, J.L., Rolland, J.M., O’Hehir, R.E., Hardy, C.L., and Plebanski, M. (2017). Synthetic Nanoparticles That Promote Tumor Necrosis Factor

Receptor 2 Expressing Regulatory T Cells in the Lung and Resistance to Allergic Airways Inflammation. *Front. Immunol.* **8**.

Mougiakakos, D., Johansson, C.C., Jitschin, R., Böttcher, M., and Kiessling, R. (2011). Increased thioredoxin-1 production in human naturally occurring regulatory T cells confers enhanced tolerance to oxidative stress. *Blood* **117**, 857–861.

Muller, S., and Radic, M. (2015). Citrullinated Autoantigens: From Diagnostic Markers to Pathogenetic Mechanisms. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **49**, 232–239.

Munker, R., Gasson, J., Ogawa, M., and Koeffler, H.P. (1986). Recombinant human TNF induces production of granulocyte-monocyte colony-stimulating factor. *Nature* **323**, 79–82.

Murphy, J.M., Czabotar, P.E., Hildebrand, J.M., Lucet, I.S., Zhang, J.-G., Alvarez-Diaz, S., Lewis, R., Lalaoui, N., Metcalf, D., Webb, A.I., et al. (2013). The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. *Immunity* **39**, 443–453.

Nadkarni, S., Mauri, C., and Ehrenstein, M.R. (2007). Anti-TNF- α therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF- β . *J. Exp. Med.* **204**, 33–39.

Nair, R.P., Duffin, K.C., Helms, C., Ding, J., Stuart, P.E., Goldgar, D., Gudjonsson, J.E., Li, Y., Tejasvi, T., Feng, B.-J., et al. (2009). Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways. *Nat. Genet.* **41**, 199–204.

Nair, V.S., Song, M.H., Ko, M., and Oh, K.I. (2016). DNA Demethylation of the Foxp3 Enhancer Is Maintained through Modulation of Ten-Eleven-Translocation and DNA Methyltransferases. *Mol. Cells* **39**, 888–897.

Nakae, S., Saijo, S., Horai, R., Sudo, K., Mori, S., and Iwakura, Y. (2003). IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 5986–5990.

Nakano, K., Boyle, D.L., and Firestein, G.S. (2013). Regulation of DNA methylation in rheumatoid arthritis synoviocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **190**, 1297–1303.

Nguyen, D.X., and Ehrenstein, M.R. (2016). Anti-TNF drives regulatory T cell expansion by paradoxically promoting membrane TNF-TNF-RII binding in rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* **213**, 1241–1253.

Nie, H., Zheng, Y., Li, R., Guo, T.B., He, D., Fang, L., Liu, X., Xiao, L., Chen, X., Wan, B., et al. (2013). Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF- α in rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* **19**, 322–328.

Nozawa, K., Fujishiro, M., Takasaki, Y., and Sekigawa, I. (2014). Inhibition of rheumatoid arthritis by blocking connective tissue growth factor. *World J. Orthop.* **5**, 653–659.

Okubo, Y., Mera, T., Wang, L., and Faustman, D.L. (2013). Homogeneous Expansion of Human T-Regulatory Cells Via Tumor Necrosis Factor Receptor 2. *Sci. Rep.* **3**.

- Ottaviani, C., Nasorri, F., Bedini, C., de Pità, O., Girolomoni, G., and Cavani, A. (2006). CD56^{bright}CD16⁽⁻⁾ NK cells accumulate in psoriatic skin in response to CXCL10 and CCL5 and exacerbate skin inflammation. *Eur. J. Immunol.* *36*, 118–128.
- Ouyang, W., Beckett, O., Ma, Q., Paik, J., DePinho, R.A., and Li, M.O. (2010). Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *11*, 618–627.
- Pacholczyk, R., Ignatowicz, H., Kraj, P., and Ignatowicz, L. (2006). Origin and T cell receptor diversity of Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ T cells. *Immunity* *25*, 249–259.
- Park, J.-H., Wacholder, S., Gail, M.H., Peters, U., Jacobs, K.B., Chanock, S.J., and Chatterjee, N. (2010). Estimation of effect size distribution from genome-wide association studies and implications for future discoveries. *Nat. Genet.* *42*, 570–575.
- Park, S.H., Park-Min, K.-H., Chen, J., Hu, X., and Ivashkiv, L.B. (2011). Tumor necrosis factor induces GSK3 kinase-mediated cross-tolerance to endotoxin in macrophages. *Nat. Immunol.* *12*, 607–615.
- Pasare, C., and Medzhitov, R. (2003). Toll pathway-dependent blockade of CD4⁺CD25⁺ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* *299*, 1033–1036.
- Pearce, E.J., Caspar, P., Grzych, J.-M., Lewis, F.A., and Sher, A. (2012). Pillars Article: Downregulation of Th1 Cytokine Production Accompanies Induction of Th2 Responses by a Parasitic Helminth, *Schistosoma mansoni*. *J. Exp. Med.* *199*, 159–166. *J. Immunol.* *189*, 1104–1111.
- Peters, M.J.L., Symmons, D.P.M., McCarey, D., Dijkmans, B. a. C., Nicola, P., Kvien, T.K., McInnes, I.B., Haentzschel, H., Gonzalez-Gay, M.A., Provan, S., et al. (2010). EULAR evidence-based recommendations for cardiovascular risk management in patients with rheumatoid arthritis and other forms of inflammatory arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *69*, 325–331.
- Plenge, R.M., Cotsapas, C., Davies, L., Price, A.L., de Bakker, P.I.W., Maller, J., Pe'er, I., Burtt, N.P., Blumenstiel, B., DeFelice, M., et al. (2007). Two independent alleles at 6q23 associated with risk of rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.* *39*, 1477–1482.
- Polansky, J.K., Kretschmer, K., Freyer, J., Floess, S., Garbe, A., Baron, U., Olek, S., Hamann, A., von Boehmer, H., and Huehn, J. (2008). DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur. J. Immunol.* *38*, 1654–1663.
- Polzer, K., Baeten, D., Soleiman, A., Distler, J., Gerlag, D.M., Tak, P.P., Schett, G., and Zwerina, J. (2008). Tumour necrosis factor blockade increases lymphangiogenesis in murine and human arthritic joints. *Ann. Rheum. Dis.* *67*, 1610–1616.
- Powrie, F., and Mason, D. (1990). OX-22^{high} CD4⁺ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22^{low} subset. *J. Exp. Med.* *172*, 1701–1708.

Punit, S., Dubé, P.E., Liu, C.Y., Girish, N., Washington, M.K., and Polk, D.B. (2015). Tumor Necrosis Factor Receptor 2 Restricts the Pathogenicity of CD8+ T Cells in Mice With Colitis. *Gastroenterology* 149, 993–1005.

Qureshi, O.S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E.M., Baker, J., Jeffery, L.E., Kaur, S., Briggs, Z., et al. (2011). Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* 332, 600–603.

Rajan, N., and Langtry, J. a. A. (2006). Generalized exacerbation of psoriasis associated with imiquimod cream treatment of superficial basal cell carcinomas. *Clin. Exp. Dermatol.* 31, 140–141.

Ramirez-Carrozzi, V., Sambandam, A., Luis, E., Lin, Z., Jeet, S., Lesch, J., Hackney, J., Kim, J., Zhou, M., Lai, J., et al. (2011). IL-17C regulates the innate immune function of epithelial cells in an autocrine manner. *Nat. Immunol.* 12, 1159–1166.

Ranjbar, S., Rajsbaum, R., and Goldfeld, A.E. (2006). Transactivator of transcription from HIV type 1 subtype E selectively inhibits TNF gene expression via interference with chromatin remodeling of the TNF locus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 4182–4190.

Rantapää-Dahlqvist, S., de Jong, B.A.W., Berglin, E., Hallmans, G., Wadell, G., Stenlund, H., Sundin, U., and van Venrooij, W.J. (2003). Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 48, 2741–2749.

Raza, K., Falciani, F., Curnow, S.J., Ross, E.J., Lee, C.-Y., Akbar, A.N., Lord, J.M., Gordon, C., Buckley, C.D., and Salmon, M. (2005). Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. *Arthritis Res. Ther.* 7, R784-795.

Remberger, M., Ringden, O., and Markling, L. (1995). TNF alpha levels are increased during bone marrow transplantation conditioning in patients who develop acute GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 15, 99–104.

Rhee, D.K., Marcelino, J., Baker, M., Gong, Y., Smits, P., Lefebvre, V., Jay, G.D., Stewart, M., Wang, H., Warman, M.L., et al. (2005). The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth. *J. Clin. Invest.* 115, 622–631.

Rivas, M.A., Carnevale, R.P., Proietti, C.J., Rosembliit, C., Beguelin, W., Salatino, M., Charreau, E.H., Frahm, I., Sapia, S., Brouckaert, P., et al. (2008). TNF α acting on TNFR1 promotes breast cancer growth via p42/P44 MAPK, JNK, Akt and NF- κ B-dependent pathways. *Exp. Cell Res.* 314, 509–529.

Rodríguez, M., Cabal-Hierro, L., Carcedo, M.T., Iglesias, J.M., Artime, N., Darnay, B.G., and Lazo, P.S. (2011). NF-kappaB signal triggering and termination by tumor necrosis factor receptor 2. *J. Biol. Chem.* 286, 22814–22824.

- Roncarolo, M.G., Gregori, S., Bacchetta, R., and Battaglia, M. (2014). Tr1 cells and the counter-regulation of immunity: natural mechanisms and therapeutic applications. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *380*, 39–68.
- Rossol, M., Meusch, U., Pierer, M., Kaltenhauser, S., Hantzschel, H., Hauschildt, S., and Wagner, U. (2007). Interaction between Transmembrane TNF and TNFR1/2 Mediates the Activation of Monocytes by Contact with T Cells. *J. Immunol.* *179*, 4239–4248.
- Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V.M., and Goeddel, D.V. (1995). TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* *269*, 1424–1427.
- Rothschild, B.M., Turner, K.R., and DeLuca, M.A. (1988). Symmetrical erosive peripheral polyarthritis in the Late Archaic Period of Alabama. *Science* *241*, 1498–1501.
- Ryba, M., Rybarczyk-Kapturska, K., Zorena, K., Myśliwiec, M., and Myśliwska, J. (2011). Lower frequency of CD62L(high) and higher frequency of TNFR2(+) Tregs are associated with inflammatory conditions in type 1 diabetic patients. *Mediators Inflamm.* *2011*, 645643.
- Sakaguchi, S., Fukuma, K., Kuribayashi, K., and Masuda, T. (1985). Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J. Exp. Med.* *161*, 72–87.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *155*, 1151–1164.
- Sandoval, D.M., Alarcón, G.S., and Morgan, S.L. (1995). Adverse events in methotrexate-treated rheumatoid arthritis patients. *Br. J. Rheumatol.* *34 Suppl 2*, 49–56.
- Santos, L.L., Morand, E.F., Hutchinson, P., Boyce, N.W., and Holdsworth, S.R. (1997). Anti-neutrophil monoclonal antibody therapy inhibits the development of adjuvant arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* *107*, 248–253.
- Sasi, S.P., Song, J., Park, D., Enderling, H., McDonald, J.T., Gee, H., Garrity, B., Shtifman, A., Yan, X., Walsh, K., et al. (2014). TNF-TNFR2/p75 signaling inhibits early and increases delayed nontargeted effects in bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J. Biol. Chem.* *289*, 14178–14193.
- Sattar, N., and McInnes, I.B. (2005). Vascular comorbidity in rheumatoid arthritis: potential mechanisms and solutions. *Curr. Opin. Rheumatol.* *17*, 286–292.
- Schett, G., and Gravallese, E. (2012). Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat. Rev. Rheumatol.* *8*, 656–664.
- Schett, G., Redlich, K., Xu, Q., Bizan, P., Gröger, M., Tohidast-Akrad, M., Kiener, H., Smolen, J., and Steiner, G. (1998). Enhanced expression of heat shock protein 70 (hsp70) and heat shock factor 1 (HSF1) activation in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Differential*

regulation of hsp70 expression and hsf1 activation in synovial fibroblasts by proinflammatory cytokines, shear stress, and antiinflammatory drugs. *J. Clin. Invest.* *102*, 302–311.

Schiffenbauer, J., Streit, W.J., Butfiloski, E., LaBow, M., Edwards, C., and Moldawer, L.L. (2000). The Induction of EAE Is Only Partially Dependent on TNF Receptor Signaling but Requires the IL-1 Type I Receptor. *Clin. Immunol.* *95*, 117–123.

Schlenner, S.M., Weigmann, B., Ruan, Q., Chen, Y., and von Boehmer, H. (2012). Smad3 binding to the foxp3 enhancer is dispensable for the development of regulatory T cells with the exception of the gut. *J. Exp. Med.* *209*, 1529–1535.

Schmid, T., Falter, L., Weber, S., Müller, N., Molitor, K., Zeller, D., Weber-Steffens, D., Hehlgans, T., Wajant, H., Mostböck, S., et al. (2017). Chronic Inflammation Increases the Sensitivity of Mouse Treg for TNFR2 Costimulation. *Front. Immunol.* *8*.

Seibl, R., Birchler, T., Loeliger, S., Hossle, J.P., Gay, R.E., Saurenmann, T., Michel, B.A., Seger, R.A., Gay, S., and Lauener, R.P. (2003). Expression and regulation of Toll-like receptor 2 in rheumatoid arthritis synovium. *Am. J. Pathol.* *162*, 1221–1227.

Seyler, T.M., Park, Y.W., Takemura, S., Bram, R.J., Kurtin, P.J., Goronzy, J.J., and Weyand, C.M. (2005). BlyS and APRIL in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* *115*, 3083–3092.

Shibata, S., Tada, Y., Asano, Y., Yanaba, K., Sugaya, M., Kadono, T., Kanda, N., Watanabe, S., and Sato, S. (2013). IL-27 Activates Th1-Mediated Responses in Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Lesions. *J. Invest. Dermatol.* *133*, 479–488.

Singer, A., Adoro, S., and Park, J.-H. (2008). Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 788–801.

Singh, J.A., Christensen, R., Wells, G.A., Suarez-Almazor, M.E., Buchbinder, R., Lopez-Olivo, M.A., Ghogomu, E.T., and Tugwell, P. (2009). A network meta-analysis of randomized controlled trials of biologics for rheumatoid arthritis: a Cochrane overview. *CMAJ Can. Med. Assoc. J. J. Assoc. Medicale Can.* *181*, 787–796.

Slowik, M.R., De Luca, L.G., Fiers, W., and Pober, J.S. (1993). Tumor necrosis factor activates human endothelial cells through the p55 tumor necrosis factor receptor but the p75 receptor contributes to activation at low tumor necrosis factor concentration. *Am. J. Pathol.* *143*, 1724–1730.

Smolen, J.S., Kay, J., Doyle, M.K., Landewé, R., Matteson, E.L., Wollenhaupt, J., Gaylis, N., Murphy, F.T., Neal, J.S., Zhou, Y., et al. (2009). Golimumab in patients with active rheumatoid arthritis after treatment with tumour necrosis factor alpha inhibitors (GO-AFTER study): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase III trial. *Lancet Lond. Engl.* *374*, 210–221.

Sohn, C., Lee, A., Qiao, Y., Loupasakis, K., Ivashkiv, L.B., and Kalliolias, G.D. (2015). Prolonged tumor necrosis factor α primes fibroblast-like synoviocytes in a gene-specific manner by altering chromatin. *Arthritis Rheumatol.* Hoboken NJ *67*, 86–95.

Solomon, D.H., Karlson, E.W., Rimm, E.B., Cannuscio, C.C., Mandl, L.A., Manson, J.E., Stampfer, M.J., and Curhan, G.C. (2003). Cardiovascular morbidity and mortality in women diagnosed with rheumatoid arthritis. *Circulation* *107*, 1303–1307.

Stoelcker, B., Hehlgans, T., Weigl, K., Bluethmann, H., Grau, G.E., and Männel, D.N. (2002). Requirement for tumor necrosis factor receptor 2 expression on vascular cells to induce experimental cerebral malaria. *Infect. Immun.* *70*, 5857–5859.

Strohal, R., Chimenti, S., Vena, G.A., and Girolomoni, G. (2013). Etanercept provides an effective, safe and flexible short- and long-term treatment regimen for moderate-to-severe psoriasis: a systematic review of current evidence. *J. Dermatol. Treat.* *24*, 199–208.

Stuart, J.M., and Dixon, F.J. (1983). Serum transfer of collagen-induced arthritis in mice. *J. Exp. Med.* *158*, 378–392.

Sugiyama, H., Gyulai, R., Toichi, E., Garaczi, E., Shimada, S., Stevens, S.R., McCormick, T.S., and Cooper, K.D. (2005). Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 164–173.

Sultana, S., Dey, R., and Bishayi, B. (2017). Dual neutralization of TNFR-2 and MMP-2 regulates the severity of *S. aureus* induced septic arthritis correlating alteration in the level of interferon gamma and interleukin-10 in terms of TNFR2 blocking. *Immunol. Res.* 1–23.

Suzuki, H., Wang, B., Shivji, G.M., Toto, P., Amerio, P., Tomai, M.A., Miller, R.L., and Sauder, D.N. (2000). Imiquimod, a topical immune response modifier, induces migration of Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.* *114*, 135–141.

Symmons, D.P., Bankhead, C.R., Harrison, B.J., Brennan, P., Barrett, E.M., Scott, D.G., and Silman, A.J. (1997). Blood transfusion, smoking, and obesity as risk factors for the development of rheumatoid arthritis: results from a primary care-based incident case-control study in Norfolk, England. *Arthritis Rheum.* *40*, 1955–1961.

Szabo, S.K., Hammerberg, C., Yoshida, Y., Bata-Csorgo, Z., and Cooper, K.D. (1998). Identification and quantitation of interferon-gamma producing T cells in psoriatic lesions: localization to both CD4+ and CD8+ subsets. *J. Invest. Dermatol.* *111*, 1072–1078.

Tada, Y., Ho, A., Koarada, S., Morito, F., Ushiyama, O., Suzuki, N., Kikuchi, Y., Ohta, A., Mak, T.W., and Nagasawa, K. (2001). Collagen-Induced Arthritis in TNF Receptor-1-Deficient Mice: TNF Receptor-2 Can Modulate Arthritis in the Absence of TNF Receptor-1. *Clin. Immunol.* *99*, 325–333.

Tai, X., Van Laethem, F., Pobezinsky, L., Guintier, T., Sharrow, S.O., Adams, A., Granger, L., Kruhlak, M., Lindsten, T., Thompson, C.B., et al. (2012). Basis of CTLA-4 function in regulatory and conventional CD4(+) T cells. *Blood* *119*, 5155–5163.

Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J., and Sakaguchi, S. (1998). Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally

anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int. Immunol.* *10*, 1969–1980.

Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T.W., and Sakaguchi, S. (2000). Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* *192*, 303–310.

Tanaka, S. (2013). Regulation of bone destruction in rheumatoid arthritis through RANKL-RANK pathways. *World J. Orthop.* *4*, 1–6.

Tanaka, Y., and Martin Mola, E. (2014). IL-6 targeting compared to TNF targeting in rheumatoid arthritis: studies of olokizumab, sarilumab and sirukumab. *Ann. Rheum. Dis.* *73*, 1595–1597.

Taylor, G.A., Carballo, E., Lee, D.M., Lai, W.S., Thompson, M.J., Patel, D.D., Schenkman, D.I., Gilkeson, G.S., Broxmeyer, H.E., Haynes, B.F., et al. (1996). A pathogenetic role for TNF alpha in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetraprolin (TTP) deficiency. *Immunity* *4*, 445–454.

Tenev, T., Bianchi, K., Darding, M., Broemer, M., Langlais, C., Wallberg, F., Zachariou, A., Lopez, J., MacFarlane, M., Cain, K., et al. (2011). The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs. *Mol. Cell* *43*, 432–448.

Thiolat, A., Semerano, L., Pers, Y.M., Biton, J., Lemeiter, D., Portales, P., Quentin, J., Jorgensen, C., Decker, P., Boissier, M.-C., et al. (2014). Interleukin-6 Receptor Blockade Enhances CD39+ Regulatory T Cell Development in Rheumatoid Arthritis and in Experimental Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* *66*, 273–283.

Thornton, A.M., Donovan, E.E., Piccirillo, C.A., and Shevach, E.M. (2004). Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 6519–6523.

Toker, A., Engelbert, D., Garg, G., Polansky, J.K., Floess, S., Miyao, T., Baron, U., Düber, S., Geffers, R., Giehr, P., et al. (2013). Active demethylation of the Foxp3 locus leads to the generation of stable regulatory T cells within the thymus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *190*, 3180–3188.

Torrey, H., Butterworth, J., Mera, T., Okubo, Y., Wang, L., Baum, D., Defusco, A., Plager, S., Warden, S., Huang, D., et al. (2017). Targeting TNFR2 with antagonistic antibodies inhibits proliferation of ovarian cancer cells and tumor-associated Tregs. *Sci Signal* *10*, eaaf8608.

Trentham, D.E., Townes, A.S., and Kang, A.H. (1977). Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J. Exp. Med.* *146*, 857–868.

Tsakiri, N., Papadopoulos, D., Denis, M.C., Mitsikostas, D.-D., and Kollias, G. (2012). TNFR2 on non-haematopoietic cells is required for Foxp3⁺ Treg-cell function and disease suppression in EAE: Immunomodulation. *Eur. J. Immunol.* *42*, 403–412.

- Tsokos, G.C. (1987). Immunomodulatory treatment in patients with rheumatic diseases: mechanisms of action. *Semin. Arthritis Rheum.* *17*, 24–38.
- Tsytsykova, A.V., Rajsbaum, R., Falvo, J.V., Ligeiro, F., Neely, S.R., and Goldfeld, A.E. (2007). Activation-dependent intrachromosomal interactions formed by the TNF gene promoter and two distal enhancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 16850–16855.
- Tuma, R., Russell, M., Rosendahl, M., and Thomas, G.J. (1995). Solution conformation of the extracellular domain of the human tumor necrosis factor receptor probed by Raman and UV-resonance Raman spectroscopy: structural effects of an engineered PEG linker. *Biochemistry (Mosc.)* *34*, 15150–15156.
- Turkstra, E., Ng, S.-K., and Scuffham, P.A. (2011). A mixed treatment comparison of the short-term efficacy of biologic disease modifying anti-rheumatic drugs in established rheumatoid arthritis. *Curr. Med. Res. Opin.* *27*, 1885–1897.
- Tzimas, C., Michailidou, G., Arsenakis, M., Kieff, E., Mosialos, G., and Hatzivassiliou, E.G. (2006). Human ubiquitin specific protease 31 is a deubiquitinating enzyme implicated in activation of nuclear factor-kappaB. *Cell. Signal.* *18*, 83–92.
- Van Der Meer, J.B., Glazenburg, E.J., Mulder, P.G., Eggink, H.F., and Coenraads, P.J. (1999). The management of moderate to severe atopic dermatitis in adults with topical fluticasone propionate. The Netherlands Adult Atopic Dermatitis Study Group. *Br. J. Dermatol.* *140*, 1114–1121.
- Vanlangenakker, N., Bertrand, M.J.M., Bogaert, P., Vandenabeele, P., and Vanden Berghe, T. (2011). TNF-induced necroptosis in L929 cells is tightly regulated by multiple TNFR1 complex I and II members. *Cell Death Dis.* *2*, e230.
- Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J.A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* *318*, 1931–1934.
- Venkatesh, D., Hernandez, T., Rosetti, F., Batal, I., Cullere, X., Luscinskas, F.W., Zhang, Y., Stavrakis, G., García-Cardena, G., Horwitz, B., et al. (2013). TNF receptor 2 induces IRF1 transcription factor-dependent interferon- β autocrine signaling to promote monocyte recruitment. *Immunity* *38*, 1025–1037.
- Wagner, T.L., Ahonen, C.L., Couture, A.M., Gibson, S.J., Miller, R.L., Smith, R.M., Reiter, M.J., Vasilakos, J.P., and Tomai, M.A. (1999). Modulation of TH1 and TH2 cytokine production with the immune response modifiers, R-848 and imiquimod. *Cell. Immunol.* *191*, 10–19.
- Waldmann, H., Adams, E., and Cobbold, S. (2008). Reprogramming the immune system: co-receptor blockade as a paradigm for harnessing tolerance mechanisms. *Immunol. Rev.* *223*, 361–370.
- Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G.R., Inoue, J., and Chen, Z.J. (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* *412*, 346–351.

- Wang, H., Peters, T., Sindrilaru, A., Kess, D., Oreshkova, T., Yu, X.-Z., Seier, A.M., Schreiber, H., Wlaschek, M., Blakytyn, R., et al. (2008a). TGF-beta-dependent suppressive function of Tregs requires wild-type levels of CD18 in a mouse model of psoriasis. *J. Clin. Invest.* *118*, 2629–2639.
- Wang, L., Du, F., and Wang, X. (2008b). TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* *133*, 693–703.
- Wang, L., Liu, Y., Han, R., Beier, U.H., Thomas, R.M., Wells, A.D., and Hancock, W.W. (2013). Mbd2 promotes foxp3 demethylation and T-regulatory-cell function. *Mol. Cell. Biol.* *33*, 4106–4115.
- Wang, L., Kumar, S., Dahiya, S., Wang, F., Wu, J., Newick, K., Han, R., Samanta, A., Beier, U.H., Akimova, T., et al. (2016). Ubiquitin-specific Protease-7 Inhibition Impairs Tip60-dependent Foxp3+ T-regulatory Cell Function and Promotes Antitumor Immunity. *EBioMedicine* *13*, 99–112.
- Ware, C.F., Crowe, P.D., Vanarsdale, T.L., Andrews, J.L., Grayson, M.H., Jerzy, R., Smith, C.A., and Goodwin, R.G. (1991). Tumor necrosis factor (TNF) receptor expression in T lymphocytes. Differential regulation of the type I TNF receptor during activation of resting and effector T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *147*, 4229–4238.
- Wegner, N., Wait, R., Sroka, A., Eick, S., Nguyen, K.-A., Lundberg, K., Kinloch, A., Culshaw, S., Potempa, J., and Venables, P.J. (2010). Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and α -enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *62*, 2662–2672.
- Wei, S., Kitaura, H., Zhou, P., Ross, F.P., and Teitelbaum, S.L. (2005). IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J. Clin. Invest.* *115*, 282–290.
- Weyand, C.M., and Goronzy, J.J. (1990). Disease-associated human histocompatibility leukocyte antigen determinants in patients with seropositive rheumatoid arthritis. Functional role in antigen-specific and allogeneic T cell recognition. *J. Clin. Invest.* *85*, 1051–1057.
- Wildin, R.S., Ramsdell, F., Peake, J., Faravelli, F., Casanova, J.L., Buist, N., Levy-Lahad, E., Mazzella, M., Goulet, O., Perroni, L., et al. (2001). X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat. Genet.* *27*, 18–20.
- Williams, S.K., Maier, O., Fischer, R., Fairless, R., Hochmeister, S., Stojic, A., Pick, L., Haar, D., Musiol, S., Storch, M.K., et al. (2014). Antibody-Mediated Inhibition of TNFR1 Attenuates Disease in a Mouse Model of Multiple Sclerosis. *PLoS ONE* *9*, e90117.
- Wolfe, F. (1993). The curious case of intramuscular gold. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* *19*, 173–187.

Wu, C.-J., Conze, D.B., Li, X., Ying, S.-X., Hanover, J.A., and Ashwell, J.D. (2005). TNF- α induced c-IAP1/TRAF2 complex translocation to a Ubc6-containing compartment and TRAF2 ubiquitination. *EMBO J.* *24*, 1886–1898.

Xu, X., Blinder, L., Shen, J., Gong, H., Finnegan, A., Williams, J.W., and Chong, A.S. (1997). In vivo mechanism by which leflunomide controls lymphoproliferative and autoimmune disease in MRL/MpJ-lpr/lpr mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *159*, 167–174.

Yan, F., Du, R., Wei, F., Zhao, H., Yu, J., Wang, C., Zhan, Z., Ding, T., Ren, X., Chen, X., et al. (2015). Expression of TNFR2 by regulatory T cells in peripheral blood is correlated with clinical pathology of lung cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* *64*, 1475–1485.

Yao, Y., Vent-Schmidt, J., McGeough, M.D., Wong, M., Hoffman, H.M., Steiner, T.S., and Levings, M.K. (2015). Tr1 Cells, but Not Foxp3⁺ Regulatory T Cells, Suppress NLRP3 Inflammasome Activation via an IL-10-Dependent Mechanism. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *195*, 488–497.

Yarilina, A., Park-Min, K.-H., Antoniv, T., Hu, X., and Ivashkiv, L.B. (2008). TNF activates an IRF1-dependent autocrine loop leading to sustained expression of chemokines and STAT1-dependent type I interferon-response genes. *Nat. Immunol.* *9*, 378–387.

Yawalkar, N., Tscherner, G.G., Hunger, R.E., and Hassan, A.S. (2009). Increased expression of IL-12p70 and IL-23 by multiple dendritic cell and macrophage subsets in plaque psoriasis. *J. Dermatol. Sci.* *54*, 99–105.

Zaba, L.C., Cardinale, I., Gilleaudeau, P., Sullivan-Whalen, M., Suárez-Fariñas, M., Suárez Fariñas, M., Fuentes-Duculan, J., Novitskaya, I., Khatcherian, A., Bluth, M.J., et al. (2007). Amelioration of epidermal hyperplasia by TNF inhibition is associated with reduced Th17 responses. *J. Exp. Med.* *204*, 3183–3194.

Zhang, K., Li, X., Yin, G., Liu, Y., Niu, X., and Hou, R. (2008). Functional characterization of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells differentiated in vitro from bone marrow-derived haematopoietic cells of psoriasis patients with a family history of the disorder. *Br. J. Dermatol.* *158*, 298–305.

Zhang, P., Su, Y., Zhao, M., Huang, W., and Lu, Q. (2011). Abnormal histone modifications in PBMCs from patients with psoriasis vulgaris. *Eur. J. Dermatol. EJD* *21*, 552–557.

Zhang, Q., Cui, F., Fang, L., Hong, J., Zheng, B., and Zhang, J.Z. (2013). TNF- α impairs differentiation and function of TGF- β -induced Treg cells in autoimmune diseases through Akt and Smad3 signaling pathway. *J. Mol. Cell Biol.* *5*, 85–98.

Zhang, X.-J., Huang, W., Yang, S., Sun, L.-D., Zhang, F.-Y., Zhu, Q.-X., Zhang, F.-R., Zhang, C., Du, W.-H., Pu, X.-M., et al. (2009). Psoriasis genome-wide association study identifies susceptibility variants within LCE gene cluster at 1q21. *Nat. Genet.* *41*, 205–210.

Zhao, X., Rong, L., Zhao, X., Li, X., Liu, X., Deng, J., Wu, H., Xu, X., Erben, U., Wu, P., et al. (2012). TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation. *J. Clin. Invest.* *122*, 4094–4104.

- Zheng, L., Bidere, N., Staudt, D., Cubre, A., Orenstein, J., Chan, F.K., and Lenardo, M. (2006). Competitive control of independent programs of tumor necrosis factor receptor-induced cell death by TRADD and RIP1. *Mol. Cell. Biol.* 26, 3505–3513.
- Zheng, Y., Danilenko, D.M., Valdez, P., Kasman, I., Eastham-Anderson, J., Wu, J., and Ouyang, W. (2007). Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 445, 648–651.
- Zheng, Y., Chaudhry, A., Kas, A., deRoos, P., Kim, J.M., Chu, T.-T., Corcoran, L., Treuting, P., Klein, U., and Rudensky, A.Y. (2009). Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature* 458, 351–356.
- Zheng, Y., Josefowicz, S., Chaudhry, A., Peng, X.P., Forbush, K., and Rudensky, A.Y. (2010). Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature* 463, 808–812.
- Zhu, J., Davidson, T.S., Wei, G., Jankovic, D., Cui, K., Schones, D.E., Guo, L., Zhao, K., Shevach, E.M., and Paul, W.E. (2009). Down-regulation of Gfi-1 expression by TGF-beta is important for differentiation of Th17 and CD103+ inducible regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 206, 329–341.
- Zimmermann, M., Aguilera, F.B., Castellucci, M., Rossato, M., Costa, S., Lunardi, C., Ostuni, R., Girolomoni, G., Natoli, G., Bazzoni, F., et al. (2015). Chromatin remodelling and autocrine TNF α are required for optimal interleukin-6 expression in activated human neutrophils. *Nat. Commun.* 6, 6061.
- Zitnik, R.J., and Cooper, J.A. (1990). Pulmonary disease due to antirheumatic agents. *Clin. Chest Med.* 11, 139–150.

VII. ANNEXE

In Vivo Expansion of Activated Foxp3⁺ Regulatory T Cells and Establishment of a Type 2 Immune Response upon IL-33 Treatment Protect against Experimental Arthritis

Jérôme Biton,^{*,†,1} Sara Khaleghparast Athari,^{*,†,2} Allan Thiolat,^{*,†,2,3} François Santinon,^{*,†} Delphine Lemeiter,^{*,†} Roxane Hervé,^{*,†} Laure Delavallée,^{*} Anais Levescot,^{‡,4} Stéphane Roga,[§] Patrice Decker,^{*,†} Jean-Philippe Girard,[§] André Herbelin,[‡] Marie-Christophe Boissier,^{*,†,¶} and Natacha Bessis^{*,†}

IL-33 is strongly involved in several inflammatory and autoimmune disorders with both pro- and anti-inflammatory properties. However, its contribution to chronic autoimmune inflammation, such as rheumatoid arthritis, is ill defined and probably requires tight regulation. In this study, we aimed at deciphering the complex role of IL-33 in a model of rheumatoid arthritis, namely, collagen-induced arthritis (CIA). We report that repeated injections of IL-33 during induction (early) and during development (late) of CIA strongly suppressed clinical and histological signs of arthritis. In contrast, a late IL-33 injection had no effect. The cellular mechanism involved in protection was related to an enhanced type 2 immune response, including the expansion of eosinophils, Th2 cells, and type 2 innate lymphoid cells, associated with an increase in type 2 cytokine levels in the serum of IL-33-treated mice. Moreover, our work strongly highlights the interplay between IL-33 and regulatory T cells (Tregs), demonstrated by the dramatic in vivo increase in Treg frequencies after IL-33 treatment of CIA. More importantly, Tregs from IL-33-treated mice displayed enhanced capacities to suppress IFN- γ production by effector T cells, suggesting that IL-33 not only favors Treg proliferation but also enhances their immunosuppressive properties. In concordance with these observations, we found that IL-33 induced the emergence of a CD39^{high} Treg population in a ST2L-dependent manner. Our findings reveal a powerful anti-inflammatory mechanism by which IL-33 administration inhibits arthritis development. *The Journal of Immunology*, 2016, 197: 1708–1719.

Interleukin-33 is a barrier tissue-expressed cytokine that when released targets its receptor ST2 to promote Th2 response, mast cells, eosinophils, and basophils (1–4). It also promotes

type 2 innate lymphoid cells (ILC2), a population that represents a critical source of type 2 cytokines in vivo (5). IL-33 is an unconventional cytokine because it has a proinflammatory face related to its alarmin function, but it can also suppress inflammation in some clinical settings by driving type 2 immunity. This activity is illustrated by the protective role of IL-33 in hepatitis (6), colitis (7), experimental autoimmune encephalomyelitis (8, 9), uveitis (10), and atherosclerosis (11). However, a similar amplification of this type 2 immune response, initiated by IL-33, aggravates asthma, which is clearly a Th2-driven disease (12). Moreover, it has recently been shown that IL-33 can activate and promote CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cell (Treg) expansion, thus protecting mice from cardiac or skin transplant rejection (13, 14).

In this study, we investigated the role of IL-33 in a model of chronic inflammatory arthritis. Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic joint disease whose hallmark is hyperplastic synovitis responsible for cartilage and bone destruction. Factors such as TNF- α , IL-1, and chemokines induce synovial cell activation and proliferation, as well as production of metalloproteinases and free radicals by macrophages, neutrophils, synoviocytes, and chondrocytes, directly leading to destruction of neighboring tissues (15). In contrast, Treg function is altered in RA (16), and those cells are protective in its experimental models (15, 17, 18).

Some works suggest a functional role of the IL-33/ST2 axis in the pathogenesis of human and mouse arthritis. In RA patients, only a few data on the role of IL-33 are available. IL-33 levels in serum and synovial fluid are elevated, and a strong IL-33 expression can be detected in RA synovium (19, 20). IL-33 synergistically enhances immune complex-induced TNF- α and IL-8 production in cultured human synovium-derived mast cells (21). In mouse models, whereas arthritis is reduced in ST2 knockout (KO) or in anti-ST2-treated mice

^{*}INSERM, U1125, F-93017 Bobigny, France; [†]Sorbonne Paris Cité Université Paris 13, F-93000 Bobigny, France; [‡]INSERM U1082, Pôle Biologie Santé, Centre Hospitalo-Universitaire Poitiers, BP 633, F-86022 Poitiers, France; [§]Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale CNRS-Université de Toulouse III, F-31000 Toulouse, France; and [¶]Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Avicenne, Service de Rhumatologie, F-93009 Bobigny, France

¹Current address: INSERM, U1138, Cordeliers Research Center, Team Cancer, Immune Control and Escape, Paris, France.

²S.K.A. and A.T. contributed equally to this work.

³Current address: INSERM U955, Institut Mondor de Recherche Biomédicale, Créteil, France.

⁴Current address: Division of Rheumatology, Immunology and Allergy, Brigham and Women's Hospital, and Division of Immunology, Boston Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA.

ORCID: 0000-0003-3840-3887 (S.R.); 0000-0002-9907-2818 (A.H.).

Received for publication September 29, 2015. Accepted for publication June 24, 2016.

This work was supported by the Fondation Arthritis Courtin and by Pfizer. J.B. received funding from the Conseil Général de Seine Saint Denis, the French Society for Rheumatology, and the Fondation du Judaïsme Français.

Address correspondence and reprint requests to Prof. Natacha Bessis, INSERM U1125, Sorbonne Paris Cité Université Paris 13, 74 rue Marcel Cachin, F-93000 Bobigny, France. E-mail address: natacha.bessis@univ-paris13.fr

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: A_{max}, mean maximal arthritis score; CIA, collagen-induced arthritis; CII, chicken collagen type II; ILC2, type 2 innate lymphoid cell; KO, knockout; m, murine; LN, lymph node; MFI, mean fluorescence intensity; RA, rheumatoid arthritis; RLU, relative light unit; Tconv, CD4⁺CD25⁺ conventional T cell; Treg, regulatory T cell.

Copyright © 2016 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/16/\$30.00

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1502124

(22–24), it does not differ in IL-33 KO mice compared with wild-type mice (25, 26). These studies in arthritis models underscore the complex nature of IL-33 and the necessity to establish how administered IL-33 modulates the inflammatory and regulatory pathways, respectively, involved in arthritis control.

In the current study, we describe a previously unknown inhibition of mouse collagen-induced arthritis (CIA) development after repeated administration of IL-33. This anti-inflammatory effect was related to a type 2 immune response and strongly involved regulatory T cells.

Materials and Methods

Mice

Male mice aged 6–9 wk and belonging to the C57BL/6 strain were purchased from Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France). All procedures were approved by the Animal Care Use Committee of the Paris 13 University (Bobigny, France) and the ethical committee Charles Darwin.

CIA induction and evaluation

Arthritis was induced with native chicken collagen type II (CII) (MD Biosciences, Zürich, Switzerland). At 9 wk of age, male C57BL/6 mice were injected intradermally at the base of the tail with 50 µg CII emulsified in CFA (MD Biosciences). On day 21, a booster s.c. injection of CII emulsified in CFA was given. A blinded procedure was used to monitor clinical and histological arthritis in all four limbs, as previously described (27, 28).

Sources of IL-33

For *in vitro* experiments, murine (m) rIL-33 was purchased from R&D Systems (Abingdon, U.K.). For all *in vivo* treatments, we used a purified rIL-33 (aa 109–266), provided by Dr. J. P. Girard laboratory (CNRS, Toulouse, France). It was obtained from a mouse cDNA encoding IL-33 aa 109–266, which was subcloned into expression vector pET-15b (Novagen), and mouse rIL-33 was produced in *Escherichia coli* BL21pLysS (Novagen) and purified on Ni-NTA agarose (QIAGEN), according to the manufacturer's instructions.

Treatments

C57BL/6 mice were treated i.p. daily by rIL-33 (1 µg/mouse) or by PBS for 10 d from days 1 to 5 and from days 21 to 25 in most experiments, or only from days 21 to 25 in Fig. 7.

Cell and tissue preparation

Leukocytes from the spleen were prepared using a cell strainer, and RBCs were lysed in hemolysis buffer (NH₄Cl, KHCO₃, and EDTA). Afferent and popliteal lymph nodes (LNs) were dissected out of the hind limbs, and leukocytes were prepared using a homogenizer. Blood was collected by heart puncture, and for cell analysis, RBCs were lysed in hemolysis buffer. For bone marrow, the femur and the tibia from both hind legs were removed and freed of soft tissue attachments, and the extreme distal tip of each extremity was cut off. PBS–EDTA solution was forced through the bone with a syringe. After dispersing cell clumps, the cell suspension was centrifuged (400 × g, 10 min, 4°C) and resuspended in 1 ml PBS–EDTA.

Flow cytometry

For Treg, Th2 cell, or CD4⁺CD25[−] conventional T cell (Tconv) study, cells were stained with FITC-labeled anti-ST2 (clone DJ8; MD Biosciences), R-PE-labeled anti-CD39 (clone 24DMS1; eBioscience, San Diego, CA) or PE-labeled anti-CTLA-4 (clone UC10-4F10-11; BD Biosciences, San Jose, CA), and PerCP-Cy5.5-labeled anti-CD4 (clone RM4-5; BD Biosciences). The allophycocyanin-labeled anti-Foxp3 (clone FJK-16s) Staining Set (eBioscience) was used for intracellular staining according to the manufacturer's recommendations. In *in vitro* experiments, a PE-labeled anti-CD25 (Clone PC61; BioLegend) was used. For eosinophil study, cells were stained with FITC-labeled anti-CD11c (clone HL3) and PE-labeled anti-Siglec-F (clone E50-2440) (all from BD Biosciences). Finally, for IL2 staining, cells were stained with FITC-labeled anti-ST2 (clone DJ8; MD Biosciences), PE-labeled anti-Lin (including anti-CD3 [clone 2C11], anti-Ly6G/Ly6C [clone RB6-8C5], anti-CD11b [clone M1/70], anti-CD45R/B220 [RA3-6B2], and anti-TER-119 [clone Ter-119]; BioLegend, San Diego, CA), allophycocyanin-labeled anti-CD25 (clone PC61; BD Biosciences), V450-labeled anti-Sca1 (clone D7; BD Biosciences), and

allophycocyanin-eFluor 780-labeled anti-cKit (clone ACK2; eBioscience). Cells were stained at 4°C in PBS containing 2% heat-inactivated FCS and 0.01 M sodium azide, incubated for 30 min with 2.4G2 mAb to block the Fcγ receptors (BD Biosciences), and incubated for 30 min with appropriate dilutions of various mAbs or corresponding isotype control coupled to FITC, PE, PerCP-Cy5.5, allophycocyanin, V450, or allophycocyanin-eFluor 780.

For intracellular cytokine staining, cells were stimulated for 5 h with PMA and ionomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Brefeldin A (BD Pharmingen, San Diego, CA) was added for the last 4 h. For surface staining, cells were incubated with PerCP-Cy5.5-labeled anti-CD4 (clone RM4-5) for 30 min at 4°C in the dark, then washed. The cells were then permeabilized using Fixation/Permeabilization solution and stained with allophycocyanin-labeled anti-IFN-γ (XMG1.2) and PE-labeled anti-IL-17A (TC11-18H10) (all from BD Biosciences) for 30 min at 4°C in the dark.

Flow cytometry was performed on a FACScalibur or BD LSRFortessa cell analyzer (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Dead cells were excluded based on forward and side scatter characteristics. Reported statistical data are based on at least 1000 events gated on the population of interest. Results were analyzed using CellQuest Pro software or FACSDiva software (BD Biosciences). FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR) was used for graphical representations.

In vitro experiments

Splenocytes were harvested from C57BL/6 male mice at age 9 wk and seeded (1×10^5) in RPMI 1640 with 10% FCS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 50 µM 2-ME, 1 M HEPES, and 5 µg/ml soluble anti-CD3 (clone 2C11; BD Biosciences), in U-bottom 96-well plates. Cells were incubated for 18 or 30 h with or without 20 ng/ml of rIL-33 (R&D Systems) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

Lymphocyte purification

CD4⁺CD25[−] and CD4⁺CD25⁺ T cells from the spleen were purified using the Regulatory T Cell Isolation Kit according to the manufacturer's protocol (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). In brief, CD4⁺CD25[−] T cells were isolated using a two-step procedure. First, CD4⁺ T cells were isolated by negative selection using a mixture of biotin-conjugated Abs, anti-Biotin MicroBeads, LD column, and QuadroMACS (all from Miltenyi Biotec). Then, CD4⁺ T cells were directly labeled with a PE-conjugated anti-CD25 Ab and anti-PE MicroBeads. The cell suspension was loaded onto an MS column, which was placed in the magnetic field of a MACS separator (OctoMACS, Miltenyi Biotec). The flow-through cells were collected and used as CD4⁺CD25[−] cells, whereas the retained cells were eluted from the column and used as CD4⁺CD25⁺ Tregs. To increase purity, two consecutive column runs were performed. Flow cytometry analysis showed that purity of the CD4⁺CD25[−] and CD4⁺CD25⁺ cell-enriched fractions was 90–95% (data not shown).

Measurement of CD4⁺CD25[−] Tconv cell cytokine secretion

Spleen CD4⁺CD25[−] (1×10^6) Tconv cells were stimulated for 18 h with PMA (50 ng/ml) and ionomycin (1 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Cytokine (IL-4, IL-13, IL-5, IFN-γ, IL-10, IL-6, TNF-α, IL-17) levels in culture supernatants were measured by multiplex protein analysis using the MILLIPIXEL MAP Mouse Cytokine Magnetic Bead Panel Kit (Merck Millipore, Billerica, MA) according to the manufacturer's instructions, and data were analyzed with Bioplex 200 (Bio-Rad, Hercules, CA).

Assessment of Treg suppressive effect on CD4⁺CD25[−]

Tconv cells

CD4⁺CD25[−] T cells (Tconv) and CD4⁺CD25⁺ T cells (Tregs) were purified as described above from the spleen of mice treated with PBS ($n = 8$) or IL-33 ($n = 8$) at day 28 after CIA induction. CD4⁺CD25[−] T cells (Tconv) were prelabeled with 5 µM CFSE (Invitrogen, Carlsbad, CA) for 10 min. CFSE-labeled Tconv (1×10^5) were cocultured in RPMI 1640 with 10% FCS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 50 µM 2-ME, 1 M HEPES, and 5 µg/ml soluble anti-CD3 (clone 2C11; BD Biosciences) in U-bottom 96-well plates with Tregs (1×10^5) to produce Tconv/Treg ratios of 1:1. Cocultures always included Tconv and Tregs purified from the same mouse. Controls were performed using non-CFSE-labeled Tconv cells instead of Tregs (CD4⁺CD25[−]; 1×10^5). APCs (1×10^5) (splenocytes of naive C57BL/6 mice) (1×10^5), previously treated with mitomycin (50 µg/ml) for 45 min at 37°C, were added to the culture medium. The cells were then incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. After 4 d of culture, the cells were stained with allophycocyanin-labeled anti-CD4 (clone RM4-5; BD Biosciences), and Tconv proliferation was then determined for each Tconv/Treg ratio using flow cytometry to measure the CFSE dilution. Data were analyzed using CellQuest Pro software (BD Biosciences).

IFN- γ levels in culture supernatants were measured using commercially available ELISA kits (Quantikine; R&D Systems, Abingdon, U.K.), according to the manufacturer's instructions. The sensitivity of the cytokine assays was 2 pg/ml.

CII-specific T cell response

For measurement of collagen-specific T cell responses, draining LN cells from mice with CIA were prelabeled with 5 μ M CFSE for 10 min. CFSE-labeled cells (4×10^5) were then cultured in RPMI 1640 with 10% FCS, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 50 μ M 2-ME, 1 M HEPES, and heat-denatured CII (MD Biosciences) (0.25–50–100 μ g/ml) in U-bottom 96-well plates. Cultures were done in duplicate. After a 4-d incubation at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere, the cells were stained with allophycocyanin-labeled anti-CD4 (clone RM4-5; BioLegend), and CD4⁺ cell proliferation was then determined for each CII concentration using flow cytometry to measure the CFSE dilution. Data were analyzed using Diva software (BD Biosciences). Culture supernatants were collected and assessed for the presence of IFN- γ by ELISA (Quantikine; R&D Systems, Abingdon, U.K.), according to the manufacturer's instructions.

ATPase assay

The CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) was used. Magnetically sorted spleen CD4⁺CD25⁺ cells (2.5×10^4 cells/well) were incubated in 96-well round-bottom plates with medium containing 50 μ M ATP (Sigma) in a final volume of 100 μ l at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 20 min. Then, 100 μ l CellTiter-Glo reagent was added to the CD4⁺CD25⁺ cells and the plate was mixed for 2 min at room temperature on an orbital shaker to induce cell lysis, and then incubated 10 min without shaking to stabilize luminescent signal. Luminescence was then recorded (Tristar 2 LB 942; Berthold Technologies). The percentage of intracellular + extracellular ATP was determined as follows: percentage of intracellular + extracellular ATP = [(relative light unit (RLU) of 50 μ M ATP without Treg – RLU of 50 μ M ATP with Treg]/RLU of 50 μ M ATP without Treg) \times 100.

Cytokines and IgE assay in the serum

Cytokine (IL-4, IL-13, IL-5, IFN- γ , IL-10, IL-6, TNF- α , IL-17) levels in plasma from CIA mice treated or not treated with IL-33 were measured using the MILLIPLEX MAP Mouse Cytokine Magnetic Bead Panel Kit (Merck Millipore) according to the manufacturer's instructions, and data were analyzed with Bioplex 200 (Bio-Rad). IgE levels were determined in the serum by ELISA (mouse IgE, ELISA MAX Standard Sets; BioLegend) according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

According to data distribution, a parametric (ANOVA) or a nonparametric test (Kruskal–Wallis, Mann–Whitney), with appropriate post hoc comparisons, was used to compare data across the different groups. Clinical scores curves were compared with ANOVA. Categorical data were compared by χ^2 test. Pearson's correlation was used to correlate CD39 mean fluorescence intensity (MFI) and frequency of cells expressing ST2L among CD4⁺Foxp3⁺CD39⁺ cells (Fig. 6). All statistical analyses were performed using STATVIEW version 5.0 Software (Abacus Concepts, San Diego, CA).

Results

Early and late IL-33 treatment dramatically inhibits arthritis development

We first investigated the effect of rIL-33 on the development of CIA. Mice were treated i.p. daily with IL-33 from days 1 to 5 and from days 21 to 25 after CIA induction. IL-33 almost completely inhibited clinical signs of arthritis in the treated mice compared with control mice (Fig. 1A). Moreover, the mean maximal arthritis score (A_{max}) and arthritis incidence were dramatically reduced in IL-33-treated mice compared with PBS control mice (Fig. 1B, 1C). Finally, histological examination at day 42 also revealed an important decrease in joint inflammation and destruction in IL-33-treated mice (Fig. 1D–G).

Expansion of eosinophils and Th2 cells in IL-33-treated mice reveals the establishment of a type 2 immune response

The IL-33/ST2 pathway is essential in type 2 immune response establishment (1). Consequently, we investigated whether the

inhibitory effect of IL-33 on CIA development involved eosinophils and Th2 cells. First, IL-33 induced a 3-fold increase of eosinophil frequency, defined as SSC^{high}CD45⁺Siglec-F⁺CD11c[–] cells, among total blood leukocytes (Fig. 2A, 2B) (29). Interestingly, blood neutrophil (Ly6G⁺CD11b⁺) frequencies were lower in IL-33-treated mice ($20.13\% \pm 2.869$, $n = 9$) as compared with untreated mice ($41.31\% \pm 3.710$, $n = 10$). This result might reflect the decrease of inflammation induced by IL-33, leading to the reduction of arthritis development. In contrast, other cell types, including monocytes, and whole lymphocyte frequencies were not modified (data not shown). Moreover, IgE and Th2 cytokine (IL-4, IL-5, IL-10, and a trend for IL-13) levels were increased in the plasma of IL-33-treated mice, also signifying a type 2 immune response, whereas IL-17 and IL-6 levels were decreased (Fig. 2C, 2D). TNF- α was detected, but no difference was observed between groups (data not shown). There was a slight increase in IFN- γ plasma level in IL-33-treated mice, although the difference was not statistically significant ($p = 0.25$).

Afterward, we investigated the proportion of Th2 cells defined as CD4⁺Foxp3[–]ST2L⁺ cells (30) in the spleen and the blood (Fig. 3A). First, the total leukocyte count in the spleen was markedly increased in IL-33-treated mice (PBS-treated mice: 81.6×10^6 ; IL-33-treated mice: 143.6×10^6 , $p < 0.0001$). IL-33 induced a 3-fold increase of Th2 cell number in the spleen (Fig. 3B). Moreover, the percentage of CD4⁺Foxp3[–]Tconv expressing ST2L in the spleen (Fig. 3C) and in the blood ($6.52 \pm 2.29\%$, $n = 9$, versus $1.62 \pm 0.35\%$, $n = 10$, $p < 0.05$) were increased in IL-33-treated mice compared with PBS mice. Of note, after IL-33 treatment, Th17 cell frequency was not modified in the spleen (Fig. 3F) or LNs (data not shown), but Th1 cell frequency was increased, although not significantly, in the spleen ($p = 0.08$) (Fig. 3E). Finally, we assessed ex vivo cytokine production by Tconv, defined as CD4⁺CD25[–] cells. Tconv from the spleen of IL-33-treated mice produced more IL-4, IL-5, IL-10, and IL-13 than did those from the PBS group, but surprisingly also more IL-6 (Fig. 3G). Neither IL-17 nor IFN- γ levels were modified. Altogether these results showed that IL-33 induces globally a shift toward type 2 immunity in CIA mice.

ILC2 are involved in the type 2 immune shift induced by IL-33 in CIA

ILC2 are strongly associated with the establishment of type 2 immunity, and IL-33 promotes their expansion. It is not known, however, whether IL-33 can promote such an innate type 2 immune response in arthritis. Consequently, and according to the above results, ILC2 proportion was determined in the bone marrow and in the spleen of IL-33- and PBS-treated CIA mice. ILC2 were identified as a lineage-negative SSC^{low}FSC^{low} population expressing ST2L and Sca-1 (Fig. 4A). Consistent with previous reports, most of these cells expressed CD25 and were only partially positive for c-Kit (31, 32). In bone marrow, IL-33 treatment of CIA dramatically increased the proportion of ILC2 (Fig. 4B). We observed a similar result in the spleen, where the frequency and the number of ILC2 were increased by 6-fold after IL-33 treatment (Fig. 4C, 4D).

IL-33 promotes Treg expansion in CIA and increases ST2L expression

Tregs are able to prevent autoimmunity and to respond to IL-33, thanks to their expression of ST2L (13). Therefore, we investigated whether the mechanism of action of IL-33 in CIA involved Tregs. In the spleen, IL-33 treatment induced an increase in Treg (CD4⁺Foxp3⁺ cells) and Tconv numbers (Fig. 5B, 5D). However, Tconv percentage in the spleen was decreased in IL-33-treated mice compared with the

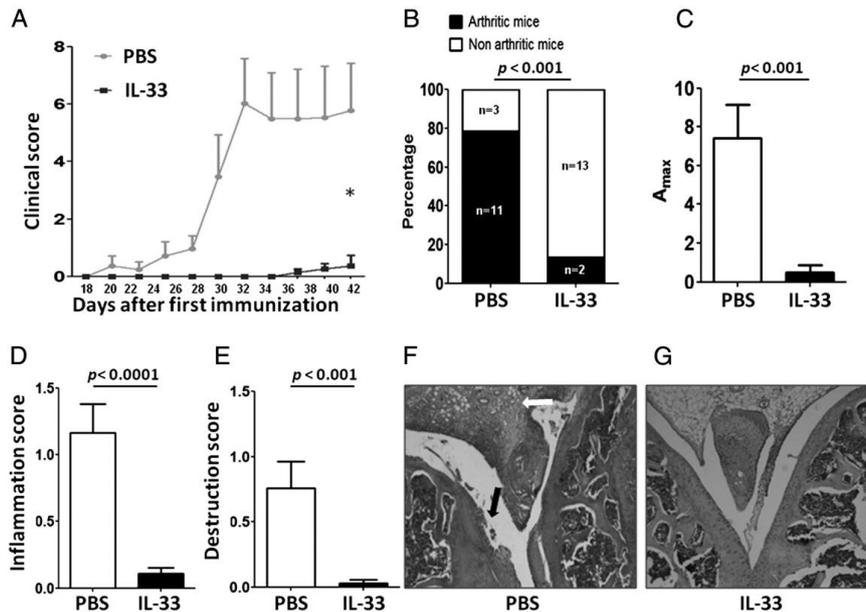


FIGURE 1. IL-33 treatment inhibits CIA. All C57BL/6 mice were immunized with CII emulsified in CFA on day 0 and on day 21. Mice were treated i.p. daily with 100 μ l of rIL-33 at 10 μ g/ml (1 μ g/mouse) for 10 d, from days 1 to 5 and from days 21 to 25 ($n = 15$, black squares). Control mice received 100 μ l of phosphate buffer saline (PBS) ($n = 14$, gray circles). On day 28, mice were given i.p. injection of LPS 055:B5 (50 μ g/mice) (LPL203; Biochem, Meudon, France). Mice were killed at day 42, paws were removed, and histological sections of the knee were prepared and stained with H&E. (A) Clinical arthritis scores. (B) Frequency of arthritis. (C) A_{max} . (D) Histological joint inflammation score. (E) Histological joint destruction score. Histological slide at day 42 of one representative PBS control mouse (F) and of one representative IL-33-treated mouse (G). Black arrow shows joint destruction, and white arrow shows synovial infiltration. Except in (B), data are expressed as mean \pm SEM. Data are representative of one experiment of three similar experiments. * $p < 0.0001$ IL-33 versus PBS (one-way ANOVA).

control group (Fig. 5E), whereas Treg frequency among splenocytes was increased (Fig. 5C). Treg frequency among $CD4^+$ T cells was also increased in IL-33-treated mice (PBS: 12.6% \pm 0.52 versus IL-33: 20.7% \pm 0.98, $p < 0.0001$). Consequently, there was an increase of the Treg (among splenocytes)/Tconv (among splenocytes) ratio in IL-33-treated CIA mice (Fig. 5F), showing a shift in favor of Tregs. Likewise, in LNs and blood from IL-33-treated mice, the frequency of Tregs among total cells was increased, whereas Tconv frequency decreased, although differences were nonsignificant (Supplemental Table D). Consequently, the Treg/Tconv ratio was increased in the blood of IL-33-treated CIA mice (Supplemental Table I). We next tried to determine whether IL-33 acts directly on Tregs in CIA mice by studying their ST2L expression 28 d after CIA induction (Fig. 5G). IL-33 treatment induced a 2-fold increase in the frequency of Tregs expressing ST2L in the spleen (Fig. 5H). This was accompanied by an increased MFI of ST2L among Treg $ST2L^+$ (Fig. 5I). Afterward, we analyzed the increased number of Tregs after IL-33 treatment of CIA mice upon differential gating on Treg $ST2L^+$ and Treg $ST2L^-$. IL-33 treatment induced only a 2.5-fold increase in $ST2L^-$ Treg cell count, whereas the number of $ST2L^+$ Tregs was multiplied by six (Fig. 5J). This result suggests that IL-33-induced Treg expansion is likely to be a direct effect of IL-33 on $ST2L^+$ Tregs. In LN and in blood, the frequency of Tregs expressing ST2L was also increased in IL-33-treated mice (Supplemental Fig. 1A, 1C). IL-33 also induced in vitro an increased percentage of Tregs expressing ST2L after a stimulation of 18 and 30 h (Supplemental Fig. 1E, 1F).

IL-33 modifies Treg phenotype and enhances Treg suppressive activity in CIA

Then, we characterized the biological effect of IL-33 on Treg activation. First, we studied the expression of CD39 by Tregs 28 d after CIA induction (Fig. 6A). CD39 expression on splenic Tregs was higher in IL-33-treated mice compared with the PBS group (Fig. 6B, 6C). The same result was observed in LNs, but not in the blood (Supplemental Table I). Moreover, we observed a 2-fold increase of $CD39^{high}$ Treg frequency among $CD39^+$ Tregs in the spleen of IL-33-treated mice (Fig. 6D). The percentages of Tregs expressing ST2L and CD39 MFI among $CD39^+$ Tregs in mice treated or not treated with IL-33 were correlated. This finding suggested a link between the expression of these two molecules on Tregs (Fig. 6E). To strengthen these data, we determined CD39 MFI among $CD39^+$ Tregs expressing or not expressing ST2L in IL-33-treated mice. The $ST2L^+$ Treg population had a 2-fold higher CD39 MFI than did nonexpressing $ST2L^-$ Tregs (Fig. 6F). A similar result was observed in LNs concerning CD39 MFI in IL-33-treated mice according to ST2L expression ($ST2L^+$ Tregs: 273.3 \pm 6.3; $ST2L^-$ Tregs: 152.6 \pm 4.7, $p < 0.001$). Accordingly, IL-33-induced CD39 expression by Tregs is probably restricted to $ST2L^+$ cells. CD39 expression on Tregs is related to their suppressive activity because membrane-expressed CD39 catalyzes extracellular ATP hydrolysis (33–35). Consequently, we determined the impact of IL-33 on the ATPase activity of Tregs ($CD4^+CD25^+$ cells). We observed a slight and nonsignificant increase in the ATPase activity of Tregs in IL-33-treated CIA mice (Fig. 6G).

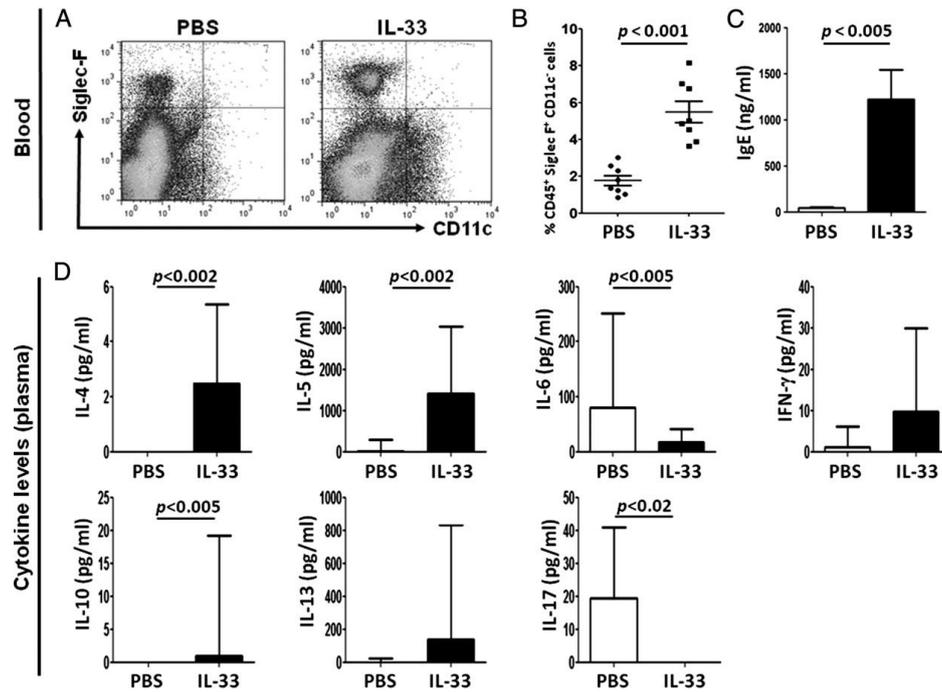


FIGURE 2. IL-33 treatment induces a shift toward a type 2 immune response by promoting eosinophils and by increasing Th2 cytokine levels in plasma. C57BL/6 mice were immunized with CII/CFA at days 0 and 21, and they were treated i.p. daily with rIL-33 (1 μ g/mouse) from days 1 to 5 and from days 21 to 25. Control mice received PBS. All mice were euthanized 28 d after the first immunization with CII/CFA. (A and B) Blood cells (eight mice per group) were labeled with fluorochrome-conjugated anti-CD11c and anti-Siglec-F. (A) Representative dot plot of SSC^{high} CD45⁺ Siglec-F⁺ CD11c⁻ cell frequency in IL-33-treated mice and in PBS control mice. (B) SSC^{high} CD45⁺ Siglec-F⁺ CD11c⁻ cell frequency among whole blood leukocytes. (C) IgE levels in the plasma and (D) cytokine (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IFN- γ , and IL-17) levels in the plasma were determined at day 28 (PBS; $n = 8$; IL-33; $n = 8$). Data are given as mean \pm SEM (A–C) or median and interquartile range (error bars) (D) for each group. Data are representative of one experiment of three similar experiments. Mann-Whitney U test was used for statistical analysis.

Moreover, CTLA-4 membrane expression on Tregs from LNs (Supplemental Table 1) and the spleen (data not shown) were slightly increased in IL-33-treated mice. Finally, we determined ex vivo the ability of Tregs to suppress Tconv proliferation. We found no significant difference in the capacity of Tregs to inhibit Tconv proliferation between IL-33-treated mice and the control group (data not shown). On the contrary, IL-33 treatment dramatically enhanced the ability of Tregs to suppress IFN- γ secretion by Tconv (Fig. 6H).

IL-33 does not inhibit CII-specific CD4⁺ T cell response in CIA

The therapeutic effect of IL-33 is associated with a shift toward a type 2 immune response and to a dramatic Treg expansion. However, because CIA is strongly mediated by CII-specific CD4⁺ T cells, we also investigated whether the dramatic impact of IL-33 on arthritis development was linked to a modified CII-specific autoimmune T cell response. Accordingly, we measured the CD4⁺ T cell response to CII immunizing Ag in draining LNs at 10 and 28 d after the first CII immunization in PBS- and IL-33-treated mice. CD4⁺ T cell proliferation and IFN- γ production with CII in vitro challenge were assessed in cells from draining LNs (Supplemental Fig. 2). At day 10, CII-induced IFN- γ secretion and CD4⁺ T cell proliferation in cell culture supernatant were similar in LNs from control mice and IL-33-treated mice (days 1–5) (Supplemental Fig. 2A, 2C). At day 28, CII-induced CD4⁺ T cell

proliferation was higher in IL-33-treated mice (days 1–5 and days 21–25) than in control mice, and increased IFN- γ production was observed upon in vitro restimulation with the highest dose of CII (100 μ g/ml) (Supplemental Fig. 2B, 2D).

Effect of a late IL-33 treatment on arthritis development

The importance of timing of IL-33 injection was investigated by treating mice only during the clinical onset of arthritis, i.p. daily from day 21 to day 25. Clinical scores were similar in mice treated with IL-33 and control mice (Fig. 7A), and neither incidence (Fig. 7B) nor A_{\max} (Fig. 7C) was modified. Histological analysis did not reveal any difference between the groups (Fig. 7D, 7E). We then aimed at comparing Treg and type 2 immune cell responses in mice receiving early + late or only late injection of IL-33. As shown in Supplemental Fig. 3A, ST2L⁺ Treg, Th2 cell, and ILC2 expansion was much weaker in CIA mice receiving IL-33 only from day 21 to day 25 than in mice treated from days 1 to 5 and then from days 21 to 25. We also aimed at comparing cytokine level changes in serum from mice treated with IL-33 according to both treatment regimens. As shown in Supplemental Fig. 3B, the increase in IL-4 levels in serum was more pronounced in CIA mice receiving IL-33 from days 1 to 5 and then from days 21 to 25 than in mice treated only from day 21 to day 25, in contrast to IL-5 and IL-6 levels, which showed greater increase in mice treated only from day 21 to day 25.

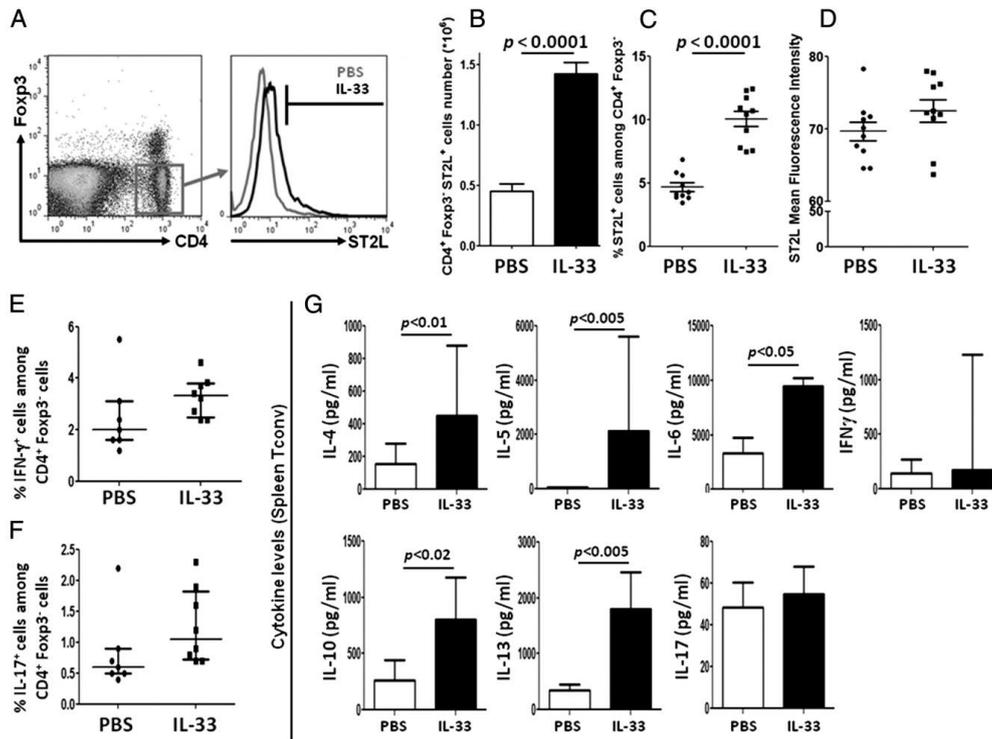


FIGURE 3. IL-33 treatment promotes Th2 cells and dramatically increases Th2 cytokine secretion by Tconv. C57BL/6 mice were immunized with CII/ CFA and treated as in Fig. 2. Control mice received PBS. All mice were euthanized 28 d after the first immunization with CII/CFA. (A) As shown on this representative dot plot, Th2 cells were defined as CD4⁺ Foxp3⁺ cells expressing ST2L. Representative histogram of ST2L expression among CD4⁺ Foxp3⁺ cells in IL-33-treated mice and in PBS control mice. (B–E) Splenocytes (10 mice per group) were labeled with fluorochrome-conjugated anti-ST2L, anti-CD4, anti-Foxp3, anti-IFN-γ, and anti-IL-17. (B) CD4⁺ Foxp3⁺ ST2L⁺ (Th2) cell number. (C) Percentage of ST2L⁺ cells among CD4⁺ Foxp3⁺ cells. (D) ST2L MFI on ST2L⁺ CD4⁺ Foxp3⁺ cells. (E) Percentage of Th1 (PBS: *n* = 7; IL-33: *n* = 8) and (F) Th17 (PBS: *n* = 7; IL-33: *n* = 8) cells in the spleen, respectively defined as CD4⁺ Foxp3⁺ IFN-γ⁺ and CD4⁺ Foxp3⁺ IL-17⁺ cells. (G) Cytokine (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, and IL-17) levels were determined at day 28 post CIA induction in PMA-ionomycin-stimulated Tconv supernatant from mice treated with IL-33 (*n* = 8) and PBS (*n* = 8). Data are given as mean ± SEM (A–D) or median and interquartile range (error bars) (E–G) for each group. Mann-Whitney *U* test was used for statistical analysis.

Discussion

Our study shows, to our knowledge, a previously undescribed capacity of IL-33 to dramatically suppress CIA development. This therapeutic effect was observed when IL-33 was administered at both the initial and the development phases of CIA. It was strong, long lasting, and associated with a shift toward a type 2 immune response, including the expansion of eosinophils, Th2 cells, and ILC2. Moreover, our work reveals the central role of Tregs in the inhibitory effect of IL-33 on CIA development.

Treatment of CIA by repeated administration of IL-33 led to a strong increase in Th2 cytokine levels in the plasma. These cytokines, such as IL-4 and IL-13, show therapeutic properties in various RA models and are certainly strongly involved in the therapeutic effect of IL-33 in our study (36, 37). In contrast, IL-17 concentration in plasma is decreased after IL-33 treatment, whereas it is not modified in splenic Tconv cultures. This decrease might be related to a lower secretion by non-CD4⁺ T cells of IL-17 in IL-33-treated mice, including ILC3, NK, macrophages (38, 39), and neutrophils (40), even if the functional importance of the IL-17 produced by these cell types during inflammation is not very well characterized. Furthermore, in our CIA experiments, IL-33

induces a shift toward Th2 cells. However, it appears that IL-33 is a switch-hitting cytokine that can have different functions associated with driving either the Th2 immune response or the Th1 immune response when delivered in vivo. For instance, it can promote IFN-γ secretion by CD8 T cells in a model of virus infection (41) and interact directly with NK and NKT cells to induce this cytokine (3). In the same way, IL-33 blockade ameliorates hepatic injury by reducing IFN-γ secretion in a mouse model (42). How one method elicits Th2 responses and other Th1 responses in vivo is unclear. It is possible that different routes of delivery and even different doses have different outcomes.

ILC2 are a newly defined member of the lymphoid lineage strongly involved in the establishment of a type 2 immunity, notably by producing high amounts of IL-13 and IL-5, and low amounts of IL-4 (43). However, to our knowledge, the role of ILC2 in chronic inflammation of autoimmune origin has not been described yet, but because they produce type 2 cytokines, their role should be beneficial in Th1- and Th17-driven autoimmune diseases such as RA. In our study, IL-33 treatment was associated with a dramatic expansion of ILC2 in the bone marrow and in the spleen of IL-33-treated mice. Thus, ILC2 are likely to participate

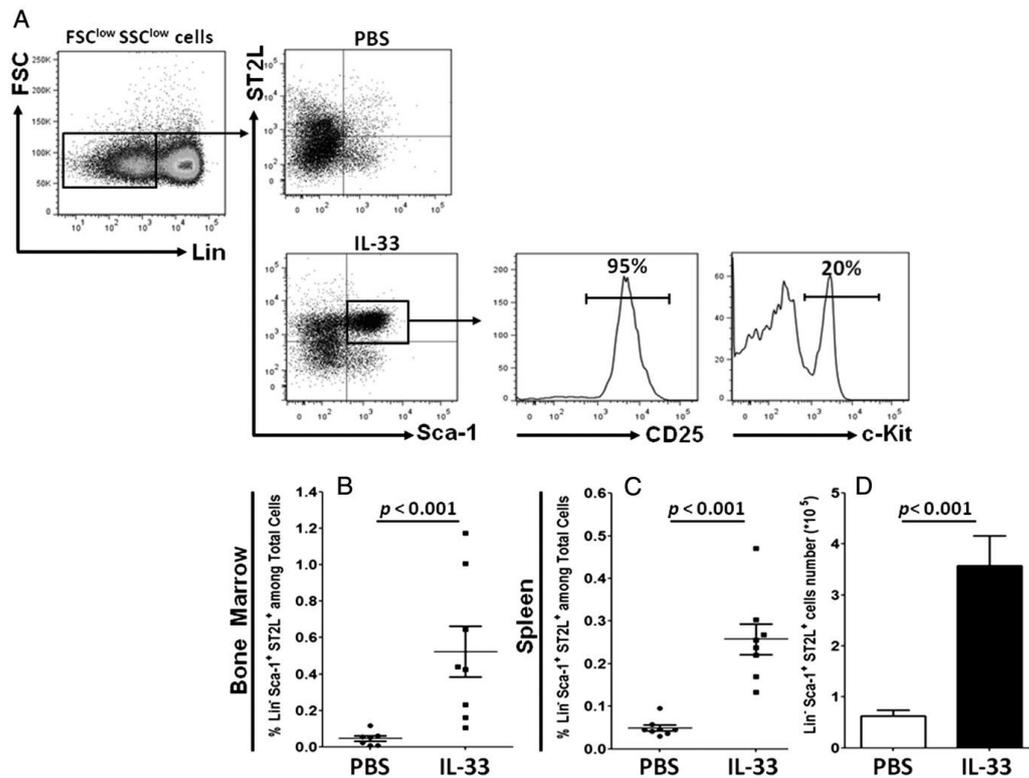


FIGURE 4. IL-33 treatment strongly expands ILC2. Mice are the same as in Fig. 3. Splenocytes and bone marrow cells were labeled with fluorochrome-conjugated anti-ST2L, anti-Lin, anti-Sca-1, anti-CD25, and anti-c-Kit. **(A)** Identification of ILC2 in the bone marrow by flow cytometry is shown in representative mice. Cells were gated on the $FSC^{low}SSC^{low}Lin^{-}$ fraction, and then ILC2 frequency was determined by gating on $Sca-1^{+}ST2L^{+}$ cells. Histogram shows CD25 and c-Kit expression among $FSC^{low}SSC^{low}Lin^{-}Sca-1^{+}ST2L^{+}$. **(B)** Percentage of ILC2 ($FSC^{low}SSC^{low}Lin^{-}Sca-1^{+}ST2L^{+}$ cells) among total bone marrow cells. **(C)** Percentage of ILC2 among total splenocytes. **(D)** ILC2 number in the spleen. Data are given as mean \pm SEM for each group. Mann-Whitney U test was used for statistical analysis.

in the therapeutic effect of IL-33 in CIA by promoting the establishment of the type 2 immune response observed in our experiments.

Tregs are key players in the control of RA (16, 44) and its models (45). We hypothesized that the strong anti-inflammatory effect of IL-33 in CIA is in part mediated through Treg expansion and activation. Indeed, our work shows that IL-33 administration *in vivo* increases the frequency of Tregs, confirming *in vitro* and *in vivo* data obtained in three other studies performed in Con A-induced hepatitis (46) and in allograft models (13, 14). It was also shown that IL-33 is a key regulator of intestinal immune response by promoting Tregs in the intestine (47). Moreover, IL-33-induced expansion of Tregs can lead to an anti-inflammatory therapeutic effect in experimental colitis (48) and prevention of transplant rejection (13). These effects of IL-33 on Treg expansion may be either direct or indirect, as suggested by recent publications, for instance, via induction of IL-2 production by dendritic cells (49) or mast cells (50). In our study, we show that IL-33 treatment induced higher rates of $ST2L^{+}$ Tregs than $ST2L^{-}$ Tregs, suggesting that IL-33-induced Treg expansion is likely to be a direct effect of IL-33 on $ST2L^{+}$ Tregs. This $ST2L^{+}$ Treg population has recently been shown to be an activated subset of $Foxp3^{+}$ cells, demonstrated by a

higher expression of ICOS and CD44 compared with their $ST2L^{-}$ counterpart (49). We can therefore hypothesize that the therapeutic effect of IL-33 in CIA is, at least in part, related to the expansion of a more activated Treg population. Similarly, we showed a higher CD39 expression on Tregs of IL-33-treated mice. Indeed, membrane-expressed CD39 catalyzes extracellular ATP hydrolysis and, together with CD73, results in the production of adenosine, an anti-inflammatory mediator. CD39 expression on Tregs has been thus associated with increased suppressive potency, of which one effect is suppression of Th17 cells (33, 34). Moreover, alterations in the CD39/CD73 machinery lead to loss of Treg function and to autoimmunity (35). $CD39^{+}$ Tregs are impaired in patients with multiple sclerosis (33). Furthermore, this $CD39^{+}$ Treg population expands during multiple sclerosis remissions and after anti-inflammatory treatment in CIA (33, 51). We recently showed that treatment of CIA and of RA patients with an Ab against IL-6R also involved $CD39^{+}$ Tregs (51). We therefore hypothesized that IL-33 allows the generation of a more potent suppressive Treg population capable of inducing metabolic changes (ATP hydrolysis) that protect against joint inflammation. We observed *ex vivo* that IL-33 enhances the ability of Tregs to inhibit IFN- γ secretion by T_{conv} , without increasing the inhibition of

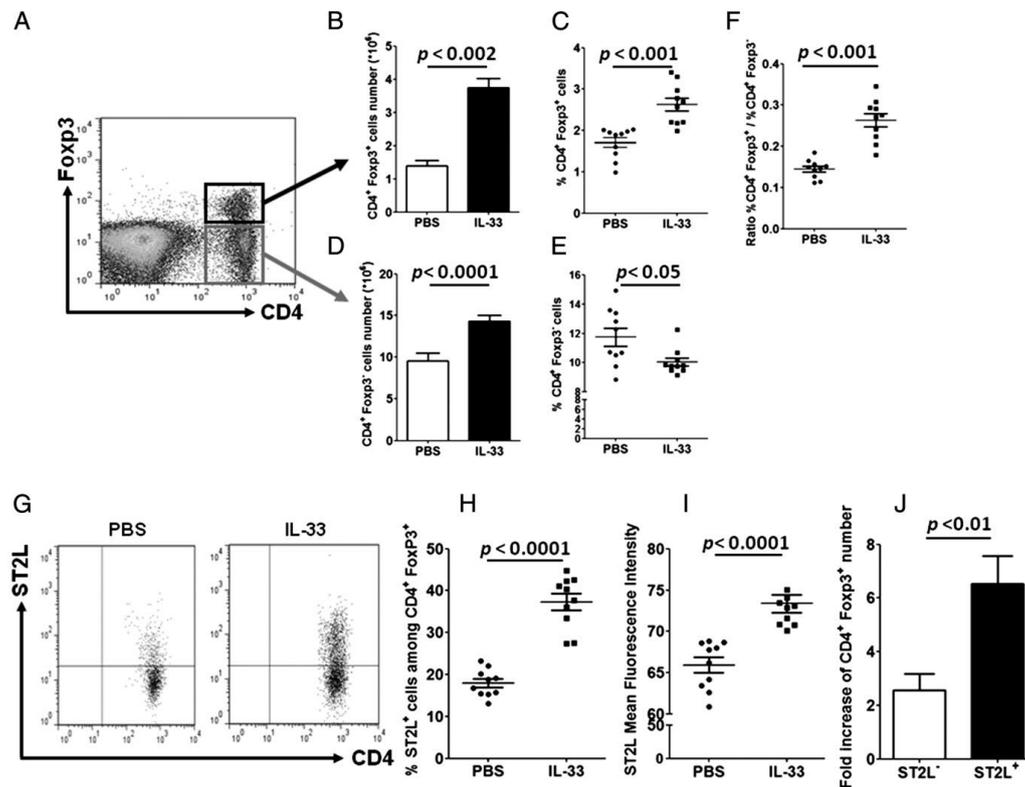


FIGURE 5. IL-33 treatment expands Tregs and induces an increased expression of ST2L. C57BL/6 mice were immunized with CII/CFA at days 0 and 21, and they were treated i.p. daily with rIL-33 (1 μ g/mouse) ($n = 10$) from days 1 to 5 and from days 21 to 25. Control mice ($n = 10$) received PBS. All mice were euthanized 28 d after the first immunization with CII/CFA. Splenocytes were stained with fluorochrome-conjugated anti-CD4, anti-ST2L, and anti-Foxp3. **(A)** As shown on this representative dot plot, Tconv were defined as CD4⁺ Foxp3⁻ cells and Tregs as CD4⁺ Foxp3⁺ cells. **(B)** Treg number. **(C)** Treg percentages among splenocytes. **(D)** Tconv number. **(E)** Tconv percentages among splenocytes. **(F)** %Treg among splenocytes/%Tconv among splenocytes ratio. **(G)** Representative dot plot of ST2L expression among Tregs in one IL-33-treated mouse and in one PBS control mouse. **(H)** Percentage of ST2L⁺ cells among CD4⁺ Foxp3⁺ cells. **(I)** ST2L MFI on ST2L⁺ Tregs. **(J)** Fold increase in Treg numbers in IL-33-treated mice according to ST2L expression. Data are given as mean \pm SEM for each group. Data are representative of one experiment of three similar experiments. Mann-Whitney *U* test was used for statistical analysis.

Tconv proliferation by Tregs. Interestingly, anti-TNF- α Ab (infliximab), frequently used in RA treatment, was also found to enhance the inhibition by Tregs of IFN- γ secretion by Tconv, without altering their proliferation (52).

Most of the work deciphering the involvement of IL-33 in RA studied the functional role of the IL-33/ST2 axis. In mouse models of arthritis involving active immunization, the use of ST2 KO mice, ST2 blockade, or injection of sST2 decreased immune responses and severity of arthritis. This finding suggested a pathogenic role for IL-33, signaling through ST2L, in these experimental models (20–22). However, although arthritis is reduced in ST2 KO mice, it did not differ in IL-33 KO mice compared with wild-type mice (25, 26). One hypothesis of this striking contrast could be that ST2L can cross-activate other signaling pathways in addition to IL-33-mediated signals (53). Thus, all results obtained by inhibiting ST2L or in ST2L KO mice do not necessarily allow conclusions to be drawn on the role of IL-33 in the RA process.

The direct involvement of IL-33 in the inflammatory effector phase of arthritis had been reported in two studies. The first one, in

concordance with our result, was performed in the KRN model of RA and reported a suppression of joint inflammation by IL-33, by enhancing the production of Th2 cytokines and by upregulating Fc γ RIIB on macrophages (54). However, the second one concluded that late IL-33 administration had a pathogenic role in CIA by activating mast cells (24). The main difference with our study, however, is based on the therapeutic window used because we administered IL-33 both at the induction of CIA, from days 1 to 5, and then at the boost from days 21 to 25. In the study by Xu et al. (24), IL-33 was administered only from day 21 to day 25. Using the same kinetic treatment, we partially confirmed this result. In fact, we observed in IL-33-treated mice a slight and nonsignificant increase in arthritis clinical signs, whereas joint destruction and inflammation were unmodified. This differential effect of IL-33 according to the therapeutic window used could probably be explained by the fact that ST2L⁺ Treg, Th2 cell, and ILC2 expansion was much weaker in CIA mice receiving IL-33 only from day 21 to day 25 than in mice treated from days 1 to 5 and then from days 21 to 25. Moreover, treatment with IL-33 from days 1

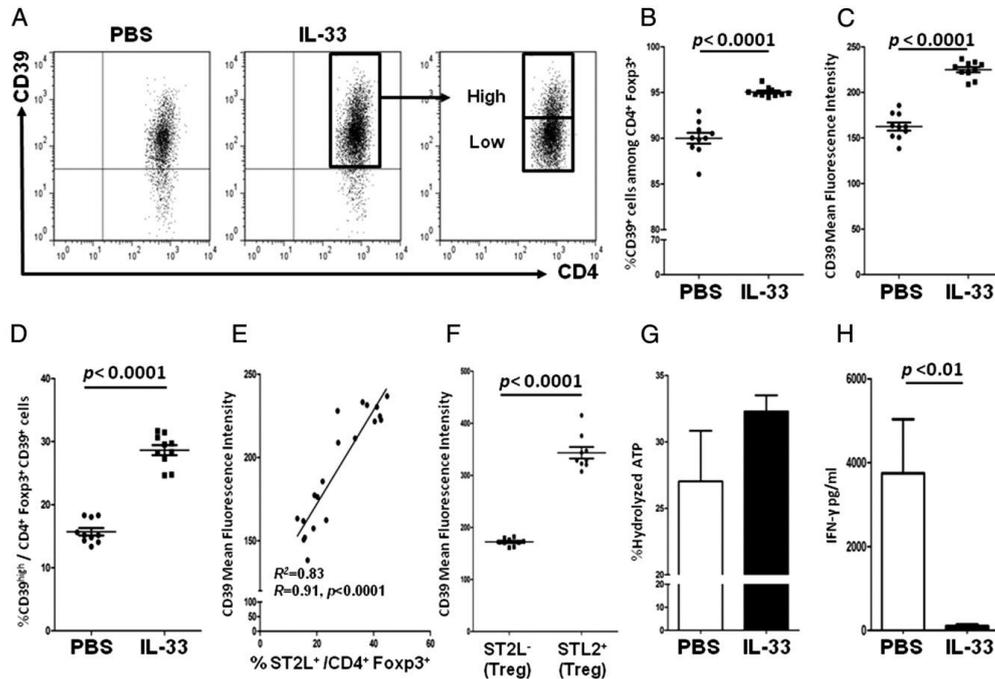


FIGURE 6. IL-33 treatment enhances Treg activity. The mice are the same as in Fig. 5. (A–F) Splenocytes were labeled with fluorochrome-conjugated anti-ST2L, anti-CD4, anti-Foxp3, and anti-CD39. (A) Representative dot plot of CD39 expression among CD4⁺ Foxp3⁺ cells in IL-33-treated mice and in PBS control mice. (B) Percentage of CD39⁺ cells among CD4⁺ Foxp3⁺ cells. (C) CD39 MFI on CD39⁺ Tregs. (D) Frequency of Treg CD4⁺ Foxp3⁺ CD39⁺ high among Treg CD4⁺ Foxp3⁺ CD39⁺. (E) Correlation of the frequency of Treg CD4⁺ Foxp3⁺ expressing ST2L and CD39 MFI in mice treated or not treated with IL-33. (F) Correlation of CD39 MFI among CD4⁺ Foxp3⁺ CD39⁺ ST2L⁺ cells and among CD4⁺ Foxp3⁺ CD39⁺ ST2L⁻ cells, in IL-33-treated mice. (G) CD4⁺CD25⁺ ATPase activity. (H) In vitro IFN- γ concentration after 4 d of coculture of CD4⁺CD25⁻ cells and CD4⁺CD25⁺ cells. Data are given as mean \pm SEM for each group. Data represent one experiment representative of two similar experiments. Pearson's correlation was used to correlate CD39 MFI among CD4⁺ Foxp3⁺ CD39⁺ cells and frequency of CD4⁺ Foxp3⁺ cells expressing ST2L. Mann-Whitney *U* test was used for the other statistical analysis.

to 5 and then from days 21 to 25 induced a more pronounced increase in IL-4 serum level than in mice that had received IL-33 only from day 21 to day 25. Because IL-4 is anti-inflammatory in CIA (36, 37), this could also explain the differential effect of IL-33 according to the therapeutic window. We can therefore hypothesize that early administration of IL-33 is likely to allow the shift to a type 2 immune response and to Treg activation, as we showed. In contrast, late administration of IL-33 would probably occur too late to efficiently promote Treg expansion, to induce a strong shift toward a type 2 immune response, and finally to inhibit arthritis development. Consequently, in a context where joint inflammation is probably already installed, IL-33 treatment only from days 21 to 25 may exacerbate inflammation by inducing neutrophil and/or mast cell migration within the joint. Interestingly, the antiarthritic effect of IL-33 may be also related to its expression in the bone tissue in which it acts as a bone-protective cytokine-blocking osteoclastogenesis, as shown in human-TNF-transgenic mice, a model of RA (55). Importantly, IL-33 can also inhibit human osteoclast differentiation from bone marrow precursors in vitro (52).

To determine whether the strong impact of IL-33 on CIA development was linked to a modified anti-CII immune response, we also investigated CII-specific CD4⁺ T cell proliferation in IL-33-

treated mice. In the early phase of CIA (day 10), IL-33 does not modify CII-specific CD4⁺ T cell response in the draining LNs. The inhibitory effect of IL-33 on CIA development is thus not linked to the absence of an arthritogenic response to CII, which could result from a skew of the immune response from a Th1/Th17 toward a Th2 profile during the induction of CIA.

During the arthritis development phase (day 28) and, as expected, CII-induced T cell proliferation is lower than at day 10 but was enhanced by IL-33 treatment. Indeed, CII-specific CD4⁺ T cell proliferation is enhanced by IL-33 treatment, and IFN- γ production increases upon in vitro restimulation with the highest dose of CII (100 μ g). Several hypotheses can be raised to explain these results. In light of our data, IL-33 both protects against arthritis and promotes IFN- γ secretion and CD4⁺ T cell proliferation induced by CII restimulation. Yet, in several studies, IFN- γ was protective in CIA. We and others showed this by administering IFN- γ or a neutralizing anti-IFN- γ Ab or using genetically engineered mice with defective IFN- γ production or action (56–60). IFN- γ could exert its protective effect in CIA by inhibiting the differentiation of monocytes/macrophages into osteoclasts (61) and by inducing regulatory B10 cells in CIA (62). Moreover, some studies showed that IFN- γ inhibits IL-17-mediated neutrophil infiltration and bone destruction, whereas neutralization of IFN- γ

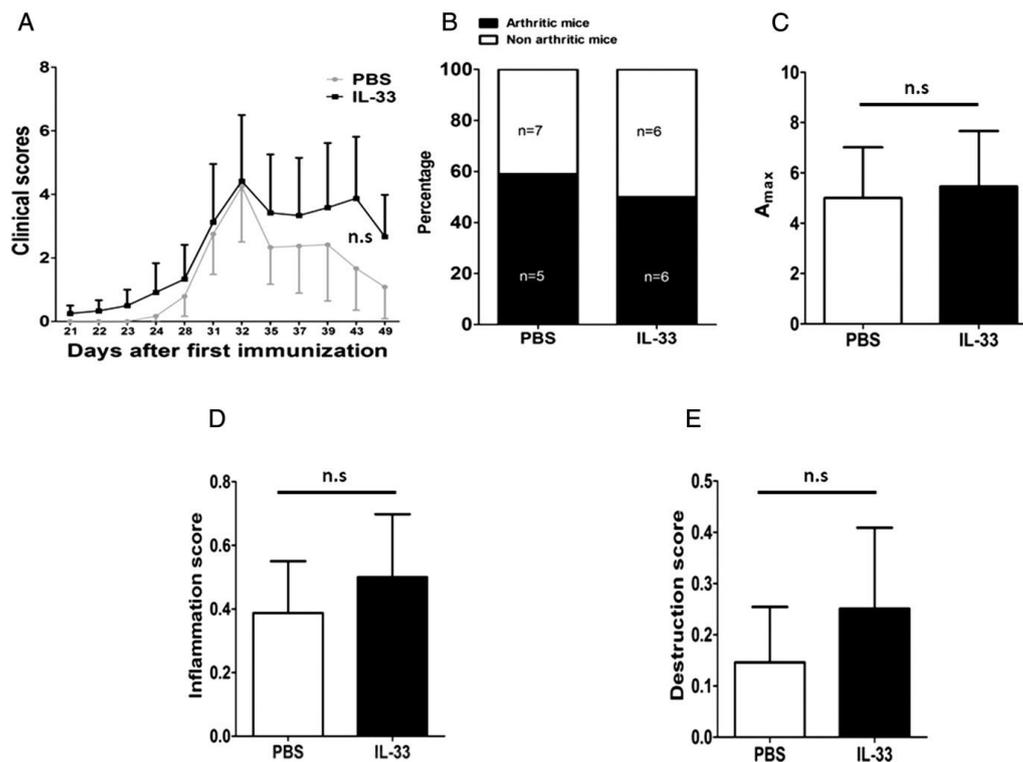


FIGURE 7. Late IL-33 administration does not significantly affect CIA development. All C57BL/6 mice were immunized with CII emulsified in CFA on day 0 and on day 21. Mice were treated i.p. daily with 100 μ l of rIL-33 at 10 μ g/ml (1 μ g/mouse) for 5 d from days 21 to 25 ($n = 12$, black squares). Control mice received 100 μ l of PBS ($n = 12$, gray circle). Mice were killed at day 49, paws were removed, and histological sections of the knee were prepared and stained with H&E. (A) Clinical arthritis scores. (B) Frequency of arthritis. (C) A_{\max} . (D) Histological joint inflammation score. (E) Histological joint destruction score. Data are given as mean \pm SEM for each group. Mann-Whitney U test was used for statistical analysis.

accelerates the course of CIA, with an increase in IL-17 levels in serum and joints (63). However, the contribution of IFN- γ to the pathogenesis of experimental arthritis is controversial. For instance, this cytokine contributes to the development of proteoglycan-induced arthritis (64, 65). Indeed, the IFN- γ effect seems to depend on the phase of disease and location of its production (joint versus spleen or LNs).

Overall, it is now well established that IL-33 is able to suppress inflammation by driving type 2 immunity and/or by boosting Treg activity, a phenomenon observed in our study but also in many murine models of human disease (6–8, 10). For the first time, to our knowledge, we highlight the protective effect of repeated IL-33 injections in CIA and relate it to the emergence of type 2 immunity and to the expansion of a CD39⁺ Treg population. In RA, a disease in which Tregs are clearly defective (16), the powerful effect of IL-33 on those cells should not be ignored. Finally, in a field mainly focused on the search for new therapeutic targets, our work, by demonstrating the powerful anti-inflammatory capacity of exogenous IL-33 in CIA, provides a warning signal concerning the development of treatment based on IL-33/ST2 axis inhibition. Other studies, particularly in humans, will be necessary to determine which effect of IL-33 in RA, anti- or proinflammatory, outperforms the other and should be targeted.

Acknowledgments

We thank Nadège Brunel for multiplex experiments (INSERM IFR65: Institut de recherche en santé Saint-Antoine, Paris, France). We thank Clément Lourdes (University of Paris 13, Paris, France) and Stéphane Chambris and Sonia Varela (animal facilities, University of Paris 13, Paris, France) for outstanding technical assistance.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Pecaric-Petkovic, T., S. A. Didichenko, S. Kaempfer, N. Spiegl, and C. A. Dahinden. 2009. Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. *Blood* 113: 1526–1534.
- Schmitz, J., A. Owyang, E. Oldham, Y. Song, E. Murphy, T. K. McClanahan, G. Zurawski, M. Moshrefi, J. Qin, X. Li, et al. 2005. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 23: 479–490.
- Bourgeois, E., L. P. Van, M. Samson, S. Diem, A. Barra, S. Roga, J. M. Gombert, E. Schneider, M. Dy, P. Gourdy, et al. 2009. The pro-Th2 cytokine IL-33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN-gamma production. *Eur. J. Immunol.* 39: 1046–1055.
- Besnard, A.-G., D. Togbe, I. Couillin, Z. Tan, S.-G. Zheng, F. Erard, M. Le Bert, V. Quesniaux, and B. Ryffel. 2012. Inflammasome-IL-1-Th17 response in allergic lung inflammation. *J. Mol. Cell Biol.* 4: 3–10.
- Licona-Limón, P., L. K. Kim, N. W. Palm, and R. A. Flavell. 2013. TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. *Nat. Immunol.* 14: 536–542.

6. Milovanovic, M., V. Volarevic, G. Radosavljevic, I. Jovanovic, N. Pejnovic, N. Arsenijevic, and M. L. Lukic. 2012. IL-33/ST2 axis in inflammation and immunopathology. *Immunol. Res.* 52: 89–99.
7. Groß, P., K. Doser, W. Falk, F. Obermeier, and C. Hofmann. 2012. IL-33 attenuates development and perpetuation of chronic intestinal inflammation. *Inflamm. Bowel Dis.* 18: 1900–1909.
8. Jiang, H.-R., M. Milovanovic, D. Allan, W. Niedbala, A.-G. Besnard, S. Y. Fukada, J. C. Alves-Filho, D. Togbe, C. S. Goodyear, C. Linington, et al. 2012. IL-33 attenuates EAE by suppressing IL-17 and IFN- γ production and inducing alternatively activated macrophages. *Eur. J. Immunol.* 42: 1804–1814.
9. Chen, H., Y. Sun, L. Lai, H. Wu, Y. Xiao, B. Ming, M. Gao, H. Zou, P. Xiong, Y. Xu, et al. 2015. Interleukin-33 is released in spinal cord and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Neuroscience* 308: 157–168.
10. Barbour, M., D. Allan, H. Xu, C. Pei, M. Chen, W. Niedbala, S. Y. Fukada, A.-G. Besnard, J. C. Alves-Filho, X. Tong, et al. 2014. IL-33 attenuates the development of experimental autoimmune uveitis. *Eur. J. Immunol.* 44: 3320–3329.
11. Miller, A. M., D. Xu, D. L. Asquith, L. Denby, Y. Li, N. Sattar, A. H. Baker, I. B. McInnes, and F. Y. Liew. 2008. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J. Exp. Med.* 205: 339–346.
12. Wills-Karp, M., R. Rani, K. Dienger, I. Lewkowich, J. G. Fox, C. Perkins, L. Lewis, F. D. Finkelman, D. E. Smith, P. J. Bryce, et al. 2012. Trefoil factor 2 rapidly induces interleukin 33 to promote type 2 immunity during allergic asthma and hookworm infection. *J. Exp. Med.* 209: 607–622.
13. Turnquist, H. R., Z. Zhao, B. R. Rosborough, Q. Liu, A. Castellana, K. Isse, Z. Wang, M. Lang, D. B. Stolz, X. X. Zheng, et al. 2011. IL-33 expands suppressive CD11b⁺ Gr-1(int) and regulatory T cells, including ST2L⁺ Foxp3⁺ cells, and mediates regulatory T cell-dependent promotion of cardiac allograft survival. *J. Immunol.* 187: 4598–4610.
14. Gajardo, T., R. A. Morales, M. Campos-Mora, J. Campos-Acuña, and K. Pino-Lagos. 2015. Exogenous interleukin-33 targets myeloid-derived suppressor cells and generates periphery-induced Foxp3⁺ regulatory T cells in skin-transplanted mice. *Immunology* 146: 81–88.
15. Boissier, M.-C. 2011. Cell and cytokine imbalances in rheumatoid synovitis. *Joint Bone Spine* 78: 230–234.
16. Nadkarni, S., C. Mauri, and M. R. Ehrenstein. 2007. Anti-TNF- α therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF- β . *J. Exp. Med.* 204: 33–39.
17. Morgan, M. E., R. P. Sutmoller, H. J. Witteveen, L. M. van Duivenvoorde, E. Zanelli, C. J. Melief, A. Sijders, R. Offringa, R. R. de Vries, and R. E. Toes. 2003. CD25⁺ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 48: 1452–1460.
18. Nguyen, L. T., J. Jacobs, D. Mathis, and C. Benoist. 2007. Where FoxP3-dependent regulatory T cells impinge on the development of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 56: 509–520.
19. Carriere, V., L. Roussel, N. Ortega, D. A. Lacombe, L. Americh, L. Aguilar, G. Bouche, and J. P. Girard. 2007. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 282–287.
20. Talbot-Ayer, D., C. Gabay, and G. Palmer. 2013. Reply to Xie et al. about the article "Distinct serum and synovial fluid interleukin (IL)-33 levels in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and osteoarthritis." *Joint Bone Spine* 80: 117–118.
21. Kashiwakura, J., M. Yanagisawa, H. Lee, Y. Okamura, T. Sasaki-Sakamoto, S. Saito, Y. Tokuhashi, C. Ra, and Y. Okayama. 2013. Interleukin-33 synergistically enhances immune complex-induced tumor necrosis factor alpha and interleukin-8 production in cultured human synovium-derived mast cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 161(Suppl. 2): 32–36.
22. Leung, B. P., D. Xu, S. Culshaw, I. B. McInnes, and F. Y. Liew. 2004. A novel therapy of murine collagen-induced arthritis with soluble T1/ST2. *J. Immunol.* 173: 145–150.
23. Palmer, G., D. Talbot-Ayer, C. Lamacchia, D. Toy, C. A. Seemayer, S. Viatte, A. Finckh, D. E. Smith, and C. Gabay. 2009. Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis. *Arthritis Rheum.* 60: 738–749.
24. Xu, D., H. R. Jiang, P. Kewin, Y. Li, R. Mu, A. R. Fraser, N. Pitman, M. Kurowska-Stolarska, A. N. McKenzie, I. B. McInnes, and F. Y. Liew. 2008. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 10913–10918.
25. Martin, P., D. Talbot-Ayer, C. A. Seemayer, S. Vigne, C. Lamacchia, E. Rodriguez, A. Finckh, D. E. Smith, C. Gabay, and G. Palmer. 2013. Disease severity in K/BxN serum transfer-induced arthritis is not affected by IL-33 deficiency. *Arthritis Res. Ther.* 15: R13.
26. Talbot-Ayer, D., P. Martin, C. A. Seemayer, S. Vigne, C. Lamacchia, A. Finckh, E. Saiji, C. Gabay, and G. Palmer. 2014. Immune-mediated experimental arthritis in IL-33 deficient mice. *Cytokine* 69: 68–74.
27. Clavel, G., C. Valvason, K. Yamaoka, D. Lemeiter, L. Laroche, M. C. Boissier, and N. Bessis. 2006. Relationship between angiogenesis and inflammation in experimental arthritis. *Eur. Cytokine News* 17: 202–210.
28. Saldenbergh-Kermanac'h, N., N. Bessis, D. Lemeiter, M. C. de Vernejoul, M. C. Boissier, and M. Cohen-Solal. 2004. Interleukin-4 cellular gene therapy and osteoprotegerin decrease inflammation-associated bone resorption in collagen-induced arthritis. *J. Clin. Immunol.* 24: 370–378.
29. Wen, T., J. A. Besse, M. K. Mingler, P. C. Fulkerson, and M. E. Rothenberg. 2013. Eosinophil adoptive transfer system to directly evaluate pulmonary eosinophil trafficking in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 6067–6072.
30. Löhning, M., A. Stroehmann, A. J. Coyle, J. L. Grogan, S. Lin, J. C. Gutierrez-Ramos, D. Levinson, A. Radbruch, and T. Kamradt. 1998. T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6930–6935.
31. Klein Wolterink, R. G. J., A. Kleinjan, M. van Nimwegen, I. Bergen, M. de Bruijn, Y. Levani, and R. W. Hendriks. 2012. Pulmonary innate lymphoid cells are major producers of IL-5 and IL-13 in murine models of allergic asthma. *Eur. J. Immunol.* 42: 1106–1116.
32. Brickshawana, A., V. S. Shapiro, H. Kita, and L. R. Pease. 2011. Lineage⁺ Sca1⁺ c-Kit⁺ CD25⁺ cells are IL-33-responsive type 2 innate cells in the mouse bone marrow. *J. Immunol.* 187: 5795–5804.
33. Fletcher, J. M., R. Loneragan, L. Costelloe, K. Kinsella, B. Moran, C. O'Farrelly, N. Tubridy, and K. H. Mills. 2009. CD39⁺Foxp3⁺ regulatory T cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *J. Immunol.* 183: 7602–7610.
34. Ye, Z. J., Q. Zhou, J. C. Zhang, X. Li, C. Wu, S. M. Qin, J. B. Xin, and H. Z. Shi. 2011. CD39⁺ regulatory T cells suppress generation and differentiation of Th17 cells in human malignant pleural effusion via a LAP-dependent mechanism. *Respir. Res.* 12: 77.
35. Sauer, A. V., I. Brigida, N. Carriglio, R. J. Hernandez, S. Scaramuzza, D. Clavenna, F. Sanvito, P. L. Poliani, N. Gagliani, F. Carlucci, et al. 2012. Alterations in the adenosine metabolism and CD39/CD73 adenosinergic machinery cause loss of Treg cell function and autoimmunity in ADA-deficient SCID. *Blood* 119: 1428–1439.
36. Bessis, N., M. C. Boissier, P. Ferrara, T. Blankenstein, D. Fradelizi, and C. Fournier. 1996. Attenuation of collagen-induced arthritis in mice by treatment with vector cells engineered to secrete interleukin-13. *Eur. J. Immunol.* 26: 2399–2403.
37. Cottard, V., D. Mulleman, P. Bouille, M. Mezzina, M. C. Boissier, and N. Bessis. 2000. Adeno-associated virus-mediated delivery of IL-4 prevents collagen-induced arthritis. *Gene Ther.* 7: 1930–1939.
38. Reynolds, J. M., P. Angkasekwinai, and C. Dong. 2010. IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21: 413–423.
39. Cua, D. J., and C. M. Tato. 2010. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 10: 479–489.
40. Moran, E. M., R. Heydrich, C. T. Ng, T. P. Saber, J. McCormick, J. Sieper, H. Appel, U. Fearon, and D. J. Veale. 2011. IL-17A expression is localised to both mononuclear and polymorphonuclear synovial cell infiltrates. *PLoS One* 6: e24048.
41. Bonilla, W. V., A. Fröhlich, K. Senn, S. Kallert, M. Fernandez, S. Johnson, M. Kreuzfeldt, A. N. Hegazy, C. Schrick, P. G. Fallon, et al. 2012. The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral CD8⁺ T cell responses. *Science* 335: 984–989.
42. Chen, J., L. Duan, A. Xiong, H. Zhang, F. Zheng, Z. Tan, F. Gong, and M. Fang. 2012. Blockade of IL-33 ameliorates Con A-induced hepatic injury by reducing NKT cell activation and IFN- γ production in mice. *J. Mol. Med.* 90: 1505–1515.
43. Walker, J. A., J. L. Barlow, and A. N. McKenzie. 2013. Innate lymphoid cells—how did we miss them? *Nat. Rev. Immunol.* 13: 75–87.
44. Nie, H., Y. Zheng, R. Li, T. B. Guo, D. He, L. Fang, X. Liu, L. Xiao, X. Chen, B. Wan, et al. 2013. Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF- α in rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* 19: 322–328.
45. Biton, J., L. Semerano, L. Delavallée, D. Lemeiter, M. Laborie, G. Groudard-Vogel, M. C. Boissier, and N. Bessis. 2011. Interplay between TNF and regulatory T cells in a TNF-driven murine model of arthritis. *J. Immunol.* 186: 3899–3910.
46. Volarevic, V., M. Mitrovic, M. Milovanovic, I. Zelen, I. Nikolic, S. Mitrovic, N. Pejnovic, N. Arsenijevic, and M. L. Lukic. 2012. Protective role of IL-33/ST2 axis in Con A-induced hepatitis. *J. Hepatol.* 56: 26–33.
47. Schiering, C., T. Krausgruber, A. Chomka, A. Fröhlich, K. Adelman, E. A. Wohlfert, J. Pott, T. Griseri, J. Bollrath, A. N. Hegazy, et al. 2014. The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. *Nature* 513: 564–568.
48. Duan, L., J. Chen, H. Zhang, H. Yang, P. Zhu, A. Xiong, Q. Xia, F. Zheng, Z. Tan, F. Gong, and M. Fang. 2012. Interleukin-33 ameliorates experimental colitis through promoting Th2/Foxp3⁺ regulatory T-cell responses in mice. *Mol. Med.* 18: 753–761.
49. Matta, B. M., J. M. Lott, L. R. Mathews, Q. Liu, B. R. Rosborough, B. R. Blazar, and H. R. Turnquist. 2014. IL-33 is an unconventional alarmin that stimulates IL-2 secretion by dendritic cells to selectively expand IL-33R/ST2⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.* 193: 4010–4020.
50. Morita, H., K. Arae, H. Unno, K. Miyachi, S. Toyama, A. Nambu, K. Oboki, T. Ohno, K. Motomura, A. Matsuda, et al. 2015. An interleukin-33-mast cell-interleukin-2 axis suppresses papain-induced allergic inflammation by promoting regulatory T cell numbers. *Immunity* 43: 175–186.
51. Thiélot, A., L. Semerano, Y. M. Pers, J. Biton, D. Lemeiter, P. Portales, J. Quentin, C. Jorgensen, P. Decker, M.-C. Boissier, et al. 2014. Interleukin-6 receptor blockade enhances CD39⁺ regulatory T cell development in rheumatoid arthritis and in experimental arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 66: 273–283.
52. Ehrenstein, M. R., J. G. Evans, A. Singh, S. Moore, G. Warnes, D. A. Isenberg, and C. Mauri. 2004. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF α therapy. *J. Exp. Med.* 200: 277–285.
53. Kamradt, T., and S. Drube. 2013. A complicated liaison: IL-33 and IL-33R in arthritis pathogenesis. *Arthritis Res. Ther.* 15: 115.
54. Anthony, R. M., T. Kobayashi, F. Wermeling, and J. V. Ravetch. 2011. Intravenous gammaglobulin suppresses inflammation through a novel T(H)2 pathway. *Nature* 475: 110–113.
55. Zaiss, M. M., M. Kurowska-Stolarska, C. Böhm, R. Gary, C. Scholtyssek, B. Stolarski, J. Reilly, S. Kerr, N. L. Millar, T. Kamradt, et al. 2011. IL-33 shifts the balance from osteoclast to alternatively activated macrophage differentiation and protects from TNF- α -mediated bone loss. *J. Immunol.* 186: 6097–6105.

56. Boissier, M. C., G. Chiochia, N. Bessis, J. Hajnal, G. Garotta, F. Nicoletti, and C. Fournier. 1995. Biphasic effect of interferon-gamma in murine collagen-induced arthritis. *Eur. J. Immunol.* 25: 1184–1190.
57. Nakajima, H., H. Takamori, Y. Hiyama, and W. Tsukada. 1990. The effect of treatment with interferon-gamma on type II collagen-induced arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 81: 441–445.
58. Williams, R. O., D. G. Williams, M. Feldmann, and R. N. Maini. 1993. Increased limb involvement in murine collagen-induced arthritis following treatment with anti-interferon-gamma. *Clin. Exp. Immunol.* 92: 323–327.
59. Manoury-Schwartz, B., G. Chiochia, N. Bessis, O. Abehsira-Amar, F. Batteux, S. Muller, S. Huang, M. C. Boissier, and C. Fournier. 1997. High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN-gamma receptors. *J. Immunol.* 158: 5501–5506.
60. Vermeire, K., H. Heremans, M. Vandeputte, S. Huang, A. Billiau, and P. Matthys. 1997. Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice. *J. Immunol.* 158: 5507–5513.
61. Schurgers, E., A. Billiau, and P. Matthys. 2011. Collagen-induced arthritis as an animal model for rheumatoid arthritis: focus on interferon- γ . *J. Interferon Cytokine Res.* 31: 917–926.
62. Zheng, Z., T. Liu, X. Li, J. Ding, Y. Feng, J. Miao, X. Luo, Z. Wu, and P. Zhu. 2015. Kinetic changes of regulatory B10 cells in collagen-induced arthritis could be regulated by cytokines IFN- γ and TGF- β 1. *Inflamm. Res.* 64: 637–645.
63. Kelchtermans, H., E. Schurgers, L. Geboes, T. Mitera, J. Van Damme, J. Van Snick, C. Uytendhove, and P. Matthys. 2009. Effector mechanisms of interleukin-17 in collagen-induced arthritis in the absence of interferon-gamma and counteraction by interferon-gamma. *Arthritis Res. Ther.* 11: R122.
64. Olalekan, S. A., Y. Cao, K. M. Hamel, and A. Finnegan. 2015. B cells expressing IFN- γ suppress Treg-cell differentiation and promote autoimmune experimental arthritis. *Eur. J. Immunol.* 45: 988–998.
65. Finnegan, A., K. Mikecz, P. Tao, and T. T. Glant. 1999. Proteoglycan (aggrecan)-induced arthritis in BALB/c mice is a Th1-type disease regulated by Th2 cytokines. *J. Immunol.* 163: 5383–5390.

Table S1

Group	Tconv number $\times 10^6$	Treg number $\times 10^6$	% Tconv	% Treg	Ratio (%Treg/ %Tconv)	CD39		CTLA-4		
						%	MFI	%	MFI	
LN	PBS	2.48 ± 0.30	0.50 ± 0.06	14.04 ± 0.49	2.91 ± 0.10	0.21 ± 0.01	89.17 ± 0.34 ⁽¹⁾	169.63 ± 4.98 ⁽³⁾	9.68 ± 0.55 ⁽³⁾	19.84 ± 0.98
	IL-33	2.09 ± 0.45	0.47 ± 0.08	13.29 ± 0.67	3.17 ± 0.10	0.24 ± 0.01	92.06 ± 0.36	187.66 ± 6.30	11.79 ± 0.98	20.30 ± 1.18
Blood	PBS	N.D.	N.D.	8.95 ± 0.88	0.89 ± 0.09	0.10 ± 0.01 ⁽²⁾	75.24 ± 1.80	83.73 ± 2.90	35.10 ± 3.17	34.09 ± 2.71
	IL-33	N.D.	N.D.	7.17 ± 0.69	1.06 ± 0.13	0.15 ± 0.01	77.43 ± 2.69	86.09 ± 3.89	41.11 ± 3.65	37.35 ± 5.35

Table S1: IL-33 treatment effect on Treg number, frequency and expression of CTLA-4 and CD39 in blood and LN.

The mice are the same as in Figure 2. Blood cells and LN cells were labeled with fluorochrome-conjugated anti-CD4, anti-FoxP3, anti-ST2L and anti-CD39 or anti-CTLA-4. Data are given as mean±SEM. (1) $p < 0,02$, (2) $p < 0,0001$, (3) $p = 0,05$ vs. IL-33 treated mice (Mann-Whitney test).

Figure S1

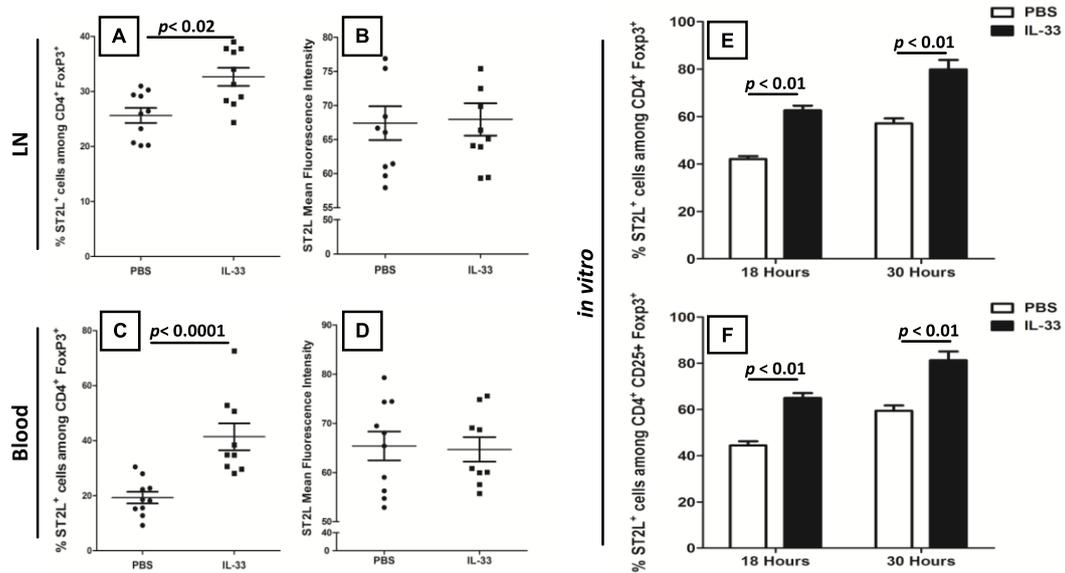


Fig.S1. IL-33 treatment expands Treg expressing ST2L in the blood, the LN and *in vitro*. (A-D) The mice are the same as in Figure 5. (A), (B) LN cells and (C), (D) blood cells were stained with fluorochrome-conjugated anti-CD4, anti-ST2L and anti-Foxp3. (E) and (F) Splenocytes from naïve C57BL/6 mice were incubated in culture medium containing anti-CD3 (5µg/ml) and with (n=3) or without IL-33 (20 ng/ml) for 18H or 30H (n=3). (A) Percentage of ST2L⁺ cells among CD4⁺Foxp3⁺ cells. (B) ST2L MFI on ST2L⁺ Treg. (C) Percentage of ST2L⁺ cells among CD4⁺Foxp3⁺ cells. (D) ST2L MFI on ST2L⁺ Treg in the blood. (E) Percentage of ST2L⁺ cells among CD4⁺Foxp3⁺ cells. (F) Percentage of ST2L⁺ cells among CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells. Data are given as mean ± SEM for each group. Data represent one experiment representative of 3 similar experiments. Mann-Whitney test was used for statistical analysis.

Fig.S1. IL-33 treatment expands Treg expressing ST2L in the blood, the LN and *in vitro*. (A-D) The mice are the same as in Figure 5. (A), (B) LN cells and (C), (D) blood cells were stained with fluorochrome-conjugated anti-CD4, anti-ST2L and anti-Foxp3. (E) and (F) Splenocytes from naïve C57BL/6 mice were incubated in culture medium containing anti-CD3 (5µg/ml) and with (n=3) or without IL-33 (20 ng/ml) for 18H or 30H (n=3). (A) Percentage of ST2L⁺ cells among CD4⁺Foxp3⁺ cells. (B) ST2L MFI on ST2L⁺ Treg. (C) Percentage of ST2L⁺ cells among CD4⁺Foxp3⁺ cells. (D) ST2L MFI on ST2L⁺ Treg in the blood. (E) Percentage of ST2L⁺ cells among CD4⁺Foxp3⁺ cells. (F) Percentage of ST2L⁺ cells among CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells. Data are given as mean ± SEM for each group. Data represent one experiment representative of 3 similar experiments. Mann-Whitney test was used for statistical analysis.

Fig. S2 : CII-specific CD4⁺ T cell response in IL-33 treated CIA mice. Mice were immunized with CII/CFA at day 0 in (A) and (C) or day 0 and day 21 in (B) and (D). They were treated i.p daily with 100μL of rIL-33 at 10μg/ml (1 μg per mouse) from day 0 to 5 (A) and (C) or from day 1 to 5 and day 21 to 25 (B) and (D). Ten days (A) and (C) or 28 days (B) and (D) after CII-immunization, cells from draining LN were cultured with the indicated concentrations of CII. (A) and (B) show the proliferation of CII-specific CD4⁺ T cells from lymph nodes obtained from CII immunized mice treated with IL-33 or PBS. (C) and (D) show IFN-γ levels in the culture supernatants of cells from LN from CII immunized mice treated with IL-33 or PBS. Data are expressed as mean ± SEM (n=6 in each group). Mann-Whitney test was used for statistical analysis.

Figure S3

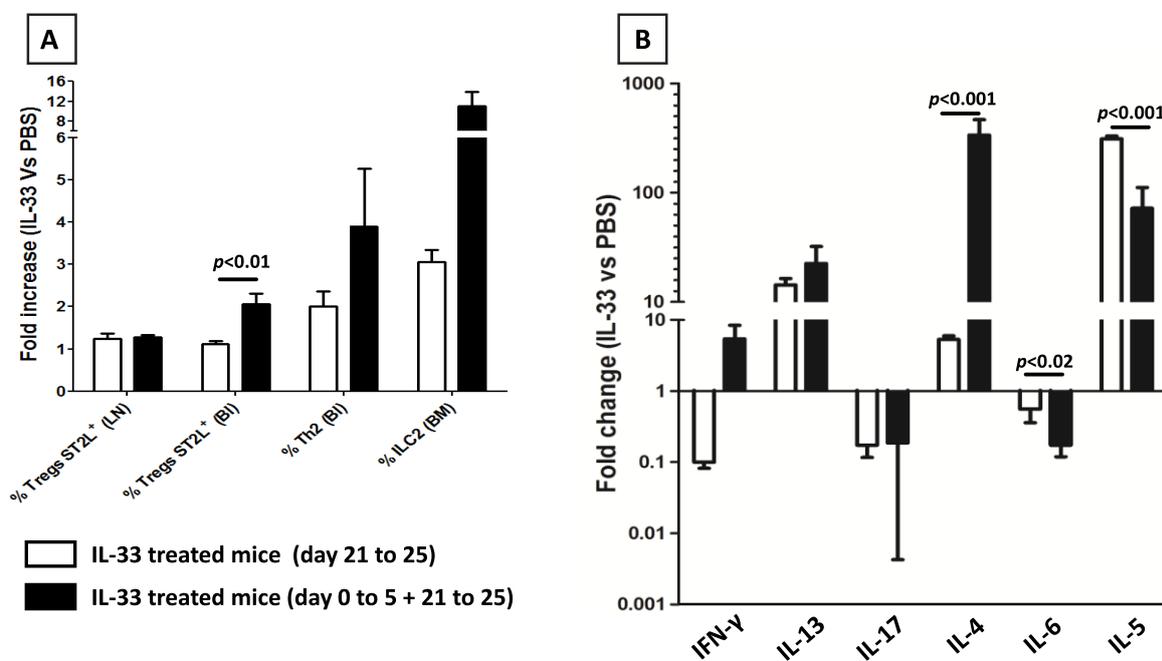


Fig.S3. Comparison of Treg and type 2 immune cell response with either early+late or only late injection of IL-33.

All mice were immunized with chicken collagen II emulsified in CFA on day 0 and on day 21. Mice were treated i.p daily with 100µL of rIL-33 at 10µg/ml (1 µg per mouse) for 5 days from day 21 to 25 (n=12) or for 10 days from day 1 to day 5 and then from day 21 to day 25 (n= 8). Control mice received 100µl of phosphate buffer saline (PBS) (n=12). All mice were euthanized at day 28 post CIA induction. **(A)** LN cells and blood cells were stained with fluorochrome-conjugated anti-CD4, anti-ST2L and anti-Foxp3. Percentage of ST2L⁺ cells among CD4⁺FoxP3⁺ cells (Treg ST2L⁺) or among CD4⁺FoxP3⁻ cells (Th2 cells) were determined. ILC2 cells from BM were defined and stained as described in figure 4. Results show the fold increases in the percentage of Treg ST2L⁺, Th2 cells and ILC2 in mice treated with rIL-33 from day 1 to day 5 (white bars) or from day 1 to day 5 and day 21 to day 25 (black bars), and PBS treated mice. **(B)** Fold changes in cytokine plasma levels from mice treated with rIL-33 from day 1 to day 5 (white bars) or from day 1 to day 5 and day 21 to day 25 (black bars), and PBS treated mice. Data are expressed as mean ± SEM. LN: lymph nodes, Bl: Blood; BM: bone marrow. Mann-Whitney test was used for statistical analysis.

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie inflammatoire chronique d'étiologie inconnue. L'inflammation présente dans cette pathologie est fortement dépendante de la cytokine pro-inflammatoire qu'est le TNF α . Cette molécule possède deux récepteurs : le TNFR1 et le TNFR2. Le TNFR1 est un récepteur exprimé à la surface de toutes les cellules. L'activation de sa voie de signalisation déclenche la mort cellulaire et elle est souvent associée à des phénomènes inflammatoires. Le TNFR2, quant à lui, est exprimé à la surface des cellules immunitaires, des cellules endothéliales et des cellules neuronales. L'activation de la signalisation du TNFR2 conduit à la survie et à la prolifération cellulaire. Le TNFR2 est de plus, associé à des mécanismes anti-inflammatoires. Les lymphocytes T régulateurs (Treg), cellules clé dans le contrôle de la réponse immunitaire, sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription Forkhead box P3 (FoxP3) et sont défectueux chez des patients atteints de PR. Ces cellules expriment les deux récepteurs du TNF α et sont capables d'inhiber l'action des cellules inflammatoires et particulièrement des T effecteurs par différents mécanismes d'immunosuppression. Les Treg exprimant le TNFR2 représentent la population la plus immunosuppressive actuellement recensée. L'objectif de notre travail a été de mieux comprendre le rôle des Treg exprimant le TNFR2 dans le contrôle de l'inflammation dépendante du TNF α . Tout d'abord, nous avons montré que la signalisation TNF α -TNFR2 sur les Treg augmentait le maintien de l'expression de FoxP3 ainsi que la prolifération de ces cellules. L'expression du TNFR2 est en outre liée à une stabilité accrue de ces cellules. Ces résultats peuvent expliquer le rôle important que pourraient jouer les Treg TNFR2⁺ dans le contrôle de l'inflammation dépendante du TNF α . Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons démontré, dans deux modèles expérimentaux d'inflammation dépendants du TNF α (arthrite et psoriasis), que les Treg TNFR2⁺ jouaient un rôle prépondérant dans le contrôle de l'inflammation. Enfin, des expériences effectuées chez des patients atteints de PR ont mis en évidence que les traitements anti-TNF α conduisaient à une augmentation de la fréquence des Treg TNFR2⁺ circulants chez des patients répondeurs. En démontrant le rôle prépondérant des Treg TNFR2⁺ dans la résolution de l'inflammation, ce travail ouvre la voie vers l'élaboration de thérapies ciblant le système TNF α /TNFR plus spécifiques pour le traitement de la PR et d'autres pathologies dépendantes du TNF.

Role of TNFR2 on Tregs in TNF- α -mediated inflammation

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease with unknown etiology. In this pathology, inflammation is mainly dependent on the pro-inflammatory cytokine TNF α . This molecule acts through two receptors: TNFR1 and TNFR2. TNFR1 is expressed on almost all cell types. Activation of this pathway mainly leads to cell death and is often associated with pro-inflammatory response. In contrast, TNFR2 is expressed on immune, epithelial and neuronal cells. Activation of TNFR2 signaling triggers cellular survival and cell proliferation. Furthermore, TNFR2 pathway is associated with anti-inflammatory mechanisms. Regulatory T cells (Treg) play a pivotal role in the control of inflammation and are defective in RA. They are characterized by the expression of transcriptional factor Forkhead box P3 (FoxP3). Tregs express both TNF α receptors and are able to inhibit inflammatory cells, specifically effector T cells using various immunosuppressive mechanisms. Treg expressing TNFR2 have been identified as the most suppressive Treg population. The aim of this study was to elucidate the role of TNFR2⁺ Tregs in TNF α mediated - inflammation by. Firstly, we have shown that TNF α -TNFR2 signaling on Tregs increased their proliferation and helped to maintain FoxP3 expression. Moreover, TNFR2 expression was associated with increased Treg stability. These results could explain the potential role of TNFR2⁺ Tregs in control of TNF α mediated - inflammation. To confirm this hypothesis, we demonstrated, in two models of inflammation mediated by TNF α (arthritis and psoriasis), that TNFR2⁺ Tregs play a major role in the control of inflammation. Finally, our experiments in RA patients highlighted that anti-TNF α treatments increased circulating TNFR2⁺ Treg frequency in responder RA patients. By demonstrating the major role of TNFR2⁺ Tregs in resolution of inflammation, our work paves the way for therapies targeting more specifically TNF α /TNFR system to cure RA and others TNF α - mediated pathologies.

Discipline : Biologie, mention Biologie moléculaire

Mots clé : lymphocytes T régulateurs, TNF α , polyarthrite rhumatoïde, inflammation chronique

UMR INSERM 1125, Université Paris 13, USPC, 1 Rue de Chablais 93017 BOBIGNY