

**UNIVERSITE PARIS XIII – SORBONNE PARIS NORD**  
UFR DE SANTE-MEDECINE-BIOLOGIE HUMAINE

**École doctorale Sciences, Technologies, Santé Galilée**

*Année 2022*

---

**Identité des lymphocytes T régulateurs au cours des  
maladies articulaires inflammatoires chroniques et impact  
des thérapies ciblées**

---

**THÈSE DE DOCTORAT**

présentée par

**Majda Lyna MEBREK**

INSERM UMR1125

pour l'obtention du grade de  
DOCTEUR EN BIOLOGIE, MENTION BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

*Soutenue publiquement le 11 Janvier 2022 devant le jury d'examen constitué de :*

<b>Dr Pascale PLENCE</b> (Université de Montpellier 1)	Rapportrice
<b>Pr Bertrand BELLIER</b> (Sorbonne Université)	Rapporteur
<b>Dr Allan THIOLAT</b> (Université Paris Est Créteil)	Examineur
<b>Pr Natacha BESSIS</b> (Université Sorbonne Paris Nord)	Directrice de thèse
<b>PUPH Luca SEMERANO</b> (Université Sorbonne Paris Nord)	Co-directeur de thèse
<b>Dr Jérôme BITON</b> (Université Sorbonne Paris Nord)	Co-encadrant de thèse



# REMERCIEMENTS





*En rédigeant cette partie, je me suis rendu compte de la chance que j'ai eu d'avoir été soutenue par une famille merveilleuse, un époux attentionné, des amis magnifiques et des collègues géniaux. En effet, cela fait quatre années que je me suis lancée dans cette aventure et au cours de celles-ci, je me suis entourée de bonnes personnes qui sont devenues pour la plupart des amis proches et intimes, une seconde famille. Je souhaite donc remercier ici toutes ces personnes (en essayant de ne pas dépasser le nombre de page de mon introduction).*

*En premier lieu j'adresse mes remerciements à Mme Pascale PLENCE, Monsieur Bertrand BELLIER et Mr Allan THIOLAT qui m'ont fait l'honneur de composer mon jury de thèse et d'évaluer mon travail. Merci d'avoir pris le temps de lire mon manuscrit et d'y apporter un regard nouveau et critique.*

*Tous mes travaux ont été réalisés au sein du Li2P, j'adresse donc ma profonde reconnaissance au Professeur Marie-Christophe BOISSIER pour son accueil au sein de son équipe et la grande bienveillance qu'il m'a témoigné. Vous m'avez accordé beaucoup de temps pour parler notamment de mes projets futurs et m'avez adressé des conseils avisés. Merci à vous monsieur Boissier.*

*Je remercie vivement ma directrice de thèse, le Pr Natacha BESSIS pour avoir cru en moi et de m'avoir accordé sa confiance. Merci pour l'autonomie que tu m'as laissée durant ce travail, pour la bienveillance que tu as témoigné à mon égard, notamment pendant les périodes difficiles où je devais rentrer voir mes parents. Ta prestance, ta passion pour la recherche et pour les Treg, ton intégrité et ta rigueur scientifique que j'espère avoir acquise, te définissent. Merci de m'avoir tant appris.*

*Je remercie le Dr Jérôme BITON mon co-encadrant de thèse, qui a su dès le début me mettre très à l'aise grâce à son esprit et son caractère de bon vivant. J'ai énormément appris avec toi, tes remarques ont toujours été très constructives et judicieuses concernant mes résultats. J'espère avoir réussi à acquérir un peu de ton esprit critique et inventif. J'ai également beaucoup apprécié faire les TP avec toi ; préparer les gels et chercher les réactifs dans le -20 entre les cerveaux de rats et les cuisses de grenouilles resteront des souvenirs gravés dans la tête d'Anne-Sophie. Enfin, tes blagues, pour la grande majorité très drôles, vont également beaucoup me manquer.*

*Merci Pr Luca SEMERANO mon co-directeur de thèse, pour tes conseils et ton aide notamment pour la partie clinique. Ton point de vue d'expert sur le monde des SpA m'a aidé à mieux apprivoiser le sujet. Certes nous n'avons pas eu l'occasion de beaucoup se voir pendant ces trois années de thèse (COVID19) mais nos échanges pendant le club REM, ou encore les réunions de labo, m'ont beaucoup apporté.*

*Je tiens également à remercier les anciens. Merci François, d'avoir été mon repère au début de mon stage de M2, de m'avoir mise à l'aise dès mon arrivée et prise sous ton aile, je n'arrive pas à savoir si ton côté taquin me manque ou pas... mais ce qui est sûr c'est que tu mettais une ambiance au labo que personne ne pourra égaler. Merci à Sarah, pour ta bonne humeur, tes conseils et ton soutien moral. Merci Eliès, pour tes conseils nutritionnels, ta personnalité inhabituelle et ta forte sympathie.*

*Je remercie énormément Maxime, l'un de mes meilleurs amis, mon partenaire de blagues carambar, merci pour ta grande disponibilité, tes encouragements, tes conseils et pour ta*

*gentillesse sans limite. Tu es l'ami sur qui je peux toujours compter, tu as toujours répondu présent à chaque fois que j'avais besoin de parler, avoir un avis, ou juste décompresser notamment pendant la période de rédaction. Après ton départ, les vendredis n'étaient plus aussi fun et les liquides synoviaux se sont fait rares.*

*Merci à Gérôme, pour ta disponibilité, tous les avis médicaux, tes histoires fascinantes et tes blagues. Avec toi j'ai appris à relativiser et à me dire qu'il y avait toujours pire. Bon courage à toi pour cette fin de thèse, tu l'auras bien mérité.*

*Merci à Johanna pour le temps que tu m'as accordé, notamment pour corriger la partie traitements de la PR, pour tes explications lors des consultations, ta sympathie et ta modestie.*

*Merci à Ahmad, mon voisin de bureau, pour ta gentillesse, ta disponibilité et ton aide à chaque fois que j'en ai eu besoin. Je n'oublierais pas nos aventures sous la pluie avec l'anneau de cytophère dans un sac à dos sur la tête et les Ficoll de 6h du matin.*

*Je tiens à remercier également Meriem, ma petite jumelle qui a passé six mois à nos côtés au laboratoire, la personne la plus « connectée » que je connaisse. Certes ça aura été court mais intense. Tu as très vite intégré le cercle étudiant et tu as trouvé ta place, tu es vite devenue au delà d'une collègue pour moi, une amie proche.*

*Merci à Tessnime d'avoir embrassé mon projet qui est devenu tien, je te souhaite beaucoup de courage et une belle thèse, mais je n'en doute pas, tu es au bon endroit.*

*Merci Mégane, pour ton rire contagieux, ta bonne humeur, merci de m'avoir prêté main forte à chaque fois que j'en ai eu besoin. Je ne compte plus les heures qu'on a passé ensemble dans les bouchons, à papoter, raconter nos vies et pour la majorité du temps à râler comme de bonnes parisiennes qui se respectent. Tu es une amie que je compte garder longtemps encore et j'espère qu'on pourra se le faire très vite ce voyage au Japon. Je te souhaite une très belle fin de thèse.*

*Je tiens également à remercier particulièrement ma copinette Dydy. Merci de m'avoir accordé une oreille attentive, d'avoir été ma confidente et mon amie, de m'avoir donné la force par tes messages d'encouragements, ta gentillesse et ta positivité. Tu fais partie intégrante de tous les bons souvenirs que j'ai de mes années au sein du Li2P, en passant par notre groupe de chant dans le L2 aux réunions des stressés anonymes. Saches Dyhia que tu es pour moi un modèle de courage, de détermination et de force.*

*Mes remerciements s'adressent ensuite aux ingénieuses ingénieurs du laboratoire, Magali, Roxane et Delphine.*

*Merci Delphine d'être là pour nous, de nous défendre devant les plus grands, de faire passer notre confort avant tout et d'avoir la solution à quasiment tous nos soucis. Je reprends les mots utilisés par les anciens pour dire à mon tour que tu es notre maman à tous du laboratoire. Et bien évidemment, merci pour toutes les fois où tu as ramené Léo, qui apporte avec lui à chaque passage beaucoup de bonheur et de bonne humeur.*

*Roxane, nous sommes devenues proches à partir du moment où nous avons passé des heures à disséquer des intestins ensemble dans un parfum d'ambiance des plus agréables, on ne peut*

*pas partager de tels moments avec n'importe qui... Plus sérieusement, je tiens à te remercier notamment pour ton aide précieuse lors des manip souris, d'avoir été mon chauffeur les week-end de grève de la RATP et de m'avoir mise à l'aise avec les DBA/1. N'empêche je suis désolée mais je ne les trouve toujours pas mignonnes, surtout pas la C6. Je te remercie pour ta sympathie, les moments qu'on a partagé à parler de vernis (désolée encore Ahmad) et de nourriture, toutes les infos insolites et les devinettes scientifiques, ta culture générale m'a toujours impressionné, surtout sur les thèmes les plus improbables (#WikiRoxane). J'ai hâte qu'on coche enfin des choses dans notre todo-list, à commencer par le week-end à la campagne.*

*Magali, ma voisine de bureau préférée, je peux écrire des pages entières et ça serait insuffisant pour décrire ta gentillesse sans limite. Merci d'être mon amie, de me conseiller, de me motiver et d'être à mon écoute. Merci pour ton aide, pour tous les tris que tu m'as fait, tous les marquages et les heures tardives passées au FACS. J'ai toujours pu compter sur toi à n'importe quel moment, tu es beaucoup plus qu'une collègue, tu es une amie. Merci pour tous tes conseils personnels, pour ton coaching sportif et pour toutes les réunions des stressées anonymes et les fous rires. Merci pour toutes tes qualités sans défauts, sincèrement la seule chose qu'on peut te reprocher c'est de ne pas savoir dire non.*

*Mylène, avant de te remercier je tiens à m'excuser des milliers de messages que je t'ai envoyé pour demander des nouvelles des patients... Je te remercie pour ta patience, ton organisation notamment pour ton fameux tableau qui m'a été d'une grande aide, ton sourire et ta bonne humeur. Sans toi, on se perdrait dans les couloirs de l'hôpital, c'est un réel luxe pour nous de t'avoir, surtout quand tu viens avec l'assiette bleue pleine de brookies.*

*Mes remerciements s'adressent ensuite au Dr Eric ASSIER et au Pr Patrice DECKER. Merci Eric pour tout le temps que tu m'as accordé pour me conseiller notamment pour mes projets futurs. J'ai beaucoup appris du patrimoine français avec toi, allant des expressions, à la fabrication du champagne et aux sites insolites à visiter (surtout en Bretagne). Ton dévouement pour l'enseignement et le partage ainsi que ta bonne humeur font tes qualités. Tes étudiants ont beaucoup de chance de t'avoir.*

*Patrice, toujours de bonnes idées en réunion de labo. Pendant les présentations, tu fais attention aux petits détails qui ne « jump pas to the eyes » comme dirait Mr BOISSIER et tu y apportes une critique fondée et constructive. Merci pour les discussions scientifiques de qualité qu'on a pu partager et pour ton coté sarcastique qui se termine souvent par des fous rires.*

*Merci à mes amis, Stéphane, William, Yacine, Coralie, Ténin, Marie-Anaïs et le grand Farid BOUCHEBBAH qui a sacrifié ses vacances en Guadeloupe pour me soutenir. Merci à toutes les personnes que j'ai connues au cours de ces 4 années, avec qui j'ai pu échanger et qui ont participé à égayer mes journées dans les couloirs obscurs de SMBH, tous les doctorants, les ingénieurs et les chercheurs de l'UMR978, l'UMR1148 et l'UMR 1272.*

*Quand on est en thèse, on a aussi besoin d'être épaulé en dehors du laboratoire et je dois dire que j'ai la chance d'être très bien entourée.*

*Merci à mon tonton adoré et à ma yaya pour votre amour et pour vos encouragements. A mes grands-pères, vous qui m'avez chérie et donné tant d'amour, merci pour tout. Merci Jeddi de m'avoir toujours encouragé à viser haut, j'espère que là ou tu es tu es fier de ta petite tazazoult.*

*A mes beaux-parents, Amar et Elisabeth, merci de m'avoir soutenu, encouragé et de m'apporter autant d'amour. Merci à mes beaux-frères, à Nathalie et au petit baouche pour votre bonne humeur et votre soutien. Enfin, merci à ma BELLE sœur et à Aulon pour votre aide et doublement merci à Sarah-Louisa pour ton fort soutien, tes encouragements et ta gentillesse sans limite. J'ai de la chance de faire partie d'une aussi merveilleuse famille.*

*Merci à Betty d'être une grande sœur pour moi, d'avoir pris soin de ma maman et d'avoir fait que je ne me soucie de rien. J'ai de la chance de t'avoir et je sais que je pourrais toujours compter sur toi. Et bien évidemment, merci à Elyne, ma petite boule de bonheur pour tout l'amour qu'elle me donne et tout le bonheur qu'elle m'apporte.*

*Merci à mon frère chéri, mon khouya, qui me comble d'amour et de bonheur tous les jours. Aucun mot ne peut décrire la profondeur du sentiment de l'amour fraternel. J'ai tellement de chance d'avoir un grand frère comme toi, tu as toujours su me protéger, me chérir, me rassurer et me faire sentir en sécurité. Tu as cru en moi et tu m'as soutenue dans mon aventure depuis le début, tu es le meilleur frère au monde.*

*Mon chéri d'amour, tout simplement merci de m'avoir supporté. Dieu sait à quel point c'est dur de vivre avec une thésarde stressée et pourtant tu as tellement pris sur toi et tu m'as soutenue pendant cette période difficile où j'étais loin de mes parents. Tu as réussi à combler un vide immense, tu m'as épaulé à chaque coup dur et tu as toujours su me redonner le sourire et me remonter le moral (si si je t'assure). Tu es la meilleure chose qui me soit arrivée, tu m'apportes tout l'amour et l'affection dont j'ai besoin et tu es la seule personne qui arrive à canaliser mon stress. Merci de croire en moi et de toujours m'encourager et surtout merci de m'avoir nourrie et fait en sorte que je vive dans des conditions décentes pendant la période de rédaction. Tu mérites autant que moi cette thèse. Merci Elias pour tout ce que tu es.*

*Enfin, j'adresse ma plus grande reconnaissance à mes parents, sans vous je ne serais pas parvenue à atteindre mes objectifs. Merci maman pour ton soutien psychologique et pour tes encouragements. Depuis toujours tu as su assurer pleinement le rôle de maman, la meilleure qui soit, mais tu es beaucoup plus que ça, tu es ma meilleure amie, ma confidente, ma psychologue. Merci papa d'être un modèle de persévérance, de réussite et d'ambition, merci de m'avoir soutenue dans tous mes projets et de m'avoir offert le luxe de ne me soucier de rien. A mes yeux tu es et tu seras toujours le meilleur des papas. Je vous dois à tous les deux tout ce que je suis aujourd'hui, vous avez toujours cru en moi, vous m'avez soutenue et poussée à donner le meilleur de moi dans toutes les circonstances.*

*A vous deux, Dr BELLABAS et Dr MEBREK, ma source inépuisable de prières, de courage et d'amour, je vous dédie cette thèse, le fruit de ces années d'études loin de vous.*

*A toi grand frère, ma source inépuisable de réconfort et d'amour, je te dédie cette thèse, le fruit de ces années d'études loin de toi.*

*A toi mon tendre et cher époux, ma source inépuisable de bonheur, de tendresse et d'amour je te dédie cette thèse, le fruit de ces années d'études près de toi.*



# SOMMAIRE

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>3</b>
<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>11</b>
<b>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....</b>	<b>17</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>21</b>
<b>PREAMBULE .....</b>	<b>29</b>
<b>I. INTRODUCTION .....</b>	<b>31</b>
<b>LA POLYARTHRITE RHUMATOÏDE.....</b>	<b>33</b>
A. Généralités .....	33
B. Manifestations cliniques et diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde .....	34
C. Manifestations extra-articulaires .....	35
D. Etiologie de la polyarthrite rhumatoïde .....	35
a. Facteurs génétiques et épigénétiques .....	36
b. Facteurs environnementaux.....	37
➤ Le tabagisme.....	37
➤ Microbiome .....	38
➤ L'alimentation.....	39
c. Facteurs hormonaux.....	39
E. Evolution de la polyarthrite rhumatoïde.....	41
a. PR pré-clinique .....	41
b. PR précoce et établie.....	41
F. Physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde .....	42
a. Rôle de la réponse immunitaire innée dans la physiopathologie de la PR.....	43
b. Rôle de la réponse immunitaire adaptative dans la physiopathologie de la PR..	47
c. Rôle des cytokines dans la physiopathologie de la PR .....	50
G. La destruction articulaire .....	53
H. Modèles murins de la PR :.....	53
1. Modèles expérimentaux induits de la polyarthrite rhumatoïde .....	54
a. Arthrite Expérimentale au Collagène (AEC).....	54
b. Le modèle DTHA .....	55



c.	Arthrite induite par la mBSA.....	56
d.	L'Arthrite induite par des anticorps anti-collagène .....	56
e.	Arthrite induite par la paroi cellulaire du streptocoque (SCWIA) .....	57
2.	Modèles expérimentaux génétiques de la polyarthrite rhumatoïde .....	57
a.	Souris transgéniques au TNF $\alpha$ .....	57
b.	Modèle d'arthrite K/BxN .....	58
c.	Souris SKG.....	58
I.	Les traitements de la polyarthrite rhumatoïde .....	58
1.	Les DMARDs synthétiques.....	59
a.	DMARDs synthétiques conventionnels .....	60
b.	DMARDs synthétiques ciblés : inhibiteurs de JAK .....	60
2.	Les DMARDs biologiques .....	60
a.	Les inhibiteurs du TNF $\alpha$ .....	61
b.	Inhibiteur de l'interleukine 1.....	62
c.	Inhibiteurs des récepteurs de l'interleukine 6.....	62
d.	Inhibiteurs du CD80/86 .....	63
e.	Anticorps anti-CD20 .....	63
	LES SPONDYLOARTHRIES (SPA) .....	65
A.	Généralités .....	65
B.	Outils d'évaluation dans les SpA .....	66
C.	Etiologie des SpA .....	67
D.	Physiopathologie des SpA .....	67
E.	Traitements des SpA.....	69
	LES LYMPHOCYTES T REGULTEURS (TREG).....	71
A.	Génération des lymphocytes T régulateurs .....	71
a.	Génération des Treg thymiques (tTreg) .....	72
b.	Génération des Treg périphériques (pTreg) .....	75
B.	Autres cellules régulatrices .....	77
a.	Les cellules régulatrices Tr1 et Th3.....	77
b.	Les cellules régulatrices CD8 .....	78
C.	Le facteur de transcription FoxP3 .....	78
➤	Le gène foxp3 .....	79

D.	La fonction des lymphocytes T régulateurs.....	81
a.	Perturbation du métabolisme des cellules cibles.....	82
b.	Mécanismes dépendants de la sécrétion des médiateurs solubles .....	82
c.	Cytotoxicité .....	83
d.	Mécanismes dépendants du contact .....	84
E.	Caractérisation phénotypique des Treg .....	86
F.	Rôle des lymphocytes T régulateurs dans les maladies auto-immunes .....	86
1.	Plasticité des lymphocytes T régulateurs .....	87
a.	Les Treg de type Th1 (Th1-like Treg Cells) .....	88
b.	Les Treg de type Th17 (Th17-like Treg Cells) .....	88
c.	Les Treg de type Th2 (Th2-like Treg Cells) .....	89
2.	Stabilité des lymphocytes T régulateurs.....	89
a.	Régulation post-traductionnelle de FoxP3 .....	91
b.	Régulation transcriptionnelle .....	93
1.	Rôle des cytokines dans la stabilité de l'expression de FoxP3.....	93
2.	Rôle du facteur de transcription Helios dans la stabilité de l'expression de FoxP3 .....	94
c.	Régulation épigénétique .....	95
1.	L'Histone méthyl transférase EZH2 .....	95
1.1.	Les protéines du groupe polycomb.....	95
1.2.	Les composants du PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) .....	96
1.3.	Les co-facteurs du PRC2.....	97
1.4.	Le gène ezh2 .....	98
1.5.	Rôle d'EZH2 dans la régulation de la plasticité des lymphocytes T.....	98
1.6.	Rôle d'EZH2 dans la régulation de la stabilité des Treg .....	99
2.	Les histones acétyltransférases (HAT) et les histones désacétylases (HDAC)	100
3.	Les microRNA .....	101
1.7.	Biogénèse des miRNA .....	101
1.8.	Rôle des miRNA dans la stabilité des Treg .....	102
G.	Tableau récapitulatif des marqueurs impliqués dans la caractérisation phénotypique et fonctionnelle et dans la stabilité des Treg .....	104

<b>I. OBJECTIFS .....</b>	<b>109</b>
<b>II. RESULTATS.....</b>	<b>113</b>
ARTICLE 1 :.....	115
TNFR2 associates with FoxP3 stability and identifies a subset of regulatory T cells that are specifically expanded by anti-TNF treatments in rheumatoid arthritis.....	115
ARTICLE 2 (en préparation): Altered expression of Tregs stability markers during chronic inflammation in patients with rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. ....	137
<b>III. DISCUSSION .....</b>	<b>165</b>
A. STABILITE DES TREG AU COURS DE L'INFLAMMATION CHRONIQUE .....	167
a. EZH2, inducteur essentiel de la stabilité des Treg.....	167
i. Altération de la fréquence des Treg EZH2 <sup>+</sup> au cours des maladies articulaires inflammatoires chroniques : PR et SpA .....	167
ii. Stabilité des Treg dans les modèles murins d'arthrite expérimentale .....	168
i. Rôle d'EZH2 dans le maintien de l'identité des Treg .....	169
ii. Dépendance de l'expression d'EZH2 et des marqueurs de suppression CD39 et TNFR2 .....	171
b. La fréquence des Treg Helios <sup>+</sup> n'est pas modifiée au cours de la PR et de la SpA	173
c. Altération de la phosphorylation de STAT5 dans les Treg au cours de la PR et de la SpA	173
B. IMPACT DES THERAPIES CIBLEES SUR LA STABILITE DES TREG AU COURS DE L'INFLAMMATION CHRONIQUE	174
a. Etude de la fréquence des Treg EZH2 <sup>+</sup> au cours des traitements ciblés dans la PR et la SpA.....	174
b. La phosphorylation de STAT5 dans les Treg est liée à l'efficacité du traitement par l'éta nercept dans l'arthrite expérimentale au collagène .....	175
C. STABILITE ET PLASTICITE DES TREG DANS LE MICROENVIRONNEMENT INFLAMMATOIRE : NOTION PARADOXALE .....	176
<b>IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>179</b>
<b>V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>185</b>



# **LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX**



<b>Figure 1</b> : Articulation normale et articulation inflammatoire de polyarthrite rhumatoïde. ...	33
<b>Figure 2</b> : Localisation des manifestations cliniques. ....	34
<b>Figure 3</b> : Mécanismes impliqués dans l’initiation et le développement de la polyarthrite rhumatoïde.....	40
<b>Figure 4</b> : Initiation et progression de la polyarthrite rhumatoïde. ....	42
<b>Figure 5</b> : Réponses immunitaires innées et adaptatives impliquées dans la physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde .....	49
<b>Figure 6</b> : Stratégies thérapeutiques ciblées de la polyarthrite rhumatoïde .....	64
<b>Figure 7</b> : Colonne vertébrale normale et colonne vertébrale atteinte de spondylarthrite ankylosante. ....	66
<b>Figure 8</b> : Rôle du TCR dans la génération des Treg thymiques. ....	72
<b>Figure 9</b> : Génération des Treg dans le thymus.....	75
<b>Figure 10</b> : Génération des Treg dans les tissus périphériques.....	76
<b>Figure 11</b> : Structure du facteur de transcription FoxP3.....	79
<b>Figure 12</b> : Structure et régulation transcriptionnelle du gène foxp3.....	81
<b>Figure 13</b> : Mécanismes de suppression des lymphocytes T régulateurs. ....	85
<b>Figure 14</b> : Structure et fonction du complexe PRC2. ....	96
<b>Figure 15</b> : Structure du gène ezh2. ....	98
<b>Figure 16</b> : Biogénèse des miRNA. ....	102
<b>Figure 17</b> : Rôle des miRNA dans la stabilité des Treg. ....	104
<b>Tableau 1</b> : Formules de calcul du DAS28 et interprétation des scores en fonction de l’activité de la maladie. ....	35
<b>Tableau 2</b> : Principaux modèles animaux de la polyarthrite rhumatoïde. ....	54
<b>Tableau 3</b> : Principaux traitements de la polyarthrite rhumatoïde. ....	59
<b>Tableau 4</b> : Marqueurs impliqués dans la fonction et la stabilité des Treg. ....	107





# **LISTE DES ABREVIATIONS**



ACPA : Anti-Citrullinated Protein Antibody, anticorps anti-protéines citrullinées

AEBP2 : Adipocyte Enhancer-Binding Protein 2

AEC : Arthrite Expérimentale au Collagène

Ago2 : Argonaute protein-2

AINS : Anti-Inflammatoires Non-Stéroïdiens

AP-1 : Activated Protein 1

APRIL : A Proliferation-Inducing Ligand

ASDAS : Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score

ATF-1 : Activating Transcription Factor 1

ATP : Adénosine Tri-phosphate

axSpA : Spondyloarthrite axiale

BAFF : B-cell Activating Factor, facteur d'activation des lymphocytes B

BASDAI : Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index

bDMARD : DMARD biologique

Breg : B régulateurs

CAIA : Collagen Antibody Induced Arthritis

CD28 : Cluster de Différenciation 28

CG : Centres Germinaux

CLR : C-type lectin receptor

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CNS : Conserved Non coding DNA Sequences

CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes

CREB : C-AMP Response Element-binding protein

CRP : C Reactive Protein, protéine C réactive

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

CZP : Certolizumab Pegol

DAMP : Damage-Associated Molecular Pattern

DAS 28 : Disease Activity Score 28

DGCR8 : DiGeorge Syndrome Critical Region 8 homologue

DMARD : Disease-Modifying Antirheumatic Drug

DNMT1 : DNA Méthyltransférase-1

DTHA : Delayed-Type Hypersensitivity Arthritis

DUB : Déubiquitinases

EAE : Encéphalite Auto-immune Expérimentale

EDTA : Éthylènediaminetétraacétique

Eed : Embryonic Ectoderm Development

EFS : Etablissement Français du Sang

EID : EED-Interaction Domain

ERAP : Endoplasmic Reticulum AminoPeptidase

ETN : Etanercept

EULAR : European League Against Rheumatism

EVA : Echelle Visuelle Analogique

EZH2 : Enhancer of Zeste Homologue 2

Fc : Fraction constante des anticorps

FLS : Fibroblast-Like Synoviocytes, fibroblastes de type synoviocytes

FoxP3 : Forkhead box P3

FR : Facteurs Rhumatoïdes

G-CSF : Granulocyte Colony-Stimulating Factor

G6PI : Glucose-6-Phosphate Isomérase

GALT : Gut-Associated Lymphoid Tissues

GARP : Glycoprotein A Repetitions Predominant

GC : Glucocorticoïde

GITR : Glucocorticoid-Induced TNFR-Related protein

GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

GOL : Golimumab

GWAS : Genome Wide Association Study

H3K27me3 : Triméthylation de la lysine 27 sur l'histone 3

HAT : Histones Acétyltransférases

HD : Healthy Donors

HIF-1 $\alpha$  : Hypoxia-Inducible Factor 1  $\alpha$

HLA : Human Leucocyte Antigen

ICOS : Inducible T-cell Costimulator

IDO : Indolamine 2, 3 DiOxygenase

IFN- $\gamma$  : Interféron  $\gamma$

IgG : Immunoglobuline G

IL : Interleukine

IPEX : Immunodérégulation, Polyendocrinopathie, Entéropathie auto-immune lié au chromosome X

IPP : Interphalangiennes Proximales

IRF4 : IFN Regulatory Factor 4

iTreg : Treg induit *in vitro*

JAK : Janus Kinase

JARID2 : Jumonji and AT-Rich Interaction Domain containing 2

LAG3 : Lymphocyte Activating 3

LECAM1 : Leukocyte-Endothelial Cell Adhesion Molecule 1

LPS : Lipopolysaccharide

LT : Lymphocyte T

MAI : Maladies Auto-Immunes

MBD2 : Methyl-CpG-Binding Protein 2

mBSA : methyl-Bovine Serum Albumine, albumine de sérum bovin méthylée

MCP : Métacarpo-Phalangiennes

miRNA, miR : micro RNA

MLS : Macrophage-Like-Synoviocyte

MMP : Métalloprotéinases Matricielles

MTP : Métatarso-Phalangiennes

NAD : Nombre d'Articulations Douloureuses

NAG : Nombre d'Articulation Gonflées

Ncor2 : Nuclear Receptor Corepressor 2

NE : Neutrophile Elastase

NET : Neutrophil Extracellular Traps

NFAT : Nuclear Factor Activated T cells

NFκB : Nuclear Factor Kappa-B

NK : Natural Killer

NLK : Nemo-Like Kinase

NLR : NOD-Like Receptor

NO : Nitric Oxide

Nrp1 : Neuropilin-1  
OGT : O-GlcNAc-transférase  
PAD : Peptidyl Arginine Deiminase  
PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern  
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells, cellules mononucléées du sang périphérique  
MFI : Mean Fluorescence Intensity  
PBS : Phosphate Buffer Saline  
PcG : Polycomb Group  
PD1 : Programmed cell Death protein 1  
PEG : Polyéthylène Glycol  
PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase  
PNN : PolyNucléaires Neutrophiles  
PR : Polyarthrite Rhumatoïde  
PRC2 : Polycomb Repressive Complexe 2  
PRR : Pattern Recognition Receptor  
pSpA : Spondyloarthrite périphérique  
pTreg : Treg périphériques  
RANKL : Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand  
RBAP46/48 : Retinoblastoma Binding Protein 46 ou 48  
RISC : RNA-Induced Silencing Complex  
RLR : Retinoid acid-inducible gene I-Like Receptors  
ROR $\gamma$ T : RAR-related Orphan Receptor  $\gamma$  T  
ROS : Reactive Oxygen Species  
SA : Spondylarthrite Ankylosante  
SAM : S-Adénosyl-L-Méthionine  
Satb1 : Special AT-rich sequence-Binding protein 1  
SE : Super-Enhancer  
SGK-1 : Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1  
SH2 : Src Homology 2  
SOCS1 : Suppressor of Cytokine Signaling protein1  
SpA : Spondyloarthrite  
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription

Suz12 : Suppressor of Zeste 12  
T-bet : T-box expressed in T cells  
Tbx21 : T-box expression factor 21  
Tconv : T conventionnelle  
TCR : T Cell Receptor, récepteur des lymphocytes T  
Teff : lymphocytes T effecteurs  
TET : Ten-Eleven Translocation  
TGF $\beta$  : Transforming Growth Factor  $\beta$   
Th : T helper, T auxiliaire  
TIMP : Tissue Inhibitor of Metalloproteinase  
TLR : Toll Like Receptor  
TNFR2 : Tumor Necrosis Factor Receptor 2, récepteur de type 2 du TNF $\alpha$   
TNFRSF : TNF $\alpha$  Receptor Super Family  
TNF $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$   
Treg : Regulatory T cells, lymphocytes T régulateurs  
TSDR : Treg-Specific Demethylated Region, région déméthylée spécifique des Treg  
tTreg : Treg thymiques  
USP7 : Ubiquitin Specific Peptidase 7  
UTR : Untranslated Region  
VS : Vitesse de Sédimentation  
ZAP-70 : Zeta-Associated Protein 70





## Préambule

Le système immunitaire est conçu pour reconnaître et éliminer les antigènes étrangers (non-soi) assurant ainsi la protection de l'hôte et le maintien de l'homéostasie immunitaire. Parallèlement, il doit être capable de protéger l'organisme contre le développement de réponses immunitaires inappropriées et néfastes envers les antigènes du soi ou du non soi en mettant en place des mécanismes de tolérance. La tolérance aux auto-antigènes est le résultat d'une tolérance centrale (sélection négative des clones auto-réactifs) et de divers mécanismes de tolérance périphérique tels que l'anergie ou la suppression par les lymphocytes T régulateurs (Treg) des lymphocytes autoréactifs périphériques ayant échappé à la sélection centrale et périphérique. La rupture de la tolérance immunologique entraîne le développement d'immunopathologies telles que les maladies auto-immunes, caractérisées par une réponse immunitaire inappropriée envers les auto-antigènes.

Les lymphocytes T régulateurs sont les gardiens de l'homéostasie immunitaire. Ils jouent un rôle indispensable dans le maintien de la tolérance périphérique envers les auto-antigènes en régulant les réponses immunitaires excessives néfastes pour l'hôte, médiées notamment par les lymphocytes T effecteurs inflammatoires. Une altération fonctionnelle des Treg a été associée à plusieurs pathologies autoimmunes dont la polyarthrite rhumatoïde et les spondyloarthropathies. Une meilleure compréhension des processus cellulaires et moléculaires qui sous-tendent l'altération fonctionnelle des Treg permettrait d'établir de nouvelles stratégies pour le traitement et la prévention des maladies auto-immunes.



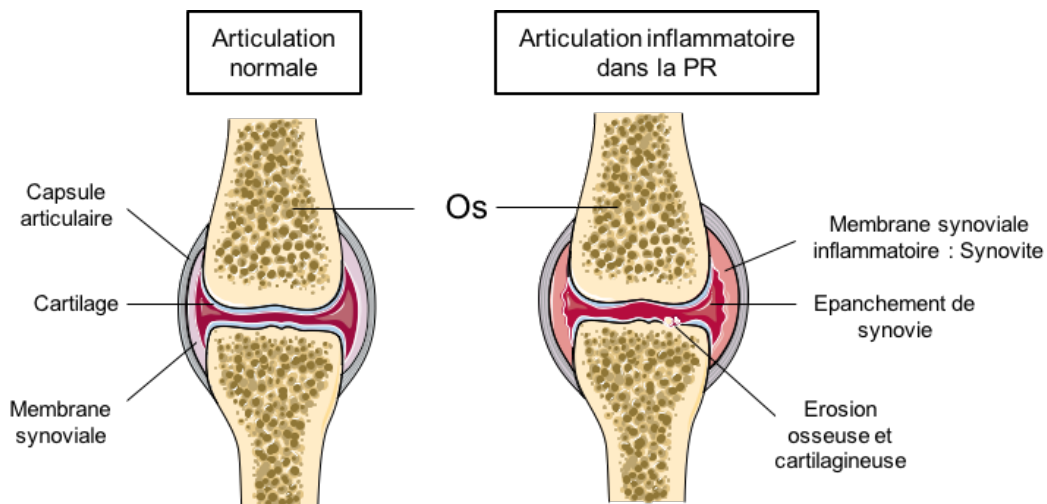
# **I. INTRODUCTION**



# La polyarthrite rhumatoïde

## A. Généralités

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie articulaire inflammatoire chronique de nature auto-immune. Elle touche essentiellement les articulations et se manifeste par un dérèglement inflammatoire systémique et une altération de l'immunité innée et adaptative. Elle est caractérisée par une destruction articulaire cartilagineuse et osseuse associée à une hyperplasie synoviale ainsi qu'à la présence d'auto-anticorps dirigés contre l'IgG (Immunoglobuline G), appelés facteurs rhumatoïdes (FR). Les autres principaux auto-anticorps impliqués dans la pathogénie de la maladie sont ceux dirigés contre les protéines citrullinées (Anti-Citrullinated Protein Antibody: ACPA).

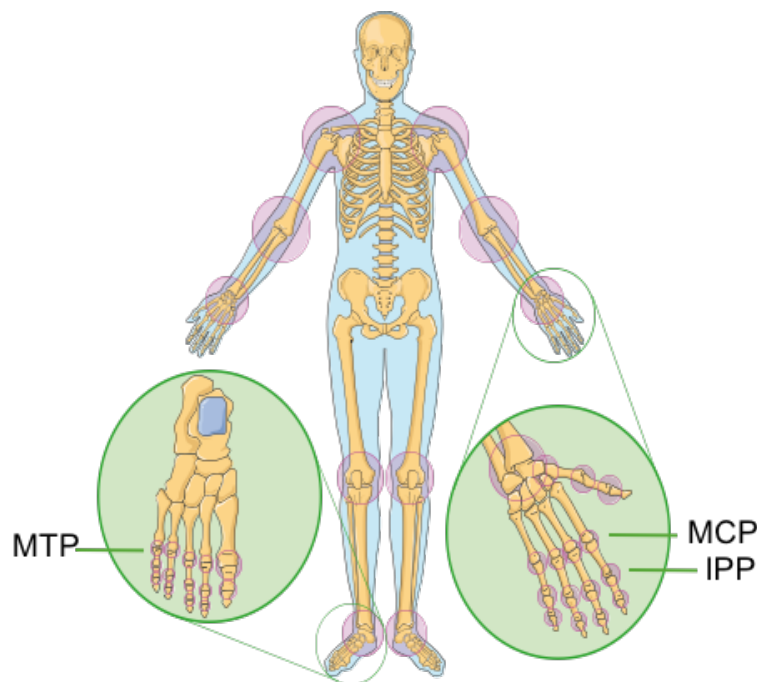


**Figure 1 : Articulation normale et articulation inflammatoire de polyarthrite rhumatoïde.**

Cette maladie auto-immune peut se déclarer à tout âge, mais concerne majoritairement des personnes âgées de 35 à 55 ans et survient trois fois plus souvent chez la femme que chez l'homme. En France, la PR a une prévalence d'environ 0,3% (Roux et al., 2007). Il a été montré que les différences géographiques influencent la prévalence de la PR. Elle est d'environ 1% dans le monde occidental (Tobón et al., 2010). En absence de prise en charge, la PR peut entraîner une accumulation de lésions articulaires et une invalidité irréversible. Dans ses formes les plus sévères, la durée de vie des patients atteints de PR peut être réduite de 5 à 10 ans, notamment en raison de son caractère systémique.

## **B. Manifestations cliniques et diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde**

Les manifestations initiales sont caractérisées par des arthralgies souvent bilatérales et symétriques accompagnées de signes inflammatoires (gonflements, rougeurs) localisées préférentiellement aux poignets ou aux articulations métacarpo-phalangiennes (MCP) et interphalangiennes proximales (IPP) des mains, aux articulations métatarso-phalangiennes (MTP) des coudes et des épaules, ou encore des genoux et des chevilles. Ces douleurs sont accompagnées d'une raideur matinale d'une durée supérieure à 30 minutes.



**Figure 2 : Localisation des manifestations cliniques.**

MCP : articulations métacarpo-phalangiennes ; IPP : articulations interphalangiennes proximales ; MTP : articulations métatarso-phalangiennes.

Pour confirmer le diagnostic clinique, des examens complémentaires doivent être réalisés, comme un bilan d'imagerie pour la recherche de lésions structurales. Un bilan biologique est également réalisé pour la recherche de facteurs rhumatoïdes, d'ACPA, pour la mesure de la vitesse de sédimentation (VS) et le dosage de la protéine C réactive (CRP). Certains de ces paramètres biologiques seront nécessaires par la suite pour le calcul du *Disease Activity Score 28* (DAS 28). Le DAS28 est un indicateur d'activité de la PR faisant intervenir plusieurs paramètres en une mesure unique d'interprétation standardisée qui sera corrélée à l'activité de la maladie (van der Heijde et al., 1993; Prevoo et al., 1995).

En plus des paramètres biologiques, le calcul du DAS28 fait intervenir des paramètres physiologiques et cliniques mais aussi le ressenti du patient. En fonction du paramètre

biologique utilisé, 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 dans le sang alors que le DAS 28 VS fait intervenir la vitesse de sédimentation. Pour calculer ces deux scores, le nombre d'articulations gonflées (**NAG**) (0 à 28 articulations), le nombre d'articulations douloureuses (**NAD**) et enfin, une mesure de l'activité globale de la maladie selon le patient à l'aide de l'échelle visuelle analogique (**EVA**) sont pris en compte.

Une formule mathématique va permettre ensuite de calculer la valeur définitive du DAS (van der Heijde et al., 1993) et en fonction du score obtenu, il est possible d'estimer le niveau de l'activité de la maladie.

Score	Formule	Rémission	Faible activité de la maladie	activité modérée	activité forte
<b>DAS 28 CRP</b>	$0,56 * \sqrt{NAD} + 0,28 * NAG + 0,36 * \ln(CRP + 1) + 0,014 * em + 0,96$	$\leq 2,6$	$> 2,6 - 3,2$	$> 3,2 - 5,1$	$> 5,1$
<b>DAS 28 VS</b>	$0,56 * \sqrt{NAD} + 0,28 * NAG + 0,7 * \ln(VS) + 0,014 * em$				

**Tableau 1 : Formules de calcul du DAS28 et interprétation des scores en fonction de l'activité de la maladie.**

### **C. Manifestations extra-articulaires**

Bien que ciblant principalement les articulations, la PR en tant que maladie systémique peut entraîner un certain nombre de manifestations extra-articulaires. Ces atteintes peuvent être cardiovasculaires, pulmonaires, rénales, dermatologiques ou gastro intestinales. Les manifestations extra-articulaires les plus fréquentes sont les maladies cardiovasculaires et la pneumopathie interstitielle (Koduri et al., 2010) et, dans les formes les plus graves de la maladie, les nodules rhumatoïdes et les vascularites. Toutefois, ces manifestations extra-articulaires sont moins fréquentes de nos jours grâce aux progrès thérapeutiques, notamment le développement des thérapies ciblées et l'optimisation des stratégies thérapeutiques en se basant sur l'activité de la maladie.

### **D. Etiologie de la polyarthrite rhumatoïde**

La PR est une maladie dite multifactorielle, plusieurs facteurs de risque sont donc connus pour être impliqués dans son développement. Ces facteurs peuvent être des facteurs de prédisposition génétique et épigénétique, des facteurs hormonaux ou encore environnementaux.

### a. Facteurs génétiques et épigénétiques

La prédisposition génétique au développement de la PR a été mise en évidence par plusieurs études, notamment celles conduites sur des jumeaux homozygotes et dizygotes. Ces études ont montré que dans une population de jumeaux monozygotes, les taux de concordance (correspondant à la proportion de jumeaux pour lesquels les deux individus sont atteints de la maladie) sont plus élevés que chez les jumeaux dizygotes, ce qui démontre une implication des facteurs génétiques dans la pathogenèse de la PR (Svendsen et al., 2013).

Les gènes présentant la plus forte association avec le développement de la PR sont ceux codants pour le HLA (Human Leucocyte Antigen) de classe II, communément appelé CMH (Complex Majeur d'Histocompatibilité), en particulier HLA-DRB1\*01 et HLA-DRB1\*04. Ces gènes retrouvés chez les patients atteints de PR possèdent un « épitope partagé », qui est une séquence commune de cinq acides aminés en position 70-74 (<sup>70</sup>QKRAA<sup>74</sup>, <sup>70</sup>QRRAA<sup>74</sup> ou <sup>70</sup>RRRAA<sup>74</sup>), conférant une susceptibilité au développement de la PR (Gregersen et al., 1987). Plus tard, il a été montré que les allèles HLA-DRB1 codants l'épitope partagé prédisposent uniquement aux PR ACPA-positives, ce qui indique que ces allèles ne s'associent pas à la PR en tant que telle, mais plutôt à un phénotype particulier (Huizinga et al., 2005).

L'épitope partagé forme une poche appelée P4 se situant dans la chaîne beta1 du CMH-II, site de liaison de l'antigène à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (Hammer et al., 1995). Cette poche chargée positivement, lie et présente les auto-antigènes portant une charge négative ou neutre. Tandis que les antigènes contenant de l'arginine ou de la lysine chargées positivement, ne se lieront probablement pas au niveau de P4 avec une affinité mesurable, en raison de la répulsion de charges similaires (Scally et al., 2013). Par conséquent, une hypothèse des effets de la citrullination est que les propriétés de ces peptides contenant de l'arginine ou de la lysine seraient modifiées leur permettant de se lier à P4. Ceci se baserait sur la modification impliquant la conversion des résidus d'arginine et de lysine en citrulline formant des néo-peptides citrullinés de polarité neutre. Ce phénomène serait à l'origine de l'augmentation de la présentation des peptides citrullinés, induisant l'activation d'une réponse auto-immune à ces auto-antigènes citrullinés, résultant en une production d'ACPA, favorisant alors le développement d'une PR « immunopositive » (Hill et al., 2003). Par ailleurs, une étude récente a remis en question cette hypothèse, en montrant que la capacité à présenter des néo-épitopes citrullinés n'est pas limitée aux molécules HLA



porteur de l'épitope partagé et que d'autres molécules HLA peuvent également potentialiser une possible rupture de la tolérance des lymphocytes T envers les antigènes citrullinés (Kampstra et al., 2016).

D'autres gènes de prédisposition avec des associations plus ou moins faibles ont également été identifiés, grâce au séquençage du génome (Genome Wide Association Study : GWAS) de différentes cohortes de patients PR (BIRAC Consortium et al., 2010). La plupart de ces gènes présentant des polymorphismes, sont associés à des voies immunitaires et inflammatoires. Parmi ces mutations, on peut mentionner celles que portent les gènes codants les cytokines telles que l'IL-6, le CCL21 et les récepteurs des cytokines tels que le CCR6 et l'IL-2RA (Interleukin 2 Receptor Subunit Alpha), ou encore des gènes codants des molécules impliquées dans la différenciation et l'activation des lymphocytes T, comme le Ctl4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4), le CD28 (Cluster de différenciation 28) (Viatte et al., 2012) et le Ptnp22 (Tyrosine phosphatase non-receptor 22) (Chang et al., 2016).

L'épigénétique pourrait également jouer un rôle dans le développement de la PR. Par exemple, chez des jumeaux homozygotes, une différence dans la méthylation de l'ADN au niveau de EXOSC1 (codant une protéine impliquée dans la dégradation de l'ARN) a été observée entre le jumeau atteint de PR immunopositive et le jumeau non atteint (Gomez-Cabrero et al., 2016). Par ailleurs, les modifications épigénétiques, telles que la méthylation de l'ADN, peuvent constituer un lien biologique possible entre les expositions environnementales, les mutations génétiques prédisposantes et la maladie. Il a été récemment montré que chez un groupe de patients fumeurs, les niveaux de méthylation étaient plus élevés chez les patients atteints de PR ACPA-positif porteurs de l'allèle de risque HLA-DRB1 comparé aux non-porteurs de l'allèle de risque; cette différence de méthylation n'a en revanche pas été observée chez les patients non-fumeurs (Meng et al., 2017).

#### **b. Facteurs environnementaux**

Les facteurs de risque environnementaux comprennent le tabagisme, l'exposition à la silice, la carence en vitamine D, l'alimentation et les modifications du microbiote.

##### **➤ Le tabagisme**

Le tabagisme est le facteur de risque environnemental le plus étudié et le mieux

identifié de la PR. Dans la PR, il est maintenant bien définie que le tabagisme augmente le risque de développer la maladie de façon exponentielle, le risque étant augmenté de 26 % chez les personnes ayant fumé de 1 à 10 paquets-années et de 94 % chez les personnes ayant fumé plus de 20 paquets-années (Di Giuseppe et al., 2014). Cette association entre le tabagisme et le risque de PR est d'autant plus forte et expose à un sur-risque de développement de la forme séropositive de la maladie, chez les patients qui possèdent un polymorphisme sur le gène codant pour HLA-DR4 (Symmons et al., 1997). En effet, Il a été montré par Källberg *et al.* que l'interaction entre l'épitope partagé et le tabagisme peut multiplier le risque de développer une PR ACPA-positif par 20 ou plus par rapport aux non-fumeurs qui ne sont pas porteurs de l'épitope partagé (Källberg et al., 2011). Cela est en partie dû, en présence d'un polymorphisme sur Hladr<sub>b1</sub>, à l'induction par la fumée de cigarette de l'augmentation de l'expression des enzymes PAD (Peptidyl Arginine Deiminase) à l'origine de la citrullination des protéines et par conséquent à l'augmentation de la production d'ACPA. De plus, il est bien défini aujourd'hui que le tabagisme est associé à une activité importante de la maladie et à des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires (Sokolove et al., 2016). Il est en revanche possible que le risque associé au tabagisme pourrait également être médié par des modifications épigénétiques et cette hypothèse a été appuyée par les données qui montrent une hypométhylation de certaines régions de l'ADN chez les fumeurs. Ces mêmes régions sont hyperméthylées par les traitements DMARD (disease-modifying antirheumatic drug), suggérant ainsi que le tabagisme peut altérer la réponse au traitement et donc constituer un facteur de résistance au traitement (Svendsen et al., 2016).

En plus de la fumée de cigarette, l'exposition prolongée à la poussière contenant des traces de ciment, d'amiante ou de silice (Stolt, 2005) a également été associée à la prédisposition à différentes maladies auto-immunes systémiques dont la PR (Webber et al., 2015).

#### ➤ **Microbiome : facteur environnemental interne**

En plus des facteurs environnementaux externes, le microbiote humain représente à lui seul un facteur interne associé au risque de développer une PR. Par exemple, le microbiote parodontal a été fortement associé à la prédisposition à la PR, par le biais de la bactérie responsable de la gingivite : *Porphyromonas gingivalis* (Kharlamova et al., 2016). En effet, *P. gingivalis* exprime des PAD et peut donc induire la citrullination favorisant la génération

d'ACPA (Dissick et al., 2010). Outre le microbiote parodontal, le microbiote intestinal favorise également le développement de la maladie. Il a été montré que chez les patients atteints de PR, la diversité du microbiote intestinal est réduite par rapport à des sujets sains et a été corrélée à une production importante d'auto-anticorps. Cette dysbiose chez les patients PR est le résultat de l'abondance de certaines lignées bactériennes normalement rares comme les *Actinobacteries* et au contraire la réduction de la diversité des lignées abondantes (Chen et al., 2016a).

### ➤ **L'alimentation**

De nombreuses études ont porté sur le rôle de l'alimentation dans la prédisposition aux maladies auto-immunes, notamment la PR. Par exemple, la consommation d'aliments riches en acides gras oméga-3 auraient un effet protecteur dans la PR (Saidane et al., 2019). En revanche, l'alimentation riche en sel a été fortement associée à l'auto-immunité. En effet, un régime riche en sel induit l'expression et l'activation de SGK-1 (Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1), ce qui entraîne une augmentation de la différenciation des lymphocytes Th17 pathogéniques (Wu et al., 2013) et une diminution de la fonction suppressive des Treg (Wu et al., 2018) et par conséquent une aggravation des maladies auto-immunes. De plus, il a été montré qu'une alimentation riche en sel associée au tabagisme potentialise d'autant plus le risque de développer une PR (Sundstrom et al., 2015).

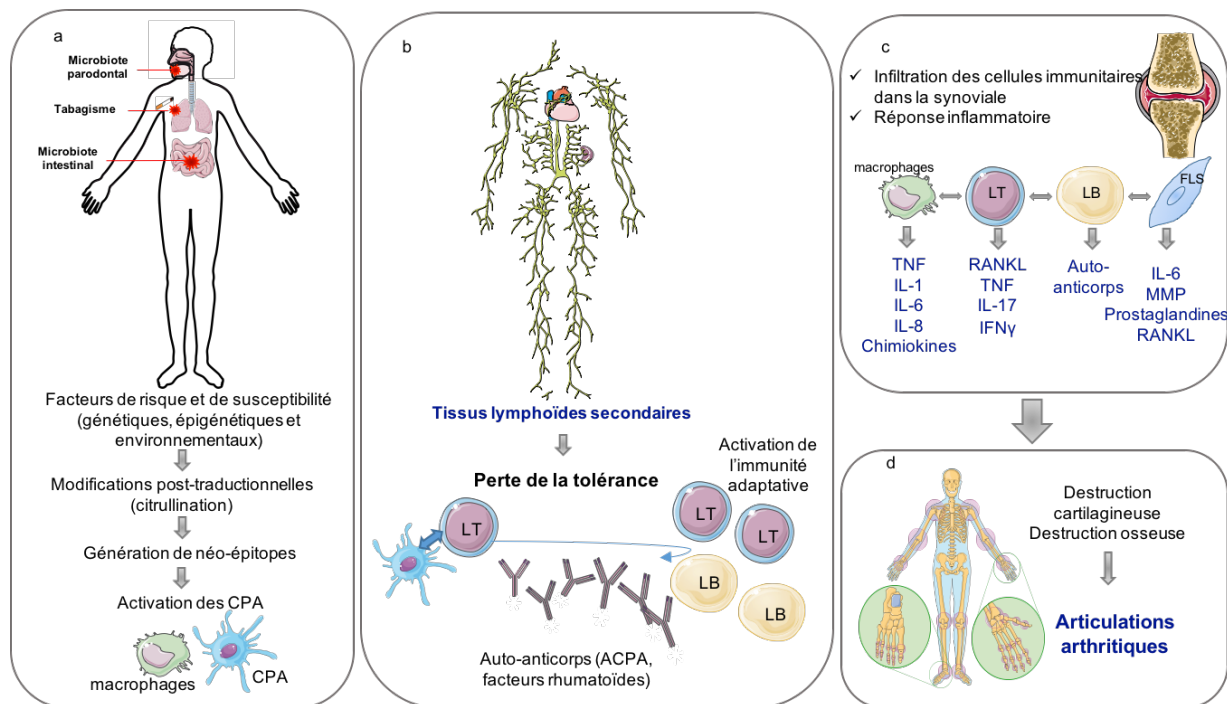
La vitamine D et l'ensoleillement représentent également des facteurs environnementaux jouant un rôle dans l'initiation d'une PR. La vitamine D peut être absorbée par l'alimentation ou synthétisée suite à l'exposition solaire. Ses propriétés immunomodulatrices et anti-inflammatoires et sa carence ont été associées à plusieurs maladies auto-immunes. En effet, la vitamine D est un régulateur important de divers gènes impliqués dans le système immunitaire, notamment l'expression de cytokines pro-inflammatoires (Aslam et al., 2019; Mateen et al., 2017). Une association inverse a été mise en évidence entre les niveaux sériques de vitamine D, la susceptibilité à la PR et l'activité de la maladie (Jeffery et al., 2016).

### **c. Facteurs hormonaux**

En moyenne la PR survient trois fois plus chez les femmes que chez les hommes avec un risque de développer la maladie à l'âge adulte estimé à 3,6 % pour les femmes et à 1,7 % pour les hommes (Crowson et al., 2011). La causalité de cette prédominance féminine est

associée, en partie, à une modulation du système immunitaire par les facteurs hormonaux. Ceci a été appuyé par des études qui ont montré que la nulliparité augmente souvent le risque de développer une PR, tandis que la grossesse est souvent associée à une rémission de la maladie, bien que les phases de poussées de la maladie soient fréquentes dans la période post-partum (de Man et al., 2008). En revanche, il a été montré que dans la période post-partum, la durée de l'allaitement est inversement corrélée au développement de la maladie (Karlson et al., 2004; Pikwer et al., 2009). Chez les femmes, la PR devient le plus souvent symptomatique au moment de la ménopause (Mollard et al., 2018), alors que, chez les hommes la PR survient vers un âge plus tardif. Ces observations suggèrent que la diminution de la fonction ovarienne pourrait contribuer au développement de l'auto-immunité associée à la PR et potentiellement à la prédisposition au développement de la maladie chez les femmes.

Même si la cause exacte de la PR reste inconnue, il est aujourd'hui établi que cette maladie est le résultat de plusieurs facteurs et mécanismes largement décrits (autoantigènes, épigénétique, environnement, microbiome, hormones, alimentation) potentialisant sa survenue dans un contexte génétique bien connu.



**Figure 3 : Mécanismes impliqués dans l'initiation et le développement de la polyarthrite rhumatoïde adapté de Smolen et al., 2018.**

a. Les modifications post-traductionnelles, telle que la citrullination, dans les muqueuses (bouche, poumons, intestins) peuvent créer des néo-épitopes qui peuvent être reconnus par le système immunitaire adaptatif. b. Ces peptides modifiés

sont présentés par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Dans les tissus lymphoïdes secondaires, ils activent une réponse immunitaire adaptative et entraînent la production d'auto-anticorps. **c.** Infiltration des cellules immunitaires dans la synoviale. Les cellules stromales (telles que les FLS) et les macrophages peuvent être activées localement et produire des facteurs inflammatoires. La réponse immunitaire induite localement entraîne l'inflammation synoviale. **d.** L'ensemble des événements (b-c) conduisent finalement à la destruction du cartilage et de l'os. *ACPA* : anticorps anti-protéines citrullinées ; *MMP* : métalloprotéinase matricielle ; *RANKL* : receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand ; *TNF* : tumour necrosis factor. *IFN* : interféron.

## **E. Evolution de la polyarthrite rhumatoïde**

### **a. PR pré-clinique**

La phase de susceptibilité, basée sur un génotype prédisposant sur lequel agissent des facteurs environnementaux est le premier stade de développement de la PR. Cette phase se poursuit par une PR préclinique avant que l'inflammation articulaire ne se développe, avec pour conséquence une réponse synoviale inflammatoire et une destruction articulaire.

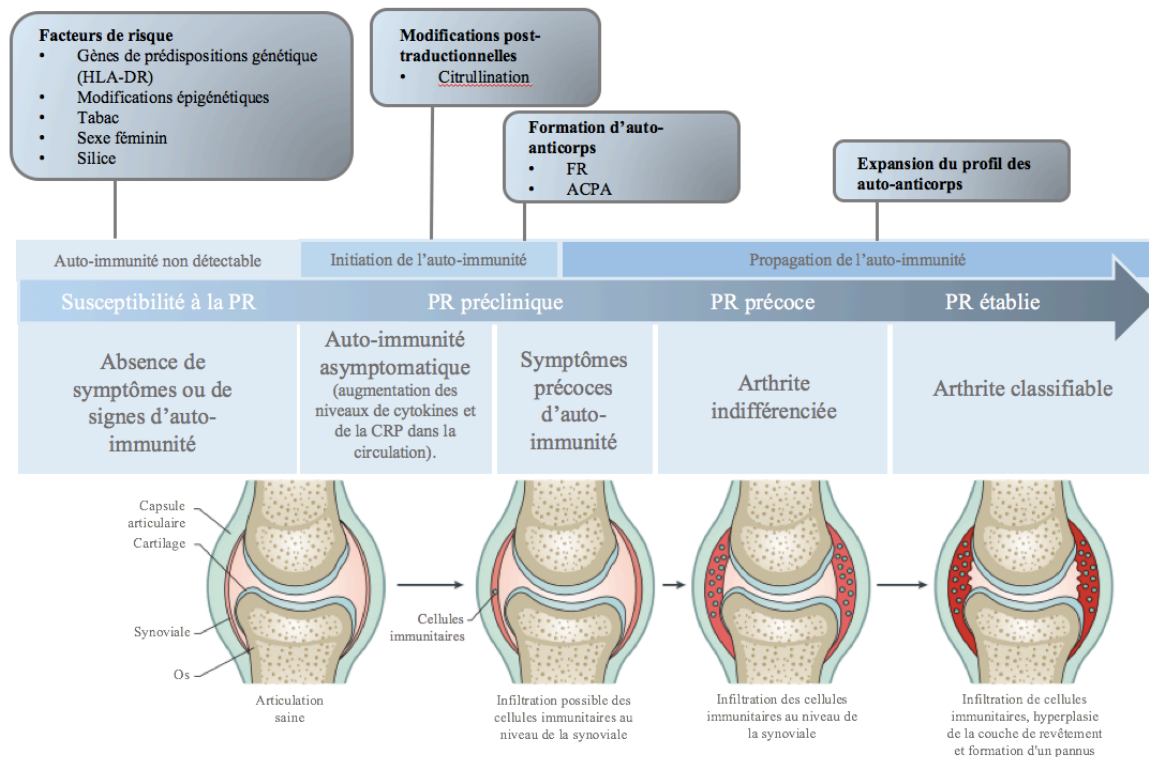
Les modifications post-traductionnelles, dont principalement la citrullination, sont à l'origine de la perte de la tolérance immunitaire au niveau des muqueuses. En plus de la citrullination, d'autres modifications post-traductionnelles peuvent survenir, comme l'acétylation ou la carbamylation. Au niveau des muqueuses, elles sont généralement induites par différents facteurs, notamment la fumée de cigarette (Makrygiannakis et al., 2008).

Les peptides portant les modifications post-traductionnelles sont ensuite présentés avec les molécules de CMH, en particulier ceux qui portent l'épitope partagé, par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) aux lymphocytes T. Les lymphocytes T stimulent à leur tour les lymphocytes B, induisant la production d'anticorps dirigés contre les auto-peptides modifiés comme les facteurs rhumatoïdes (FR) dirigés contre les IgG et les ACPA, ciblant les protéines citrullinées.

### **b. PR précoce et établie**

La PR précoce est caractérisée par une inflammation de la synoviale. Cette inflammation est en partie le résultat de l'infiltration des cellules immunitaires dans la synoviale, dont majoritairement les lymphocytes T CD4 et les macrophages, ainsi que l'activation des cellules stromales. Les cellules stromales (FLS : Fibroblast-Like-Synoviocytes), les CPA et les macrophages sont activés localement dans la synoviale et produisent plusieurs facteurs inflammatoires dont principalement les cytokines. Les effets paracrines et autocrines des cytokines, ainsi que les réponses immunitaires adaptatives persistantes sont responsables de la perpétuation de l'inflammation et conduisent finalement à la destruction osseuse et

cartilagineuse.



**Figure 4 : Initiation et progression de la polyarthrite rhumatoïde adapté de Smolen et al., 2018.**

## **F. Physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde**

Le liquide synovial est un liquide biologique d'une consistance visqueuse présentant deux fonctions principales dans l'homéostasie : limite les frottements des surfaces cartilagineuses et fournit au cartilage les éléments nutritifs et le dioxygène essentiels aux chondrocytes le constituant. Une synoviale saine est composée d'une fine membrane formée par une couche de cellules de protection qui recouvre l'intérieur de l'articulation, les synoviocytes de type fibroblaste (FLS). La membrane synoviale est tapissée du liquide synovial. Dans la PR, la synoviale subit des modifications structurales pathogéniques, on parle alors de synovite. L'une des modifications clés dans la synovite est l'épaississement de la membrane synoviale formant ce qu'on appelle le pannus synovial. Le pannus synovial est le résultat d'une prolifération et d'une activation d'essentiellement deux types de synoviocytes producteurs de cytokines et de protéases favorisant la destruction ostéo-cartilagineuse : les synoviocytes de type macrophage (macrophage-like-synoviocyte : MLS) et les FLS. Les MLS sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-1, l'IL-6 et le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (Tumor

Necrosis Factor  $\alpha$  : TNF $\alpha$ ), favorisant l'inflammation locale en recrutant d'autres cellules immunitaires et en activant les FLS. Les FLS, en réponse à ces médiateurs pro-inflammatoires, produisent l'IL-6 (Perlman et al., 2003), le GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) (Leizer et al., 1990), mais la fonction majeure qui leur confère le caractère invasif et contribue à la destruction du tissu est la production des métalloprotéinases matricielles (MMP). De ce fait, ces cellules sont impliquées dans la physiopathologie de la PR en favorisant la synovite, la croissance du pannus et finalement la destruction osseuse et cartilagineuse. De plus, le caractère invasif qu'adoptent les FLS leur confère la capacité de migrer d'une articulation à l'autre favorisant la propagation des atteintes articulaires à plusieurs articulations (Lefèvre et al., 2009).

La synovite est aussi le résultat de l'infiltration des cellules immunitaires dans le compartiment synovial (Ziff, 1974). L'accumulation des cellules immunitaires dans le pannus synovial est dans un premier temps le résultat de la migration facilitée par l'activation endothéliale des micro-vaisseaux de la membrane synoviale qui augmente l'expression de molécules d'adhésion et de chémokines, plutôt que la prolifération locale des cellules immunitaires. De plus, la lymphangiogenèse insuffisante limitant la sortie des cellules et la mise en place d'une néo-angiogenèse induite par la présence de cytokines pro-inflammatoires et d'un environnement hypoxique local, facilitent d'autant plus l'infiltration cellulaire (Polzer et al., 2008).

#### **a. Rôle de la réponse immunitaire innée dans la physiopathologie de la PR**

Dans la PR, l'activation de l'immunité innée contribue à la synovite. On retrouve dans la membrane synoviale différents type de cellules de l'immunité innée, essentiellement les macrophages, les mastocytes et les NK (Natural Killer). Quant aux neutrophiles, ces derniers sont retrouvés principalement dans le liquide synovial.

**Les macrophages** sont les effecteurs centraux de la synovite. Dans la membrane synoviale, le GM-CSF produit localement par les FLS activés, favorise l'infiltration des monocytes et leur différenciation en macrophages. Les macrophages participent activement à l'inflammation de la synoviale par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dont le TNF $\alpha$ , l'IL-6, l'IL-1 $\beta$  ou encore l'IL-23. Ils produisent également des espèces réactives à l'oxygène (Reactive Oxygen Species : ROS), des prostaglandines et certaines enzymes dégradant la matrice, participant ainsi à la destruction tissulaire. Ce profil cytokinique associé à la

production de ROS suggère un phénotype prédominant de macrophage de type M1 dans la synovite. En effet, quand les monocytes se différencient en macrophages dans un tissu, ils adoptent en fonction des signaux du microenvironnement un phénotype fonctionnel spécifique, de type M1 ou M2 (Mills et al., 2000). Les macrophages de type M1 possèdent un phénotype pro-inflammatoire. Ils sont polarisés *in vitro* en présence de lipopolysaccharide (LPS), seul ou avec de cytokines telles que l'IFN- $\gamma$  (Interféron  $\gamma$ ) et le GM-CSF. Les macrophages de type M2, sont quant à eux anti-inflammatoires et immunorégulateurs. Ces cellules sont polarisées *in vitro* par des cytokines telles que l'IL-4 et l'IL-13 et produisent ensuite des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) (Shapouri-Moghaddam et al., 2018).

Par ailleurs, l'utilisation en essai clinique de phase II d'anticorps monoclonaux neutralisants anti-GM-CSF dans le traitement de la PR a mis plus en avant le rôle de cette cytokine et l'implication des macrophages dans la physiopathologie de la PR (Bykerk, 2020).

De plus, les macrophages sont des phagocytes et ils se comportent aussi comme des cellules présentatrices d'antigène. Ils reconnaissent des particules pathogènes via plusieurs récepteurs. Les plus importants étant les récepteurs Fc (Fraction constante des anticorps) qui reconnaissent les parties Fc des complexes immuns et les récepteurs du complément qui lient les composants de la cascade du complément déposés à la surface des cibles à phagocyter. Les macrophages sont également activés par les récepteurs de type PRR (Pattern-Recognition Receptors) qu'ils expriment, tels que les TLR (Toll-Like Receptor) et les NLR (NOD-Like Receptor). Ces récepteurs reconnaissent une multitude de motifs PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern) ou DAMP (Damage-associated Molecular Pattern) dont les bactéries et les virus (Seibl et al., 2003). L'activation des PRR entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages, comme le TNF $\alpha$  et l'IL-6, et ils stimulent la production de ROS. Ces récepteurs sont importants pour la reconnaissance non spécifique des agents pathogènes et l'activation de la réponse immunitaire. Cette activation peut néanmoins être délétère par stimulation excessive du système immunitaire résultant en une inflammation, comme c'est le cas dans la PR (Huang and Pope, 2009). De plus, il a été récemment montré que l'activation de TLR7 induit l'ostéoclastogénèse dans la PR par l'induction directe de la différenciation des ostéoclastes à partir de leurs précurseurs (Kim et al., 2019).



**Les mastocytes** constituent un autre type cellulaire de l'immunité innée retrouvé dans la synoviale rhumatoïde et qui contribuerait à l'inflammation. Ces cellules sont activées soit via les récepteurs de type TLR, soit via les récepteurs de type Fc exprimés à leur surface. L'activation de ces cellules conduit à la production d'amines vasoactives, de cytokines comme l'IL-17 et de protéases, favorisant l'inflammation (Hueber et al., 2010).

Dans la PR, les **polynucléaires neutrophiles (PNN)** sont le type cellulaire le plus abondant du liquide synovial, représentant jusqu'à 90 % des cellules. Ils sont activés et recrutés dans les articulations des patients atteints de PR, par différents signaux inflammatoires.

Les PNN sont produits dans la moelle osseuse à partir de précurseurs myéloïdes, en réponse au G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor) et migrent à partir de la moelle osseuse, dans la circulation sanguine vers les sites inflammatoires, grâce aux molécules d'adhésion (intégrines, sélectines) et aux chimiokines (IL-8) (Pelletier et al., 2010). Les neutrophiles sont activés lorsqu'ils reconnaissent des motifs PAMP ou DAMP par l'intermédiaire des PRR (Pattern Recognition Receptor) (TLR, CLR, NLR, RLR) qu'ils expriment. Dans la PR, les stimuli inflammatoires locaux (complexes immuns « ACPA, FR », cytokines, facteurs de croissance) activent les neutrophiles. Cette activation se traduit par la phagocytose, la dégranulation, la production de ROS et la formation de NET (Neutrophil Extracellular Traps).

La dégranulation des neutrophiles permet la libération de différents médiateurs de l'inflammation dont les MMP (MMP8, MMP9) qui favorisent la dégradation du collagène de type 2 (Van den Steen et al., 2002) et maintiennent l'inflammation dans le cartilage articulaire (Kim et al., 2011). Les neutrophiles libèrent également dans leurs granules des sérines protéases, comme la neutrophile élastase (NE), la cathepsine G et la protéinase III. Ces molécules sont à l'origine de l'activation des cytokines pro-inflammatoires (Lefrançais et al., 2012), du clivage des molécules d'adhésion (Raptis et al., 2005) et de la régulation de la fonction des chimiokines (Padrines et al., 1994).

De plus, dans la synovite, les neutrophiles sont une source de diverses chimiokines et cytokines dont le TNF $\alpha$  (Wright et al., 2011) et d'autres membres de la superfamille du TNF. Par exemple, le facteur d'activation des lymphocytes B (B-cell Activating Factor, facteur d'activation des lymphocytes B : BAFF) induit la prolifération des cellules B et contribue à la production d'auto-anticorps dans la synoviale (Assi et al., 2007). Un autre membre de la

superfamille du TNF exprimé par les PNN est le ligand RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor kappa-B Ligand). Ce dernier favorise la destruction osseuse dans la PR en induisant la différenciation et l'activation des ostéoclastes (Chakravarti et al., 2009). Par ailleurs, les neutrophiles sont également capables de produire l'IL-8, permettant le recrutement de nouveaux neutrophiles dans l'articulation et favorisant ainsi une boucle d'amplification de l'inflammation.

Enfin, les neutrophiles sont impliqués dans la physiopathologie de la PR, par la production de NET (Neutrophil Extracellular Traps). Les NET sont des filaments d'ADN liés à des protéines granulaires, libérés dans l'espace extracellulaire (Brinkmann, 2004). C'est un mécanisme de défense antibactérien. Il a été montré que chez les patients atteints de PR, les stimuli inflammatoires tels que le TNF $\alpha$  et l'IL-17 présents dans l'articulation, activent les neutrophiles et induisent la formation de NET ou NETose (Khandpur et al., 2013). Ceci expliquerait pourquoi les neutrophiles circulants et ceux présents dans le liquide synovial produisent davantage de NET chez les patients atteints de PR (Khandpur et al., 2013). D'autre part, dans cette même étude, la NETose a été corrélée à la présence d'ACPA chez ces patients. En effet, dans la PR, la NETose est associée à la libération de PAD activées, détectées dans le liquide synovial (Spengler et al., 2015). Ceci serait à l'origine de la génération des auto-antigènes citrullinés dans la PR, cible des ACPA, entraînant la formation de complexes immuns pathologiques. De plus, la quantité élevée de NET retrouvée chez les patients atteints de PR et leur pathogénicité ont été mises en avant par une récente étude réalisée par notre équipe. Dans cette étude, nous montrons que les NET activent les PNN et les macrophages au repos et que cette activité pro-inflammatoire des NET est plus élevée chez les patients atteints de PR (Ribon et al., 2019). A l'inverse, dans cette même étude, nous mettons en avant le potentiel rôle anti-inflammatoire des NET dans certaines conditions. Cela confirme l'hypothèse selon laquelle les PNN constituent une population cellulaire hétérogène ayant une activité pro-inflammatoire et dans certaines conditions immunorégulatrice, puisque des PNN régulateurs (Zhang et al., 2009), immunosuppresseurs (Marini et al., 2017) et anti-inflammatoires (Gresnigt et al., 2012) ont été identifiés.

Globalement, les neutrophiles orchestrent une forte réponse immunitaire articulaire, favorisant l'inflammation et la destruction ostéo-cartilagineuse.

## **b. Rôle de la réponse immunitaire adaptative dans la physiopathologie de la PR**

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont des cellules clés de l'immunité adaptative à médiation cellulaire. Ils sont les responsables de l'orchestration des réponses immunitaires aux agents pathogènes et en même temps, ils favorisent la tolérance aux auto-antigènes et aux allergènes environnementaux.

Au cours de l'activation du TCR (T Cell Receptor) dans un milieu cytokinique particulier, les lymphocytes T CD4 naïfs appelés Th0 (T helper 0) peuvent se différencier en plusieurs sous-populations de lymphocytes T effecteurs (Teff) : Th1, Th2 et Th17 et aussi en lymphocytes T régulateurs. Ces sous-populations sont distinguables fonctionnellement par leur profil cytokinique et par l'expression de facteurs de transcription qui leurs sont propres (Kim and Leonard, 2007).

Les lymphocytes **Th1** assurent une protection contre les agents pathogènes intracellulaires et les virus (Harms Pritchard et al., 2015). En présence d'IL-12, les lymphocytes T expriment le facteur de transcription T-bet (T-box expressed in T cells) qui joue un rôle central dans le développement des Th1. T-bet ou Tbx21 (Zhang and Yang, 2000) contrôle et promeut l'expression du gène codant la cytokine pro-inflammatoire caractéristique des Th1, l'IFN- $\gamma$ . Il induit sa production endogène, il en résulte une augmentation de l'IFN- $\gamma$  local (Szabo et al., 2000). De plus, lorsqu'ils sont activés, les Th1 activent les macrophages en induisant d'une part la production des intermédiaires réactifs de l'oxygène et de l'oxyde nitrique (NO) et d'autre part, en stimulant leur fonction phagocytaire et en favorisant leur capacité de présentation antigénique par la régulation des molécules de CMH de classe II. Dans les lymphocytes Th1 en développement, la voie de régulation impliquant la signalisation IFN- $\gamma$ -R/STAT1 maintient un niveau d'expression de T-bet élevé, créant une boucle autocrine de rétroaction positive. Par cette boucle de rétroaction, la cytokine régule un facteur de transcription favorisant sa propre production (Lighvani et al., 2001). Les Th1 sont impliqués dans la pathogénèse de la PR, ils sont présents en abondance dans la synoviale articulaire (Yamada et al., 2007) et entraînent la destruction osseuse régulée par les ostéoclastes.

Les lymphocytes Th17 protègent contre les infections fongiques et les bactéries extracellulaires. Ils se différencient en présence d'IL-6 et de TGF $\beta$  (Bettelli et al., 2006; Veldhoen et al., 2006). Ils sont caractérisés par la production de l'IL-17, l'IL-21, l'IL-22 et du TNF $\alpha$  sous le contrôle du facteur de transcription ROR $\gamma$ T (RAR-related Orphan Receptor  $\gamma$  T)

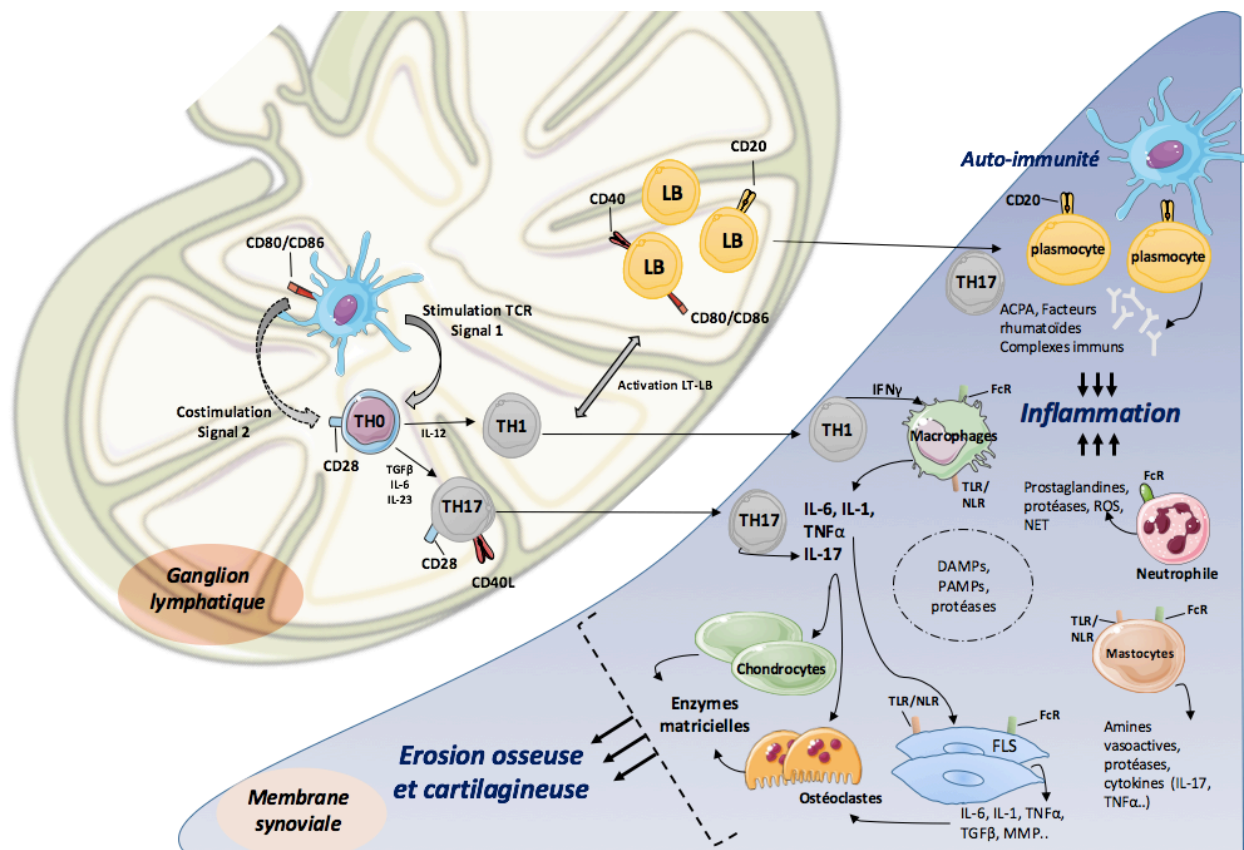
(Ivanov et al., 2006). Le TGF $\beta$  augmente l'expression du récepteur de l'IL-23 par les Th17 en développement augmentant la réponse à l'IL-23, cytokine importante dans la survie, l'expansion et le maintien des Th17 (Mangan et al., 2006). De plus, il est à noter que le TGF- $\beta$  est également responsable de l'induction de l'expression de FoxP3 à partir des CD4 naïfs (Chen et al., 2003). En revanche, en présence d'IL-6 ou d'IL-21 l'expression de FoxP3 induite par TGF- $\beta$  est supprimée et à l'inverse l'expression de ROR $\gamma$ t est favorisée (Bettelli et al., 2006; Zhou et al., 2007). Il existe donc des voies de développement réciproques pour la génération des Th17 pathogènes et de lymphocytes T régulateurs (Treg) qui peuvent finalement influencer les réponses immunitaires (Bettelli et al., 2006; Zhou et al., 2008). Il a d'ailleurs été montré dans la PR qu'il existe un déséquilibre Treg/Th17 favorisé par un microenvironnement cytokinique pro-inflammatoire qui conduit au développement continu des Th17 au détriment des Treg (Niu et al., 2012).

Le rôle principal des **Treg** est le maintien de la tolérance vis-à-vis des antigènes du soi. Dans la PR, ces cellules présentent une altération fonctionnelle. Ceci a été appuyé par des études qui ont montré que le transfert adoptif de Treg améliore l'arthrite expérimentale et qu'à l'inverse, la déplétion de ces cellules aggrave la maladie (Morgan et al., 2005). En revanche, un défaut quantitatif n'est pas clairement établi. Toutefois, une faible quantité de Treg dans le sang périphérique des patients atteints de PR combinée à une plus grande quantité dans le liquide synovial a été suggérée dans une méta-analyse estimant la proportion des Treg chez ces patients (Morita et al., 2016).

Dans un environnement cytokinique particulier, les Treg présentent une certaine plasticité leur permettant d'acquérir les phénotypes Th1, Th2 ou Th17. Cette conversion des Treg en T effecteurs de l'inflammation serait à l'origine de la perte de la capacité immunosuppressive de ces cellules qui deviennent alors des exTreg (notion qui sera abordée plus tard) capables de produire des cytokines pro-inflammatoires. En effet, une étude a mis en évidence la présence d'un phénotype de lymphocytes T régulateurs co-exprimant FoxP3 (Forkhead box P3) et l'IL-17 dans la synoviale de patients atteints de PR (Komatsu et al., 2014), suggérant que ces Treg pro-inflammatoires dans ce contexte, participeraient à la pathogénèse de la PR.

Enfin, la dernière voie pathogène faisant partie intégrante de la polyarthrite rhumatoïde, implique l'immunité adaptative humorale. Dans la PR, les **lymphocytes B** dans la synoviale forment des agrégats avec les lymphocytes T et les cellules dendritiques. Ces

agrégats forment des structures appelées follicules lymphoïdes ectopiques. La génération de ces structures, est contrôlée par l'expression de facteurs, dont le facteur d'induction de la prolifération « APRIL » (A Proliferation-Inducing Ligand), le facteur d'activation des lymphocytes B « BAFF », ou encore certaines chimiokines, comme les CXCL14 et CXCL21 (Ohata et al., 2005). Le tissu synovial est également un site de différenciation des lymphocytes B en plasmocytes et de production in-situ d'auto-anticorps dans la PR. Les lymphocytes B contribuent à la maladie par différents mécanismes, incluant des fonctions dépendantes et indépendantes des anticorps. Ces dernières comprennent : la présentation antigénique et la production de cytokines et de chimiokines à l'origine de l'activation et la polarisation des lymphocytes T. Cette fonction pathogène polyvalente des lymphocytes B en fait d'excellentes cibles pour les traitements immunosuppresseurs. En effet, l'efficacité du rituximab, anticorps monoclonal qui cible l'antigène CD20 à la surface des lymphocytes B et qui permet une déplétion spécifique et efficace de cette population, confirme le rôle pathogène de ces cellules dans la PR (Edwards et al., 2004).



**Figure 5 : Réponses immunitaires innées et adaptatives impliquées dans la physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde, adapté de McInnes and Schett, 2011.**

Les interactions dépendantes de la costimulation entre les cellules dendritiques, les lymphocytes T et les lymphocytes B sont présentées comme se produisant principalement dans le ganglion lymphatique ; ces

événements génèrent une réponse auto-immune aux auto-antigènes citrullinés. Dans la membrane synoviale, les voies immunitaires adaptatives et innées se rejoignent pour favoriser le remodelage osseux et la dégradation des tissus. Les interactions entre les leucocytes, les FLS, les chondrocytes et les ostéoclastes et les cytokines et dérivés moléculaires produits conduisent à la phase chronique de la pathogénèse de la polyarthrite rhumatoïde. *ACPA* : anti-citrullinated protein antibody ; *DAMP* : damage-associated molecular pattern ; *FcR* : récepteur Fc ; *MMP* : métalloprotéinase matricielle, *NLR* : NOD-like receptor ; *PAMP* : pathogen-associated molecular pattern ; *TGF- $\beta$*  transforming growth factor  $\beta$  ; *Th0* : type 0 helper T cell ; *Th1* : type 1 helper T cell ; *Th17* : type 17 helper T cell, *TLR* : toll-like receptor, *TNF- $\alpha$*  : tumor necrosis factor  $\alpha$  ; *ROS* : Reactive Oxygen Species, *IFN- $\gamma$*  : interferon  $\gamma$ .

### **c. Rôle des cytokines dans la physiopathologie de la PR**

Dans la synoviale de la PR, les cellules produisent des cytokines qui agissent de manière paracrine ou autocrine. Par exemple, les macrophages produisent des cytokines qui activent les FLS, les lymphocytes T et les cellules dendritiques adjacentes. Ces cellules produisent à leur tour des cytokines qui peuvent activer d'autres cellules dans l'environnement articulaire. Ainsi, ces boucles de rétroaction assurent le recrutement continu de nouveaux médiateurs cellulaires de l'inflammation et par conséquent, maintiennent l'activation de ces cellules et leur fonction effectrice immunitaire et limitent l'apoptose dans le microenvironnement. Les cytokines sont directement impliquées dans de nombreux processus immunitaires associés à la pathogénèse de la polyarthrite rhumatoïde. Il existe un déséquilibre entre les fonctions pro- et anti-inflammatoires des cytokines. Ce déséquilibre est en faveur de la fonction pro-inflammatoire à l'origine de l'inflammation chronique favorisant l'auto-immunité et par conséquent la destruction ostéo-cartilagineuse. Toutefois, il a été montré que le profil cytokinique dépend du stade d'évolution de la maladie. Le stade précoce de la PR est caractérisé par un profil cytokinique impliquant l'expression des interleukines 4, 13 et 15 nécessaires à la mise en place de la chronicité de la maladie (Raza et al., 2005). Les ostéoclastes activés par les ACPA produisent l'IL-8, cette cytokine joue un rôle particulièrement important dans la phase d'initiation de la maladie en favorisant le recrutement de neutrophiles dans le compartiment synovial (Krishnamurthy et al., 2016). Quant au TNF $\alpha$ , cette cytokine joue un rôle essentiel dans l'initiation, l'établissement et la chronicité de la réponse immunitaire dans la PR. En effet, plusieurs études ont démontré le rôle pro-inflammatoire de cette cytokine dans la pathogénèse de la maladie. Le TNF $\alpha$  permet la régulation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines au sein de la membrane synoviale. Il promeut l'expression des molécules d'adhésion, l'angiogenèse, la douleur articulaire (Hess et al., 2011) et est capable d'augmenter la résistance des T<sub>eff</sub> à la suppression par les T<sub>reg</sub> (Chen et al., 2016b). Le TNF $\alpha$  joue également un rôle dans la régulation des médiateurs ostéo-articulaires. Il favorise l'ostéoclastogénèse en présence de RANKL (Komine et al., 2001). En effet, en

synergie avec RANKL, le TNF $\alpha$  induit l'expression de RANK via la voie de signalisation NF $\kappa$ B (Nuclear Factor Kappa-B) (Luo et al., 2018) induisant la différenciation des ostéoclastes à l'origine de la résorption osseuse. Paradoxalement, outre son rôle pro-inflammatoire bien caractérisé, le TNF $\alpha$  possède également un rôle anti-inflammatoire et immunosuppresseur via les lymphocytes T régulateurs (Chen et al., 2007). Nous avons montré que le TNF $\alpha$ , à travers une signalisation TNFR2 (Tumor Necrosis Factor Receptor 2), est à l'origine de la stabilité et de la prolifération des lymphocytes T régulateurs, ainsi que d'une activité immunosuppressive renforcée de cette population (Santinon et al., 2020).

Dans la PR, les thérapies ciblant les cytokines pro-inflammatoires, notamment le TNF $\alpha$ , est une des stratégies de traitement les plus efficaces. Il a été montré par notre équipe que les thérapies anti-TNF $\alpha$  restaurent les capacités suppressives des lymphocytes T régulateurs dans les modèles murins d'arthrite (Biton et al., 2011). Ceci a également été observé chez les patients atteints de PR traités par des anticorps monoclonaux (Ehrenstein et al., 2004). Dans notre récente publication, nous avons montré que les traitements biologiques anti-TNF $\alpha$  comprenant les anticorps monoclonaux et le récepteur soluble au TNF $\alpha$ , entraînaient une augmentation de la fréquence des Treg-TNFR2<sup>+</sup> chez les patients atteints de PR (Santinon et al., 2020).

L'interleukine 6, comme le TNF $\alpha$  joue un rôle central dans la physiopathologie de la PR. Elle est exprimée de manière abondante dans le liquide synovial et dans le sérum des patients atteints de PR (Madhok et al., 1993). Le taux d'expression de l'IL-6 et de son récepteur soluble, l'IL-6R, est corrélé à l'activité de la maladie et à la destruction articulaire. L'IL-6 est impliquée dans le développement de la réponse immunitaire adaptative, elle entraîne l'activation locale des leucocytes et la production d'auto-anticorps (Dienz et al., 2009). Aussi, en synergie avec d'autres cytokines, l'IL-6 favorise la différenciation des Th17 producteurs de l'IL-17 (Acosta-Rodriguez et al., 2007). De plus, l'IL-6 est impliquée dans l'activation et le recrutement des neutrophiles dans l'articulation et dans la différenciation des ostéoclastes, favorisant l'inflammation articulaire et la résorption osseuse (Liu et al., 2005). Enfin, le rôle central de cette cytokine a été mis en avant par l'efficacité des thérapies ciblant le récepteur de l'IL-6 dans le traitement de la PR.

L'IL-17 est la cytokine caractéristique des lymphocytes Th17. Elle a été impliquée dans la pathogenèse de nombreuses maladies auto-immunes, dont la PR. L'IL-17 est impliquée à tous

les stades de la maladie et contribue de manière importante à la chronicité de cette dernière (Benedetti and Miossec, 2014), notamment par son rôle dans l'induction de l'ostéoclastogénèse, ce qui conduit à la résorption osseuse (Kotake et al., 1999). L'IL-17 favorise également la survie des synoviocytes et des cellules inflammatoires ainsi que la maturation des cellules immunitaires. Cela conduit à une augmentation du nombre de synoviocytes et de cellules inflammatoires dans la synoviale, entraînant une hyperplasie et la formation du pannus synovial observés dans les articulations des patients atteints de PR.

Les cytokines de la famille de l'IL-1 (par exemple, l'IL-1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 18 et 33) ainsi que l'IL-1RA, un antagoniste du récepteur de l'IL-1 sont également exprimées de manière abondante dans le liquide synovial et dans le sérum des patients atteints de PR. Elles favorisent l'activation des leucocytes, des cellules endothéliales, des chondrocytes et des ostéoclastes. Il a été montré que la surexpression transgénique de l'IL-1 induit une arthrite érosive (Ghivizzani et al., 1997) et que les souris déficientes en IL-1RA développent aussi une arthrite érosive spontanée, associée à l'induction des Th17 (Akitsu et al., 2015). Ces données suggèrent que l'IL-1 joue un rôle important dans l'induction de la destruction ostéo-cartilagineuse.

Bien que des inhibiteurs endogènes tels que l'IL-1RA, les récepteurs solubles du TNF $\alpha$  et l'IL-10 soient également produits localement par les macrophages, les neutrophiles et les fibroblastes, leurs taux d'expression restent insuffisants pour atténuer la réponse inflammatoire. Pour cela, des inhibiteurs thérapeutiques ciblant les cytokines pro-inflammatoires ont été développées, notamment les inhibiteurs de l'IL-6R et du TNF $\alpha$  qui sont aujourd'hui efficaces dans le traitement de la PR. En revanche, l'inhibition de l'IL-1 et de l'IL-17 ont eu moins de succès.

Afin de développer des thérapies ciblées efficaces, des chercheurs se sont intéressés aux voies de signalisation induites par les cytokines. La voie Janus kinase (JAK) a été largement étudiée et associée à l'inflammation. En effet, cette voie est commune à la transduction du signal de plusieurs cytokines dont l'IL-6. De ce fait, des inhibiteurs de JAK, en particulier les inhibiteurs de JAK1 ont été développés et montrent une efficacité clinique dans le traitement de la PR (Boyle et al., 2015).

Ainsi, la compréhension des mécanismes qui orchestrent l'évolution des différents stades qui mènent finalement à la PR établie offrent de nombreuses possibilités d'intervention thérapeutique.



## **G. La destruction articulaire**

Les lésions ostéo-cartilagineuses sont un signe caractéristique de la PR établie, ils sont le résultat de l'inflammation chronique de la membrane synoviale. Dans cette dernière, les médiateurs cellulaires qui orchestrent la destruction articulaire ont des rôles bien définis. Les macrophages, les neutrophiles, les mastocytes et plus particulièrement les FLS (Kiener et al., 2009) contribuent à la destruction de l'os et du cartilage par la libération de cytokines et de MMP. Les MMP sont à l'origine du désassemblage du réseau de collagène de type II et par conséquent de la modification de la composition en glycosaminoglycane de l'articulation. Ainsi ces modifications conduisent finalement à un dysfonctionnement biomécanique majeur.

On retrouve dans la synoviale des patients atteints de PR des niveaux d'expression élevés de MMP et même si leurs inhibiteurs endogènes TIMP (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase) sont exprimés, ils restent néanmoins insuffisants pour empêcher cette cascade destructive (Keyszer et al., 1998). De plus, le cartilage articulaire présente un potentiel de régénération limité du fait d'un défaut de chondrocytes, cellules qui régulent la formation de la matrice. Ceci est dû à la présence de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 et l'IL-17 et de ROS dans la synoviale qui entraînent l'apoptose de ces cellules (Blanco et al., 1995).

L'érosion osseuse est en grande partie due à la maturation et à l'activation des ostéoclastes induites par RANKL, produit par les lymphocytes T. Le  $TNF\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-1 produits par les macrophages et les FLS dans la synoviale, favorisent aussi la différenciation et l'activation des ostéoclastes (Schett and Gravallese, 2012). Par ailleurs, l'équipe de Schett a suggéré que les ACPA contribuent également à l'activation des ostéoclastes et par conséquent au processus de destruction osseuse. En effet, les ACPA interagissent avec les peptides citrullinés (par exemple la vimentine citrullinée) exprimés par les ostéoclastes et leurs précurseurs, ce qui entraîne la maturation et l'activation de ces cellules (Harre et al., 2012). Les ostéoclastes activés produisent des protéases, dont la cathepsine K, responsable de la dégradation de la matrice osseuse (Dodds et al., 2001).

## **H. Modèles murins de la PR :**

Les modèles animaux sont indispensables à la compréhension des mécanismes physiopathologiques des maladies chez l'humain, grâce à leur capacité à mimer l'état pathologique humain. Dans la polyarthrite rhumatoïde, les modèles murins ont été des outils

utiles et essentiels à la compréhension du processus pathogénique et au développement de nouveaux traitements.

Les modèles d'arthrite expérimentale peuvent être classés en deux grandes catégories : (A) les modèles animaux induits, (B) les modèles génétiques de la PR. Nous détaillons ces différents modèles dans cette partie.

---

## Modèles animaux de la polyarthrite rhumatoïde

---

### Modèles induits

Arthrite expérimentale au collagène (AEC)  
Arthrite d'hypersensibilité de type retardée (DTHA)  
Arthrite induite par la mBSA  
Arthrite induite par les anticorps anti-collagènes (CAIA)  
Arthrite induite par la paroi cellulaire du streptocoque (SCWIA)

### Modèles génétiques

Souris K/BxN  
Souris transgénique au TNF $\alpha$   
Souris SKG

---

**Tableau 2 : Principaux modèles animaux de la polyarthrite rhumatoïde.**

## 1. Modèles expérimentaux induits de la polyarthrite rhumatoïde

### a. *Arthrite Expérimentale au Collagène (AEC)*

De manière générale, il n'existe pas de modèle animal qui puisse mimer parfaitement la pathologie humaine. C'est pourquoi, le modèle présentant le moins de dissemblance est favorisé.

Dans la PR, le modèle qui partage le plus de caractéristiques pathologiques et immunologiques similaires à la pathologie humaine est l'arthrite expérimentale au collagène (AEC). Le premier modèle d'AEC a été développé chez le rat par immunisation avec du collagène de type II (Trentham et al., 1977), avant d'être reproduit plus tard chez la souris. Chez cette dernière, l'AEC est induite par une immunisation contre le collagène de type II articulaire, avec une émulsion d'adjuvant complet de Freund et de collagène de type II (CII) de source bovine (CIIb). Les souches de souris les plus sensibles à l'AEC sont les DBA/1, les B10.Q et B10.RIII. La DBA/1 est la souche la plus utilisée dans ce modèle, avec une incidence d'arthrite allant de 80 à 100% (Brand et al., 2007). L'AEC peut aussi être induite chez les souris C57BL/6, par une immunisation avec le collagène de type II (CII) de poulet (CIIp) dans de l'adjuvant complet de

Freund. Toutefois, cette souche est moins sensible à l'induction de ce modèle, avec une incidence plus faible et très variable.

En général, les premiers signes cliniques d'arthrite apparaissent 21-28 jours après la première immunisation (Brand et al., 2007), avec une réponse qui se distingue par une inflammation de la synoviale, une destruction du cartilage et une érosion osseuse similaires à la PR chez l'humain. Dans ce modèle, l'évaluation de l'arthrite se fait sur les pattes postérieures (doigts, tarse, cheville) et antérieure (doigts et carpe) des souris selon une échelle allant de 0 à 4 avec 0 = articulation normale, 1 = rougeur, 2 = œdème modéré, 3 = œdème sévère et 4 = déformation et ankylose. Ce score est attribué à chaque articulation (les doigts de chaque patte étant considérés comme une seule articulation). La somme des scores obtenus pour chaque articulation donne le score total de la souris à un jour donné, qui peut atteindre un maximum de 40.

L'AEC est avant tout une maladie auto-immune, dont la réponse immunitaire est dirigée contre le collagène de type II. Cette réponse est médiée par les lymphocytes B, produisant des auto-anticorps dirigés contre le CII et par les lymphocytes T, dont principalement les Th1 et les Th17 avec une dominance Th17.

#### **b. Le modèle DTHA**

Le développement de l'arthrite dans la souche de souris C57BL/6 est difficile, l'incidence est variable et généralement faible. Comme la plupart des souris transgéniques sont développées sur ce fond génétique, il a été nécessaire de développer un modèle d'arthrite efficace dans cette souche. Dans ce contexte, il y a dix ans, le modèle DTHA (Delayed-Type Hypersensitivity Arthritis) a été développé. Il est induit par une injection par voie intradermique d'une émulsion d'adjuvant complet de Freund et d'albumine de sérum bovin méthylée (methyl-Bovine Serum Albumine, mBSA) conduisant à une réponse inflammatoire dirigée contre la mBSA. La première immunisation est suivie d'une administration en intraveineux d'un cocktail d'anticorps monoclonaux anti collagène de type II retrouvé spécifiquement dans l'articulation. En dernière étape, l'inflammation articulaire est induite avec un rappel de mBSA injecté en sous-cutané dans le coussinet plantaire permettant l'évaluation de l'arthrite dans l'articulation. En effet, les signes cliniques de l'arthrite apparaissent dès le lendemain du rappel et sont évalués selon des paramètres cliniques définies (Atkinson et al., 2012). La réponse inflammatoire mise en place implique l'activation

des médiateurs cellulaires dont les neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes T CD4, ainsi que des médiateurs inflammatoires cytokiniques dont principalement le TNF $\alpha$  et l'IL-17 (Atkinson et al., 2016). Comme dans l'AEC, l'inflammation entraîne des érosions osseuses et cartilagineuses analysables en histologie. Enfin, ce modèle peut être traité avec des agents thérapeutiques bloquant le TNF $\alpha$  qui sont conventionnellement utilisés chez l'humain dans le traitement de la PR (Atkinson et al., 2012).

### ***c. Arthrite induite par la mBSA***

Ce modèle d'arthrite est induit par immunisation avec une émulsion d'adjuvant complet de Freund et de méthyl BSA (mBSA), suivie d'une injection de mBSA dans du PBS, 21 jours après la première immunisation dans l'articulation du genou. Dans ce modèle, l'antigène qui est la mBSA, est une substance cationique chargée positivement, qui va se lier au cartilage articulaire chargé négativement et de ce fait, sera retenue dans l'articulation. Très rapidement après la première injection, une réponse inflammatoire se met en place avec activation des lymphocytes T CD4 spécifiques de l'antigène et recrutement des neutrophiles et des macrophages dans l'articulation. Cette inflammation aiguë entraîne dans l'articulation traitée par la mBSA, une inflammation de la membrane synoviale, une hyperplasie synoviale et une destruction osseuse et cartilagineuse (van den Berg et al., 2007).

Les modèles murins d'arthrite induite par la mBSA ont été largement utilisés pour étudier le rôle spécifique des cytokines dans les différentes phases de la pathogenèse de la maladie (Lemos et al., 2009).

### ***d. L'Arthrite induite par des anticorps anti-collagène***

La CAIA (Collagen Antibody Induced Arthritis) est induite par administration d'un cocktail d'anticorps monoclonaux dirigés contre le collagène articulaire de type II chez la souris, suivie trois jours après d'une injection de LPS. Rapidement après la deuxième injection, les souris commencent à développer des signes cliniques de l'arthrite résultant de l'inflammation articulaire. L'inflammation dans la CAIA est caractérisée par l'infiltration des macrophages et des neutrophiles dans l'articulation (Santos et al., 1997), mais n'entraîne pas l'activation des cellules de l'immunité adaptative, ce qui représente une limite pour ce modèle. Néanmoins, ce modèle présente beaucoup d'avantages, notamment par la rapidité d'induction, l'incidence de l'arthrite et la possibilité d'utiliser les souris transgéniques (Bessis

et al., 2017).

#### ***e. Arthrite induite par la paroi cellulaire du streptocoque (SCWIA)***

Le modèle d'arthrite induite par le SCW (Streptococcal Cell Wall) a été développé et est utilisé chez les souris BALB/c et DBA/1. Ce modèle est induit par une immunisation contre le SCW, avec une seule injection intra-articulaire de fragments de parois cellulaires de Streptocoque, qui sont reconnus par les TLR et qui entraînent une inflammation articulaire aiguë, dès le lendemain. En revanche, l'arthrite se résorbe en général une semaine après l'injection. Par ailleurs, l'arthrite destructive chronique peut être induite dans ce modèle et ce, en répétant les injections des fragments de SCW (Joosten et al., 2008).

Dans ce modèle, le TNF $\alpha$  est impliqué dans l'inflammation conduisant au gonflement initial de l'articulation et diminue au cours de la phase érosive, alors que l'IL-1 $\beta$  est fortement impliqué dans la destruction cartilagineuse et l'infiltration des cellules immunitaires dans l'articulation, favorisant ainsi l'inflammation, à la fois dans les phases aiguës et chroniques de la maladie (Joosten et al., 2008). Par ailleurs, les macrophages et les lymphocytes B jouent également un rôle dans ce modèle, notamment par la production d'anticorps anti-SCW.

## **2. Modèles expérimentaux génétiques de la polyarthrite rhumatoïde**

### ***a. Souris transgéniques au TNF $\alpha$***

Les modifications génétiques peuvent être à l'origine du développement spontané de l'arthrite. Par exemple, il y a une trentaine d'années, l'équipe de G.Kollias a découvert que les souris sur-exprimant un transgène du TNF $\alpha$  humain (h), développaient spontanément une arthrite érosive chronique (Keffer et al., 1991). L'arthrite des souris transgéniques au hTNF $\alpha$  présente des caractéristiques semblables à celles de la PR chez l'humain. Ces dernières sont principalement l'infiltration de PNN et de lymphocytes dans l'espace synovial entraînant l'hyperplasie synoviale, la formation du pannus, la destruction du cartilage et la résorption de l'os. Par ailleurs, il est à noter que dans ce modèle, il y a absence de réponse B et de réponse T et en l'occurrence pas de production d'ACPA ni de facteurs rhumatoïdes (Aidinis et al., 2003). Toutefois, ce modèle a été utile pour étudier l'effet délétère de la surproduction du TNF $\alpha$ , pour établir la relation entre le TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  dans la pathogenèse de l'arthrite (Probert et al., 1995) et aussi pour évaluer les thérapies anti-TNF $\alpha$  (Keffer et al., 1991).

### **b. Modèle d'arthrite K/BxN**

Le modèle K/BxN est un modèle d'arthrite spontanée, qui se développe lorsqu'on croise des souris transgéniques pour le TCR spécifique du peptide de la ribonucléase pancréatique bovine avec des souris NOD exprimant le CMHII I-Ag7 (Kouskoff et al., 1996). La progéniture résultante (K/BxN) développe spontanément à l'âge de 4 à 5 semaines, une arthrite sévère et symétrique, affectant principalement les articulations distales. L'inflammation dans ce modèle est le résultat d'une autoréactivité des lymphocytes T et B à l'auto-antigène glucose-6-phosphate isomérase (G6PI), présenté par les CPA sur les molécules I-Ag7 du CMH de classe II. Cela entraîne la production d'auto-anticorps pathogènes spécifiques de la G6PI. Il n'y a pas de production d'ACPA, ni de facteur rhumatoïde dans l'arthrite K/BxN (Bessis et al., 2017). Par ailleurs, dans ce modèle la réponse immunitaire dépend principalement de l'IL-1, qui favorise l'infiltration synoviale des cellules immunitaires, la synovite et par conséquent, la destruction osseuse et cartilagineuse. Enfin, il a été montré que le sérum des souris K/BxN arthritiques suffit à induire une arthrite chez diverses souches de souris (Christianson et al., 2010).

### **c. Souris SKG**

Le modèle d'arthrite des souris SKG fut une découverte fortuite. En effet, le développement de l'arthrite inflammatoire chronique et spontanée dans ce modèle est le résultat d'une mutation ponctuelle spontanée dans le domaine SH2 (Src Homology 2) du gène ZAP-70 (Zeta-Associated Protein 70) d'une colonie de souris BALB/c (Sakaguchi et al., 2003). Ce modèle est caractérisé par une inflammation articulaire sévère, impliquant l'infiltration synoviale des médiateurs cellulaires de l'immunité innée et adaptative, ainsi que localement, la prolifération des synoviocytes, entraînant l'érosion osseuse et cartilagineuse. De plus, dans le sérum des souris SKG on retrouve des niveaux élevés d'auto-anticorps spécifiques du collagène de type II et de facteurs rhumatoïdes (Sakaguchi et al., 2003).

## **I. Les traitements de la polyarthrite rhumatoïde**

L'objectif de tout traitement dans la PR est la rémission de la maladie, en empêchant l'apparition de lésions ou, si une destruction articulaire est présente, sa progression. Tout nouveau traitement doit entraîner une amélioration de l'activité de la maladie dans les 3 mois qui suivent la première administration (Aletaha et al., 2016). En l'absence de réponse, le

traitement doit être adapté ou modifié (stratégie de « treat to target »), mais cette décision doit se prendre au cas par cas. Ainsi, une approche efficace de thérapie ciblée repose sur une surveillance fréquente de l'activité de la maladie et sur des adaptations rapides du traitement (« Tight control » ou contrôle étroit).

Les AINS (Anti-Inflammatoires Non-Stéroïdiens) améliorent les symptômes cliniques (les douleurs articulaires, la fatigue, les rougeurs et les gonflements) généralement par inhibition de la synthèse des prostaglandines. Toutefois, tous ces médicaments ne modifient pas le processus immunitaire et par conséquent, n'interfèrent pas avec les mécanismes conduisant à la destruction articulaire. Les glucocorticoïdes sont également des traitements symptomatiques efficaces, leur action est rapide et ils ont aussi une efficacité démontrée sur la progression des lésions articulaires, cependant, leurs effets indésirables empêchent leur utilisation à long terme. L'interférence avec le processus inflammatoire à l'origine des lésions articulaires nécessite des traitements immunomodulateurs dits « de fond » ou DMARDs (Disease-modifying antirheumatic drugs), parmi lesquels on distingue les DMARD synthétiques et les DMARD biologiques.

DMARD (Disease-Modifying Anti-rheumatic Drug)	
DMARDs Synthétiques	DMARDs Biologiques
<p><b>Conventionnels</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <b>Cibles inconnues</b> : méthotrexate, sulfasalazine, chloroquine, hydroxychloroquine</li> <li>➤ <b>Cibles connues</b> : léflunomide</li> </ul> <p><b>Ciblés</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <b>Inhibiteurs de JAK1 et JAK2</b> : Baricitinib</li> <li>➤ <b>Inhibiteurs de JAK1,2 et 3</b> : Tofacitinib</li> </ul>	<p><b>Traitement biologiques de référence</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <b>Anti-TNFα</b> : Infliximab, adalimumab, etanercept, certolizumab, golimumab</li> <li>➤ <b>Anti-IL-6-R</b> : tocilizumab, sarilumab</li> <li>➤ <b>CTLA-4-Ig</b> : abatacept</li> <li>➤ <b>Anti-CD20</b> : rituximab</li> </ul> <p><b>Biosimilaires</b></p>

**Tableau 3 : Principaux traitements de la polyarthrite rhumatoïde.**

### 1. Les DMARDs synthétiques

Les DMARDs synthétiques sont divisés en DMARDs synthétiques conventionnels, dont les modes d'action sont pour la plupart inconnus et en DMARDs synthétiques ciblés, qui ont été développés pour cibler des molécules spécifiques à l'intérieur des cellules.

### **a. DMARDs synthétiques conventionnels**

Dès que le diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde est posé, il faut commencer un traitement par un DMARD synthétique conventionnel afin de limiter les dommages structuraux (Nell, 2004) (concept de « fenêtre d'opportunité »). En général, le méthotrexate est le premier choix de traitement de première intention. Le méthotrexate a une action pléiotrope sur les médiateurs cellulaires de l'inflammation, ce qui entraîne une atténuation globale de la réponse inflammatoire. La mise à jour de 2019 des recommandations de l'EULAR (European League Against Rheumatism) pour la prise en charge de la PR recommande l'association de ce DMARD avec des glucocorticoïde (GC) (Smolen et al., 2020). Cette association montre une efficacité équivalente et une meilleure tolérance à l'association de deux ou trois DMARD synthétiques conventionnels et de GC (Verschueren et al., 2015). Dans le cas où le méthotrexate ne peut être utilisé, en raison d'une intolérance ou d'une contre-indication, les DMARD synthétiques conventionnels alternatifs, qui comprennent la sulfasalazine ou le léflunomide sont utilisés.

### **b. DMARDs synthétiques ciblés : inhibiteurs de JAK**

Le tofacitinib et le baricitinib sont des inhibiteurs des Janus Kinase. Ils sont efficaces dans le traitement des maladies inflammatoires dont la polyarthrite rhumatoïde (Taylor et al., 2017) en bloquant la transduction du signal intracellulaire, à travers l'inhibition de la phosphorylation des STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription). En effet, les JAK sont d'importants médiateurs en aval de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, telles que les interférons ou l'interleukine 6. Lorsqu'un ligand se lie à son récepteur, la kinase JAK intracellulaire est phosphorylée, ce qui entraîne la phosphorylation et l'activation de la voie STAT. Par conséquent, l'inhibition de ces kinases par des molécules ciblées affecte de multiples voies inflammatoires.

## **2. Les DMARDs biologiques**

Les traitements DMARDs actuellement approuvés pour la polyarthrite rhumatoïde ont quatre modes d'action différents : l'inhibition du TNF $\alpha$ , l'inhibition du récepteur de l'interleukine 6, le blocage de la co-stimulation des lymphocytes T et la déplétion des lymphocytes B. Ces thérapies ciblent avec spécificité des protéines solubles extracellulaires ou associées à la membrane cellulaire. Ça peut être les traitements biologiques de référence ou



leurs biosimilaires lorsque le brevet tombe dans le domaine public. Les biosimilaires font l'objet d'études de phase I à IV et s'ils sont approuvés par l'agence européenne des médicaments, sont considérés comme équivalents en termes d'efficacité et de sécurité aux traitements biologiques de référence.

#### **a. Les inhibiteurs du TNF $\alpha$**

Le rôle du TNF $\alpha$  dans la physiopathologie de la PR a été établi il y a plus de vingt ans, notamment par le modèle de souris transgéniques au TNF $\alpha$  (Keffer et al., 1991). De ce fait, cette cytokine a été la première cible des traitements biologiques (Elliott et al., 1994). Le premier anti-TNF $\alpha$  développé et approuvé pour le traitement de la PR a été l'**infiximab** (Maini et al., 1998). Cet anticorps monoclonal chimérique humain/souris, cible spécifiquement à la fois la forme soluble et membranaire du TNF $\alpha$ . Il est administré aux patients par voie intraveineuse toutes les 4 à 8 semaines. Sa nature chimérique entraîne néanmoins chez certains patients la génération d'anticorps anti-médicaments qui peuvent altérer la réponse thérapeutique (Murdaca et al., 2016).

Très peu de temps après, l'**étanercept** (ETN), un autre inhibiteur du TNF $\alpha$  a été approuvé pour le traitement de la PR. Cet inhibiteur est différent de l'infiximab d'un point de vue structurel, mode d'action et voie d'administration. L'étanercept est une protéine de fusion qui a été développée en associant la fraction extracellulaire du récepteur de type 2 du TNF $\alpha$  (TNFR2) à la portion Fc d'une IgG1 humaine (Elliott et al., 1994). L'étanercept est un récepteur soluble au TNF $\alpha$ , il empêche les réponses cellulaires médiées par ce dernier en le neutralisant. Ce traitement est administré par une injection en sous-cutanée, à une fréquence d'une fois par semaine en raison d'une demi-vie réduite allant de 4 à 6 jours. Il peut être utilisé en monothérapie, cependant il a été montré que son association avec le méthotrexate permet d'augmenter son activité et donne en l'occurrence une meilleure réponse (Weinblatt et al., 1999).

Le troisième inhibiteur approuvé par l'agence européenne du médicament est l'**adalimumab** (ADA) (Rau, 2002). L'adalimumab est le premier anticorps monoclonal anti-TNF $\alpha$  entièrement humain développé pour le traitement de la PR. Il est constitué d'une séquence peptidique qui mime à la perfection, en terme de structure et de fonction, l'IgG1 humaine. L'adalimumab se lie à la fois à la forme soluble et membranaire du TNF $\alpha$ , bloquant l'interaction de ce dernier avec ses récepteurs. Il est administré par injection en sous-cutanée

une fois toutes les 2 semaines. Comme pour l'étanercept, l'adalimumab est également plus efficace en association avec le méthotrexate (Burmester et al., 2007).

Plus tard, en 2007, le Certolizumab Pegol (CZP) a été approuvé par l'agence européenne du médicament. Le CZP est un fragment d'anticorps anti-TNF $\alpha$  humain, constitué de seulement la partie Fab couplée à du polyéthylène glycol (PEG). L'ajout du PEG permet de stabiliser la molécule et prolonge sa demi-vie à environ 2 semaines. Le certolizumab est administré par injection en sous-cutanée toutes les deux semaines, en monothérapie ou associé au méthotrexate (Smolen et al., 2009).

Le **golimumab** (GOL), est un anticorps monoclonal IgG1 anti-TNF $\alpha$ . Contrairement à l'infliximab, le golimumab est constitué d'une séquence peptidique entièrement humanisée. Son efficacité a été montrée chez des patients atteints de PR avec une activité sévère, qui ne répondent pas aux traitements de première intention (Kay et al., 2008).

#### ***b. Inhibiteur de l'interleukine 1***

L'anakinra est un antagoniste des récepteurs de l'IL-1 humaine et la forme recombinante de l'IL-1-RA. En raison d'une demi-vie plasmatique courte (4-6 heures), cet inhibiteur est administré à une fréquence d'une fois par jour, par injection en sous-cutanée. Il a d'abord été développé pour le traitement de la PR, mais n'a montré qu'une efficacité modérée en comparaison aux biothérapies anti-TNF $\alpha$ . De ce fait, l'anakinra est très rarement utilisé dans le traitement de la PR (Singh et al., 2009). Aujourd'hui, il est beaucoup plus efficace dans le traitement des maladies inflammatoires liées à l'inflammasome telles que les maladies autoinflammatoires ou la goutte (Gratton et al., 2009).

#### ***c. Inhibiteurs des récepteurs de l'interleukine 6***

L'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire, identifiée en 1986 comme cytokine jouant un rôle essentiel dans la physiopathologie de la PR. Son niveau d'expression ainsi que celui de son récepteur soluble (IL-6R) ont été corrélés à l'activité de la maladie, ce qui en fait une cible pour le traitement de la PR. Le **tocilizumab** est le premier anticorps monoclonal humanisé dirigé contre la forme soluble et membranaire du récepteur de l'IL-6. Il est efficace dans le traitement de la PR en monothérapie ou associé à un DMARD synthétique conventionnel tel que le méthotrexate (Jones et al., 2010). Sept ans après, le **sarilumab**,

deuxième anticorps entièrement humain anti-IL-6R a été approuvé pour le traitement de la PR.

Le ciblage de ces cytokines pro-inflammatoires en amont de leur production par ciblage des cellules productrices, est une stratégie qui a également été développée dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde. Par exemple le ciblage des lymphocytes T.

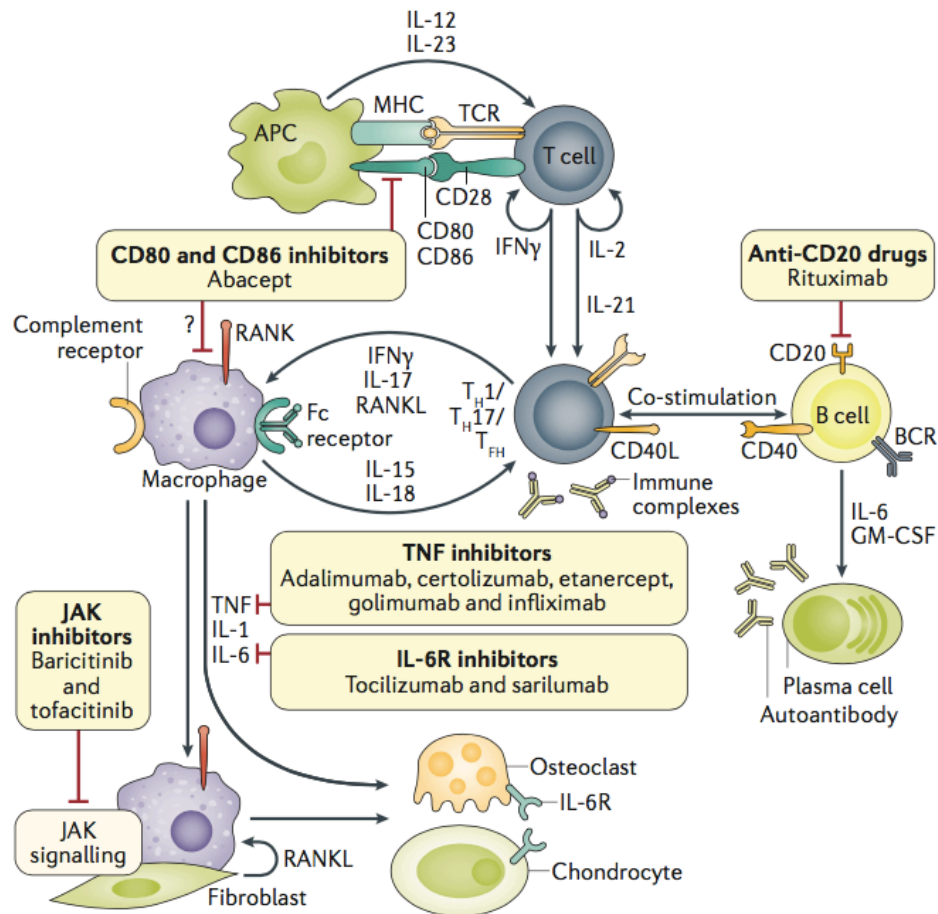
#### **d. *Inhibiteurs du CD80/86***

L'activation des lymphocytes T requiert deux signaux : l'activation du TCR et un signal de co-stimulation. Dans un premier temps, la reconnaissance du peptide antigénique présenté par la CPA au LT a pour résultat l'activation du TCR. Ce premier signal nécessite une co-stimulation qui a pour but d'amplifier le signal d'activation et de réponse. L'une des voies de co-stimulation les mieux caractérisées est celle médiée par la liaison du CD28 sur les LT aux molécules CD80/86 sur les CPA. Toutefois, il existe une protéine régulatrice de la réponse immunitaire qui est le CTLA-4. Cette dernière lie le CD80/86, empêchant le signal de co-stimulation. En se basant sur ce mécanisme de régulation de l'activation des lymphocytes T, l'**abatacept** a été développé. L'abatacept est une protéine de fusion constituée d'une immunoglobuline fusionnée au domaine extracellulaire du CTLA-4. Cette molécule se lie avec une grande affinité aux CD80/86 exprimés à la surface des CPA. De ce fait, l'abatacept est capable de bloquer l'interaction entre la CPA et le lymphocyte T, rendant les CPA tolérogènes (Patakas et al., 2016). Il en résulte une diminution de la prolifération des lymphocytes T et de la production de cytokines (Genant et al., 2008). L'abatacept est administré par voie intraveineuse une fois toutes les 4 semaines ou par voie sous-cutanée une fois par semaine.

#### **e. *Anticorps anti-CD20***

Les lymphocytes B interviennent dans la physiopathologie de la PR à deux niveaux. D'une part, ce sont les précurseurs des cellules productrices d'ACPA ou de facteurs rhumatoïdes. D'autre part, ils participent à l'activation des lymphocytes T grâce à leur fonction de cellules présentatrices d'antigène. De ce fait, les LB sont une cible dans le traitement de la PR. Depuis 2006, le rituximab est autorisé pour le traitement de la PR qui ne répond pas à une thérapie anti-TNF $\alpha$  (Chatzidionysiou et al., 2011). Il s'agit d'un anticorps monoclonal chimérique murin-humain anti-CD20. Le CD20 est un marqueur spécifique des LB, il est exprimé à leur surface dès le stade pré-B jusqu'au LB mémoire. En se liant au CD20, le

rituximab entraîne la déplétion des lymphocytes B circulants. Par ailleurs, il a été montré que les patients positifs pour les ACPA répondent mieux au traitement par le rituximab que les patients négatifs (Isaacs et al., 2013). Le rituximab peut être utilisé en monothérapie, mais une meilleure réponse a été observée lorsqu'il est administré en association avec le méthotrexate à des patients atteints de PR active (Emery et al., 2006).



**Figure 6 : Stratégies thérapeutiques ciblées de la polyarthrite rhumatoïde, Smolen et al., 2018.**

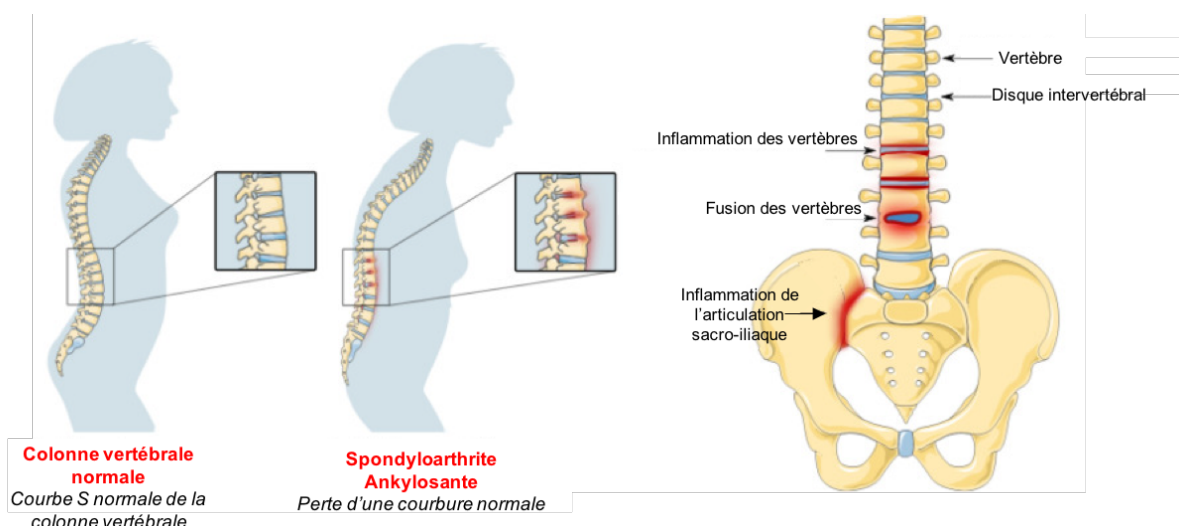
Les inhibiteurs du facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), les inhibiteurs du récepteur de l'IL6 (IL-6R) et les inhibiteurs des Janus kinases (JAK) bloquent l'action des cytokines pro inflammatoires impliquées dans l'initiation et la progression de la polyarthrite rhumatoïde (PR). Le ciblage des voies en amont (abatacept, rituximab) conduit à une régulation négative de ces cytokines pro-inflammatoires. APC : cellule présentatrice d'antigène (CPA) ; BCR : récepteur des lymphocytes B (B cell receptor) ; CD : cluster de différenciation ; GM-CSF : granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ; MHC : complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ; RANKL : receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ; TCR : récepteur des lymphocytes T (T cell receptor).

# Les Spondyloarthrites (SpA)

## A. Généralités

Les spondyloarthrites (SpA) sont une famille de maladies inflammatoires chroniques caractérisées, sur le plan anatomo-pathologique, par une inflammation et une ossification progressive des enthèses (sites d'insertion à l'os des tendons et des ligaments). A l'intérieur de cette famille, certaines maladies, comme la spondylarthrite ankylosante (SA) correspondent à un phénotype clinique précis, mais les SpA peuvent avoir des phénotypes extrêmement variés. Pour cette raison, actuellement, on préfère appeler spondyloarthrites des maladies différentes ayant en commun une ou plusieurs caractéristiques, notamment : 1) une atteinte du squelette axial et/ou périphérique, 2) l'association fréquente à des maladies inflammatoires chroniques extra-articulaires comme le psoriasis, les maladies inflammatoires chroniques intestinales et l'uvéïte 3) un terrain familial favorisant et l'association avec des gènes du HLA de classe I comme le HLA-B27. Selon le type d'atteinte rhumatologique principale, deux grands groupes de SpA sont définis : la SpA axiale (axSpA) caractérisée par une inflammation chronique des articulations du squelette axial (rachis et articulations sacro-iliaques) et la SpA périphérique (pSpA) avec des manifestations périphériques prédominantes telles que l'enthésite, la dactylite et l'arthrite (le plus souvent asymétrique et affectant principalement les membres inférieurs).

A terme, dans les formes graves de l'axSpA, l'inflammation chronique peut induire une néoformation osseuse et une fusion des vertèbres, entraînant une ankylose de la colonne vertébrale (Braun and Sieper, 2007). En effet, à la différence de la PR où les atteintes articulaires sont uniquement destructrices, dans la SpA, on retrouve tant des phénomènes d'ostéodestruction (prépondérant dans les atteintes des articulations périphériques) que des phénomènes d'ostéoprolifération. Dans la colonne vertébrale, l'ostéoprolifération, et notamment l'ossification des ligaments longitudinaux, se traduit par la formation et la croissance de syndesmophytes (des « ponts » osseux entre deux vertèbres) bien visibles à la radiographie standard (Appel et al., 2010). Par ailleurs, cette néoformation osseuse pourrait être la conséquence d'une destruction osseuse antérieure et pourrait faire partie d'un processus de réparation (Jacques et al., 2014).



**Figure 7 : Colonne vertébrale normale et colonne vertébrale atteinte de spondylarthrite ankylosante, adapté de Groen et al., 2021.**

L'inflammation sévère et chronique peut entraîner la fusion des vertèbres, conduisant à l'ankylose de la colonne vertébrale avec une perte de la courbure normale en forme de S observée dans une colonne vertébrale saine.

Ces maladies peuvent se déclarer à tout âge mais surviennent majoritairement chez une population jeune au cours de la troisième décennie de la vie et environ 5 ans plus tôt chez les patients HLA-B27 positifs que chez les patients HLA-B27 négatifs (Jaakkola, 2006). Elles se manifestent deux fois plus souvent chez l'homme que chez la femme, avec une prévalence dans la population française estimée à 0,43% (Costantino et al., 2015a).

Parmi les manifestations extra-articulaires, l'uvéite est la plus fréquente dans la SA, survenant chez près d'un tiers des patients. Chez la majorité des patients, l'uvéite est aiguë, antérieure et unilatérale et se manifeste par une douleur, une photosensibilité et une vision floue.

## **B. Outils d'évaluation dans les SpA**

Plusieurs outils d'évaluation de l'activité et du retentissement fonctionnel des SpA sont utilisés, notamment le Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) (Garrett et al., 1994) ou le Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score (ASDAS) (Machado et al., 2011). Ces deux indicateurs font intervenir plusieurs paramètres rapportés par le patient en une mesure unique d'interprétation qui déterminera l'activité de la maladie. L'ASDAS, à différence du BASDAI, prend en compte, en plus du ressenti du patient, un paramètre biologique de phase aiguë, la protéine C-réactive (CRP).

### **C. Etiologie des SpA**

L'étiologie des SpA est inconnue, néanmoins une forte association avec le gène HLA-B27 est bien établie depuis plusieurs décennies (Schlosstein et al., 1973), puisque 80 % des patients atteints de SpA sont porteurs du HLA-B27. En revanche, seulement 1 à 5 % des individus porteurs du gène HLA-B27 développent une SpA (Brown et al., 2020). Outre HLA-B27, les polymorphismes de deux autres gènes ont été associés à l'axSpA : ERAP (Endoplasmic Reticulum AminoPeptidase) qui code pour une aminopeptidase exprimée dans le réticulum endoplasmique (Costantino et al., 2015b) et le récepteur de l'interleukine-23 (IL-23R) qui active les lymphocytes Teff sécrétant l'IL-17 mais aussi d'autres cellules pro-inflammatoires (Kadi et al., 2013a; The Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC), 2010). Le microbiote humain représente lui aussi un facteur interne de prédisposition aux SpA (Asquith et al., 2014). Par exemple, les infections bactériennes génito-urinaires à Chlamydia, ou une entérite causée par des entérobactéries gram-négatives telles que Salmonella, Yersinia, Shigella et Campylobacter, ainsi que l'inflammation chronique de l'intestin, ont été associées à un risque important de développer une SpA (Carter et al., 2009; Costello et al., 2013).

### **D. Physiopathologie des SpA**

La pathogénie exacte des SpA est encore inconnue. Toutefois, il est bien établi que le HLA-B27 confère un risque important de développer la maladie. De ce fait, un certain nombre d'hypothèses ont été émises pour expliquer l'induction de la maladie par HLA-B27.

HLA-B27 est constitué d'une chaîne alpha codée dans le locus B de la région du CMH sur le chromosome 6 et d'une chaîne bêta non codée par le CMH, la  $\beta$ 2-microglobuline. La fonction physiologique de HLA-B27 en association avec la  $\beta$ 2-microglobuline est de présenter des peptides antigéniques aux récepteurs des lymphocytes T (TCR) cytotoxiques.

Le HLA B-27 présente un polymorphisme important et ce nombre élevé de polymorphismes, en combinaison avec l'hétérozygotie, confère un avantage sélectif au système immunitaire contre la diversité des micro-organismes et de leurs antigènes. Cependant, le polymorphisme extrême et les mutations potentielles du CMH augmentent le risque de développer des maladies auto-immunes (McGonagle et al., 2015). En effet, les molécules HLA-B27 associées à la SpA (HLA-B\*27:05) ne diffèrent des molécules HLA-B27 non associées à la SpA (HLA-

B\*27:06 et HLA-B\*27:09) que sur quelques résidus d'acides aminés (résidus 114 et 116 de la chaîne lourde) (Guiliano et al., 2017). En revanche, ces résidus d'acides aminés sont tous situés dans la poche de liaison du peptide antigénique, ainsi cette différence d'acides aminés peut induire des changements de conformation dans cette poche et modifier en l'occurrence la présentation antigénique (Guiliano et al., 2017; Ostermeir et al., 2015). Le fait que la SpA soit génétiquement liée à des polymorphismes de nucléotides impliqués dans la présentation des peptides antigéniques sur les lymphocytes T, évoque une maladie dirigée par les lymphocytes T CD8, bien qu'un antigène en particulier à l'origine de la maladie n'ait pas été identifié (McGonagle et al., 2015). Une théorie propose que des peptides antigéniques dérivés de certaines protéines bactériennes seraient à l'origine d'une réactivité croisée avec les peptides présents dans les articulations ou avec les peptides dérivés du HLA-B27 (mimétisme moléculaire), conduisant à une inflammation médiée par les LT CD8 contre les cellules du soi (Oldstone, 1989; Ramos et al., 2002).

La seconde hypothèse soutient une tendance à un mauvais repliement du HLA-B27, déclenchant la production de cytokines telles que l'IL-17 et IL-23. Les molécules HLA-B27 mal repliées s'accumulent dans le réticulum endoplasmique (RE), où elles induisent une réponse au stress qui conduit à une réponse aux protéines non repliées (UPR) et à l'autophagie (Colbert et al., 2010). La régulation positive des gènes UPR active ensuite la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF $\alpha$ , l'IL-17, l'IL-23 et l'IFN- $\gamma$  (DeLay et al., 2009; McGeachy et al., 2009) associées à la destruction osseuse et à la synovite. Les lésions osseuses structurelles provoquent la stimulation des mécanismes de réparation qui impliquent l'ostéoprolifération, conduisant à l'ankylose osseuse du rachis, caractéristique des SpA et principale cause de la perte de capacité fonctionnelle.

Outre HLA-B27, le gène présentant la deuxième plus forte association avec la SpA est ERAP1 (Kadi et al., 2013b). Dans le réticulum endoplasmique, cette amino-peptidase clive les protéines, y compris celles présentées par HLA-B27, afin d'obtenir des peptides de taille optimale nécessaires à la présentation antigénique par le CMH de type 1 aux cellules immunitaires effectrices. La perte d'allèles fonctionnels de ERAP1 a un impact considérable sur la fonction de l'enzyme et sur l'expression des différentes formes de HLA-B27 à la surface des cellules présentatrices d'antigène, ce qui peut avoir un impact sur la pathogenèse de la SpA (Babaie et al., 2020).



Ainsi, les réponses immunitaires auraient un rôle important dans la SpA. Un des principaux axes implique l'activation de la voie IL-23/Th17. En effet, il a été montré qu'il existe une expansion importante des Th17 dans le modèle expérimental de SpA chez le modèle de rat B27 (Glatigny et al., 2012). Dans une autre étude, il a été montré que les lymphocytes T CD3<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> résidant dans l'enthèse, qui expriment le facteur de transcription ROR $\gamma$ T et l'IL-23R répondent à l'IL-23 en produisant de l'IL-17 et d'autres cytokines pro-inflammatoires à l'origine d'une enthésite périphérique et axiale, ce qui relie la voie IL-23/IL-17 au phénotype de la spondyloarthrite (Sherlock et al., 2012). D'autres études ont montré chez les patients atteints de SpA une expansion des Th17 dans le sang périphérique (Shen et al., 2009) ainsi que des concentrations significativement plus élevées d'IL-17 et d'IL-23 dans le sérum des patients comparé aux témoins sains (Mei et al., 2011).

A ce jour, le rôle des Treg dans la pathogénie de la SpA a été moins bien caractérisé que dans la PR, toutefois certaines études ont montré une altération fonctionnelle des Treg dans cette maladie (Guo et al., 2016).

## **E. Traitements des SpA**

Les objectifs du traitement de la SpA comprennent la réduction des symptômes, l'amélioration et le maintien de la mobilité de la colonne vertébrale et d'une posture normale et la diminution des complications associées à la maladie.

Les directives actuelles recommandent pour les patients présentant une manifestation axiale active, l'administration d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) à la dose maximale tolérée comme traitement de première intention. En cas d'échec de la réponse à deux AINS différents après 4 semaines au total, un bDMARD (DMARD biologique) doit être envisagé (van der Heijde et al., 2017). Les bDMARDs peuvent être soit un inhibiteur du TNF $\alpha$  ou un inhibiteur de l'IL-17. En effet, la découverte de la surexpression du TNF $\alpha$  dans les articulations sacro-iliaques (Sveaas et al., 2015) des patients atteints d'axSpA a justifié l'utilisation d'inhibiteurs du TNF $\alpha$ , qui sont très efficaces dans le traitement de la maladie. Cinq anti-TNF $\alpha$  sont actuellement disponibles pour le traitement des SpA : l'adalimumab, le certolizumab pegol, l'étanercept, le golimumab et l'infliximab.

Par ailleurs, une meilleure compréhension de l'axe IL-23/IL-17 dans la pathogénèse de la SpA a conduit à l'ouverture d'une nouvelle voie de traitement pour les sujets atteints de

SpA. Les traitements actuellement approuvés ciblant l'IL-17 sont le sécukinumab, un anticorps monoclonal entièrement humanisé anti-IL-17 A et F (Baeten et al., 2015) et l'ixekizumab, un anticorps monoclonal spécifique pour l'IL-17A (Deodhar et al., 2019).

Il existe aussi des traitements ciblant l'IL-23, soit par ciblage de la protéine p40, commune entre l'IL-23 et l'IL-12 (ustékinumab), ou de la protéine p19 spécifique à l'IL-23 (guselkumab, risankizumab). De façon intéressante, ces traitements ne sont pas efficaces sur l'atteinte axiale des SpA et ils sont actuellement approuvés uniquement pour traiter les atteintes articulaires et enthésistiques périphériques des SpA associés au psoriasis (rhumatisme psoriasique).

Enfin, les inhibiteurs de JAK sont aussi une option thérapeutique pour la SpA. L'upadacitinib (inhibiteur sélectif de JAK-1) est approuvé pour le traitement de l'axSpA et du rhumatisme psoriasique et le tofacitinib (inhibiteur de JAK-1 et 3, moins de JAK2) a complété les études de phase 3 dans ces mêmes indications. Leur mécanisme d'action exact dans la SpA n'est pas encore tout à fait clair mais il est probable qu'il implique l'axe IL-23/IL-17 dans lequel plusieurs cytokines clés exercent leur fonction via la voie JAK-STAT (Fragoulis et al., 2019).

## Les Lymphocytes T régulateurs (Treg)

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont les gardiens de l'homéostasie immunitaire, ils maintiennent la tolérance vis-à-vis des antigènes du soi. Leur capacité immunosuppressive a été décrite pour la première fois en 1970 (Gershon and Kondo, 1970), ces cellules sont alors appelées lymphocytes T suppresseurs. En 1995 Sakaguchi a identifié le CD25 (chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2) comme marqueur spécifique de cette population immuno-régulatrice chez la souris (Sakaguchi et al., 1995) et le terme "cellule T régulatrice" a remplacé celui de "cellule T suppressive" dans la littérature immunologique.

A ce stade, les Treg sont définis comme double positifs aux marqueurs  $CD4^+CD25^+$ . Plus tard, dans les années 2000, une population ayant des propriétés phénotypiques et fonctionnelles identiques a été définie par plusieurs équipes chez l'humain (Dieckmann et al., 2001; Jonuleit et al., 2001; Levings et al., 2001a). Durant cette même période, il a été découvert que les Treg  $CD4^+CD25^+$  expriment spécifiquement le facteur de transcription FoxP3, qui joue un rôle majeur dans leur développement et leur fonction (Fontenot et al., 2003). Les Treg sont ainsi définis par l'expression de FoxP3 et leur importance dans le maintien de la tolérance a été établie.

En plus de ces lymphocytes T régulateurs conventionnels  $FoxP3^+$ , il existe un certain nombre de leucocytes régulant le système immunitaire, parmi elles : les lymphocytes B régulateurs (Breg) (Mauri and Menon, 2017), les cellules lymphoïdes innées régulatrices (ILCreg) (Wang et al., 2017), les lymphocytes T régulateurs de type 1 (Tr1) (Zeng et al., 2015) et les lymphocytes T régulateurs Th3 (Weiner, 2001).

### A. Génération des lymphocytes T régulateurs

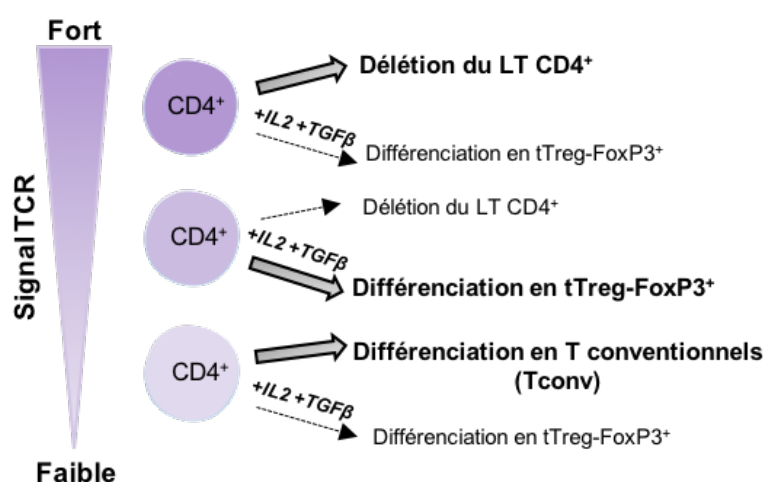
Il existe trois types de Treg, les Treg thymiques (tTreg), les Treg périphériques (pTreg) et les Treg induit *in vitro* (iTreg). Alors que les tTreg sont générés naturellement dans le thymus, les pTreg sont quant à eux générés en périphérie à partir de lymphocytes T CD4 naïfs ( $CD4^+FoxP3^-$ ) (Abbas et al., 2013). Ces pTreg se différencient en présence d'une cellule présentatrice d'antigène, dans un environnement cytokinique particulier (Apostolou and von Boehmer, 2004). Enfin, l'induction *in vitro* d'iTreg à partir de lymphocytes T CD4 naïfs repose sur l'activation des lymphocytes T en présence de cytokines nécessaires à la différenciation

des pTreg *in vivo*, le TGF $\beta$  (Chen et al., 2003) et l'IL-2 (Davidson et al., 2007).

### a. Génération des Treg thymiques (tTreg)

Le thymus est le site de développement et de maturation des lymphocytes T et par conséquent le lieu d'acquisition de la tolérance au soi. Par la jonction cortico-médullaire, les progéniteurs des lymphocytes T arrivant de la moelle osseuse entrent dans le thymus où ils subissent un processus de sélection et de différenciation en cellules matures prêtes à migrer dans les organes lymphoïdes secondaires.

Deux étapes de sélection sont à l'origine de la différenciation et de la maturation des lymphocytes T dans le thymus. La sélection négative qui survient en premier lieu et qui permet l'élimination des lymphocytes T possédants un TCR auto-réactif et la sélection positive qui permet de conserver les LT qui reconnaissent les molécules du CMH du soi présentées par les cellules épithéliales thymiques. La durée et l'intensité de stimulation du TCR sont des éléments centraux de la détermination du devenir de ces cellules. Le lymphocyte T en développement, dont le TCR a une affinité intermédiaire pour le complexe auto-antigène/CMH présenté par les cellules épithéliales thymiques, est dirigé vers une différenciation en Treg. Le lymphocyte T dont le TCR a une très forte interaction avec le complexe auto-antigène/CMH du soi, est considéré comme auto-réactif et est donc éliminé. Enfin un LT en développement dont le TCR présente une faible affinité pour le complexe auto-antigène/CMH se différencie en une cellule T conventionnelle (Tconv) naïve.



**Figure 8 : Rôle du TCR dans la génération des Treg thymiques, adaptée de Josefowicz et al., 2012**

Les thymocytes immatures CD4 simple positif (SP) reçoivent des signaux TCR d'intensité variable via des interactions avec le complexe peptide-CMH sur les cellules présentatrices d'antigènes. L'intensité et la durée de

la stimulation du TCR déterminent le devenir des thymocytes CD4 SP. Un signal TCR de forte intensité induit la délétion des CD4<sup>+</sup> par apoptose. Les CD4 SP recevant un signal TCR d'intensité intermédiaire sont capables d'échapper à la délétion et sont dirigés vers une différenciation Treg en présence d'un signal médié par les cytokines dont principalement l'IL-2 et le TGFβ. Enfin, les CD4 SP recevant un signal TCR de faible intensité sont dirigés vers une différenciation Tconv. *SP : simple positif ; tTreg : lymphocytes T régulateur thymique ; Tconv : lymphocyte T conventionnel.*

Les caractéristiques majeures des Treg thymiques sont non seulement la sélection positive induite par l'interaction avec l'auto-antigène/CMH thymique, mais aussi leur différenciation en cellules suppressives fonctionnellement compétentes et spécifiques de l'antigène dans le thymus. L'importance de la stimulation TCR dans le développement des tTreg a été montrée par l'expression des marqueurs d'activation tels que le CD25, CD5 et CTLA-4, qui sont tous dépendants de cette stimulation (Itoh et al., 1999). Par ailleurs, en périphérie, grâce à leur répertoire TCR, les tTreg sont activées à des concentrations beaucoup plus faibles du complexe peptide/CMH nécessaires pour activer les Tconv naïfs reconnaissant le même complexe peptide/CMH. Cette activation, rapide et sensible aux antigènes, assure une tolérance au soi dominante dépendante des Treg lors de l'exposition à des auto-antigènes libérés par des tissus endommagés.

Au cours du développement des tTreg, les super-enhancer (SE) associés aux gènes de signature de ces cellules tels que *foxp3*, *IL-2ra* (*cd25*), *ctla4*, *Ikzf2* (Helios) et *Ifzf4* (Eos), sont progressivement activés à partir du stade précurseur de lymphocyte T jusqu'à l'expression de FoxP3 (Kitagawa et al., 2017). L'activation de ces SE est dépendante du facteur Satb1 (Special AT-rich sequence-binding protein 1), qui est induit en réponse à la stimulation du TCR (Gottimukkala et al., 2016). Satb1 est cruciale pour la différenciation des Treg dans le thymus, il se lie à des sites spécifiques du génome dès le stade des thymocytes double positifs CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> pour ouvrir la chromatine et activer les SE. Il a notamment été montré que sa dérégulation est à l'origine de maladies auto-immunes. Ces résultats appuient d'autant plus l'importance du signal du TCR, en fonction de son intensité et de sa durée, dans le développement des tTreg (Kitagawa et al., 2017).

En plus de la stimulation du TCR, le développement des tTreg implique deux autres signaux : un signal de co-stimulation dépendant de l'interaction du CD28 avec les ligands CD80/86 et un signal médié par les cytokines dont principalement l'IL-2. En effet, l'interaction du CD28 exprimé par les lymphocytes T avec les ligands CD80/86 à la surface des CPA est essentielle pour le développement des Treg dans le thymus. Ceci a été mis en évidence pour la première

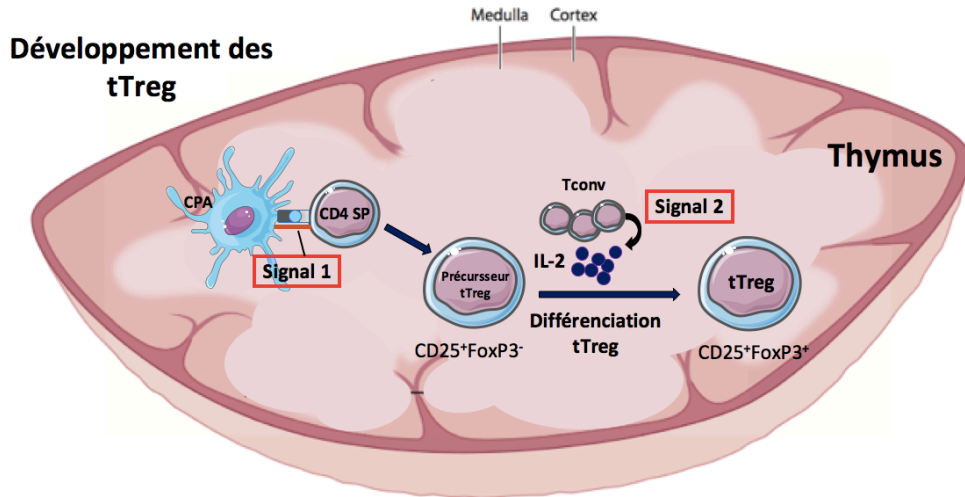
fois par l'équipe de Salomon qui a montré que les souris NOD déficientes en CD28 ou CD80/86 présentent un défaut quantitatif de Treg dans le thymus et en périphérie, se traduisant par une exacerbation du diabète chez ces souris (Salomon et al., 2000).

Outre la reconnaissance du complexe auto-antigène/CMH et des ligands CD80/86, un troisième signal impliquant l'IL-2 est nécessaire pour la différenciation des tTreg. En effet, il a été montré que la neutralisation de l'IL-2 par des anticorps monoclonaux a induit une diminution de la fréquence de Treg dans le thymus et en périphérie (Fontenot et al., 2005). Les mécanismes par lesquels l'IL-2 conduit à la différenciation des tTreg font intervenir le facteur de transcription STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5). L'activation de STAT5 est dépendante de l'IL-2 et conduit à l'expression de FoxP3 dans les Treg. En effet, il a été montré qu'en l'absence de STAT5, le nombre des tTreg est réduit (Burchill et al., 2007a) alors que l'expression constitutive de la forme activée de STAT5 l'augmente (Burchill et al., 2008), montrant ainsi le rôle crucial de ce facteur de transcription dans la transduction du signal dépendant de l'IL-2 qui conduit à la différenciation des Treg.

Une autre cytokine jouant un rôle dans la différenciation des tTreg est le TGF $\beta$ . Le TGF $\beta$  favorise la survie des tTreg en développement en inhibant l'apoptose dépendante de la protéine Bim (Ouyang et al., 2010a), leur conférant ainsi une résistance à la délétion clonale induite par la sélection négative des lymphocytes T.

Enfin, d'autres voies de signalisation impliquant les membres de la superfamille des récepteurs du TNF (TNF $\alpha$  Receptor Super Family, TNFRSF) tels que le GITR (Glycoprotein A Repeating Predominant), OX40 ou TNFR2 ont été suggérées comme jouant un rôle dans la différenciation des tTreg. Ces voies de signalisation augmentent la réactivité aux cytokines, facilitant ainsi la différenciation des Treg dans le thymus (Mahmud et al., 2014).

Finalement, la différenciation des Treg dans le thymus est un processus en deux grandes étapes. Premièrement, des signaux dépendants du TCR et du CD28 entraînent la différenciation en « Treg intermédiaires » caractérisés par l'expression du CD25 mais pas de FoxP3 (CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup>). Deuxièmement le signal cytokinique impliquant l'IL-2 va permettre le passage à un phénotype de Treg mature co-exprimant le CD25 et FoxP3 (CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>).



**Figure 9 : Génération des Treg dans le thymus.**

La différenciation des tTreg dépend de deux signaux majeurs : le signal 1, dépendant de l'activation du TCR, aboutit à la génération des précurseurs des tTreg exprimant le CD25. Le signal 2, dépendant des cytokines aboutit à la génération des tTreg FoxP3<sup>+</sup>. SP : simple positif ; tTreg : lymphocyte T régulateur thymique ; CPA : cellule présentatrice d'antigène.

#### **b. Génération des Treg périphériques (pTreg)**

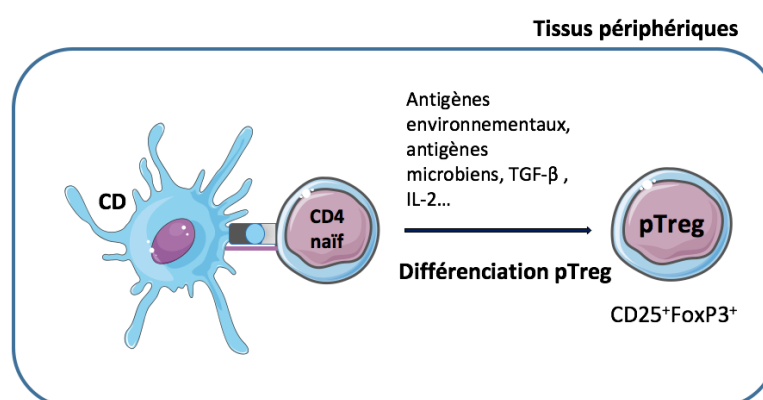
Les lymphocytes T régulateurs périphériques « pTreg » ont été décrits pour la première fois en 2004 dans l'étude au cours de laquelle des lymphocytes T régulateurs ont pu être isolés à partir de souris présentant une lymphopénie ayant reçu, par transfert intraveineux, des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (Curotto de Lafaille et al., 2004). Ainsi, contrairement aux tTreg, les pTreg sont générés dans des sites extra-thymiques à partir de lymphocytes T CD4 naïfs (Th0). La deuxième différence entre ces deux populations cellulaires implique la nature de la stimulation TCR à l'origine de leur différenciation. En effet, les tTreg se différencient suite à l'interaction de leur TCR avec le complexe auto-antigène/CMHII alors que les pTreg présentent un TCR qui reconnaît des peptides exogènes (Gottschalk et al., 2010). Il a été montré que les TCR qui reconnaissent des antigènes auxquels l'organisme est exposé de manière chronique dans des conditions homéostatiques et non inflammatoires, par exemple les antigènes de la flore intestinale commensale ou encore les antigènes environnementaux, peuvent favoriser la différenciation des pTreg dans les organes ou tissus lymphoïdes secondaires. En effet, dans la muqueuse intestinale, les GALT (Gut-Associated Lymphoid tissues) ou encore les plaques de Peyer favorisent la génération des pTreg. Ceci est en grande partie due à la présence des cellules dendritiques présentatrices d'antigène CD103<sup>+</sup> et à leur capacité à produire une grande quantité de TGFβ et d'acide rétinoïque (Coombes et al., 2007). Ainsi il a été ainsi suggéré que les tTreg sont impliqués dans la tolérance au soi, alors

que les pTreg ont un rôle dans la tolérance acquise.

L'identification de marqueurs permettant de distinguer les Treg d'origine thymique et extrathymique a suscité beaucoup d'intérêt mais reste toutefois controversée. Les premières études ont mis en évidence deux facteurs pouvant être utilisés pour la caractérisation phénotypique des tTreg, le facteur de transcription Helios (Thornton et al., 2010) et le récepteur Neuropilin-1 (Yadav et al., 2012). Cependant des études ultérieures ont démontré que ces marqueurs peuvent également être exprimés par les pTreg ou par les Treg différenciés *in vitro* « iTreg » (Szurek et al., 2015).

En plus de la stimulation du TCR, l'induction de l'expression de Foxp3 dans les pTreg nécessite une signalisation médiée par la cytokine TGF $\beta$  (Chen et al., 2003). De plus, comme dans les tTreg, l'IL-2 joue également un rôle important dans la différenciation des pTreg. En plus de son rôle dans l'induction de l'expression de FoxP3 dépendante de pSTAT5, la survie et la prolifération cellulaire en présence de TGF $\beta$ , l'IL-2 empêche la différenciation des Th0 en Th17 (Laurence et al., 2007). En effet, le TGF $\beta$  en synergie avec l'IL-6 induit la différenciation des Th17 en périphérie, or cette même cytokine est essentielle à l'induction des pTreg. Ainsi, l'IL-2 favorise la voie de différenciation des pTreg induite par le TGF $\beta$  en activant pSTAT5 qui possède un rôle inhibiteur sur l'expression de ROR $\gamma$ T.

Enfin, l'IL-2 est également nécessaire à l'induction de Foxp3 par le TGF $\beta$  dans les lymphocytes T régulateurs induits *in vitro* « iTreg » (Davidson et al., 2007).



**Figure 10 : Génération des Treg dans les tissus périphériques, adapté de Lee and Lee, 2018.**

Les pTreg se développent en périphérie à partir de lymphocytes T CD4 naïfs après activation par des antigènes environnementaux tels que les antigènes microbiens présentés par les cellules dendritiques (CD) résidant dans les tissus périphérique (muqueuses). Le TGF- $\beta$  et l'IL-2 favorisent, et sont essentiels au développement des Treg dans les tissus périphériques. CD : cellule dendritique ; pTreg : lymphocyte T régulateur périphérique ; TGF-  $\beta$  : Transforming Growth Factor  $\beta$ .



## **B. Autres cellules régulatrices**

### **a. Les cellules régulatrices Tr1 et Th3**

Les Tr1 sont des lymphocytes T CD4 régulateurs induits en périphérie, qui contrairement aux Treg conventionnels FoxP3<sup>+</sup>, n'expriment pas de manière constitutive le facteur de transcription FoxP3 (Vieira et al., 2004). L'absence de FoxP3 n'altère cependant pas leur capacité immunosuppressive ni leur développement. En effet il a été montré que des Tr1 fonctionnellement actifs peuvent être générées *in vitro* à partir de lymphocytes T CD4 isolés de patients atteints du syndrome IPEX (Immunodérégulation, Polyendocrinopathie, Entéropathie auto-immune lié au chromosome X), qui sont porteurs d'une mutation du gène de FoxP3 (Passerini et al., 2011). De plus, les Tr1 se distinguent des Treg conventionnels par leur profil de sécrétion de cytokines. En effet, ces cellules sont caractérisées par la production de niveaux élevés d'IL-10 et de TGFβ. Ils sont induits *in vivo* en présence d'IL-10 et d'IL-27 (Awasthi et al., 2007; Groux et al., 1997) et peuvent être induits *in vitro* par stimulation TCR en présence d'une forte concentration d'IL-10. De plus, l'IFNα en synergie avec l'IL-10 favoriserait d'autant plus la différenciation des Tr1 *in vitro* (Levings et al., 2001b). Finalement, en plus de son rôle de suppression, l'IL-10 est le principal acteur d'une boucle de rétroaction positive à l'origine de l'induction et de la prolifération des Tr1. Les Tr1 se distinguent également des Treg FoxP3<sup>+</sup> par leur activité immunosuppressive. En effet il a été montré que les Tr1 suppriment l'activation de l'inflammasome par un mécanisme dépendant de l'IL-10 ce qui n'est pas le cas des Treg FoxP3<sup>+</sup> (Yao et al., 2015).

Par ailleurs, une autre population de lymphocytes T CD8 de type Tr1 producteurs d'IL-10 a également été identifiée. Comme les Tr1 CD4<sup>+</sup>, l'induction de ces cellules est dépendante de l'IL-10 et leur fonction suppressive est médiée par cette même cytokine (Gilliet and Liu, 2002).

Les Th3 ont été décrits pour la première fois en 1994, ils ont été qualifiés de lymphocytes T régulateurs producteurs de TGFβ (Chen et al., 1994). Comme les Tr1, les Th3 n'expriment pas FoxP3. Ils sont induits en périphérie à partir des lymphocytes T CD4 naïfs après l'ingestion d'un antigène par voie orale. Il a été montré que les Th3 spécifiques de l'Ag jouent un rôle crucial dans l'induction et le maintien de la tolérance périphérique en favorisant la différenciation des Treg Foxp3<sup>+</sup> spécifiques de l'antigène (Carrier et al., 2007).

Les Th3 exercent leur activité immunosuppressive par des mécanismes indépendants du

contact et principalement par la sécrétion du TGF $\beta$ . De plus, ces cellules contribuent également à la sécrétion d'IgA et suppriment l'activité des Th1 et Th2 (Fukaura et al., 1996).

#### **b. Les cellules régulatrices CD8**

Les lymphocytes T CD8 sont aussi capables d'exprimer FoxP3 et d'autres marqueurs des Treg conventionnels tels que le CD25, le CTLA-4 et le GITR (Robb et al., 2012). Ces lymphocytes T CD8 régulateurs induisent la suppression des lymphocytes T CD4 par des mécanismes principalement dépendants du contact cellulaire (Mahic et al., 2008). Par ailleurs il a été montré par Cone et al. que les Treg CD8<sup>+</sup> sont limités à la reconnaissance par leur TCR de la molécule Qa-1 du CMH de classe IB, qui est généralement exprimée par les lymphocytes T CD4 activés, les cellules dendritiques et les lymphocytes B (Cone et al., 2009).

#### **C. Le facteur de transcription FoxP3**

FoxP3 est le facteur de transcription caractéristique des lymphocytes T régulateurs, à l'origine de l'établissement et du maintien du phénotype immunosuppresseur de ces cellules ainsi que de leur développement. Il est principalement localisé dans le noyau et se lie à plus de 700 gènes qui sont impliqués dans divers programmes cellulaires, y compris la signalisation TCR, la communication cellulaire et la régulation transcriptionnelle (Lopes et al., 2006). Foxp3 joue un rôle essentiel en tant qu'activateur et répresseur transcriptionnel, et la régulation médiée par ce dernier est dépendante aussi de son association avec d'autres facteurs de transcription (Zheng et al., 2007). L'importance du facteur de transcription FoxP3 dans la génération et la fonction des Treg a été démontrée par le développement du syndrome lymphoprolifératif chez les souris Scurfy déficientes en FoxP3 (Brunkow et al., 2001) ou encore par le développement du syndrome IPEX chez les patients porteurs d'une mutation du gène de FoxP3 (Bennett et al., 2001).

Structurellement, FoxP3 contient trois domaines principaux : un domaine N-terminal riche en proline (1-97 aa) responsable de l'activation et de la répression transcriptionnelle. Un domaine central composé d'un doigt de zinc et d'une glissière à leucine (98-260 aa) impliquée dans la formation d'oligomères ou l'association avec d'autres facteurs. Et enfin un domaine C-terminal conservé « *Forkhead Domain* » (337-423 aa) responsable de la liaison à l'ADN. Ces domaines fonctionnent ensemble pour réguler l'activité de FoxP3 (Hancock and Ozkaynak, 2009).

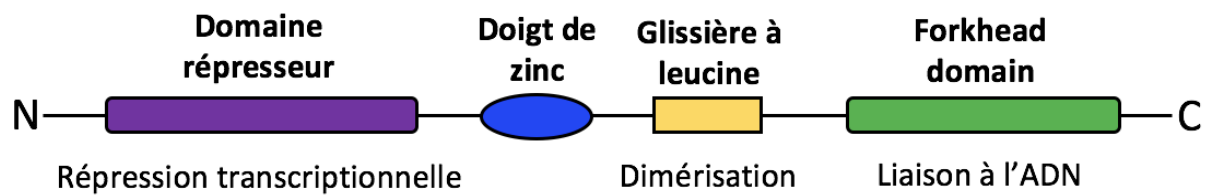


Figure 11 : Structure du facteur de transcription FoxP3, adapté de von Knethen et al., 2020.

➤ [Le gène foxp3](#)

Chez l'humain, le gène foxp3 est situé sur le bras p du chromosome X (Bennett et al., 2000). Il comprend 11 exons qui présentent un degré élevé de conservation entre l'humain et la souris (Brunkow et al., 2001). Il est sous le contrôle d'un promoteur et de plusieurs régions non codantes conservées (Conserved Non coding DNA Sequences :CNS) (CNS-0, CNS-1, CNS-2 et CNS-3).

En réponse à une stimulation TCR, les facteurs de transcription NFAT (Nuclear Factor Activated T cells) et AP-1 (Activated Protein 1) se fixent sur le promoteur de FoxP3 et l'activent. Toutefois, l'initiation de la transcription de FoxP3 ne dépend pas uniquement de l'activation de son promoteur, mais aussi des régions activatrices CNS présentes dans le gène. Ces séquences CNS, servent de sites de fixation pour les facteurs de transcription, indispensables à l'initiation et au maintien de la transcription de FoxP3 tels que FOXO1, FOXO3, CREB (C-AMP Response Element-binding protein) et ATF-1 (Activating Transcription Factor 1) (Kim and Leonard, 2007; Ouyang et al., 2010b).

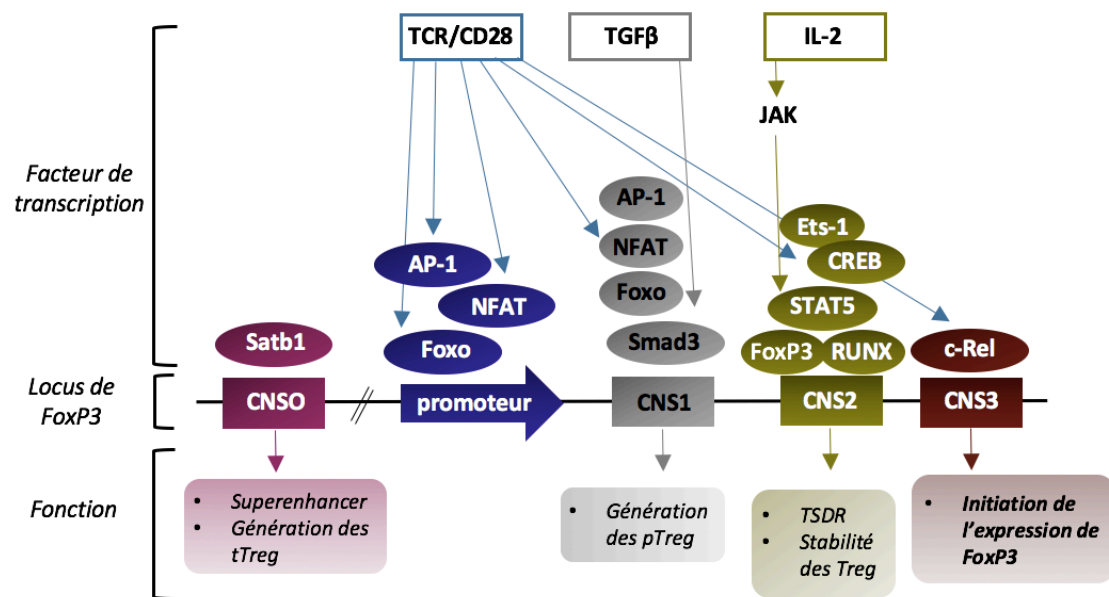
En partant de 5', on retrouve la première séquence non codante conservée (**CNS-0**) (Kitagawa et al., 2017) qui est le site de liaison de Satb1, un super-enhancer récemment identifié qui permet l'induction de la différenciation des tTreg (Gottimukkala et al., 2016). Après CNS-0, on retrouve la région promotrice et trois autres CNS (CNS-1-3). **CNS-1**, situé dans l'intron 1, est associé à l'expression de FoxP3 induite par la voie de signalisation TGFβ/Smad dans les pTreg (Schlenner et al., 2012). En utilisant des souris transgéniques déficientes en CNS-1, Rudensky et al. a démontré une altération dans l'induction des pTreg chez ces souris (Zheng et al., 2010). Toutefois, ces souris n'ont pas développé de maladies auto-immunes, ce qui indique que CNS-1 possède un rôle crucial dans l'induction des pTreg mais pas des tTreg. En accord avec cela, une étude récente de Holohan et al. a évalué la déficience de CNS-1 sur un fond NOD et n'a révélé aucun changement dans l'incidence du diabète et le moment de son apparition chez ces souris (Holohan et al., 2019).

La séquence **CNS-2**, également située dans l'intron 1, est nécessaire au maintien de l'expression de FoxP3 pendant les divisions cellulaires. La liaison de Foxp3 lui-même au CNS-2 est importante pour établir une expression stable de ce dernier dans les Treg et dépend de la déméthylation du CNS-2 (Zheng et al., 2010). En effet, le CNS-2 contient un élément riche en îlot CpG hypométhylé, appelé région déméthylée spécifique des Treg (Treg-Specific Demethylated Region : TSDR) (Polansky et al., 2008). Lors de la différenciation des Treg, cette région TSDR est déméthylée ce qui se traduit par une accessibilité à la chromatine dans le locus de foxp3 (Toker et al., 2013). En effet, l'hypométhylation du TSDR permet la fixation à la séquence CNS-2 de FoxP3 lui-même ainsi que de plusieurs facteurs, notamment REL, CREB-ATF1, RUNX1 et STAT5 qui interviennent dans le maintien et la stabilité de l'expression de FoxP3 dans les Treg (Kim and Leonard, 2007; Zheng et al., 2010). De plus, il a été montré qu'une délétion de la région CNS-2 chez des souris transgéniques entraîne une perte de l'expression de Foxp3 pendant l'expansion des Treg et résulte en une instabilité de ces derniers (Feng et al., 2014). Par ailleurs, il a été montré que les iTreg qui sont moins stables que les Treg *in vivo* en termes d'expression de FoxP3 et d'activité suppressive présentent un niveau de méthylation du TSDR plus élevé que celui des tTreg ou pTreg (Polansky et al., 2008). En revanche, les pTreg et les tTreg possèdent un profil épigénétique proche (Ohkura et al., 2012). Ainsi, ces observations mettent en avant le rôle important du statut de méthylation du TSDR dans le maintien de l'expression de FoxP3 et en l'occurrence dans la stabilité des lymphocytes T régulateurs (Wang et al., 2013).

Le maintien du profil déméthylé du CNS-2 dépend d'une déméthylase : TET1 (Ten-Eleven Translocation 1). Le recrutement de cette déméthylase au niveau du CNS-2 est assuré par une protéine, appelée MBD2 (methyl-CpG-binding protein 2). Wang et al. ont mis en évidence un défaut de maintien de l'hypométhylation du CNS-2 dans les Treg, associé à une diminution de leur nombre et de leur fonction chez des souris déficientes en MBD2 (Wang et al., 2013). A l'inverse, la DNMT1 (DNA méthyltransférase-1) a un rôle antagoniste à TET, en favorisant la méthylation du CNS-2 (Yue et al., 2016). Par ailleurs, il a été montré que l'action de ces enzymes était sous l'influence de cytokines, l'IL-6 stimule le recrutement de la DNMT1 au niveau du CNS-2, induisant ainsi la méthylation du TSDR et cette méthylation est contrée par l'IL-2 qui stimule le recrutement de la TET (Nair, Varun Sasidharan et al., 2016). Ainsi, le statut

de méthylation du CNS-2 est régulé par un équilibre entre TET et DNMT qui influencent la stabilité épigénétique de l'expression de Foxp3 dans les Treg.

Enfin, le **CNS-3** est localisé dans l'intron 3 et est appelé : élément pionnier de Foxp3. En réponse à la liaison au facteur de transcription c-Rel, il agit pour initier et augmenter l'expression de FoxP3 dans les Treg générés dans le thymus et en périphérie (Feng et al., 2015).



**Figure 12 : Structure et régulation transcriptionnelle du gène foxp3, adapté de von Knethen et al., 2020; Lee and Lee, 2018.**

#### **D. La fonction des lymphocytes T régulateurs**

Les avancés scientifiques au cours des 50 dernières années ont clairement établi que les Treg exprimant FoxP3 dans le noyau et CD25 à leur surface sont activement engagés dans la régulation des réponses immunitaires dirigées contre les antigènes du soi, microbiens et environnementaux. Plusieurs études ont notamment montré qu'un défaut quantitatif ou qualitatif des Treg peut être à l'origine de diverses maladies immunologiques telles que les maladies auto-immunes et les allergies (Akbari, 2003). En dehors d'un contexte immuno-pathologique, les Treg FoxP3<sup>+</sup> jouent un rôle clé dans les conditions physiologiques, par exemple dans la tolérance fœto-maternelle (Aluvihare et al., 2004) et au cours de la régénération tissulaire (Dombrowski et al., 2017).

Plusieurs mécanismes ont été décrits pour la suppression médiée par les Treg, qui peuvent être dépendants du contact cellulaire, ou médiés par des cytokines immuno-

modulatrices. Ces mécanismes impliquent diverses molécules, par exemple des molécules de surface telles que CTLA-4, CD25, TIGIT, CD39 et CD73, des cytokines telles que l'IL-2, l'IL-10, le TGF $\beta$  et l'IL-35 et des molécules sécrétées ou intracellulaires telles que la Granzyme, l'AMP cyclique (cAMP) et IDO (Indolamine 2, 3 DiOxygenase).

#### **a. Perturbation du métabolisme des cellules cibles**

Les lymphocytes T régulateurs activés produisent peu d'IL-2, en raison de la répression transcriptionnelle du gène de l'IL-2 induite par FoxP3, en conséquent ils dépendent en grande partie de l'IL-2 exogène pour leur survie (Setoguchi et al., 2005). De ce fait, les Treg expriment de manière constitutive, des niveaux élevés de CD25, chaîne alpha du récepteur à l'IL-2. Le récepteur à l'IL-2 est formé de trois sous unités : chaîne alpha (CD25), chaîne beta (CD122) et chaîne gamma (CD132). Les chaînes beta et gamma vont permettre la transduction du signal intracellulaire, or, le CD25, ayant une chaîne cytoplasmique très courte n'y participe pas. Cependant, ce dernier joue un rôle crucial dans l'augmentation de l'affinité de l'IL-2 à son récepteur. Ainsi les Treg entrent en compétition pour l'IL-2 avec les Teff en croissance les empêchant non seulement de poursuivre leur processus prolifératif, mais les privent également d'une cytokine vitale, ce qui entraîne une interruption du métabolisme et la mort des cellules (Pandiyani et al., 2007).

En plus du CD25, les Treg expriment à leur surface des enzymes impliquées dans leur activité immunosuppressive, les ectoenzymes apyrases (CD39) et les ecto-5'-nucléotidases (CD73) (Borsellino et al., 2007; Deaglio et al., 2007). Ces ectoenzymes permettent l'hydrolyse de l'ATP extracellulaire en adénosine qui possède des propriétés anti-inflammatoires. Lorsque les Teff expriment à leur surface le récepteur à l'adénosine A2A, l'interaction adénosine-A2A conduit à l'inhibition de la prolifération des T effecteurs de l'inflammation. De plus, l'adénosine induit également l'augmentation de la capacité immunosuppressive des Treg (Ohta and Sitkovsky, 2014). Ceci suggère l'existence d'une boucle de rétroaction positive, qui favorise la régulation négative de la réponse inflammatoire.

#### **b. Mécanismes dépendants de la sécrétion des médiateurs solubles**

Un autre mécanisme de suppression indépendant du contact cellulaire est la production de cytokines par les Treg : TGF $\beta$ , IL-10 et IL-35.

La fonction *in vivo* du **TGF $\beta$**  n'implique pas seulement l'induction des Treg périphériques au

détriment des Th17, mais cette cytokine anti-inflammatoire possède également une fonction immuno-modulatrice. Cette fonction se traduit par le contrôle de l'activation et de la prolifération des Th17 par les Treg dans un environnement tissulaire spécifique (Konkel et al., 2017).

L'**IL-10**, autre cytokine anti-inflammatoire majeure sécrétée par les Treg après activation, joue un rôle particulièrement important dans la régulation de l'inflammation. Cette cytokine semble avoir le même rôle immunosuppresseur que le TGF $\beta$ , notamment dans l'homéostasie de l'immunité intestinale (Kotlarz et al., 2018; Rubtsov et al., 2008). D'autre part, l'IL-10 n'intervient pas dans la différenciation des Th17 mais possède plutôt un rôle immuno-régulateur sur ces cellules (Chaudhry et al., 2011).

Enfin la dernière cytokine anti-inflammatoire découverte, impliquée dans la suppression médiée par le Treg est l'**IL-35** (Collison et al., 2007). Toutefois, il a été montré par notre équipe que cette cytokine pouvait, de façon contraire à l'action anti-inflammatoire la caractérisant, favoriser l'inflammation chronique dans un modèle murin de PR auto-immune et inflammatoire (Thiolat et al., 2014a). Néanmoins, d'autres études chez des patients atteints de PR ont mis en évidence le rôle plutôt protecteur de l'IL-35 dans la pathogénèse de la maladie (Nakano et al., 2015; Ning et al., 2015). De ce fait, le rôle biologique de l'IL-35 produite par les Treg dans l'auto-immunité reste controversé. Plus tard, dans le contexte de l'immunité anti-tumorale, il a été montré que l'IL-35 par sa fonction anti-inflammatoire conduisait à la limitation de l'immunité anti-tumorale médiée par les Teff de l'inflammation (Sawant et al., 2019; Turnis et al., 2016) et peu de temps après, une étude a mis en évidence le rôle de l'IL-35 dans un nouveau mécanisme de tolérance infectieuse (Sullivan *et al.*, 2020).

### c. Cytotoxicité

Un autre mécanisme de suppression médiée par les Treg, est la suppression par cytolysse. Ce mécanisme, utilisé par les NK et les lymphocytes T CD8 cytotoxiques lors de la lyse des cellules cibles, fait intervenir le système Perforine/Granzyme (Grossman et al., 2004). Lors de la cytolysse, les Treg libèrent des granules contenant des granzymes et des perforines à l'interface de l'interaction cellulaire Treg-Teff. Une fois dans l'espace extracellulaire, les perforines s'insèrent dans la membrane plasmique de la cellule cible et en présence d'ions

calcium, elles polymérisent formant un pore transmembranaire. Les granzymes, entrent alors dans la cellule cible à travers ces pores et induisent l'apoptose dans celles-ci.

#### **d. Mécanismes dépendants du contact**

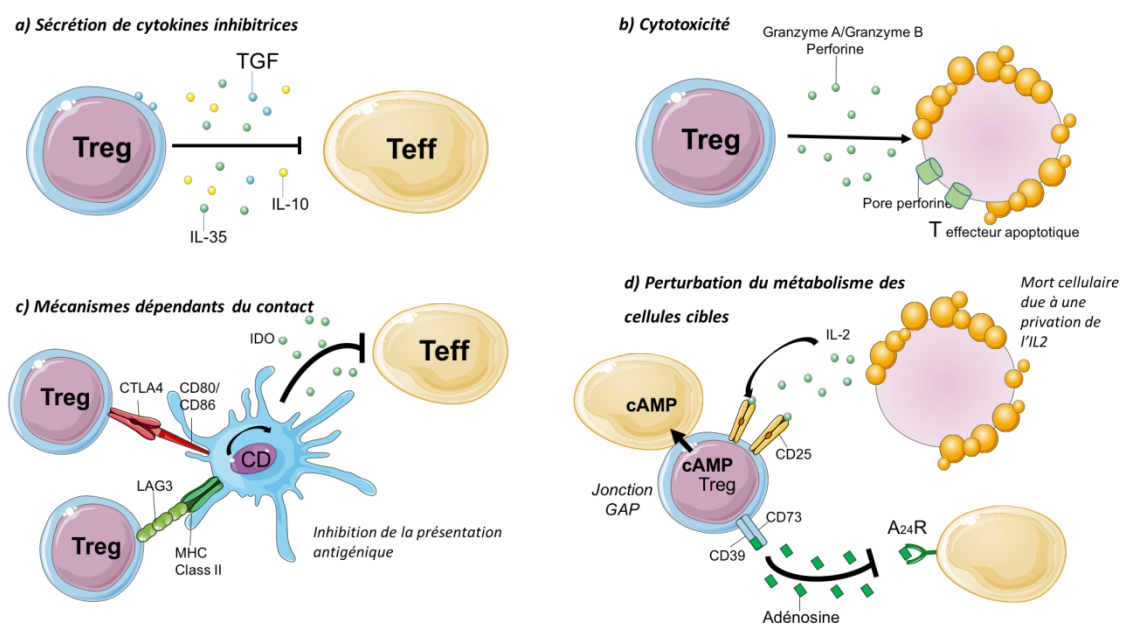
Les mécanismes dépendants du contact sont médiés par l'interaction du CTLA-4 exprimé par les Treg avec les molécules de co-stimulation CD80/86 à la surface des CPA telles que les cellules dendritiques et les lymphocytes B, privant ainsi les Teff répondeurs du signal de co-stimulation CD28 (Wing et al., 2008). Non seulement CTLA-4 à la surface des Treg entre en compétition avec le CD28 pour la liaison CD80/86 empêchant l'activation des Teff, mais il semble également capable d'endocyter les molécules CD80/86 et induire leur dégradation dans les lysosomes des Treg (Qureshi et al., 2011). Ceci a pour résultat la diminution de l'expression de ces molécules de co-stimulation à la surface des CPA et de ce fait l'inhibition de l'activation des cellules effectrices suite à la présentation antigénique. L'importance du CTLA-4 dans l'immunorégulation et la médiation de la tolérance par les Treg a été mise en évidence par l'équipe de Sakaguchi. Ils ont montré qu'une déficience spécifique du CTLA-4 dans les Treg entraîne le développement spontané d'une maladie auto-immune à médiation cellulaire T chez la souris et une puissante immunité anti-tumorale (Wing et al., 2008). Les Treg déficients en CTLA-4, perdent leur fonction suppressive *in vivo* et *in vitro*, en particulier, la régulation négative de l'expression des CD80/CD86 par les cellules dendritiques, médiée par le Treg (Wing et al., 2008).

Par la suite et de façon relativement contradictoire aux études précédentes, Paterson et al. ont montré que la suppression du CTLA-4 dans les Treg des souris adultes, a conduit à une augmentation de la prolifération de ces cellules *in vivo* et à un maintien de leur fonction suppressive (Paterson et al., 2015). Suite à cela, une hypothèse a été émise par Holt et al. sur l'existence d'un mécanisme dans lequel le CD28 est le principal inducteur de la prolifération des Treg et le CTLA-4 au contraire fonctionnerait comme l'inhibiteur principal de cette prolifération, mais dépendrait des signaux TCR et CD80/CD86 (Holt et al., 2017).

La liaison CTLA-4-CD80/CD86, entraîne également une augmentation de l'expression d'IDO dans les cellules dendritiques (Fallarino et al., 2003). IDO est une enzyme aux propriétés immuno-régulatrices qui lui ont été conférées par sa capacité à cataboliser un acide aminé essentiel, le tryptophane en kynurenine. Ainsi, l'appauvrissement du milieu en tryptophane



et la génération de la kynurenine contribuent à l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T effecteurs de l'inflammation, médiée par la liaison CTLA-4-CD80/CD86 (Terness et al., 2002). Les mécanismes dépendants du contact cellulaire impliquent également LAG3 (Lymphocyte Activation Gene 3), molécule qui identifie les Treg activés et contribue à leur activité suppressive. Après activation, les Treg exprimant LAG3 induisent une inhibition de l'activation des lymphocytes T effecteurs et ce, via l'inhibition de la présentation antigénique. En effet, les Treg exprimant LAG3 entrent en compétition avec les Teff dans la liaison au CMH-II, cette liaison étant plus stable que celle du TCR-CMH-II permet d'allonger la durée des interactions des Treg avec les CPA. L'importance de LAG3 dans la fonction suppressive des Treg a été particulièrement mise en évidence avec les travaux montrant que la neutralisation de LAG3 avec des anticorps bloquants ou sa déficience conduit à une diminution de la capacité suppressive des Treg (Huang et al., 2004).



**Figure 13 : Mécanismes de suppression des lymphocytes T régulateurs, adapté de Vignali et al., 2008.**

Les différents mécanismes de suppression des Treg répartis en quatre points (a-d) centrés sur quatre modes d'action fondamentaux. a. La sécrétion de cytokines inhibitrices qui comprennent l'IL-10, l'IL-35 et le TGF- $\beta$ . b. La cytotoxicité qui comprend les mécanismes dépendants des granzymes A et B ainsi que de la perforine. c. les mécanismes dépendants du contact cellulaire qui incluent les mécanismes qui modulent la fonction de présentation antigénique des cellules dendritiques (CD), tels que l'interaction LAG3 sur les Treg et CMH-II sur la CD, et l'induction par les cellules dendritiques d'IDO, médiée par l'interaction CTLA4 sur les Treg et CD80/CD86 sur la CD. d. La perturbation du métabolisme des cellules cibles qui comprend l'apoptose induite par la privation de cytokines grâce au CD25, l'inhibition médiée par l'AMP cyclique (AMPc) qui est transférée aux cellules cibles par les jonctions GAP et l'immunosuppression médiée par l'interaction de l'adénosine  $A_{2A}R$  générée par le CD39 et/ou le CD73, avec son récepteur  $A_{2A}R$ . cAMP : adénosine mono-phosphate cyclique ; LAG3 : lymphocyte activating 3 ; Treg : lymphocyte T régulateur ; Teff : lymphocyte T effecteur ; IDO : indolamine 2, 3

## **E. Caractérisation phénotypique des Treg**

Chez la souris et chez l'humain, les Treg sont caractérisés par une forte expression du CD25 et par l'expression constitutive de Foxp3, qui est nécessaire à leur développement, leur fonction et leur stabilité (Fontenot et al., 2003). Toutefois, chez l'humain, comme le CD25 est également exprimé par les lymphocytes T CD4 activés, l'absence de la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-7 (CD127) est utilisée comme marqueur complémentaire du CD25 pour identifier plus précisément les Treg humains (Liu et al., 2006). Ainsi les Treg chez la souris sont caractérisés par le profil d'expression  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  et chez l'humain par  $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}FoxP3^+$ . Par ailleurs, d'autres molécules dont l'expression est régulée par FoxP3 peuvent également être utilisées pour une meilleure caractérisation phénotypique des Treg immunorégulateurs, comme le CTLA-4 et le GITR (Hori et al., 2003; Wu et al., 2006). De plus, chez l'humain, il existe une hétérogénéité des populations Treg en fonction de leur expression de CD45RA. En effet, l'expression de CD45RA en combinaison avec le niveau d'expression de FoxP3 a permis l'identification et la caractérisation de trois populations de Treg phénotypiquement et fonctionnellement distinctes : des Treg naïfs ( $CD45RA^+FoxP3^{low}$ ), des Treg effecteurs ( $CD45RA^-FoxP3^{high}$ ) et enfin des lymphocytes T CD4 non-Treg ( $CD45RA^-FoxP3^{low}$ ). Les Treg effecteurs et les Treg naïfs après activation, sont caractérisés par une forte stabilité et activité suppressive *in vitro*. A l'inverse, les non-Treg, comme leur nom l'indique, ne possèdent pas d'activité suppressive et sont caractérisés par l'expression de cytokines pro-inflammatoires (Miyara et al., 2009, 2011).

## **F. Rôle des lymphocytes T régulateurs dans les maladies auto-immunes**

Les maladies auto-immunes sont le résultat de la rupture de la tolérance immunitaire. De ce fait, de nombreuses études se sont penchées sur la caractérisation quantitative et qualitative des Treg dans diverses maladies auto-immunes (MAI), notamment le diabète de type 1, la sclérose en plaques, le lupus érythémateux systémique et la polyarthrite rhumatoïde. Les données montrent un défaut qualitatif évident, le défaut quantitatif faisant en revanche l'objet de résultats discordants selon les études. C'est donc une fonction suppressive altérée des Treg qui est une constatation quasiment constante.

Le profil immunorégulateur des Treg dépend de deux éléments principaux, tous deux régulés par divers facteurs et maintenus dans des conditions physiologiques : l'expression de Foxp3 et une signature épigénétique globale spécifique. Cependant, sous l'influence d'un certain nombre de facteurs importants, dont un environnement inflammatoire chronique, certaines sous-populations de Treg peuvent devenir instables, perdre l'expression de FoxP3 et leur fonction d'immunosuppression. Ou alors, ils peuvent maintenir l'expression de FoxP3 mais leur signature épigénétique globale peut être modifiée (plasticité des Treg). Dans ce dernier cas, les Treg-FoxP3<sup>+</sup> sont capables de sécréter des cytokines pro-inflammatoires et adopter un profil de lymphocytes T effecteurs. Il a été montré que la plasticité et la stabilité des Treg affectent leur fonction et sont liées à la progression des maladies auto-immunes. Une approche thérapeutique potentielle pour restaurer la tolérance périphérique pourrait cibler des molécules et des voies spécifiques qui présentent une dysfonction au cours des MAI. Toutefois, pour cette approche, il sera important de déterminer les mécanismes physiologiques et moléculaires à l'origine de l'instabilité et de la plasticité des Treg au cours des MAI.

### **1. Plasticité des lymphocytes T régulateurs**

La plasticité est une propriété inhérente à la plupart des cellules immunitaires, principalement aux lymphocytes T CD4, qui leur permet d'adapter leur phénotype et leur fonction à leur environnement extracellulaire. Plusieurs études ont suggéré que dans certaines conditions inflammatoires, le profil immunorégulateur des Treg subit une polarisation vers des phénotypes de lymphocytes T effecteurs de l'inflammation ce qui leur permet d'acquérir des caractéristiques spécifiques au type de réponse immunitaire qu'ils régulent (Dominguez-Villar et al., 2011; Komatsu et al., 2014; Pelly et al., 2017). Ainsi, les cellules Treg acquièrent l'expression du facteur de transcription T-bet pour limiter l'inflammation de type Th1 pendant l'infection (Koch et al., 2009; Levine et al., 2017), ils expriment le facteur de transcription IRF4 et GATA3 pour inhiber les réponses de type Th2 (Zheng et al., 2009) et STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) pour inhiber les réponses de type Th17 (Chaudhry et al., 2009). Finalement, les données sur la plasticité des Treg sont controversées, puisque des aspects bénéfiques et pathogènes sont décrits. En effet, la plasticité des Treg semble être avantageuse pour une régulation adaptée en fonction de la réponse immunitaire. Toutefois, une plasticité excessive des Treg peut être à l'origine

d'une dérégulation et d'une exacerbation de l'inflammation comme observé dans plusieurs maladies auto-immunes. Dans ce contexte, les Treg expriment les mêmes facteurs de transcription décrits plus haut mais cette expression est accompagnée de l'expression des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- $\gamma$  ou l'IL-17 (Hua et al., 2018). Ainsi, les Treg acquièrent des phénotypes semblables à ceux des T effecteurs de l'inflammation (Teff) et présentent une fonction régulatrice diminuée tout en conservant l'expression de Foxp3. Par ailleurs, dans la plupart des cas, les Treg de type Teff possèdent un TSDR déméthylé même s'ils présentent des caractéristiques effectrices, ce qui suggère que leur phénotype pourrait être réversible (Dominguez-Villar et al., 2011).

#### **a. Les Treg de type Th1 (Th1-like Treg Cells)**

Dans les modèles expérimentaux de souris et chez les patients atteints de maladies auto-immunes, telles que le diabète de type 1 (McClymont et al., 2011), la sclérose en plaques (SEP) (Dominguez-Villar et al., 2011) et l'hépatite auto-immune (Arterbery et al., 2016), on observe une accumulation de tTreg Foxp3<sup>+</sup> sécréteur d'IFN- $\gamma$  dans la périphérie. Ces cellules appelées Treg Th1-like ont une fonction suppressive réduite et expriment fortement le facteur de transcription T-bet ainsi que d'autres marqueurs caractéristiques des Th1 tels que CCR5 et CXCR3. La sécrétion de l'IFN- $\gamma$  dans ces cellules est le résultat de l'activation de la voie de signalisation PI3K-Akt/Foxo1/3 induite par l'IL-12. En effet, il a été montré que les Treg isolés de patients atteints de SEP présentent une activation de la voie PI3K/Akt/Foxo1/3 et le blocage de cette voie a inhibé la production de l'IFN- $\gamma$  et a rétabli le phénotype et la fonction de ces Treg (Kitz et al., 2016). D'autre part et de manière paradoxale, il a été montré que l'expression de T-bet induite par l'IFN- $\gamma$  dans les Treg Th1-like est nécessaire pour le contrôle de la régulation de la réponse immunitaire de type Th1 médiée par ces cellules (Koch et al., 2009).

#### **b. Les Treg de type Th17 (Th17-like Treg Cells)**

Les Treg-Th17-like sont le mieux identifiés dans les tissus intestinaux, en effet, la lamina propria est enrichie en Treg exprimant le facteur de transcription ROR $\gamma$ T qui caractérise les Th17. La conversion des Treg-Foxp3<sup>+</sup> en Th17-like sécréteurs d'IL-17 est induite par l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6. Cette conversion a été observée et associée à la pathogénèse de l'arthrite auto-immune dans des modèles murins d'arthrite expérimentale au collagène. De plus, une accumulation des Treg Th17-like a été retrouvée dans la synoviale des patients atteints de PR

(Komatsu et al., 2014), dans les tissus cutanés de patients atteints de psoriasis (Bovenschen et al., 2011), dans des modèles murins de psoriasis (Singh et al., 2013), chez les patients atteints de lupus érythémateux systémique et dans les modèles murins de lupus spontané. Paradoxalement, d'autres études ont mis en évidence une fonction plutôt bénéfique de ces Treg-Th17. En effet, il a été montré que l'absence des Treg FoxP3<sup>+</sup>RORγT<sup>+</sup> a exacerbé la maladie dans un modèle d'auto-immunité de colite induite par le TNBS chez la souris (Sefik et al., 2015) et dans un modèle murin de lupus érythémateux systémique (Kluger et al., 2016). Les Treg Th17-like dans ce contexte semblent co-localiser avec les Th17 et contrôler l'inflammation *in situ*. Ainsi, pour l'instant les éléments décrivant le rôle de ces Treg Th17-Like restent contradictoires et encore mal caractérisés.

### **c. Les Treg de type Th2 (Th2-like Treg Cells)**

Sous l'influence de l'IL-4, les Treg subissent une polarisation vers un phénotype Th2-like et sont caractérisés par la production d'IL-4 et d'IL-13 et par l'expression de GATA3 et d'IRF-4, facteurs de transcription caractéristiques des Th2. Le facteur de transcription GATA3 possède un rôle essentiel dans l'expression de FoxP3 et le contrôle de la fonction des Treg. En effet, les Treg déficients en GATA3 ont été incapables de contrôler l'inflammation spontanée chez la souris (Wang et al., 2011). Pareillement, il a été montré qu'IRF4 favorise l'activité suppressive des Treg contre l'inflammation de type Th2 (Zheng et al., 2009).

Finalement ces données suggèrent d'une part que la conversion des Treg Th-like est nécessaire pour limiter efficacement le type correspondant de la réponse immunitaire et d'autre part révèlent un rôle plutôt pathogénique des Treg Th-like.

Ainsi, à ce stade de nombreuses questions restent sans réponses concernant le rôle controversé des Treg Th-like au cours du développement et la progression des maladies auto-immunes.

## **2. Stabilité des lymphocytes T régulateurs**

L'expression de Foxp3 et sa stabilité jouent un rôle crucial dans le maintien de la fonction suppressive des lymphocytes T régulateurs (Wan and Flavell, 2007). En effet, il a été montré qu'une délétion spécifique d'un allèle de foxp3 dans les Treg a eu pour résultat une dérégulation de l'expression des gènes cibles de ce dernier et le développement d'une population de lymphocytes T effecteurs capables d'induire des lésions tissulaires

inflammatoires (Williams and Rudensky, 2007). Ainsi, l'expression constitutive de Foxp3 dans les Treg est nécessaire pour maintenir le programme transcriptionnel et fonctionnel établi pendant leur développement. Toutefois, des études récentes ont mis en évidence des mécanismes moléculaires - à la fois transcriptionnels et épigénétiques - qui induisent l'instabilité de FoxP3 dans un environnement inflammatoire, entraînant la conversion des Treg en cellules effectrices pathogènes (Colamatteo et al., 2020). En effet, depuis une dizaine d'années, l'instabilité de FoxP3 et donc la perte de son expression a été montrée dans plusieurs études et dans différentes conditions, notamment *in vitro* (Hoffmann et al., 2009), lors du transfert adoptif de Treg chez des souris présentant une lymphopénie (Duarte et al., 2009) ou encore dans des contextes infectieux (Oldenhove et al., 2009).

Les Treg qui perdent l'expression de FoxP3 sont appelés « ex-Foxp3 » ou « ex-Treg », ils sont caractérisés par l'acquisition d'un phénotype de lymphocytes T effecteurs activés producteurs de cytokines inflammatoires telles que l'IFN- $\gamma$  et l'IL-17 (Hua et al., 2018; Zhou et al., 2009). Ces ex-Treg ont été capables d'induire l'auto-immunité dans un modèle de transfert adoptif sur le fond NOD. D'autres données qui viennent appuyer la proposition d'instabilité des Treg ont montré une perte de l'expression de Foxp3 dans les tTreg spécifiques d'un antigène (la MOG) au cours du développement de l'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE). Cette diminution de l'expression de FoxP3 a été accompagnée d'une fréquence élevée d'ex-Treg sécréteurs d'IFN- $\gamma$  dans le système nerveux central aux stades préclinique et établi de l'EAE, qui diminue au cours de la résolution de la maladie (Bailey-Bucktrout et al., 2013). D'autres études ont également montré une diminution de l'expression de FoxP3 dans les Treg isolés des sites inflammatoires dans des modèles murins d'auto-immunité et chez des patients atteints de maladies auto-immunes (Huan et al., 2005; Long et al., 2010; Zhang et al., 2008). Toutefois les mécanismes moléculaires responsables de la diminution de Foxp3 et les conséquences à long terme de cette diminution, nécessitent plus d'investigations.

La stabilité et le maintien de l'expression de FoxP3, ainsi que son activité transcriptionnelle sont régulés par plusieurs mécanismes : i) une régulation post-traductionnelle ii) une régulation transcriptionnelle iii) une régulation épigénétique. Les paramètres impliqués dans les différents mécanismes de régulation peuvent subir à leur tour des modifications dans certaines conditions telle que l'inflammation chronique. Parmi ces paramètres, les facteurs de

transcription, les miRNA, la méthylation du TSDR, ou encore les enzymes de type histone méthyl-transférase.

#### **a. Régulation post-traductionnelle de FoxP3**

L'activité transcriptionnelle de Foxp3 peut être régulée par diverses modifications post-traductionnelles de FoxP3 lui-même, telles que la phosphorylation, la O-GlcNAcylation et l'ubiquitination.

La **phosphorylation** des protéines est une modification réversible et transitoire impliquée dans leur stabilité intracellulaire, leur interaction et leur localisation. La séquence de FoxP3 chez la souris et l'humain contient plusieurs résidus conservés de type sérine, thréonine et tyrosine, qui sont des sites d'interaction potentiels de certaines kinases. Par ailleurs, il a été montré que FoxP3 peut être phosphorylé sur des résidus thréonine (Samanta et al., 2008).

La structure primaire de FoxP3 contient quatre motifs kinases dépendantes des cyclines (Cyclin dependent kinase, CDK) dans le domaine répresseur N-terminal. Par exemple, CDK2 en s'associant à la cycline E peut phosphoryler FoxP3 sur ces sites. Il a été montré qu'une mutation des motifs CDK N-terminaux au niveau de FoxP3 induit la stabilité de ce dernier et son activité transcriptionnelle. De même, les Treg présentant cette même mutation dans FoxP3 ont montré une capacité immunosuppressive significativement plus élevée comparé aux Treg exprimant la forme non mutée de FoxP3 (Morawski et al., 2013). Il a donc été suggéré que CDK2 régule négativement la fonction des Treg et la tolérance périphérique en phosphorylant Foxp3.

Les kinases Pim-1 et Pim-2 induisent également la phosphorylation de la protéine FoxP3, ce qui résulte en une régulation négative de la fonction suppressive des Treg. Pim-1 phosphoryle FoxP3 chez l'humain sur la Ser422 au niveau du domaine Forkhead empêchant ainsi la liaison de FoxP3 à l'ADN nécessaire à la régulation des gènes caractéristiques des Treg (Li et al., 2014). Quant à la kinase Pim-2, cette dernière phosphoryle plusieurs sites dans le domaine N-terminal de FoxP3. Par ailleurs, il a été montré que la stimulation du TCR diminue l'expression de Pim-1 et en parallèle augmente l'expression de FoxP3 dans les lymphocytes Treg *in vitro*, indiquant qu'au moins une partie de la phosphorylation de FoxP3 médiée par Pim-1 peut être régulée par la stimulation du TCR.

Lors de la stimulation TCR, la voie de signalisation médiée par ce dernier peut réguler la phosphorylation de FoxP3 par l'activation de la sérine/thréonine protéine kinase NLK (Nemo-Like Kinase) d'une manière dépendante du TGF $\beta$ . Il a été montré que la phosphorylation de FoxP3 médiée par NLK entraîne une stabilité de ce dernier en empêchant son association avec la protéine ligase E3-ubiquitine STUB1 (STIP1 homology and U-box-containing protein 1) et en l'occurrence sa dégradation par le protéasome. De plus, la délétion conditionnelle de NLK dans les Treg a entraîné la perte de la fonction immunosuppressive de ces cellules *in vivo* (Fleskens et al., 2019).

Ainsi, les données de la littérature montrent que la phosphorylation de FoxP3 peut réguler positivement ou négativement la fonction de ce dernier et par conséquent la fonction des Treg.

L'**ubiquitination** des protéines est une modification post-traductionnelle qui intervient dans leur régulation. Elle est médiée par la fixation d'une ou plusieurs ubiquitines sur la partie N terminale de la protéine cible conduisant à sa dégradation par le protéasome. L'ubiquitination joue également un rôle dans la régulation de la fonction des cellules immunitaires et de la réponse immunitaire de manière générale. En effet, il a été rapporté que l'activation des LT CD4 était associée à une augmentation de l'ubiquitination non-protéolytique dans ces cellules, suggérant l'importance de ce mécanisme dans la signalisation des lymphocytes T (Dybas et al., 2019). Dans des conditions de stress inflammatoire, HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$ ) favorise le développement des Th17 et parallèlement à ça, régule négativement le développement des Treg en augmentant l'ubiquitination de FoxP3 et sa dégradation médiée par le protéasome (Dang et al., 2011). De plus, l'ubiquitination de FoxP3 est également favorisée en présence de cytokines pro-inflammatoires ou de LPS (Chen et al., 2013).

D'autre part, l'ubiquitination des protéines peut être inversée par les déubiquitinases (DUB). Il a été montré qu'USP7 (Ubiquitin Specific Peptidase 7) est fortement exprimée dans les Treg et que son expression est associée à la stabilité de FoxP3 et à une augmentation de l'activité immunosuppressive de ces cellules (van Loosdregt et al., 2013). Par ailleurs, les DUB peuvent également réguler négativement les Treg. En effet, une déficience de certaines de ces protéines telle que la CYLD qui a pour cible Smad7, entraîne une activation constitutive de la voie de signalisation NF-kB et une augmentation de la signalisation du TGF $\beta$ , ce qui augmente



la fréquence des Treg en périphérie et favorise la différenciation des Treg *in vitro* (Zhao et al., 2011).

La **O-GlcNAcylation** des protéines est une modification post-traductionnelle qui se produit au niveau des résidus sérine et thréonine et qui est catalysée par la O-GlcNAc-transférase (OGT). La O-GlcNAcylation peut contrer l'ubiquitination pour stabiliser FoxP3. De plus, il a été montré que les Treg déficients en OGT présentent une altération de leur stabilité et activité suppressive (Liu et al., 2019).

## **b. Régulation transcriptionnelle**

### **1. Rôle des cytokines dans la stabilité de l'expression de FoxP3**

Lorsque l'IL-2 se lie à son récepteur transmembranaire associé aux kinases Janus 1 ou 3 (JAK-1, JAK-3), cela conduit à la dimérisation de ce dernier et à l'activation croisée de ses kinases JAK, entraînant la phosphorylation de résidus de tyrosine spécifiques au récepteur. Ces résidus phospho-tyrosines du récepteur dirigent le recrutement dépendant de SH2 du transducteur de signal et activateur de la signalisation 5 (STAT5). Dans les cellules au repos, les STAT en général sont localisés en grande partie dans le cytoplasme sous forme d'homodimères inactifs. En réponse à l'IL-2, STAT5 est recruté au niveau du récepteur JAK, il est phosphorylé à son tour par les kinases JAK sur des résidus tyrosine. STAT5 phosphorylé sur la tyrosine 694 (Y694) et donc activé, est libéré du récepteur lorsqu'il se dimérise via les interactions SH2-domaine phospho-tyrosine en dimère anti parallèle. Le dimère de phospho-STAT5 est capable de transloquer dans le noyau où il se lie au promoteur de FoxP3 et à la région CNS-2, entraînant la transcription active de FoxP3 et le maintien de son expression dans les Treg. La suppression de STAT5 ou du récepteur JAK3 résulte en une importante réduction de l'expression de FoxP3 dans les Treg (Mayack and Berg, 2006; Yao et al., 2007).

Ainsi, l'IL-2 joue un rôle important dans la stabilité de Foxp3 (Chen et al., 2011). Néanmoins, ce rôle peut être contrecarré par des cytokines pro-inflammatoires telle que l'IL-6. En effet, en plus d'être à l'origine de la méthylation du CNS-2 par le recrutement de la DNMT1, l'IL-6 induit également l'activation de STAT3. STAT3 activé, inhibe l'expression de Foxp3 en bloquant la liaison de STAT5 activé par l'IL-2 aux éléments du gène *foxp3*, en l'occurrence le CNS-2 (Laurence et al., 2012).

D'autre part, l'interaction du TNF $\alpha$  avec son récepteur TNFR2 exprimé par les

Treg aurait un rôle plutôt avantageux dans le maintien de leur stabilité. Nous, ainsi que d'autres équipes avons montré que le TNF $\alpha$ , à travers une signalisation TNFR2 augmente d'une part l'expression du CD25 et d'autre part la phosphorylation de STAT5 induite par l'IL-2 dans les Treg favorisant leur expansion et leur stabilité (Nguyen and Ehrenstein, 2016; Santinon et al., 2020). En effet, STAT5 phosphorylé, se fixe au TSDR, stabilisant ainsi l'expression de Foxp3, ce qui conduit à une forte activité suppressive de ces cellules (Alvarez Salazar et al., 2017).

Enfin, le TGF $\beta$  permet l'activation et la formation de l'hétérodimère SMAD3-SMAD4, qui se fixe sur la séquence CNS-1 (Schlenner et al., 2012). Ceci est essentiel pour induire l'expression de Foxp3 dans les T naïfs lors de la différenciation des Treg périphériques et des Treg induits *in vitro*.

## **2. Rôle du facteur de transcription Helios dans la stabilité de l'expression de FoxP3**

L'expression de FoxP3 est régulée par un ensemble de facteurs moléculaires exprimés par les Treg et une perte de l'expression de ces facteurs peut aussi entraîner une instabilité des Treg et le développement des ex-Treg. Par exemple, il a été montré qu'une déficience de l'expression du facteur de transcription Helios par les Treg entraîne une altération fonctionnelle de ces cellules et le développement de l'auto-immunité chez la souris. Dans ce modèle, les Treg déficients en Helios adoptent un phénotype instable au cours des réponses inflammatoires, caractérisé par une diminution de l'expression de FoxP3 et une augmentation de l'expression des cytokines effectrices inflammatoires IFN- $\gamma$  et IL-17 (Kim et al., 2015). Helios représente donc un facteur de transcription clé impliqué dans la stabilité des Treg.

Helios est un membre de la famille Ikaros des facteurs de transcription à doigt de zinc exprimés par les Treg, il a été décrit initialement comme étant le facteur permettant de différencier les Treg thymiques des Treg induits en périphérie (Thornton et al., 2010). Toutefois, cette notion est controversée car d'autres n'ont pas observé de distinction claire des sous-populations de Treg sur la base de l'expression d'Helios (Akimova et al., 2011; Himmel et al., 2013). Helios est exprimé dans les Treg et est essentiel pour maintenir un phénotype stable et potentialiser la fonction suppressive de ces cellules dans les conditions inflammatoires qui incluent les maladies auto-immunes et le cancer (Kim et al., 2015; Thornton et al., 2010). En effet, il a été montré qu'une déficience de Helios dans les Treg résulte en une diminution de l'expression de FoxP3, une faible expression de CD25, une altération de l'activation de STAT5 induite par

l'IL-2 et une production des cytokines inflammatoires telles que l'IFN- $\gamma$ , l'IL-17 et le TNF $\alpha$  par ces cellules (Sebastian et al., 2016). Helios semble ainsi maintenir la stabilité des Treg, leur survie et leur fonction en supprimant la production de cytokines inflammatoires. Toutefois les mécanismes par lesquels Helios limite l'expression des cytokines effectrices par les Treg ne sont pas encore bien définis. Enfin, sur le plan épigénétique, il semblerait que l'expression de Helios par les Treg soit associée à une déméthylation du TSDR plus importante comparé aux Treg Helios<sup>-</sup> (Thornton et al., 2019).

### ***c. Régulation épigénétique***

Les changements moléculaires épigénétiques tels que la méthylation du TSDR pourraient expliquer la perte de l'expression de FoxP3 par les ex-Treg. En effet, l'hypométhylation du TSDR permet l'accessibilité à la chromatine et favorise donc la fixation de FoxP3 lui-même ainsi que de plusieurs facteurs de transcription essentiels à l'induction de son expression, favorisant le maintien et la stabilité de l'expression de ce dernier dans les Treg (Kim and Leonard, 2007; Zheng et al., 2010). Ce schéma de déméthylation du TSDR est aussi retrouvé dans les pTreg, ce qui n'est en revanche pas le cas des iTregs, qui présentent par conséquent une expression instable de FoxP3 (Ohkura et al., 2012; Polansky et al., 2008). Ainsi, un statut épigénétique spécifique aux Treg est impliqué dans la régulation de l'expression de FoxP3 et celle des gènes signature des Treg, favorisant le maintien de la stabilité phénotypique et fonctionnelle de ces cellules.

L'expression de certains marqueurs par les Treg est directement associée à leur stabilité. Par exemple, nous avons récemment montré que l'expression du TNFR2 par les Treg est associée à une hypométhylation du TSDR et donc par conséquent à une augmentation de la stabilité de l'expression de FoxP3 ainsi qu'à une forte activité immunosuppressive (Santinon et al., 2020).

## **1. L'Histone méthyl transférase EZH2**

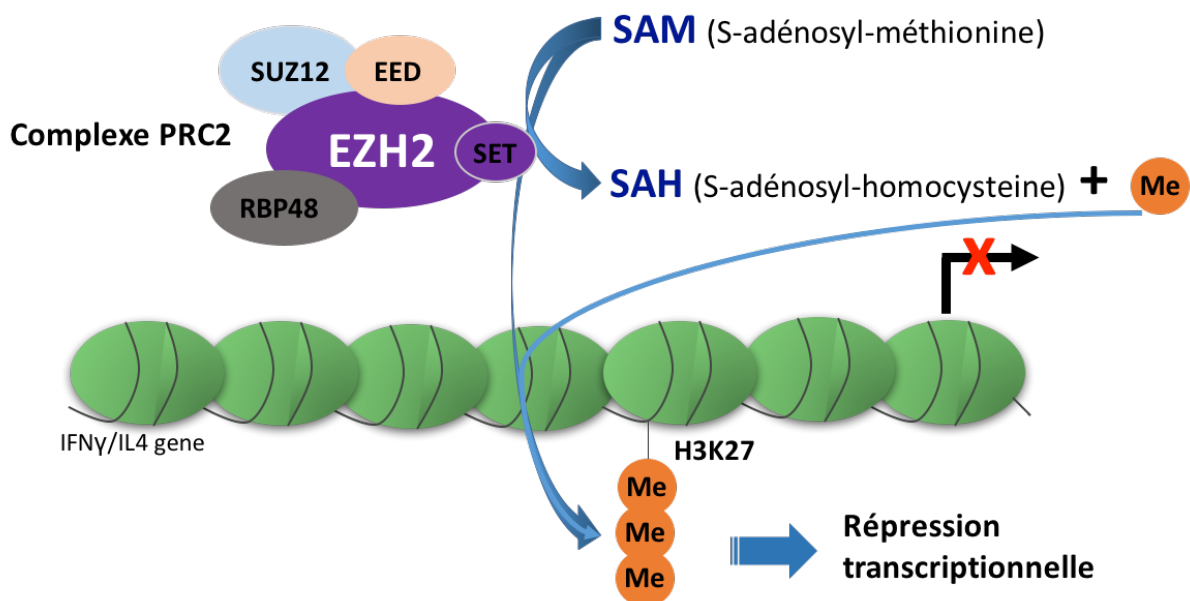
### ***1.1. Les protéines du groupe polycomb***

L'histone méthyl transférase EZH2 (enhancer of zeste homologue2) est une protéine clés du Groupe Polycomb (PcG). Les protéines du PcG ont été identifiées à l'origine chez la Drosophile comme d'importants régulateurs négatifs des gènes homéotiques (Hox), essentiels pour une bonne segmentation au cours du développement (Lewis, 1978). Elles sont

nécessaires au maintien de la répression transcriptionnelle des gènes cibles, par la régulation de leur structure chromatinienne via des modifications post-traductionnelles des histones. Le rôle des protéines PcG au cours du développement a été mis en évidence par la létalité embryonnaire précoce chez les souris déficientes en gènes codants pour certaines de ces protéines, notamment Eed, Ezh2 et Suz12 (O'Carroll et al., 2001; Pasini et al., 2004). Une partie de ce groupe de protéines forme le PRC2 (Polycomb Repressive Complexe 2), complexe majeur de modification de la chromatine.

### 1.2. Les composants du PRC2 (Polycomb Repressive Complexe 2)

Le PRC2 est un complexe multiprotéique composé de trois sous unités : EZH1/2 (Enhancer of Zeste Homologue1/2), EED (Embryonic Ectoderm Development) et SUZ12 (Suppressor of Zeste 12). Les sous-unités centrales du PRC2 sont associées à des protéines de liaison aux histones : les RBAP46/48 (Retinoblastoma Binding Protein 46 ou 48). Les deux isoformes EZH1 et EZH2 sont les sous-unités catalytiques du PRC2 contenant chacune un domaine SET possédant une activité méthyl-transférase. Par ce domaine SET, un groupement méthyle du cofacteur S-adenosyl-L-méthionine (SAM) est transféré sur la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me) du gène cible et la triméthylation H3K27 (H3K27me<sup>3</sup>) favorise la répression transcriptionnelle (Joshi et al., 2008). Le domaine SET possède deux sites d'entrée, un pour le substrat (H3K27me<sup>0</sup>, H3K27me<sup>1</sup>, ou H3K27me<sup>2</sup> dans le cas du PRC2) et l'autre pour le SAM.



**Figure 14 : Structure et fonction du complexe PRC2.**

La méthylation de la H3K27 est progressive : H3K27me<sup>3</sup> résulte de la mono-méthylation de

H3K27me<sup>2</sup>. La H3K27me<sup>2</sup> est un produit intermédiaire important du PRC2, car il constitue non seulement le substrat pour la formation ultérieure de la H3K27me<sup>3</sup>, mais pourrait également empêcher l'acétylation de la H3K27. La H3K27 acétylée est considérée comme antagoniste de la répression transcriptionnelle médiée par PRC2 et est enrichi en son absence (Tie et al., 2009). L'expression et la fonction de EZH1 et EZH2 sont différentes. EZH1 est plus abondante dans les organes adultes non prolifératifs tandis que l'expression d'EZH2 est étroitement associée à la prolifération (Margueron et al., 2008). De plus, l'activité catalytique du PRC2 contenant EZH2 (PRC2-EZH2) est supérieure à celle du PRC2-EZH1. De plus, il a été montré que EZH1 et EZH2, sont activées différemment par divers mécanismes.

En effet, alors que PRC2-EZH1 et PRC2-EZH2 sont tous deux capables de catalyser la mono- et la diméthylation, seule PRC2-EZH2 est fortement activée par des modulateurs allostériques et des substrats de chromatine spécifiques pour catalyser la tri-méthylation de H3K27 (Lee et al., 2018). Par ailleurs, des études ont montré qu'EZH2 seule est catalytiquement inactive et nécessite la présence des sous-unités EED et SUZ12 qui induisent le compactage de la chromatine permettant l'activation de la fonction enzymatique d'EZH2 (Cao et al., 2002; Kuzmichev, 2002; Margueron and Reinberg, 2011). De plus, après la tri-méthylation de H3K27 par EZH2, la liaison de EED à H3K27me<sup>3</sup> par son domaine WD40 entraîne un changement de conformation du PRC2, renforçant son activité catalytique par activation allostérique d'EZH2 (Jiao and Liu, 2015). De ce fait, en se liant à son propre produit via le EED, le PRC2 peut déposer une H3K27me<sup>3</sup> au nucléosome voisin (Poepsel et al., 2018). Quant à SUZ12, il sert de facteur de stabilisation pour la liaison du PRC2 à l'ADN (Højfeldt et al., 2018).

### ***1.3. Les co-facteurs du PRC2***

Outre les composants principaux du PRC2, plusieurs cofacteurs interagissent avec ce complexe et modulent à la fois sa liaison à la chromatine et son activité catalytique. C'est par exemple, le cas des facteurs chromatiniens JARID2 (Jumonji and AT-rich interaction domain containing 2) et AEBP2 (Adipocyte Enhancer-Binding Protein 2). Ces facteurs sont capables de se lier à l'ADN et induire l'adressage du complexe PRC2 à la chromatine (Kim et al., 2009; Pasini et al., 2010). La stimulation de l'activité enzymatique d'EZH2 par JARID2 est en partie médiée par la tri-méthylation de JARID2 au niveau de la lysine 116 (K116me). Ceci met en évidence l'existence d'une boucle de régulation où la méthylation de JARID2 par EZH2 permet de réguler l'activité catalytique de cette dernière en fonction du contexte chromatiniens (Sanulli

et al., 2015). En effet, JARID2-K116me agit comme un échafaudage de liaison pour le domaine WD40 de l'EED, entraînant un changement de conformation du PRC2 qui se traduit par une activité catalytique accrue d'EZH2 (Justin et al., 2016). D'autre part AEBP2 interagit avec plusieurs composants du PRC2, renforçant son activité catalytique. En effet, AEBP2 possède trois doigts de zinc qui, lorsqu'ils sont liés au PRC2, sont localisés près du domaine catalytique d'EZH2 (Ciferri et al., 2012) induisant la stabilité de cette dernière et de ce fait son activité catalytique.

#### 1.4. Le gène ezh2

Chez l'humain, le gène ezh2 est localisé sur le bras q en position 35 du chromosome 7 (7q35) et comprend 20 exons (Cardoso et al., 2000). Il comporte cinq domaines, dont le domaine EID (EED-Interaction Domain), le domaine I, le domaine II, le domaine riche en cystéine (domaine CXC) et le domaine C-terminal qui représente le domaine SET. L'activité histone méthyltransférase d'EZH2 est principalement maintenue par le domaine SET. Les domaines N-terminal sont les domaines d'interaction des protéines, qui sont nécessaires pour l'assemblage des sous-unités partenaires du complexe PRC2 dont EED et SUZ12 (Simon and Lange, 2008).

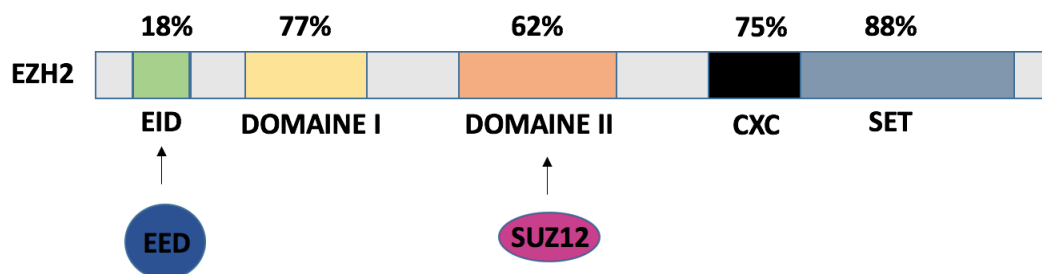


Figure 15 : Structure du gène ezh2, adapté de Simon and Lange, 2008.

#### 1.5. Rôle d'EZH2 dans la régulation de la plasticité des lymphocytes T

De nombreuses études ont mis en évidence le rôle d'EZH2 dans la régulation épigénétique de gènes essentiels et dans le contrôle des processus cellulaires importants. Notamment par son rôle dans la progression du cycle cellulaire, le maintien de la pluripotence des cellules souches (Lee et al., 2006), la prolifération cellulaire (Bracken, 2003), l'inactivation du chromosome X (Plath, 2003), ou encore la lymphopoïèse (Su et al., 2003).

De plus, il a été montré qu'EZH2 possède un rôle important dans la régulation de la

différentiation et de la plasticité des lymphocytes T, en particulier dans la stabilité des Treg ainsi que dans le développement des maladies auto-immunes, ou encore dans le cancer. En utilisant des lymphocytes T CD4 naïfs déficients en EZH2, différentes équipes ont montré qu'EZH2 possède un rôle clé dans la différenciation et la plasticité des lymphocytes Th1 et Th2 et un rôle essentiel sur leur survie. EZH2 favorise la survie des lymphocytes T effecteurs différenciés grâce à l'inhibition de nombreuses voies d'apoptose, y compris la signalisation Fas, TNFR1, DR4 et Mlk1 (Zhang et al., 2014). Zhang et al. ont montré que les lymphocytes T CD4 déficients en EZH2 surproduisent l'IFN- $\gamma$  dans les Th2 et les iTreg différenciés, indiquant que la régulation du gène de l'IFN- $\gamma$  est médiée par EZH2. EZH2 régule en plus d'autres gènes dans les lymphocytes Th, notamment Tbx21 et Gata3 (Tumes et al., 2013; Zhang et al., 2014). De plus, par rapport aux cellules de type sauvage, les Th1 déficients en EZH2 expriment des niveaux plus élevés d'IL-4, IL-5 et IL-13 lorsqu'ils sont exposés à des conditions de polarisation Th2 et les Th2 déficients en EZH2 expriment des niveaux plus élevés d'IFN- $\gamma$  lorsqu'ils sont exposés aux conditions de polarisation Th1 (Tumes et al., 2013). Ces observations confirment le rôle d'EZH2 dans la régulation de la plasticité des lymphocytes T.

### ***1.6. Rôle d'EZH2 dans la régulation de la stabilité des Treg***

Dans les lymphocytes T régulateurs activés, FoxP3 agit principalement comme un répresseur transcriptionnel (Arvey et al., 2014). Cette régulation médiée par FoxP3 est dépendante de l'association de ce dernier avec d'autres facteurs dont EZH2. En effet, lors de l'activation des Treg par le TCR, FoxP3 recrute EZH2 au niveau des gènes auxquels il est lié. Cette co-localisation résulte en la tri-méthylation de l'histone 3 sur la lysine 27 (H3K27) qui conduit à la répression transcriptionnelle (Arvey et al., 2014). Parmi les gènes dont l'expression est régulée par EZH2 dans les Treg il y a ceux qui codent pour la cytokine effectrice IFN- $\gamma$  et la cytokine IL-4. L'activation de STAT1 (Signal Transducer and Activator of Transcription 1) en aval de l'IFN- $\gamma$  et l'activation de STAT6 en aval de l'IL-4 sont tous deux impliqués dans l'inhibition de l'expression de FoxP3 (Chang et al., 2009; O'Malley et al., 2009). Ainsi en supprimant l'expression de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-4, EZH2 lève l'inhibition induite par ces cytokines sur l'expression de FoxP3, favorisant ainsi le maintien de l'expression de ce dernier et la stabilité des Treg.

## 2. Les histones acétyltransférases (HAT) et les histones désacétylases (HDAC)

Les histones acétyltransférases (HAT) et les histones désacétylases (HDAC) sont des enzymes responsables de l'acétylation des histones, mais sont également impliquées dans l'acétylation de substrats protéiques. L'acétylation des protéines est un processus réversible qui régule leur activité biologique en réponse à des stimuli cellulaires. L'association des HAT à Foxp3 entraîne son (hyper)acétylation et par conséquent une augmentation de sa stabilité (van Loosdregt et al., 2010). TIP60 a été la première acétyltransférase identifiée qui s'associe à FoxP3 et favorise son acétylation. La délétion conditionnelle de TIP60 dans les Treg conduit au développement de maladies auto-immunes sévères et létales dans des modèles murins, indiquant que TIP60 joue un rôle dominant dans le développement et la fonction des Treg (Xiao et al., 2014). De même, p300, un membre de la famille p300/CBP, est également responsable de l'acétylation de FoxP3 et a pour résultat d'empêcher sa dégradation par le protéasome, augmentant ainsi considérablement sa stabilité. A l'inverse des HAT, les HDAC désacétylent Foxp3, le rendant plus sensible à la dégradation protéasomique (van Loosdregt et al., 2010). Finalement, ces observations mettent en évidence le rôle de l'acétylation dans la régulation de la stabilité d'expression de Foxp3 et par conséquent de la stabilité des lymphocytes T régulateurs.

L'acétylation a été directement impliquée dans le contrôle de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose, ce qui fait des HAT et HDAC des cibles intéressantes pour le traitement de diverses maladies, notamment le cancer. Dans ce contexte des inhibiteurs des HDAC (iHDAC) ont été développés et représentent aujourd'hui une nouvelle classe d'agents thérapeutiques anticancéreux (Bolden et al., 2006; Lin et al., 2006). De plus, étant donné que les HDAC régulent directement la différenciation, la prolifération et la fonction des Treg, par conséquent, les iHDAC présentent un potentiel thérapeutique pour restaurer la tolérance immunitaire et inhiber l'activation des cellules inflammatoires dans les maladies auto-immunes (Nijhuis et al., 2019). En effet, il a été montré que l'inhibition des HDAC entraîne une augmentation du nombre de Treg stables et fonctionnels, et empêche la polarisation de ces derniers vers un profil de Th17 producteurs d'IL-17 (Koenen et al., 2008). L'utilisation des iHDAC peut augmenter la fréquence des Treg Foxp3<sup>+</sup> et induire divers changements moléculaires qui améliorent leur profil d'immunosuppression (von Knethen et al., 2020). En effet, plusieurs études ont démontré l'efficacité des iHDAC notamment dans les modèles



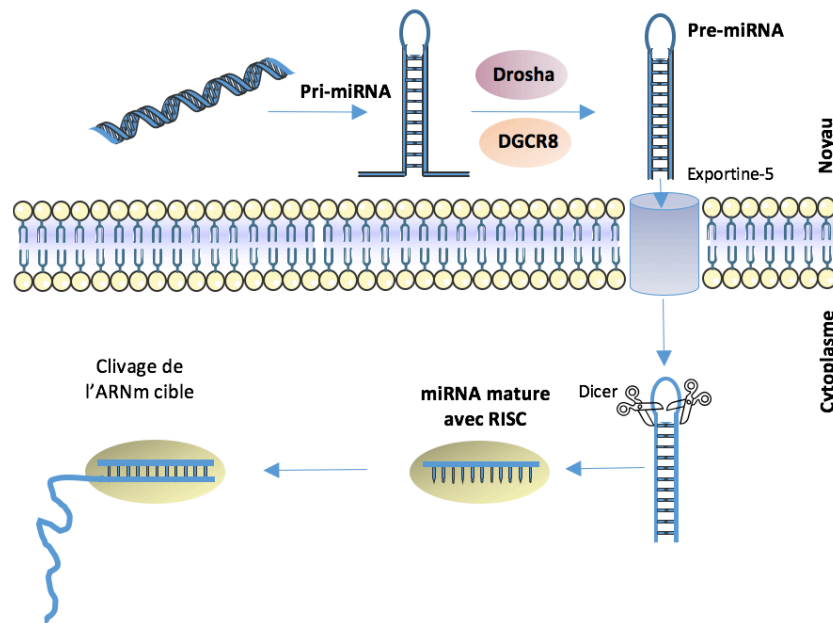
expérimentaux d'arthrite (arthrite expérimentale au collagène) (Oh et al., 2017), de colite (Ali et al., 2018; de Zoeten et al., 2010), ou encore de rejet de greffe (Beier et al., 2011).

### **3. Les microRNA**

Enfin, un autre mécanisme de régulation fait intervenir les micro-RNA (miRNA). Les micro-ARN sont des petits ARN non codants, monocaténares, d'une longueur de 20 à 23 nucléotides, qui ont été découverts pour la première fois chez *C.elegans* en 1993 (Lee et al., 1993). Le rôle principal des miRNA est de réguler la transcription des gènes au niveau post-transcriptionnel, en clivant et en bloquant la traduction des ARN messagers (ARNm).

#### ***1.7. Biogénèse des miRNA***

Les gènes qui codent pour les miRNA sont transcrits par l'ARN polymérase II en transcrits primaires, appelés pri-miRNA. Dans le noyau, le pri-miR est clivé par les enzymes Drosha et DGCR8 (DiGeorge syndrome Critical Region 8 homologue) en une molécule d'ARN intermédiaire d'environ 70 nucléotides qui est le précurseur des miRNA (pré-miR) (Lee et al., 2003). Les pré-miR sont ensuite transportés vers le cytoplasme à travers l'exportine 5 (Yi et al., 2003) qui se lie aux ARN double-brins, puis dans le cytoplasme, ils sont transformés par l'enzyme cytoplasmique ARNase III « Dicer » en miRNA double brin d'environ 22 nucléotides (Denli et al., 2004). Dans cette structure à double brin, un brin mature et fonctionnel joue le rôle du « brin guide », quant à l'autre « brin passager », il subit une dégradation. Le brin guide est intégré dans le complexe multi-protéique RISC (RNA-Induced Silencing Complex) qui est composé d'enzymes telles que Dicer et Ago2 (Argonaute protein-2) et est ensuite transporté par l'importine 8 vers son ARNm cible. Enfin, le miRNA reconnaît son ARNm cible, il se lie à la séquence 3'UTR (3' Untranslated Region) de ce dernier par complémentarité de séquences et induit la suppression de sa traduction.



**Figure 16 : Biogénèse des miRNA, adapté de Soltanzadeh-Yamchi et al., 2018.**

### **1.8. Rôle des miRNA dans la stabilité des Treg**

Les miRNA participent à la régulation du développement, de l'homéostasie, ainsi que de la fonction des cellules immunitaires dont les Th17 et les Treg. Il a été montré qu'une déficience dans la régulation des composants de la biogénèse des miRNA, tels que Drosha et Dicer, entraîne des manifestations auto-immunes chez la souris (Chong et al., 2008). De ce fait, beaucoup d'études se sont penchées sur l'identification des rôles des différents miRNA dans la prolifération, la différenciation et la fonction des Treg. En effet, plusieurs miRNA sont impliqués de manière directe ou indirecte dans la régulation de l'expression de FoxP3 et dans le maintien de sa stabilité, par exemple miR155, miR146a, miR126 ou encore miR10a. Une diminution de l'expression de miR146a, corrélée à l'inflammation articulaire a été observée dans les Treg des patients atteints de PR active. Ces Treg ont développé un phénotype pro-inflammatoire caractérisé par la production de cytokines effectrices telles que l'IFN- $\gamma$ , le TNF $\alpha$  et l'IL-17, due à une surexpression et une sur-activation de STAT1, qui est une cible de miR146a. Ainsi, miR-146a empêche le développement d'un phénotype pro-inflammatoire des Treg via une modulation de STAT1 et sa diminution dans la PR contribue à la pathogénèse de la maladie (Zhou et al., 2015). Pareillement, dans cette même étude, une diminution de l'activation de miR155 en réponse à une stimulation TCR dans les Treg a également été observée chez les patients atteints de PR. miR155 est fortement exprimé dans les Treg et son expression est régulée par FoxP3. Une déficience en miR155 a été associée à une réduction

du nombre de Treg dans le thymus et la rate chez la souris (Kohlhaas *et al.*, 2009), ce qui suggère que ce micro-RNA est nécessaire au développement des Treg et est indispensable à leur homéostasie, leur prolifération ou à leur survie dans le thymus et en périphérie (Lu *et al.*, 2009). De plus, miR155 a pour cible SOCS1 (Suppressor Of Cytokine Signaling protein1) qui inhibe la voie de signalisation en aval de l'IL-2. Ainsi, miR155 module la signalisation de l'IL-2 en levant l'inhibition induite par SOCS1, et favorise ainsi l'activation de STAT5 et par conséquent le maintien de la stabilité des Treg.

Un autre miRNA nécessaire au maintien de la stabilité des Treg est le miR10a. En effet, en ciblant Bcl-6 et son co-represseur Ncor2 (Nuclear Receptor Corepressor 2), miR10a empêche la conversion des Treg en lymphocytes T folliculaires (TFh) mais aussi en Th17 (Takahashi *et al.*, 2012). De plus, Jeker *et al.* ont montré que miR10a est spécifiquement exprimé dans les Treg et que son inhibition peut entraîner une réduction de l'expression de FoxP3 *in vitro* (Jeker *et al.*, 2012).

miR126 est également exprimé par les Treg et son expression est régulée positivement quand ils sont activés. Il a été rapporté que miR126 est impliqué dans le maintien de la stabilité d'expression de FoxP3 en modulant la voie PI3K-AKT dans les Treg via le ciblage de la sous-unité p85 $\beta$  de la PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase) (Guo *et al.*, 2008). Une déficience en miR126 a été à l'origine d'une réduction de l'expression de FoxP3 et d'une altération de la fonction suppressive des Treg *in vitro* et *in vivo* (Qin *et al.*, 2013).

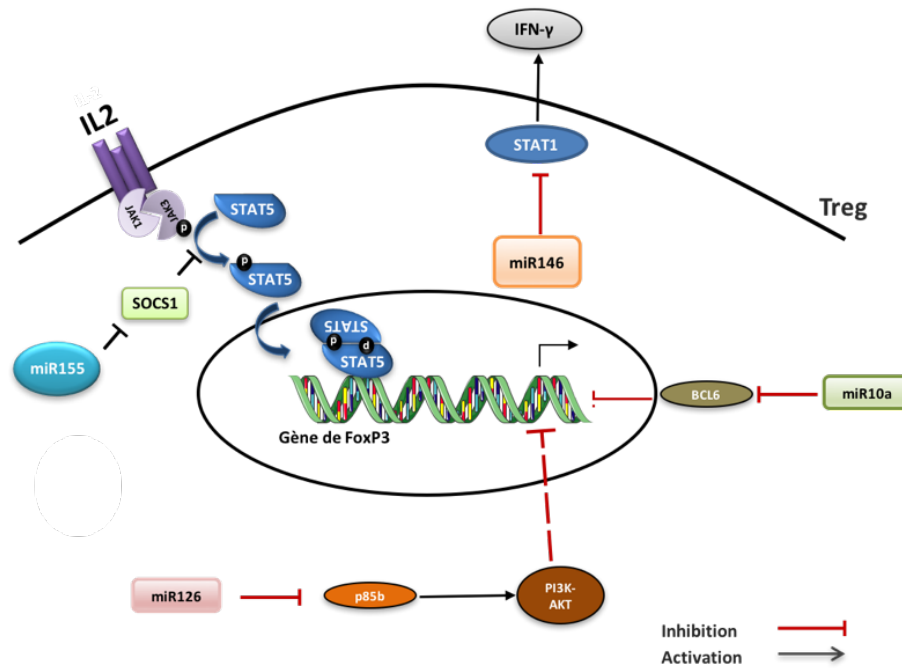


Figure 17 : Rôle des miRNA dans la stabilité des Treg, adapté de Soltanzadeh-Yamchi et al., 2018.

### G. Tableau récapitulatif des marqueurs impliqués dans la caractérisation phénotypique et fonctionnelle et dans la stabilité des Treg

MARQUEUR	DEFINITION ET FONCTION	REFERENCE
CD25	Chaîne $\alpha$ du récepteur de l'IL-2 est exprimé de manière constitutive par les Treg, mais aussi par les Teff activés	(Jonuleit et al., 2001; Sakaguchi et al., 1995)
CD39	Le CD39 est une ectoenzyme apyrase nécessaire à la fonction immunosuppressive des Treg en association avec CD73 par perturbation du métabolisme des cellules cibles  Son expression caractérise les Treg fortement immunosuppressifs	(Deaglio et al., 2007; Thiolat et al., 2014a)
CD62L	L-selectin ou LECAM1 (Leukocyte-Endothelial Cell Adhesion Molecule 1) est présent sur tous les lymphocytes T, les lymphocytes B et les NK et il ne contribue pas à la sélection des Treg Son expression est associée à une forte activité immunosuppressive des Treg	(Lange et al., 2011)

CD73	Le CD73 est une ecto-5'-nucléotidase nécessaire à la fonction suppressive des Treg en association avec le CD39	(Deaglio et al., 2007)
CD127	Chaîne $\alpha$ du récepteur de l'IL-7 (IL7-R $\alpha$ ), son expression est inversement corrélée à l'expression de FoxP3 et à l'activité suppressive des Treg chez l'humain. La combinaison du profil d'expression CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>low</sup> permet d'isoler les Treg FoxP3 <sup>+</sup> humains  Chez la souris, les Treg expriment des niveaux relativement plus faibles de CD127 que les Teff. Cependant, les Treg ICOS <sup>+</sup> et CD103 <sup>+</sup> expriment un niveau élevé de CD127	(Cozzo et al., 2003; Liu et al., 2006)
CD152	<b>CTLA-4</b> est une molécule inhibitrice exprimée par les Treg. Son expression est corrélée à l'activité immunosuppressive des Treg  CTLA-4 sur les Treg inhibe de manière compétitive la liaison du CD28 à ses ligands CD80/CD86 bloquant ainsi le signal de co-stimulation nécessaire à l'activation des T effecteurs	(Jonuleit et al., 2001; Wing et al., 2008)
CD223	<b>LAG3</b> (Lymphocyte Activating 3) identifie les Treg activés et totalement différenciés avec une forte activité immunosuppressive	(Huang et al., 2004)
GARP	GARP (Glycoprotein A Repetitions Predominant) est fortement exprimé par les Treg activés et contribue à leur activité suppressive en favorisant l'expression du TGF $\beta$	(Wang et al., 2008)
GITR	Important pour la différenciation des Treg thymique. Son expression est associée à une forte activité suppressive et à une augmentation de la prolifération des Treg	(Alunno et al., 2012; Liao et al., 2010; Mahmud et al., 2014)
CD79	<b>PD1</b> (Programmed cell Death protein 1) est une molécule inhibitrice exprimée à la surface des Treg, elle a pour ligands PDL-1 et PDL-2  La signalisation PD-1 dans les Treg favorise leur activité suppressive et leur expansion	(Park et al., 2015)

HLA-DR	Chez l'humain, il identifie les Treg matures, exprimants fortement FoxP3 et impliqués dans la suppression dépendante du contact cellulaire	(Baecher-Allan et al., 2006)
CD278	Chez l'humain, <b>ICOS</b> (CD278) identifie les Treg mémoires sécréteurs d'IL-10 mais ne semble pas modifier leur activité suppressive  Chez la souris, les Treg ICOS <sup>+</sup> produisent des quantités élevées d'IL-10 et sont plus suppressifs que les Treg ICOS <sup>-</sup>  ICOS possède également un rôle dans le maintien de la stabilité fonctionnelle de FoxP3, nécessaire pour le maintien de la fonction des Treg dans la périphérie	(Ito et al., 2008)
CD304	<b>Neuropilin-1</b> (CD304) est exprimée par les cellules dendritiques, les NK et par les Treg  Elle contribue à la fonction et la stabilité des Treg et permet distinguer les pTreg des tTreg chez la souris	(Sidaway, 2017; Weiss et al., 2012)
BLIMP-1	Blimp1 agit en synergie avec IRF4 pour induire la différenciation des Treg et leur fonction par l'expression de l'IL-10 et le Granzyme B, en particulier dans les tissus non lymphoïdes  Blimp1 prévient la méthylation de foxp3 et est associé à la stabilité des Treg dans les sites de l'inflammation	(Cretney et al., 2011; Garg et al., 2019)
CD120B	<b>TNFR2</b> (récepteur de type 2 du TNF $\alpha$ ) est exprimé par les cellules immunitaires et est associé à la stabilité des Treg et à leur fonction immunosuppressive  Il est up-régulé dans les Treg activés et promeut leur survie dans des conditions inflammatoires	(Nagar et al., 2010; Santinon et al., 2020)
HELIOS	Facteur de transcription exprimé dans les tTreg, mais aussi dans les pTreg. Il est associé à la	(Chougnnet and Hildeman, 2016; Kim et al., 2015)

	stabilité de l'expression de FoxP3 et le maintien de la fonction suppressive des Treg	
EZH2	EZH2 est une histone méthyl transférase essentielle à la différenciation des Treg et au maintien de leur stabilité et de leur activité suppressive  Elle peut former un complexe avec FoxP3, nécessaire au maintien de l'identité des Treg après leur activation	(DuPage et al., 2015; Goswami et al., 2018)
STAT5	Facteur de transcription essentiel à l'induction et au maintien de l'expression de FoxP3 et par conséquent à la stabilité des Treg et à leur fonction régulatrice	(Burchill et al., 2007b; Passerini et al., 2008)
MIR-155	miR-155 module la signalisation de l'IL-2 en inhibant l'expression de SOCS1 favorisant ainsi l'activation de STAT5 et par conséquent le maintien de la stabilité des Treg	(Lu et al., 2009)
MIR-126	miR-126 est exprimé par les Treg activés. Il maintient la stabilité d'expression de FoxP3 en modulant la voie PI3K-AKT dans les Treg via le ciblage de la sous-unité p85 $\beta$ de la PI3K	(Guo et al., 2008)
MIR-146	miR-146a empêche le développement d'un phénotype pro-inflammatoire des Treg via une modulation de STAT1	(Zhou et al., 2015)
MIR-10A	miR-10a participe à la stabilité des Treg en empêchant leur conversion en TFh ou en Th17 via l'inhibition de l'expression de Bcl-6 et son co-represseur Ncor2	(Takahashi et al., 2012)

**Tableau 4 : Marqueurs impliqués dans la fonction et la stabilité des Treg.**





# I. OBJECTIFS



La polyarthrite rhumatoïde (PR) et la spondyloarthrite (SpA) sont deux maladies articulaires inflammatoires chroniques différentes d'un point de vue clinique et physiopathologique, mais qui présentent des caractéristiques communes. Une altération de la fonction des lymphocytes T régulateurs en particulier a été décrite dans les deux pathologies, mais les mécanismes moléculaires à l'origine de ce défaut fonctionnel ne sont pas clairement élucidés.

Les Treg sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription FoxP3, dont la stabilité est régulée par différents mécanismes moléculaires transcriptionnels et épigénétiques. Ces mécanismes de régulation de l'expression de FoxP3 participent au maintien de l'identité des Treg et en l'occurrence, à leur activité immunosuppressive.

Notre hypothèse est que dans l'inflammation articulaire chronique (PR et SpA), les Treg présentent une modification de l'expression de certains facteurs impliqués dans le maintien de leur identité. De ce fait, ils deviendraient instables et perdraient leur activité suppressive. Ainsi, notre premier objectif a été d'évaluer la stabilité des Treg au cours de l'inflammation articulaire chronique chez des patients atteints de PR et de SpA, en évaluant l'expression des facteurs impliqués dans le maintien de la stabilité des Treg.

Notre deuxième objectif a été de comprendre les mécanismes mis en jeu par les biothérapies dans la PR et la SpA. En effet, actuellement il est bien établi que les thérapies ciblées n'exercent pas leurs effets uniquement en inhibant leurs cibles mais pourraient également modifier la réponse immunitaire en modifiant le phénotype ou l'activation de certaines populations cellulaires dont les Treg. Nous avons récemment montré (article 1) que l'effet thérapeutique des anti-TNF $\alpha$  chez les patients PR est lié à une augmentation d'une sous-population de Treg exprimant le TNFR2, molécule associée à la stabilité de FoxP3. Sur la base de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que la réponse au traitement par les thérapies ciblées serait dépendante d'une restauration de la stabilité des Treg. Ainsi notre second objectif a été d'évaluer l'impact des biothérapies sur la stabilité des Treg chez les patients atteints de PR ou de SpA.



## **II. RESULTATS**



## ARTICLE 1 :

### **TNFR2 associates with FoxP3 stability and identifies a subset of regulatory T cells that are specifically expanded by anti-TNF treatments in rheumatoid arthritis.**

François Santinon<sup>a,b</sup>, Maxime Batignes<sup>a,b\*</sup>, Majda Lyna Mebrek<sup>a,b\*</sup>, Jérôme Biton<sup>a,b</sup>, Gaëlle Clavel<sup>a,b,c</sup>, Roxane Hervé<sup>a,b</sup>, Delphine Lemeiter<sup>a,b</sup>, Magali Breckler<sup>a,b</sup>, Florence Busato<sup>d</sup>, Jorg Tost<sup>d</sup>, Marianne Ziol<sup>e,f</sup>, Marie-Christophe Boissier<sup>a,b,g</sup>, Patrice Decker<sup>a,b</sup>, Luca Semerano<sup>a,b,g</sup> and Natacha Bessis<sup>a,b</sup>.

<sup>a</sup>UMR 1125 INSERM, Bobigny, France, <sup>b</sup> Sorbonne Paris Cité Université Paris 13, Bobigny, France. <sup>c</sup> Department of Internal Medicine, Fondation Rothschild, Paris, France. <sup>d</sup>Laboratory for Epigenetics and Environment, Centre National de Recherche en Génomique Humaine, CEA-Institut de Biologie François Jacob, Evry, France. <sup>e</sup>Department of pathology, University Hospital Jean Verdier, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (APHP), Bondy, France. <sup>f</sup>Unité Mixte de Recherche 1162, Génomique Fonctionnelle des Tumeurs Solides, INSERM, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, Paris, France. <sup>g</sup>Rheumatology Department, GH Avicenne—Jean Verdier—René Muret, APHP, Bobigny, France.

\*equal contribution

***Arthritis and Rheumatology. 2020 April; Volume 72 (No: 4): pp 576-587; DOI 10.1002/art.41134***

L'objectif de ce travail était d'évaluer le rôle du TNFR2 exprimé par les Treg dans le contrôle de l'inflammation. Nous avons d'abord montré que le TNF $\alpha$  permettait, *in vitro*, un maintien et une prolifération des Treg en culture via sa liaison au TNFR2 et non au TNFR1.

En analysant la méthylation du TSDR des lymphocytes T régulateurs exprimant ou non le TNFR2, nous avons de plus démontré pour la première fois une méthylation plus importante de cette région dans les Treg TNFR2<sup>-</sup> comparé aux Treg TNFR2<sup>+</sup>. Il existe donc un lien entre l'expression du TNFR2 et la stabilité de FoxP3.

*In vivo*, dans un modèle de polyarthrite rhumatoïde (DTHA) et un modèle de psoriasis induit par l'imiquimod, nous avons démontré le rôle protecteur des Treg exprimant le TNFR2. Nous avons ensuite mis en évidence le mécanisme par lequel le TNFR2 pourrait induire la stabilité de l'expression de FoxP3, en montrant que la signalisation TNF $\alpha$ -TNFR2 augmente la phosphorylation de STAT5 induite par l'IL-2 dans les Treg *in vitro*.



Enfin, nous avons mené une étude longitudinale chez des patients atteints de PR et de SpA et nous avons montré pour la première fois que les anti-TNF $\alpha$ , dont l'éta nercept, augmentent la fréquence des Treg-TNFR2<sup>+</sup> chez les patients PR répondeurs. Cet effet des anti-TNF $\alpha$  sur les Treg TNFR2<sup>+</sup> est spécifique des anti-TNF $\alpha$  et de la PR, puisque ce n'est pas le cas avec d'autres

biothérapies telles que les anti-IL-6R (tocilizumab), ou dans une autre pathologie telle que la SpA. Ainsi, les anti-TNF $\alpha$ , en induisant l'expression du TNFR2 par les Treg, pourraient exercer leur activité anti-inflammatoire en augmentant la stabilité des Treg. Ce travail ouvre la voie à de nouvelles perspectives notamment l'investigation de l'impact des biothérapies sur la stabilité des Treg au cours de l'inflammation chronique.

En tant que co-deuxième auteur de cet article, j'ai participé à la plupart des expériences et j'ai démontré l'implication de pSTAT5 dans la stabilité des Treg médiée par le TNFR2.



# Involvement of Tumor Necrosis Factor Receptor Type II in *Foxp3* Stability and as a Marker of Treg Cells Specifically Expanded by Anti-Tumor Necrosis Factor Treatments in Rheumatoid Arthritis

François Santinon,<sup>1</sup> Maxime Batignes,<sup>1</sup> Majda Lyna Mebrek,<sup>1</sup> Jérôme Biton,<sup>1</sup> Gaëlle Clavel,<sup>2</sup> Roxane Hervé,<sup>1</sup> Delphine Lemeiter,<sup>1</sup> Magali Breckler,<sup>1</sup> Florence Busato,<sup>3</sup> Jorg Tost,<sup>3</sup>  Marianne Zioli,<sup>4</sup> Marie-Christophe Boissier,<sup>5</sup> Patrice Decker,<sup>1</sup> Luca Semerano,<sup>5</sup> and Natacha Bessis<sup>1</sup> 

**Objective.** To study the involvement of Treg cells expressing tumor necrosis factor receptor type II (TNFR<sub>II</sub>) in exerting control of inflammation in experimental models and in the response to anti-TNF treatments in patients with rheumatoid arthritis (RA) or spondyloarthritis (SpA).

**Methods.** The role of TNFR<sub>II</sub> in Treg cells was explored using a multilevel translational approach. Treg cell stability was evaluated by analyzing the methylation status of the *Foxp3* locus using bisulfite sequencing. Two models of inflammation (imiquimod-induced skin inflammation and delayed-type hypersensitivity arthritis [DTHA]) were induced in TNFR<sub>II</sub><sup>-/-</sup> mice, with or without transfer of purified CD4+CD25+ cells from wild-type (WT) mice. In patients with RA and those with SpA, the evolution of the TNFR<sub>II</sub><sup>+</sup> Treg cell population before and after targeted treatment was monitored.

**Results.** *Foxp3* gene methylation in Treg cells was greater in TNFR<sub>II</sub><sup>-/-</sup> mice than in WT mice (50% versus 36.7%). In cultured Treg cells, TNF enhanced the expression, maintenance, and proliferation of *Foxp3* through TNFR<sub>II</sub> signaling. Imiquimod-induced skin inflammation and DTHA were aggravated in TNFR<sub>II</sub><sup>-/-</sup> mice ( $P < 0.05$  for mice with skin inflammation and  $P < 0.0001$  for mice with ankle swelling during DTHA compared to WT mice). Adoptive transfer of WT mouse Treg cells into TNFR<sub>II</sub><sup>-/-</sup> mice prevented aggravation of arthritis. In patients with RA receiving anti-TNF treatments, but not those receiving tocilizumab, the frequency of TNFR<sub>II</sub><sup>+</sup> Treg cells was increased at 3 months of treatment compared to baseline (mean  $\pm$  SEM 65.2  $\pm$  3.1% versus 49.1  $\pm$  5.5%;  $P < 0.01$ ). In contrast, in anti-TNF-treated patients with SpA, the frequency of TNFR<sub>II</sub><sup>+</sup> Treg cells was not modified.

**Conclusion.** TNFR<sub>II</sub> expression identifies a subset of Treg cells that are characterized by stable expression of *Foxp3* via gene hypomethylation, and adoptive transfer of TNFR<sub>II</sub>-expressing Treg cells ameliorates inflammation in experimental models. Expansion and activation of TNFR<sub>II</sub><sup>+</sup> Treg cells may be one of the mechanisms by which anti-TNF agents control inflammation in RA, but not in SpA.

## INTRODUCTION

Tumor necrosis factor (TNF) is a potent proinflammatory cytokine involved in the initiation, coordination, and perpetuation of

inflammation and the immune response (1). TNF exerts its effects by binding to 2 cell-membrane TNF receptors (TNFRs), TNFR<sub>I</sub> (p55) and TNFR<sub>II</sub> (p75) (2). Anti-TNF agents are effective in a broad spectrum of chronic inflammatory diseases such as rheumatoid

Supported by unrestricted research grants from Pfizer (within the Projet Passerelle 2016), Sandoz, the French Society for Rheumatology, and the Institut Fédératif de Recherche Biomédicale of Paris 13 University.

<sup>1</sup>François Santinon, PhD, Maxime Batignes, PhD, Majda Lyna Mebrek, MSc, Jérôme Biton, PhD, Roxane Hervé, PhD, Delphine Lemeiter, Magali Breckler, PhD, Patrice Decker, PhD, Natacha Bessis, PhD: INSERM UMR 1125, Université Sorbonne Paris Cité, and Université Paris 13, Bobigny, France; <sup>2</sup>Gaëlle Clavel, MD, PhD: INSERM UMR 1125, Université Sorbonne Paris Cité, Université Paris 13, and Fondation Adolphe De Rothschild, Paris, France; <sup>3</sup>Florence Busato, MSc, Jorg Tost, PhD: Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives, Evry, France; <sup>4</sup>Marianne Zioli, MD, PhD: Hôpital Jean-Verdier, AP-HP, Bondy, INSERM UMR 1162, Université Paris Descartes, and Université Paris Diderot, Paris, France; <sup>5</sup>Marie-Christophe Boissier, MD, PhD, Luca Semerano, MD, PhD: INSERM UMR 1125, Université Sorbonne

Paris Cité, Université Paris 13, Hôpital Avicenne, Hôpital Jean-Verdier, Hôpital René-Muret, and AP-HP, Bobigny, France.

Dr. Batignes and Ms Mebrek contributed equally to this work.

Dr. Boissier has received speaking fees from Novartis, Eli Lilly, and Peptinov (less than \$10,000 each) and research support from Diacurate. Dr. Semerano has received consulting fees, speaking fees, and/or honoraria from Bristol-Myers Squibb, MSD, Pfizer, and Roche-Chugai (less than \$10,000 each) and research support from Pfizer. No other disclosures relevant to this article were reported.

Address correspondence to Natacha Bessis, PhD, Université Paris 13 Université Sorbonne Paris Cité, INSERM UMR 1125, 1 Rue de Chablis, 93000 Bobigny, France. E-mail: natacha.bessis@univ-paris13.fr.

Submitted for publication January 17, 2019; accepted in revised form October 8, 2019.

arthritis (RA), spondyloarthritis (SpA), inflammatory bowel disease, and psoriasis (3–6).

Besides its well-characterized proinflammatory role, TNF also exerts antiinflammatory and immunosuppressive effects (7). Administration of TNF delays the recurrence of diabetes in non-obese diabetic mice (8) and ameliorates lupus in NZB/NZW mice (9), but anti-TNF agents aggravate multiple sclerosis (10).

Most of the proinflammatory effects of TNF are generally considered to be mediated by TNFR1 (11), whereas the immunosuppressive effects of TNF are considered to be mediated by TNFR2 (12). In particular, the antiinflammatory effects of TNF may be dependent on its ability to activate and expand TNFR2-expressing Treg cells (13–15). Treg cells are essential in the control of a variety of immune responses, including allergy, autoimmunity, inflammation, and tumor immunity. Treg cells play a vital role in tolerance to self and are defective in a number of human autoimmune diseases, including RA (16). Moreover, expression of TNFR2 in the joints has been shown to exert a physiologic role in the resolution of inflammation (17). We and others have shown that anti-TNF biologic agents restore the suppressive capacities of Treg cells in a TNF-dependent arthritis model (13) and in RA patients (18). In this context, Nguyen et al recently showed in vitro that adalimumab, an anti-TNF monoclonal antibody, but not the receptor fusion protein etanercept, binds to membrane TNF on RA monocytes and promotes Treg cell expansion via enhanced TNFR2 signaling (19). This result is of paramount interest because it suggests that anti-TNF treatments may block the proinflammatory activity of TNF while, in the meantime, promoting its immunosuppressive properties.

To further characterize TNFR2-positive Treg cells and their involvement in the control of inflammation and response to treatment, we adopted a multilevel translational approach. We first studied the effect of TNFR2 in vitro on Treg cell survival and *Foxp3* methylation, and then explored the effect of TNFR2 deletion in vivo in 2 experimental models of inflammation. Finally, we longitudinally followed up the evolution of TNFR2-positive Treg cell subpopulations during anti-TNF treatments both in patients with RA and in patients with spondyloarthritis (SpA).

## MATERIALS AND METHODS

**Patients and healthy donors.** Individuals meeting the American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism (EULAR) revised criteria for RA (20) and qualifying for biologic treatment were selected. Eligible participants were required to have either a Disease Activity Score in 28 joints (DAS28) of  $\geq 3.2$  (21) or evidence of erosive disease on imaging regardless of the DAS28 score. Seventeen participants starting anti-TNF treatment (8 with etanercept, 5 with infliximab, 2 with golimumab, 1 with adalimumab, and 1 with certolizumab) (mean  $\pm$  SD age  $56.8 \pm 12.4$  years [range 29–72 years], mean  $\pm$  SD disease duration  $15.5 \pm 8.3$  years [range 2–32 years]; 16 female,

1 male) and 6 participants starting tocilizumab (mean  $\pm$  SD age  $60.3 \pm 13.3$  years [range 39–73 years], mean  $\pm$  SD disease duration  $7 \pm 5.2$  years [range 2–13 years]; 3 female, 3 male) were recruited. All treatments were administered according to the label dosing recommendation. According to the EULAR response criteria (22), good responders were defined as those who had a decrease in the DAS28 of  $>1.2$  points, moderate responders were those with a decrease in DAS28 of 0.6–1.2 points, and nonresponders were those with a stable increase or decrease in DAS28 of  $<0.6$  points.

We also recruited 20 individuals fulfilling the Assessment of SpondyloArthritis international Society criteria for axial or peripheral SpA (23) who were starting anti-TNF treatment (4 with etanercept, 9 with infliximab, 1 with adalimumab, 2 with certolizumab pegol, and 4 with golimumab) (mean  $\pm$  SD age  $50 \pm 12.6$  years [range 36–84 years], mean  $\pm$  SD disease duration  $13.8 \pm 13.3$  years [range 12–60 years]; 11 female, 9 male). According to the EULAR recommendations, patients with SpA received anti-TNF treatment if the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) was  $>40$  (24) or if they needed daily treatment with nonsteroidal antiinflammatory drugs independent of the BASDAI score. Individuals were considered to be responders if they experienced a decrease in the BASDAI score of below 40 (of 100).

All patients underwent 2 blood sample collections: 1 before the first biologic treatment administration, and the second after 3 months of treatment (at the time of first clinical response evaluation). The study was approved by the local ethics committee (CPP Paris Ile de France, approval no. NI-2016-11-01), and informed consent was obtained from all patients before study entry.

In addition, blood samples (stored in EDTA) from random healthy individuals, obtained from a blood bank in Bobigny, France, were used for in vitro culture experiments.

**Mice.** Homozygous TNFR2<sup>-/-</sup> mice were generated by crossing wild-type (WT) C57BL/6 mice (Janvier) and TNFR1<sup>-/-</sup>/TNFR2<sup>-/-</sup> double-deficient mice (generated and kindly provided by Dr. Muazzam Jacobs) (25). We obtained TNFR1<sup>+/+</sup>/TNFR2<sup>-/-</sup> mice and TNFR1<sup>-/-</sup>/TNFR2<sup>-/-</sup> mice, but did not obtain any TNFR1<sup>-/-</sup>/TNFR2<sup>+/+</sup> mice. The TNFR1<sup>+/+</sup>/TNFR2<sup>-/-</sup> mice and the TNFR1<sup>-/-</sup>/TNFR2<sup>+/+</sup> mice were simply renamed as TNFR2<sup>-/-</sup> mice and TNFR1<sup>-/-</sup> mice, respectively. The genotypes of the different mouse strains were confirmed by polymerase chain reaction (PCR) analysis of tail biopsy specimens (the primer sequences used are available from the corresponding author upon request). TNFR2<sup>-/-</sup> mice and TNFR1<sup>-/-</sup> mice were crossed, bred, and housed in our animal facility (agreement no. C93-008-01).

In some experiments, we used 6–12-week-old mice belonging to the C57BL/6 strain (purchased from Janvier). All procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of the Paris 13 University and the Charles Darwin National Animal Ethics Committee.



**Animal models of inflammation.** *Generation of imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice.* Details regarding the induction and evaluation of psoriasis in an animal model of imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation are available from the corresponding author upon request.

*Induction and assessment of delayed-type hypersensitivity arthritis (DTHA) in mice.* On day -7, 10-week-old C57BL/6 mice were injected intradermally at the base of the tail with 250  $\mu$ g methylated bovine serum albumin (mBSA) emulsified in complete Freund's adjuvant (CFA; Difco). Four days later (day -3), the mice received 200  $\mu$ g anti-mouse type II collagen antibody cocktail (Chondrex), containing the clones A2-10 (IgG2a), F10-21 (IgG2a), D8-6 (IgG2a), D1-2G (IgG2b), and D2-112 (IgG2b), intravenously in 100  $\mu$ l phosphate buffered saline (PBS) (26). On day 0, mice were challenged with 200  $\mu$ g mBSA subcutaneously in 20  $\mu$ l PBS in the left hind foot pad. The right hind foot pad received 20  $\mu$ l PBS only and was used as a control.

On day 0 just before mBSA challenge, thicknesses of the left paw and left ankle were measured using an electronic caliper (Mitutoyo) (baseline measurement). Subsequently, paw and ankle swelling was measured, with results expressed as the difference in the thickness of the left paw or ankle compared to the baseline measurement.

Histologic changes in the paws were assessed on sections stained with hematoxylin and eosin and Safranin O. The extra-articular infiltration of inflammatory cells and arthritic changes (each scored on a scale of 0–3) were assessed separately. Arthritic changes were assessed on the ankle and tarsal joints, including scores for synovitis, cartilage destruction, and bone erosion. The sum score of histologic features was the mean of the 4 scores (extraarticular infiltration, synovitis, cartilage destruction, and bone erosion).

**Cell preparation and flow cytometry.** Details on the preparation of cells and tissue samples and the staining of mouse and human cells for flow cytometry, as well as the purification of lymphocytes, are available from the corresponding author upon request.

**Adoptive Treg cell transfer experiments and assessment of Treg cell effects.** CD4+CD25+ cells in splenocytes obtained from 12 naive mice were purified by magnetic separation. A total of  $7 \times 10^5$  purified cells (95% purity) was transferred by retroorbital injection (100  $\mu$ l) into the left foot pad of 11 TNFR1<sup>-/-</sup> mice 2 days before mBSA challenge. Control TNFR1<sup>-/-</sup> mice or WT littermate mice (each n = 12) received PBS instead. Details on the in vitro culture of cells and measurement of Treg cell proliferation and viability are available from the corresponding author upon request.

CD4+CD25- effector T (Teff) cells and CD4+CD25+ Treg cells were purified from the spleens of mice with DTHA at the time of euthanasia (details available from the corresponding

author upon request). Teff cells were prelabeled with 5 mM 5,6-carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE; Invitrogen) for 10 minutes at 37°C. CFSE-labeled Teff cells ( $1 \times 10^5$ ) were cocultured in flat-bottomed 96-well plates with Treg cells ( $1 \times 10^5$ ) (ratio 1:1) in RPMI 1640 with 10% fetal calf serum, 100 units/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 50 mM 2-mercaptoethanol, 1M HEPES, and 5  $\mu$ g/ml soluble anti-CD3 (clone 2C11; BD Biosciences). Controls were non-CFSE-labeled Teff cells ( $1 \times 10^5$ ) instead of Treg cells. Antigen-presenting cells ( $1 \times 10^5$  splenocytes from naive C57BL/6 mice) that had been previously treated with mitomycin (50  $\mu$ g/ml) for 45 minutes at 37°C were added to the culture medium. Cells were then incubated at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. After 3 days of culture, the cells were stained with allophycocyanin-labeled anti-CD4 antibody (clone RM4-5; BioLegend) and the proliferation of Teff cells was determined by flow cytometry, to measure CFSE dilution. Data were analyzed using BD FACSDiva software (BD Biosciences).

#### DNA methylation analysis by pyrosequencing.

Genomic DNA was extracted from purified CD4+CD25+ or CD4+CD25- cells using an All Prep DNA/RNA mini kit (Qiagen). Quantitative DNA methylation analysis involved pyrosequencing bisulfite-treated DNA (27). DNA (650 ng to 1  $\mu$ g) was bisulfite-converted using an EpiTect 96 Fast Bisulfite kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.

The Treg-specific demethylated region (TSDR) of *Foxp3* was amplified using 30 ng bisulfite-treated mouse genomic DNA and 5 pmoles forward and reverse primers, 1 of which was biotinylated (details on the sequences of the oligonucleotides used for PCR amplification and pyrosequencing are available from the corresponding author upon request). Reaction conditions comprised 1 $\times$  HotStarTaq buffer supplemented with 1.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 400  $\mu$ M dNTPs, and 1.8 units HotStarTaq polymerase (Qiagen) in a 25- $\mu$ l volume. The PCR program consisted of a denaturing step of 15 minutes at 95°C followed by 50 cycles of 30 seconds at 95°C, 30 seconds at 61°C, and 15 seconds at 72°C, with a final extension of 5 minutes at 72°C. An amount of 10–15  $\mu$ l PCR product was rendered single-stranded using a previously described method (27), and 4 pmoles of the respective sequencing primer was used for analysis.

Quantitative DNA methylation analysis was carried out on a PyroMark Q24 Advanced system with a PyroMark Q24 Advanced CpG reagent kit (Qiagen). The results were analyzed using PyroMark Q24 Advanced software version 3.0.0.

**Statistical analysis.** Data distribution was preliminarily 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 test (analysis of variance [ANOVA], *t*-test) or nonparametric test (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney test) was used. For comparison of data in some of the

cell culture experiments, two-way ANOVA was used. For the study of patient-specific parameters (disease activity scores, Treg cell frequency) before and after biologic treatment, a paired *t*-test (Wilcoxon's test) was used. For differences between groups, *P* values less than 0.05 were considered statistically significant. Data are presented as the mean ± SEM. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software version 6.0.

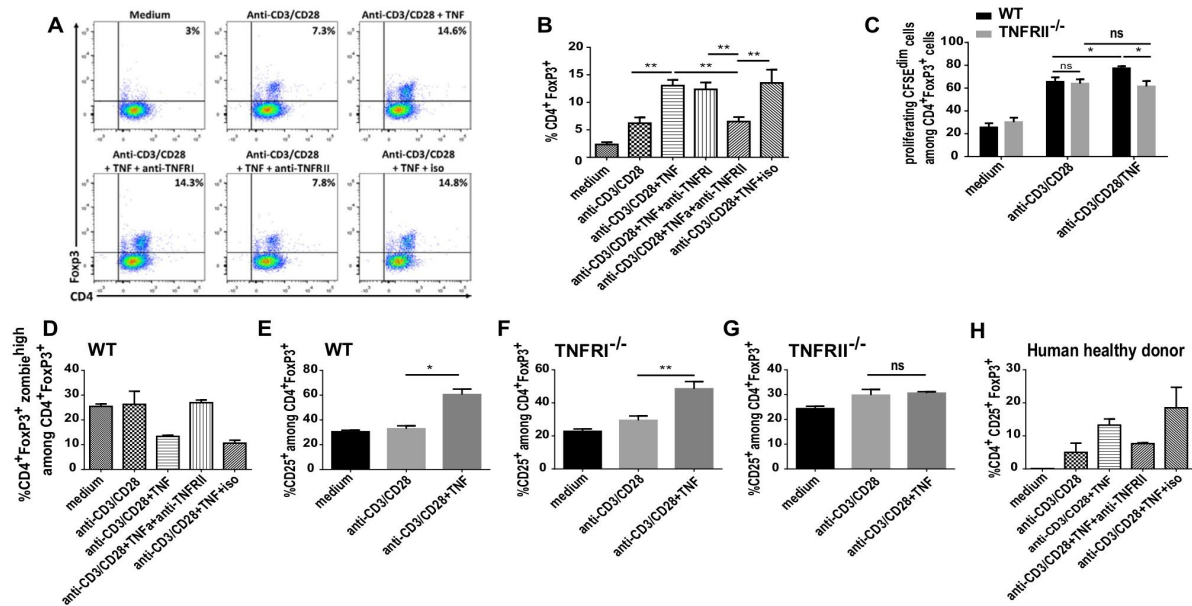
**RESULTS**

**Maintenance of *Foxp3* expression and Treg cell proliferation by TNF in vitro through TNFR11, but not TNFR1, signaling.** To assess the effect of TNF on the maintenance of *Foxp3* expression, we evaluated the impact of exogenous TNF on purified Treg cells stimulated with soluble anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. Alone, T cell receptor and costimulation signals were not sufficient to maintain *Foxp3* expression after 72 hours

of culture. In contrast, the addition of TNF partly restored the expression of *Foxp3*, exhibiting a dose-response effect, as previously described (15). Moreover, TNF decreased the frequency of CD39+ Treg cells, but not CTLA-4+ Treg cells, with a dose-dependent effect (details available from the corresponding author upon request).

We then investigated whether the effect of TNF on Treg cells was mediated by TNFR11, and not TNFR1, using anti-TNFR1 or anti-TNFR11 neutralizing antibodies. TNF-induced *Foxp3* expression was abolished by anti-TNFR11 antibodies, but not by anti-TNFR1 antibodies (Figures 1A and B).

To determine whether TNF exerts its effect only by preventing the loss of *Foxp3* expression or whether it also can induce Treg cell proliferation, we used a CFSE-labeling assay to assess Treg cells from WT or TNFR11<sup>-/-</sup> mice. Following stimulation of WT mouse Treg cells with TNF for 96 hours, we observed that TNF induced a stronger proliferation of Treg cells as compared to cells in culture with only anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies



**Figure 1.** Effect of tumor necrosis factor (TNF) on cultured mouse and human Treg cells. CD4+CD25+ cells were purified from the spleens of wild-type (WT), TNF receptor type I-deficient (TNFR1<sup>-/-</sup>), and TNFR11<sup>-/-</sup> mice, and CD4+CD25+CD127<sup>-</sup> cells were purified from healthy human donor peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). In some cases, cells were labeled with 5,6-carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE). Cells were cultured for 72 hours (A, B, and D–H) or 96 hours (C) with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies in the presence of 20 ng/ml recombinant murine TNF (A–G) or with 400 ng/ml recombinant human TNF (H). In some experiments, 10 μg/ml anti-mouse TNFR1 or TNFR11 monoclonal antibodies (A, B, and D) or 40 μg/ml anti-human TNFR11 monoclonal antibodies (H) were added, with isotype (iso) used as a control. A, Representative dot plots of CD4+Foxp3<sup>+</sup> cell frequency among total cells. B, CD4+Foxp3<sup>+</sup> cell frequency among total cells. Data were pooled from 3 independent experiments. C, Percentage of proliferating CFSE<sup>dim</sup> cells among CD4+Foxp3+CFSE+ cells. D, Frequency of dead cells (zombie<sup>high</sup>) among CD4+Foxp3+ cells. E–G, Frequency of CD25+ cells among CD4+Foxp3+ cells in WT (E), TNFR1<sup>-/-</sup> (F), and TNFR11<sup>-/-</sup> (G) mice. H, Frequency of CD4+Foxp3+CD25+ cells among total cells in healthy human PBMCs. In D, CD4+CD25+ cells were purified from the spleens pooled from 2 WT mice. Data are representative of 2 independent experiments, each with similar results. In H, Treg cells were purified from PBMCs of 1 healthy donor. Data are representative of 3 individuals, each with similar results. Results in B–H are the mean ± SEM. \* = *P* < 0.05; \*\* = *P* < 0.01, by one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post hoc test for multiple comparisons (B and E–G) or two-way ANOVA (C). NS = not significant.



(Figure 1C). Moreover, this TNF-induced Treg cell proliferation was mediated by TNFR11, as indicated by the lack of increase in CFSE<sup>dim</sup> Treg cell frequency in TNFR11<sup>-/-</sup> mice (Figure 1C). TNF also protected Treg cells against death, since the frequency of zombie<sup>high</sup> cells among CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells was decreased in WT mice (Figure 1D).

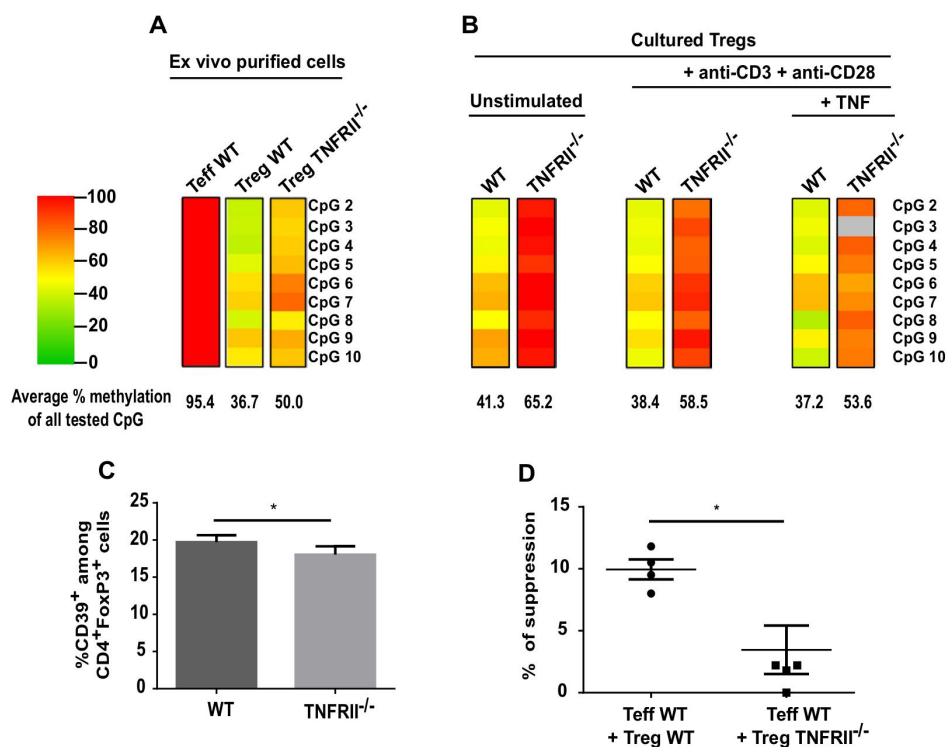
In addition, TNF stimulation modified the expression of CD25 by Treg cells, as shown by the induction of an almost doubling of the CD25<sup>+</sup> Treg cell proportion by TNF (Figure 1E). Again, this effect was mediated by TNFR11, since it occurred in Treg cells from WT and TNFR11<sup>-/-</sup> mice only (Figure 1F) but not in Treg cells from TNFR11<sup>-/-</sup> mice (Figure 1G).

Of note, TNF induced CD25 expression by Treg cells (Figure 1E) and also increased interleukin-2 (IL-2)-induced CD25 and STAT5 phosphorylation in Treg cells (results available from the corresponding author upon request). Subsequently, we confirmed that TNF also sustained the expression of *Foxp3*

in human Treg cells through a TNFR11-dependent pathway (Figure 1H).

**Facilitation of TSDR demethylation, a driver of *Foxp3* stability, by TNFR11.** Treg cells with stable suppressive functions are characterized by an unmethylated *Foxp3* TSDR and stable expression of *Foxp3* (28). Because, as discussed above, TNFR11 affected the maintenance of *Foxp3* expression and the proliferative ability of Treg cells, we investigated the effect of deletion of TNFR11 on the methylation of the TSDR site. In isolated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Treg cells, which served as a control, the proportion of *Foxp3* methylation was 95.4%, as compared to 36.7% in isolated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Treg cells (Figure 2A).

We therefore compared the methylation state of the *Foxp3* TSDR of freshly isolated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg cells from WT and TNFR11<sup>-/-</sup> mice and in various culture conditions. The



**Figure 2.** Methylation of the Treg-specific demethylated region and characterization of Treg cells in WT and TNFR11<sup>-/-</sup> mice. **A** and **B**, Genomic DNA was extracted from CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells isolated from WT and TNFR11<sup>-/-</sup> mouse spleens (**A**) or from Treg cells obtained from WT and TNFR11<sup>-/-</sup> mice and cultured for 72 hours under the indicated conditions (**B**). In **A**, DNA from CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T (Teff) cells isolated from WT mouse spleens served as a control. 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). Because of sequencing problems, the CpG motif 3 in TNFR11<sup>-/-</sup> Treg cells cultured with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies and stimulated with TNF appears in gray (**B**). Results are representative of 1 of 2 independent experiments. **C**, The frequency of CD39<sup>+</sup> cells among CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells in WT and TNFR11<sup>-/-</sup> mice was determined by fluorescence-activated cell sorting analysis. Results are the mean  $\pm$  SEM of 5 mice per group. **D**, The suppressive effect of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg cells from WT or TNFR11<sup>-/-</sup> mice on the proliferation of WT mouse CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Teff cells was determined. Symbols show individual mice ( $n = 5$  per group); horizontal lines with bars show the mean  $\pm$  SEM. \* =  $P < 0.05$  by unpaired 2-tailed  $t$ -test (**C**) or Mann-Whitney test (**D**). See Figure 1 for other definitions. Color figure can be viewed in the online issue, which is available at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.41134/abstract>.

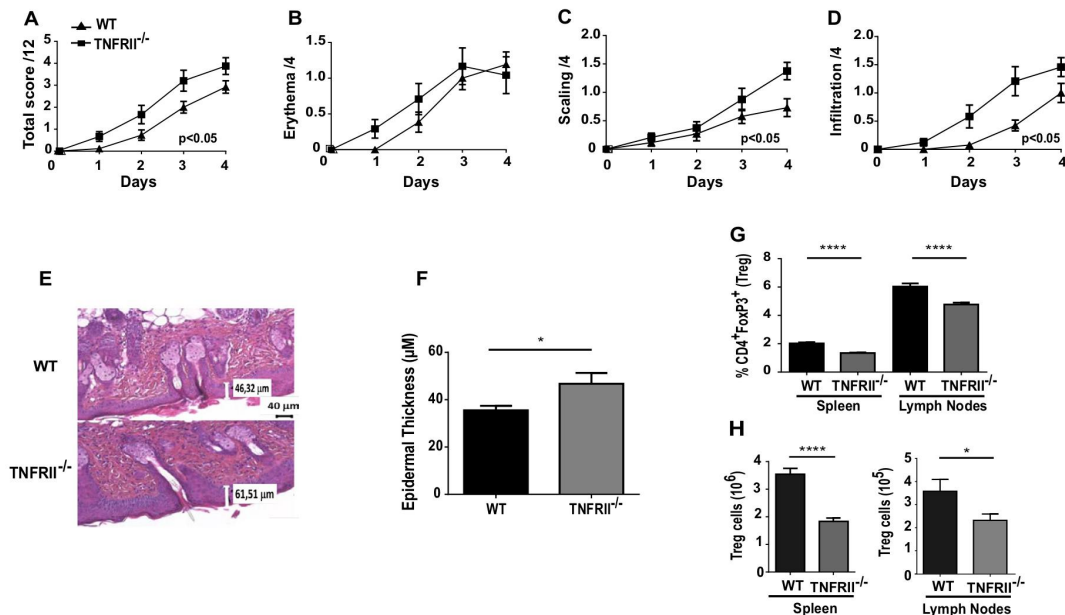
methylation proportion in the *Foxp3* TSDR was higher in Treg cells ex vivo from TNFR11<sup>-/-</sup> mice than in those from WT mice (50% versus 36.7%) (Figure 2A). This difference was even more pronounced in cultured cells, especially on unstimulated Treg cells (41.3% in WT mouse Treg cells versus 65.2% in TNFR11<sup>-/-</sup> mouse Treg cells) (Figure 2B). These data suggest that TNFR11 expression is essential for optimal *Foxp3* TSDR demethylation, and the findings highlight the involvement of TNFR11 in the stabilization of *Foxp3* expression. Of note, greater TSDR methylation in TNFR11<sup>-/-</sup> mouse Treg cells compared to WT mouse Treg cells was associated with a reduced capacity to inhibit Teff cell proliferation (Figure 2D) and a lower expression of CD39+ Treg cells (Figure 2C), whereas the expression of CTLA-4 in Treg cells was similar between the 2 groups (data not shown).

**Aggravated skin inflammation in the presence of TNFR11 deficiency in a mouse model of psoriasis.** To assess the role of TNFR11 in the development of in vivo inflammation, we first evaluated the effect of TNFR11 deficiency in a short-lasting model of inflammation, namely imiquimod-induced psoriasis. Disease was aggravated in TNFR11<sup>-/-</sup> mice compared to WT mice (Figures 3A–F). The score of inflammatory cell infiltration was the

most affected factor (Figure 3D), and epidermal thickness, quantified on skin histology slides, was also higher in TNFR11<sup>-/-</sup> mice compared to WT mice (Figures 3E and F), in accordance with the findings from the clinical analysis.

We then investigated the involvement of Treg cells in the exacerbated skin inflammation observed in TNFR11<sup>-/-</sup> mice. The frequencies and numbers of Treg cells were decreased in the spleens and lymph nodes (LNs) of TNFR11<sup>-/-</sup> mice as compared to WT mice (Figures 3G and H), and this was associated with a reduced intensity of *FoxP3* expression (results available from the corresponding author upon request).

With regard to Treg cell activation and/or functionality markers, the proportion of Treg cells expressing CD39 was significantly lower in TNFR11<sup>-/-</sup> mice than in WT mice, whereas the frequency of CTLA-4+ Treg cells was unchanged. Of note, the frequencies and numbers of CD8+Foxp3+ Treg cells were also lower in TNFR11<sup>-/-</sup> mice than in WT mice. Moreover, the frequency of CD4+IFN $\gamma$ + Th1 cells was lower in the spleens of TNFR11<sup>-/-</sup> mice compared to WT mice. Local skin cell analysis revealed that the frequency of CD45+ leukocytes was higher in TNFR11<sup>-/-</sup> mice than in WT mice, which was related to an increased proportion of F4/80+ macrophages, whereas the frequency of CD3+ T lymphocytes was comparable between



**Figure 3.** Aggravation of imiquimod-induced skin inflammation in TNFR11<sup>-/-</sup> mice. Imiquimod cream was applied daily to the skin of TNFR11<sup>-/-</sup> mice (n = 12) and WT mice (n = 13). **A–D**, The extent of erythema, scales, and infiltration of the back skin was scored daily on a scale of 0–4 (**B–D**), along with calculation of a cumulative score for all 3 features (**A**). **E** and **F**, Epidermal thickness was measured on histology slides of the skin on day 5. In **E**, representative skin samples are shown (original magnification × 20). In **F**, the epidermal thickness was measured in TNFR11<sup>-/-</sup> and WT mice (n = 8 mice per group). **G** and **H**, Fluorescence-activated cell sorting analysis was used to determine the frequency (**G**) and numbers (**H**) of CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg cells among whole splenocytes and lymph nodes of WT and TNFR11<sup>-/-</sup> mice on day 5 of skin inflammation. Data are representative of 3 independent experiments. All results are the mean ± SEM. \* = P < 0.05; \*\*\*\* = P < 0.0001, by Student’s *t*-test for area under the curve in each mouse (**A–D**) or by unpaired 2-tailed *t*-test (**F–H**). See Figure 1 for definitions. Color figure can be viewed in the online issue, which is available at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.41134/abstract>.

the 2 groups (results available from the corresponding author upon request).

**Restoration of aggravated experimental arthritis to a normal level in TNFRII<sup>-/-</sup> mice after adoptive transfer of WT mouse Treg cells.** We assessed the effect of TNFRII deficiency on the development of DTHA in mice. Arthritis developed in all mice of both the WT and TNFRII<sup>-/-</sup> genotypes as soon as day 1 after administration of mBSA boost in the foot pad, which is usual in the DTHA model (26). Arthritis was aggravated in TNFRII<sup>-/-</sup> mice, as indicated by a significant increase in both ankle and tarsus swelling compared to that in WT mice (Figures 4A and B). Accordingly, the maximum ankle swelling and maximum tarsus swelling were both higher in TNFRII<sup>-/-</sup> mice than in WT mice (Figures 4C and D).

Histopathologic analyses were performed to assess the extent of inflammation and cartilage and bone destruction in the mice (26). The sum score of histologic features was higher in TNFRII<sup>-/-</sup> mice than in WT mice (Figures 4E and F), thus confirming the findings from clinical evaluation.

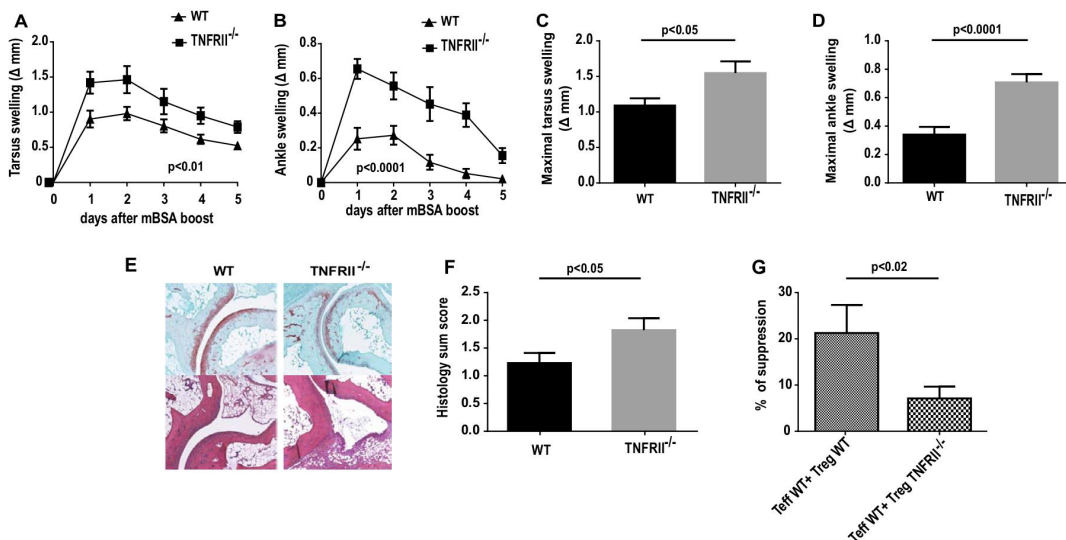
The frequency of CD4+FoxP3+ Treg cells was similar in the spleens and LNs of WT and TNFRII<sup>-/-</sup> mice on day 0. On day 2, the mean Treg cell frequency was lower in TNFRII<sup>-/-</sup> mice than in WT mice (left LN, mean  $\pm$  SEM 1.61  $\pm$  0.29% versus 2.27  $\pm$

0.26% [ $P < 0.02$ ]; right LN, 1.75  $\pm$  0.05% versus 2.05  $\pm$  0.1% [ $P < 0.05$ ]).

We then evaluated the impact of TNFRII deficiency on Treg cell suppressive functions. We found that the capacity to inhibit the proliferation of Teff cells was lower for TNFRII<sup>-/-</sup> mouse Treg cells than for WT mouse Treg cells (Figure 4G).

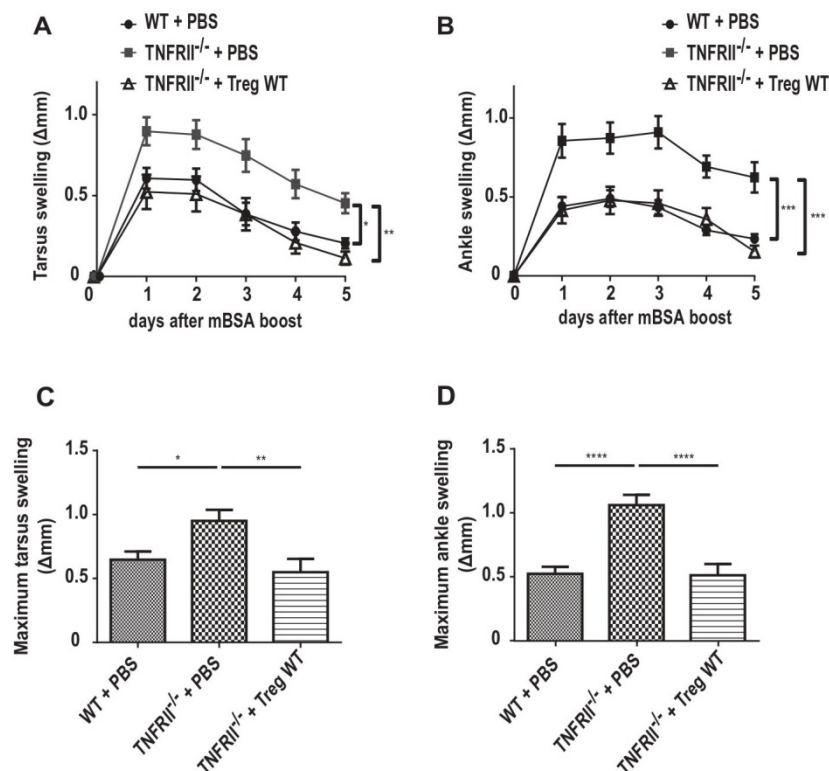
To assess the role of Treg cell deficiency in the exacerbation of DTHA in TNFRII<sup>-/-</sup> animals, we evaluated the capacity of WT mouse Treg cells to protect TNFRII<sup>-/-</sup> mice against arthritis. CD4+CD25+ cells were purified from the spleens of WT mice and transferred into TNFRII<sup>-/-</sup> mice at 5 days after immunization with mBSA/CFA. We repeatedly confirmed that more than 90% of the purified CD4+CD25+ cells expressed *Foxp3*. Thus, CD4+CD25+ cell transfer can be considered a transfer of Treg cells. As expected, adoptive transfer of WT mouse Treg cells significantly attenuated arthritis as compared to that in TNFRII<sup>-/-</sup> mice receiving only PBS (Figures 5A–D).

**Increased frequency of TNFRII-expressing Treg cells in patients with RA, but not in patients with SpA, during anti-TNF treatment.** Some anti-TNF agents have been suggested to promote the immunosuppressive activities of TNF, and therefore we studied the evolution of TNFRII-deficient Treg cells in



**Figure 4.** Exacerbation of arthritis in TNFRII<sup>-/-</sup> mice. Delayed-type hypersensitivity arthritis was induced in WT mice ( $n = 15$ ) and TNFRII<sup>-/-</sup> mice ( $n = 13$ ). **A–D**, Swelling of the tarsus (**A**) and ankle (**B**) over the duration of the study was examined, and the maximal tarsus (**C**) and ankle (**D**) swelling during the disease course was calculated for each individual mouse. **E**, Ankle and tarsal joints were assessed for histologic changes on day 7 by staining paw sections with Safranin O (upper panels) and hematoxylin and eosin (lower panels). Samples from a representative WT control mouse and TNFRII<sup>-/-</sup> mouse are shown. **F**, The mean sum score of histologic features was calculated to assess the extent of extraarticular infiltration of inflammatory cells and arthritic changes (synovitis, cartilage destruction, and bone erosion) (score scale 0–3). **G**, The suppressive effect of CD4+CD25+ cells from WT or TNFRII<sup>-/-</sup> mice ( $n = 8$  randomly chosen mice per group) on the proliferation of WT mouse CD4+CD25– effector T (Teff) cells was determined. Results are the mean  $\pm$  SEM. In **A–F**, data are representative of 1 of 2 experiments, each yielding similar results.  $P$  values were determined by unpaired 2-tailed  $t$ -test (**A–D** and **F**) or by Mann-Whitney test (**G**). mBSA = methylated bovine serum albumin (see Figure 1 for other definitions). Color figure can be viewed in the online issue, which is available at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.41134/abstract>.





**Figure 5.** Adoptive transfer of CD4+CD25+ WT mouse Treg cells attenuates arthritis in TNFR11<sup>-/-</sup> mice. Delayed-type hypersensitivity arthritis (DTHA) was induced in WT mice (n = 12) and TNFR11<sup>-/-</sup> mice (n = 23). CD4+CD25+ cells (7 × 10<sup>5</sup>) from WT mice without DTHA were intravenously transferred to TNFR11<sup>-/-</sup> mice (n = 11) at 5 days after subcutaneous immunization with methylated bovine serum albumin (mBSA)/complete Freund's adjuvant; control TNFR11<sup>-/-</sup> mice with DTHA (n = 12) received only phosphate buffered saline (PBS). Boost mBSA/PBS was administered in the foot pad 2 days later in all mice. Swelling of the tarsus (A) and ankle (B) was examined over the duration of the study, and maximal tarsus (C) and ankle (D) swelling during the disease course for each individual mouse was calculated. Results are the mean ± SEM. \* = P < 0.05; \*\* = P < 0.02; \*\*\* = P < 0.01; \*\*\*\* = P < 0.001, by one-way analysis of variance (ANOVA) for the area under the curve for each mouse (A and B) or by one-way ANOVA (C and D). See Figure 1 for other definitions.

patients with either RA or SpA who had received anti-TNF agents. After 3 months of treatment, anti-TNF-treated patients with RA showed a significantly increased frequency of peripheral blood Treg cells among CD4+ T cells (Figure 6A), more specifically, the TNFR11-positive subpopulation (mean ± SEM 65.2 ± 3.1% versus 49.1 ± 5.5% at baseline; P < 0.01) (Figure 6B).

Of the 17 treated patients with RA, 2 were classified as nonresponders, 1 had stable low disease activity, 9 were good responders, and 5 were moderate responders (Figure 6C). We found no clear association between the clinical response and the modified Treg cell frequency or the expression of TNFR11 by Treg cells (data not shown); nevertheless, the number of nonresponders was probably too low to detect a difference. Importantly, the fold increase in TNFR11+ Treg cell frequency did not differ between individuals who received etanercept (n = 8) and those who received anti-TNF monoclonal antibody (n = 9) (mean ± SEM 1.92 ± 0.53% versus 1.58 ± 0.25% from baseline to month 3).

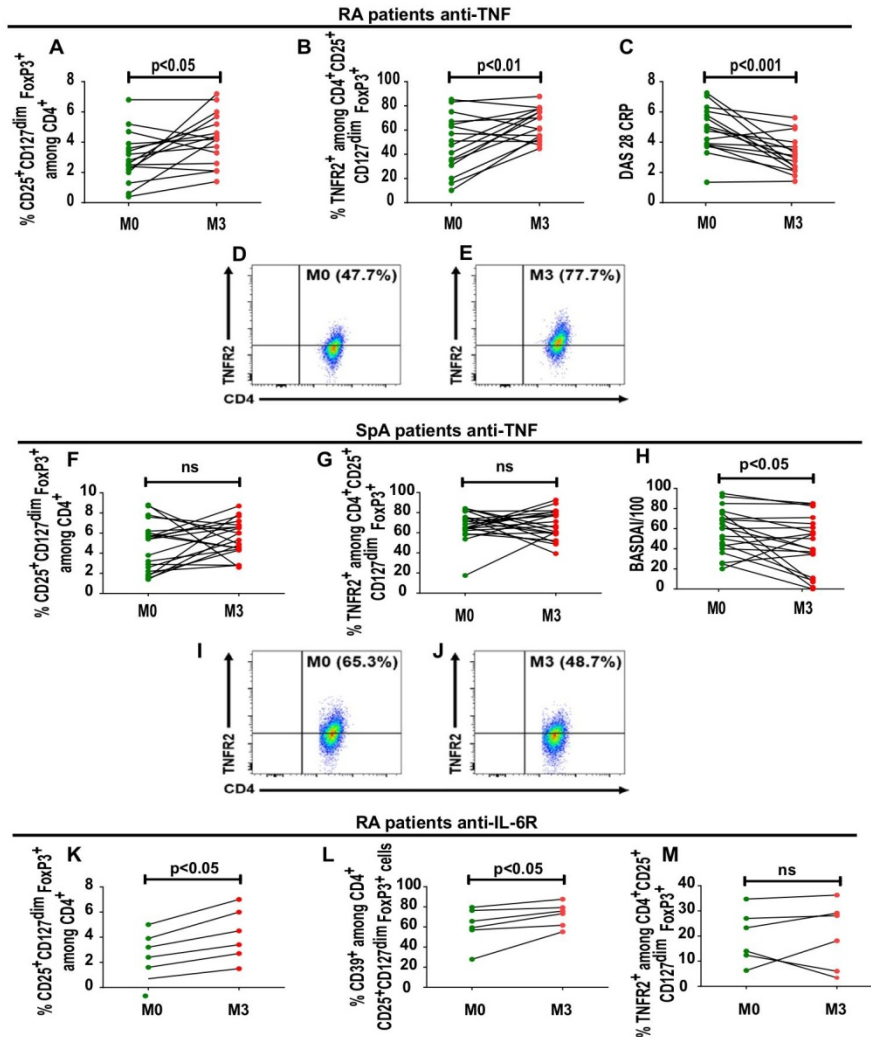
In patients with RA who received tocilizumab, the Treg cell frequency was significantly increased at 3 months of treatment (Figure 6K), with a specific increase in the subpopulation of Treg cells expressing CD39 (Figure 6L), which confirms our previous results (29). Importantly, TNFR11+ Treg cells were not affected by tocilizumab treatment (Figure 6M), which suggests that the increase in this Treg cell subpopulation in patients with RA may be specific to TNF inhibitors.

In patients with SpA, anti-TNF treatment was not associated with a significant modification in either the percentage or frequency of Treg cells expressing TNFR11 (Figures 6F and G). The clinical response in patients with SpA was variable (Figure 6H) and was not associated with Treg cell frequency (data not shown).

**DISCUSSION**

TNFR11+ Treg cells are a highly suppressive subpopulation of Treg cells that are expanded by anti-TNF monoclonal antibody treatment in RA. Among other findings, our novel data show that





**Figure 6.** Evolution of peripheral blood Treg cell subpopulations from patients with rheumatoid arthritis (RA) or patients with spondyloarthritis (SpA) after treatment with anti-tumor necrosis factor (anti-TNF) or anti-interleukin-6 receptor (anti-IL-6R). Flow cytometry was used to analyze cells at baseline (M0) and at 3 months (M3) after anti-TNF treatment (etanercept  $n = 8$ , infliximab  $n = 5$ , golimumab  $n = 2$ , adalimumab  $n = 1$ , certolizumab  $n = 1$ ) of patients with RA ( $n = 16$ ) or patients with SpA ( $n = 20$ ) (A–J) or after tocilizumab treatment of patients with RA ( $n = 6$ ) (K–M). Analyses determined the percentage of Treg cells (CD4+CD25+FoxP3+CD127<sup>dim</sup>) (K–M) among CD4+ cells (A, F, and K), TNF receptor type II-positive (TNFRII+) cells among Treg cells (B, G, and M), and CD39+ cells among Treg cells (L) from RA or SpA patients, and also determined the different degrees of clinical response to treatment according to the Disease Activity Score in 28 joints (DAS28) (C) and the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) (H). Representative dot plots show the frequency of TNFRII+ cells among Treg cells in RA patients (D and E) or SpA patients (I and J) at baseline (D and I) and 3 months (E and J) after treatment initiation. Details on the gating strategy are available from the corresponding author upon request. Each dot linked by a black line represents an individual patient.  $P$  values were determined by Wilcoxon's paired  $t$ -test. NS = not significant. Color figure can be viewed in the online issue, which is available at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.41134/abstract>.

this phenomenon in RA is not restricted to monoclonal antibodies but is common to the entire class of anti-TNF agents. Conversely, this Treg cell subpopulation is not affected by anti-TNF treatment in patients with SpA, another disease that responds to TNF blockade. This work also integrates multilevel data that support the relevance of TNFRII+ Treg cells in the control of inflammation, by

showing that the adoptive transfer of TNFRII+ Treg cells is sufficient to ameliorate experimental arthritis. Furthermore, our data demonstrate, for the first time, an epigenetic change that may underlie the suppressive capacity of this Treg cell subset.

Consistent with previous studies in mice and humans, we showed that TNF protected against the loss of *Foxp3* expression

and induced the proliferation of Treg cells via TNFR11 *in vitro* (14,15). Moreover, TNF–TNFR11 signaling was associated with enhanced expression of CD25 (the  $\alpha$  subunit of IL-2 receptor) by Treg cells in mice. Because Treg cells coexpressing CD25 and TNFR11 were found to be the most suppressive Treg cell subpopulation both in mice (30) and in humans (31), we aimed to determine whether this membrane phenotype is linked to the expression of the master Treg cell transcription factor *Foxp3*. Indeed, how TNFR11 signaling mediates *Foxp3* expression, and thus Treg cell stability, is unclear. Treg cell stability is regulated by numerous microenvironment inputs, including transcriptional and epigenetic programs and posttranslational modifications (32). In our study, we showed that TNFR11 expression was associated with TSDR hypomethylation and, consequently, increased Treg cell stability.

We further showed that TNF induced CD25 expression in Treg cells and also increased IL-2–induced CD25 and STAT5 phosphorylation in Treg cells. Phosphorylated STAT5 binds to demethylated CNS2, which contains the TSDR (33) and thus may stabilize *Foxp3* expression, leading to the high suppressive activity of Treg cells (34). On another note, the STAT5/STAT3 balance controls the fate of CD4+ T cells. A predominance of phospho-STAT5 leads to the proliferation of Treg cells, whereas higher STAT3 levels trigger Th17 cell differentiation (35). Thus, increased levels of CD25 and phospho-STAT5 may up-regulate Treg cell proliferation in the presence of IL-2 and may decrease Th17 cell differentiation within a control loop of TNF-mediated inflammation.

After establishing the connection between membrane TNFR11 and *Foxp3* expression, we wanted to study the functional relevance of TNFR11 signaling on Treg cells in the control of inflammation. Our results showed an exacerbation of skin inflammation and arthritis in TNFR11<sup>-/-</sup> mice. It should be noted that, although the collagen-induced arthritis (CIA) model is a more appropriate mouse model for RA, we used the DTHA model in our study. Indeed, TNFR11<sup>-/-</sup> mice belong to the C57BL/6 strain, but the incidence and severity of CIA are low in this strain (36). The antiinflammatory role of TNF signaling via TNFR11 has also been demonstrated in other disorders, such as experimental allergic encephalomyelitis (37,38), TNF-induced arthritis (39), allergic airway inflammation (40), and *Mycobacterium tuberculosis* infection (25). However, TNFR11 signaling can also mediate proinflammatory signals, as has been shown in a model of colitis (41), central nervous system–induced inflammation (42), experimental cerebral malaria (43), idiopathic pneumonia syndrome (44), smoke-induced pulmonary inflammation (45), and experimental glomerulonephritis (46).

This apparent discrepancy in the role of TNF raises the question as to which TNFR11-expressing cell type responds to TNF. In this study, we used adoptive transfer of WT mouse Treg cells to TNFR11<sup>-/-</sup> mice, which ameliorated the experimental arthritis. This finding suggests an antiinflammatory effect of TNF via TNFR11 on Treg cells. The relevance of TNFR11 signaling on Treg cells was shown in other experimental models. In graft-versus-host disease, a blocking antibody against TNFR11 abolished the disease

control exerted by Treg cells (47), whereas TNFR11 agonists could protect against graft-versus-host disease (48) and ameliorate CIA by promoting Treg cell expansion (49). TNFR11 expression in other immunomodulatory cells, such as myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), could also be associated with protection against inflammation, because TNFR11<sup>-/-</sup> mouse MDSCs are less suppressive (50,51). Thus, the pro- and antiinflammatory effects of TNFR11 signaling features a delicate balance depending on the cell type involved. Although the actions of TNF via TNFR11 can expand Treg cells and confer higher suppressive effects to MDSCs, the same does not apply to all cells. Nonmyeloid cells expressing TNFR11, such as endothelial cells, can mediate an inflammatory signal upon stimulation with TNF (43). Eventually, TNFR11 expression by Treg cells is essential for full development of experimental colitis (52).

Although TNF boosts Treg cell expansion and function via TNFR11, anti-TNF monoclonal antibodies also restore Treg cell function in RA (18,53) and in experimental arthritis (13). The apparent paradox that both TNF and anti-TNF treatments can boost Treg cells suggests that, at least in some circumstances, anti-TNF treatments may block the proinflammatory activity of TNF while preserving, or even promoting, its antiinflammatory action.

Because TNFR11 is crucial for TNF-mediated Treg cell expansion, we assessed whether and how TNFR11+ Treg cells are modified by anti-TNF biologic treatments in RA and SpA. In patients with RA, we observed an increased frequency of TNFR11+ Treg cells from day 0 up to 3 months of anti-TNF treatment. This effect on TNFR11+ Treg cells may be treatment-specific, because tocilizumab did not affect this specific cell subpopulation. Consistent with our previous results (29), we observed an increase in the frequency of Treg cells expressing CD39 in patients receiving tocilizumab treatment. This finding suggests that, in the same disease, different targeted treatments may modulate different subsets of Treg cells. In contrast, the effect of anti-TNF treatments on Treg cells may be, at least in part, disease-specific, because we showed for the first time that these treatments had no effect on total Treg cells or TNFR11+ subpopulations in patients with SpA. Thus, anti-TNF treatments may exert their therapeutic effect by activating different mechanisms of immune regulation depending on the treated condition.

Nguyen et al showed that adalimumab, but not etanercept, expanded Treg cells *in vitro* in RA patients who were considered treatment responders (19). Adalimumab binds to membrane TNF on RA monocytes to promote Treg cell expansion via enhanced TNFR11 signaling (19). In that work, only adalimumab, and not etanercept, was associated with an expansion of Treg cells *in vivo*. In our study, all anti-TNF agents, including etanercept, induced an expansion of Treg cells and TNFR11+ Treg cells as compared to the baseline levels. This discrepancy may be explained by the fact that we longitudinally evaluated the evolution of Treg cell frequency by studying each patient before and after treatment, as their own control. This approach is justified by the fact that the baseline Treg cell frequency, and more importantly, the propor-



tion of TNFR1L-expressing Treg cells, is highly variable between individual patients. Therefore, the frequency of these cells must be compared before and after treatment, within each patient. This approach may have allowed us to detect subtle differences in the evolution of Treg cell subpopulations that may not have been detected if we had compared the final Treg cell frequency in patients after treatment with different anti-TNF agents. This result suggests that mechanisms other than the up-regulation of membrane TNF on monocytes may be involved in etanercept-mediated Treg cell expansion. Indeed, anti-TNF monoclonal antibodies and etanercept may both induce Treg cell expansion via different mechanisms that remain to be explored.

A major limitation of this study is that the number of patients with RA who did not respond to anti-TNF treatment was too low to assess any correlations between the TNFR1L+ Treg cell modifications and clinical response. These data are critical to establish the real importance of TNFR1L+ Treg cell expansion in the proper response to anti-TNF treatment in RA.

TNFR1L signaling may be an interesting potential therapeutic target in RA. However, given the complexity of TNFR1L signaling on other cell types, such as conventional T cells or endothelial cells, further studies are needed to dissect the TNFR1L-dependent pathways in those cells involved in the resolution of inflammation in autoimmune diseases such as RA.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Sonia Varela (animal facilities, University of Paris 13, Paris, France) for outstanding technical assistance, and Laura Smales for critically proofreading the manuscript.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version to be published. Dr. Bessis had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

**Study conception and design.** Biton, Boissier, Decker, Semerano, Bessis. **Acquisition of data.** Santinon, Batignes, Mebrek, Biton, Clavel, Hervé, Lemeiter, Breckler, Busato, Tost, Ziol, Boissier, Decker, Semerano, Bessis. **Analysis and interpretation of data.** Santinon, Batignes, Mebrek, Biton, Clavel, Tost, Boissier, Decker, Semerano, Bessis.

## REFERENCES

- Kalliolias GD, Iwashiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol* 2016;12:49–62.
- Rothe J, Gehr G, Loetscher H, Lesslauer W. Tumor necrosis factor receptors: structure and function. *Immunol Res* 1992;11:81–90.
- Deng Y, Chang C, Lu Q. The inflammatory response in psoriasis: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2016;50:377–89.
- Sieper J, van der Heijde D, Dougados M, Mease PJ, Maksymowych WP, Brown MA, et al. Efficacy and safety of adalimumab in patients with non-radiographic axial spondyloarthritis: results of a randomised placebo-controlled trial (ABILITY-1). *Ann Rheum Dis* 2013;72:815–22.
- Suenaert P, Bulteel V, Lemmens L, Noman M, Geypens B, Van Assche G, et al. Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2000–4.
- Zampeli E, Vlachoyiannopoulos PG, Tzioufas AG. Treatment of rheumatoid arthritis: unraveling the conundrum. *J Autoimmun* 2015;65:1–18.
- Liu J, Marino MW, Wong G, Graill D, Dunn A, Bettadapura J, et al. TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in autoimmune-mediated demyelination. *Nat Med* 1998;4:78–83.
- Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Sorensen O, Rajotte RV, Power RF. TNF- $\alpha$  down-regulates type 1 cytokines and prolongs survival of syngeneic islet grafts in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 1997;159:6298–303.
- Jacob CO, McDevitt HO. Tumour necrosis factor- $\alpha$  in murine autoimmune 'lupus' nephritis [letter]. *Nature* 1988;331:356–8.
- Kemanetzoglou E, Andreadou E. CNS demyelination with TNF- $\alpha$  blockers. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2017;17:36.
- Rickard JA, Anderton H, Etemadi N, Nachbur U, Darding M, Peltzer N, et al. TNFR1-dependent cell death drives inflammation in Sharpin-deficient mice. *Elife* 2014;3:e03464.
- Fischer R, Proske M, Duffey M, Stangl H, Martinez GF, Peters N, et al. Selective activation of tumor necrosis factor receptor II induces antiinflammatory responses and alleviates experimental arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2018;70:722–35.
- Biton J, Semerano L, Delavallée L, Lemeiter D, Laborie M, Grouard-Vogel G, et al. Interplay between TNF and regulatory T Cells in a TNF-driven murine model of arthritis. *J Immunol* 2011;186:3899–910.
- Chen X, Bäuml M, Männel DN, Howard OM, Oppenheim JJ. Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol* 2007;179:154–61.
- Chen X, Wu X, Zhou Q, Howard OM, Netea MG, Oppenheim JJ. TNFR2 is critical for the stabilization of the CD4+Foxp3+ regulatory T cell phenotype in the inflammatory environment. *J Immunol* 2013;190:1076–84.
- Behrens F, Himsel A, Rehart S, Stanczyk J, Beutel B, Zimmermann SY, et al. Imbalance in distribution of functional autologous regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007;66:1151–6.
- McCann FE, Perocheau DP, Ruspi G, Blazek K, Davies ML, Feldmann M, et al. Selective tumor necrosis factor receptor I blockade is antiinflammatory and reveals immunoregulatory role of tumor necrosis factor receptor II in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:2728–38.
- Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF $\alpha$  therapy. *J Exp Med* 2004;200:277–85.
- Nguyen DX, Ehrenstein MR. Anti-TNF drives regulatory T cell expansion by paradoxically promoting membrane TNF–TNF–RII binding in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 2016;213:1241–53.
- Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO III, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2010;62:2569–81.
- Prevoo ML, van't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts: development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995;38:44–8.
- Van Gestel AM, Prevoo ML, van't Hof MA, van Rijswijk MH, van de Putte LB, van Riel PL. Development and validation of the European League Against Rheumatism response criteria for rheumatoid arthritis: comparison with the preliminary American College of Rheumatology

- and the World Health Organization/International League Against Rheumatism criteria. *Arthritis Rheum* 1996;39:34–40.
23. Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewé R, Akkoc N, Brandt J, Chou CT, et al. The Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general. *Ann Rheum Dis* 2010;70:25–31.
  24. Garrett S, Jenkinson T, Kennedy LG, Whitelock H, Gaisford P, Calin A. A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J Rheumatol* 1994;21:2286–91.
  25. Keeton R, Allie N, Dambuzza I, Abel B, Hsu NJ, Sebesho B, et al. Soluble TNFRp75 regulates host protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest* 2014;124:1537–51.
  26. Atkinson SM, Usher PA, Kvist PH, Markholst H, Haase C, Nansen A. Establishment and characterization of a sustained delayed-type hypersensitivity model with arthritic manifestations in C57BL/6J mice. *Arthritis Res Ther* 2012;14:R134.
  27. Tost J, Gut IG. DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nat Protoc* 2007;2:2265–75.
  28. Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J, Floess S, Garbe A, Baron U, et al. DNA methylation controls *Foxp3* gene expression. *Eur J Immunol* 2008;38:1654–63.
  29. Thiolat A, Semerano L, Pers YM, Biton J, Lemeiter D, Portales P, et al. Interleukin-6 receptor blockade enhances CD39+ regulatory T cell development in rheumatoid arthritis and in experimental arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:273–83.
  30. Chen X, Subleski JJ, Kopf H, Howard OM, Männel DN, Oppenheim JJ. 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* 2008;180:6467–71.
  31. Chen X, Subleski JJ, Hamano R, Howard OM, Wiltrout RH, Oppenheim JJ. Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4+FOXP3+ regulatory T cells in human peripheral blood. *Eur J Immunol* 2010;40:1099–106.
  32. Lu L, Barbi J, Pan F. The regulation of immune tolerance by FOXP3 [review]. *Nat Rev Immunol* 2017;17:703–17.
  33. Rainbow DB, Yang X, Burren O, Pekalski ML, Smyth DJ, Klarqvist MD, et al. Epigenetic analysis of regulatory T cells using multiplex bisulfite sequencing. *Eur J Immunol* 2015;45:3200–3.
  34. Alvarez Salazar EK, Cortés-Hernández A, Alemán-Muench GR, Alberú J, Rodríguez-Aguilera JR, Recillas-Targa F, et al. Methylation of FOXP3 TSDR underlies the impaired suppressive function of Tregs from long-term belatacept-treated kidney transplant patients. *Front Immunol* 2017;8:219.
  35. Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 2007;26:371–81.
  36. Bessis N, Decker P, Assier E, Semerano L, Boissier MC. Arthritis models: usefulness and interpretation. *Semin Immunopathol* 2017;39:469–86.
  37. Madsen PM, Motti D, Karmally S, Szymkowski DE, Lambertsen KL, Bethea JR, et al. Oligodendroglial TNFR2 mediates membrane TNF-dependent repair in experimental autoimmune encephalomyelitis by promoting oligodendrocyte differentiation and remyelination. *J Neurosci* 2016;36:5128–43.
  38. Tsakiri N, Papadopoulos D, Denis MC, Mitsikostas DD, Kollias G. TNFR2 on non-haematopoietic cells is required for *Foxp3*+ Treg-cell function and disease suppression in EAE. *Eur J Immunol* 2012;42:403–12.
  39. Blüml S, Binder NB, Niederreiter B, Polzer K, Hayer S, Tauber S, et al. Antiinflammatory effects of tumor necrosis factor on hematopoietic cells in a murine model of erosive arthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62:1608–19.
  40. Li XM, Chen X, Gu W, Guo YJ, Cheng Y, Peng J, et al. Impaired TNF/TNFR2 signaling enhances Th2 and Th17 polarization and aggravates allergic airway inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2017;313:L592–601.
  41. Holtmann MH, Douni E, Schütz M, Zeller G, Mudter J, Lehr HA, et al. 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* 2002;32:3142–51.
  42. Akassoglou K, Douni E, Bauer J, Lassmann H, Kollias G, Probert L. 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* 2003;100:709–14.
  43. Stoelcker B, Hehlgans T, Weigl K, Bluethmann H, Grau GE, Männel DN. Requirement for tumor necrosis factor receptor 2 expression on vascular cells to induce experimental cerebral malaria. *Infect Immun* 2002;70:5857–9.
  44. Hildebrandt GC, Olkiewicz KM, Corrion L, Clouthier SG, Pierce EM, Liu C, et al. A role for TNF receptor type II in leukocyte infiltration into the lung during experimental idiopathic pneumonia syndrome. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14:385–96.
  45. D'hulst AI, Bracke KR, Maes T, De Bleeker JL, Pauwels RA, Joos GF, et al. Role of tumour necrosis factor- $\alpha$  receptor p75 in cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and emphysema. *Eur Respir J* 2006;28:102–12.
  46. Pfeifer E, Polz J, Griebel S, Mostböck S, Hehlgans T, Männel DN. Mechanisms of immune complex-mediated experimental glomerulonephritis: possible role of the balance between endogenous TNF and soluble TNF receptor type 2. *Eur Cytokine Netw* 2012;23:15–20.
  47. Leclerc M, Naserian S, Pilon C, Thiolat A, Martin GH, Pouchy C, et al. Control of GVHD by regulatory T cells depends on TNF produced by T cells and TNFR2 expressed by regulatory T cells. *Blood* 2016;128:1651–9.
  48. Chopra M, Biehl M, Steinfatt T, Brandl A, Kums J, Amich J, et al. Exogenous TNFR2 activation protects from acute GVHD via host T reg cell expansion. *J Exp Med* 2016;213:1881–900.
  49. Fischer R, Proske M, Duffey M, Stangl H, Martinez GF, Peters N, et al. Selective activation of tumor necrosis factor receptor II induces antiinflammatory responses and alleviates experimental arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2018;70:722–35.
  50. Hu X, Li B, Li X, Zhao X, Wan L, Lin G, et al. Transmembrane TNF- $\alpha$  promotes suppressive activities of myeloid-derived suppressor cells via TNFR2. *J Immunol* 2014;192:1320–31.
  51. Zhao X, Rong L, Zhao X, Li X, Liu X, Deng J, et al. TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation. *J Clin Invest* 2012;122:4094–104.
  52. Chen X, Nie Y, Xiao H, Bian Z, Scarzello AJ, Song NY, et al. TNFR2 expression by CD4 effector T cells is required to induce full-fledged experimental colitis. *Sci Rep* 2016;6:32834.
  53. Nadkarni S, Mauri C, Ehrenstein MR. Anti-TNF- $\alpha$  therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF- $\beta$ . *J Exp Med* 2007;204:33–9.

## **SUPPLEMENTARY METHODS**

### **Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation induction and evaluation**

Psoriasis was induced with commercially imiquimod (IMQ) cream (5%; Aldara Cream; MEDA AB, Solna, Sweden). Male mice, 9 to 11 weeks of age received a daily topical application of 32.2 mg of IMQ cream on the shaved back skin for 5 consecutive days. A blinded procedure was used to monitor psoriasis-like skin inflammation induced on mouse shaved back skin. Every day, clinical scoring of psoriasis was done based on the human clinical Psoriasis Area and Severity Index (PASI). Three parameters were evaluated including erythema, scaling, and thickening and were scored independently on a scale from 0 to 4: 0, none; 1, slight; 2, moderate; 3, marked; 4, very marked. The cumulative score was done by addition of the three previous parameters with a scale from 0 to 12. For histological assessment, skin samples from back skin were fixed in 10% formalin for at least 24 h at room temperature and embedded in paraffin. Four  $\mu\text{m}$  deparaffinised sections were stained with HES before microscopic observation (optical microscopy). Epidermal thickness was evaluated with Archimed software (Microvision, Les Ulis, France) and by averaging the 5 to 10 values of independent fields of skin for each mouse.

### **Cell and tissue preparation**

#### ***Mice***

Spleen leukocytes were prepared using a 70 $\mu\text{m}$  cell strainer, and red blood cells (RBC) were lysed in hemolysis buffer (NH<sub>4</sub>CL, KHCO<sub>3</sub>, and EDTA). Afferent popliteal and axillary lymph nodes were dissected out of the limbs, and node leukocytes were prepared using a 70 $\mu\text{m}$  cell strainer. Blood was collected by heart puncture, and for cell analysis, RBCs were lysed in hemolysis buffer.

For skin cell preparation, mouse back skin was collected and the subdermal fat was removed in order to quench autofluorescence during FACS analysis. Tissue was kept on ice, cut into small pieces and then incubated in digestion medium containing 400U/ml collagenase (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ), 100 U/ml hyaluronidase (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) and 0.5U/ml DNase1 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) in RPMI for 2.5 h at 37 °C in a thermo shaker (1,300 rpm). Single-cell suspension was prepared by pushing the mixture through a 70- $\mu\text{m}$  cell strainer. Cells were then washed with 10 ml PBS containing 2 mM EDTA

and spun down for 7 min at 400g. Cell pellet was then resuspended in FACS buffer (PBS 1X, 5% FCS, 0.02% sodium azide and 100 µg/ml human γ-globulin) and transferred to FACS tube for staining.

**Patients.** Blood samples from RA and SpA patients and healthy donors were collected as described above. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were freshly isolated by dextran sedimentation (Axis Shield, Dundee, United Kingdom).

### **Lymphocyte purification**

CD4<sup>+</sup> T cells, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells from mouse 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). Flow cytometry analysis showed that purity of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cell-enriched fractions was 90–95% (data not shown).

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Treg 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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> cell-enriched fractions was 90–95% (data not shown).

### ***In vitro* culture experiments**

Treg were purified from indicated strain of mice and seeded ( $5 \times 10^4$ ) in RPMI 1640 with 10% FCS, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 50 mM 2-ME, 1 M HEPES, 5 µg/ml soluble anti-CD3 (clone 2C11; BD Biosciences, Franklin Lake, NJ) and 2 µg/ml anti-CD28 (clone 37.51; BD Biosciences, Franklin Lake, NJ) mAbs, in U-bottom 96-well plates. Cells were incubated for 72h or 96h with or without rmTNF-α (R&D Systems, Minneapolis, MN) or rmlL-2 (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany) at indicated concentrations at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. In some experiments, antagonist anti-TNFR1 (clone 55R-170; BioLegend, San Diego, CA) and anti-TNFR2 (clone TR.75.35-4; BioLegend, San Diego, CA) antibodies or isotype controls (clone RTK.2071; BioLegend, San Diego, CA) were added at indicated concentrations. Human Treg were cultured using the same conditions with rhTNF-α (Immunotools, Friesoythe, Germany) and an antagonist anti-TNFR2 antibody (clone 367A02; BioLegend, San Diego, CA) and its isotype control (clone RTK2758; BioLegend, San Diego, CA).

### **Flow cytometry**



**Mice.** Cell surfaces were stained with: PE-labeled anti-CD25 (clone 7D4; Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany), APC-Cy7-labeled anti-CD4 (clone RM4-5; BD Biosciences, Franklin Lake, NJ), PE-Cy7-labeled anti-CD39 (clone Duha59; BioLegend, San Diego, CA). PE-labeled anti-F4/80 (clone CI.A3.1, Biolegend, San Diego, CA), PercP-Cy5.5-labeled anti-CD3 (clone 17.A2; BD Biosciences Franklin Lake, NJ), APC-labeled anti-CD45 (clone 30F-11; BioLegend San Diego, CA), PerCP-Cy5.5-labeled anti-CTLA-4 (clone UCD10-489; BioLegend San Diego, CA) and PerCP-labeled anti-CD8 (clone 53-6.7; BD Biosciences, Franklin Lake, NJ). Cells were stained at 4°C in PBS containing 5% heat-inactivated FCS, 0.02 M sodium azide and 100µg/mL human immunoglobulin (Merck Millipore, Burlington, MA), and incubated for 30 min with appropriate dilutions of various mAbs (monoclonal antibodies) or corresponding isotype controls coupled to PE, APC-Cy7, PE-Cy7, PerCP-Cy5.5, APC and PerCP. For intranuclear Foxp3 staining, cells were fixed and permeabilized with eBioscience Foxp3 Transcription Factor Staining Buffer Set (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The stainings were performed with eFluor450-labeled anti-Foxp3 (clone FJK.16s; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) or corresponding isotype control coupled to eFluor450 and incubated for 30 min at 4°C in permeabilization buffer with appropriate dilution.

For pSTAT5 staining on Treg, cells were fixed with pre-warmed Lyse/Fix Buffer (Phosflow, BD Bioscience) at 37°C for 10 minutes, washed with PBS containing 5% FCS, permeabilized with pre-chilled Perm Buffer III (Phosflow, BD Bioscience) for 30 minutes on ice, washed two additional times with PBS containing 5% FCS, and finally stained for 60 minutes at room temperature with APC-Cy7-labeled anti-CD4 (clone GK1.5; BD Bioscience), PE-labeled anti-CD25 (clone 7D4; BD Bioscience), eFluor450-labeled anti-FoxP3 (clone FJK.16s; eBioscience), and AlexaFluor488-labeled anti-Stat5(pY694) (clone 47; BD Bioscience), or corresponding isotype control coupled to PE, eFluor450 and AlexaFluor488 in PBS containing 5% FCS, 0.02 M sodium azide and 100µg/mL human immunoglobulin (Calbiochem).

For intracellular cytokine staining, cells were stimulated for 4 h with PMA and ionomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and Brefeldin A (BD Biosciences). Surface CD4 was stained first. cells were incubated with PerCP-Cy5.5-labeled anti-CD4 (clone RM4-5; BioLegend, San Diego, CA) 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 Biosciences, Franklin Lake, NJ) for 30 min at 4°C in the dark.

**Patients and healthy donors.** For assessment of Treg from RA or SpA patients and from healthy donors, we used antibodies to surface markers: APC-H7-labeled anti-CD3 (clone SK7; BD Biosciences, Franklin Lake, NJ), BV510-labeled anti-CD4 (clone RPA.T4; BioLegend, San Diego, CA), BV421-labeled anti-CD39 (clone A1; BioLegend, San Diego, CA), PerCP-Cy5.5-labeled anti-CD25 (clone M-A251; BioLegend, San Diego, CA), APC-labeled anti-TNFR2 (clone 3G7A02; BioLegend, San Diego, CA) and PE-Cy7-labeled anti-CD127 (clone A019D5; BioLegend, San Diego, CA).

For intranuclear Foxp3 staining, cells were fixed and permeabilized with Foxp3 Transcription Factor Staining Buffer Set (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The staining was performed with PE-labeled anti-Foxp3 (clone PCH 101; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) or corresponding isotype control coupled to PE and incubated for 30 min at 4°C in dark with appropriate dilution.

Flow cytometry gating strategy used to study TNFR2 expression by Tregs from peripheral blood of RA and SPA patients is shown on fig S2.

All flow cytometry experiments were performed on a BD FACS CANTO II flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Dead cells were excluded based on forward and side scatter characteristics. Reported statistical data are based on at least 1,000 events gated on the population of interest. Results were analyzed using FACS Diva software (BD Biosciences, Franklin Lake, NJ).

### **Measurement of Treg proliferation and viability**

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> were purified as described above from spleen of mice. Treg were pre-labeled with 5mM CFSE (Invitrogen; Carlsbad, CA) for 10 min at 37°C. CFSE-labeled Treg ( $5 \times 10^4$ ) 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, 5µg/ml anti-CD3 (clone 2C11; BD Biosciences, Franklin Lake, NJ) and 2 µg/ml anti-CD28 (clone 37.51; BD Biosciences, Franklin Lake, NJ) mAbs. Cells were incubated with or without 20 ng/ml rmTNF-α (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany). After 4 days, Treg (CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>) were stained as described above. Treg proliferation was then determined using flow cytometry by measuring CFSE dilution. Data were analyzed using FACS Diva software as described above.



For Treg viability assessment, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells were purified as described above from spleen of mice. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells (5x10<sup>4</sup>), stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 mAbs as for proliferation measure described above, were incubated with or without 20 ng/ml rmTNF- $\alpha$  (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany) for 72h. Viability measurement was performed with Zombie Green (BioLegend, San Diego, CA) before surface staining. Cells were incubated with Zombie Green in PBS 1X for 20 min at room temperature in the dark. Cells were then washed twice with surface staining buffer as describe above. CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells were stained as described above.

### SUPPLEMENTARY TABLES AND FIGURES

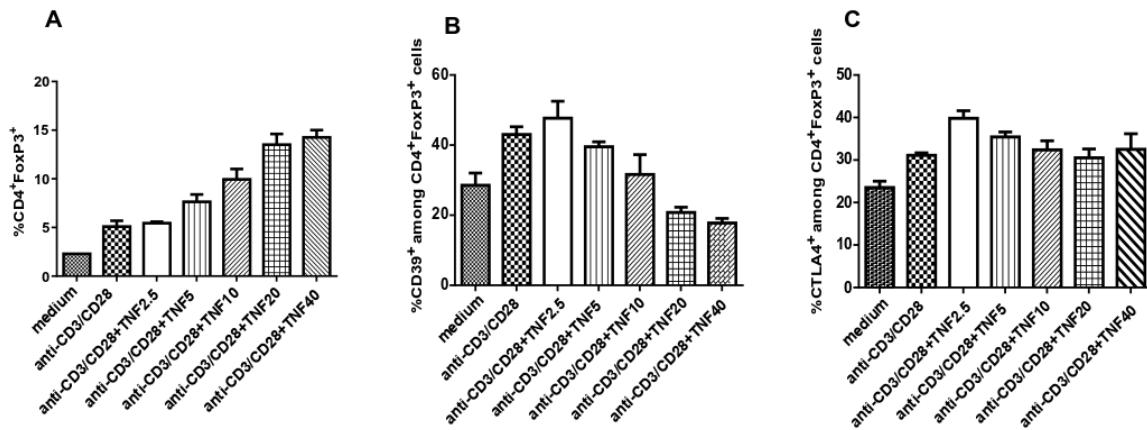
Gene	Orientation	Primer (5'-3')	Size amplicon
TNFR1 WT	Forward	TGTGGAAAGGGCACCTTTACGGC	470bp
	Reverse	GGCTGCAGTCCACGCACTGG	
TNFR1 <sup>-/-</sup>	Forward	TGTGGAAAGGGCACCTTTACGGC	300bp
	Reverse	ATTCGCCAATGACAAGACGCTGG	
TNFR2 WT	Forward	AGCTCCAGGCACAAGGGCGGG	200bp
	Reverse	CCTCTCATGCTGTCCCGGAAT	
TNFR2 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

**Table S1: Primer sequences used to genotype TNFR1<sup>-/-</sup> TNFR2<sup>-/-</sup> mice**

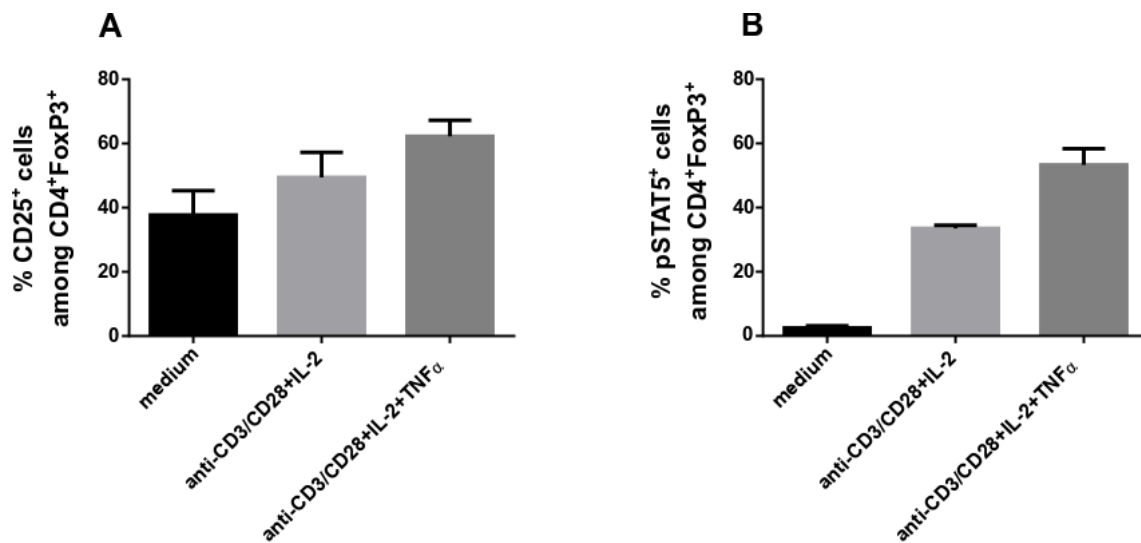
Gene	Size	PCR primer forward	PCR primer reverse	Pyrosequencing primers	CpGs
<i>Foxp3</i> (NM_054039.2) chrX:7583912-7584196	285	GGTTTTGTTGTTATAATTT GAATTTG	Biotin <sup>-</sup> CAACCTTAAACCC CTCTAACATC	TGTTGTTATAATTTGAATTT	2,3,4
				GGGGTAGATAATTTATTTTA	5,6,7
				GGTGATGTGGGTGTTAG	8,9,10

**Table S2: Oligonucleotide sequences for PCR amplification and pyrosequencing**

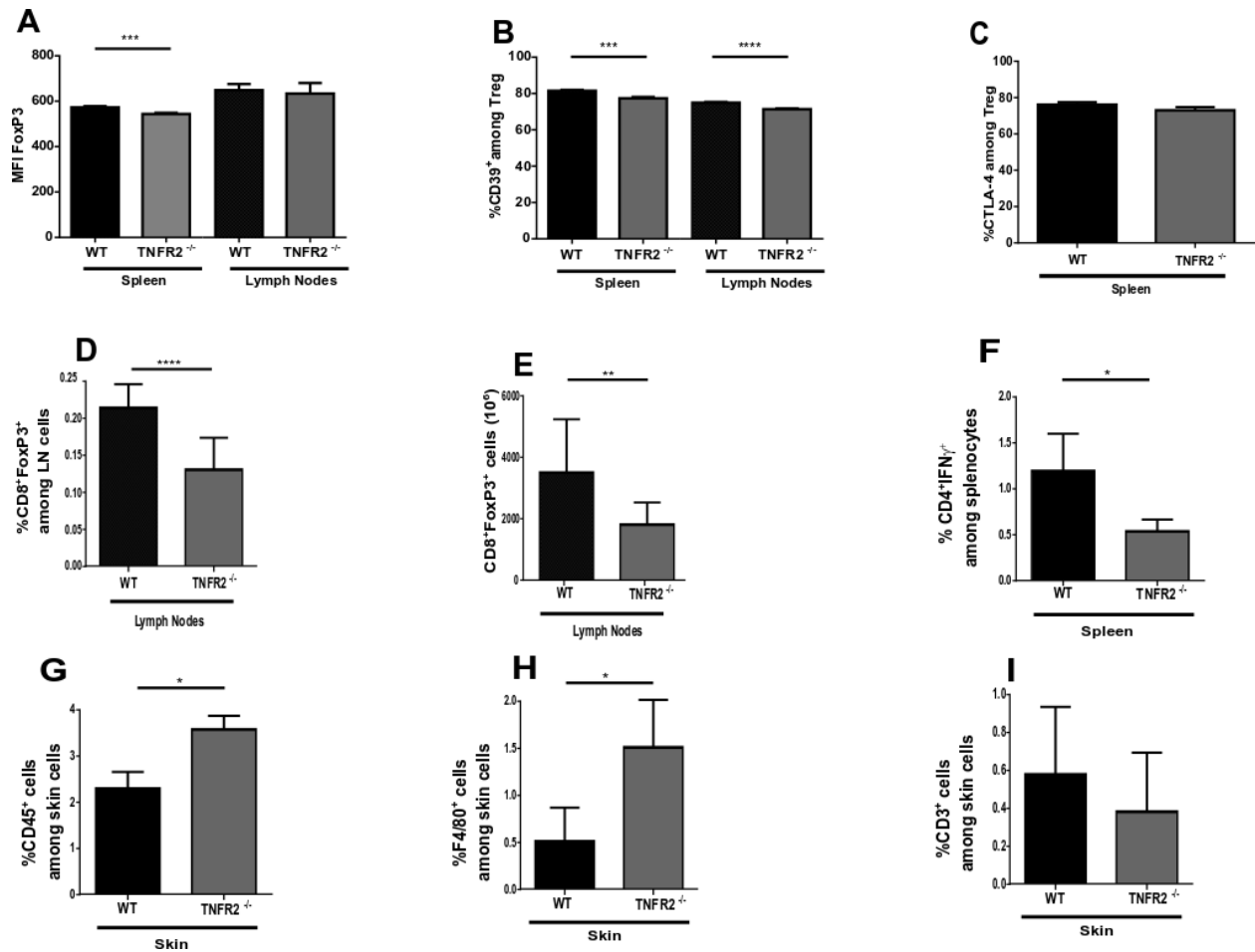
fig S1



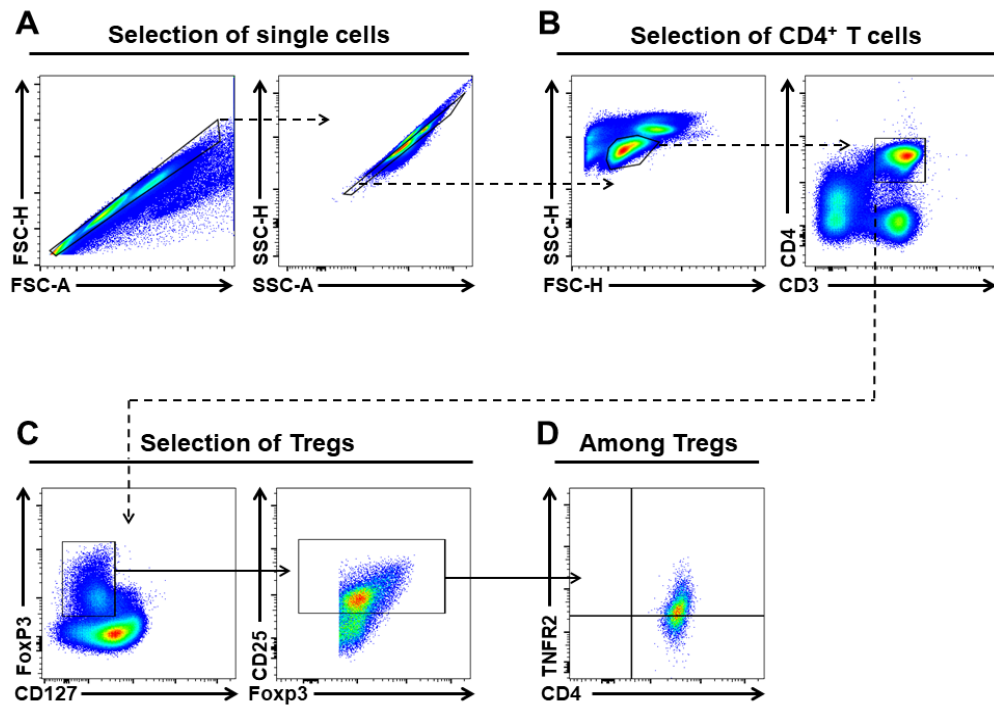
**Figure S1: Effect of TNF on cultured mouse Treg.** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells were purified from the spleen of *wt* mice. Cells were cultured for 72h with anti-CD3 + anti-CD28 Abs in presence of increasing (0 to 40 ng/ml) concentrations of rmTNF- $\alpha$ . (A) CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> frequency among total cells. (B) CD39<sup>+</sup> cells frequency among CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells. (C) CTLA-4<sup>+</sup> cells frequency among CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells were purified from two spleens pooled from two *wt* mice. Data shown are representative of 2 independent experiments with similar results.



**Figure S2: TNF increases IL-2-mediated CD25 expression and phosphorylation of STAT5 by Treg.** CD4<sup>+</sup> T cells were purified from *wt* C57Bl/6 mice by magnetic separation and cultured for 6h with medium, or anti-CD3 (1 $\mu$ g/ml) , anti-CD28 (2 $\mu$ g/ml), IL-2 (0.1 ng/ml) with or without TNF- $\alpha$  (40 ng/ml). (A) Percentage of CD25<sup>+</sup> cells among CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg. (B) Percentage of pSTAT5<sup>+</sup> cells among CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg. Data are representative of 2 independent experiments.



**Figure S3: TNFR2 deficiency is related to altered splenic Treg, CD39<sup>+</sup> Treg and skin macrophage frequencies during IMQ-induced skin inflammation.** Cell frequency was analysed by FACS on spleen, LN or skin of TNFR2<sup>-/-</sup> and *wt* mice 5 days after the first application of IMQ cream. Splenocytes and/or LN cells were stained with fluorochrome-conjugated anti-CD4, anti-CD8, anti-FoxP3, anti-CD39, anti-CTLA-4, anti-IFN- $\gamma$  and anti-IL-17 (A-F) antibodies. Skin cells were stained with fluorochrome-conjugated anti-CD45, anti-CD3 and anti-F4/80 (G-I) antibodies. (A) FoxP3<sup>+</sup> mean fluorescence intensity (MFI) on CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> cells. (B) Percentage of CD39<sup>+</sup> cells among CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Treg cells. (C) Percentage of CTLA-4<sup>+</sup> cells among CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> splenic Treg cells. (D) Percentage of CD8<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> cells among whole LN cells. (E) Number of CD8<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> cells in the LN. (F) Percentage of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells among all splenocytes. Percentage of CD45<sup>+</sup> (G), F4/80<sup>+</sup> (H) and CD3<sup>+</sup> (I) cells among skin cells. Data are given as mean  $\pm$  SEM for each group. Two-tailed unpaired student *t*-test was used for statistical analysis. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ .



**Figure S4 Flow cytometry gating strategy used to study TNFR2 expression by Tregs from peripheral blood of RA and SPA patients.** (A) Doublet cells were excluded and (B) total CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were identified based on SSC/FSC and on the co-expression of CD3 and CD4. (C) Tregs were identified as CD25<sup>+</sup> CD127<sup>dim</sup> FoxP3<sup>+</sup> cells and (D) the frequency of TNFR2<sup>+</sup> cells was determined among Tregs.

**ARTICLE 2 (en préparation): Altered expression of Tregs stability markers during chronic inflammation in patients with rheumatoid arthritis and spondyloarthritis.**

Après avoir démontré l'implication du TNFR2 dans la stabilité des Treg (article 1), nous avons choisi d'étudier l'état de stabilité des Treg au cours de l'inflammation articulaire chronique.

Nous avons mené une étude transversale visant à évaluer différents marqueurs de régulation de la stabilité de FoxP3 chez des patients PR et SpA naïfs de biothérapies comparé à des sujets sains. Le principal résultat que nous avons obtenu est que l'expression d'EZH2, une histone méthyl-transférase impliquée dans la stabilité des Treg, est dérégulée chez les patients atteints de PR et de SpA. Nous avons démontré, notamment, qu'EZH2 était nécessaire à la différenciation et à la fonction des Treg *in vitro*. De plus, nous avons mis en évidence une association entre l'expression d'EZH2 et celle des marqueurs de suppression des Treg.

Pour terminer, nous avons réalisé une étude longitudinale visant à déterminer l'impact des thérapies ciblées sur la stabilité des Treg chez des patients PR et SpA, ainsi que dans le modèle murin d'arthrite expérimentale au collagène, afin de déterminer si les thérapies ciblées exercent leur activité anti-inflammatoire à travers une restauration de la stabilité des Treg. L'ensemble des résultats obtenus font l'objet d'un article en préparation présenté ci-après.

**Altered expression of Tregs stability markers during chronic inflammation in patients with rheumatoid arthritis and spondyloarthritis.**

Majda Lyna Mebrek<sup>1,2</sup>, Tessnime Abaab<sup>1,2</sup>, Delphine Lemeiter<sup>1,2</sup>, Magali Breckler<sup>1,2</sup>, Gaëlle Clavel<sup>1,2,4</sup>, Marie-Christophe Boissier<sup>1,2,3</sup>, Luca Semerano<sup>1,2,3</sup>, Jérôme Biton<sup>1,2\*</sup> and Natacha Bessis<sup>1,2\*</sup>.

<sup>1</sup>UMR 1125 INSERM, Bobigny, France, <sup>2</sup>Sorbonne Paris Nord University, Bobigny, France.

<sup>3</sup>Rheumatology Department, Avicenne Hospital, APHP, Bobigny, France. <sup>4</sup>Department of Internal Medicine, Fondation Rothschild, Paris, France.

*\*equal contribution*

Corresponding author: Natacha Bessis, INSERM U1125, Sorbonne Paris Nord University, 1 rue Chablis, 93000, Bobigny, France

Telephone: +33 1 48 38 76 98 ; Fax : +33 1 48 38 88 93

E-mail address: [natacha.bessis@univ-paris13.fr](mailto:natacha.bessis@univ-paris13.fr)

**Key words:** Regulatory T cells, EZH2, chronic inflammation, rheumatology.

## ABSTRACT

**Objective:** Rheumatoid arthritis (RA) and spondyloarthritis (SpA) are inflammatory autoimmune diseases associated with impaired regulatory T cell (Tregs) function. Tregs identity varies according to their microenvironment. Under inflammatory conditions, their stability may be altered, which may lead to a decrease in their suppressive activity. In the present work, we evaluated Tregs stability in patients with RA and SpA and the impact of targeted therapies.

**Methodes:** Expression of epigenetic or transcriptional regulators (EZH2, Helios, pSTAT5) known to stabilize FoxP3, and suppressive markers (TNFR2, CD39) were evaluated on Tregs from blood of healthy donors (HD) and RA or SpA patients free of targeted therapies or, before and after targeted therapies using flow cytometry. CPI-1205, an EZH2 inhibitor, was used to study the role of EZH2 in Treg differentiation and suppressive activity. Collagen-induced arthritis (CIA) was induced in mice treated or not with etanercept.

**Results:** We showed that the frequency of Treg expressing the stability inducer, EZH2, but not that of Helios, was significantly lower among Tregs from RA and SpA patients as compared to HD. However, we report that targeted therapies in RA and SpA patients does not affect EZH2<sup>+</sup> Tregs frequency. We revealed a link between EZH2 and Treg suppressive markers, since EZH2 was preferentially expressed in TNFR2<sup>+</sup> and CD39<sup>+</sup> suppressive Treg sub-populations. In mirror, TNFR2 and CD39 were more frequently expressed in Treg expressing EZH2. Furthermore, we showed that pharmacological inhibition of EZH2 with CPI-1205 attenuated *in vitro* Treg differentiation and suppressive function. Finally, we found that phospho (p)STAT5<sup>+</sup> Tregs frequency was lower in RA and SpA patients than in HD. Interestingly, in mice with CIA etanercept treatment increased Treg stability, at least in part, by restoring pSTAT5<sup>+</sup> Treg frequency.

**Conclusion:** Altogether, these results highlight the role of EZH2 on Treg functions and suggest that Treg stability is altered in RA and SpA patients. Whether or not targeted therapies act through restoration of Treg stability requires further investigations.

## INTRODUCTION

FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells (Treg) play an essential role in the maintenance of immune homeostasis by suppressing inflammation and maintaining immune tolerance. A large number of studies have shown that Tregs are deficient in number and/or function in animal models of autoimmune diseases, and this has generally been confirmed in autoimmune patients (Dominguez-Villar and Hafler, 2018; Zhang et al., 2020). Treg suppressive functions are impaired in rheumatoid arthritis (RA), contributing to the excessive immune activation associated with this disease (Jiang et al., 2021). In this context, we and others have shown that the action of targeted therapies was associated with a modification of the phenotype of Tregs, along with a restoration of their suppressive activity (Ehrenstein et al., 2004; Santinon et al., 2020; Thiolat et al., 2014b). While the role of Treg has been much less well characterized in spondyloarthritis (SpA), some studies also show an impaired suppressive function in this disease (Guo et al., 2016).

Defective Treg cell functions observed in RA and SpA could result from exposure to inflammatory environment, preventing them to retain their identity and function. Indeed, Treg suppressive functions are principally regulated by the expression of the transcription factor FoxP3. Recent progress in the knowledge of Treg cell biology points to molecular mechanisms - both transcriptional and epigenetic - that induce FoxP3 instability in an inflammatory environment, readily converting Tregs into pathogenic effector cells (Colamatteo et al., 2020). However, some studies in animal models of autoimmunity, such as experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) (Garg et al., 2019) support the idea that inflammation signals initiate a feedback loop that maintains Treg cell identity and function to counteract inflammation. Treg behaviour during chronic inflammation thus remains to be better understood.

Among factors maintaining Treg stability and function, a critical role has been assigned to enhancer of zeste homolog 2 (Ezh2), an histone-lysine N-methyltransferase enzyme responsible for the methylation activity of Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) by catalyzing the addition of methyl groups to histone H3 at lysine 27 (H3K27). Histone methylation activity of EZH2 facilitates heterochromatin formation thereby silences gene expression. Yet there is a strong link between FoxP3 and Ezh2 activity. Indeed, in activated Treg, Foxp3 acts primarily as a transcriptional repressor (Arvey et al., 2014) depending on its



association with other factor. In response to inflammatory signals, FoxP3 recruits EZH2, resulting in key gene silencing such as IFN- $\gamma$  (Arvey et al., 2014). EZH2 is thus responsible for the maintenance of the repressive gene program after Treg activation, maintaining their identity and function.

Signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) phosphorylation also participates in Treg maintenance. Indeed, IL-2 controls Foxp3 expression through the phosphorylation of STAT5. The two main pSTAT5-responsive elements in the Foxp3 locus are CNS0 and CNS2 (Dikiy et al., 2021). Phosphorylated STAT5 binds to CNS0 and induces Foxp3 expression during Treg cell differentiation; and binds to demethylated CNS2 which contains the TSDR and thus stabilizes and maintains Foxp3 expression after its induction.

Here, we postulated that factors maintaining Treg stability such as EZH2 and pSTAT5 may be altered under chronic inflammation in RA and SpA, leading to Treg instability and a defect in their suppressive function. Thus, in the present study, we aimed to characterize Treg identity with regards to their stability in patients with RA and SpA. Consistent with our hypothesis, we mainly showed that EZH2 expression and STAT5 phosphorylation are altered in Tregs from these patients, and that EZH2 expression is strongly linked to TNFR2 and CD39, key molecules characterizing highly suppressive Tregs.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Patients and healthy donors**

Individuals meeting the American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism (EULAR) revised criteria for RA were selected.

A total of 27 targeted biotherapy-naïve RA patients (mean age  $52.5 \pm 2.4$  years (range 34-83), mean disease duration  $12.4 \pm 1.8$  years (range 2-34), sex F/M: 23/4) were selected for EZH2 and Helios study. Eighteen targeted biotherapy-naïve RA patients (mean age  $53.7 \pm 2.0$  years (range 34-70), mean disease duration  $9.3 \pm 2.3$  years (range 1-36), sex F/M: 14/4) were selected for pSTAT5 evaluation.

Twelve RA patients (mean age  $51.75 \pm 2.4$  years (34-66), mean disease duration 10.3 years (3-21), sex F/M: 9/3) were recruited including: three patients starting anti-TNF- $\alpha$  therapy (infliximab); seven patients starting anti-IL6R therapy (4 sarilumab, 3 tocilizumab); one patient starting JAK inhibitor therapy (baricitinib); one patient treated with CTLA-4-Ig (abatacept). RA

patients were eligible to start targeted biotherapy if the 28-joint Disease Activity Score (DAS28) was  $\geq 3.2$  or if they have evidence of erosive disease on imaging regardless of their DAS28 score. According to EULAR response criteria, good responders had a DAS28 decrease by  $> 1.2$  points, moderate responders a decrease of 0.6 to 1.2 points, and non-responders a stable, increase or decrease of  $<0.6$  points.

Individuals meeting the ASAS criteria for axial or peripheral spondyloarthritis were selected. Twenty-nine SpA patients naïve of targeted biotherapy (mean age  $48.8 \pm 2.0$  years (26-69), mean disease duration  $12.4 \pm 1.7$  years (1-35), sex F/M: 17/12) were recruited for EZH2 and Helios study. Fifteen SpA patients naïve of targeted biotherapy (mean age  $42 \pm 3.7$  years (21-60), mean disease duration  $11.3 \pm 2.8$  years (1-41), sex F/M: 7/8) were recruited for pSTAT5 evaluation.

Forteen SpA patients (mean age  $45.8 \pm 2.8$  years (21-57), mean disease duration  $8.2 \pm 1.7$  years (1-26), sex F/M: 10/4) starting anti-TNF- $\alpha$  therapy (1 etanercept, 1 golimumab, 6 infliximab, 6 adalimumab) were recruited. According to EULAR recommendations, individuals received anti-TNF- $\alpha$  treatment if the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) was  $> 40$  or if they needed daily treatment with nonsteroidal anti-inflammatory drugs independent of the BASDAI score. Individuals were considered responders with a decrease in BASDAI score below 40/100.

RA and SpA patients were recruited as part of their medical management in the rheumatology department of Avicenne Hospital. All treatments were administered according to label dosing recommendations, and response to treatment was assessed according to EULAR response criteria. A total of 35 healthy donors (HD) were randomly selected and recruited from the « Etablissement Français du sang » (EFS) of Avicennes Hospital, Bobigny, France. The study was approved by the local ethics committee (NI-2016-11-01), and written informed consent was obtained from all patients before study entry. Peripheral blood (EDTA) as well as cytopheresis samples from healthy individuals (Etablissement Français du sang de l'Hôpital saint Louis de Paris, France) were also used for the *in vitro* culture experiments.

## **Mice**

Male mice aged 5–7 weeks and belonging to the DBA/1 strain and male mice aged 6-12 weeks 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 (#16312).

## **Cell preparation**

### ***Patients***

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were freshly isolated by density gradient centrifugation (Polymorphprep, Proteogenix) from EDTA blood samples from RA and SpA patients and from healthy donors.

### ***Lymphocyte purification***

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Treg cells from healthy donor PBMC and from RA and SpA patient PBMC were purified using magnetic cell sorting (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>dim/-</sup> Regulatory T Cell Isolation Kit II, human, Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's protocol. Flow cytometry analysis showed that the purity of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> cell-enriched fraction was > 90%. Naive CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> T cells from healthy donors PBMC were isolated using magnetic cell sorting (Naïve CD4<sup>+</sup> T Cell isolation kit II, human, Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. Flow cytometry analysis showed that the purity of the CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> cell-enriched fraction was > 90%.

Naive CD4<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup> T cells from mouse spleen were isolated using magnetic cell sorting (Naïve CD4<sup>+</sup> T Cell isolation kit, mouse, Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's protocol. Flow cytometry analysis showed that the purity of the CD4<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup> cell-enriched fraction was > 90%.

## **In vitro culture experiments**

### ***Treg differentiation***

***Healthy donors.*** For human in vitro regulatory T cell differentiation, CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> naïve T cells were isolated from healthy donors PBMC as described above, then the cells ( $5 \times 10^4$ ) were differentiated in U bottom 96-well plates in «Human Treg Cell Differentiation Kit» medium (R&D systems) and cultured for 5 days. In some conditions, CPI-1205 (Adooq Bioscience A16357) or dimethyl sulfoxide (DMSO) were added to the culture.

***Mice.*** For mouse in vitro regulatory T cell differentiation, CD4<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup> naïve splenic T cells were isolated from C57BL/6 mice as described above. Then the cells ( $5 \times 10^4$ ) were

differentiated in U bottom 96-well plates in «Mouse Treg Cell Differentiation Kit» medium (R&D systems) and cultured for 5 days. In some conditions, CPI-1205 (Adooq Bioscience A16357) or dimethyl sulfoxide (DMSO) were added to the culture.

### **Assessment of Treg suppressive effect on T effector cells**

For T cell suppression assay, autologous PBMC from HD frozen during the Treg differentiation period were thawed and labeled with CellTrace Violet (Thermo Fisher Scientific) for 20 minutes at 37°C at a final concentration of 2,5 µM. PBMC-CTV<sup>+</sup> and autologous induced regulatory T cells were co-cultured (ratio 1/1) in RPMI 1640 with 10% FCS, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 50 mM 2-ME, 1 M HEPES, 0,5 µg/ml coated anti-CD3 (clone OKT3; Invitrogen) and 1 µg/ml soluble anti-CD28 (clone CD28.2; BD Pharmingen) mAbs (monoclonal antibodies), in U-bottom 96-well plates for 72h. After 3 days of culture, cells were stained with APC-labeled anti-CD4 (clone RPA-T4, BD Bioscience) and PE-Cy7-labeled anti-CD8 (SFCI21Thy2D3, Beckman Coulter) surface antibodies, and suppression was subsequently analyzed by flow cytometry (CellTrace Violet–based proliferation in combination with CD4 and CD8 staining). Data were analyzed using FACS Diva software as described below.

### **Flow cytometry**

#### ***Patients and healthy donors***

Surface markers staining for assessment of Treg from RA or SpA patients and from healthy donors, were carried with the following antibodies: BV510-labeled anti-CD4 (clone RPA.T4; BioLegend), PerCP-Cy5.5-labeled anti-CD25 (clone M-A251; BioLegend), APC-Cy7-labeled anti-CD39 (clone M A1, BioLegend), PE-Cy7-labeled anti-CD127 (clone A019D5) and APC-labeled anti-TNFR2 (clone 3G7A02; BioLegend). Cells were stained at 4°C in PBS containing 5% heat-inactivated FCS, 0.02 M sodium azide and 100µg/mL human immunoglobulin (Merck Millipore), and incubated for 20 min with appropriate dilutions of various antibodies or corresponding isotype controls.

For intracellular Foxp3, EZH2 and Helios staining, cells were fixed and permeabilized with Foxp3 Transcription Factor Staining Buffer Set (Thermo Fisher Scientific). The staining was accomplished with the following antibodies: PE-labeled anti-Foxp3 (clone PCH 101; Thermo Fisher Scientific), BV-421-labeled anti-EZH2 (clone 11/EZH2, BD Bioscience) and AlexaFluor-488-labeled anti-Helios (clone: 22F6, Biolegend) and incubated for 30 min at 4°C in

permeabilization buffer with appropriate dilution of various antibodies or corresponding isotype control.

For pSTAT5 staining on Treg, cells were fixed with pre-warmed Lyse/Fix Buffer (Phosflow, BD Bioscience) at 37°C for 12 minutes, permeabilized with pre-chilled Perm Buffer III (Phosflow, BD Bioscience) for 30 minutes on ice, washed two times with PBS containing 5% FCS, and finally stained for 60 minutes at room temperature with BV510-labeled anti-CD4 (clone RPA.T4; BioLegend), eFluor450-labeled anti-FoxP3 (clone: PCH101, Thermo Fisher Scientific), and AlexaFluor488-labeled anti-STAT5 (pY694) (clone 47; BD Bioscience), or corresponding isotype control coupled to eFluor450 and AlexaFluor488 in PBS containing 5% FCS, 0.02 M sodium azide and 100µg/mL human immunoglobulin (Calbiochem).

All flow cytometry data were acquired on a BD FACS CANTO II flow cytometer (Becton Dickinson). Gates were defined based on isotype controls and results were analyzed using FACS Diva software (BD Bioscience) and FlowJo software (Tree Star).

### ***Mice***

Cell surface markers were stained at 4°C in PBS containing 5% heat-inactivated FCS, 0.02 M sodium azide and 100µg/mL human immunoglobulin (Merck Millipore), and incubated for 20 min with appropriate dilutions of PE-labeled anti-CD25 (clone 7D4; Miltenyi) and APC-Cy7-labeled anti-CD4 (clone RM4-5; BD Biosciences) or corresponding isotype controls.

For intranuclear Foxp3 staining, cells were first fixed and permeabilized with the eBioscience Foxp3 Transcription Factor Staining Buffer Kit (Thermo Fisher Scientific), then staining was performed with APC-labeled anti-Foxp3 (clone FJK.16s; Thermo Fisher Scientific) or a corresponding APC-coupled isotypic control. Cells were incubated for 30 min at 4°C in permeabilization buffer with the appropriate dilution.

For pSTAT5 staining on Treg, cells were fixed with pre-warmed Lyse/Fix Buffer (Phosflow, BD Bioscience) at 37°C for 12 minutes, washed with PBS containing 5% FCS, permeabilized with pre-chilled Perm Buffer III (Phosflow, BD Bioscience) for 30 minutes on ice, washed two additional times with PBS containing 5% FCS, and finally stained for 60 minutes at room temperature with APC-Cy7-labeled anti-CD4 (clone GK1.5; BD Bioscience), PE-labeled anti-CD25 (clone 7D4; BD Bioscience), eFluor450-labeled anti-FoxP3 (clone FJK.16s; eBioscience), and AlexaFluor488-labeled anti-STAT5 (pY694) (clone 47; BD Bioscience), or corresponding

isotype control coupled to PE, eFluor450 and AlexaFluor488 in PBS containing 5% FCS, 0.02 M sodium azide and 100µg/mL human immunoglobulin (Calbiochem).

### ***Enzyme-Linked Immunosorbent Assay***

Cell-free culture supernatants were collected at the end of the culture period. Then, according to the manufacturer's instructions, ELISA kit (R&D systems, DY285) was used to measure IFN- $\gamma$  concentrations.

### ***Collagen-Induced arthritis induction, assessment and treatment***

Arthritis was induced with native bovine collagen type II (CIIb) (MD Biosciences, Zurich, Switzerland). At 8 wk of age, male DBA/1 mice were injected subcutaneous (s.c) at the base of the tail with 50 µg CII emulsified in complete Freund's adjuvant (CFA, MD Biosciences). A s.c booster of 50 µg CIIb emulsified in incomplete Freund's adjuvant (IFA, MD Biosciences) was given 21 days later (Thiolat et al., 2014b).

A blinded procedure was used to assess the clinical signs of arthritis in all four limbs. Arthritis severity scores attributed to each joint or group of joints (toes, tarsus, and ankles) were scored by the same experimenter as follows: 0, normal; 1, erythema; 2, swelling; 3, deformation; and 4, necrosis. These scores were summed to obtain the clinical arthritis score; the average clinical arthritis score in each group was used to assess the severity of CIA on each clinical observation day (Thiolat et al., 2014b).

DBA/1 mice were treated i.p. twice weekly with etanercept (ETN-Enbrel<sup>®</sup>, Pfizer) (30mg/Kg) or NaCl 0.9% from day 10 after the first immunization until euthanasia.

### **Statistical**

According to data distribution and number of groups, a parametric (ANOVA, T-test) or a nonparametric test (Kruskal–Wallis, Mann–Whitney) was used to compare data across the different groups. For the study of patient parameters (disease activity scores, Treg EZH2<sup>+</sup> frequency) before and after biologic treatment, a parametric (paired T-test) or a nonparametric test (Wilcoxon test) were used.

Correlations between the frequency of EZH2 and those of CD39, TNFR2 and Helios were assessed using the Spearman test.

For all tests, differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . Data are shown as mean  $\pm$  SEM. All analyses were performed using GraphPad Prism version 9.0 (Graphpad Software, San Diego, California USA).

## RESULTS

### **Decreased EZH2 expressing Treg frequency in RA and SpA patients.**

To assess the stability of regulatory T cells in the context of chronic inflammatory joint diseases (RA and SpA), we evaluated the expression of two Treg stability markers EZH2 (Arvey et al., 2014) and Helios (Kim et al., 2015) in Tregs ( $CD4^+CD25^+ CD127^{low} FoxP3^+$ ) from biotherapy-naive SpA and RA patients. We thus evaluated the frequency of  $EZH2^+$  Tregs and  $Helios^+$  Tregs in peripheral blood from RA and SpA patients that we compared to healthy donors (HD). We found that  $EZH2$  expressing Tregs frequency from both RA and SpA patients was significantly lower than in HD (Figure 1A). In contrast, we observed no significant difference in the frequency of  $Helios^+$  Tregs in RA and SpA patients compared to HD (Figure 1B).

### **Decreased $EZH2^+$ cell frequency in the sub-population of Treg $TNFR2^-$ and Treg $CD39^-$ .**

We and others have shown that Treg expressing  $TNFR2$  (Santinon et al., 2020) and  $CD39$  (Thiolat et al., 2014b) are highly immunosuppressive Tregs subpopulations, so we wanted to characterize the stability of these Tregs subpopulations by evaluating their  $EZH2$  expression.

We first evaluated  $EZH2$  expression in  $TNFR2^+$  or  $TNFR2^-$  (Figure 2A) and  $CD39^+$  or  $CD39^-$  (Figure 2C) Tregs independently of the pathological context by performing the analyses on the RA, SpA, and HD data pool. We found that  $EZH2^+$  Treg frequency as well as mean fluorescence intensity (MFI) (data not shown) in  $TNFR2^+$  (Figure 2A) and  $CD39^+$  (Figure 2C) Tregs were significantly higher compared to the  $TNFR2^-$  and  $CD39^-$  Tregs subpopulation, respectively. This was also observed when we distinguished RA, SpA patients and HD groups (Figures 2B, 2D).

Given that highly immunosuppressive Tregs are associated to  $EZH2$  expression and that  $EZH2^+$  Tregs frequency is significantly lower in RA and SpA patients, we decided to focus on  $EZH2^+$  Tregs. We compared  $TNFR2$ ,  $CD39$  and  $Helios$  frequency and MFI in  $EZH2^+$  or  $EZH2^-$  Tregs in the data pool (RA, SpA and HD) as described above. We showed that  $TNFR2$  and  $CD39$  Treg frequency (Figure 3A and 3C respectively) as well as MFI (Figure 3E and 3G respectively) were significantly lower in  $EZH2^-$  Tregs compared to  $EZH2^+$  Tregs. This was also true when we distinguished RA, SpA patients and HD (Figures 3B, 3D, 3F and 3H).

Conversely, no significant differences in Helios expressing Tregs frequency were observed either in the data pool or in the individual patient and HD groups (Figure 4).

Next, based on the findings above, we wondered whether EZH2<sup>+</sup> Treg frequency correlate with TNFR2, CD39 or Helios expressing Tregs frequencies. We thus performed a correlation test between the percentage of EZH2 among Tregs and those of TNFR2, CD39 and Helios (Figure 5). We found that the percentage of EZH2 was significantly correlated with those of CD39 in Tregs from both RA (R=0.51) and SpA (R=0.62) patients but not in Tregs from HD.

A significant positive correlation was also observed between the percentage of TNFR2 and EZH2 in Tregs from SpA patients (R=0.47). However, this correlation was not found in RA patients or HD.

Moreover, we did not observe a correlation between the percentage of EZH2 and Helios in Tregs from both RA and SpA patients as well as HD (Figure 5).

#### **Inhibition of EZH2 attenuates *in vitro* iTreg differentiation and suppressive function.**

Treg differentiation from naive CD4 T cells requires the expression of Foxp3. To assess the role of EZH2 on the acquisition of Foxp3 expression, we evaluated the effect of EZH2 inhibition with a commercially available specific EZH2 inhibitor, CPI-1205, on Treg differentiation *in vitro*. Naive CD4 T cells derived from HD PBMC or mouse splenocytes were differentiated *in vitro* into iTregs in the presence of CPI-1205 or its control DMSO. CPI-1205 significantly reduced human induced Tregs differentiation *in vitro* (58.51% ± 9.66 vs 27.95% ± 4.71, p<0.05) (Figure 6A). A similar effect of CPI-1205 was observed on mouse iTregs differentiation (55.47% ± 1.15 vs 38.87% ± 2.55) (Figure 6B). Furthermore, we evaluated the IFN- $\gamma$  level in the culture supernatant of the human iTregs that were differentiated in the presence of CPI-1205 or its control DMSO and we observed an increased IFN- $\gamma$  level in the supernatant of iTregs differentiated with CPI-1205 (232.5 pg/mL) compared to iTregs differentiated with DMSO control condition (119 pg/mL) (Figure 6C). We obtained similar results in mice (data not shown).

Next, to examine the role of EZH2 on human Treg function, we performed a suppression assay using human iTregs differentiated in the presence or absence of CPI-1205. Differentiated Tregs were co-cultured with thawed autologous CellTrace Violet (CTV)-labeled PBMC for 72 hours at a iTregs/PBMC ratio of 1/1. We ascertained that DMSO did not alter the suppressive



function of iTregs *in vitro* (Figure 6D). More interestingly, we demonstrated that iTregs differentiated in the presence of CPI-1205 lose their suppressive capacity as shown by the increase in the proliferation of CD4 and CD8 Teff cells (Figure 6D).

### **Targeted therapies have no impact on EZH2 expressing Tregs frequency.**

We have shown previously that some targeted therapies act in part by inducing an expansion of highly suppressive Tregs and restoring their suppressive activity in RA (Santinon et al., 2020; Thiolat et al., 2014b). In this regard, we wanted to examine whether targeted therapies act on Tregs by improving Treg stability in RA or SpA patients according to the response to treatment. So, since EZH2<sup>+</sup> Tregs frequency is significantly decreased in biotherapy-naive RA and SpA patients, we wanted to examine whether targeted therapies would restore Treg stability by increasing EZH2 expressing Tregs frequency. We thus assessed the frequency of EZH2<sup>+</sup>Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> CD127<sup>low</sup> FoxP3<sup>+</sup>EZH2<sup>+</sup>) in RA and SpA patients receiving targeted-therapy (anti-TNF $\alpha$ , anti-IL6R, CTLA-4-Ig or JAK inhibitors) at baseline (M0) and 3 months after (M3). In RA patients, treated with various targeted therapies, we observed increased EZH2<sup>+</sup> Tregs frequency of five patients, and inversely, decreased EZH2<sup>+</sup> Tregs frequency of five patients at M3. However, no modification in EZH2 expressing Treg frequency was observed in two patients between M0 and M3 (Figure 7A). The low number of patients per treatment group probably does not allow us to conclude definitively.

A significant decrease in DAS28 CRP was observed with a variable clinical response (Figure 7B). Among the 12 RA patients receiving biotherapy, 8 were good responders ( $\Delta$  DAS28 CRP >1.2), 2 were moderate responders ( $0,6 < \Delta$  DAS28 CRP < 1.2), and 2 were non-responders ( $\Delta$  DAS28 CRP < 0.6).

In SpA patients, all treated with anti-TNF $\alpha$  treatment, the later was also not associated with a significant change in the frequency of EZH2-expressing Tregs (Figure 7C). Indeed, 6 patients showed increase EZH2-expressing Treg frequency, while four patients showed decreased EZH2-expressing Treg frequency at M3. In four patients no variation in EZH2<sup>+</sup> Treg frequency was eventually observed (Figure 7C).

Clinical response to treatment was assessed (Figure 7D), among the 14 SpA patients receiving biotherapy, 11 of them are non-responders to treatment ( $\Delta$  BASDAI < 40) and 3 are responders ( $\Delta$  BASDAI > 40).

### **Decreased pSTAT5<sup>+</sup>Treg frequency in RA and SpA patients.**

STAT5 phosphorylation is related to its activation, and is involved in the stability of FoxP3 expression (Passerini et al., 2008). In this context, we evaluated the level of STAT5 phosphorylation in Tregs from RA and SpA patients to assess their stability. We thus compared the frequency of pSTAT5<sup>+</sup> Tregs from biotherapy-naive RA and SpA patients to HD. We show a decrease in the frequency of pSTAT5<sup>+</sup> Tregs in RA (mean 51.3% ± 6.0) and SpA (mean 52.9% ± 5.8) patients compared to HD (mean 70.7% ± 3.3) (Figure 8 A-B).

### **Etanercept restores pSTAT5 activation in Tregs from CIA treated mice.**

Next, we wanted to study the effect of etanercept, an anti-TNF $\alpha$  treatment, on Treg stability in mice during collagen-induced arthritis (CIA). For this purpose, we induced CIA in two groups of mice (n=8), one group was treated with etanercept and the control one with NaCl. As expected etanercept treatment significantly reduced the clinical signs of arthritis in the treated CIA group compared to the NaCl control (Figure 8C).

The effect of etanercept on Treg stability was then assessed by evaluating the level of STAT5 phosphorylation in splenic Tregs. The results showed a significantly higher frequency of pSTAT5<sup>+</sup> Tregs in ETN-treated mice compared to NaCl control mice (70.08% ± 1.21 vs 75.71% ± 1.38, p<0.01) (Figure 8D).

## **DISCUSSION**

Regulatory T cells (Tregs) play a central role in maintaining immune homeostasis and a defect in Tregs is involved in the pathogenesis of many autoimmune diseases including rheumatoid arthritis (RA) and spondyloarthritis (SpA) (Dominguez-Villar and Hafler, 2018; Guo et al., 2016). Thus, maintenance of Tregs identity is important in controlling the excessive inflammation associated with these diseases. To assess Tregs stability during chronic inflammation, we evaluated the expression of epigenetic and transcriptional regulators involved in the maintenance of Treg identity in RA and SpA patients. Our study describes for the first time a Tregs instability during RA and SpA, which is mediated, in part, by a significant decrease in EZH2<sup>+</sup> and pSTAT5<sup>+</sup> Tregs frequencies as compared to healthy donors. This work also includes data supporting a role for EZH2 in maintaining Tregs differentiation. In addition, this study reveals a link between EZH2 and suppressive markers (CD39 and TNFR2) in Tregs, suggesting that highly suppressive Treg are also more stable subpopulation. Finally, we show that

biotherapies can restore Tregs stability in collagen induced arthritis model, however this remains to be confirmed in RA and SpA patients.

EZH2 is an histone methyl transferase, which mediates trimethylation of H3K27 resulting in transcriptional repression of certain genes (Cao et al., 2002; Margueron and Reinberg, 2011). Its overexpression, notably in Tregs, has been associated with the induction of cell proliferation and oncogenesis in different types of cancer (Bracken, 2003; Varambally et al., 2002). In contrast, a decrease in EZH2 expression in PBMC and CD4 T cells has been demonstrated in RA patients (Xiao et al., 2020).

EZH2 expression on Tregs in autoimmunity has not yet been described, we thus show for the first time, an alteration of EZH2 expressing Tregs frequency during two chronic inflammatory autoimmune diseases, RA and SpA. The role of EZH2 on Treg stability, apart from an autoimmune inflammatory context, is well identified, as there is a close link between FoxP3 and EZH2 activity. Indeed, in response to inflammatory signals, FoxP3 recruits EZH2, resulting in transcriptional repression of key genes such as IFN- $\gamma$  (Arvey et al., 2014; Yang et al., 2015). EZH2 has other target genes. Recently, Xiao et al. showed that EZH2 induces the expression of RUNX1, a key transcription factor in the induction of Tregs expression and function. In parallel, EZH2 would inhibit the expression of SMAD7, a negative regulator of the TGF- $\beta$  signaling pathway involved in Tregs differentiation (Xiao et al., 2020). We further suggest that FoxP3 and EZH2-mediated transcriptional regulation in Tregs of RA and SpA patients could be abrogated due to decreased EZH2 expressing Treg frequency. This would lead to the instability of Tregs and consequently to the impairment of their suppressive function in RA and SpA.

Moreover, we sought to explore the underlying mechanism of EZH2-mediated Tregs stability. Consistent with Goswami et al. (Goswami et al., 2018) we show that CPI-1205, a pharmacological inhibitor of EZH2 (Vaswani et al., 2016), impairs iTregs differentiation *in vitro* and attenuates their suppressive function. Furthermore, we noted increased IFN- $\gamma$  in the supernatant of iTregs differentiated with CPI-1205. We thus confirm the importance of EZH2 in the induction of FoxP3 expression, and in the maintenance of Tregs identity and suppressive activity.

In previous studies, we and others, identified highly immunosuppressive Tregs subpopulations expressing CD39 or TNFR2 (Nguyen and Ehrenstein, 2016; Santinon et al., 2020; Thiolat et al., 2014b). Here, we identified a more stable Tregs subpopulations expressing both TNFR2 or

CD39 together with EZH2. This result highlights a potential role of EZH2 in the generation of highly stable and suppressive Tregs populations, and provide additional evidence for the importance of these suppressive markers in maintaining Tregs identity.

We have recently demonstrated that TNFR2 expression on Tregs favor Tregs phenotype notably by increasing FoxP3 stability (Santinon et al., 2020). Furthermore, it has been shown that under an inflammatory environment driven by TNF $\alpha$ , TNFR2 engagement results in a TNF $\alpha$ -TNFR2 autocrine loop that positively regulates EZH2 expression (Urbano et al., 2018). Thus, we propose that another mechanism allowing TNFR2 dependent stabilization of Tregs phenotype can be attributed to the induction of EZH2 expression.

We also identified a subpopulation of EZH2<sup>+</sup> Tregs, which are closely associated with the expression of the suppressive markers CD39 and TNFR2. Moreover, we show a positive correlation between the frequency of EZH2<sup>+</sup> Tregs and CD39 expressing Tregs from RA and SpA patients, and between the frequency of EZH2<sup>+</sup> Tregs and TNFR2 expressing Tregs from SpA patients. We therefore further confirm the association between EZH2 and CD39 and TNFR2 suppressive markers. Interestingly, the correlations demonstrated in RA or SpA patients were not observed in healthy individuals. This difference could be explained by the fact that in chronic inflammatory joint diseases, inflammation could induce an activation of Tregs that would set up mechanisms that tend to establish a global compensation and that, therefore, adopt a different transcriptional and epigenetic program compared to a physiological context.

Helios is a transcription factor involved in the regulation of FoxP3 expression and therefore the maintenance of Tregs identity. In line with the recent study of Lam et al. we do not show a change in the frequency of Helios<sup>+</sup> Tregs during chronic inflammation. Indeed, Lam et al. showed that human Helios-KO Tregs and non-genetically modified Tregs exhibit equivalent suppressive function and stability under inflammation (Lam et al., 2021).

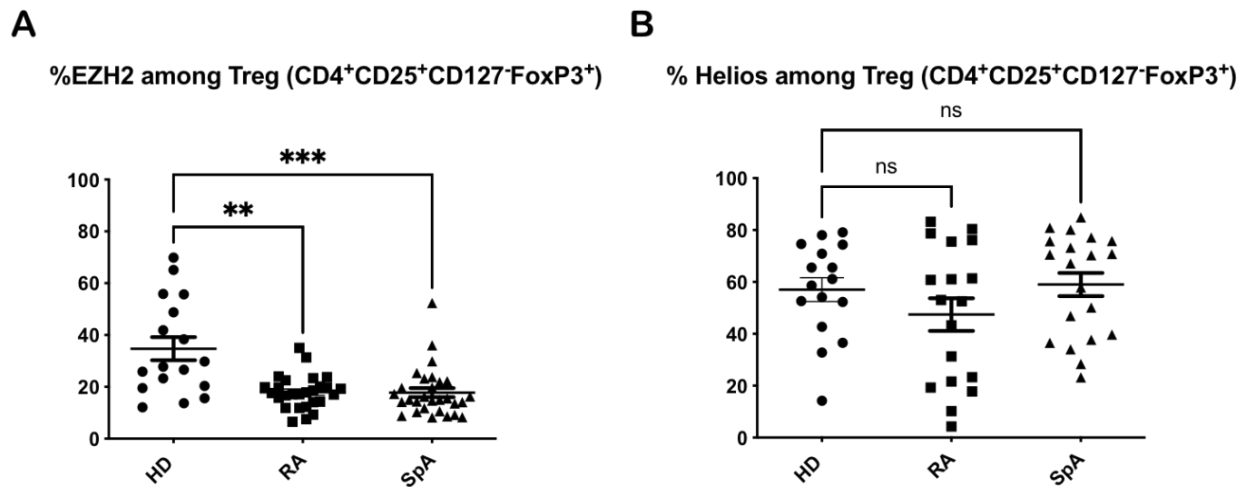
PhosphoSTAT5 (pSTAT5) binds to demethylated CNS2 inducing FoxP3 expression and maintaining its stability, which leads to strong Tregs suppressive activity (Alvarez Salazar et al., 2017). Here we show an IL-2 induced alteration of STAT5 phosphorylation in Tregs from RA and SpA patients. We suggest that the decrease in STAT5 phosphorylation could be the consequence of a functional alteration of the upstream signaling pathway. For example, a modification of the serine/threonine kinases Mst1-Mst2, which promotes the activation of

STAT5 in Tregs in response to IL-2 (Shi et al., 2018). This requires a further investigation in our context.

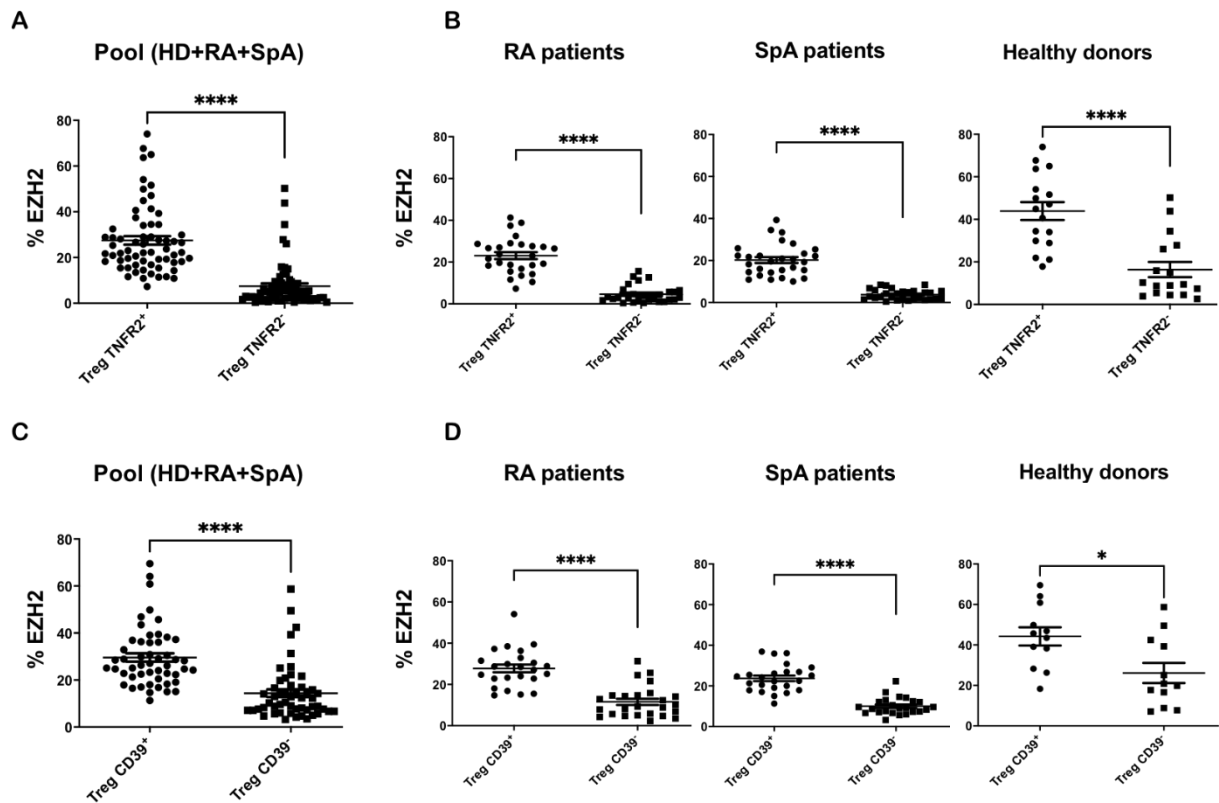
The impact of targeted therapies on Tregs stability in RA and SpA is not yet known. In this study, we did not observe a statistically significant difference in the frequency of EZH2<sup>+</sup> Tregs in RA and SpA patients before and 3 months after baseline. We suggest that EZH2 expressing Tregs frequency is independent of the effect of targeted therapies in responder patients with RA or SpA. Moreover, we have shown that etanercept, a soluble TNF $\alpha$  receptor, significantly reduced the clinical scores of arthritis in CIA mice and, at the cellular level, increased the frequency of pSTAT5<sup>+</sup> Tregs. Thus we can propose that etanercept would induce Tregs stability restoration and that this effect would be mediated by an increase in STAT5 phosphorylation. However, it remains to be determined how this anti-TNF $\alpha$  increases pSTAT5<sup>+</sup> Tregs frequency. Given that TNF $\alpha$ -TNFR2 signaling increased IL-2-induced STAT5 phosphorylation, and that anti-TNF $\alpha$  therapies increase TNFR2<sup>+</sup> Tregs frequency (Santinon et al., 2020), we suggest that TNF $\alpha$ -TNFR2 signaling, enhanced by etanercept, would partly underlie the increase of STAT5<sup>+</sup> Tregs frequency in etanercept-treated CIA mice. Thus, targeted therapies could restore Tregs stability in an inflammatory context in mice. However, this remains to be confirmed in RA and SpA patients treated with targeted therapies.

Thus, EZH2 and pSTAT5 may be interesting potential therapeutic targets in RA and SpA. However, since these regulators play a key role in multiple aspects of the development and function of other immune cells, further studies are needed to dissect the pathways dependent on these regulators in order to specifically target Tregs.

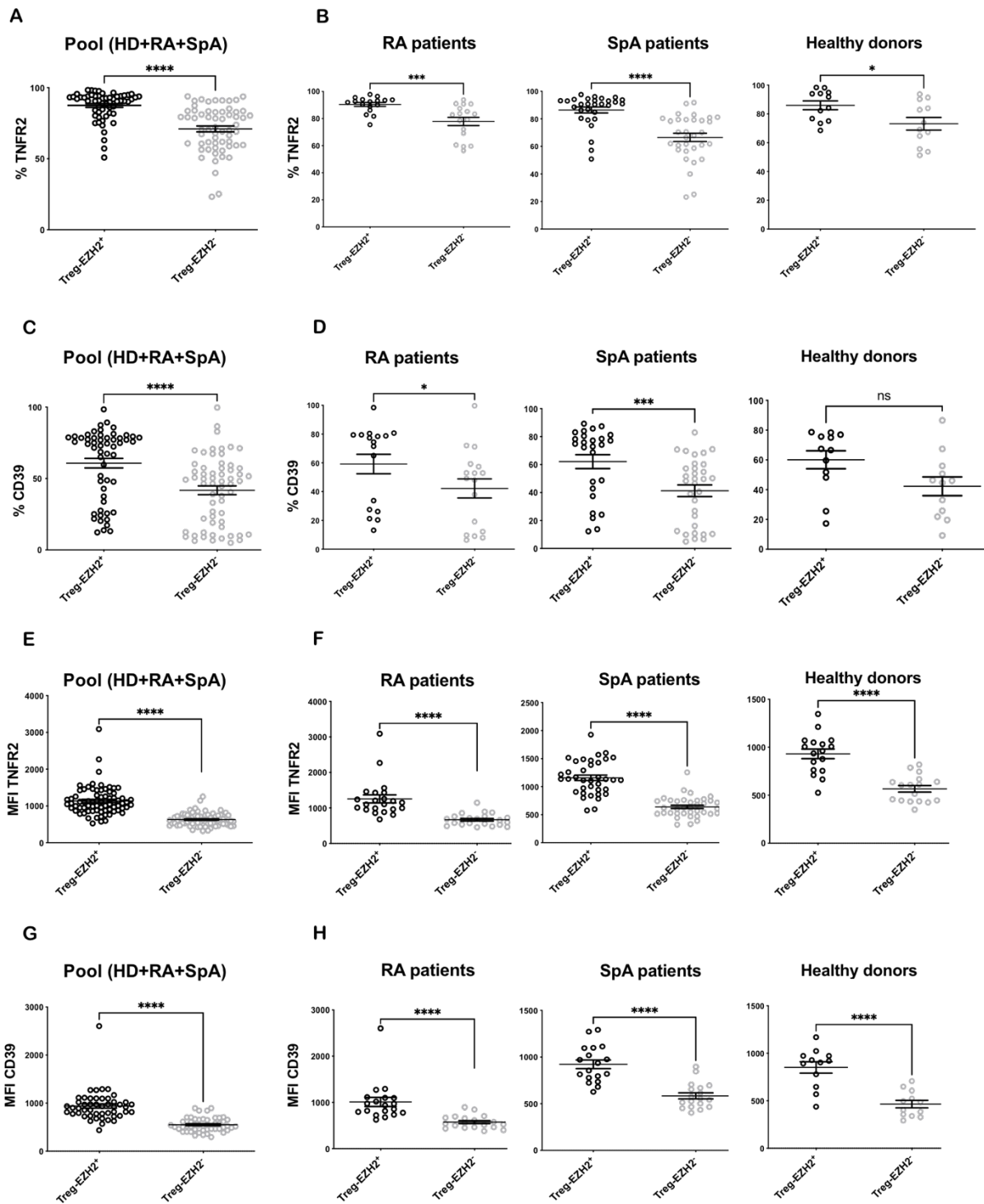
## FIGURES AND LEGENDS



**Figure 1 : Decreased EZH2<sup>+</sup> but not Helios<sup>+</sup> Tregs frequency in RA and SpA patients.** EZH2 (A) and Helios (B) expressing Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> CD127<sup>low</sup> FoxP3<sup>+</sup>) frequencies in RA patients (n= 27), SpA patients (n= 29) and HD (n=17) were assessed by flow cytometry. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Kruskal-Wallis test (A) and One-way ANOVA test (B) were used for statistical analysis. \*\* p< 0.01; \*\*\* p< 0.001, ns: not significant.

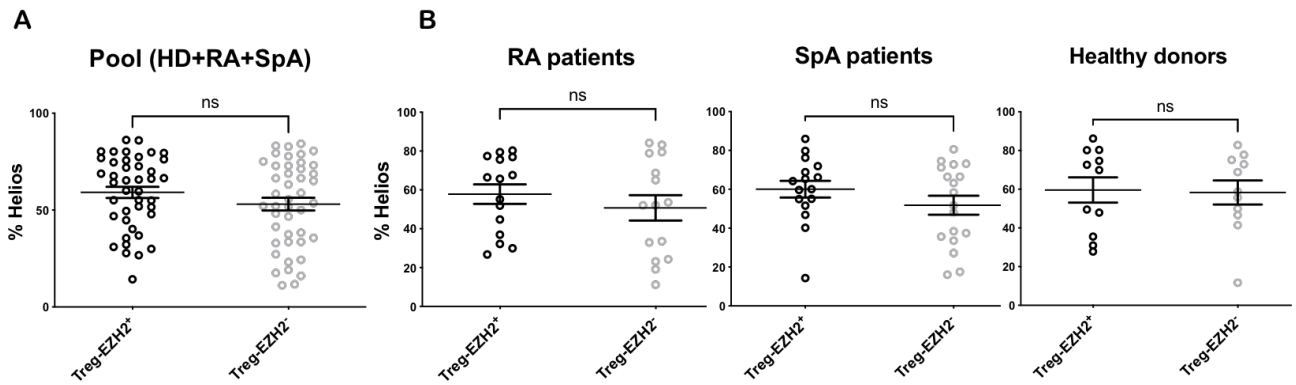


**Figure 2 : EHZ2<sup>+</sup> cell frequency among Treg according to CD39 and TNFR2 expression.** Data were pooled (A, C) for RA (n= 27), SpA (n= 29) and HD (n=17) to characterize Treg subpopulations independently of pathologies. Percentage of EHZ2 among Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup>TNFR2<sup>+</sup> or TNFR2<sup>-</sup> (A) and Treg-CD39<sup>+</sup> or CD39<sup>-</sup> (C) from pooled data (A, C) and individual groups of RA, SpA patients and HD (B, D). All data were assessed by flow cytometry and are expressed as mean ± SEM. Mann-Whitney test (A, C, D) and Unpaired t-test (B) were used for statistical analysis. \*\*\*\* p < 0.0001.

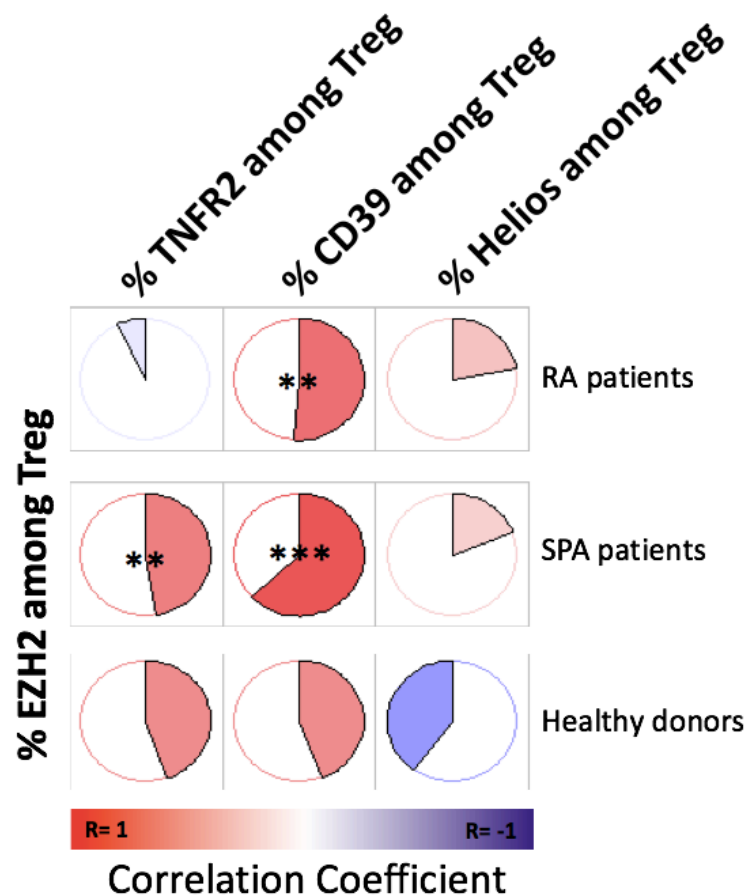


**Figure 3 : Suppressive markers expression in EZH2<sup>+</sup> or EZH2<sup>-</sup> Treg population.** Frequencies (A-B, C-D) and MFI (E-F, G-H) of TNFR2 and CD39 respectively among Treg-EZH2<sup>+</sup> or EZH2<sup>-</sup> from pooled data (A, C, E, G) and individual groups of RA (n= 27), SpA (n= 29) patients, and HD (n=17) (B, D, F, H). All data were assessed by flow cytometry and are expressed as mean  $\pm$  SEM. Mann-Whitney test (A-G) and Unpaired t-test (H) were used for statistical analysis. \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; ns: not significant.



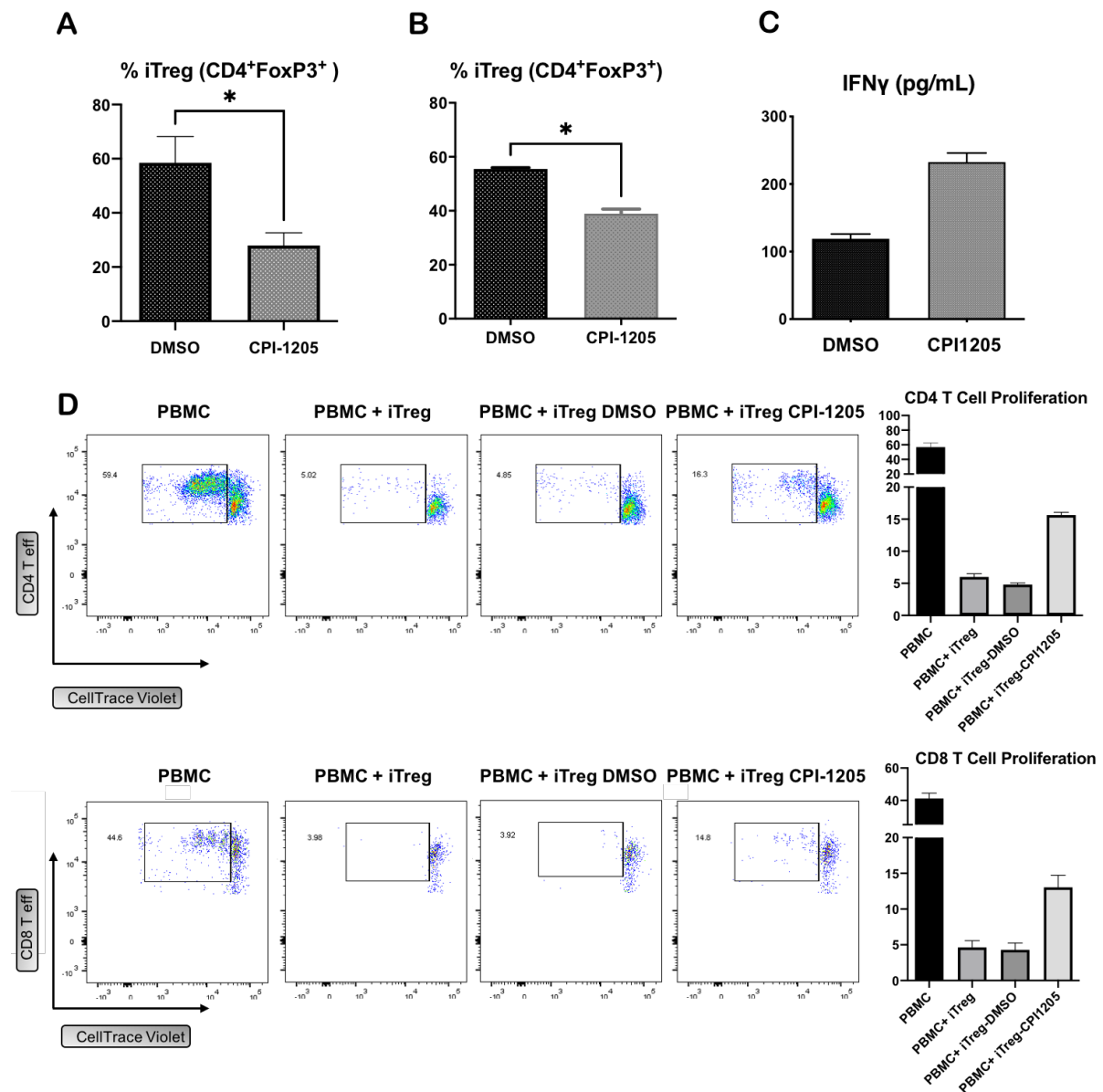


**Figure 4 : Helios<sup>+</sup> cells frequency among Tregs according to EZH2 expression.** Helios frequency among Treg-EZH2<sup>+</sup> or EZH2<sup>-</sup> from pooled data (A) (RA (n= 27), SpA (n= 29) and HD (n=17)) and individual groups of RA, SpA patients and HD (B). All data were assessed by flow cytometry and are expressed as mean ± SEM. Mann-Whitney test (A-B) was used for statistical analysis. ns: not significant.



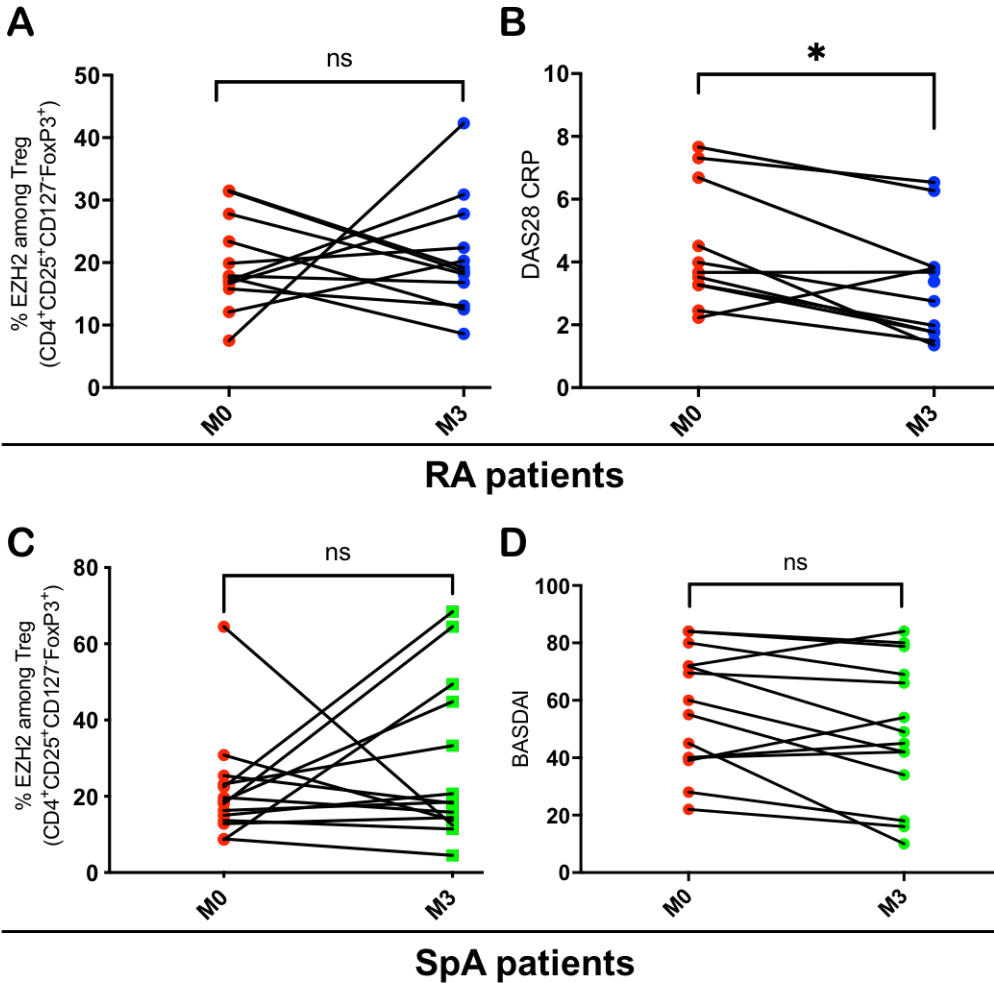
**Figure 5 : Correlation between EZH2<sup>+</sup> and suppressive markers (CD39, TNFR2 and Helios) Tregs frequencies from RA, SpA patients and healthy donors.** Graphical representation of Spearman correlations between percentage of EZH2 among Tregs and the frequencies of

TNFR2, CD39 and Helios among Tregs in RA and SpA patients as well as healthy donors. Red and blue colors indicate positive and negative correlations, respectively. The filled portion of the circle in each of the pie charts corresponds to the absolute value of the associated Spearman correlation coefficient (R). Spearman test was used for statistical analysis. \*\* p< 0.01; \*\*\* p< 0.001.



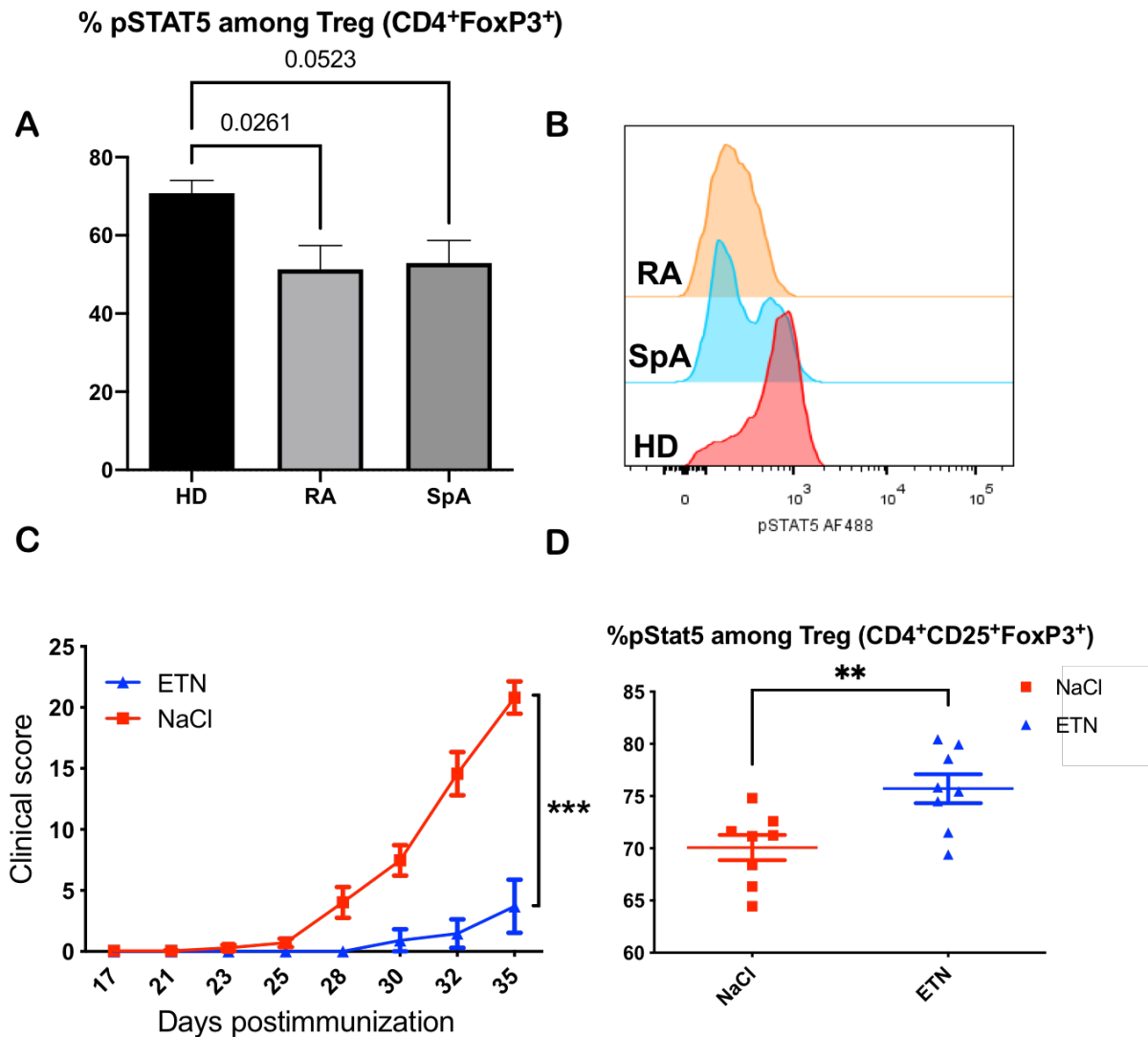
**Figure 6 : EZH2 inhibition by CPI-1205 attenuates *in vitro* iTreg differentiation and suppressive function.** Naive CD4 T cells isolated from healthy donor PBMC (A) or wild-type C57BL/6 mouse splenocytes (B) were differentiated *in vitro* into iTregs in the presence of 3.5 $\mu$ M (A) and 7 $\mu$ M (B) CPI-1205 or its control DMSO for 5 days. (C) Production of IFN- $\gamma$  in the culture supernatant of the human iTregs differentiated in the presence of CPI-1205 or its control DMSO. (D) Differentiated human iTregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) with or without 3.5 $\mu$ M

CPI-1205 were co-cultured with thawed autologous CellTrace Violet (CTV)-labeled PBMC for 72 hours at a ratio (1/1) with coated anti-CD3 antibodies (Abs) and soluble anti-CD28 Abs. Results are expressed as the percentage of proliferating CD4 and CD8 CTV<sup>dim</sup> Teff cells among PBMC-CTV<sup>+</sup>. Data shown in (A and B) were pooled from five (A), and two (B) independent experiments. In (C) data are representative of 1 of 2 experiments, each yielding similar results. Data are expressed as mean ± SEM. Mann-Whitney test (A, B) was used for statistical analysis. \* p< 0.05.



**Figure 7 : EZH2 expressing Tregs frequency is independant of targeted therapies.** Flow cytometry was used to analyse EZH2 frequency on blood Tregs at baseline and 3 months after targeted treatments in RA and SpA patients (A, C) [infliximab (n=2) etanercept (n=1), sarilumab (n=3), tocilizumab (n=4), baricitinib (n=1), abatacept (n=1)] in RA patients (n=12) and [infliximab (n=6) etanercept (n=1), adalimumab (n=6), golimumab (1)] in SpA patients (n=14). Percentage of EZH2<sup>+</sup> cells among Tregs from RA (A) or SpA (C) patients. Response to

treatment was assessed by DAS28 CRP (B) for RA patients and BASDAI (D) for SpA patients. Each red dot (M0) linked to a blue (RA patients) or green (SpA patients) dot (M3) by a black line represents an individual patient. Paired t-test (A, B, D) and Wilcoxon test (C) were used for statistical analysis. ns: not significant.



**Figure 8 : STAT5 phosphorylation in Tregs from RA, SpA patients and HD, and impact of etanercept treatment on STAT5 phosphorylation in Tregs from CIA mice.** PBMC from RA, SpA and HD were treated with recombinant human IL-2 (30 pg/mL) for 15 minutes at 37°C. (A) Frequency of pSTAT5<sup>+</sup> cells among CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg from RA patients (n= 18), SpA patients (n= 15) and HD (n=18) was assessed by flow cytometry. (B) Representative histograms of Treg-pSTAT5<sup>+</sup> frequency among the indicated individuals. (C) Clinical arthritis scores. CIA was induced at day 0, followed by i.p injection of ETN (0,75mg/injection, n=8) or NaCl (n=8) at days

10, 14, 17, 21, 24, 28 and 31. (D) Percentage of pSTAT5<sup>+</sup> cells among CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Tregs. CD4<sup>+</sup> T cells were isolated from NaCl control (n=8) and ETN (n=8) mice splenocytes at day 35 by magnetic separation and incubated for 15 minutes with recombinant mouse IL-2 (0.1 ng/ml). Data are expressed as mean ± SEM. Kruskal-Wallis test (A), Mann-Whitney test for area under the curve in each mouse (C), and Unpaired t-test (D) were used, for statistical analysis. ns: not significant, \*\* p≤ 0.01, \*\*\*\* p< 0.001.

## REFERENCES

Alvarez Salazar, E.K. *et al.* (2017) 'Methylation of FOXP3 TSDR Underlies the Impaired Suppressive Function of Tregs from Long-term Belatacept-Treated Kidney Transplant Patients', *Frontiers in Immunology*, 8. doi:10.3389/fimmu.2017.00219.

Arvey, A. *et al.* (2014) 'Inflammation-induced repression of chromatin bound by the transcription factor Foxp3 in regulatory T cells', *Nature Immunology*, 15(6), pp. 580–587. doi:10.1038/ni.2868.

Bracken, A.P. (2003) 'EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer', *The EMBO Journal*, 22(20), pp. 5323–5335. doi:10.1093/emboj/cdg542.

Cao, R. *et al.* (2002) 'Role of Histone H3 Lysine 27 Methylation in Polycomb-Group Silencing', *Science*, 298(5595), pp. 1039–1043. doi:10.1126/science.1076997.

Colamatteo, A. *et al.* (2020) 'Molecular Mechanisms Controlling Foxp3 Expression in Health and Autoimmunity: From Epigenetic to Post-translational Regulation', *Frontiers in Immunology*, 10, p. 3136. doi:10.3389/fimmu.2019.03136.

Dikiy, S. *et al.* (2021) 'A distal Foxp3 enhancer enables interleukin-2 dependent thymic Treg cell lineage commitment for robust immune tolerance', *Immunity*, 54(5), pp. 931-946.e11. doi:10.1016/j.immuni.2021.03.020.

Dominguez-Villar, M. and Hafler, D.A. (2018) 'Regulatory T cells in autoimmune disease', *Nature Immunology*, 19(7), pp. 665–673. doi:10.1038/s41590-018-0120-4.

Ehrenstein, M.R. *et al.* (2004) 'Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy', *The Journal of Experimental Medicine*, 200(3), pp. 277–285. doi:10.1084/jem.20040165.

Garg, G. *et al.* (2019) 'Blimp1 Prevents Methylation of Foxp3 and Loss of Regulatory T Cell Identity at Sites of Inflammation', *Cell Reports*, 26(7), pp. 1854-1868.e5. doi:10.1016/j.celrep.2019.01.070.

Goswami, S. *et al.* (2018) 'Modulation of EZH2 expression in T cells improves efficacy of anti-CTLA-4 therapy', *Journal of Clinical Investigation*, 128(9), pp. 3813–3818. doi:10.1172/JCI99760.

Guo, H. *et al.* (2016) 'Functional defects in CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatory cells in ankylosing spondylitis', *Scientific Reports*, 6(1), p. 37559. doi:10.1038/srep37559.

Jiang, Q. *et al.* (2021) 'Function and Role of Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis', *Frontiers in Immunology*, 12, p. 626193. doi:10.3389/fimmu.2021.626193.

Kim, H.-J. *et al.* (2015) 'Stable inhibitory activity of regulatory T cells requires the transcription factor Helios', *Science (New York, N.Y.)*, 350(6258), pp. 334–339. doi:10.1126/science.aad0616.

Lam, A.J. *et al.* (2021) 'Helios is a marker, not a driver, of human Treg stability', *European Journal of Immunology*, p. eji.202149318. doi:10.1002/eji.202149318.

Margueron, R. and Reinberg, D. (2011) 'The Polycomb complex PRC2 and its mark in life', *Nature*, 469(7330), pp. 343–349. doi:10.1038/nature09784.

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', *The Journal of Experimental Medicine*, 213(7), pp. 1241–1253. doi:10.1084/jem.20151255.

Passerini, L. *et al.* (2008) 'STAT5-signaling cytokines regulate the expression of FOXP3 in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cells', *International Immunology*, 20(3), pp. 421–431. doi:10.1093/intimm/dxn002.

Santinon, F. *et al.* (2020) 'Involvement of Tumor Necrosis Factor Receptor Type II in FoxP3 Stability and as a Marker of Treg Cells Specifically Expanded by Anti-Tumor Necrosis Factor Treatments in Rheumatoid Arthritis', *Arthritis & Rheumatology*, 72(4), pp. 576–587. doi:10.1002/art.41134.

Shi, H. *et al.* (2018) 'Hippo Kinases Mst1 and Mst2 Sense and Amplify IL-2R-STAT5 Signaling in Regulatory T Cells to Establish Stable Regulatory Activity', *Immunity*, 49(5), pp. 899-914.e6. doi:10.1016/j.immuni.2018.10.010.

Thiolat, A. *et al.* (2014) 'Interleukin-6 Receptor Blockade Enhances CD39<sup>+</sup> Regulatory T Cell Development in Rheumatoid Arthritis and in Experimental Arthritis: Effects of IL-6R Blockade on CD39<sup>+</sup> Treg Cells in Arthritis', *Arthritis & Rheumatology*, 66(2), pp. 273–283. doi:10.1002/art.38246.

Urbano, P.C.M. *et al.* (2018) 'An Autocrine TNF $\alpha$ -Tumor Necrosis Factor Receptor 2 Loop Promotes Epigenetic Effects Inducing Human Treg Stability In Vitro', *Frontiers in Immunology*, 9. doi:10.3389/fimmu.2018.00573.

Varambally, S. *et al.* (2002) *Nature*, 419(6907), pp. 624–629. doi:10.1038/nature01075.

Vaswani, R.G. *et al.* (2016) 'Identification of (R)-N-((4-Methoxy-6-methyl-2-oxo-1,2-dihydropyridin-3-yl)methyl)-2-methyl-1-(1-(1-(2,2,2-trifluoroethyl)piperidin-4-yl)ethyl)-1H-indole-3-carboxamide (CPI-1205), a Potent and Selective Inhibitor of Histone Methyltransferase EZH2, Suitable for Phase I Clinical Trials for B-Cell Lymphomas', *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(21), pp. 9928–9941. doi:10.1021/acs.jmedchem.6b01315.

Xiao, X. *et al.* (2020) 'EZH2 deficiency attenuates Treg differentiation in rheumatoid arthritis', *Journal of Autoimmunity*, 108, p. 102404. doi:10.1016/j.jaut.2020.102404.

Yang, X.-P. *et al.* (2015) 'EZH2 is crucial for both differentiation of regulatory T cells and T effector cell expansion', *Scientific Reports*, 5(1). doi:10.1038/srep10643.

Zhang, X., Olsen, N. and Zheng, S.G. (2020) 'The progress and prospect of regulatory T cells in autoimmune diseases', *Journal of Autoimmunity*, 111, p. 102461. doi:10.1016/j.jaut.2020.102461.





# III. DISCUSSION



La stabilité des lymphocytes T régulateurs dépend principalement de la stabilité de l'expression de FoxP3, principal régulateur de la fonction des Treg, participant au maintien de leur identité. Plusieurs mécanismes moléculaires liés à la régulation transcriptionnelle et épigénétique participent au maintien de la stabilité de FoxP3 dans les conditions physiologiques. Dans notre étude, l'hypothèse avancée postule que ces régulateurs pourraient, dans un contexte physiopathologique particulier tel que l'inflammation articulaire chronique (PR et SpA), présenter une expression modifiée, résultant en une instabilité des Treg.

## **A. Stabilité des Treg au cours de l'inflammation chronique**

### **a. EZH2, inducteur essentiel de la stabilité des Treg**

#### **i. Altération de la fréquence des Treg EZH2<sup>+</sup> au cours des maladies articulaires inflammatoires chroniques : PR et SpA**

Nous avons montré que la fréquence des Treg exprimant EZH2, un régulateur épigénétique impliqué dans la stabilité des Treg, est significativement diminuée chez les patients atteints de PR et de SpA naïfs de biothérapies comparés aux sujets sains.

Récemment, l'équipe de Zhang et al. ont porté leur attention sur l'implication d'EZH2 dans la PR. Dans leur étude, ils ont montré une diminution de l'expression d'EZH2 dans les PBMC et les lymphocytes T CD4 de patients atteints de PR comparés à des individus sains (Xiao et al., 2020). Nos résultats apportent quant à eux des arguments concernant la fréquence d'EZH2 dans la population de lymphocytes T régulateurs non décrite dans leur étude et son implication dans la PR.

EZH2 est une histone méthyl transférase responsable de la triméthylation de H3K27 à l'origine d'une répression transcriptionnelle de certains gènes. EZH2 fait l'objet de beaucoup d'études qui tendent à mettre en évidence son rôle dans la régulation de la différenciation et de la plasticité des lymphocytes T. En particulier, dans le maintien de la stabilité des Treg et par conséquent son implication dans le développement des maladies auto-immunes ainsi que dans le cancer. Au niveau moléculaire, un taux basal d'EZH2 doit être maintenu pour le bon fonctionnement cellulaire. Toutefois, depuis une vingtaine d'années, beaucoup de données ont mis en évidence une surexpression d'EZH2 dans les cellules cancéreuses et immunitaires

dans différentes formes de cancer. Cette surexpression rapportée notamment dans les Treg, a été associée à l'induction de la prolifération cellulaire et à l'oncogenèse (Bracken, 2003; Varambally, 2002).

A ce jour, le rôle d'EZH2 dans les Treg au cours de l'auto-immunité a fait l'objet de très peu d'études et aucune n'a déterminé son niveau d'expression au cours de l'inflammation articulaire chronique. Nous montrons ainsi pour la première fois, une altération de la fréquence des Treg EZH2<sup>+</sup> au cours de deux maladies auto-immunes inflammatoires chroniques, la PR et la SpA. Le rôle d'EZH2 dans la stabilité des Treg en dehors d'un contexte auto-immun inflammatoire est en revanche bien identifié, du fait qu'il existe un lien étroit entre FoxP3 et l'activité d'EZH2. En effet, dans les Treg activés, Foxp3 agit principalement comme un répresseur transcriptionnel en fonction de son association avec d'autres facteurs. En réponse aux signaux inflammatoires, FoxP3 recrute EZH2, ce qui entraîne la répression transcriptionnelle de gènes clés tels que celui qui code pour l'IFN- $\gamma$  (Arvey et al., 2014), empêchant la différenciation des Treg en lymphocytes Th1 proinflammatoires et favorisant le maintien de leur identité. Nous suggérons que l'inhibition de l'expression de l'IFN- $\gamma$  induite par FoxP3 et EZH2 dans les Treg des patients PR et SpA pourrait être levée en raison de la diminution de la fréquence des Treg EZH2<sup>+</sup> chez ces patients. Cela conduirait à l'instabilité des Treg et par conséquent, à l'altération de leur fonction suppressive dans la PR et la SpA.

## **ii. Stabilité des Treg dans les modèles murins d'arthrite expérimentale**

Nous avons évalué la stabilité des Treg en évaluant la fréquence d'EZH2 dans des modèles murins d'arthrite : un modèle d'inflammation chronique, l'AEC et un modèle d'inflammation aiguë, la DTHA (données non présentées). Nous avons choisi de travailler sur ces deux modèles pour mimer d'une part l'aspect chronique avec l'AEC et d'autre part, avec le modèle court de la DTHA, une poussée d'arthrite. Les résultats ne montrent pas d'altération de l'expression d'EZH2 dans les Treg au cours de l'arthrite dans ces modèles murins contrairement à ce que nous avons identifié chez les patients atteints de PR. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces résultats. On pourrait supposer que dans le modèle DTHA, le caractère aigu de l'arthrite n'a pas laissé le temps nécessaire à l'instauration d'une instabilité des Treg. Et dans le modèle AEC, nous aurions procédé à l'analyse cellulaire au mauvais moment, quand les Treg auraient restauré leur stabilité. De plus, chez l'humain, l'étude a été menée sur des Treg isolés du sang périphérique, or dans les modèles murins,

nous avons réalisé nos analyses sur des Treg isolés des organes lymphoïdes secondaires, notamment les ganglions drainants les articulations inflammatoires. Ceci laisse penser que les Treg pourraient répondre de manière différente et que probablement le microenvironnement inflammatoire serait à l'origine d'une activation de ces cellules et d'une induction du maintien de leur stabilité (Garg et al., 2019). Par ailleurs, nous avons observé chez les souris arthritiques, dans les deux modèles, une augmentation significative de la fréquence des Treg activés TNFR2<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup> (données non présentées). On peut supposer qu'il s'agisse d'un mécanisme de régulation consistant à produire des Treg plus activés et plus stables mais que cela ne suffise pas à résoudre l'inflammation dans ces modèles.

Enfin, on pourrait également supposer que ce paramètre n'est pas modifié au cours de l'inflammation dans ces modèles. En effet, le rôle des Treg dans l'AEC n'est pas très bien caractérisé et dans la DTHA pas connu. De ce fait, nous pouvons penser que les Treg ne possèdent pas le même rôle dans le développement de l'arthrite expérimentale comparé à la maladie chez l'humain, d'où la limite des modèles expérimentaux qui ne reflètent pas de manière exacte la pathologie humaine, ce qui rend ces résultats non transposables.

#### **i. Rôle d'EZH2 dans le maintien de l'identité des Treg**

Actuellement, EZH2 fait l'objet de beaucoup de recherches pour une meilleure compréhension de son implication dans l'immunité anti-tumorale. En effet, une dérégulation de l'expression d'EZH2, qui se traduit par sa surexpression dans les cellules tumorales et les cellules immunitaires a été mise en évidence dans différents types de cancer. De ce fait, EZH2 est évalué comme un nouveau biomarqueur et une nouvelle cible dans les thérapies innovantes anticancéreuses. Ainsi, dans le contexte des thérapies ciblées dans le cancer et dans le but de renforcer les réponses immunitaires anti-tumorales, des inhibiteurs d'EZH2 ont été développés.

De manière à rejoindre et soutenir les résultats de Goswami et al., nous montrons dans notre étude que le CPI-1205, inhibiteur pharmacologique d'EZH2 (Vaswani et al., 2016), influence la différenciation des iTreg *in vitro* et atténue leur activité suppressive. Nous confirmons ainsi l'importance d'EZH2 dans l'induction de l'expression de FoxP3 *in vitro* et dans le maintien de l'identité des Treg et de leur activité suppressive. De plus, nous montrons que le CPI-1205 a induit une augmentation de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  au cours de la différenciation des T naïfs en Treg. Par ailleurs, dans l'étude de Goswami et al., une diminution

de la stabilité des iTreg différenciés avec le CPI-1205, qui se traduit par une diminution de l'expression des facteurs spécifiques des Treg (FoxP3, Neuropilin-1 et Bach2) a également été observée (Goswami et al., 2018).

Dans une autre étude, Yang et al. suggèrent que cette altération de la différenciation des iTreg en présence de CPI-1205 serait secondaire à un effet autocrine de l'IFN- $\gamma$  (Yang et al., 2015). Ceci semble être en accord avec les travaux de Wei et al. selon lesquels l'IFN- $\gamma$  inhibe l'expression de FoxP3 en activant STAT1 et T-bet (Wei et al., 2007). Cette hypothèse a été confirmée en montrant une restauration de la différenciation des iTreg *in vitro* en présence d'anticorps bloquants anti-IFN- $\gamma$ , suggérant ainsi qu'EZH2 supprime l'expression de l'IFN- $\gamma$  permettant la différenciation des iTreg et le maintien de leur identité (Yang et al., 2015). Très récemment, un autre mécanisme moléculaire par lequel EZH2 régule la différenciation des iTreg a été mis en évidence. En effet, Xiao et al. ont montré qu'EZH2 favoriserait l'expression de RUNX1, facteur de transcription clé dans l'induction de l'expression et de la fonction des Treg. En parallèle, EZH2 inhiberait l'expression de SMAD7, régulateur négatif de la voie de signalisation TGF $\beta$  au cours de la médiation de la différenciation des Treg (Xiao et al., 2020).

Pour approfondir ces résultats et comprendre leurs implications *in vivo*, Yang et al. ont montré que la suppression spécifique d'EZH2 dans les lymphocytes T CD4 chez des souris transgéniques  $CD4^{cre}EZH2^{fl/fl}$  entraîne une diminution significative de l'expression de FoxP3 dans les CD4 de la rate et des ganglions lymphatiques. En utilisant un modèle de souris transgéniques présentant une délétion conditionnelle d'EZH2 dans les Treg ( $FoxP3^{cre}EZH2^{fl/fl}$ ), Goswami et al. ont observé une instabilité du phénotype immunosuppresseur des Treg déficients en EZH2 qui ont été reprogrammés en Teff pro-inflammatoires produisant de l'IFN- $\gamma$  chez ces souris porteuses de tumeurs. Cette reprogrammation a induit une immunité anti-tumorale robuste (Goswami et al., 2018). De plus, dans un modèle murin de cancer, le traitement des souris avec le CPI-1205 induit une diminution importante de la croissance tumorale. Au niveau cellulaire, une diminution de l'expression de FoxP3 dans les Treg intra-tumoraux a également été observée (Wang et al., 2018). Par ailleurs, l'effet de cet inhibiteur pharmacologique sur les Teff de l'inflammation se traduit par une amélioration de la cytotoxicité des Teff *in vitro* et une augmentation de la proportion des lymphocytes T cytotoxiques infiltrant les tumeurs *in vivo* (Goswami et al., 2018; Wang et al., 2018).

Les implications fonctionnelles de la déficience en EZH2 sur les propriétés de Treg ont également été étudiées dans des modèles d'auto-immunité. En effet, il a été montré que les Treg déficients en EZH2 ne protègent pas contre le développement de l'auto-immunité dans un modèle de colite à médiation cellulaire T *in vivo* (Yang et al., 2015). Les Treg déficients en EZH2 ont également été incapables de maintenir l'homéostasie immunitaire *in vivo*, ni de résoudre l'inflammation dans un modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) (DuPage et al., 2015). Ces études indiquent un rôle positif d'EZH2 dans la régulation de la différenciation, de l'activation et de la fonction suppressive des Treg, d'où son importance dans le maintien de leur stabilité.

ii. **Dépendance de l'expression d'EZH2 et des marqueurs de suppression CD39 et TNFR2**

Notre étude a permis d'identifier des sous-populations de Treg probablement plus stables exprimant à la fois TNFR2 et EZH2 ou CD39 et EZH2. En effet, nous avons évalué la stabilité des Treg CD39<sup>+</sup> en évaluant la fréquence d'expression d'EZH2. Nous montrons que la fréquence d'EZH2 est significativement plus élevée dans la population de Treg CD39<sup>+</sup> par rapport aux Treg CD39<sup>-</sup>. Ces résultats ayant été retrouvés chez les sujets sains ainsi que chez des patients atteints de PR et de SpA.

Le CD39 exprimé à la surface des Treg permet l'hydrolyse de l'ATP extracellulaire et, avec le CD73, entraîne la production d'adénosine, un médiateur anti-inflammatoire (Borsellino et al., 2007). L'altération fonctionnelle de cette ectonucléotidase entraîne une perte de la fonction des Treg et le développement d'une auto-immunité (Sauer et al., 2012). Ainsi, l'expression du CD39 sur les Treg a été associée à une activité suppressive importante (Thiolat et al., 2014b) et l'un des effets passe par la suppression de l'activité des Th17 (Fletcher et al., 2009), population pro-inflammatoire importante dans la pathogénèse de la PR et de la SpA. Nous apportons dans notre étude des arguments supplémentaires soulignant l'importance de ce marqueur de suppression dans le maintien de l'identité des Treg.

Nous avons également montré que la fréquence d'EZH2 était plus élevée dans les Treg TNFR2<sup>+</sup> que dans les Treg TNFR2<sup>-</sup> et ce, indépendamment d'un contexte pathologique, étant donné que les mêmes résultats ont été observés chez les patients PR et SpA ainsi que dans le groupe des sujets sains. Ces résultats rejoignent et confirment ce que nous avons très récemment mis en évidence, c'est à dire que l'expression du TNFR2 par les Treg est associée

à une stabilité de ces derniers. En effet, dans notre récente publication, nous avons montré que l'expression du TNFR2 à la surface des Treg leur confère une expression stable de FoxP3 et est important pour leur activité suppressive puisque nous avons montré que le transfert adoptif de ces sous-populations chez des souris TNFR2KO améliore l'inflammation expérimentale. De plus, dans un environnement inflammatoire, en présence de TNF $\alpha$ , l'engagement du TNFR2 entraîne une boucle autocrine TNF $\alpha$ -TNFR2 qui régule positivement l'expression de l'histone méthyltransférase EZH2 (Urbano et al., 2018). Ainsi, dans notre étude, nous apportons également des arguments soutenant l'implication du TNFR2 dans le maintien de l'identité des Treg qui pourrait en partie être médié par EZH2.

Finalement, les suggestions que nous pouvons formuler sont que l'expression des marqueurs de suppression CD39 et TNFR2 par les Treg est associée à une stabilité médiée, au moins en partie, par EZH2.

Nous avons également pu identifier une sous-population de Treg EZH2<sup>+</sup>, ces Treg sont étroitement associés à l'expression des marqueurs de suppression CD39 et TNFR2. En effet, nous avons montré que les fréquences du CD39 et du TNFR2 sont significativement élevées dans les Treg EZH2<sup>+</sup>. Nous avons également montré des MFI plus importantes de ces marqueurs dans les Treg EZH2<sup>+</sup>, indiquant que ces cellules expriment plus fortement CD39 et TNFR2 comparé aux Treg EZH2<sup>-</sup>. Ainsi, nous confirmons d'autant plus l'association entre l'expression d'EZH2 et celle des marqueurs de suppression CD39 et TNFR2. Nous avons apporté des preuves supplémentaires de l'association entre EZH2 et les marqueurs de suppression en montrant une corrélation positive et significative entre la fréquence des Treg EZH2<sup>+</sup> et celle des Treg CD39<sup>+</sup> chez les patients atteints de PR et de SpA. Et entre la fréquence des Treg EZH2<sup>+</sup> et celle des Treg exprimant le TNFR2 chez les patients atteints de SpA. Néanmoins, ce résultat n'a pas été confirmé chez les patients atteints de PR.

Pour terminer, de manière intéressante, les corrélations démontrées chez les patients PR ou SpA n'ont pas été observées chez les sujets sains. Cette différence pourrait être expliquée par le fait que dans les maladies articulaires inflammatoires chroniques, l'inflammation pourrait induire une activation des Treg qui mettraient en place des mécanismes qui tendent à établir un certain équilibre et qui, de ce fait, adoptent un programme transcriptionnel et épigénétique global différent de celui d'un contexte physiologique.



## **b. La fréquence des Treg Helios<sup>+</sup> n'est pas modifiée au cours de la PR et de la SpA**

Helios est un facteur de transcription impliqué dans la régulation de l'expression de FoxP3. Plusieurs études ont mis en évidence le rôle de Helios dans la stabilité des Treg. En effet, il a été montré qu'une déficience de l'expression de Helios dans les Treg entraîne une instabilité de ces cellules qui se traduit par une diminution de FoxP3, une augmentation de l'expression des cytokines effectrices inflammatoires IFN- $\gamma$  et IL-17 et par conséquent le développement de l'auto-immunité dans des modèles murins (Kim et al., 2015; Sebastian et al., 2016).

Dans notre étude, nous n'avons pas observé d'altération de la fréquence des Treg Helios<sup>+</sup> au cours des maladies articulaires inflammatoires chroniques chez les patients atteints de PR et de SpA. Nos résultats peuvent être soutenus par la récente étude de Lam et al. qui présente Helios comme marqueur de stabilité des Treg humains et non inducteur de leur stabilité au cours de l'inflammation. En utilisant le système d'édition génétique CRISPR/Cas9, Lam et al. ont supprimé l'expression de Helios dans des Treg humains et ont montré que les Treg Helios-KO et les Treg non modifiés génétiquement présentent une fonction suppressive et une stabilité équivalente dans l'inflammation (Lam et al., 2021).

Par ailleurs, nous n'avons démontré aucune association, ni corrélation, entre la fréquence des Treg Helios<sup>+</sup> et celle des Treg EZH2<sup>+</sup> chez les patients atteints de PR ou de SpA, ni chez les individus sains.

## **c. Altération de la phosphorylation de STAT5 dans les Treg au cours de la PR et de la SpA**

pSTAT5 est un inducteur de la stabilité des lymphocytes T régulateurs. STAT5 phosphorylé se fixe sur le gène foxp3 au niveau du CNS-2, induisant l'expression de FoxP3 et le maintien de sa stabilité, ce qui conduit à une forte activité suppressive des Treg (Alvarez Salazar et al., 2017).

Nous avons montré que la fréquence des Treg exprimant pSTAT5 était diminuée chez les patients PR et SpA naïfs de biothérapies comparés aux sujets sains. Nos résultats rejoignent en partie ceux de Guo et al., qui ont montré une phosphorylation relativement faible de STAT5

dans les formes actives de SpA (Guo et al., 2016). Dans leur étude, ils montrent que la diminution de la fréquence de pSTAT5 dans les Treg résulte de l'altération de la capacité de ces cellules à consommer l'IL-2 extracellulaire de manière efficiente. Peu de temps après, un mécanisme intracellulaire d'activation de STAT5 en aval de l'IL-2 a été décrit (Shi et al., 2018). En effet, des sérine/thréonine kinases Mst1 et Mst2 ont été identifiées comme amplificateurs dépendant du signal de l'activité de l'IL-2-STAT5 dans les Treg. Les Mst1-Mst2 promeuvent l'activation de STAT5 dans les Treg en réponse à l'IL-2, nécessaire à la stabilité des Treg et au maintien d'une activité fortement immunosuppressive. Le rôle de Mst1-Mst2 dans le maintien de l'identité des Treg induit par pSTAT5 a été d'autant plus mis en évidence avec le développement spontané d'une auto-immunité multi-organes de type Scurfy chez des souris déficientes en Mst1-Mst2 dans les Treg (Shi et al., 2018). Ainsi, ces données suggèrent que la diminution de la phosphorylation de STAT5 dans les Treg chez les patients PR et SpA que nous présentons, pourrait être le résultat d'une altération fonctionnelle de Mst1-Mst2. Cette piste nécessite donc une exploration dans notre contexte.

## **B. Impact des thérapies ciblées sur la stabilité des Treg au cours de l'inflammation chronique**

### **a. Etude de la fréquence des Treg EZH2<sup>+</sup> au cours des traitements ciblés dans la PR et la SpA**

Nous avons postulé que l'altération fonctionnelle des Treg est liée à l'induction d'une instabilité de FoxP3 au cours de l'inflammation chronique et avons mis en évidence une instabilité des Treg médiée par une altération de la fréquence des Treg EZH2<sup>+</sup>. Nous avons ensuite émis l'hypothèse que les biothérapies agissent sur les Treg en rétablissant leur stabilité chez les patients répondeurs en augmentant la fréquence des Treg EZH2<sup>+</sup>. Récemment, l'équipe de Sharma et al. a montré que le traitement par un anti-CTLA-4 augmente l'expression d'EZH2 dans les lymphocytes T CD4 périphériques de patients atteints de cancer de la prostate, ce qui est à l'origine de la diminution de l'efficacité du traitement dans cette cohorte de patients (Goswami et al., 2018).

Dans notre étude, nous n'avons pas observé de différence statistiquement significative de la fréquence des Treg EZH2<sup>+</sup> chez les patients PR et SpA avant et 3 mois après l'initiation d'une biothérapie, au moment de l'évaluation de la réponse au traitement. La conclusion que nous

avançons à l'heure actuelle est que la fréquence des Treg EZH2<sup>+</sup> est indépendante de l'effet des biothérapies chez les patients répondeurs atteints de PR ou de SpA.

Aujourd'hui, il existe plusieurs traitements efficaces dans la PR, dont les inhibiteurs du TNF $\alpha$ , de l'IL-6R, du CD80/86 et des JAK. Ces thérapies ciblées exercent leur effet thérapeutique principalement en modifiant la réponse immunitaire, mais leur rôle sur la stabilité des lymphocytes T régulateurs dans la PR et la SpA n'a pas encore été décrit. Les mécanismes d'action des thérapies ciblées peuvent être différents en fonction de la biothérapie et de la pathologie traitée. En effet, nous avons montré dans notre récente étude que les inhibiteurs du TNF $\alpha$  ont induit une expansion des Treg et particulièrement la sous-population des Treg TNFR2<sup>+</sup> après 3 mois de traitement chez les patients atteints de PR. Cet effet sur les Treg TNFR2<sup>+</sup> semble en revanche être spécifique des anti-TNF $\alpha$ , étant donné qu'un pareil effet n'a pas été observé chez les patients traités par un anti-IL-6R. L'effet des anti-TNF $\alpha$  sur les Treg TNFR2<sup>+</sup> semble être également spécifique de la PR car nous ne le retrouvons pas dans la SpA. Nous pouvons donc suggérer que les biothérapies induisent des modifications propres à chacune de ces pathologies.

De ce fait, étant donné que les différentes biothérapies peuvent avoir des mécanismes d'action et des rôles différents et en raison du faible nombre de patients PR par groupe de traitement dans notre étude (anti-TNF $\alpha$  (n=3), CTLA-4-Ig (n=1), anti-JAK (n=1) et anti-IL-6R (n=7)), nous ne pouvons pas, à ce stade, avancer une conclusion définitive.

A l'inverse des patients PR traités par des biothérapies différentes, dans notre groupe de patients SpA, tous les patients sont traités par des anti-TNF $\alpha$ . Cependant, en raison du faible nombre de patients répondeurs (patients répondeurs (n=3), patients non répondeurs (n=9)), nous ne pouvons pas conclure de manière définitive. Par ailleurs, nous observons une tendance à l'expansion de la sous-population de Treg EZH2<sup>+</sup> chez les patients répondeurs.

#### **b. La phosphorylation de STAT5 dans les Treg est liée à l'efficacité du traitement par l'éтанercept dans l'arthrite expérimentale au collagène**

Pour terminer, nous avons également évalué l'impact des biothérapies sur la stabilité des Treg dans un modèle d'AEC chez la souris. Nous avons montré que l'éтанercept, récepteur soluble du TNF $\alpha$ , a réduit significativement les signes cliniques de l'arthrite chez les souris AEC et au niveau cellulaire, a augmenté la fréquence des Treg pSTAT5<sup>+</sup>. Ainsi nous pouvons

proposer que l'éтанercept induirait une restauration de la stabilité des Treg et que cet effet serait médié par une augmentation de la phosphorylation de STAT5. Cependant, reste à déterminer comment cet anti-TNF $\alpha$  augmente la fréquence des Treg pSTAT5<sup>+</sup>.

Nous avons montré dans notre récente étude que les anti-TNF $\alpha$  incluant l'éтанercept induisent une augmentation de la fréquence des Treg TNFR2<sup>+</sup> chez les patients PR après 3 mois de traitement. D'autre part, nous avons montré que les Treg de souris KOTNFR2 possèdent un niveau de méthylation du TSDR plus élevé que les Treg de souris WT et avons postulé que le TNFR2 pourrait induire une hypométhylation du TSDR médiée par une activation de STAT5. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons montré chez la souris, que le TNF $\alpha$  augmente la phosphorylation de STAT5 induite par l'IL-2 *in vitro* (Santinon et al., 2020). Sur la base de ces données, nous pourrions d'une part supposer que l'éтанercept favoriserait l'expression du TNFR2 dans les Treg chez les souris AEC. D'autre part, nous suggérons que la signalisation TNF $\alpha$ -TNFR2 favorisée par l'éтанercept, serait en partie à l'origine de l'augmentation de pSTAT5 dans les Treg observée chez les souris AEC traitées par l'éтанercept.

### **C. Stabilité et plasticité des Treg dans le microenvironnement inflammatoire : notion paradoxale**

L'altération fonctionnelle des Treg observée dans la PR et la SpA pourrait résulter de leur exposition à un environnement inflammatoire, induisant une instabilité et une plasticité pathogène. En effet, un Treg gagne en plasticité ce qu'il perd en stabilité. Sous certaines conditions, notamment un microenvironnement inflammatoire, les Treg peuvent devenir instables et subissent une reprogrammation de leur profil immunosuppresseur en Teff pro-inflammatoires produisant des cytokines pro-inflammatoires (Hansmann et al., 2012; Hua et al., 2018; Oldenhove et al., 2009), facilitant ainsi l'auto-immunité et exacerbant la maladie.

A l'inverse, d'autres études ont mis en évidence une plasticité non-pathogène des Treg dans un environnement inflammatoire et soutiennent l'idée que le microenvironnement inflammatoire initie une boucle de rétroaction qui maintient l'identité et la fonction des Treg pour contrer l'inflammation (Garg et al., 2019). En effet, les Treg sont capables d'acquérir l'expression de facteurs de transcription et de récepteurs de chimiokines normalement associés aux Teff de l'inflammation Th1 (Koch et al., 2009; Levine et al., 2017) Th2 (Zheng et al., 2009), Th17 (Chaudhry et al., 2009; Sefik et al., 2015), tout en conservant l'expression de

FoxP3. Ces Treg Th-Like présentent une fonction immunosuppressive spécifique à une réponse inflammatoire médiée par les Teff dont ils présentent les mêmes caractéristiques. Dans ce cas précis, on pourrait supposer qu'il s'agisse plutôt d'une adaptabilité fonctionnelle des Treg au microenvironnement inflammatoire. Cette hypothèse repose sur le fait que les Treg peuvent s'adapter à leur environnement et modifier considérablement leur phénotype tout en conservant leur fonction suppressive. En effet, au-delà de la suppression immunitaire et en dehors des organes lymphoïdes, les Treg résidants dans les tissus sains adaptent également leurs profils d'expression génétique, par exemple dans les muscles squelettiques les Treg produisent le facteur de croissance amphiregulin qui agit en potentialisant la réparation musculaire (Burzyn et al., 2013). Autre exemple, les Treg présents dans le tissu adipeux viscéral expriment le facteur de transcription PPAR $\gamma$  et agissent pour contrôler l'inflammation associée à l'obésité dans le tissu adipeux (Cipolletta et al., 2012). Ainsi, ces données mettent en évidence la capacité d'adaptation fonctionnelle des Treg en fonction du microenvironnement local. En revanche, reste à déterminer comment et sous quelles conditions les changements épigénétiques spécifiques aux Treg permettent finalement l'acquisition de ces propriétés et fonctions adaptatives.

De ce fait, à ce jour, la question de savoir si les Treg présentent une stabilité permettant de maintenir leur fonction suppressive au cours de l'inflammation chronique avec une adaptation au microenvironnement associé, en particulier dans les sites inflammatoires où les cytokines pro-inflammatoires sont abondantes, ou au contraire, subissent une plasticité pathogène résultant d'une instabilité et se différencient en Teff de l'inflammation producteurs de cytokines proinflammatoires, est controversée. Le comportement des Treg pendant l'inflammation chronique reste donc à mieux comprendre. Dans notre étude nous abordons la question de la stabilité des Treg périphériques au cours de l'inflammation chroniques (PR et SpA) ce qui peut différer du comportement qu'adoptent les Treg dans le site inflammatoire.



# **IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES**





Les objectifs de ce travail de thèse étaient d'évaluer la stabilité des lymphocytes T régulateurs au cours de l'inflammation chronique et d'établir le lien entre les thérapies ciblées et la stabilité des Treg. De ce fait, durant cette thèse, nous avons évalué plusieurs mécanismes de régulation impliqués dans le maintien de l'identité des Treg et l'ensemble de nos résultats nous ont, en partie, permis de vérifier nos hypothèses.

En effet, le travail réalisé sur le sang de patients atteints de PR et de SpA nous a permis de mettre en évidence, pour la première fois, une instabilité des Treg au cours des maladies articulaires inflammatoires chroniques résultant d'une altération des mécanismes de régulation médiés par EZH2 et pSTAT5 mais pas par Helios. De plus, nous suggérons que l'expression d'EZH2 est associée aux Treg hautement immunosuppresseurs exprimant le CD39 et le TNFR2. Nous apportons également des preuves supplémentaires de l'importance d'EZH2 dans le maintien du profil immunosuppresseur des Treg et de leur identité. Pour terminer, nos résultats suggèrent que les thérapies ciblées pourraient restaurer la stabilité des Treg dans un contexte inflammatoire, comme observé dans le modèle murin d'arthrite expérimentale au collagène. Cette dernière suggestion reste néanmoins à confirmer chez les patients atteints de PR et de SpA traités par des thérapies ciblées.

Nos données actuelles concernant l'étude de l'impact des biothérapies sur les Treg EZH2<sup>+</sup> ne nous permettant pas de conclure de manière définitive, il est donc primordial de continuer le recrutement des patients. Nous devons, d'une part, augmenter le nombre de patients PR par groupe de traitement et d'autre part, augmenter le nombre de patients SpA répondeurs aux anti-TNF $\alpha$  ou autre thérapie ciblée. Le but est de déterminer si les paramètres de stabilité étudiés sont dépendants de la réponse au traitement et à long terme, de mettre en évidence des paramètres prédictifs de la réponse.

Etant donné que nous avons également observé une altération de pSTAT5 dans les Treg au cours de ces deux maladies articulaires inflammatoires chroniques et au vu des résultats obtenus dans le modèle d'AEC, nous prévoyons également d'étudier l'impact des thérapies ciblées sur la phosphorylation de STAT5 dans les Treg chez les patients atteints de PR ou de SpA.

De plus, il serait intéressant d'étudier les mécanismes à l'origine de l'altération de la phosphorylation de STAT5 induite par l'IL-2 dans les Treg au cours de la PR et la SpA. Faisant suite à l'étude de Shi et al. (Shi et al., 2018), il est en effet envisageable de penser à une

probable altération fonctionnelle des sérine/thréonine kinases Mst1-Mst2 chez les patients PR et SpA présentant une altération de la phosphorylation de STAT5 dans les Treg. Ainsi, cette piste nécessite une exploration dans notre contexte au cours de la PR et la SpA.

Au cours de cette thèse, nous avons réalisé des tris biomagnétiques des lymphocytes T régulateurs à partir des PBMC de patients PR et SpA inclus dans notre étude. Des extractions ADN et ARN ont été réalisées sur les Treg purifiés des patients PR et SpA mais aussi sur des Treg isolés à partir de PBMC de sujets sains. Le but est d'évaluer la stabilité des lymphocytes T régulateurs au cours de l'inflammation chronique en étudiant, d'une part, le profil de méthylation du TSDR chez les patients PR et SpA et les comparer aux sujets sains. D'autre part, nous pourrions évaluer les niveaux d'expression de certains miRNA décrits dans la littérature comme impliqués dans le maintien de la stabilité des Treg (Guo et al., 2008; Lu et al., 2009; Takahashi et al., 2012; Zhou et al., 2015), au cours de la PR et de la SpA.

Par ailleurs, à partir des ARN totaux extraits des Treg de patients PR et SpA, il serait intéressant de réaliser une étude incluant une analyse globale du transcriptome. Le but de cette étude serait d'identifier d'éventuels changements dans l'expression des paramètres de stabilité des Treg au cours de ces maladies articulaires inflammatoires chroniques.

Nous avons montré que l'inhibition d'EZH2 avec le CPI-1205 a réduit significativement la différenciation des iTreg *in vitro* et a été à l'origine d'une altération de leur fonction suppressive et d'une production d'IFN- $\gamma$  détectée dans les surnageants de culture. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer le profil adopté par les Treg induits en présence de CPI-1205, et ce notamment, en évaluant, par marquage intracellulaire, la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- $\gamma$ , l'IL-17 et le TNF $\alpha$ .

Récemment, Urbano et al. ont montré qu'une boucle autocrine TNF $\alpha$ -TNFR2 jouait un rôle important dans la stabilité des Treg médiée par EZH2. Dans leur étude, ils ont montré que la rapamycine inhibait l'expression d'EZH2 induite par le CD28 super agoniste (CD28-SA), en revanche l'ajout d'un agoniste du TNFR2 lève cette inhibition et favorise l'expression de facteurs associés aux Treg, notamment FoxP3 (Urbano et al., 2018). En associant les résultats descriptifs et prometteurs que nous avons obtenus aux données de la littérature, il serait intéressant d'établir le lien fonctionnel entre la signalisation TNFR2 et l'expression d'EZH2 dans les Treg. Ainsi, dans un premier temps, nous pourrions déterminer si le blocage de la

signalisation du TNFR2 avec un anticorps anti-TNFR2 inhibe l'expression d'EZH2 induite par le CD28-SA dans les Treg humains *in vitro*.

Par ailleurs, il serait également intéressant d'évaluer la fréquence des Treg EZH2<sup>+</sup> chez des souris KOTNFR2 et de la comparer à des souris de type sauvage. Des cultures *in vitro* seront également envisagées sur les Treg des souris KOTNFR2. Il serait par exemple envisageable d'évaluer l'induction de l'expression d'EZH2 par le CD28SA dans les Treg de souris KOTNFR2 *in vitro* comparée à des Treg de souris de type sauvage. Ou encore d'évaluer l'impact de la suppression de la signalisation TNFR2 sur la différenciation des Treg *in vitro*. Au final, notre objectif sera d'étudier le lien entre la signalisation TNFR2, la fonction d'EZH2 et la différenciation des Treg *in vitro*.

Enfin, il serait également intéressant d'évaluer si la downrégulation d'EZH2 exacerbe les signes cliniques de l'arthrite en induisant une instabilité des Treg dans un modèle d'arthrite expérimentale chez des souris traitées par le CPI-1205 ou chez des souris *FoxP3<sup>cre</sup> EZH2<sup>fl/fl</sup>* (Goswami et al., 2018).

Au final, l'ensemble de nos résultats nous ont permis de mettre en évidence deux potentielles cibles thérapeutiques intéressantes dans la PR et la SpA qui sont EZH2 et pSTAT5. Cependant, étant donné que ces régulateurs jouent un rôle clé dans de multiples aspects du développement et de la fonction d'autres cellules immunitaires, des études supplémentaires sont nécessaires pour disséquer les voies dépendant de ces régulateurs afin de cibler spécifiquement les lymphocytes T régulateurs dans une perspective de développement de nouvelles stratégies pour le traitement et la prévention de ces maladies.



# **V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abbas, A.K., Benoist, C., Bluestone, J.A., Campbell, D.J., Ghosh, S., Hori, S., Jiang, S., Kuchroo, V.K., Mathis, D., Roncarolo, M.G., et al. (2013). Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nat. Immunol.* *14*, 307–308.
- Acosta-Rodriguez, E.V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2007). Interleukins 1 $\beta$  and 6 but not transforming growth factor- $\beta$  are essential for the differentiation of interleukin 17–producing human T helper cells. *Nat. Immunol.* *8*, 942–949.
- Aidinis, V., Plows, D., Haralambous, S., Armaka, M., Papadopoulos, P., Kanaki, M., Koczan, D., Thiesen, H., and Kollias, G. (2003). [No title found]. *Arthritis Res. Ther.* *5*, R140.
- Akbari, O. (2003). Role of regulatory T cells in allergy and asthma. *Curr. Opin. Immunol.* *15*, 627–633.
- Akimova, T., Beier, U.H., Wang, L., Levine, M.H., and Hancock, W.W. (2011). Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PLoS One* *6*, e24226.
- Akitsu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Chung, S., Ikeda, S., Shimizu, K., Kubo, S., Liu, Y., Umemura, M., Matsuzaki, G., et al. (2015). IL-1 receptor antagonist-deficient mice develop autoimmune arthritis due to intrinsic activation of IL-17-producing CCR2+V $\gamma$ 6+ $\gamma\delta$  T cells. *Nat. Commun.* *6*, 7464.
- Aletaha, D., Alasti, F., and Smolen, J.S. (2016). Optimisation of a treat-to-target approach in rheumatoid arthritis: strategies for the 3-month time point. *Ann. Rheum. Dis.* *75*, 1479–1485.
- Ali, M.N., Chojookhuu, N., Takagi, H., Srisowanna, N., Nguyen Nhat Huynh, M., Yamaguchi, Y., Synn Oo, P., Tin Htwe Kyaw, M., Sato, K., Yamaguchi, R., et al. (2018). The HDAC Inhibitor, SAHA, Prevents Colonic Inflammation by Suppressing Pro-inflammatory Cytokines and Chemokines in DSS-induced Colitis. *ACTA Histochem. Cytochem.* *51*, 33–40.
- Alunno, A., Nocentini, G., Bistoni, O., Petrillo, M.G., Bartoloni Bocci, E., Ronchetti, S., Lo Vaglio, E., Riccardi, C., and Gerli, R. (2012). Expansion of CD4+CD25-GITR+ regulatory T-cell subset in the peripheral blood of patients with primary Sjögren’s syndrome: correlation with disease activity. *Reumatismo* *64*, 293–298.
- Aluvihare, V.R., Kallikourdis, M., and Betz, A.G. (2004). Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat. Immunol.* *5*, 266–271.
- 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*.
- Apostolou, I., and von Boehmer, H. (2004). In Vivo Instruction of Suppressor Commitment in Naive T Cells. *J. Exp. Med.* *199*, 1401–1408.
- Appel, H., Maier, R., Loddenkemper, C., Kayser, R., Meier, O., Hempfing, A., and Sieper, J. (2010). Immunohistochemical Analysis of Osteoblasts in Zygapophyseal Joints of Patients with Ankylosing Spondylitis Reveal Repair Mechanisms Similar to Osteoarthritis. *J. Rheumatol.* *37*, 823–828.
- Arterbery, A.S., Osafo-Addo, A., Avitzur, Y., Ciarleglio, M., Deng, Y., Lobritto, S.J., Martinez, M., Hafler, D.A., Kleinewietfeld, M., and Ekong, U.D. (2016). Production of Proinflammatory Cytokines by Monocytes in Liver-Transplanted Recipients with De Novo Autoimmune Hepatitis

Is Enhanced and Induces TH1-like Regulatory T Cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **196**, 4040–4051.

Arvey, A., van der Veeke, J., Samstein, R.M., Feng, Y., Stamatoyannopoulos, J.A., and Rudensky, A.Y. (2014). Inflammation-induced repression of chromatin bound by the transcription factor Foxp3 in regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **15**, 580–587.

Aslam, M.M., John, P., Bhatti, A., Jahangir, S., and Kamboh, M.I. (2019). Vitamin D as a Principal Factor in Mediating Rheumatoid Arthritis-Derived Immune Response. *BioMed Res. Int.* **2019**, 1–12.

Asquith, M., Elewaut, D., Lin, P., and Rosenbaum, J.T. (2014). The role of the gut and microbes in the pathogenesis of spondyloarthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **28**, 687–702.

Assi, L.K., Wong, S.H., Ludwig, A., Raza, K., Gordon, C., Salmon, M., Lord, J.M., and Scheel-Toellner, D. (2007). Tumor necrosis factor  $\alpha$  activates release of B lymphocyte stimulator by neutrophils infiltrating the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum.* **56**, 1776–1786.

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.

Babaie, F., Mohammadi, H., Hemmatzadeh, M., Ebrahimi, M., Torkamandi, S., Yousefi, M., Hajaliloo, M., Rezaeiemanesh, A., Salimi, S., Salimi, R., et al. (2020). Evaluation of ERAP1 gene single nucleotide polymorphisms in immunomodulation of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines profile in ankylosing spondylitis. *Immunol. Lett.* **217**, 31–38.

Baecher-Allan, C., Wolf, E., and Hafler, D.A. (2006). MHC Class II Expression Identifies Functionally Distinct Human Regulatory T Cells. *J. Immunol.* **176**, 4622–4631.

Baeten, D., Sieper, J., Braun, J., Baraliakos, X., Dougados, M., Emery, P., Deodhar, A., Porter, B., Martin, R., Andersson, M., et al. (2015). Secukinumab, an Interleukin-17A Inhibitor, in Ankylosing Spondylitis. *N. Engl. J. Med.* **373**, 2534–2548.

Bailey-Bucktrout, S.L., Martinez-Llordella, M., Zhou, X., Anthony, B., Rosenthal, W., Luche, H., Fehling, H.J., and Bluestone, J.A. (2013). Self-antigen-Driven Activation Induces Instability of Regulatory T Cells during an Inflammatory Autoimmune Response. *Immunity* **39**, 949–962.

Beier, U.H., Wang, L., Bhatti, T.R., Liu, Y., Han, R., Ge, G., and Hancock, W.W. (2011). Sirtuin-1 Targeting Promotes Foxp3<sup>+</sup> T-Regulatory Cell Function and Prolongs Allograft Survival. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 1022–1029.

Benedetti, G., and Miossec, P. (2014). Interleukin 17 contributes to the chronicity of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* **44**, 339–347.

Bennett, C.L., Yoshioka, R., Kiyosawa, H., Barker, D.F., Fain, P.R., Shigeoka, A.O., and Chance, P.F. (2000). X-Linked syndrome of polyendocrinopathy, immune dysfunction, and diarrhea

maps to Xp11.23-Xq13.3. *Am. J. Hum. Genet.* 66, 461–468.

van den Berg, W.B., Joosten, L.A.B., and van Lent, P.L.E.M. (2007). Murine Antigen-Induced Arthritis. In *Arthritis Research*, A.P. Cope, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 243–253.

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.

BIRAC Consortium, YEAR Consortium, Stahl, E.A., Raychaudhuri, S., Remmers, E.F., Xie, G., Eyre, S., Thomson, B.P., Li, Y., Kurreeman, F.A.S., et al. (2010). Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat. Genet.* 42, 508–514.

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. Baltim. Md 1950* 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.

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

Bolden, J.E., Peart, M.J., and Johnstone, R.W. (2006). Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 769–784.

Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., Höpner, S., Centonze, D., Bernardi, G., Dell’Acqua, M.L., et al. (2007). Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 110, 1225–1232.

Boyle, D.L., Soma, K., Hodge, J., Kavanaugh, A., Mandel, D., Mease, P., Shurmur, R., Singhal, A.K., Wei, N., Rosengren, S., et al. (2015). The JAK inhibitor tofacitinib suppresses synovial JAK1-STAT signalling in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 74, 1311–1316.

Bracken, A.P. (2003). EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J.* 22, 5323–5335.

Brand, D.D., Latham, K.A., and Rosloniec, E.F. (2007). Collagen-induced arthritis. *Nat. Protoc.* 2, 1269–1275.

Braun, J., and Sieper, J. (2007). Ankylosing spondylitis. *The Lancet* 369, 1379–1390.

Brinkmann, V. (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* 303, 1532–1535.

Brown, M.A., Xu, H., and Li, Z. (2020). Genetics and the axial spondyloarthritis spectrum. *Rheumatology* 59, iv58–iv66.

Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paepker, 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, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* 27, 68–73.



- Burchill, M.A., Yang, J., Vogtenhuber, C., Blazar, B.R., and Farrar, M.A. (2007a). IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 280–290.
- Burchill, M.A., Yang, J., Vogtenhuber, C., Blazar, B.R., and Farrar, M.A. (2007b). IL-2 Receptor  $\beta$ -Dependent STAT5 Activation Is Required for the Development of Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells. *J. Immunol.* *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.
- Burzyn, D., Kuswanto, W., Kolodin, D., Shadrach, J.L., Cerletti, M., Jang, Y., Sefik, E., Tan, T.G., Wagers, A.J., Benoist, C., et al. (2013). A Special Population of Regulatory T Cells Potentiates Muscle Repair. *Cell* *155*, 1282–1295.
- Bykerk, V.P. (2020). The efficacy and safety of targeting GM-CSF in arthritis. *Lancet Rheumatol.* *2*, e648–e650.
- Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R.S., and Zhang, Y. (2002). Role of Histone H3 Lysine 27 Methylation in Polycomb-Group Silencing. *Science* *298*, 1039–1043.
- Cardoso, C., Mignon, C., Hetet, G., Grandchamps, B., Fontes, M., and Colleaux, L. (2000). c. *Eur. J. Hum. Genet.* *8*, 174–180.
- Carrier, Y., Yuan, J., Kuchroo, V.K., and Weiner, H.L. (2007). Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 179–185.
- Carter, J.D., Gérard, H.C., Espinoza, L.R., Ricca, L.R., Valeriano, J., Snelgrove, J., Oszust, C., Vasey, F.B., and Hudson, A.P. (2009). Chlamydiae as etiologic agents in chronic undifferentiated spondylarthritis. *Arthritis Rheum.* *60*, 1311–1316.
- Chakravarti, A., Raquil, M.-A., Tessier, P., and Poubelle, P.E. (2009). Surface RANKL of Toll-like receptor 4-stimulated human neutrophils activates osteoclastic bone resorption. *Blood* *114*, 1633–1644.
- Chang, H.-H., Liu, G.-Y., Dwivedi, N., Sun, B., Okamoto, Y., Kinslow, J.D., Deane, K.D., Demoruelle, M.K., Norris, J.M., Thompson, P.R., et al. (2016). A molecular signature of preclinical rheumatoid arthritis triggered by dysregulated PTPN22. *JCI Insight* *1*, e90045.
- Chang, J.-H., Kim, Y.-J., Han, S.-H., and Kang, C.-Y. (2009). IFN- $\gamma$ -STAT1 signal regulates the differentiation of inducible Treg: Potential role for ROS-mediated apoptosis. *Eur. J. Immunol.* *39*, 1241–1251.
- Chatzidionysiou, K., Lie, E., Nasonov, E., Lukina, G., Hetland, M.L., Tarp, U., Gabay, C., van Riel, P.L.C.M., Nordstrom, D.C., Gomez-Reino, J., et al. (2011). Highest clinical effectiveness of rituximab in autoantibody-positive patients with rheumatoid arthritis and in those for whom

no more than one previous TNF antagonist has failed: pooled data from 10 European registries. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, 1575–1580.

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

Chaudhry, A., Samstein, R.M., Treuting, P., Liang, Y., Pils, M.C., Heinrich, J.-M., Jack, R.S., Wunderlich, F.T., Brüning, J.C., Müller, W., et al. (2011). Interleukin-10 Signaling in Regulatory T Cells Is Required for Suppression of Th17 Cell-Mediated Inflammation. *Immunity* **34**, 566–578.

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, Q., Kim, Y.C., Laurence, A., Punkosdy, G.A., and Shevach, E.M. (2011). IL-2 Controls the Stability of Foxp3 Expression in TGF- $\beta$ -Induced Foxp3<sup>+</sup> T Cells In Vivo. *J. Immunol.* **186**, 6329–6337.

Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.-J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naive T cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* **198**, 1875–1886.

Chen, X., Bäumel, M., Männel, 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<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T Regulatory Cells. *J. Immunol.* **179**, 154–161.

Chen, X., Nie, Y., Xiao, H., Bian, Z., Scarzello, A.J., Song, N.-Y., Trivett, A.L., Yang, D., and Oppenheim, J.J. (2016b). Corrigendum: TNFR2 expression by CD4 effector T cells is required to induce full-fledged experimental colitis. *Sci. Rep.* **6**, 34680.

Chen, Y., Kuchroo, V.K., Inobe, J., Hafler, D.A., and Weiner, H.L. (1994). Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* **265**, 1237–1240.

Chen, Z., Barbi, J., Bu, S., Yang, H.-Y., Li, Z., Gao, Y., Jinasena, D., Fu, J., Lin, F., Chen, C., et al. (2013). The ubiquitin ligase Stub1 negatively modulates regulatory T cell suppressive activity by promoting degradation of the transcription factor Foxp3. *Immunity* **39**, 272–285.

Chong, M.M.W., Rasmussen, J.P., Rudensky, A.Y., and Littman, D.R. (2008). The RNaseIII enzyme Drosha is critical in T cells for preventing lethal inflammatory disease. *J. Exp. Med.* **205**, 2005–2017.

Chougnet, C., and Hildeman, D. (2016). Helios—controller of Treg stability and function. *Transl. Cancer Res.* **5**, S338–S341.

Christianson, C.A., Corr, M., Firestein, G.S., Mobargha, A., Yaksh, T.L., and Svensson, C.I. (2010). Characterization of the acute and persistent pain state present in K/BxN serum transfer arthritis. *Pain* **151**, 394–403.

Ciferri, C., Lander, G.C., Maiolica, A., Herzog, F., Aebersold, R., and Nogales, E. (2012). Molecular architecture of human polycomb repressive complex 2. *ELife* **1**, e00005.

Cipolletta, D., Feuerer, M., Li, A., Kamei, N., Lee, J., Shoelson, S.E., Benoist, C., and Mathis, D. (2012). PPAR- $\gamma$  is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg

cells. *Nature* 486, 549–553.

Colamatteo, A., Carbone, F., Bruzzaniti, S., Galgani, M., Fusco, C., Maniscalco, G.T., Di Rella, F., de Candia, P., and De Rosa, V. (2020). Molecular Mechanisms Controlling Foxp3 Expression in Health and Autoimmunity: From Epigenetic to Post-translational Regulation. *Front. Immunol.* 10, 3136.

Colbert, R.A., DeLay, M.L., Klenk, E.I., and Layh-Schmitt, G. (2010). From HLA-B27 to spondyloarthritis: a journey through the ER. *Immunol. Rev.* 233, 181–202.

Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S., and Vignali, D.A.A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450, 566–569.

Cone, R.E., Chattopadhyay, S., Sharafieh, R., Lemire, Y., and O'Rourke, J. (2009). The suppression of hypersensitivity by ocular-induced CD8<sup>+</sup> T cells requires compatibility in the Qa-1 haplotype. *Immunol. Cell Biol.* 87, 241–248.

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<sup>+</sup> DCs induces Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* 204, 1757–1764.

Costantino, F., Talpin, A., Said-Nahal, R., Goldberg, M., Henny, J., Chiochia, G., Garchon, H.-J., Zins, M., and Breban, M. (2015a). Prevalence of spondyloarthritis in reference to HLA-B27 in the French population: results of the GAZEL cohort. *Ann. Rheum. Dis.* 74, 689–693.

Costantino, F., Talpin, A., Evnouchidou, I., Kadi, A., Leboime, A., Said-Nahal, R., Bonilla, N., Letourneur, F., Leturcq, T., Ka, Z., et al. (2015b). *ERAP1* Gene Expression Is Influenced by Nonsynonymous Polymorphisms Associated With Predisposition to Spondyloarthritis: INFLUENCE OF NONSYNONYMOUS POLYMORPHISMS ASSOCIATED WITH SpA ON *ERAP1*. *Arthritis Rheumatol.* 67, 1525–1534.

Costello, M.-E., Elewaut, D., Kenna, T.J., and Brown, M.A. (2013). Microbes, the gut and ankylosing spondylitis. *Arthritis Res. Ther.* 15, 214.

Cozzo, C., Larkin, J., and Caton, A.J. (2003). Cutting Edge: Self-Peptides Drive the Peripheral Expansion of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells. *J. Immunol.* 171, 5678–5682.

Cretney, E., Xin, A., Shi, W., Minnich, M., Masson, F., Miasari, M., Belz, G.T., Smyth, G.K., Busslinger, M., Nutt, S.L., et al. (2011). The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 12, 304–311.

Crowson, C.S., Matteson, E.L., Myasoedova, E., Michet, C.J., Ernste, F.C., Warrington, K.J., Davis, J.M., Hunder, G.G., Therneau, T.M., and Gabriel, S.E. (2011). The lifetime risk of adult-onset rheumatoid arthritis and other inflammatory autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 63, 633–639.

Curotto de Lafaille, M.A., Lino, A.C., Kutchukhidze, N., and Lafaille, J.J. (2004). CD25<sup>-</sup> T Cells Generate CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells by Peripheral Expansion. *J. Immunol.* 173, 7259–7268.

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.

Davidson, T.S., DiPaolo, R.J., Andersson, J., and Shevach, E.M. (2007). Cutting Edge: IL-2 Is Essential for TGF- $\beta$ -Mediated Induction of Foxp3<sup>+</sup> T Regulatory Cells. *J. Immunol.* *178*, 4022–4026.

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.

DeLay, M.L., Turner, M.J., Klenk, E.I., Smith, J.A., Sowders, D.P., and Colbert, R.A. (2009). HLA-B27 misfolding and the unfolded protein response augment interleukin-23 production and are associated with Th17 activation in transgenic rats. *Arthritis Rheum.* *60*, 2633–2643.

Denli, A.M., Tops, B.B.J., Plasterk, R.H.A., Ketting, R.F., and Hannon, G.J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* *432*, 231–235.

Deodhar, A., Poddubnyy, D., Pacheco-Tena, C., Salvarani, C., Lespessailles, E., Rahman, P., Järvinen, P., Sanchez-Burson, J., Gaffney, K., Lee, E.B., et al. (2019). Efficacy and Safety of Ixekizumab in the Treatment of Radiographic Axial Spondyloarthritis: Sixteen-Week Results From a Phase III Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial in Patients With Prior Inadequate Response to or Intolerance of Tumor Necrosis Factor Inhibitors. *Arthritis Rheumatol.* *71*, 599–611.

Di Giuseppe, D., Discacciati, A., Orsini, N., and Wolk, A. (2014). Cigarette smoking and risk of rheumatoid arthritis: a dose-response meta-analysis. *Arthritis Res. Ther.* *16*, R61.

Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T., and Schuler, G. (2001). Ex Vivo Isolation and Characterization of Cd4+Cd25+ T Cells with Regulatory Properties from Human Blood. *J. Exp. Med.* *193*, 1303–1310.

Dienz, O., Eaton, S.M., Bond, J.P., Neveu, W., Moquin, D., Noubade, R., Briso, E.M., Charland, C., Leonard, W.J., Ciliberto, G., et al. (2009). The induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced by CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* *206*, 69–78.

Dikiy, S., Li, J., Bai, L., Jiang, M., Janke, L., Zong, X., Hao, X., Hoyos, B., Wang, Z.-M., Xu, B., et al. (2021). A distal Foxp3 enhancer enables interleukin-2 dependent thymic Treg cell lineage commitment for robust immune tolerance. *Immunity* *54*, 931-946.e11.

Dissick, A., Redman, R.S., Jones, M., Rangan, B.V., Reimold, A., Griffiths, G.R., Mikuls, T.R., Amdur, R.L., Richards, J.S., and Kerr, G.S. (2010). Association of Periodontitis With Rheumatoid Arthritis: A Pilot Study. *J. Periodontol.* *81*, 223–230.

Dodds, R.A., James, I.E., Rieman, D., Ahern, R., Hwang, S.M., Connor, J.R., Thompson, S.D., Veber, D.F., Drake, F.H., Holmes, S., et al. (2001). Human Osteoclast Cathepsin K Is Processed Intracellularly Prior to Attachment and Bone Resorption. *J. Bone Miner. Res.* *16*, 478–486.

Dombrowski, Y., O’Hagan, T., Dittmer, M., Penalva, R., Mayoral, S.R., Bankhead, P., Fleville, S., Eleftheriadis, G., Zhao, C., Naughton, M., et al. (2017). Regulatory T cells promote myelin regeneration in the central nervous system. *Nat. Neurosci.* *20*, 674–680.

Dominguez-Villar, M., and Hafler, D.A. (2018). Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nat. Immunol.* *19*, 665–673.

Dominguez-Villar, M., Baecher-Allan, C.M., and Hafler, D.A. (2011). Identification of T helper type 1–like, Foxp3+ regulatory T cells in human autoimmune disease. *Nat. Med.* *17*, 673–675.

- Duarte, J.H., Zelenay, S., Bergman, M.-L., Martins, A.C., and Demengeot, J. (2009). Natural Treg cells spontaneously differentiate into pathogenic helper cells in lymphopenic conditions. *Eur. J. Immunol.* *39*, 948–955.
- DuPage, M., Chopra, G., Quiros, J., Rosenthal, W.L., Morar, M.M., Holohan, D., Zhang, R., Turka, L., Marson, A., and Bluestone, J.A. (2015). The Chromatin-Modifying Enzyme Ezh2 Is Critical for the Maintenance of Regulatory T Cell Identity after Activation. *Immunity* *42*, 227–238.
- Dybas, J.M., O’Leary, C.E., Ding, H., Spruce, L.A., Seeholzer, S.H., and Oliver, P.M. (2019). Integrative proteomics reveals an increase in non-degradative ubiquitylation in activated CD4+ T cells. *Nat. Immunol.* *20*, 747–755.
- Edwards, J.C.W., Szczepański, L., Szechiński, 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 $\alpha$  therapy. *J. Exp. Med.* *200*, 277–285.
- Elliott, M.J., Maini, R.N., Feldmann, M., Kalden, J.R., Antoni, C., Smolen, J.S., Leeb, B., Breedveld, F.C., Macfarlane, J.D., and Bijl, H. (1994). Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet Lond. Engl.* *344*, 1105–1110.
- 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.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K.W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., Alegre, M.-L., and Puccetti, P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *4*, 1206–1212.
- Feng, Y., Arvey, A., Chinen, T., van der Veeke, J., Gasteiger, G., and Rudensky, A.Y. (2014). Control of the inheritance of regulatory T cell identity by a cis element in the Foxp3 locus. *Cell* *158*, 749–763.
- Feng, Y., van der Veeke, 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.
- Flekens, V., Minutti, C.M., Wu, X., Wei, P., Pals, C.E.G.M., McCrae, J., Hemmers, S., Groenewold, V., Vos, H.-J., Rudensky, A., et al. (2019). Nemo-like Kinase Drives Foxp3 Stability and Is Critical for Maintenance of Immune Tolerance by Regulatory T Cells. *Cell Rep.* *26*, 3600–3612.e6.
- Fletcher, J.M., Lonergan, R., Costelloe, L., Kinsella, K., Moran, B., O’Farrelly, C., Tubridy, N., and Mills, K.H.G. (2009). CD39<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells Suppress Pathogenic Th17 Cells and Are Impaired in Multiple Sclerosis. *J. Immunol.* *183*, 7602–7610.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and

function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *4*, 330–336.

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.

Fragoulis, G.E., McInnes, I.B., and Siebert, S. (2019). JAK-inhibitors. New players in the field of immune-mediated diseases, beyond rheumatoid arthritis. *Rheumatology* *58*, i43–i54.

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.

Garg, G., Muschawekh, A., Moreno, H., Vasanthakumar, A., Floess, S., Lepennetier, G., Oellinger, R., Zhan, Y., Regen, T., Hiltensperger, M., et al. (2019). Blimp1 Prevents Methylation of Foxp3 and Loss of Regulatory T Cell Identity at Sites of Inflammation. *Cell Rep.* *26*, 1854–1868.e5.

Garrett, S., Jenkinson, T., Kennedy, L.G., Whitelock, H., Gaisford, P., and Calin, A. (1994). A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J. Rheumatol.* *21*, 2286–2291.

Genant, H.K., Peterfy, C.G., Westhovens, R., Becker, J.-C., Aranda, R., Vratsanos, G., Teng, J., and Kremer, J.M. (2008). Abatacept inhibits progression of structural damage in rheumatoid arthritis: results from the long-term extension of the AIM trial. *Ann. Rheum. Dis.* *67*, 1084–1089.

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

Ghivizzani, S.C., Kang, R., Georgescu, H.I., Lechman, E.R., Jaffurs, D., Engle, J.M., Watkins, S.C., Tindal, M.H., Suchanek, M.K., McKenzie, L.R., et al. (1997). Constitutive intra-articular expression of human IL-1 beta following gene transfer to rabbit synovium produces all major pathologies of human rheumatoid arthritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *159*, 3604–3612.

Gilliet, M., and Liu, Y.-J. (2002). Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* *195*, 695–704.

Glatigny, S., Fert, I., Blaton, M.A., Lories, R.J., Araujo, L.M., Chiochia, G., and Breban, M. (2012). Proinflammatory Th17 cells are expanded and induced by dendritic cells in spondylarthritis-prone HLA-B27-transgenic rats. *Arthritis Rheum.* *64*, 110–120.

Gomez-Cabrero, D., Almgren, M., Sjöholm, L.K., Hensvold, A.H., Ringh, M.V., Tryggvadottir, R., Kere, J., Scheynius, A., Acevedo, N., Reinius, L., et al. (2016). High-specificity bioinformatics framework for epigenomic profiling of discordant twins reveals specific and shared markers for ACPA and ACPA-positive rheumatoid arthritis. *Genome Med.* *8*, 124.

Goswami, S., Apostolou, I., Zhang, J., Skepner, J., Anandhan, S., Zhang, X., Xiong, L., Trojer, P., Aparicio, A., Subudhi, S.K., et al. (2018). Modulation of EZH2 expression in T cells improves efficacy of anti-CTLA-4 therapy. *J. Clin. Invest.* *128*, 3813–3818.

Gottmukkala, K.P., Jangid, R., Patta, I., Sultana, D.A., Sharma, A., Misra-Sen, J., and Galande, S. (2016). Regulation of SATB1 during thymocyte development by TCR signaling. *Mol. Immunol.* *77*, 34–43.

Gottschalk, R.A., Corse, E., and Allison, J.P. (2010). TCR ligand density and affinity determine

peripheral induction of Foxp3 in vivo. *J. Exp. Med.* 207, 1701–1711.

Gratton, S.B., Scalapino, K.J., and Fye, K.H. (2009). Case of anakinra as a steroid-sparing agent for gout inflammation. *Arthritis Rheum.* 61, 1268–1270.

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.

Gresnigt, M.S., Joosten, L.A.B., Verschueren, I., van der Meer, J.W.M., Netea, M.G., Dinarello, C.A., and van de Veerdonk, F.L. (2012). Neutrophil-Mediated Inhibition of Proinflammatory Cytokine Responses. *J. Immunol.* 189, 4806–4815.

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.

Guiliano, D.B., North, H., Panayoitou, E., Campbell, E.C., McHugh, K., Cooke, F.G.M., Silvestre, M., Bowness, P., Powis, S.J., and Antoniou, A.N. (2017). Polymorphisms in the F Pocket of HLA-B27 Subtypes Strongly Affect Assembly, Chaperone Interactions, and Heavy-Chain Misfolding: IMPACT OF F-POCKET POLYMORPHISMS ON HLA-B27 SUBTYPE FOLDING. *Arthritis Rheumatol.* 69, 610–621.

Guo, C., Sah, J.F., Beard, L., Willson, J.K.V., Markowitz, S.D., and Guda, K. (2008). The noncoding RNA, miR-126, suppresses the growth of neoplastic cells by targeting phosphatidylinositol 3-kinase signaling and is frequently lost in colon cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 47, 939–946.

Guo, H., Zheng, M., Zhang, K., Yang, F., Zhang, X., Han, Q., Chen, Z.-N., and Zhu, P. (2016). Functional defects in CD4+ CD25high FoxP3+ regulatory cells in ankylosing spondylitis. *Sci. Rep.* 6, 37559.

Hancock, W.W., and Ozkaynak, E. (2009). Three distinct domains contribute to nuclear transport of murine Foxp3. *PloS One* 4, e7890.

Hansmann, L., Schmidl, C., Kett, J., Steger, L., Andreesen, R., Hoffmann, P., Rehli, M., and Edinger, M. (2012). Dominant Th2 Differentiation of Human Regulatory T Cells upon Loss of FOXP3 Expression. *J. Immunol.* 188, 1275–1282.

Harms Pritchard, G., Hall, A.O., Christian, D.A., Wagage, S., Fang, Q., Muallem, G., John, B., Glatman Zaretsky, A., Dunn, W.G., Perrigoue, J., et al. (2015). Diverse Roles for T-bet in the Effector Responses Required for Resistance to Infection. *J. Immunol.* 194, 1131–1140.

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.

van der Heijde, D., Ramiro, S., Landewé, R., Baraliakos, X., Van den Bosch, F., Sepriano, A., Regel, A., Ciurea, A., Dagfinrud, H., Dougados, M., et al. (2017). 2016 update of the ASAS-EULAR management recommendations for axial spondyloarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 76, 978–991.

- van der Heijde, D.M., van 't Hof, M., van Riel, P.L., and van de Putte, L.B. (1993). Development of a disease activity score based on judgment in clinical practice by rheumatologists. *J. Rheumatol.* *20*, 579–581.
- 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- $\alpha$  rapidly inhibits pain responses in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 3731–3736.
- Hill, J.A., Southwood, S., Sette, A., Jevnikar, A.M., Bell, D.A., and Cairns, E. (2003). Cutting Edge: The Conversion of Arginine to Citrulline Allows for a High-Affinity Peptide Interaction with the Rheumatoid Arthritis-Associated HLA-DRB1\*0401 MHC Class II Molecule. *J. Immunol.* *171*, 538–541.
- Himmel, M.E., MacDonald, K.G., Garcia, R.V., Steiner, T.S., and Levings, M.K. (2013). Helios+ and Helios- cells coexist within the natural FOXP3+ T regulatory cell subset in humans. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *190*, 2001–2008.
- Hoffmann, P., Boeld, T.J., Eder, R., Huehn, J., Floess, S., Wieczorek, G., Olek, S., Dietmaier, W., Andreesen, R., and Edinger, M. (2009). Loss of FOXP3 expression in natural human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells upon repetitive *in vitro* stimulation. *Eur. J. Immunol.* *39*, 1088–1097.
- Højfeldt, J.W., Laugesen, A., Willumsen, B.M., Damhofer, H., Hedehus, L., Tvardovskiy, A., Mohammad, F., Jensen, O.N., and Helin, K. (2018). Accurate H3K27 methylation can be established de novo by SUZ12-directed PRC2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *25*, 225–232.
- Holohan, D.R., Van Gool, F., and Bluestone, J.A. (2019). Thymically-derived Foxp3+ regulatory T cells are the primary regulators of type 1 diabetes in the non-obese diabetic mouse model. *PLoS One* *14*, e0217728.
- Holt, M.P., Punkosdy, G.A., Glass, D.D., and Shevach, E.M. (2017). TCR Signaling and CD28/CTLA-4 Signaling Cooperatively Modulate T Regulatory Cell Homeostasis. *J. Immunol.* *198*, 1503–1511.
- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor *Foxp3*. *Science* *299*, 1057–1061.
- Hua, J., Inomata, T., Chen, Y., Foulsham, W., Stevenson, W., Shiang, T., Bluestone, J.A., and Dana, R. (2018). Pathological conversion of regulatory T cells is associated with loss of allotolerance. *Sci. Rep.* *8*, 7059.
- Huan, J., Culbertson, N., Spencer, L., Bartholomew, R., Burrows, G.G., Chou, Y.K., Bourdette, D., Ziegler, S.F., Offner, H., and Vandenberg, A.A. (2005). Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. *J. Neurosci. Res.* *81*, 45–52.
- Huang, Q.-Q., and Pope, R.M. (2009). The role of Toll-like receptors in rheumatoid arthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* *11*, 357–364.
- Huang, C.-T., Workman, C.J., Flies, D., Pan, X., Marson, A.L., Zhou, G., Hipkiss, E.L., Ravi, S., Kowalski, J., Levitsky, H.I., et al. (2004). Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* *21*, 503–513.
- Hueber, A.J., Asquith, D.L., Miller, A.M., Reilly, J., Kerr, S., Leipe, J., Melendez, A.J., and McInnes, I.B. (2010). Cutting Edge: Mast Cells Express IL-17A in Rheumatoid Arthritis Synovium. *J. Immunol.* *184*, 3336–3340.
- Huizinga, T.W.J., Amos, C.I., van der Helm-van Mil, A.H.M., Chen, W., van Gaalen, F.A.,



Jawaheer, D., Schreuder, G.M.T., Wener, M., Breedveld, F.C., Ahmad, N., et al. (2005). Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum.* 52, 3433–3438.

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.

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.

Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F., and Sakaguchi, S. (1999). Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 162, 5317–5326.

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 $\gamma$ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. *Cell* 126, 1121–1133.

Jaakkola, E. (2006). Finnish HLA studies confirm the increased risk conferred by HLA-B27 homozygosity in ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* 65, 775–780.

Jacques, P., Lambrecht, S., Verheugen, E., Pauwels, E., Kollias, G., Armaka, M., Verhoye, M., Van der Linden, A., Achten, R., Lories, R.J., et al. (2014). Proof of concept: enthesitis and new bone formation in spondyloarthritis are driven by mechanical strain and stromal cells. *Ann. Rheum. Dis.* 73, 437–445.

Jeffery, L.E., Raza, K., and Hewison, M. (2016). Vitamin D in rheumatoid arthritis—towards clinical application. *Nat. Rev. Rheumatol.* 12, 201–210.

Jeker, L.T., Zhou, X., Gershberg, K., de Kouchkovsky, D., Morar, M.M., Stadthagen, G., Lund, A.H., and Bluestone, J.A. (2012). MicroRNA 10a Marks Regulatory T Cells. *PLoS ONE* 7, e36684.

Jiang, Q., Yang, G., Liu, Q., Wang, S., and Cui, D. (2021). Function and Role of Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis. *Front. Immunol.* 12, 626193.

Jiao, L., and Liu, X. (2015). Structural basis of histone H3K27 trimethylation by an active polycomb repressive complex 2. *Science* 350, aac4383–aac4383.

Jones, G., Sebba, A., Gu, J., Lowenstein, M.B., Calvo, A., Gomez-Reino, J.J., Siri, D.A., Tomšič, M., Alecock, E., Woodworth, T., et al. (2010). Comparison of tocilizumab monotherapy versus methotrexate monotherapy in patients with moderate to severe rheumatoid arthritis: the AMBITION study. *Ann. Rheum. Dis.* 69, 88–96.

Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J., and Enk, A.H. (2001). Identification and Functional Characterization of Human Cd4+Cd25+ T Cells with Regulatory Properties Isolated from Peripheral Blood. *J. Exp. Med.* 193, 1285–1294.

Joosten, L.A.B., Abdollahi-Roodsaz, S., Heuvelmans-Jacobs, M., Helsen, M.M.A., van den Berselaar, L.A.M., Oppers-Walgreen, B., Koenders, M.I., and van den Berg, W.B. (2008). T cell dependence of chronic destructive murine arthritis induced by repeated local activation of Toll-like receptor-driven pathways: crucial role of both interleukin-1beta and interleukin-17. *Arthritis Rheum.* 58, 98–108.

- Joshi, P., Carrington, E.A., Wang, L., Ketel, C.S., Miller, E.L., Jones, R.S., and Simon, J.A. (2008). Dominant Alleles Identify SET Domain Residues Required for Histone Methyltransferase of Polycomb Repressive Complex 2. *J. Biol. Chem.* *283*, 27757–27766.
- Justin, N., Zhang, Y., Tarricone, C., Martin, S.R., Chen, S., Underwood, E., De Marco, V., Haire, L.F., Walker, P.A., Reinberg, D., et al. (2016). Structural basis of oncogenic histone H3K27M inhibition of human polycomb repressive complex 2. *Nat. Commun.* *7*, 11316.
- Kadi, A., Costantino, F., Izac, B., Leboime, A., Said-Nahal, R., Garchon, H.-J., Chiocchia, G., and Breban, M. (2013a). The *IL23R* non-synonymous polymorphism rs11209026 is associated with radiographic sacroiliitis in spondyloarthritis. *Arthritis Rheum.* n/a-n/a.
- Kadi, A., Izac, B., Said-Nahal, R., Leboime, A., Van Praet, L., de Vlam, K., Elewaut, D., Chiocchia, G., and Breban, M. (2013b). Investigating the genetic association between *ERAP1* and spondyloarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *72*, 608–613.
- Källberg, H., Ding, B., Padyukov, L., Bengtsson, C., Rönnelid, J., Klareskog, L., Alfredsson, L., and EIRA Study Group (2011). Smoking is a major preventable risk factor for rheumatoid arthritis: estimations of risks after various exposures to cigarette smoke. *Ann. Rheum. Dis.* *70*, 508–511.
- Kampstra, A.S.B., van Heemst, J., Moustakas, A.K., Papadopoulos, G.K., Huizinga, T.W.J., and Toes, R.E.M. (2016). The increased ability to present citrullinated peptides is not unique to HLA-SE molecules: arginine-to-citrulline conversion also enhances peptide affinity for HLA-DQ molecules. *Arthritis Res. Ther.* *18*, 254.
- Karlson, E.W., Mandl, L.A., Hankinson, S.E., and Grodstein, F. (2004). Do breast-feeding and other reproductive factors influence future risk of rheumatoid arthritis?: Results from the Nurses' Health Study. *Arthritis Rheum.* *50*, 3458–3467.
- Kay, J., Matteson, E.L., Dasgupta, B., Nash, P., Durez, P., Hall, S., Hsia, E.C., Han, J., Wagner, C., Xu, Z., et al. (2008). Golimumab in patients with active rheumatoid arthritis despite treatment with methotrexate: A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study. *Arthritis Rheum.* *58*, 964–975.
- 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.
- Keyszer, G., Redlich, A., Häupl, T., Zacher, J., Sparmann, M., Engethüm, U., Gay, S., and Burmester, G.R. (1998). Differential expression of cathepsins B and L compared with matrix metalloproteinases and their respective inhibitors in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: a parallel investigation by semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Arthritis Rheum.* *41*, 1378–1387.
- Khandpur, R., Carmona-Rivera, C., Vivekanandan-Giri, A., Gizinski, A., Yalavarthi, S., Knight, J.S., Friday, S., Li, S., Patel, R.M., Subramanian, V., et al. (2013). NETs Are a Source of Citrullinated Autoantigens and Stimulate Inflammatory Responses in Rheumatoid Arthritis. *Sci. Transl. Med.* *5*, 178ra40-178ra40.
- Kharlamova, N., Jiang, X., Sherina, N., Potempa, B., Israelsson, L., Quirke, A.-M., Eriksson, K., Yucel-Lindberg, T., Venables, P.J., Potempa, J., et al. (2016). Antibodies to *Porphyromonas gingivalis* Indicate Interaction Between Oral Infection, Smoking, and Risk Genes in Rheumatoid Arthritis Etiology: *P GINGIVALIS* IN RA ETIOLOGY. *Arthritis Rheumatol.* *68*, 604–613.

- Kiener, H.P., Niederreiter, B., Lee, D.M., Jimenez-Boj, E., Smolen, J.S., and Brenner, M.B. (2009). Cadherin 11 promotes invasive behavior of fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Rheum.* *60*, 1305–1310.
- Kim, H.-P., and Leonard, W.J. (2007). CREB/ATF-dependent T cell receptor–induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation. *J. Exp. Med.* *204*, 1543–1551.
- Kim, H., Kang, K., and Kim, J. (2009). AEBP2 as a potential targeting protein for Polycomb Repression Complex PRC2. *Nucleic Acids Res.* *37*, 2940–2950.
- Kim, H.-J., Barnitz, R.A., Kreslavsky, T., Brown, F.D., Moffett, H., Lemieux, M.E., Kaygusuz, Y., Meissner, T., Holderried, T.A.W., Chan, S., et al. (2015). Stable inhibitory activity of regulatory T cells requires the transcription factor Helios. *Science* *350*, 334–339.
- Kim, K.S., Choi, H.M., Lee, Y.-A., Choi, I.A., Lee, S.-H., Hong, S.-J., Yang, H.-I., and Yoo, M.C. (2011). Expression levels and association of gelatinases MMP-2 and MMP-9 and collagenases MMP-1 and MMP-13 with VEGF in synovial fluid of patients with arthritis. *Rheumatol. Int.* *31*, 543–547.
- Kim, K.-W., Kim, B.-M., Won, J.-Y., Lee, K.-A., Kim, H.-R., and Lee, S.-H. (2019). Toll-like receptor 7 regulates osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *J. Biochem. (Tokyo)* *166*, 259–270.
- Kitagawa, Y., Ohkura, N., Kidani, Y., Vandenbon, A., Hirota, K., Kawakami, R., Yasuda, K., Motooka, D., Nakamura, S., Kondo, M., et al. (2017). Guidance of regulatory T cell development by Satb1-dependent super-enhancer establishment. *Nat. Immunol.* *18*, 173–183.
- Kitz, A., de Marcken, M., Gautron, A.-S., Mitrovic, M., Hafler, D.A., and Dominguez-Villar, M. (2016). AKT isoforms modulate Th1-like Treg generation and function in human autoimmune disease. *EMBO Rep.* *17*, 1169–1183.
- Kluger, M.A., Melderis, S., Nosko, A., Goerke, B., Luig, M., Meyer, M.C., Turner, J.-E., Meyer-Schwesinger, C., Wegscheid, C., Tiegs, G., et al. (2016). Treg17 cells are programmed by Stat3 to suppress Th17 responses in systemic lupus. *Kidney Int.* *89*, 158–166.
- von Knethen, A., Heinicke, U., Weigert, A., Zacharowski, K., and Brüne, B. (2020). Histone Deacetylation Inhibitors as Modulators of Regulatory T Cells. *Int. J. Mol. Sci.* *21*, 2356.
- 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.
- Koduri, G., Norton, S., Young, A., Cox, N., Davies, P., Devlin, J., Dixey, J., Gough, A., Prouse, P., Winfield, J., et al. (2010). Interstitial lung disease has a poor prognosis in rheumatoid arthritis: results from an inception cohort. *Rheumatology* *49*, 1483–1489.
- Koenen, H.J.P.M., Smeets, R.L., Vink, P.M., van Rijssen, E., Boots, A.M.H., and Joosten, I. (2008). Human CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>pos</sup> regulatory T cells differentiate into IL-17–producing cells. *Blood* *112*, 2340–2352.
- Kohlhaas, S., Garden, O.A., Scudamore, C., Turner, M., Okkenhaug, K., and Vigorito, E. (2009). Cutting edge: the Foxp3 target miR-155 contributes to the development of regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 2578–2582.
- Komatsu, N., Okamoto, K., Sawa, S., Nakashima, T., Oh-hora, M., Kodama, T., Tanaka, S., Bluestone, J.A., and Takayanagi, H. (2014). Pathogenic conversion of Foxp3<sup>+</sup> T cells into TH17

cells in autoimmune arthritis. *Nat. Med.* *20*, 62–68.

Komine, M., Kukita, A., Kukita, T., Ogata, Y., Hotokebuchi, T., and Kohashi, O. (2001). Tumor necrosis factor- $\alpha$  cooperates with receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand in generation of osteoclasts in stromal cell-depleted rat bone marrow cell culture. *Bone* *28*, 474–483.

Konkel, J.E., Zhang, D., Zanvit, P., Chia, C., Zangarle-Murray, T., Jin, W., Wang, S., and Chen, W. (2017). Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling in Regulatory T Cells Controls T Helper-17 Cells and Tissue-Specific Immune Responses. *Immunity* *46*, 660–674.

Kotake, S., Udagawa, N., Takahashi, N., Matsuzaki, K., Itoh, K., Ishiyama, S., Saito, S., Inoue, K., Kamatani, N., Gillespie, M.T., et al. (1999). IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J. Clin. Invest.* *103*, 1345–1352.

Kotlarz, D., Marquardt, B., Barøy, T., Lee, W.S., Konnikova, L., Hollizeck, S., Magg, T., Lehle, A.S., Walz, C., Borggraefe, I., et al. (2018). Human TGF- $\beta$ 1 deficiency causes severe inflammatory bowel disease and encephalopathy. *Nat. Genet.* *50*, 344–348.

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.

Krishnamurthy, A., Joshua, V., Haj Hensvold, A., Jin, T., Sun, M., Vivar, N., Ytterberg, A.J., Engström, M., Fernandes-Cerqueira, C., Amara, K., et al. (2016). Identification of a novel chemokine-dependent molecular mechanism underlying rheumatoid arthritis-associated autoantibody-mediated bone loss. *Ann. Rheum. Dis.* *75*, 721–729.

Kuzmichev, A. (2002). Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev.* *16*, 2893–2905.

Lam, A.J., Uday, P., Gillies, J.K., and Levings, M.K. (2021). Helios is a marker, not a driver, of human Treg stability. *Eur. J. Immunol.* eji.202149318.

Lange, C., Scholl, M., Melms, A., and Bischof, F. (2011). CD62L(high) Treg cells with superior immunosuppressive properties accumulate within the CNS during remissions of EAE. *Brain. Behav. Immun.* *25*, 120–126.

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.

Lee, C.-H., Holder, M., Grau, D., Saldaña-Meyer, R., Yu, J.-R., Ganai, R.A., Zhang, J., Wang, M., LeRoy, G., Dobenecker, M.-W., et al. (2018). Distinct Stimulatory Mechanisms Regulate the Catalytic Activity of Polycomb Repressive Complex 2. *Mol. Cell* *70*, 435–448.e5.

Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* *75*, 843–854.

Lee, T.I., Jenner, R.G., Boyer, L.A., Guenther, M.G., Levine, S.S., Kumar, R.M., Chevalier, B., Johnstone, S.E., Cole, M.F., Isono, K., et al. (2006). Control of Developmental Regulators by Polycomb in Human Embryonic Stem Cells. *Cell* *125*, 301–313.

- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., et al. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415–419.
- Lefèvre, S., Knedla, A., Tennie, C., Kampmann, A., Wunrau, C., Dinser, R., Korb, A., Schnäker, E.-M., Tarner, I.H., Robbins, P.D., et al. (2009). Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat. Med.* 15, 1414–1420.
- Lefrançais, E., Roga, S., Gautier, V., Gonzalez-de-Peredo, A., Monsarrat, B., Girard, J.-P., and Cayrol, C. (2012). IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 1673–1678.
- Leizer, T., Cebon, J., Layton, J.E., and Hamilton, J.A. (1990). Cytokine regulation of colony-stimulating factor production in cultured human synovial fibroblasts: I. Induction of GM-CSF and G-CSF production by interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Blood* 76, 1989–1996.
- Lemos, H.P., Grespan, R., Vieira, S.M., Cunha, T.M., Verri, W.A., Fernandes, K.S.S., Souto, F.O., McInnes, I.B., Ferreira, S.H., Liew, F.Y., et al. (2009). Prostaglandin mediates IL-23/IL-17-induced neutrophil migration in inflammation by inhibiting IL-12 and IFN production. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 5954–5959.
- Levine, A.G., Mendoza, A., Hemmers, S., Moltedo, B., Niec, R.E., Schizas, M., Hoyos, B.E., Putintseva, E.V., Chaudhry, A., Dikiy, S., et al. (2017). Erratum: Corrigendum: Stability and function of regulatory T cells expressing the transcription factor T-bet. *Nature* 550, 142–142.
- Levings, M.K., Sangregorio, R., and Roncarolo, M.G. (2001a). Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J. Exp. Med.* 193, 1295–1302.
- Levings, M.K., Sangregorio, R., Galbiati, F., Squadrone, S., de Waal Malefyt, R., and Roncarolo, M.G. (2001b). IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 166, 5530–5539.
- Lewis, E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565–570.
- 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., Nayak, S., Regueiro, J.R., Berger, S.B., Detre, C., Romero, X., de Waal Malefyt, R., Chatila, T.A., Herzog, R.W., and Terhorst, C. (2010). GITR engagement preferentially enhances proliferation of functionally competent CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Int. Immunol.* 22, 259–270.
- Lighvani, A.A., Frucht, D.M., Jankovic, D., Yamane, H., Aliberti, J., Hissong, B.D., Nguyen, B.V., Gadina, M., Sher, A., Paul, W.E., et al. (2001). T-bet is rapidly induced by interferon- in lymphoid and myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 15137–15142.
- Lin, H.-Y., Chen, C.-S., Lin, S.-P., Weng, J.-R., and Chen, C.-S. (2006). Targeting histone deacetylase in cancer therapy. *Med. Res. Rev.* 26, 397–413.
- Liu, B., Salgado, O.C., Singh, S., Hippen, K.L., Maynard, J.C., Burlingame, A.L., Ball, L.E., Blazar, B.R., Farrar, M.A., Hogquist, K.A., et al. (2019). The lineage stability and suppressive program of regulatory T cells require protein O-GlcNAcylation. *Nat. Commun.* 10, 354.
- 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<sup>+</sup> T reg cells. *J. Exp. Med.* *203*, 1701–1711.

Liu, X.-H., Kirschenbaum, A., Yao, S., and Levine, A.C. (2005). Cross-Talk between the Interleukin-6 and Prostaglandin E2 Signaling Systems Results in Enhancement of Osteoclastogenesis through Effects on the Osteoprotegerin/Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ B (RANK) Ligand/RANK System. *Endocrinology* *146*, 1991–1998.

Long, S.A., Cerosaletti, K., Bollyky, P.L., Tatum, M., Shilling, H., Zhang, S., Zhang, Z.-Y., Pihoker, C., Sanda, S., Greenbaum, C., et al. (2010). Defects in IL-2R signaling contribute to diminished maintenance of FOXP3 expression in CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup> regulatory T-cells of type 1 diabetic subjects. *Diabetes* *59*, 407–415.

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., Meeding, 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.

Lopes, J.E., Torgerson, T.R., Schubert, L.A., Anover, S.D., Ocheltree, E.L., Ochs, H.D., and Ziegler, S.F. (2006). Analysis of FOXP3 Reveals Multiple Domains Required for Its Function as a Transcriptional Repressor. *J. Immunol.* *177*, 3133–3142.

Lu, L.-F., Thai, T.-H., Calado, D.P., Chaudhry, A., Kubo, M., Tanaka, K., Loeb, G.B., Lee, H., Yoshimura, A., Rajewsky, K., et al. (2009). Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein. *Immunity* *30*, 80–91.

Luo, G., Li, F., Li, X., Wang, Z., and Zhang, B. (2018). TNF- $\alpha$  and RANKL promote osteoclastogenesis by upregulating RANK via the NF- $\kappa$ B pathway. *Mol. Med. Rep.*

Machado, P., Landewe, R., Lie, E., Kvien, T.K., Braun, J., Baker, D., van der Heijde, D., and for the Assessment of SpondyloArthritis international Society (2011). Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score (ASDAS): defining cut-off values for disease activity states and improvement scores. *Ann. Rheum. Dis.* *70*, 47–53.

Madhok, R., Crilly, A., Watson, J., and Capell, H.A. (1993). Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity. *Ann. Rheum. Dis.* *52*, 232–234.

Mahic, M., Henjum, K., Yaqub, S., Bjørnbeth, B.A., Torgersen, K.M., Taskén, K., and Aandahl, E.M. (2008). Generation of highly suppressive adaptive CD8<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup>FOXP3<sup>(+)</sup> regulatory T cells by continuous antigen stimulation. *Eur. J. Immunol.* *38*, 640–646.

Mahmud, S.A., Manlove, L.S., Schmitz, H.M., Xing, Y., Wang, Y., Owen, D.L., Schenkel, J.M., Boomer, J.S., Green, J.M., Yagita, H., et al. (2014). Costimulation via the tumor-necrosis factor receptor superfamily couples TCR signal strength to the thymic differentiation of regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *15*, 473–481.

Maini, R.N., Breedveld, F.C., Kalden, J.R., Smolen, J.S., Davis, D., Macfarlane, J.D., Antoni, C., Leeb, B., Elliott, M.J., Woody, J.N., et al. (1998). Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *41*, 1552–1563.

Makrygiannakis, D., Hermansson, M., Ulfgren, A.-K., Nicholas, A.P., Zendman, A.J.W., Eklund, A., Grunewald, J., Skold, C.M., Klareskog, L., and Catrina, A.I. (2008). Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Ann. Rheum. Dis.* *67*, 1488–1492.

de Man, Y.A., Dolhain, R.J.E.M., van de Geijn, F.E., Willemsen, S.P., and Hazes, J.M.W. (2008). Disease activity of rheumatoid arthritis during pregnancy: Results from a nationwide prospective study. *Arthritis Rheum.* *59*, 1241–1248.

Mangan, P.R., Harrington, L.E., O’Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R., and Weaver, C.T. (2006). Transforming growth factor- $\beta$  induces development of the TH17 lineage. *Nature* *441*, 231–234.

Margueron, R., and Reinberg, D. (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* *469*, 343–349.

Margueron, R., Li, G., Sarma, K., Blais, A., Zavadil, J., Woodcock, C.L., Dynlacht, B.D., and Reinberg, D. (2008). Ezh1 and Ezh2 Maintain Repressive Chromatin through Different Mechanisms. *Mol. Cell* *32*, 503–518.

Marini, O., Costa, S., Bevilacqua, D., Calzetti, F., Tamassia, N., Spina, C., De Sabata, D., Tinazzi, E., Lunardi, C., Scupoli, M.T., et al. (2017). Mature CD10<sup>+</sup> and immature CD10<sup>-</sup> neutrophils present in G-CSF-treated donors display opposite effects on T cells. *Blood* *129*, 1343–1356.

Mateen, S., Moin, S., Shahzad, S., and Khan, A.Q. (2017). Level of inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis patients: Correlation with 25-hydroxy vitamin D and reactive oxygen species. *PLOS ONE* *12*, e0178879.

Mauri, C., and Menon, M. (2017). Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential. *J. Clin. Invest.* *127*, 772–779.

Mayack, S.R., and Berg, L.J. (2006). Cutting Edge: An Alternative Pathway of CD4<sup>+</sup> T Cell Differentiation Is Induced Following Activation in the Absence of  $\gamma$ -Chain-Dependent Cytokine Signals. *J. Immunol.* *176*, 2059–2063.

McClymont, S.A., Putnam, A.L., Lee, M.R., Esensten, J.H., Liu, W., Hulme, M.A., Hoffmüller, U., Baron, U., Olek, S., Bluestone, J.A., et al. (2011). Plasticity of human regulatory T cells in healthy subjects and patients with type 1 diabetes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 3918–3926.

McGeachy, M.J., Chen, Y., Tato, C.M., Laurence, A., Joyce-Shaikh, B., Blumenschein, W.M., McClanahan, T.K., O’Shea, J.J., and Cua, D.J. (2009). The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat. Immunol.* *10*, 314–324.

McGonagle, D., Aydin, S.Z., Gül, A., Mahr, A., and Direskeneli, H. (2015). ‘MHC-I-opathy’—unified concept for spondyloarthritis and Behçet disease. *Nat. Rev. Rheumatol.* *11*, 731–740.

Mei, Y., Pan, F., Gao, J., Ge, R., Duan, Z., Zeng, Z., Liao, F., Xia, G., Wang, S., Xu, S., et al. (2011). Increased serum IL-17 and IL-23 in the patient with ankylosing spondylitis. *Clin. Rheumatol.* *30*, 269–273.

Meng, W., Zhu, Z., Jiang, X., Too, C.L., Uebe, S., Jagodic, M., Kockum, I., Murad, S., Ferrucci, L., Alfredsson, L., et al. (2017). DNA methylation mediates genotype and smoking interaction in the development of anti-citrullinated peptide antibody-positive rheumatoid arthritis. *Arthritis*

Res. Ther. 19, 71.

Mills, C.D., Kincaid, K., Alt, J.M., Heilman, M.J., and Hill, A.M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J. Immunol.* 164, 6166–6173.

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.

Miyara, M., Gorochoy, G., Ehrenstein, M., Musset, L., Sakaguchi, S., and Amoura, Z. (2011). Human FoxP3+ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* 10, 744–755.

Mollard, E., Pedro, S., Chakravarty, E., Clowse, M., Schumacher, R., and Michaud, K. (2018). The impact of menopause on functional status in women with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 57, 798–802.

Morawski, P.A., Mehra, P., Chen, C., Bhatti, T., and Wells, A.D. (2013). Foxp3 protein stability is regulated by cyclin-dependent kinase 2. *J. Biol. Chem.* 288, 24494–24502.

Morgan, M.E., Flierman, R., van Duivenvoorde, L.M., Witteveen, H.J., van Ewijk, W., van Laar, J.M., de vries, R.R.P., and Toes, R.E.M. (2005). Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25+ regulatory T cells. *Arthritis Rheum.* 52, 2212–2221.

Morita, T., Shima, Y., Wing, J.B., Sakaguchi, S., Ogata, A., and Kumanogoh, A. (2016). The Proportion of Regulatory T Cells in Patients with Rheumatoid Arthritis: A Meta-Analysis. *PLOS ONE* 11, e0162306.

Murdaca, G., Spanò, F., Contatore, M., Guastalla, A., Penza, E., Magnani, O., and Puppo, F. (2016). Immunogenicity of infliximab and adalimumab: what is its role in hypersensitivity and modulation of therapeutic efficacy and safety? *Expert Opin. Drug Saf.* 15, 43–52.

Nagar, M., Jacob-Hirsch, J., Vernitsky, H., Berkun, Y., Ben-Horin, S., Amariglio, N., Bank, I., Kloog, Y., Rechavi, G., and Goldstein, I. (2010). TNF activates a NF-kappaB-regulated cellular program in human CD45RA- regulatory T cells that modulates their suppressive function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 3570–3581.

Nair, Varun Sasidharan, Song, Mi Hye, Ko, Myunggon, and Oh, Kwon Ik (2016). DNA Demethylation of the Foxp3 Enhancer Is Maintained through Modulation of Ten-Eleven-Translocation and DNA Methyltransferases. *Mol. Cells* 39, 888–897.

Nakano, S., Morimoto, S., Suzuki, S., Tsushima, H., Yamanaka, K., Sekigawa, I., and Takasaki, Y. (2015). Immunoregulatory role of IL-35 in T cells of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 54, 1498–1506.

Nell, V.P.K. (2004). Benefit of very early referral and very early therapy with disease-modifying anti-rheumatic drugs in patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 43, 906–914.

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.

Nijhuis, L., Peeters, J.G.C., Vastert, S.J., and van Loosdregt, J. (2019). Restoring T Cell Tolerance, Exploring the Potential of Histone Deacetylase Inhibitors for the Treatment of Juvenile Idiopathic Arthritis. *Front. Immunol.* 10, 151.



- Ning, X., Jian, Z., and Wang, W. (2015). Low Serum Levels of Interleukin 35 in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Tohoku J. Exp. Med.* *237*, 77–82.
- Niu, Q., Cai, B., Huang, Z., Shi, Y., and Wang, L. (2012). Disturbed Th17/Treg balance in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* *32*, 2731–2736.
- O’Carroll, D., Erhardt, S., Pagani, M., Barton, S.C., Surani, M.A., and Jenuwein, T. (2001). The polycomb-group gene *Ezh2* is required for early mouse development. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 4330–4336.
- Oh, B.R., Suh, D., Bae, D., Ha, N., Choi, Y.I., Yoo, H.J., Park, J.K., Lee, E.Y., Lee, E.B., and Song, Y.W. (2017). Therapeutic effect of a novel histone deacetylase 6 inhibitor, CKD-L, on collagen-induced arthritis in vivo and regulatory T cells in rheumatoid arthritis in vitro. *Arthritis Res. Ther.* *19*, 154.
- Ohata, J., Zvaifler, N.J., Nishio, M., Boyle, D.L., Kalled, S.L., Carson, D.A., and Kipps, T.J. (2005). Fibroblast-Like Synoviocytes of Mesenchymal Origin Express Functional B Cell-Activating Factor of the TNF Family in Response to Proinflammatory Cytokines. *J. Immunol.* *174*, 864–870.
- Ohkura, N., Hamaguchi, M., Morikawa, H., Sugimura, K., Tanaka, A., Ito, Y., Osaki, M., Tanaka, Y., Yamashita, R., Nakano, N., et al. (2012). T Cell Receptor Stimulation-Induced Epigenetic Changes and Foxp3 Expression Are Independent and Complementary Events Required for Treg Cell Development. *Immunity* *37*, 785–799.
- Ohta, A., and Sitkovsky, M. (2014). Extracellular Adenosine-Mediated Modulation of Regulatory T Cells. *Front. Immunol.* *5*.
- Oldenhove, G., Bouladoux, N., Wohlfert, E.A., Hall, J.A., Chou, D., Dos Santos, L., O’Brien, S., Blank, R., Lamb, E., Natarajan, S., et al. (2009). Decrease of Foxp3+ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. *Immunity* *31*, 772–786.
- Oldstone, M.B.A. (1989). Molecular Mimicry as a Mechanism for the Cause and as a Probe Uncovering Etiologic Agent(s) of Autoimmune Disease. In *Molecular Mimicry*, M.B.A. Oldstone, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 127–135.
- O’Malley, J.T., Sehra, S., Thieu, V.T., Yu, Q., Chang, H.-C., Stritesky, G.L., Nguyen, E.T., Mathur, A.N., Levy, D.E., and Kaplan, M.H. (2009). Signal transducer and activator of transcription 4 limits the development of adaptive regulatory T cells. *Immunology* *127*, 587–595.
- Ostermeir, K., Springer, S., and Zacharias, M. (2015). Coupling between side chain interactions and binding pocket flexibility in HLA-B\*44:02 molecules investigated by molecular dynamics simulations. *Mol. Immunol.* *63*, 312–319.
- Ouyang, W., Beckett, O., Ma, Q., and Li, M.O. (2010a). 24633226. *Immunity* *32*, 642–653.
- Ouyang, W., Beckett, O., Ma, Q., Paik, J., DePinho, R.A., and Li, M.O. (2010b). Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *11*, 618–627.
- Padrines, M., Wolf, M., Walz, A., and Baggiolini, M. (1994). Interleukin-8 processing by neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase-3. *FEBS Lett.* *352*, 231–235.
- Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., and Lenardo, M.J. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat. Immunol.* *8*, 1353–1362.

- Park, H.J., Park, J.S., Jeong, Y.H., Son, J., Ban, Y.H., Lee, B.-H., Chen, L., Chang, J., Chung, D.H., Choi, I., et al. (2015). PD-1 Upregulated on Regulatory T Cells during Chronic Virus Infection Enhances the Suppression of CD8<sup>+</sup> T Cell Immune Response via the Interaction with PD-L1 Expressed on CD8<sup>+</sup> T Cells. *J. Immunol.* *194*, 5801–5811.
- Pasini, D., Bracken, A.P., Jensen, M.R., Lazzerini Denchi, E., and Helin, K. (2004). Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. *EMBO J.* *23*, 4061–4071.
- Pasini, D., Cloos, P.A.C., Walfridsson, J., Olsson, L., Bukowski, J.-P., Johansen, J.V., Bak, M., Tommerup, N., Rappsilber, J., and Helin, K. (2010). JARID2 regulates binding of the Polycomb repressive complex 2 to target genes in ES cells. *Nature* *464*, 306–310.
- Passerini, L., Allan, S.E., Battaglia, M., Di Nunzio, S., Alstad, A.N., Levings, M.K., Roncarolo, M.G., and Bacchetta, R. (2008). STAT5-signaling cytokines regulate the expression of FOXP3 in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cells. *Int. Immunol.* *20*, 421–431.
- Passerini, L., Di Nunzio, S., Gregori, S., Gambineri, E., Cecconi, M., Seidel, M.G., Cazzola, G., Perroni, L., Tommasini, A., Vignola, S., et al. (2011). Functional type 1 regulatory T cells develop regardless of FOXP3 mutations in patients with IPEX syndrome. *Eur. J. Immunol.* *41*, 1120–1131.
- Patakas, A., Ji, R.-R., Weir, W., Connolly, S.E., Benson, R.A., Nadler, S.G., Brewer, J.M., McInnes, I.B., and Garside, P. (2016). Abatacept Inhibition of T Cell Priming in Mice by Induction of a Unique Transcriptional Profile That Reduces Their Ability to Activate Antigen-Presenting Cells. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* *68*, 627–638.
- Paterson, A.M., Lovitch, S.B., Sage, P.T., Juneja, V.R., Lee, Y., Trombly, J.D., Arancibia-Cárcamo, C.V., Sobel, R.A., Rudensky, A.Y., Kuchroo, V.K., et al. (2015). Deletion of CTLA-4 on regulatory T cells during adulthood leads to resistance to autoimmunity. *J. Exp. Med.* *212*, 1603–1621.
- Pelletier, M., Maggi, L., Micheletti, A., Lazzeri, E., Tamassia, N., Costantini, C., Cosmi, L., Lunardi, C., Annunziato, F., Romagnani, S., et al. (2010). Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood* *115*, 335–343.
- Pelly, V.S., Coomes, S.M., Kannan, Y., Gialitakis, M., Entwistle, L.J., Perez-Lloret, J., Czieso, S., Okoye, I.S., Rückerl, D., Allen, J.E., et al. (2017). Interleukin 4 promotes the development of ex-Foxp3 Th2 cells during immunity to intestinal helminths. *J. Exp. Med.* *214*, 1809–1826.
- Perlman, H., Bradley, K., Liu, H., Cole, S., Shamiyeh, E., Smith, R.C., Walsh, K., Fiore, S., Koch, A.E., Firestein, G.S., et al. (2003). IL-6 and Matrix Metalloproteinase-1 Are Regulated by the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21 in Synovial Fibroblasts. *J. Immunol.* *170*, 838–845.
- Pikwer, M., Bergström, U., Nilsson, J.-Å., Jacobsson, L., Berglund, G., and Turesson, C. (2009). Breast feeding, but not use of oral contraceptives, is associated with a reduced risk of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *68*, 526–530.
- Plath, K. (2003). Role of Histone H3 Lysine 27 Methylation in X Inactivation. *Science* *300*, 131–135.
- Poepsel, S., Kasinath, V., and Nogales, E. (2018). Cryo-EM structures of PRC2 simultaneously engaged with two functionally distinct nucleosomes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *25*, 154–162.
- 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.
- Prevoo, M.L., van 't Hof, M.A., Kuper, H.H., van Leeuwen, M.A., van de Putte, L.B., and van Riel, P.L. (1995). Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *38*, 44–48.
- Probert, L., Plows, D., Kontogeorgos, G., and Kollias, G. (1995). The type I interleukin-1 receptor acts in series with tumor necrosis factor (TNF) to induce arthritis in TNF-transgenic mice. *Eur. J. Immunol.* *25*, 1794–1797.
- Qin, A., Wen, Z., Zhou, Y., Li, Y., Li, Y., Luo, J., Ren, T., and Xu, L. (2013). MicroRNA-126 regulates the induction and function of CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells through PI3K/AKT pathway. *J. Cell. Mol. Med.* *17*, 252–264.
- 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.
- Ramos, M., Alvarez, I., Sesma, L., Logean, A., Rognan, D., and López de Castro, J.A. (2002). Molecular Mimicry of an HLA-B27-derived Ligand of Arthritis-linked Subtypes with Chlamydial Proteins. *J. Biol. Chem.* *277*, 37573–37581.
- Raptis, S.Z., Shapiro, S.D., Simmons, P.M., Cheng, A.M., and Pham, C.T.N. (2005). Serine Protease Cathepsin G Regulates Adhesion-Dependent Neutrophil Effector Functions by Modulating Integrin Clustering. *Immunity* *22*, 679–691.
- Rau, R. (2002). Adalimumab (a fully human anti-tumour necrosis factor monoclonal antibody) in the treatment of active rheumatoid arthritis: the initial results of five trials. *Ann. Rheum. Dis.* *61*, 70ii–7073.
- 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.
- Ribon, M., Seninet, S., Mussard, J., Sebbag, M., Clavel, C., Serre, G., Boissier, M.-C., Semerano, L., and Decker, P. (2019). Neutrophil extracellular traps exert both pro- and anti-inflammatory actions in rheumatoid arthritis that are modulated by C1q and LL-37. *J. Autoimmun.* *98*, 122–131.
- Robb, R.J., Lineburg, K.E., Kuns, R.D., Wilson, Y.A., Raffelt, N.C., Olver, S.D., Varelias, A., Alexander, K.A., Teal, B.E., Sparwasser, T., et al. (2012). Identification and expansion of highly suppressive CD8(+)FoxP3(+) regulatory T cells after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* *119*, 5898–5908.
- Roux, C.H., Saraux, A., Le Bihan, E., Fardellone, P., Guggenbuhl, P., Fautrel, B., Masson, C., Chary-Valckenaere, I., Cantagrel, A., Juvin, R., et al. (2007). Rheumatoid arthritis and spondyloarthropathies: geographical variations in prevalence in France. *J. Rheumatol.* *34*,

117–122.

Rubtsov, Y.P., Rasmussen, J.P., Chi, E.Y., Fontenot, J., Castelli, L., Ye, X., Treuting, P., Siewe, L., Roers, A., Henderson, W.R., et al. (2008). Regulatory T Cell-Derived Interleukin-10 Limits Inflammation at Environmental Interfaces. *Immunity* 28, 546–558.

Saidane, O., Semerano, L., and Sellam, J. (2019). Could omega-3 fatty acids prevent rheumatoid arthritis? *Joint Bone Spine* 86, 9–12.

Sakaguchi, N., Takahashi, T., Hata, H., Nomura, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Sakihama, T., Matsutani, T., Negishi, I., Nakatsuru, S., et al. (2003). Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature* 426, 454–460.

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.

Salomon, B., Lenschow, D.J., Rhee, L., Ashourian, N., Singh, B., Sharpe, A., and Bluestone, J.A. (2000). B7/CD28 Costimulation Is Essential for the Homeostasis of the CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells that Control Autoimmune Diabetes. *Immunity* 12, 431–440.

Samanta, A., Li, B., Song, X., Bembas, K., Zhang, G., Katsumata, M., Saouaf, S.J., Wang, Q., Hancock, W.W., Shen, Y., et al. (2008). TGF- and IL-6 signals modulate chromatin binding and promoter occupancy by acetylated FOXP3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 14023–14027.

Santinon, F., Batignes, M., Mebrek, M.L., Biton, J., Clavel, G., Hervé, R., Lemeiter, D., Breckler, M., Busato, F., Tost, J., et al. (2020). Involvement of Tumor Necrosis Factor Receptor Type II in *FoxP3* Stability and as a Marker of Treg Cells Specifically Expanded by Anti-Tumor Necrosis Factor Treatments in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 72, 576–587.

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.

Sanulli, S., Justin, N., Teissandier, A., Ancelin, K., Portoso, M., Caron, M., Michaud, A., Lombard, B., da Rocha, S.T., Offer, J., et al. (2015). Jarid2 Methylation via the PRC2 Complex Regulates H3K27me3 Deposition during Cell Differentiation. *Mol. Cell* 57, 769–783.

Sauer, A.V., Brigida, I., Carriglio, N., Jofra Hernandez, R., Scaramuzza, S., Clavenna, D., Sanvito, F., Poliani, P.L., Gagliani, N., Carlucci, F., 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.

Sawant, D.V., Yano, H., Chikina, M., Zhang, Q., Liao, M., Liu, C., Callahan, D.J., Sun, Z., Sun, T., Tabib, T., et al. (2019). Adaptive plasticity of IL-10+ and IL-35+ Treg cells cooperatively promotes tumor T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* 20, 724–735.

Scally, S.W., Petersen, J., Law, S.C., Dudek, N.L., Nel, H.J., Loh, K.L., Wijeyewickrema, L.C., Eckle, S.B.G., van Heemst, J., Pike, R.N., et al. (2013). A molecular basis for the association of the HLA-DRB1 locus, citrullination, and rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* 210, 2569–2582.

Schett, G., and Gravallese, E. (2012). Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat. Rev. Rheumatol.* 8, 656–664.

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.

Schlosstein, L., Terasaki, P.I., Bluestone, R., and Pearson, C.M. (1973). High Association of an HL-A Antigen, W27, with Ankylosing Spondylitis. *N. Engl. J. Med.* *288*, 704–706.

Sebastian, M., Lopez-Ocasio, M., Metidji, A., Rieder, S.A., Shevach, E.M., and Thornton, A.M. (2016). Helios Controls a Limited Subset of Regulatory T Cell Functions. *J. Immunol.* *196*, 144–155.

Sefik, E., Geva-Zatorsky, N., Oh, S., Konnikova, L., Zemmour, D., McGuire, A.M., Burzyn, D., Ortiz-Lopez, A., Lobera, M., Yang, J., et al. (2015). Individual intestinal symbionts induce a distinct population of ROR + regulatory T cells. *Science* *349*, 993–997.

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.

Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., and Sakaguchi, S. (2005). Homeostatic maintenance of natural Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J. Exp. Med.* *201*, 723–735.

Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaili, S.-A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J.T., and Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.* *233*, 6425–6440.

Shen, H., Goodall, J.C., and Hill Gaston, J.S. (2009). Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *60*, 1647–1656.

Sherlock, J.P., Joyce-Shaikh, B., Turner, S.P., Chao, C.-C., Sathe, M., Grein, J., Gorman, D.M., Bowman, E.P., McClanahan, T.K., Yearley, J.H., et al. (2012). IL-23 induces spondyloarthropathy by acting on ROR- $\gamma$ <sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>−</sup> enthesal resident T cells. *Nat. Med.* *18*, 1069–1076.

Shi, H., Liu, C., Tan, H., Li, Y., Nguyen, T.-L.M., Dhungana, Y., Guy, C., Vogel, P., Neale, G., Rankin, S., et al. (2018). Hippo Kinases Mst1 and Mst2 Sense and Amplify IL-2R-STAT5 Signaling in Regulatory T Cells to Establish Stable Regulatory Activity. *Immunity* *49*, 899-914.e6.

Sidaway, P. (2017). Neuropilin-1 is required for Treg stability. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *14*, 458–458.

Simon, J.A., and Lange, C.A. (2008). Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* *647*, 21–29.

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.

Singh, K., Gatzka, M., Peters, T., Borkner, L., Hainzl, A., Wang, H., Sindrilaru, A., and Scharffetter-Kochanek, K. (2013). Reduced CD18 levels drive regulatory T cell conversion into Th17 cells in the CD18<sup>hypo</sup> PL/J mouse model of psoriasis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *190*, 2544–2553.

Smolen, J., Landewé, R.B., Mease, P., Brzezicki, J., Mason, D., Luijckens, K., van Vollenhoven,

- R.F., Kavanaugh, A., Schiff, M., Burmester, G.R., et al. (2009). Efficacy and safety of certolizumab pegol plus methotrexate in active rheumatoid arthritis: the RAPID 2 study. A randomised controlled trial. *Ann. Rheum. Dis.* *68*, 797–804.
- Smolen, J.S., Landewé, R.B.M., Bijlsma, J.W.J., Burmester, G.R., Dougados, M., Kerschbaumer, A., McInnes, I.B., Sepriano, A., van Vollenhoven, R.F., de Wit, M., et al. (2020). EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Ann. Rheum. Dis.* *79*, 685–699.
- Sokolove, J., Wagner, C.A., Lahey, L.J., Sayles, H., Duryee, M.J., Reimold, A.M., Kerr, G., Robinson, W.H., Cannon, G.W., Thiele, G.M., et al. (2016). Increased inflammation and disease activity among current cigarette smokers with rheumatoid arthritis: a cross-sectional analysis of US veterans. *Rheumatology* *55*, 1969–1977.
- Spengler, J., Lugonja, B., Jimmy Ytterberg, A., Zubarev, R.A., Creese, A.J., Pearson, M.J., Grant, M.M., Milward, M., Lundberg, K., Buckley, C.D., et al. (2015). Release of Active Peptidyl Arginine Deiminases by Neutrophils Can Explain Production of Extracellular Citrullinated Autoantigens in Rheumatoid Arthritis Synovial Fluid: ENZYMATICALLY ACTIVE PADs AND AUTOANTIGEN PRODUCTION IN RA SF. *Arthritis Rheumatol.* *67*, 3135–3145.
- Stolt, P. (2005). Silica exposure is associated with increased risk of developing rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA study. *Ann. Rheum. Dis.* *64*, 582–586.
- Su, I., Basavaraj, A., Krutchinsky, A.N., Hobert, O., Ullrich, A., Chait, B.T., and Tarakhovsky, A. (2003). Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement. *Nat. Immunol.* *4*, 124–131.
- Sullivan, J.A., Tomita, Y., Jankowska-Gan, E., Lema, D.A., Arvedson, M.P., Nair, A., Bracamonte-Baran, W., Zhou, Y., Meyer, K.K., Zhong, W., et al. (2020). Treg-Cell-Derived IL-35-Coated Extracellular Vesicles Promote Infectious Tolerance. *Cell Rep.* *30*, 1039-1051.e5.
- Sundstrom, B., Johansson, I., and Rantapaa-Dahlqvist, S. (2015). Interaction between dietary sodium and smoking increases the risk for rheumatoid arthritis: results from a nested case-control study. *Rheumatology* *54*, 487–493.
- Sveaas, S., Berg, I., Provan, S., Semb, A., Olsen, I., Ueland, T., Aukrust, P., Vøllestad, N., Hagen, K., Kvien, T., et al. (2015). Circulating levels of inflammatory cytokines and cytokine receptors in patients with ankylosing spondylitis: a cross-sectional comparative study. *Scand. J. Rheumatol.* *44*, 118–124.
- Svendsen, A.J., Kyvik, K.O., Houen, G., Junker, P., Christensen, K., Christiansen, L., Nielsen, C., Skytthe, A., and Hjelmborg, J.V. (2013). On the Origin of Rheumatoid Arthritis: The Impact of Environment and Genes—A Population Based Twin Study. *PLoS ONE* *8*, e57304.
- Svendsen, A.J., Gervin, K., Lyle, R., Christiansen, L., Kyvik, K., Junker, P., Nielsen, C., Houen, G., and Tan, Q. (2016). Differentially Methylated DNA Regions in Monozygotic Twin Pairs Discordant for Rheumatoid Arthritis: An Epigenome-Wide Study. *Front. Immunol.* *7*, 510.
- 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.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. (2000). A Novel

Transcription Factor, T-bet, Directs Th1 Lineage Commitment. *Cell* *100*, 655–669.

Szurek, E., Cebula, A., Wojciech, L., Pietrzak, M., Rempala, G., Kisielow, P., and Ignatowicz, L. (2015). Differences in Expression Level of Helios and Neuropilin-1 Do Not Distinguish Thymus-Derived from Extrathymically-Induced CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells. *PLoS One* *10*, e0141161.

Takahashi, H., Kanno, T., Nakayamada, S., Hirahara, K., Sciumè, G., Muljo, S.A., Kuchen, S., Casellas, R., Wei, L., Kanno, Y., et al. (2012). TGF- $\beta$  and retinoic acid induce the microRNA miR-10a, which targets Bcl-6 and constrains the plasticity of helper T cells. *Nat. Immunol.* *13*, 587–595.

Taylor, P.C., Keystone, E.C., van der Heijde, D., Weinblatt, M.E., del Carmen Morales, L., Reyes Gonzaga, J., Yakushin, S., Ishii, T., Emoto, K., Beattie, S., et al. (2017). Baricitinib versus Placebo or Adalimumab in Rheumatoid Arthritis. *N. Engl. J. Med.* *376*, 652–662.

Terness, P., Bauer, T.M., Röse, L., Dufter, C., Watzlik, A., Simon, H., and Opelz, G. (2002). Inhibition of Allogeneic T Cell Proliferation by Indoleamine 2,3-Dioxygenase-expressing Dendritic Cells. *J. Exp. Med.* *196*, 447–457.

The Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC) (2010). Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci. *Nat. Genet.* *42*, 123–127.

Thiolat, A., Denys, A., Petit, M., Biton, J., Lemeiter, D., Herve, R., Lutomski, D., Boissier, M.-C., and Bessis, N. (2014a). Interleukin-35 gene therapy exacerbates experimental rheumatoid arthritis in mice. *Cytokine* *69*, 87–93.

Thiolat, A., Semerano, L., Pers, Y.M., Biton, J., Lemeiter, D., Portales, P., Quentin, J., Jorgensen, C., Decker, P., Boissier, M.-C., et al. (2014b). Interleukin-6 Receptor Blockade Enhances CD39<sup>+</sup> Regulatory T Cell Development in Rheumatoid Arthritis and in Experimental Arthritis: Effects of IL-6R Blockade on CD39<sup>+</sup> Treg Cells in Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* *66*, 273–283.

Thornton, A.M., Korty, P.E., Tran, D.Q., Wohlfert, E.A., Murray, P.E., Belkaid, Y., and Shevach, E.M. (2010). Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *184*, 3433–3441.

Thornton, A.M., Lu, J., Korty, P.E., Kim, Y.C., Martens, C., Sun, P.D., and Shevach, E.M. (2019). Helios<sup>+</sup> and Helios<sup>-</sup> Treg subpopulations are phenotypically and functionally distinct and express dissimilar TCR repertoires. *Eur. J. Immunol.* *49*, 398–412.

Tie, F., Banerjee, R., Stratton, C.A., Prasad-Sinha, J., Stepanik, V., Zlobin, A., Diaz, M.O., Scacheri, P.C., and Harte, P.J. (2009). CBP-mediated acetylation of histone H3 lysine 27 antagonizes Drosophila Polycomb silencing. *Development* *136*, 3131–3141.

Tobón, G.J., Youinou, P., and Saraux, A. (2010). The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *J. Autoimmun.* *35*, 10–14.

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.* *190*, 3180–3188.

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.

Tumes, D.J., Onodera, A., Suzuki, A., Shinoda, K., Endo, Y., Iwamura, C., Hosokawa, H., Koseki,

- H., Tokoyoda, K., Suzuki, Y., et al. (2013). The Polycomb Protein Ezh2 Regulates Differentiation and Plasticity of CD4+ T Helper Type 1 and Type 2 Cells. *Immunity* 39, 819–832.
- Turnis, M.E., Sawant, D.V., Szymczak-Workman, A.L., Andrews, L.P., Delgoffe, G.M., Yano, H., Beres, A.J., Vogel, P., Workman, C.J., and Vignali, D.A.A. (2016). Interleukin-35 Limits Anti-Tumor Immunity. *Immunity* 44, 316–329.
- Urbano, P.C.M., Koenen, H.J.P.M., Joosten, I., and He, X. (2018). An Autocrine TNF $\alpha$ –Tumor Necrosis Factor Receptor 2 Loop Promotes Epigenetic Effects Inducing Human Treg Stability In Vitro. *Front. Immunol.* 9.
- Van den Steen, P.E., Proost, P., Grillet, B., Brand, D.D., Rang, A.H., Van Damme, J., and Opdenakker, G. (2002). Cleavage of denatured natural collagen type II by neutrophil gelatinase B reveals enzyme specificity, post-translational modifications in the substrate, and the formation of remnant epitopes in rheumatoid arthritis. *FASEB J.* 16, 379–389.
- Varambally, S., Dhanasekaran, S.M., Zhou, M., Barrette, T.R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M.G., Ghosh, D., Pienta, K.J., Sewalt, R.G.A.B., Otte, A.P., et al. (2002). *Nature* 419, 624–629.
- Vaswani, R.G., Gehling, V.S., Dakin, L.A., Cook, A.S., Nasveschuk, C.G., Duplessis, M., Iyer, P., Balasubramanian, S., Zhao, F., Good, A.C., et al. (2016). Identification of (R)-N-((4-Methoxy-6-methyl-2-oxo-1,2-dihydropyridin-3-yl)methyl)-2-methyl-1-(1-(1-(2,2,2-trifluoroethyl)piperidin-4-yl)ethyl)-1 H -indole-3-carboxamide (CPI-1205), a Potent and Selective Inhibitor of Histone Methyltransferase EZH2, Suitable for Phase I Clinical Trials for B-Cell Lymphomas. *J. Med. Chem.* 59, 9928–9941.
- Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., and Stockinger, B. (2006). TGF $\beta$  in the Context of an Inflammatory Cytokine Milieu Supports De Novo Differentiation of IL-17-Producing T Cells. *Immunity* 24, 179–189.
- Verschueren, P., De Cock, D., Corluy, L., Joos, R., Langenaken, C., Taelman, V., Raeman, F., Ravelingien, I., Vandevyvere, K., Lenaerts, J., et al. (2015). Methotrexate in combination with other DMARDs is not superior to methotrexate alone for remission induction with moderate-to-high-dose glucocorticoid bridging in early rheumatoid arthritis after 16 weeks of treatment: the CareRA trial. *Ann. Rheum. Dis.* 74, 27–34.
- Viatte, S., Plant, D., Bowes, J., Lunt, M., Eyre, S., Barton, A., and Worthington, J. (2012). Genetic markers of rheumatoid arthritis susceptibility in anti-citrullinated peptide antibody negative patients. *Ann. Rheum. Dis.* 71, 1984–1990.
- Vieira, P.L., Christensen, J.R., Minaee, S., O’Neill, E.J., Barrat, F.J., Boonstra, A., Barthlott, T., Stockinger, B., Wraith, D.C., and O’Garra, A. (2004). IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 172, 5986–5993.
- Wan, Y.Y., and Flavell, R.A. (2007). Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* 445, 766–770.
- Wang, D., Quiros, J., Mahuron, K., Pai, C.-C., Ranzani, V., Young, A., Silveria, S., Harwin, T., Abnousian, A., Pagani, M., et al. (2018). Targeting EZH2 Reprograms Intratumoral Regulatory T Cells to Enhance Cancer Immunity. *Cell Rep.* 23, 3262–3274.
- 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, R., Wan, Q., Kozhaya, L., Fujii, H., and Unutmaz, D. (2008). Identification of a Regulatory T Cell Specific Cell Surface Molecule that Mediates Suppressive Signals and Induces Foxp3 Expression. *PLoS ONE* 3, e2705.

Wang, S., Xia, P., Chen, Y., Qu, Y., Xiong, Z., Ye, B., Du, Y., Tian, Y., Yin, Z., Xu, Z., et al. (2017). Regulatory Innate Lymphoid Cells Control Innate Intestinal Inflammation. *Cell* 171, 201–216.e18.

Wang, Y., Su, M.A., and Wan, Y.Y. (2011). An Essential Role of the Transcription Factor GATA-3 for the Function of Regulatory T Cells. *Immunity* 35, 337–348.

Webber, M.P., Moir, W., Zeig-Owens, R., Glaser, M.S., Jaber, N., Hall, C., Berman, J., Qayyum, B., Loupasakis, K., Kelly, K., et al. (2015). Nested Case-Control Study of Selected Systemic Autoimmune Diseases in World Trade Center Rescue/Recovery Workers: AUTOIMMUNE DISEASES AND WORLD TRADE CENTER WORK EXPOSURE. *Arthritis Rheumatol.* 67, 1369–1376.

Wei, J., Duramad, O., Perng, O.A., Reiner, S.L., Liu, Y.-J., and Qin, F.X.-F. (2007). Antagonistic nature of T helper 1/2 developmental programs in opposing peripheral induction of Foxp3+ regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 18169–18174.

Weinblatt, M.E., Kremer, J.M., Bankhurst, A.D., Bulpitt, K.J., Fleischmann, R.M., Fox, R.I., Jackson, C.G., Lange, M., and Burge, D.J. (1999). A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. *N. Engl. J. Med.* 340, 253–259.

Weiner, H.L. (2001). Induction and mechanism of action of transforming growth factor- $\beta$ -secreting Th3 regulatory cells: TGF- $\beta$ -secreting Th3 regulatory cells. *Immunol. Rev.* 182, 207–214.

Weiss, J.M., Bilate, A.M., Gobert, M., Ding, Y., Curotto de Lafaille, M.A., Parkhurst, C.N., Xiong, H., Dolpady, J., Frey, A.B., Ruocco, M.G., et al. (2012). Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells. *J. Exp. Med.* 209, 1723–1742.

Williams, L.M., and Rudensky, A.Y. (2007). Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat. Immunol.* 8, 277–284.

Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 Control over Foxp3+ Regulatory T Cell Function. *Science* 322, 271–275.

Wright, H.L., Chikura, B., Bucknall, R.C., Moots, R.J., and Edwards, S.W. (2011). Changes in expression of membrane TNF, NF- $\kappa$ B activation and neutrophil apoptosis during active and resolved inflammation. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 537–543.

Wu, C., Chen, Z., Xiao, S., Thalhamer, T., Madi, A., Han, T., and Kuchroo, V. (2018). SGK1 Governs the Reciprocal Development of Th17 and Regulatory T Cells. *Cell Rep.* 22, 653–665.

Wu, Y., Borde, M., Heissmeyer, V., Feuerer, M., Lapan, A.D., Stroud, J.C., Bates, D.L., Guo, L., Han, A., Ziegler, S.F., et al. (2006). FOXP3 Controls Regulatory T Cell Function through Cooperation with NFAT. *Cell* 126, 375–387.

Xiao, X., Li, Y., Jiang, X., Ji, X., Lu, X., Yang, B., Wu, L., Wang, X., Guo, J., Zhao, L., et al. (2020).

- EZH2 deficiency attenuates Treg differentiation in rheumatoid arthritis. *J. Autoimmun.* *108*, 102404.
- Xiao, Y., Nagai, Y., Deng, G., Ohtani, T., Zhu, Z., Zhou, Z., Zhang, H., Ji, M.Q., Lough, J.W., Samanta, A., et al. (2014). Dynamic Interactions between TIP60 and p300 Regulate FOXP3 Function through a Structural Switch Defined by a Single Lysine on TIP60. *Cell Rep.* *7*, 1471–1480.
- Yadav, M., Louvet, C., Davini, D., Gardner, J.M., Martinez-Llordella, M., Bailey-Bucktrout, S., Anthony, B.A., Sverdrup, F.M., Head, R., Kuster, D.J., et al. (2012). Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J. Exp. Med.* *209*, 1713–1722, S1-19.
- Yamada, H., Nakashima, Y., Okazaki, K., Mawatari, T., Fukushi, J.-I., Kaibara, N., Hori, A., Iwamoto, Y., and Yoshikai, Y. (2007). Th1 but not Th17 cells predominate in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *67*, 1299–1304.
- Yang, X.-P., Jiang, K., Hirahara, K., Vahedi, G., Afzali, B., Sciume, G., Bonelli, M., Sun, H.-W., Jankovic, D., Kanno, Y., et al. (2015). EZH2 is crucial for both differentiation of regulatory T cells and T effector cell expansion. *Sci. Rep.* *5*.
- 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.
- Yao, Z., Kanno, Y., Kerenyi, M., Stephens, G., Durant, L., Watford, W.T., Laurence, A., Robinson, G.W., Shevach, E.M., Moriggl, R., et al. (2007). Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3. *Blood* *109*, 4368–4375.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* *17*, 3011–3016.
- Yue, X., Trifari, S., Äijö, T., Tsagaratou, A., Pastor, W.A., Zepeda-Martínez, J.A., Lio, C.-W.J., Li, X., Huang, Y., Vijayanand, P., et al. (2016). Control of Foxp3 stability through modulation of TET activity. *J. Exp. Med.* *213*, 377–397.
- Zeng, H., Zhang, R., Jin, B., and Chen, L. (2015). Type 1 regulatory T cells: a new mechanism of peripheral immune tolerance. *Cell. Mol. Immunol.* *12*, 566–571.
- Zhang, W., and Yang, S.Y. (2000). Cloning and Characterization of a New Member of the T-Box Gene Family. *Genomics* *70*, 41–48.
- Zhang, B., Zhang, X., Tang, F., Zhu, L., and Liu, Y. (2008). Reduction of forkhead box P3 levels in CD4+CD25high T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* *153*, 182–187.
- Zhang, X., Majlessi, L., Deriaud, E., Leclerc, C., and Lo-Man, R. (2009). Coactivation of Syk Kinase and MyD88 Adaptor Protein Pathways by Bacteria Promotes Regulatory Properties of Neutrophils. *Immunity* *31*, 761–771.
- Zhang, X., Olsen, N., and Zheng, S.G. (2020). The progress and prospect of regulatory T cells in autoimmune diseases. *J. Autoimmun.* *111*, 102461.
- Zhang, Y., Kinkel, S., Maksimovic, J., Bandala-Sanchez, E., Tanzer, M.C., Naselli, G., Zhang, J.-G., Zhan, Y., Lew, A.M., Silke, J., et al. (2014). The polycomb repressive complex 2 governs life

and death of peripheral T cells. *Blood* 124, 737–749.

Zhao, Y., Thornton, A.M., Kinney, M.C., Ma, C.A., Spinner, J.J., Fuss, I.J., Shevach, E.M., and Jain, A. (2011). The deubiquitinase CYLD targets Smad7 protein to regulate transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) signaling and the development of regulatory T cells. *J. Biol. Chem.* 286, 40520–40530.

Zheng, Y., Josefowicz, S.Z., Kas, A., Chu, T.-T., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2007). Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 445, 936–940.

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.

Zhou, L., Ivanov, I.I., Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy, D.E., Leonard, W.J., and Littman, D.R. (2007). IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat. Immunol.* 8, 967–974.

Zhou, L., Lopes, J.E., Chong, M.M.W., Ivanov, I.I., Min, R., Victora, G.D., Shen, Y., Du, J., Rubtsov, Y.P., Rudensky, A.Y., et al. (2008). TGF- $\beta$ -induced Foxp3 inhibits TH17 cell differentiation by antagonizing ROR $\gamma$ t function. *Nature* 453, 236–240.

Zhou, Q., Haupt, S., Kreuzer, J.T., Hammitzsch, A., Proft, F., Neumann, C., Leipe, J., Witt, M., Schulze-Koops, H., and Skapenko, A. (2015). Decreased expression of miR-146a and miR-155 contributes to an abnormal Treg phenotype in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 74, 1265–1274.

Zhou, X., Bailey-Bucktrout, S.L., Jeker, L.T., Penaranda, C., Martínez-Llordella, M., Ashby, M., Nakayama, M., Rosenthal, W., and Bluestone, J.A. (2009). Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat. Immunol.* 10, 1000–1007.

Ziff, M. (1974). Relation of cellular infiltration of rheumatoid synovial membrane to its immune response. *Arthritis Rheum.* 17, 313–319.

de Zoeten, E.F., Wang, L., Sai, H., Dillmann, W.H., and Hancock, W.W. (2010). Inhibition of HDAC9 Increases T Regulatory Cell Function and Prevents Colitis in Mice. *Gastroenterology* 138, 583–594.

Les lymphocytes T régulateurs (Treg), gardiens de la tolérance vis-à-vis du soi, sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription FoxP3 et sont fonctionnellement défectueux chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR) ou de spondyloarthrite (SpA). Cette déficience fonctionnelle n'a pas encore été clairement caractérisée. Dans ce contexte, notre premier objectif a été d'évaluer le rôle du récepteur de type 2 du TNF $\alpha$  (TNFR2) exprimé par les Treg dans le contrôle de l'inflammation. Nous avons montré que les Treg-TNFR2<sup>+</sup> jouaient un rôle important pour contrer l'inflammation dans deux modèles murins (arthrite DTHA et psoriasis induit par l'imiquimod). Dans cette même étude, nous avons mis en évidence un lien entre le TNFR2 et la stabilité de FoxP3 en montrant que l'expression du TNFR2 par les Treg était associée à une hypométhylation du TSDR. Enfin, nous avons démontré que l'effet thérapeutique des anti-TNF $\alpha$  chez les patients PR était lié à une augmentation de la fréquence de la sous-population de Treg TNFR2<sup>+</sup>. Ainsi, en induisant l'expression du TNFR2 par les Treg, cette thérapie ciblée pourrait exercer son activité anti-inflammatoire en augmentant la stabilité des Treg. Au cours des dernières années, la littérature suggère que l'identité des Treg varie en fonction de leur microenvironnement. Dans ce contexte, nous avons fait l'hypothèse que, sous l'influence d'un environnement inflammatoire (PR et SpA), l'expression des régulateurs transcriptionnels et épigénétiques impliqués dans le maintien de la stabilité de FoxP3 pourrait être altérée, ce qui pourrait conduire à une modification de l'identité des Treg et par conséquent à une diminution de leur activité suppressive. De ce fait, notre second objectif a été (i) d'évaluer la stabilité des Treg au cours de l'inflammation chez des patients atteints de PR et de SpA en évaluant l'expression des facteurs impliqués dans le maintien de la stabilité de FoxP3 (EZH2, Helios, pSTAT5) et (ii) d'établir le lien entre les thérapies ciblées et la stabilité des Treg. Nous avons montré pour la première fois une instabilité des Treg chez des patients atteints de PR ou de SpA naïfs de biothérapies, résultant d'une altération des mécanismes de régulation médiés par EZH2 et pSTAT5 mais pas par Helios. Nous avons également apporté des preuves supplémentaires du rôle d'EZH2 dans l'induction de l'expression de FoxP3 *in vitro* et dans le maintien de l'identité et de l'activité suppressive des Treg. De plus, nous avons mis en évidence un rôle potentiel d'EZH2 dans la génération de Treg hautement stables et immunosuppresseurs exprimant à la fois EZH2 et TNFR2 ou EZH2 et CD39. Pour terminer, nous suggérons que les thérapies ciblées pourraient restaurer la stabilité des Treg, dans un contexte inflammatoire, en augmentant la fréquence des Treg pSTAT5<sup>+</sup> comme observé dans le modèle d'AEC. Ceci reste néanmoins à confirmer chez les patients atteints de PR ou de SpA.

Regulatory T cells (Treg), the guardians of self tolerance, are characterized by the expression of transcriptional factor FoxP3 and are functionally defective in patients with rheumatoid arthritis (RA) or spondyloarthritis (SpA). This functional deficiency has not yet been well characterized. In this context, our first objective was to evaluate the role of TNFR2 expressed by Treg in controlling inflammation. We showed that Treg-TNFR2<sup>+</sup> plays an important role in the control of inflammation in two mouse models (DTHA and imiquimod-induced psoriasis). In the same study, we highlighted a link between TNFR2 and FoxP3 stability by demonstrating that TNFR2 expression by Treg is associated with TSDR hypomethylation. Finally, we demonstrated that the therapeutic effect of anti-TNF $\alpha$  treatment in RA patients was related to an increase in TNFR2<sup>+</sup>Treg subpopulation frequency. Thus, by inducing TNFR2 expression in Treg, this targeted therapy could exert its anti-inflammatory activity by increasing Treg stability. In recent years, the literature has suggested that Treg identity varies according to the microenvironment. In this context, we hypothesized that, under inflammatory environment (RA and SpA), the expression of transcriptional and epigenetic regulators involved in the maintenance of FoxP3 stability could be altered, which lead to an altered Treg identity and therefore decreased their suppressive activity. Thus, our second objective was (i) to evaluate Treg stability during inflammation in RA and SpA patients by assessing the expression of factors known to stabilize FoxP3 (EZH2, Helios, pSTAT5) and (ii) to establish the link between targeted therapies and Treg stability. We showed for the first time Treg instability in biotherapy-free RA and SpA patients, resulting from impaired regulatory mechanisms mediated by EZH2 and pSTAT5 but not Helios. We also provided further evidence for EZH2's role in inducing FoxP3 expression *in vitro*, and in maintaining Treg identity and suppressive activity. Finally, we suggested that targeted therapies could restore Treg stability in an inflammatory context by increasing pSTAT5<sup>+</sup> Treg frequency as demonstrated in CIA. However, this remains to be confirmed in RA and SpA patients.

Discipline : Biologie, mention Biologie moléculaire et cellulaire.

Mots clé : lymphocytes T régulateurs, EZH2, inflammation chronique, autoimmunité, rhumatologie.

UMR INSERM 1125, Université Sorbonne Paris Nord, 1 Rue de Chablis 93017 BOBIGNY