



HAL
open science

Modulation de la balance Th17/Treg par l'IL-27 et ICOS dans un modèle animal de Spondyloarthrite

Quentin Jouhault

► **To cite this version:**

Quentin Jouhault. Modulation de la balance Th17/Treg par l'IL-27 et ICOS dans un modèle animal de Spondyloarthrite. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLV008 . tel-01561235

HAL Id: tel-01561235

<https://theses.hal.science/tel-01561235>

Submitted on 12 Jul 2017

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

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



NNT : 2017SACLV008

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'UNIVERSITE DE VERSAILLES-SAINT-QUENTIN-EN-YVELINES

ÉCOLE DOCTORALE N°577
Structure et Dynamique des Systèmes Vivants (SDSV)

Spécialité de doctorat : Biologie

Par

Quentin Jauhault

Modulation de la balance Th17/Treg par l'IL-27 et ICOS dans un modèle animal de
spondyloarthrite

Thèse présentée et soutenue à Montigny-le-Bretonneux, le 10 Avril 2017 :

Composition du Jury :

M. Pierre Bobé, Professeur, Université Paris Sud, Président du jury
Mme Géraldine Falgarone, Professeure, Université Paris 13, Rapporteur
M. Jean Roudier, Professeur, Université Aix-Marseille, Rapporteur
Mme Guiseppina Caligiuri, Directrice de Recherche, Université Paris Diderot, Examinatrice
M. Ulrich Meinzer, Maître de Conférences, Université Paris Diderot, Examineur
M. Gilles Chiochia, Professeur, Université Paris Saclay, Directeur de thèse

Titre : Modulation de la balance Th17/Treg par l'IL-27 et ICOS dans un modèle animal de spondyloarthrite

Mots clés : SpA, Th17, Treg, IL-27, ICOS

La spondyloarthrite (SpA) est un rhumatisme inflammatoire chronique fréquent avec une prévalence de 0,43% en France, fortement associée à HLA-B27. À l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement curatif et les mécanismes physiopathologiques impliqués restent méconnus. Afin de mieux comprendre les mécanismes immunologiques impliqués dans le développement de la SpA, nous avons étudié deux populations cellulaires clé, les cellules dendritiques (DC) et les lymphocytes T (LT) CD4⁺, chez le rat transgénique pour le HLA-B27 et la β 2 microglobuline humaine (rat B27) qui développe spontanément tous les symptômes de la SpA. Il a été démontré que l'accumulation de lymphocytes T helper producteurs d'interleukine 17 (IL-17) pathogénique (lymphocyte Th₁₇), et plusieurs défauts fonctionnels des cellules dendritiques (DCs) sont corrélés avec le développement de la SpA chez les rats B27.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés aux lymphocytes T régulateurs (Treg), dont le rôle est d'empêcher l'établissement d'une réponse immune pathogène pour l'hôte, chez le rat B27. Nous avons découvert que les Treg de rats B27 présentent un phénotype pro-inflammatoire (surexpression d'IL-17 et sous-expression d'IL-10 anti-inflammatoire), lié à la surexpression de la molécule ICOS. De plus, la sévérité des signes cliniques chez les rats B27 n'exprimant pas ICOS (rats B27 ICOS KO) est diminuée comparé aux animaux HLA-B27 sauvages. Cette protection partielle est corrélée à une réduction de la proportion de lymphocytes Th₁₇. Ces résultats mettent en lumière le rôle majeur d'ICOS dans la physiopathologie de la SpA du rat.

La deuxième partie de ce travail s'est concentrée sur les conséquences de la sous-expression d'IL-27 par les DC de rats B27, cytokine connue pour inhiber le développement des Th₁₇. Nous avons observé que l'addition d'IL-27 exogène permet de diminuer la production d'IL-17 et d'augmenter la synthèse d'IL-10 anti-inflammatoire par les LT différenciés (T effecteurs et Treg) et les LT naïfs de rats B27 différenciés *in vitro*. De façon intéressante, l'IL-27 réduit également la synthèse d'IL-17 par les LT CD4⁺ circulants de patients atteints de SpA.

Ces travaux démontrent pour la première fois le rôle clé de l'IL-27 et d'ICOS dans le contrôle de l'inflammation chez le rat B27 et suggèrent fortement que ces deux molécules sont de nouvelles cibles thérapeutiques prometteuses dans la SpA.

Title: Modulation of Th17/Treg balance by IL-27 and ICOS in a rat model of spondyloarthritis

Keywords: SpA, Th17, Treg, IL-27, ICOS

Spondyloarthritis (SpA) is a frequent chronic rheumatic inflammatory disorder with a prevalence of 0.43% in France and closely associated to HLA-B27. To date, there is no curative treatment and pathophysiological mechanisms involved in this pathology remain elusive. To better understand these mechanisms, we studied two crucial cell populations, dendritic cells (DC) and CD4⁺ T cells in rats transgenic for HLA-B27 and human β 2 microglobulin (B27 rats) which spontaneously develop a phenotype closely resembling human spondyloarthritis. Previous studies demonstrated that accumulation of pathogenic IL-17 producing T cells (Th₁₇ cells) and several function defects of DCs are correlated with SpA development in B27 rats.

First, we focused on regulatory T cells, whose role is to prevent the establishment of pathogenic immune responses. We discovered that Treg from B27 rats have a pro-inflammatory phenotype. They overexpress IL-17 and underexpress anti-inflammatory IL-10, linked to ICOS overexpression. Furthermore, B27 rats knock-out for ICOS (B27 ICOS KO rats) have reduced severity of clinical symptoms compared to B27 ICOS WT rats. This protective effect is correlated with a reduced proportion of Th₁₇ cells. These results highlight the crucial role of ICOS in rat SpA physiopathology.

In the second part of this work we studied the consequences of IL-27 underexpression by B27 DC, a cytokine known to inhibit Th₁₇ development. Addition of exogenous IL-27 reduces IL-17 and increases IL-10 productions by differentiated T cells (Teff and Treg) and by naive T cells polarized *in vitro*. Interestingly, IL-27 also reduces IL-17 production by circulating CD4⁺ T cells isolated from blood of SpA patients.

This work demonstrate for the first time the key role of IL-27 and ICOS in the control of inflammation in B27 rats and highly suggest that these molecules may be new promising therapeutic targets in SpA.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, le professeur Gilles Chiocchia, pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et m'avoir confié ce sujet à la fois très complexe et passionnant. Merci pour vos conseils et votre bonne humeur qui m'ont permis d'avancer tout au long de cette thèse, que ce soit dans les bons ou dans les mauvais moments. Merci pour m'avoir fait confiance.

Je tenais également à remercier le professeur Maxime Breban, co-directeur du laboratoire, pour son aide précieuse et son point de vue d'expert sur la SpA. Merci pour les nombreuses conversations scientifiques qui m'ont fortement aidé à apprivoiser ce sujet. Merci de m'avoir fait partager vos connaissances et votre excellente pédagogie.

Et c'est maintenant le tour de Luiza, que dis-je, la très grande Luiza, la « grande sœur » que j'aurais aimé avoir. Je ne sais même pas par où commencer... On dit souvent qu'on ressort différent de cette épreuve et c'est particulièrement vrai pour moi. Un immense merci pour tout ce que tu as fait, par exemple pour ta patience devant la hotte à m'expliquer ces calculs de dilution pour les cultures cellulaires qui m'ont filé quelques migraines au début. Merci aussi pour ta pédagogie, que ce soit pour les manips ou pour l'aspect scientifique. Merci pour ton soutien sans faille dans les moments difficiles. Un immense merci aussi pour toutes les discussions, scientifiques et non scientifiques, qui m'ont fait grandir. Merci pour tes innombrables conseils, toujours pertinents. Grâce à toi, ces trois ans et demi sont passés à une vitesse folle et je suis très triste de devoir quitter ce bureau 45... J'espère que de nombreux autres étudiants auront la chance que j'ai eu d'avoir travaillé avec toi. Merci aussi pour m'avoir appris quelques expressions brésiliennes savoureuses qui me feront rire encore longtemps !! Je te souhaite le meilleur pour la suite, tu le mérites énormément. Merci pour tout.

Un grand merci à tous les membres de mon jury de thèse. Merci aux professeurs Jean Roudier et Géraldine Falgarone d'avoir pris le temps de rapporter ce travail. Merci également au professeur Pierre Bobé et aux docteurs Guiseppina Caligiuri et Ulrich Meinzer d'avoir accepté d'examiner cette thèse

Je remercie également tous les étudiants qui ont travaillé avec Luiza et moi sur ce sujet pour leur enthousiasme et leur bonne humeur, ainsi que leurs excellents gâteaux ! Merci à Bilade, Guillaume, Lucy et Yoan, Elizabeth et Sabrina, Camille ou encore Emilie.

Je remercie également tous les membres de l'équipe IRIS, encore présents ou partis vers d'autres horizons. Merci à Ingrid pour sa bonne humeur et son travail qui a permis la naissance du projet IL-27. Merci à Isabelle également. Un grand merci à Nadège et Kétia pour

les pauses café et nombreux conseils ! Bon courage à toi Kétia pour la fin de ta thèse tu vas y arriver !! Merci également à Clémence et Christophe ainsi qu'à Aude et Vania, pour leurs soutien et conseils autour de bonbons et chocolat ! Merci à tous pour votre bonne humeur et vos soutiens. Merci également à tous les autres que j'oublie...

Je remercie également le Laboratoire d'Excellence Inflammex, ainsi que la fondation RAMSES, de m'avoir financé tout au long de thèse et sans qui ce travail n'aurait pas été possible.

Mes remerciements s'adressent également à la plate-forme d'imagerie et de cytométrie et à Benoit Maury pour ses coups de main sur l'Aria et le Fortessa quand ceux-ci devenaient trop capricieux. Merci également à Pelvipharm, et notamment à Aude Robert, pour avoir pris soin de l'élevage de rats.

Bien évidemment merci également à ma famille et mes amis (Steph, Alex, John, Jerem...) pour leur fort soutien et leur aide tout au long de cette thèse. Merci de m'avoir aidé à ne pas décrocher lorsque le moral ne suivait pas, ce travail c'est aussi grâce à vous. Une immense pensée pour ma grand-mère à qui je dois tant et à qui j'aurais aimé montrer ce travail.

Et bien sûr un immense merci à toi Clémentine pour avoir été à mes côtés tout au long de cette thèse et j'espère pendant encore longtemps. Merci d'avoir supporté mes sautes d'humeur ainsi que mes horaires tardifs au labo, merci d'avoir tout fait pour que je puisse faire cette thèse dans les meilleures conditions. Sans toi ce travail n'aurait pas été possible. Merci aussi à Marion d'avoir fait ses nuits aussi vite !! Merci encore à vous deux de me donner le sourire et le plaisir de la vie chaque jour.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	2
TABLE DES MATIÈRES	5
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	8
LISTE DES ABRÉVIATIONS	10
INTRODUCTION	12
Chapitre 1 : Les Spondyloarthrites	13
A. Manifestations cliniques	14
Manifestation axiales	14
Manifestation périphériques.....	17
Manifestations extra-articulaires	19
B. Les différents sous-types de SpA.....	20
La spondylarthrite ankylosante (SA).....	20
Rhumatismes associés aux entérocolopathies inflammatoires (« arthrites associées aux MICI »)	20
Les arthrites réactionnelles (Aré)	21
Le rhumatisme psoriasique (RhumPso).....	21
SpA à début juvénile	21
Les SpA indifférenciées.....	21
Concept unifié de SpA	22
C. Les critères de classification des SpA	22
Les critères d’Amor	23
Les critères de l’European Spondyloarthropathy Study Group (ESSG)	23
Les critères de l’Assesment of SpondyloArthritis Society (ASAS)	24
D. Traitements	25
E. Interactions hôte-environnement	27
Facteurs génétiques	28
Facteurs environnementaux.....	34
Chapitre 2 : Les modèles animaux de SpA.....	36
A. Rats B27.....	36
B. Modèles chez la souris	38
Souris transgéniques pour le HLA-B27 et déficientes en β 2m murine.....	39
La souris ANKENT.....	39
Modèles impliquant l’IL-23.....	39

Modèles impliquant le TNF- α	41
C. Rôle essentiel des LT CD4 ⁺ et des cellules présentatrices d'antigène (CPA)	43
Importance des cellules dérivées de la moelle osseuse.....	43
Importance des LT CD4 ⁺	43
D. Les DC chez le rat	45
E. Interactions entre DC et LT chez le rat B27	47
Chapitre 3. La différenciation des LT CD4 ⁺	51
A. Les principaux sous-types de LT CD4 ⁺	51
Les lymphocytes Th ₁	51
Les lymphocytes Th ₂	52
Les lymphocytes Th ₁₇	52
Les lymphocytes T régulateurs (Treg).....	54
B. Plasticité des LT CD4 ⁺	56
Relation entre Th ₁ et Th ₂	56
Relation entre Th ₁ /Th ₂ et Th ₁₇	57
Relation entre Treg et Th ₁₇	57
C. Influence de la molécule de costimulation ICOS	58
Chapitre 4. L'interleukine-27, un gardien du système immunitaire	62
A. Description de l'IL-27, de son récepteur et des cytokines apparentées	62
B. Régulation de l'expression de l'IL-27.....	64
C. Signalisation induite par l'IL-27	65
D. Régulation de la réponse immunitaire par l'IL-27.....	66
Effet sur les lymphocytes Th ₁	66
Effet sur les lymphocytes Th ₂	67
Effet sur les lymphocytes Th ₁₇	68
Effet sur les lymphocytes T régulateurs (Treg) Foxp3 ⁺	69
Effet sur les lymphocytes régulateurs de type 1 (Tr ₁) producteurs d'IL-10.....	70
Effet sur les DC.....	71
E. Rôle de l'IL-27 dans les pathologies inflammatoires et auto-immunes	72
Effets sur l'arthrite.....	72
Effets sur la colite	73
Effets sur le psoriasis	74
Effets sur l'uvéite	74
Objectif de la thèse.....	76
TRAVAUX ORIGINAUX.....	77

Article 1: La production accrue d'IL-17 par rapport à l'IL-10 par les Treg implique la molécule ICOS dans un modèle expérimental de spondyloarthrite.....	78
Article 2 : Rôle modulateur d'ICOS dans un modèle animal de spondyloarthrite	91
Article 3 : Régulation de l'inflammation par l'IL-27 dans un modèle animal de spondyloarthrite	98
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	132
CONCLUSION	146
BIBLIOGRAPHIE	147
Annexe 1	172

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 1 : Les différents sous-types de SpA.....	13
Figure 2 : Scanner des articulations sacro-iliaques montrant un aspect érosif de la partie antérieure de l'interligne gauche, témoignant d'une atteinte inflammatoire	15
Figure 3 : Représentation de la colonne vertébrale à 3 stades : normale, enflammée et ankylosée.	16
Figure 4 : Signes de l'ankylose de la colonne vertébrale.....	16
Figure 5 : Représentation schématique du pied.	19
Figure 6: Stratégie thérapeutique pour la prise en charge des patients atteints de SpA.	27
Figure 7 : Les principales voies de différenciation des LT CD4 ⁺	56
Figure 8 : Représentation schématique des cytokines hétérodimériques et de leurs récepteurs.	63
Figure 9 : Régulation de la synthèse de la sous-unité p28 de l'IL-27.	65
Figure 10 : Activation de la voie JAK/STAT par l'IL-27.	66
Figure 11 : Résumé de l'effet pléiotrope de l'IL-27 sur plusieurs sous-populations de LT CD4 ⁺	71
Figure 12: Analyse du niveau d'expression d'ICOS à la surface des LT CD4 ⁺ chez le rat et chez l'Homme	92
Figure 13: Electrophorèse des produits de PCR pour la détermination du génotype ICOS.....	93
Figure 14: Analyse de l'expression d'ICOS par cytométrie de flux.	94
Figure 15: Activité de la pathologie des rats ICOS WT et KO	95
Figure 16: Observation histologique de coupes de caecum après coloration Hematoxyline/eosine.	96
Figure 17: Analyse par cytométrie de flux de la production d'IL-17, de TNF- α , d'IFN- γ et d'IL-10 par les LT CD4 ⁺	97

Tableaux

Tableau 1 : Critères de classification de New-York, originaux et modifiés, de la SA.....	20
Tableau 2 : Critères de classification d'Amor.	23
Tableau 3 : Critères de classification de l'ESSG.	24
Tableau 4 : Critères de classification de l'ASAS pour la SpA axiale.	24
Tableau 5 : Critères de classification de l'ASAS pour la SpA périphérique.....	25
Tableau 6 : Prévalence du HLA-B27 dans les différents sous-types de SpA.....	28
Tableau 7 : Comparaison des séquences protéiques de différents HLA-B selon leur association à la SpA.....	29
Tableau 8 : Principales lignées de rats transgéniques étudiées dans le cadre de la SpA.....	36
Tableau 9 : Caractéristiques des deux sous-populations de DC conventionnelles chez le rat.....	46
Tableau 10 : Défauts fonctionnels des DC B27.....	48
Tableau 11: Grille d'évaluation de la sévérité des symptômes observés chez les rats B27 pour le suivi clinique	94

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien

Aré : Arthrite réactionnelle

ASAS : Assesment of spondyloarthritis international society

B2m : β 2-microglobuline

CD : cluster de différenciation

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : cellules présentatrice d'antigène

DC : dendritic cell (cellule dendritique)

EAE : encéphalite auto-immune expérimentale

ERAP : endoplasmic reticulum aminopeptidase

ESSG: European Spondyloarthropathy Study Group

Foxp3: Forkhead wing helix pocket 3

GATA-3 : GATA binding protein 3

HLA : Human leukocyte antigen (antigène des leucocytes humains)

IFN : interféron

IL : interleukine

ICOS : Inducible Costimulator

iTreg : induced Treg (Treg induit)

LB : Lymphocyte B

LPS : lipopolysaccharide

LT : lymphocyte T

MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

nTreg : naturally Treg

PCR : Polymerase Chain Reaction

PR : polyarthrite rhumatoïde

RANKL : receptor activator of nuclear factor B ligand

RhumPso : rhumatisme psoriasique

ROR γ t : retinoic acid related orphan receptor γ t

SA: spondylarthritis ankylosante

SpA: Spondyloarthritis

STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription

T-bet : T-box transcription factor

TCR: T-cell receptor (récepteur des cellules T)

Th₁ : lymphocyte T helper 1

Th₂ : lymphocyte T helper 2

Th₁₇ : lymphocyte T helper 17

TNF α : Tumor necrosis factor α

Treg : lymphocyte T régulateur

UPR : Unfolded Protein Response

INTRODUCTION

Chapitre 1 : Les Spondyloarthrites

Les spondyloarthrites (SpA) sont des rhumatismes inflammatoires chroniques caractérisés par des atteintes articulaires et extra-articulaires. Les SpA sont classiquement subdivisées en 6 groupes : la spondylarthrite ankylosante (SA) qui en est la forme emblématique, le rhumatisme psoriasique (RhumPso), les arthrites réactionnelles (Aré), les rhumatismes des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), les SpA à début juvénile et les formes indifférenciées qui correspondent aux cas ne rentrant dans aucun des sous-types précédemment cités sont (Figure 1).



Figure 1 : Les différents sous-types de SpA.

Les SpA, anciennement appelées spondyloarthropathies, regroupent des rhumatismes inflammatoires affectant principalement la colonne vertébrale. L'analyse de momies égyptiennes présentant des fusions osseuses intervertébrales évocatrices de SA a conduit certains à conclure que ces pathologies toucheraient les Hommes depuis l'Antiquité (Sieper et al., 2002). Il est cependant possible que les altérations anatomiques constatées sur ces momies aient résulté du processus de momification et leur signification n'est donc pas clairement établie. Alors que les auteurs français, notamment Jacques Forestier, avaient clairement distingué très tôt les SpA des polyarthrites rhumatoïdes (PR), l'ensemble des rhumatismes inflammatoires, dont la SA fait partie, ont longtemps été regroupés parmi les arthrites rhumatoïdes par les auteurs anglo-saxons. Moll et Wright ont été les premiers parmi ces derniers à proposer en 1974 le concept de SpA « séronégative » tel que nous le connaissons encore aujourd'hui, en regroupant plusieurs pathologies (notamment la SA, le RhumPso et

l'Aré) sur la base de leur association non fortuite et en les distinguant clairement de la PR (Moll et al., 1974). Ce travail fut rapidement validé par la découverte de la très forte association entre la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I HLA-B27 et la SA, puis l'Aré et les autres formes de SpA (Schlosstein et al., 1973).

Les SpA représentent le second rhumatisme inflammatoire chronique en France, affectant 0,43% de la population française (Costantino et al., 2015a), juste après la PR. La prévalence de la SpA dans le monde varie de 0,01% (Japon) à 2,5% (Eskimos d'Alaska) (van Tubergen, 2015). Du fait de sa plus grande prévalence, la SA est considérée comme le chef de file des SpA.

A. Manifestations cliniques

Les SpA regroupent des pathologies se manifestant par des atteintes inflammatoires du squelette axial ou périphérique, combinées de façon variable à des atteintes extra-articulaires comme les uvéites, le psoriasis ou encore les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI).

Manifestation axiales

Les atteintes axiales sont la caractéristique principale des SpA. Elles regroupent les atteintes du bassin (articulations sacro-iliaques), de la colonne vertébrale (rachis) et de la cage thoracique. Ces atteintes sont responsables de vives douleurs d'horaire inflammatoire, d'une raideur de la colonne vertébrale et peuvent conduire dans certains cas à une ankylose progressive.

L'atteinte de l'articulation sacro-iliaque.

Les deux articulations sacro-iliaques réunissent le sacrum à l'os iliaque. L'inflammation de ces articulations est appelée sacroiliite et est une caractéristique de la SA (Figure 2). Cette sacroiliite se manifeste par une douleur fessière importante, prédominant dans la deuxième partie de la nuit qui peut parfois réveiller le patient. Elle induit également une douleur lombaire basse prolongée au réveil (plus de 30 minutes) et peut être responsable d'une boiterie.



Figure 2 : Scanner des articulations sacro-iliaques montrant un aspect érosif de la partie antérieure de l'interligne gauche, témoignant d'une atteinte inflammatoire

(D'après « La Spondylarthrite » 2004, Editions John Libbey Eurotext)

L'analyse de cette sacroiliite a montré qu'elle était due à une inflammation de la membrane synoviale (synovite) avec formation d'un pannus (François et al., 2000). Une infiltration par des cellules immunitaires est également constatée, principalement des macrophages mais aussi des lymphocytes qui pénètrent dans le cartilage. Cette infiltration s'accompagne d'une néoangiogénèse et d'une destruction de l'os adjacent. À la destruction de l'os et du cartilage fait suite un processus de reconstruction osseuse qui se traduit par la densification de l'os sous-chondral, puis la formation de ponts osseux intra-articulaires et finalement la disparition de l'articulation sacro-iliaque par fusion de ses berges entre elles (Bollow et al., 2000). A la différence de PR où l'atteinte articulaire est surtout destructrice, il peut y avoir simultanément destruction et formation d'os au niveau d'une même articulation chez les patients atteints de SpA. Il est important de noter que l'ankylose osseuse complète s'accompagne souvent d'une disparition de la douleur et qu'elle n'induit qu'une gêne fonctionnelle modérée, l'articulation sacro-iliaque étant relativement peu mobile.

L'atteinte de la colonne vertébrale (spondylite)

Le rachis, ou colonne vertébrale, correspond à un empilement de vertèbres et aux articulations les reliant entre elles. L'inflammation du rachis au cours de la SpA peut aussi bien

toucher l'insertion des ligaments intervertébraux sur les corps vertébraux que les articulations situées entre les apophyses vertébrales (Figure 3).

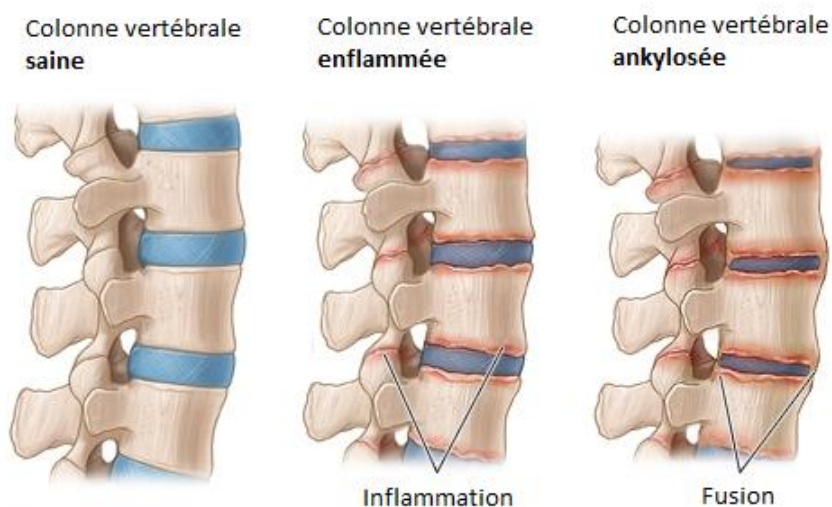


Figure 3 : Représentation de la colonne vertébrale à 3 stades : normale, enflammée et ankylosée.

Au cours de la SpA, l'atteinte du rachis entraîne des douleurs exacerbées en fin de nuit et au réveil. Ces douleurs induisent une raideur matinale importante, nécessitant un déverrouillage qui peut nécessiter jusqu'à plusieurs heures. Cette inflammation de la colonne vertébrale peut, comme dans le cas de l'articulation sacro-iliaque, évoluer vers l'ankylose. Cette ankylose provoque une perte de mobilité et une gêne fonctionnelle importantes. Un des risques pour le patient est que l'ankylose consécutive à la formation d'os se développe dans une posture anormale du rachis (Figure 4).

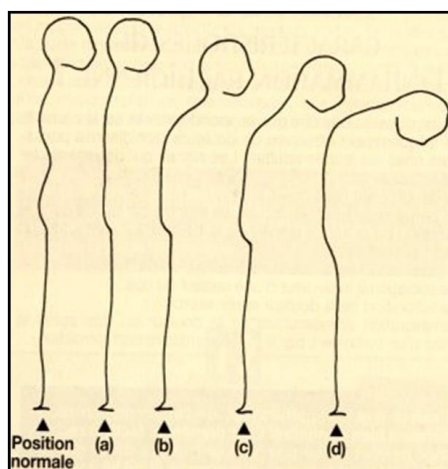


Figure 4 : Signes de l'ankylose de la colonne vertébrale.

Les atteintes les plus fréquemment observées sont : (a) perte de la cambrure des reins; (b) une position penchée en avant (appelée « cyphose dorsale »), (c) ankylose du cou qui empêche le malade de relever la tête; (d) position « vicieuse » avancée qui ne permet plus au patient de voir devant lui. (D'après « Spondylarthrite ankylosante en 100 questions » Edition 2005, Dougados M)

L'atteinte de la cage thoracique

La cage thoracique, contenant notamment le cœur et les poumons, est constituée de la colonne vertébrale dorsale, du sternum et des côtes qui réunissent ces deux éléments. Elle comprend donc de nombreuses articulations qui peuvent toutes être touchées au cours de la SpA. Les atteintes de la cage thoracique sont responsables de douleurs localisées, aggravées par la toux et les éternuements, pouvant être confondues avec les douleurs viscérales occasionnées par exemple par une atteinte cardiaque telle qu'un infarctus. De façon analogue aux autres atteintes axiales, l'inflammation des articulations de la cage thoracique peut évoluer vers l'ankylose osseuse au cours de la SpA, ce qui peut provoquer une restriction des capacités respiratoires aboutissant dans de rares cas à une insuffisance respiratoire.

Manifestation périphériques

A côté des atteintes du squelette axial que nous venons de décrire, les patients atteints de SpA peuvent également développer des atteintes des articulations périphériques, rapprochant la SpA d'autres rhumatismes inflammatoires chroniques comme la PR. Il existe cependant une caractéristique anatomique propre à la SpA : l'atteinte de l'enthèse, zone d'insertion des ligaments et des tendons dans l'os.

Les arthrites

Le développement d'arthrites périphériques au cours de la SpA affecte avec prédilection les grosses articulations des membres inférieures, telles que la hanche, le genou ou la cheville. Ces arthrites sont la conséquence d'une inflammation de la membrane synoviale entourant l'articulation, pouvant aboutir à la formation d'un « pannus synovial » en cas de persistance prolongée. Ces atteintes se caractérisent par tous les symptômes de l'inflammation : rougeur, douleur, raideur et gonflement lié à l'accumulation de liquide synovial dans l'articulation et à l'épaississement du tissu synovial. A la différence de la PR, la SpA n'affecte généralement que quelques articulations à la fois (oligoarthrite) avec une distribution asymétrique. Dans certains cas, l'arthrite peut évoluer de façon « agressive » : le cartilage et l'os sous-jacent étant progressivement dégradés, pouvant conduire à la destruction plus ou moins complète de l'articulation.

Les études histologiques d'arthrite chez des patients atteints de SpA montrent que l'articulation est le siège d'une infiltration par des cellules immunitaires, notamment des lymphocytes T (LT) et B (LB) et des macrophages exprimant le marqueur CD163. Ces

macrophages produisent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires en forte quantité (TNF- α , IL-1 β , IL-6) mais très peu de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 (Baeten et al., 2002; van Kuijk et al., 2006). Toutes ces cellules participent au développement d'un environnement inflammatoire qui peut conduire à la destruction de l'articulation. La douleur et la gêne fonctionnelle induites par ces arthrites peuvent être dues soit à l'inflammation elle-même soit à ses conséquences, telles que les attitudes vicieuses articulaires ou la destruction du cartilage.

Les dactylites

Dans certains cas, les arthrites peuvent concerner l'ensemble des articulations d'un même doigt ou orteil et s'accompagner d'une inflammation des gaines des tendons entourant les articulations ou ténosynovite. Le doigt ou orteil touché devient alors gonflé, douloureux et prend l'apparence d'une « petite saucisse » : il s'agit d'une dactylite, manifestation relativement spécifique de la SpA.

Les enthésites

L'enthésite correspond à une inflammation de l'enthèse, le site d'insertion des tendons, capsules et ligaments dans l'os. Au cours de la SpA, toutes les enthèses fibro-cartilagineuses sont susceptibles d'être touchées mais les plus fréquentes sont celles des membres inférieurs. La plus caractéristique se traduit par une talalgie (inflammation du talon ; Figure 5). L'enthésite se déroule généralement en trois phases : une phase initiale d'inflammation et d'érosion, une seconde phase de cicatrisation fibreuse et une phase tardive d'ossification qui peut s'étendre au ligament ou au tendon, produisant une excroissance osseuse, ou enthésophyte.

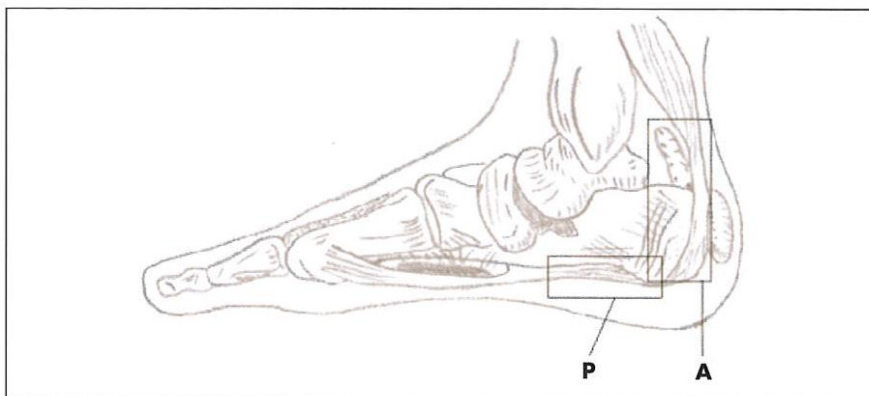


Figure 5 : Représentation schématique du pied.

Le tendon d'Achille (A) est en continuité de la toile fibreuse appelée aponévrose plantaire (P). Les bourses séreuses situées entre le tendon d'Achille et l'os évitent le frottement du tendon sur l'os. Les douleurs du talon peuvent être dues soit à l'inflammation de l'insertion du tendon d'Achille ou de l'aponévrose plantaire sur le calcaneum (enthésiopathie) soit à l'inflammation des bourses séreuses de voisinage (bursite). (D'après « La Spondylarthrite » 2004, Editions John Libbey Eurotext)

Manifestations extra-articulaires

Bien que la SpA se manifeste principalement par les atteintes axiales et périphériques du squelette que nous venons de décrire, elle peut également induire des atteintes extra-articulaires, témoignant du caractère systémique de cette pathologie. Les principales manifestations extra-articulaires observées au cours de la SpA sont :

_l'uvéite ou inflammation de l'œil. Il s'agit de la principale manifestation extra-articulaire liée à cette pathologie : le risque de développer une uvéite chez un patient atteint de SpA est d'environ 40%. L'uvéite se caractérise par un œil rouge et douloureux et une baisse de l'acuité visuelle. Lorsqu'elle est négligée, elle peut entraîner des lésions irréversibles, conduisant à une perte d'acuité visuelle.

_les MICI comme la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Les atteintes intestinales peuvent se révéler par des diarrhées, la présence de sang ou de glaires dans les selles et de violentes douleurs abdominales.

_le psoriasis, inflammation de la peau et/ou des ongles. Manifestation bien plus fréquente chez les patients atteints de SpA que dans la population générale.

B. Les différents sous-types de SpA

La spondylarthrite ankylosante (SA)

La SA est généralement considérée comme la forme emblématique des SpA et il s'agit de sa variante la plus sévère, se caractérisant par une prédominance des atteintes du squelette axial. Selon les critères de classification originaux ou modifiés de New-York (Tableau 1) (van der Linden et al., 1984a), la SA n'est retenue qu'en présence d'une sacroiliite certaine (atteinte caractéristique de l'articulation sacro-iliaque) observée sur la radiographie du bassin. L'atteinte rachidienne et les enthésites sont d'autres manifestations fréquentes au cours de la SA. L'évolution vers l'ankylose osseuse, qui en est la complication la plus sévère, est devenue rare, sans doute au moins en partie grâce à l'amélioration de la prise en charge des patients. Il est à noter que la SA touche préférentiellement les hommes, avec un sexe ratio Homme/Femme de 1,5-2 (Feldtkeller et al., 2003).

New-York 1966 (critères originaux)	New-York 1984 (critères modifiés)
<p><u>Critères cliniques :</u></p> <p>1) Limitation de la mobilité du rachis lombaire dans les 3 plans de l'espace.</p> <p>2) Douleur de la jonction dorso-lombaire ou du rachis lombaire.</p> <p>3) Limitation de l'expansion thoracique à 2,5 cm au moins, mesurée au niveau du 4ème espace intercostal.</p>	<p><u>Critères cliniques (au moins 1) :</u></p> <p>1) Lombalgie et raideur lombaire de plus de 3 mois améliorées par l'activité physique et non soulagées par le repos.</p> <p>2) Limitation de la mobilité du rachis lombaire dans le plan sagittal et frontal.</p> <p>3) Limitation de l'expansion thoracique par rapport aux valeurs de sujets de même âge et de même sexe.</p>
<p>Graduation radiographique: 0 aspect normal; 1 sacroiliite suspectée; 2 sacroiliite minime; 3 sacroiliite modérée; 4 ankylose)</p> <p><u>SA certaine :</u></p> <p>>Sacroiliite de grade 3-4 bilatérale avec au moins un critère clinique</p> <p>>Sacroiliite de grade 3-4 unilatérale ou de grade 2 bilatérale avec le premier critère clinique, ou avec les critères cliniques 2 et 3</p> <p><u>SA probable :</u></p> <p>Sacroiliite de grade 3-4 bilatérale sans critère clinique</p>	<p><u>Critères radiographiques :</u></p> <p>> Sacroiliite de grade 2 ou plus si sacroiliite bilatérale</p> <p>ou</p> <p>> Sacroiliite de grade 3 ou plus si sacroiliite unilatérale</p>

Tableau 1 : Critères de classification de New-York, originaux et modifiés, de la SA.

(van der Linden et al., 1984a)

Rhumatismes associés aux entéropathies inflammatoires (« arthrites associées aux MICI »)

Les MICI, comme la rectocolite hémorragique et la maladie de Crohn, s'accompagnent dans 20-30% des cas d'atteintes articulaires de type SpA telles qu'une spondylite, une sacroiliite ou une arthrite périphérique destructrice. A l'inverse, environ 7% des patients atteints de SA développent une entéropathie inflammatoire (De Vos et al., 1996) et une inflammation intestinale uniquement histologique (asymptomatique) a été décrite chez 50%

des patients dans certains travaux (Mielants et al., 1995). De plus, une corrélation positive entre la sévérité de l'atteinte sacro-iliaque et l'inflammation chronique intestinale a récemment été démontrée (Van Praet et al., 2014).

Les arthrites réactionnelles (Aré)

Les Aré (précédemment appelées syndrome de Fiessinger-Leroy-Reiter) sont le seul sous-type de SpA pour lequel le facteur de déclenchement est connu et représentent environ 2% des cas de SpA. Il s'agit d'une inflammation aseptique de l'articulation faisant suite à une infection intestinale ou uro-génitale survenue quelques semaines plus tôt. Cette infection est déclenchée soit par des entérobactéries (par exemple *Salmonella* ou *Shigella*) soit par des eubactéries (comme *Chlamydia*). Dans la plupart des cas, les Aré évoluent vers une rémission spontanée en plusieurs mois.

Le rhumatisme psoriasique (RhumPso)

Le RhumPso associe des atteintes cutanées de type psoriasique à des arthrites. Les atteintes cutanées concernent généralement les zones de frottement de la peau comme les coudes, les genoux, les ongles ou encore les paumes. La fréquence d'apparition du psoriasis chez les patients atteints de SpA est environ 5 fois plus élevée que dans la population générale (15 à 20% des patients atteints de SpA *versus* 3% dans la population générale). Les patients atteints de RhumPso ont des arthrites périphériques souvent asymétriques et destructrices. Il est à noter que l'apparition des atteintes cutanées précède généralement celle des atteintes ostéo-articulaires (Mease, 2011).

SpA à début juvénile

La SpA affecte principalement le jeune adulte, avec un âge moyen d'apparition de la maladie vers 25 ans. Cependant, elle peut débuter dans l'enfance, surtout chez les jeunes garçons entre 8 à 13 ans. Les atteintes prédominantes au cours de ces SpA à début juvénile sont les enthésites et dactylites. Ces SpA peuvent évoluer soit vers une SA soit vers une autre forme de SpA à l'âge adulte.

Les SpA indifférenciées

Il s'agit d'un sous-type fréquent de SpA, correspondant à un rhumatisme inflammatoire chronique répondant aux critères de classification de SpA mais ne correspondant à aucune des catégories précédemment décrites. Les SpA indifférenciées comprennent notamment des formes débutantes de la maladie, difficiles à diagnostiquer. L'évolution des formes

indifférenciées est variable, cependant 50% des patients développent une SA dans les 14 années suivant le diagnostic.

Concept unifié de SpA

Comme nous venons de le voir, les SpA ont été historiquement distinguées en 6 sous-types. Cependant, plusieurs éléments laissent penser que ces entités ne représentent que des manifestations cliniques différentes d'une même pathologie (Baeten et al., 2013a). Tout d'abord, il a été observé que plusieurs sous-types pouvaient coexister chez différents individus d'une même famille, ce qui suggère la présence de facteurs génétiques communs. L'exemple le plus frappant étant la très forte prévalence du HLA-B27 dans chacun des sous-types de SpA comme nous le verrons ultérieurement. D'autre part, les rats transgéniques pour le HLA-B27 et la β 2-microglobuline humaine (rats B27) développent simultanément plusieurs symptômes (arthrite, colite, psoriasis, spondylite) qui correspondent pourtant à des entités distinctes dans le cas de la SpA humaine. Enfin, aucune différence notable de réponse aux anti-TNF (traitement de seconde ligne des SpA) entre les différents sous-types de SpA n'a été démontrée.

Ainsi, même si la séparation entre sous-types historiques reste parfois utilisée, à l'heure actuelle, elle a tendance à être remplacée par une distinction entre formes axiales et périphériques, correspondant aux critères de classification les plus récents de l'ASAS. Il a par ailleurs été proposé par certains auteurs d'étendre le concept unifié de SpA à la maladie de Behçet et au psoriasis sous le terme de « *MHC-I-opathies* » (*pathologies liées au CMH de classe I*), du fait de leur forte association à certains allèles du CMH de classe I : HLA-B*27 pour les SpA, HLA-C*06 pour le psoriasis et HLA-B*51 pour la maladie de Behçet (McGonagle et al., 2015).

C. Les critères de classification des SpA

Comme nous l'avons vu précédemment, les symptômes cliniques des SpA sont très divers. Cette hétérogénéité phénotypique fait qu'il est parfois difficile de diagnostiquer avec certitude cette maladie. Le délai moyen entre l'apparition des premières manifestations de la pathologie et son diagnostic reste d'environ 8 ans (Hamilton et al., 2011). Afin de pouvoir harmoniser les patients inclus dans différentes études, plusieurs critères de classification ont été développés puis validés au cours des dernières décennies. Les critères de New-York (Tableau 1) permettent de classer les patients atteints de SA, mais d'autres critères sont utilisés pour les SpA au sens élargi. Du fait de leur spécificité insuffisante, ces critères ne sont pas fiables pour poser avec certitude le diagnostic de SpA. Toutefois, la probabilité qu'un patient

soit effectivement atteint de cette maladie se renforce avec le nombre de critères remplis (van Tubergen, 2015).

Les critères d'Amor

A la différence des critères de New-York (Tableau 1), les critères d'Amor permettent de définir un patient atteint de SpA même en absence d'atteinte radiologique de l'articulation sacro-iliaque. Ils permettent de regrouper l'ensemble des sous-types de SpA en incluant une majorité des manifestations caractéristiques de ce groupe de pathologies (Tableau 2). Un patient ayant 6 points ou plus est classé comme atteint de SpA selon ces critères.

Critère	Score
<u>Signes cliniques</u>	
Douleurs nocturnes dorsales ou lombaires <u>ou</u> raideur matinale dorsale ou lombaire	1
Oligoarthrite asymétrique	2
Douleur fessière (sans précision)	1
Douleur fessière à bascule	2
Doigt ou orteil en saucisse	2
Talalgie ou autre enthésopathie	2
Iritis (uvéite antérieure)	2
Urétrite non gonococcique ou cervicite moins d'un mois avant le début d'une arthrite	1
Diarrhée moins d'un mois avant une arthrite	1
Présence ou antécédent de psoriasis, ou de balanite (inflammation du gland), ou d'entéropathie chronique	2
<u>Signes radiologiques</u>	
Sacro-iliite (stade>2)	3
<u>Terrain génétique</u>	
présence de l'antigène HLA-B27 ou antécédents familiaux de spondylarthrite, de syndrome de Reiter, de psoriasis, d'entéropathie chronique	3
<u>Sensibilité au traitement</u>	
amélioration en 48 heures des douleurs par anti-inflammatoires non stéroïdiens ou rechute rapide (<48 heures) des douleurs à leur arrêt	3

Tableau 2 : Critères de classification d'Amor.

(Amor et al., 1990)

Les critères de l'European Spondyloarthritis Study Group (ESSG)

Alors que les critères d'Amor permettent de classer des patients atteints de SpA sans atteinte rhumatismale, les critères de l'ESSG n'ont que deux modes d'entrée : la présence d'une douleur rachidienne ou d'une arthrite périphérique (critères majeurs). Il faut également la présence d'un critère mineur pour remplir ces critères de classification (Tableau 3).

Critère majeur	Critère mineur
Synovites asymétriques ou prédominante aux membres inférieurs	Antécédents familiaux de SpA, psoriasis, uvéite, arthrite réactionnelle ou entérocolopathie
OU	Psoriasis
Douleurs lombaires, dorsales ou cervicales présentant 3 à 5 des critères suivants : -début avant 45 ans -début progressif -amélioration par l'exercice -raideur le matin -présentes depuis plus de 3 mois	Présence d'une entérocolopathie (Maladie de Crohn ou rectocolite hémorragique) Infection digestive ou génitale un mois avant l'apparition de l'arthrite Enthésopathie Douleur fessière à bascule Sacro-iliite radiologique

Tableau 3 : Critères de classification de l'ESSG.

(Dougados et al., 1991)

Les critères de l'Assesment of SpondyloArthritis Society (ASAS)

Les critères de l'ASAS se distinguent des autres critères précédemment décrits par l'introduction d'une distinction entre formes axiales et périphériques de SpA (Tableaux 4 et 5), s'écartant de la division historique des SpA en 6 sous-types, telle que décrite plus haut. D'autre part, ils intègrent comme l'un des critères essentiels la mise en évidence d'une inflammation de l'articulation sacro-iliaque à l'IRM alors que les précédents critères ne se basaient que sur la radiologie conventionnelle. Sachant que l'IRM peut détecter une sacro-iliite plusieurs années avant la radiographie, l'introduction d'une IRM positive parmi les critères ASAS devrait permettre de reconnaître des formes plus précoces de SpA que les précédents critères de classification.

Sacro-iliite + au moins 1 critère de SpA	<u>OU</u>	HLA-B27 ⁺ + au moins 2 critères de SpA
Critères de SpA :		
Lombalgie inflammatoire		Entérocolopathie
Arthrite		Réponse aux AINS
Enthésite		Antécédents familiaux de SpA
Uvéite		Positivité pour HLA-B27
Dactylite		Taux élevé de Protéine C réactive (CRP)
Psoriasis		
Sacro-iliite:		
Inflammation de l'articulation sacro-iliaque à l'IRM		
ou		
Sacro-iliite radiologique selon les critères modifiés de New-York		

Tableau 4 : Critères de classification de l'ASAS pour la SpA axiale.

(Rudwaleit et al., 2009)

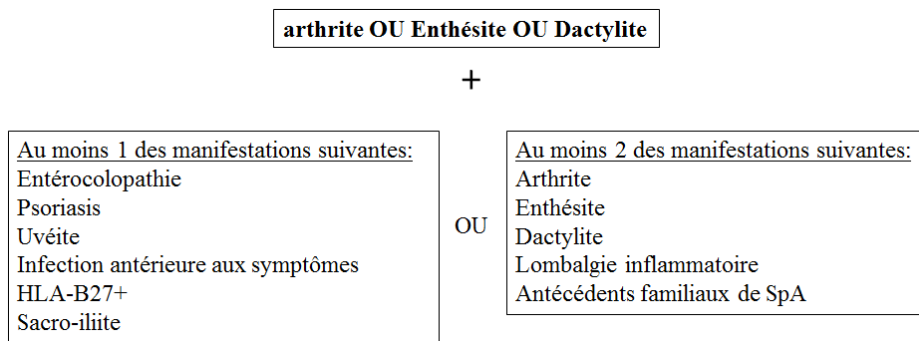


Tableau 5 : Critères de classification de l'ASAS pour la SpA périphérique.

Ces critères ne s'appliquent que si le patient ne répond pas déjà aux critères de SpA axiale (Rudwaleit et al., 2011).

D. Traitements

À ce jour, il n'existe aucun traitement curatif de SpA. Les traitements actuels sont symptomatiques, visant à réduire la douleur et la raideur articulaire et si possible prévenir les complications de cette pathologie telles que l'ankylose osseuse et les déformations. La prise en charge du patient comprend habituellement des traitements médicamenteux associés à une rééducation physique.

Les traitements prescrits en première intention aux patients atteints de SpA sont les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Leurs effets sur la douleur et la raideur se manifestent généralement dans les 48 à 72h qui suivent le début du traitement. Les différentes molécules disponibles ont une efficacité globalement comparable entre elles à l'échelle de l'ensemble des patients avec des variations individuelles. Peu d'études ont directement comparé l'efficacité des anti-inflammatoires entre eux sur la SpA. C'est toutefois le cas d'une étude qui a démontré la supériorité de l'etoricoxib sur le naproxène dans la SA (Wang et al., 2016a). Cependant, les AINS ne sont pas efficaces chez tous les patients et peuvent être responsable d'effets secondaires sévères, tels que des ulcères gastriques, surtout en cas de traitement continu. Dans ce cas, d'autres traitements sont à envisager.

Si le patient est atteint d'une SpA périphérique selon les critères de l'ASAS, il est possible de tenter en deuxième intention un traitement de fond « conventionnel », comme le méthotrexate ou la sulfasalazine, habituellement efficaces pour traiter la PR. Ces molécules ne sont toutefois pas recommandées dans le cas d'une SpA axiale en raison de leur absence d'efficacité sur ce type d'atteinte (Sieper and Poddubnyy, 2016). Des injections locales de glucocorticoïdes, ou infiltrations, peuvent également être envisagées pour traiter les arthrites ou enthésites périphériques.

En cas d'échec ou de mauvaise tolérance aux lignes de traitement ci-dessus, les traitements de recours sont les anti-tumor necrosis factor α (anti-TNF- α), qui bloquent le TNF α , médiateur pro-inflammatoire produit au cours de la SpA. L'arrivée de ces nouveaux agents thérapeutiques, tout d'abord développés pour traiter la PR et la maladie de Crohn, a apporté une amélioration considérable à la prise en charge de la SpA car ils réduisent de façon extrêmement significative la sévérité des symptômes chez la majorité des patients atteints de SpA, même réfractaires aux AINS (Sieper and Poddubnyy, 2016). Actuellement, 5 anti-TNF- α ont obtenu une autorisation de mise sur le marché dans le cadre de la SA, en tant que traitements de seconde ligne : l'infliximab, l'etanercept, l'adalimumab, le golimumab et le certolizumab-pegol. Comme tout traitement, ils peuvent cependant provoquer des effets secondaires. Les anti-TNF augmentent notamment les risques infectieux et en particulier celui de développer une maladie tuberculeuse pour les patients ayant fait une primo-infection dans le passé, souvent à leur insu. Leur effet préventif potentiel sur l'évolution des altérations structurales ostéo-articulaires reste discuté dans le cas de la SA. En effet, des premières études ont suggéré que les anti-TNF auraient peu d'effet sur le développement de l'ankylose osseuse, alors que des études récentes semblent démontrer un effet protecteur à long terme, en cas de début de traitement précoce (Zhang et al., 2016). Enfin, il faut souligner que le coût de ces traitements est particulièrement élevé : environ 13 000€ par an et par patient.

Tout récemment, une nouvelle biothérapie ayant une cible différente des anti-TNF- α a été admise sur le marché : il s'agit du secukinumab, un anticorps monoclonal qui cible l'IL-17A, autre cytokine pro-inflammatoire impliquée dans la SpA. Comme les anti-TNF, le secukinumab permet d'obtenir une réduction de la sévérité des symptômes chez la majorité des patients traités, et de façon particulièrement intéressante, également chez des patients n'ayant pas répondu à un premier anti-TNF (Baeten et al., 2015). D'autres biothérapies ciblant la voie IL-23/IL-17 sont en cours d'étude, comme l'ustekinumab (anticorps dirigé contre la sous-unité p40 commune à l'IL-23 et à l'IL-12).

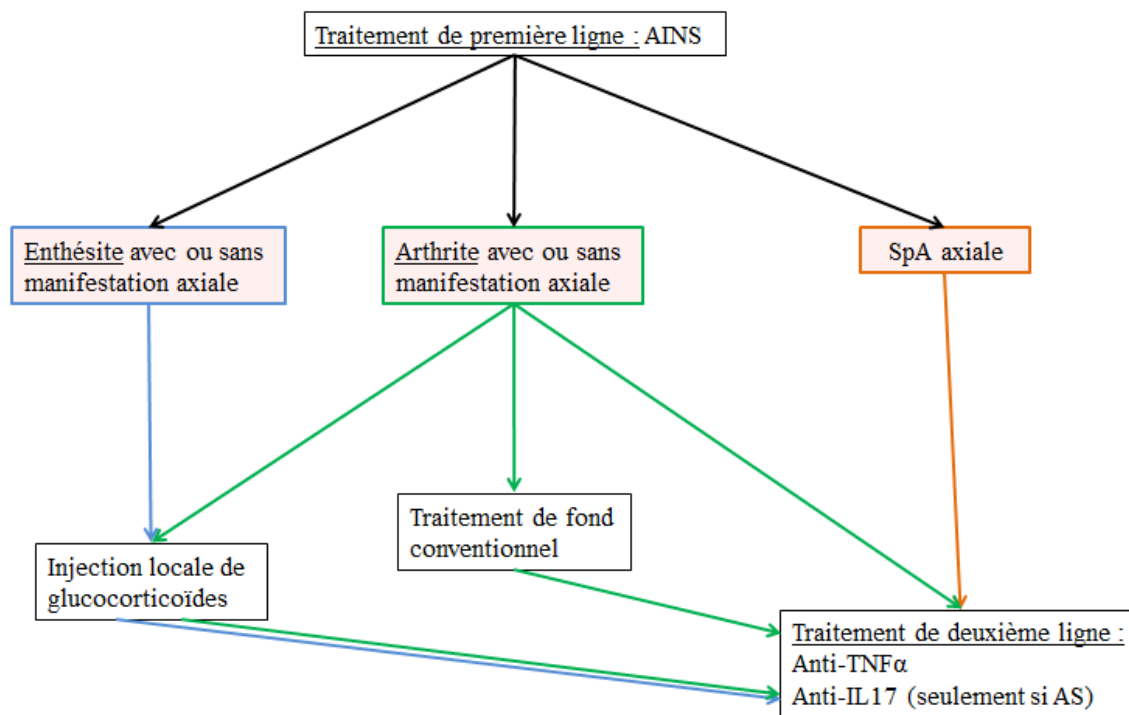


Figure 6: Stratégie thérapeutique pour la prise en charge des patients atteints de SpA.

En cas d'échec ou d'intolérance aux AINS, le traitement de seconde ligne est un anti-TNF. En cas de SpA périphérique, une injection de glucocorticoïde et/ou un traitement de fond conventionnel sont envisageables avant le recours à un anti-TNF. Le secukinumab (anti-IL-17) a été récemment approuvé pour le traitement de la SA en cas d'échec des AINS (Sieper and Poddubnyy, 2016).

En complément des traitements médicamenteux, il est généralement recommandé de prescrire au patient une rééducation physique supervisée par un kinésithérapeute. Ces exercices peuvent contribuer à réduire les douleurs articulaires et à améliorer la mobilité, une fois l'état inflammatoire réduit par les traitements médicamenteux.

Des opérations chirurgicales sont parfois à envisager, notamment en cas de destruction de l'articulation de la hanche (mise en place d'une prothèse) ou de déformation rachidienne majeure devant être corrigée (mais il s'agit d'interventions d'exception).

E. Interactions hôte-environnement

La SpA est une pathologie multifactorielle complexe dont le développement nécessite à la fois des facteurs environnementaux et génétiques. Bien que la compréhension de cette pathologie ait fortement progressé ces dernières années, l'étiologie précise de la SpA encore inconnue.

Facteurs génétiques

HLA-B27

La très forte association entre la SA et la molécule du CMH de classe I, HLA-B27, est connue depuis 1973 (Schlosstein et al., 1973). Depuis, d'autres études ont également démontré une forte association entre le HLA-B27 et les autres sous-types de SpA, comme les arthrites associées aux MICI (Morris et al., 1974) (Tableau 6).

Sous-types de SpA	Prévalence du HLA-B27
Spondylarthrite ankylosante (SA)	90%
Arthrite juvénile	76%
Arthrite réactionnelle	70%
Rhumatisme psoriasique	40-70%
Spondylarthrites associées aux MICI	50-60%

Tableau 6 : Prévalence du HLA-B27 dans les différents sous-types de SpA.

(Bowness, 2015; Reveille, 2011)

D'autres gènes du complexe majeur d'histocompatibilité ont été associés au risque de développer une SpA, comme HLA-B*60 ou HLA-B*52.

Du fait de cette très forte association, la molécule HLA-B27 a été particulièrement étudiée au cours des 40 dernières années. A l'heure actuelle, 156 variants alléliques du HLA-B27 ont été recensés (HLA-B*27:01 à HLA-B*27:156; <http://hla.alleles.org/alleles/class1.html>). L'association de ces différents allèles au risque de SpA n'a pu être étudiée que pour les premiers d'entre eux, qui sont les plus fréquents. Les allèles clairement associés au risque de SpA sont B*27:05, allèle dit « ancestral » (dont les autres allèles dérivent par mutation), B*27:02, B*27:04 et B*27:07. A l'inverse, les 2 allèles B*27:06 et B*27:09 ne sont pas ou moins associés à la SpA (Reveille, 2011).

La comparaison des séquences protéiques entre allèles HLA-B associés et non associés à la SpA a mis en évidence 4 acides aminés partagés entre les allèles associés qui paraissent donc les plus à même de rendre compte du risque de SpA : l'histidine en position 9 (His9), l'acide glutamique en position 45 (Glu45), la cystéine en position 67 (Cys67) et la lysine en position 70 (Lys70). Ces 4 résidus sont situés au voisinage de l'une des poches liant le peptide antigénique présenté par le HLA-B27 au lymphocyte T CD8⁺, la poche « B ». Si l'on tient également compte

de l'association entre SpA et HLA-B*14:03 (López-Larrea et al., 2002), seuls les acides aminés Glu45 et Cys67 sont conservés entre tous ces allèles.

D'autre part, si l'on compare les séquences des deux sous-types non associés (HLA-B*27:06 et HLA-B*27:09) aux sous-types associés, ils ont en commun un changement de l'acide aminé 116, mais qui est également présent dans l'allèle HLA-B*27:07, associé à la SpA (Tableau 7). Ces données indiquent qu'aucun acide aminé ne paraît à lui seul capable de conférer la susceptibilité à la SpA.

Allèle HLA-B	Résidu													
	9	11	45	59	67	70	77	80	81	113	114	116	131	156
<i>Associé à la SpA</i>														
B*2705	H	S	E	Y	C	K	D	T	L	Y	H	D	S	L
B*2702	-	-	-	-	-	-	N	I	A	-	-	-	-	-
B*2703	-	-	-	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B*2704	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-
B*2707	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H	N	Y	R	-
B*2708	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-
B*1403	Y	A	-	-	-	N	S	N	-	-	N	F	-	R
<i>Non-associé à la SpA</i>														
B*2706	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	D	Y	-	-
B*2709	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H	-	-

Tableau 7 : Comparaison des séquences protéiques de différents HLA-B selon leur association à la SpA.

La séquence du HLA-B*27:05 considéré comme l'allèle ancestral est prise comme référence. Seuls l'acide glutamique en position 45 et la cystéine en position 67 sont conservés entre les différents allèles associés à la SpA, mais se retrouvent également dans les deux sous-types non associés. A l'inverse HLA-B*27:06 et HLA-B*27:09 ont un acide aminé muté en position 116, mais la tyrosine 116 de B*27:06 est également présente chez B*27:07. Adapté de (Brebant et al., 2004).

Bien que l'association entre HLA-B27 et SpA soit connue depuis plusieurs décennies, le rôle de cette molécule du CMH dans le développement de la pathologie reste encore mal compris. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer l'induction de la SpA par HLA-B27. La plus ancienne est celle du « peptide arthritogène », car la principale fonction du HLA-B27 est de présenter des peptides dits endogènes (provenant de la dégradation des protéines intracellulaires) au récepteur des LT (TCR) CD8⁺ cytotoxiques.

Selon l'hypothèse du « peptide arthritogène », le HLA-B27 correctement replié serait capable de lier spécifiquement un ou plusieurs peptides dérivés du soi et induirait l'activation de LT CD8⁺ autoréactifs, préalablement activés par exemple par un pathogène bactérien, pour tenir compte de la situation des Aré. Ces LT CD8⁺ autoréactifs seraient alors les acteurs d'une réponse pro-inflammatoire responsable des symptômes articulaires observés au cours de la SpA (Benjamin and Parham, 1990). Une hypothèse complémentaire de celle du peptide arthritogénique est le « mimétisme moléculaire » qui stipule que ce sont des peptides dérivés de microorganismes bactériens qui sont à l'origine de l'activation initiale des LT CD8⁺. Ces

peptides étant très similaires à des peptides dérivés du soi, voire à des peptides dérivés du HLA-B27 lui-même, une réponse immune dirigée contre les cellules de l'hôte serait alors initiée, conduisant aux lésions tissulaires inflammatoires (Ramos et al., 2002).

Plus récemment, une hypothèse tentant d'unifier les pathologies inflammatoires ostéo-articulaires associées au CMH de classe I c'est à dire les SpA et la maladie de Behçet, a été avancée (McGonagle et al., 2015). D'après cette hypothèse, les symptômes de ces pathologies se développeraient à la suite d'une dysfonction des barrières épithéliales d'organes exposés à des microorganismes (tels que la peau et l'intestin) et/ou de microlésions de sites exposés au stress mécanique (par exemple les enthèses ou l'œil). Ces deux types de stress (microbien et mécanique) pourraient induire une réponse innée aberrante et contribuer à recruter des cellules de l'immunité innée activées ainsi que les LT CD8⁺ par l'intermédiaire des cellules dendritiques (DC). Ces LT CD8⁺ produiraient des médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL-17, le TNF- α et l'IL-8 qui seraient à l'origine d'une inflammation pathogène, principalement par l'intermédiaire des neutrophiles activés.

Les hypothèses mettant en avant l'importance des LT CD8⁺ ont été renforcées par la mise en évidence du rôle significatif joué par des polymorphismes d'*ERAP1* dans la prédisposition aux SpA (Cortes et al., 2015; Costantino et al., 2015b), comme nous le verrons dans le prochain point de cette partie. Il faut cependant souligner qu'aucun peptide arthritogène n'a encore été clairement établi dans le cadre des SpA, ce qui ne permet pas de valider ces théories (Bowness, 2015). De plus, et comme nous le verrons en détail dans le chapitre traitant des modèles animaux, des données démontrent clairement que les LT CD8⁺ ne sont pas impliqués dans le développement de la pathologie chez le rat B27 (May et al., 2003).

De nouvelles hypothèses ne faisant pas appel à la présentation de peptides particuliers par le HLA-B27 aux LT CD8⁺ ont été avancées plus récemment pour tenter d'expliquer son implication dans la SpA. L'étude approfondie du HLA-B27 a révélé plusieurs propriétés biochimiques particulières à cet allèle. Tout d'abord, cette protéine présente une certaine lenteur de repliement lors de sa synthèse dans réticulum endoplasmique (RE), ce qui conduit à l'accumulation de formes mal repliées, dépourvues de β 2-microglobuline (chaîne protéique invariante dite légère se fixant de manière non covalente à la chaîne lourde du CMH de classe I, indispensable à sa stabilité) et de peptide antigénique.

Une telle accumulation pourrait induire un processus d'adaptation de la cellule appelé ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation) qui permette d'éliminer les formes mal repliées en les expulsant du RE et en les adressant au protéasome. Cependant, il se peut que le mécanisme d'ERAD soit dépassé par l'accumulation de formes mal repliées du HLA-B27, ce qui induirait un stress cellulaire et déclencherait une UPR (*Unfolded Protein Response*). Il a par

ailleurs été démontré que l'UPR était capable d'induire la synthèse d'interleukine 23 (IL-23) (DeLay et al., 2009). Cette cytokine est très importante dans le développement des LT helper CD4⁺ producteurs d'interleukine 17 (lymphocytes Th₁₇) (McGeachy et al., 2009) pathogéniques dans la SpA.

Une autre caractéristique biochimique du HLA-B27 est sa capacité à former des dimères de chaîne lourde par la formation des ponts disulfure grâce à une Cys67 libre. De tels dimères dépourvus de β2-microglobuline, tout comme les formes mal repliées du RE, ont été mis en évidence à la surface de la cellule. Ces homodimères de B27 (B27₂) sont capables d'interagir avec des récepteurs exprimés à la surface des LT ou des cellules Natural-Killer (cellules NK). Ces récepteurs incluent les « killer immunoglobulin receptors » KIR3DL1 et KIR3DL2 chez l'Homme (Kollnberger et al., 2002) et les « paired immunoglobulin receptors » PIR chez les rongeurs (Kollnberger et al., 2004). Cette interaction entre B27₂ et KIR3DL2 peut avoir des effets pro-inflammatoires, notamment en induisant l'expansion des Th₁₇ (Bowness et al., 2011).

Autres facteurs génétiques

Plusieurs arguments vont dans le sens d'un rôle important de facteurs génétiques autres que le HLA-B27 dans la susceptibilité aux SpA. Bien que la prévalence du HLA-B27 soit extrêmement élevée dans les différents sous-types de SpA, certains patients atteints ne sont pas porteurs du HLA-B27. D'autre part, moins de 10% des personnes porteuses du HLA-B27 vont développer une SpA au cours de leur vie (Costantino et al., 2015c; Reveille, 2011). De plus, le risque de développer une SpA chez les individus apparentés au premier degré est 40 fois plus élevé que pour un individu non apparenté, avec une importance génétique équivalente des gènes situés dans et hors de la région du CMH (Dernis et al., 2009). Ce risque pour une personne HLA-B27⁺ apparentée au premier degré à une personne atteinte de SpA est 16 fois plus élevé que pour un individu HLA-B27⁺ non apparenté (van der Linden et al., 1984b). Un dernier argument est l'analyse de la concordance pour la survenue de la SpA chez les jumeaux monozygotes et dizygotes. Il a été démontré que le taux de concordance chez les jumeaux monozygotes était supérieur à celui observé chez les jumeaux dizygotes même si l'on ne considère que les jumeaux HLA-B27⁺ (Brown et al., 1997). Toutes ces données ont incité la communauté scientifique à chercher d'autres facteurs génétiques associés à la SpA.

La découverte de nouvelles associations génétiques dans la SpA a fait un bon considérable depuis le début des années 2000 notamment grâce aux études d'association pangénomiques ou GWAS (pour *Genome-Wide Association Study*). Le premier GWAS effectué dans le cadre de la SA a été publié en 2007 (Wellcome Trust Case Control Consortium et al., 2007). Il a permis de mettre en évidence deux gènes contenant des polymorphismes associés à la SpA :

ERAP1 et *IL23R*. A l'heure actuelle, on dénombre plus de 30 gènes significativement associés (Brown et al., 2016), ce qui a permis d'émettre de nouvelles hypothèses concernant la physiopathologie des SpA.

Les aminopeptidases

Trois aminopeptidases sont associées au risque de SpA : *ERAP1*, *ERAP2* et *NPEPPS* (aussi dénommée *PSA*). *ERAP1* fut l'un des premiers gènes situés en dehors du MHC à être associé à la SpA et son association à la SpA est maintenant bien établie (Kadi et al., 2013a). Bien qu'à l'origine l'association entre *ERAP1* et la SpA semblait restreinte aux patients porteurs du HLA-B27, une étude récente a montré que cette association concernait également les patients HLA-B27 négatifs (Cortes et al., 2015). *ERAP1* est une protéine du RE impliquée dans le clivage des peptides qui sont présentés par le CMH de classe I. *ERAP1* présente également une fonction de clivage de certains récepteurs de cytokines pro-inflammatoires (telles que le TNF, l'IL-1 et l'IL-6) modifiant ainsi la réponse inflammatoire médiée par ces cytokines. Il semble cependant que cette fonction de « sheddase » d'*ERAP1* ne soit pas impliquée directement dans le développement de la SpA car différents polymorphismes d'*ERAP1* ne modifient pas significativement les concentrations de TNFR1, IL1-R2 et IL-6R dans la sérum des patients atteints de SA (Haroon et al., 2010).

À l'inverse, des variants d'*ERAP1* protecteurs vis-à-vis de la SA exercent une activité de clivage des peptides réduite (Evans et al., 2011). Notre laboratoire a récemment démontré que l'haplotype résultant de la combinaison de 3 polymorphismes situés dans *ERAP1* influençait à la fois l'expression et l'activité enzymatique de cette molécule. De manière intéressante, l'haplotype associé à une susceptibilité accrue à la SpA induisait une plus forte expression d'*ERAP1* dans les DC dérivées de monocytes *in vitro*. L'haplotype protecteur était quant à lui associé à une expression et une activité plus faibles d'*ERAP1* (Costantino et al., 2015b). Un autre impact de ces différents variants d'*ERAP1* est la modification du « peptidome » présenté par HLA-B27, alimentant ainsi l'hypothèse d'un rôle possible de « peptide(s) arthritogène(s) » dans le déclenchement de la SpA, bien que de tels peptides restent à identifier.

L'axe IL-23/Th17

Le second gène associé à la SA découvert dans le GWAS de 2007 est *IL23R*, qui code pour la sous-unité spécifique du récepteur à l'interleukine 23, l'autre sous-unité étant commune au récepteur de l'IL-12. Il avait été précédemment montré que le gène *IL23R* était associé au psoriasis (Cargill et al., 2007) et aux MICI (Duerr et al., 2006), pathologies fréquemment associées aux SpA. Cette association entre *IL23R* et SA, comme celle entre *ERAP1*

et SpA, a depuis été répliquée dans plusieurs études (Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC) et al., 2010; Evans et al., 2011; International Genetics of Ankylosing Spondylitis Consortium (IGAS) et al., 2013). Une analyse récente a cependant montré que l'association entre *IL23R* et SpA est surtout restreinte à la SA (Kadi et al., 2013b), à la différence d'*ERAP1* qui est associé à la SpA dans sa globalité (Kadi et al., 2013a).

L'interleukine 23 est une des cytokines clé de la différenciation des LT CD4⁺ naïfs en LT effecteurs producteurs d'IL-17 (Th₁₇). Ces lymphocytes Th₁₇ sont spécialisées dans la réponse dirigée contre des pathogènes extracellulaires (notamment dans le tube digestif) mais sont également mis en cause dans plusieurs pathologies auto-immunes telles la PR, les MICI ou encore le psoriasis.

Il a été montré que les polymorphismes d'*IL23R* ont des conséquences fonctionnelles, notamment sur les sous-populations de LT CD4⁺ Th₁ et Th₁₇. Le polymorphisme rare protecteur vis-à-vis du risque de SA, rs11209026 (codant pour une glutamine en position 381 au lieu d'une arginine : R381Q) induit une baisse de la signalisation associée à IL23R dans les Th₁₇, ce qui provoque une baisse de la production d'IL-17, pro-inflammatoire et pathogénique dans la SpA (Di Meglio et al., 2011).

Au-delà de cette association entre *IL23R* et SA, de nombreux autres arguments sont venus renforcer l'idée d'un rôle prépondérant de l'axe IL-23/Th₁₇ dans la physiopathologie des SpA. Plusieurs études génétiques ont démontré l'association de polymorphismes situés dans d'autres gènes de cet axe :

- IL12B* (qui code pour la sous-unité p40 commune à l'IL-23 et l'IL-12),
- IL6R* et *IL1R2* (codant respectivement pour des récepteurs impliqués dans la signalisation de l'IL-6 et de l'IL-1, deux cytokines pro-inflammatoires favorisant la différenciation des LT CD4⁺ naïfs en Th₁₇),
- IL27* (codant pour la sous-unité p28 de l'IL-27, cytokine qui inhibe la différenciation Th₁₇),
- ICOSL* (codant pour la protéine *Inducible COStimulator-Ligand*, molécule de costimulation favorisant la réponse Th₁₇),
- Tyk2* et *STAT3* (codant pour des molécules impliquées dans la transmission de la signalisation des récepteurs de l'IL-23 et de l'IL-6),
- CARD9* (codant pour une molécule impliquée dans la signalisation de la dectine-1, récepteur membranaire au β-glucan d'origine microbienne, pouvant induire la production d'IL-6, d'IL-1 et d'IL-23 par les cellules présentatrices d'antigène),
- PTGER4* (codant pour un récepteur de prostaglandine induisant la synthèse d'IL-23).

En plus de ces données génétiques, les études conduites dans différents modèles animaux sont venues renforcer l'idée d'une activation de la voie IL-23/Th₁₇ dans le développement de la SpA comme nous le verrons en détail dans le chapitre suivant. Tout d'abord, il existe une expansion spectaculaire du nombre de lymphocytes Th₁₇ chez le rat B27, cette expansion étant favorisée par la DC (Glatigny et al., 2012). Une autre étude a montré que l'IL-23 était capable de stimuler localement des LT CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻ situés dans l'enthèse et d'aboutir à une inflammation articulaire destructrice (Sherlock et al., 2012). D'autre part, le phénotype développé par la souris SKG traitée par du curdlan ressemble beaucoup à la SpA humaine et est dépendant de l'IL-23 (Ruutu et al., 2012).

Enfin, plusieurs observations cliniques viennent également étayer cette hypothèse. Les concentrations sériques d'IL-23 et d'IL-17 sont plus élevées chez les patients atteints de SpA que chez des témoins (Mei et al., 2011; Wang et al., 2009). Il a été mis en évidence une augmentation du nombre de lymphocytes Th₁₇ circulants dans le sang de patients atteints de SpA (Shen et al., 2009, 2010). Une surexpression de l'IL-23 a été décrite dans l'iléon (Ciccia et al., 2009) et les articulations (Appel et al., 2013) de patients atteints de SA. Il est intéressant de noter que la production d'IL-17 dans ce contexte pathologique ne semble pas seulement assurée par les Th₁₇, mais également dépendre de cellules de l'immunité innée comme les lymphocytes NK ou les LT γ/δ (Al-Mossawi et al., 2013).

Le dernier argument d'importance est l'efficacité prouvée des traitements anti-IL-17 dans la prise en charge de la SpA (Figure 6), confirmant le rôle majeur de l'axe IL-23/Th₁₇ dans l'induction de cette maladie.

Facteurs environnementaux

Comme nous l'avons précédemment vu, les microorganismes bactériens infectant le tractus uro-génital ou digestif sont parfois responsables du développement d'un tableau Aré, sous-type de SpA qui ne représente toutefois que 2% de l'ensemble de ces pathologies. Cependant, l'implication du microbiote dans le développement des SpA a été mise en évidence par les observations faites dans le modèle du rat B27. En effet, chez ces rats qui développent spontanément un phénotype très proche des SpA humaines, l'absence de microbiote intestinal prévient l'apparition de la colite et des arthrites (Taurog et al., 1994). De manière intéressante, la reconstitution d'une flore intestinale (contenant notamment des bactéries du genre *Bacteroides*) suffit à provoquer la survenue de la colite et des arthrites chez ces rats (Rath et al., 1996) et les rats B27 présentent un microbiote différent des rats témoins (Lin et al., 2014). Il faut cependant noter que toutes les espèces bactériennes n'ont pas la même capacité à induire le développement des symptômes au cours de ce modèle. Plus récemment, une altération du

microbiote associé à la muqueuse iléale, ou dysbiose, a également été décrite chez les patients atteints de SpA (Costello et al., 2014). Les conséquences possibles d'altérations du microbiote sur la réponse immunitaire sont nombreuses (Ciccia et al., 2016) mais il reste toutefois à préciser s'il s'agit d'une cause ou d'une conséquence de l'inflammation articulaire observée chez les patients.

Partant de l'observation que les articulations les plus touchées au cours des SpA sont les grosses articulations portantes des membres inférieurs, il a été émis l'hypothèse que le stress mécanique serait l'un des facteurs à prendre en compte parmi les mécanismes de cette maladie (Jacques and McGonagle, 2014). En faveur de cette interprétation, des souris surexprimant le TNF (souris TNF^{ΔARE}) développent spontanément des enthésites et des atteintes intestinales proches des symptômes observés au cours des SpA. Cependant, leur suspension par la queue, de façon à supprimer la contrainte mécanique du poids, pendant 14 jours permet d'inhiber presque totalement l'apparition des enthésites (Jacques et al., 2014).

D'autres facteurs environnementaux tels que le tabac ont été associés à une moins bonne réponse aux anti-TNF (Glintborg et al., 2016), ainsi qu'à une activité plus élevée de la pathologie (Chung et al., 2012). Une étude parue en 2013 a de plus démontré sur le stress influençait l'activité de la SpA (Zeboulon-Ktorza et al., 2013). Des données récentes suggèrent par ailleurs que la prise excessive d'alcool augmenterait le risque de développer un rhumatisme psoriasique (Wu et al., 2015a).

Chapitre 2 : Les modèles animaux de SpA

A. Rats B27

Les modèles animaux ont largement contribué à la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans les maladies humaines et, dans le cas de la SpA, ce sont les rats transgéniques pour le HLA-B27 et la β 2-microglobuline (β 2m) humaine qui ont permis les premières avancées dans ce domaine.

C'est en 1990 que l'équipe de Joel Taurog publia ses travaux sur la production de rats transgéniques pour ces deux protéines et, de manière remarquable, ces rats développèrent spontanément un ensemble de symptômes très proche de ceux observés chez les patients atteints de SpA, avec toutefois des différences selon la lignée de rat étudiée et le nombre de copies des transgènes intégrées (Tableau 8) (Hammer et al., 1990). Il existe également certaines différences entre la SpA des rats B27 et la maladie humaine, ce qui suggère que les voies dérégulées chez le rat B27 ne sont pas forcément strictement identiques à celles impliquées chez l'Homme (Vieira-Sousa et al., 2015).

Lignée	Transgène	Fond génétique	Nombre de copies HLA-B	Nombre de copies β 2m	Développement de la maladie
33-3 (Hémi)	HLA-B27 / β 2m	F344	55	28	oui
21-4H (Hémi)	HLA-B27 / β 2m	Lewis	150	90	oui
21-4L (Hémi)	HLA-B27 / β 2m	Lewis	12	12	non
21-3 (Hémi)	HLA-B27 / β 2m	Lewis	20	15	non
21-3 (Homo)	HLA-B27 / β 2m	Lewis	40	30	oui
[21-3x283-2]F1 (Hémi)	HLA-B27 / β 2m	Lewis	20	50	oui
F344 120-4 (Hémi)	HLA-B7 / β 2m	F344	52	26	non
120-4 (Hémi)	HLA-B7 / β 2m	Lewis	52	10	non
DA 33-3 (Hémi)	HLA-B27 / β 2m	Dark Agouti	55	28	non

Tableau 8 : Principales lignées de rats transgéniques étudiées dans le cadre de la SpA.

« Hémi » : hémizygote ; « Homo » : homozygote.

Nous pouvons observer que la susceptibilité à la pathologie est positivement corrélée au nombre de copies du HLA-B27 et de la β 2m humaine intégrées. Ainsi, les lignées ayant un faible nombre de copies du HLA-B27 ne développent pas la pathologie (21-4L et 21-3 hémizygote), de même que celles ayant peu de copies de β 2m humaine (lignée 21-3 hémizygote comparée au croisement [21-3 x 283-2]. Il a été montré que le nombre de copies

du transgène HLA était corrélé à l'intensité d'expression des ARN et de la protéine (Taurog et al., 1993) mais il est important de noter que les rats Dark Agouti 33-3, résistants au développement de la SpA induite par le transgène HLA-B27, possèdent des quantités d'ARNm HLA-B27 similaires aux rats 33-3 F344 (Taurog et al., 1999). D'autre part, le développement de la SpA du rat est spécifique du transgène HLA-B27 car les rats ayant intégré un grand nombre de copies du HLA-B7, molécule ayant une séquence protéique proche du HLA-B27, ne développent aucun symptôme. Enfin, les rats possédant le fond génétique Dark Agouti, résistants au développement de la SpA, montrent l'importance d'autres facteurs génétiques dans le développement de cette pathologie, à l'image des observations faites chez l'Homme.

Il existe deux phénotypes de SpA chez le rat. Le premier à avoir été décrit est celui des lignées 21-4H, sur fond Lewis, et 33-3, sur fond F344, qui ont la plus forte expression de HLA-B27. Ces rats développent spontanément à partir de 6-10 semaines d'âge une inflammation intestinale chronique avec une prévalence de 100%. Cette inflammation intestinale est responsable d'une diarrhée chronique pouvant devenir hémorragique dans les cas les plus sévères. Au niveau histologique, l'inflammation se caractérise par un infiltrat diffus de cellules inflammatoires dans la lamina propria, pouvant également s'étendre à la sous-muqueuse, combiné à une hyperplasie des cellules épithéliales et à une raréfaction des cellules à mucus. L'inflammation débute au niveau du colon et du cæcum mais peut s'étendre à l'intestin grêle.

Quelques semaines plus tard apparaissent de façon moins constante des arthrites, touchant principalement les pattes postérieures. L'inflammation des articulations se caractérise par une infiltration de la membrane synoviale par des cellules immunitaires qui peut s'étendre jusqu'à l'attache des ligaments et tendons (enthésite). Des érosions de l'os sous-jacent et une néoformation osseuse peuvent être détectées au sein d'une même articulation. De façon intéressante, les rats mâles présentent une orchite (inflammation des testicules) les rendant stériles. À partir de 20 semaines, l'apparition d'une alopecie (perte de poils), d'une hyperkératose de la queue et une dystrophie des ongles est possible, ces atteintes étant histologiquement proches de celles observées au cours du psoriasis. Ainsi le phénotype de ces deux lignées se rapproche de la SpA associée aux MICI chez l'Homme, avec pour différence notable la présence systématique d'une orchite chez les mâles, symptôme rarement décrit chez l'Homme au cours de cette maladie. De plus, la prévalence de l'inflammation intestinale, qui est de 100% chez ces rats, est bien plus élevée qu'au cours de la SpA humaine, mais il s'agit d'un modèle génétiquement homogène puisque le fond génétique des rats est identique au sein d'une même lignée.

Le deuxième phénotype de SpA décrit chez le rat transgénique pour le HLA-B27 a été observé en croisant la lignée 21-3 dont le développement est normal à l'état hémizygote, car

possédant un nombre relativement faible de copies des transgènes HLA-B27 et $\beta 2m$ humaine, avec la lignée 283-2 uniquement transgénique pour la $\beta 2m$ humaine (Tableau 8). L'objectif initial de ce croisement était de tester le rôle pathogène du stress du RE et de la réponse UPR induits par une accumulation de formes mal repliées du HLA-B27 telle qu'observée dans les macrophages dérivés de cellules de la moelle osseuse chez les rats B27 de la lignée 33-3 (Turner et al., 2005). Les auteurs ont d'abord croisé la lignée 33-3 avec la lignée 283-2, supposant qu'une augmentation du nombre de copies de $\beta 2m$ humaine faciliterait le repliement des molécules HLA-B27, en réduirait l'accumulation de formes mal repliées, et inhiberait le développement de la SpA. Si l'effet protecteur sur l'accumulation de formes mal repliées et l'UPR qui en découle a bien été observé, le résultat a été à l'inverse de celui escompté sur la pathologie, avec davantage d'arthrites chez les rats résultant de ce croisement. Les auteurs ont donc ensuite produit les rats [21-3x283-2]F1 et ont observé chez les mâles issus de ce croisement une forte prévalence d'arthrites se manifestant à partir de 4-6 mois d'âge et de spondylites plus tardivement (vers 7-9 mois) (Tran et al., 2006). Aucun rat, mâle ou femelle, n'a développé de diarrhée ni d'inflammation intestinale mais tous les mâles avaient une orchite. De façon remarquable, l'orchidectomie (ablation des testicules) effectuée avant l'apparition des symptômes suffit à prévenir l'apparition des arthrites et de la spondylite (Taurog et al., 2012), suggérant fortement que ces 3 manifestations inflammatoires sont liées dans ce modèle.

Le phénotype de la lignée [21-3x283-2]F1 est donc à rapprocher de la SA humaine, contrairement au premier phénotype de SpA du rat que nous avons décrit où l'atteinte intestinale est prédominante. La lignée [21-3x283-2]F1 présente deux particularités notables, qui sont l'apparition de la pathologie uniquement chez les mâles et l'importance de l'orchite dans le développement des symptômes. Il est à noter qu'une version « accélérée » de ce modèle a été proposée. En effet, l'injection d'une forme inactivée de *Mycobacterium tuberculosis* chez les rats [21-3x283-2]F1 a été suivie d'une forte de la prévalence d'arthrites et de spondylite, aussi bien chez les mâles que les femelles. Les doses de *Mycobacterium tuberculosis* utilisées étaient inférieures à celles nécessaires pour induire l'arthrite à adjuvant. Cette version du modèle peut être considérée comme une forme exacerbée d'arthrite à adjuvant du fait du transgène HLA-B27 (Vieira-Sousa et al., 2015).

B. Modèles chez la souris

En parallèle de ces lignées de rats transgéniques, plusieurs lignées de souris sont également à la disposition de la communauté pour l'étude de la physiopathologie de la SpA,

bien que ces modèles soient plus éloignés de la SpA humaine que les rats B27 que nous venons de décrire.

Souris transgéniques pour le HLA-B27 et déficientes en β 2m murine

L'introduction du transgène HLA-B27 chez des souris n'exprimant pas de β 2-microglobuline endogène est associée au développement d'arthrites, principalement des pattes postérieures chez des mâles élevés en animalerie conventionnelle (Khare et al., 1995). Ces arthrites peuvent parfois évoluer vers l'ankylose de l'articulation, et des atteintes cutanées ont également été décrites. Il est à noter que les souris ne développent aucune atteinte intestinale et ne présentent aucune expression du HLA-B27 à la surface cellulaire en absence de stimulation. Il a d'ailleurs été suggéré que ces atteintes seraient principalement à relier à l'absence de β 2-microglobuline plutôt qu'à la surexpression du HLA-B27, car les souris uniquement déficientes pour la β 2-microglobuline développent également des arthrites, et l'incidence de ces symptômes ne semble pas augmentée en présence du HLA-B27 (Kingsbury et al., 2000). Ce modèle ne permet donc pas d'étudier le rôle spécifique du HLA-B27 dans l'induction de la pathologie.

La souris ANKENT

L'acronyme de cette lignée de souris, de fond génétique C57BL/10, indique qu'elle développe spontanément une enthésite ankylosante (ANKENT = ANKylosing ENThesopathy) (Weinreich et al., 1995), dont la fréquence est augmentée en présence du HLA-B27. L'enthésite apparaît tardivement, généralement à partir de 3 mois d'âge et ne touche presque exclusivement que les mâles. Il peut s'écouler plusieurs semaines avant que la deuxième patte postérieure soit touchée. Une inflammation destructrice couplée à une ossification progressive des enthèses a été décrite. La faible prévalence des arthrites et l'absence d'atteinte extra-articulaire ont fait que ce modèle est peu utilisé dans l'étude de la SpA.

Modèles impliquant l'IL-23

La découverte de l'association entre le gène *IL23R* et la SA en 2007 a ouvert un nouveau champ de recherche visant à découvrir de nouvelles voies impliquées dans le développement des SpA.

Une étude majeure publiée en 2012 démontra que l'injection d'ADN codant pour l'IL-23 induisait chez des souris adultes, dès le 5ème jour, un gonflement des pattes et une inflammation des enthèses couplée à une ostéo-formation (Sherlock et al., 2012). Environ 2 semaines plus tard, les modifications des articulations combinaient une érosion de l'os sous-

chondral à une ostéo-formation. La principale découverte de cette étude a été de révéler l'existence d'une population particulière de lymphocytes T sensibles à l'IL-23 et présentes au niveau des enthèses. Ces cellules expriment le CD3 et le facteur de transcription ROR- γ t (*RAR-related Orphan Receptor γ t*) mais sont négatives pour le CD4 et le CD8. Autre donnée particulièrement intéressante, ces cellules ont également été observées dans la valve aortique et les souris ayant reçu l'ADN codant pour IL-23 ont développé une inflammation de cette valve, manifestation que nous pouvons rapprocher de l'atteinte cardiaque parfois décrite chez des patients atteints de SpA. Ces mêmes souris produisant l'IL-23 développent par ailleurs des atteintes cutanées proches de lésions psoriasiques et une sacroiliite, autant de manifestations habituelles des SpA. Les auteurs ont démontré que l'IL-23 induisait une production d'IL-17 et d'IL-22 par les lymphocytes T présents dans l'enthèse et que l'inhibition conjointe de ces deux interleukines inhibait significativement les lésions articulaires induites par l'IL-23.

Cependant, une étude publiée par la même équipe un an auparavant à partir du même modèle expérimental avait rapporté un phénotype différent. En effet, les souris ayant reçu l'ADN codant pour l'IL-23 développaient une arthrite destructrice des pattes antérieures et postérieures (hyperplasie de la membrane synoviale et infiltration massive de cellules immunitaires) 30 jours après l'injection d'ADN. La formation de ces arthrites était corrélée à une production de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-17, IL-22, GM-CSF, IFN- γ) et est en partie dépendante de l'IL-17, du TNF et des LT CD4⁺ producteurs d'IL-17. Les auteurs n'avaient pas décrit dans ce premier travail d'altération des enthèses ou d'atteinte extra-articulaire (Adamopoulos et al., 2011). L'explication donnée en est que les anomalies des enthèses ne sont individualisables que précocement puis sont ensuite masquées par l'intense réaction inflammatoire combinant destruction articulaire et ostéo-formation.

Un autre modèle a permis de mettre en lumière l'importance de l'IL-23, il s'agit de celui de la souris SKG traitée avec du curdlan. Cette souris produite par Shimon Sakaguchi possède une mutation de la protéine adaptatrice ZAP70, ce qui altère fortement la signalisation induite par le TCR (Sakaguchi et al., 2003). En conditions d'élevage conventionnelles, elle développe des arthrites destructrices et présente des concentrations élevées d'autoanticorps (facteur rhumatoïde et anticorps dirigés contre le collagène de type II notamment), ce qui l'a fait considérer comme modèle de la PR. Un fait intéressant est que l'élevage de ces souris SKG dans un environnement dépourvu de microorganismes pathogènes (environnement SPF, *Specific Pathogen Free*) prévient l'apparition des symptômes (Ruutu et al., 2012).

L'injection intra-péritonéale de curdlan, un β -glucan d'origine fongique, chez la souris SKG élevée en milieu SPF induit un phénotype différent. En effet, les symptômes développés ne

sont plus à rapprocher de la PR mais des SpA, cette fois. Les souris traitées développent à partir d'une semaine après l'injection de curdlan des arthrites destructrices des pattes antérieures et postérieures, des dactylites, une spondylite (destruction osseuse et ossification typiques des SpA) ainsi qu'une inflammation intestinale, rappelant la maladie de Crohn, asymptomatique (absence de colite) et parfois une uvéite. Il est à noter que le premier site touché dans l'articulation est l'enthèse, puis l'inflammation s'étend progressivement à l'os adjacent.

L'analyse des voies de réponse immunitaire impliquées dans le modèle de la souris SKG traitée au curdlan a montré que l'administration d'un anti-IL-23 inhibait totalement l'apparition des arthrites et de la spondylite mais n'affectait pas l'apparition de l'atteinte intestinale. Les expériences de transfert cellulaire ont également montré que le phénotype était dépendant des LT CD4⁺. La présence d'autoanticorps dirigés contre le collagène de type II a également été rapportée.

Modèles impliquant le TNF- α

Bien que l'efficacité des traitements anti-TNF soit prouvée dans les SpA, l'implication possible d'une dérégulation de l'expression du TNF au cours de ces pathologies reste encore à préciser. Plusieurs modèles de souris ayant soit une expression modifiée du TNF murin, soit une expression aberrante du TNF humain, ont permis de mieux comprendre certains des mécanismes impliquant le TNF dans les SpA mais restent toutefois moins comparables aux SpA que les rats HLA-B27 ou les souris surexprimant l'IL-23.

L'introduction chez la souris d'un transgène du TNF- α humain modifié en 3' induit le développement spontané d'arthrites destructrices des pattes postérieures à partir de 4 semaines d'âge. Une hyperplasie de la membrane synoviale ainsi qu'une infiltration de cellules leucocytaires (lymphocytes et granulocytes) dans l'espace synovial sont alors détectées dans les articulations. À l'exception d'une atteinte cutanée chez de rares souris, aucune autre atteinte inflammatoire n'a été décrite, que ce soit intestinale ou rachidienne (Keffer et al., 1991). Bien que ce modèle démontre l'importance du TNF- α dans le développement des arthrites, il semble plus pertinent pour l'étude de la PR que pour celle de la SpA. Toutefois, un travail de 2004 a montré que ces souris développaient une sacroiliite bilatérale destructrice combinée à une inflammation massive de l'os sous-chondral mais sans atteinte rachidienne ni ostéo-formation. De plus, ces souris ne développent pas d'ankylose osseuse, mais d'après l'hypothèse émise par les auteurs, il se pourrait que la faible espérance de vie de ces souris n'ait pas laissé le temps à l'ankylose d'apparaître. Un traitement par anti-TNF α de ces souris a permis d'inhiber fortement le développement de la sacroiliite (Redlich et al., 2004).

Les souris TNF^{ΔARE} présentent quant à elles une délétion des éléments riches en AU (ARE = AU Rich Elements), séquence localisée dans la région 3' non traduite du transcrit du TNF et ayant un rôle majeur dans la régulation de la synthèse du TNF. Ces souris TNF^{ΔARE} possèdent des macrophages et des LT qui expriment fortement le TNF, avec ou sans stimulation, en comparaison aux cellules des souris témoins. En ce qui concerne leur phénotype, les souris TNF^{ΔARE} ont un retard de croissance majeur et développent spontanément une polyarthrite inflammatoire chronique, provoquant une déformation des pattes antérieures et postérieures. L'atteinte histologique articulaire est détectable dès le 12^{ème} jour de vie et se caractérise par une hyperplasie de la membrane synoviale et son infiltration par des cellules leucocytaires. A la différence des souris surexprimant le TNF humain, les souris TNF^{ΔARE} développent également des atteintes intestinales inflammatoires (de l'iléon terminal et du colon proximal) dès l'âge de 2 à 4 semaines. Une limitation à l'interprétation de ce modèle est la présence des facteurs rhumatoïdes (anticorps dirigés contre des IgM et IgG), qui sont caractéristiques de la PR et non des SpA (Kontoyiannis et al., 1999).

Le TNF- α étant une cytokine pléiotrope existant sous forme transmembranaire et soluble, il est probable que ses deux formes aient des propriétés biologiques différentes. Afin de pouvoir étudier sélectivement l'impact du TNF transmembranaire, la souris TgA86 a été générée. Elle exprime une forme mutée du TNF- α qui le rend insensible au clivage membranaire médié par la protéase ADAM-17, conduisant à la surexpression de sa forme transmembranaire. Ces souris transgéniques développent spontanément des arthrites ainsi qu'une spondylite à partir de 4 semaines, conduisant à une diminution progressive de leur mobilité, avec une pénétrance de 100%. Elles ne présentent cependant pas d'inflammation systémique, à la différence des autres souris transgéniques pour le TNF. Une hyperplasie de la membrane synoviale ainsi qu'une infiltration par des cellules immunitaires se produisent dans les articulations touchées, de façon similaire aux souris exprimant le TNF- α humain modifié en 3'. Enfin, l'administration d'un anticorps anti-TNF permet d'inhiber totalement le développement de ces arthrites.

Ces différents modèles de souris transgéniques pour le TNF- α mettent donc clairement en évidence le rôle majeur de cette cytokine dans le développement des atteintes articulaires inflammatoires et ont contribué à l'émergence des traitements anti-TNF pour la prise en charge de la SpA mais également de la PR. Ils sont cependant peu adaptés à l'étude des mécanismes associés aux autres manifestations de SpA, telles que l'inflammation intestinale ou les atteintes cutanées.

C. Rôle essentiel des LT CD4⁺ et des cellules présentatrices d'antigène (CPA)

Importance des cellules dérivées de la moelle osseuse

Partant du fait que l'étude histologique des lésions observées chez le rat B27 montrait des infiltrats de cellules leucocytaires, l'équipe de Joel Taurog a émis l'hypothèse que le système immunitaire pourrait jouer un rôle fondamental dans le développement de ce phénotype. Afin de mieux définir les populations immunitaires impliquées, plusieurs expériences de transfert cellulaire entre rats non transgéniques (NTG), rats B27 sains (ayant un faible nombre de copies du HLA-B27) ou B27 malades (ayant un nombre élevé de copies du HLA-B27) ont été effectuées au début des années 90.

Le transfert de cellules de la moelle osseuse provenant d'un rat B27 malade à un rat receveur NTG ou B27 sain permettait d'induire colite, arthrite et atteintes cutanées (Breban et al., 1993). De manière intéressante, le transfert de la pathologie par les cellules provenant de la rate d'animaux malades n'était observé qu'en cas de greffe chez le receveur des cellules souches hématopoïétiques du donneur, alors que le transfert des cellules provenant des ganglions lymphatiques (qui n'en contiennent pas) n'induisait aucun symptôme. De plus, les cellules de la moelle osseuse de rats NTG ou B27 sain (rat 21-4L ayant un faible nombre de copies de HLA-B27) n'induisaient pas de SpA chez le rat receveur. Les auteurs ont également démontré que le transfert de cellules de la moelle osseuse d'un rat NTG à un rat B27 malade irradié permet d'induire une rémission de la pathologie. Enfin, les cellules issues de foie fœtal étaient également capables d'induire le développement de la SpA, démontrant que la présence de cellules effectrices matures n'était pas nécessaire au transfert de la pathologie.

L'ensemble de ces résultats suggère donc fortement que le développement de la SpA du rat requiert uniquement une forte expression du HLA-B27 par des cellules myéloïdes dérivées de la moelle osseuse hématopoïétique (Breban et al., 1993).

Importance des LT CD4⁺

Bien que le rôle clé des cellules myéloïdes exprimant le HLA-B27 ait été démontré, l'abondance de LT dans les infiltrats cellulaires observés dans les lésions des rats B27 a conduit les mêmes auteurs à étudier l'importance de ces cellules dans le développement de la SpA du rat (Breban et al., 1996). Ils ont tout d'abord généré des rats *nude*, c'est-à-dire des rats génétiquement dépourvus de thymus, exprimant les transgènes HLA-B27 et β 2-microglobuline associés à la SpA du rat (rats B27 *nude*). Ces rats *nude* se sont révélés totalement protégés du développement des manifestations de SpA, démontrant que des cellules d'origine thymique sont tout aussi fondamentales pour l'induction de la pathologie. Afin de démontrer

formellement le rôle des LT dans la SpA, les auteurs ont réintroduit soit des LT CD4⁺ soit des LT CD8⁺ chez des rats B27 *nude*. La réintroduction de LT chez ces rats a induit le développement de la SpA et les LT CD4⁺ se sont avérés bien plus efficaces que les LT CD8⁺ dans ce domaine. Il n'était cependant pas nécessaire que les LT CD4⁺ expriment eux-mêmes le HLA-B27 pour être pathogènes puisque le transfert de LT CD4⁺ provenant de rats NTG à des rats B27 *nude* a suffi à provoquer la survenue de la maladie (Breban et al., 1996; Hoentjen et al., 2006). Ces expériences ont toutefois permis de confirmer que les LT CD4⁺ de rats B27 n'étaient pas suffisants pour induire la pathologie car leur transfert à des rats *nude* NTG n'induisait aucun symptôme.

Le fait que les LT CD4⁺ soient plus efficaces que les LT CD8⁺ pour l'induction de la SpA était un résultat relativement étonnant étant donné que le HLA-B27 est une molécule du CMH de classe I, présentant des peptides aux LT CD8⁺. Ce résultat fut cependant confirmé depuis, puisque la déplétion ou l'absence déterminée génétiquement de cette population lymphocytaire n'ont eu aucune influence sur le développement de la SpA chez le rat B27 (May et al., 2003; Taurog et al., 2009). Au vu de ces résultats, les hypothèses du « peptide arthritogène » et du mimétisme moléculaire mettant en avant une expansion de LT CD8⁺ autoréactifs et pathogènes semblent donc remises en question, tout du moins chez le rat B27.

L'ensemble des données de ces deux études majeures démontre donc le rôle crucial de deux populations dans le développement de la SpA chez le rat B27 : d'un côté une ou plusieurs sous-populations cellulaires myéloïdes issues de la moelle osseuse hématopoïétique et exprimant fortement le HLA-B27, et de l'autre les LT CD4⁺, ces derniers n'ayant pas besoin d'exprimer le HLA-B27 pour être pathogènes (Breban et al., 1993, 1996).

À partir de ces résultats, notre laboratoire a donc émis l'hypothèse que les cellules myéloïdes clé issues de la moelle osseuse étaient vraisemblablement des cellules présentatrices d'antigène (CPA) interagissant avec les LT CD4⁺. Les CPA professionnelles regroupent principalement trois types cellulaires : les monocytes/macrophages, les lymphocytes B (LB) activés et les cellules dendritiques (DC). Ces cellules sont capables d'internaliser les microorganismes exogènes et d'en présenter des peptides dérivés aux LT CD4⁺ grâce au CMH de classe II. Parmi ces 3 sous-populations, une plus précisément a retenu l'attention du laboratoire, ce sont les DC. Ce sont les seules cellules à pouvoir induire la différenciation d'un LT naïf en LT effecteur. Comme nous allons le voir, plusieurs études ultérieures ont démontré que les DC du rat B27 présentaient de nombreuses altérations fonctionnelles. Il faut toutefois noter que la démonstration directe de l'implication de cette CPA dans le développement de la SpA du rat B27 reste à faire. Des anomalies fonctionnelles des

monocytes/macrophages et/ou des lymphocytes B (LB) activés pourraient également participer au développement d'une réponse immune pathogène chez le rat B27.

D. Les DC chez le rat

Les DC se situent à l'interface de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. Elles furent décrites pour la première fois par Paul Langherans en 1868 (cellules de Langherans situées dans la peau) et formellement identifiées dans les organes lymphoïdes périphériques chez la souris par Ralph Steinman et Zanvil Cohn en 1973 (Steinman and Cohn, 1973). Ces cellules sont spécialisées dans la reconnaissance des microorganismes pathogènes grâce à leur arsenal de récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR ou *Pattern Recognition Receptors*), tels que les TLR (*Toll-like Receptors*) et CLR (*C-type Lectin Receptors*). De nombreuses sous-populations aux propriétés variées, allant de l'induction d'une réponse immune pro-inflammatoire à la génération de LT régulateurs et l'induction d'une anergie des lymphocytes autoréactifs, ont été décrites (Ganguly et al., 2013). La faible diversité de réactifs disponibles et le nombre de lignées génétiquement modifiées limité chez le rat en comparaison de la souris peuvent expliquer que la caractérisation des DC du rat soit bien moins fournie que chez la souris ou chez l'Homme.

L'identification des DC chez le rat passe par l'utilisation d'une combinaison de marqueurs exprimés à la surface de ces cellules car aucun marqueur absolument spécifique qui permettrait de les distinguer des autres populations lymphoïdes n'a été décrit pour cette espèce.

La première description de deux sous-populations distinctes de DC identifiées dans la lymphe afférente du rat fut publiée il y a près de 20 ans (Liu et al., 1998). Ces deux sous-populations de DC conventionnelles, migrant de l'intestin vers les ganglions mésentériques, ont été distinguées en se basant sur l'expression conjointe des molécules CD4 et SIRP α (ou CD172a, reconnu par l'anticorps OX-41). Les DC CD4⁻ SIRP α ⁻ (DC CD4⁻) sont de grandes cellules arrondies contenant des inclusions corpusculaires dans leur cytoplasme. A l'opposé, les DC CD4⁺ SIRP α ⁺ (DC CD4⁺) sont plus petites, ne contiennent pas d'inclusion et leur surface forme de nombreuses dendrites. Sur le plan fonctionnel, les DC CD4⁺ induisent une prolifération des LT plus forte que les DC CD4⁻ (Tableau 9).

Par la suite, le groupe de Josien a approfondi l'analyse des populations de DC dans les organes lymphoïdes secondaires, notamment la rate et les ganglions. Ils ont montré que les DC CD4⁻ exprimaient de façon plus importante le CD103 que les DC CD4⁺ et que ces deux sous-

types exprimaient peu ou pas de molécules de costimulation (CD40, CD80, CD86) lorsqu'elles étaient fraîchement isolées. Les DC CD4⁻ n'ayant pas d'expression des molécules de costimulation, les auteurs en ont déduit qu'elles avaient un phénotype immature, alors que les DC CD4⁺ qui exprimaient le CD80 mais ni le CD40, ni le CD86, avaient un stade de maturité intermédiaire. Ces deux populations une fois mises en culture s'activaient durant la nuit comme en témoignait la forte augmentation de l'expression de toutes ces molécules de costimulation et du CMH de classe II (Voisine et al., 2002).

Il est intéressant de noter que les DC CD4⁻ ont une espérance de vie très faible *in vitro*, la mortalité de ces cellules atteignant 80% après 3 jours de culture (alors qu'inversement les DC CD4⁺ survivent à 70%). Les DC CD4⁻ ont également une capacité à induire la prolifération des LT inférieure à celle des DC CD4⁺, surtout en ce qui concerne les LT CD8⁺, vraisemblablement à cause de leur survie et d'une expression des molécules de costimulation plus faibles.

En plus de leur faible capacité à induire la prolifération des LT, les DC CD4⁻ favorisent une réponse de type Th₁ grâce à leur sécrétion d'IL-12, alors que les DC CD4⁺ induisent une réponse de type Th₁/Th₂ (Voisine et al., 2002). D'autres particularités des DC CD4⁻ sont, d'une part leur activité cytolytique (Trinité et al., 2000), et d'autre part, la présence de corps apoptotiques dérivés de cellules épithéliales, contenus dans leurs inclusions cytoplasmiques (Huang et al., 2000).

Il est à noter que les DC CD4⁻, qui expriment également le récepteur chimiokinique XCR1 (Geyer et al., 2014), sont comparables aux DC CD8α⁺ de la souris et que l'expression de XCR1 rapproche ces DC des DC CD141⁺ décrites chez l'Homme (Bachem et al., 2010; Dutertre et al., 2014). À l'opposé, les DC CD4⁺ du rat peuvent être rapprochées des DC résidentes CD4⁺ CD11b⁺ de la souris (Vremec et al., 2000). Ces DC de souris sont en effet CD172a⁺ XCR1⁻, comme les DC CD4⁺ du rat, et sont homologues aux DC CD1c⁺ humaines (Murphy et al., 2016).

Sous-population	Localisation	Morphologie	Caractéristiques principales
CD103 ⁺ CD4 ⁻ CD172a ⁻	Organes lymphoïdes et périphériques	Large cellules possédant des corps d'inclusions dans le cytoplasme	Activité cytolytique, transport de corps apoptotiques, induisent une tolérance immune, faible espérance de vie <i>in vitro</i>
CD103 ⁺ CD4 ⁺ CD172a ⁺	Organes lymphoïdes et périphériques	Petites cellules sans corps d'inclusions, présence de dendrites	Forte capacité de présentation de l'antigène, induisent une grande prolifération des LT (surtout CD4 ⁺)

Tableau 9 : Caractéristiques des deux sous-populations de DC conventionnelles chez le rat.

Il existe une troisième sous-population de DC, les DC plasmacytoïdes, non conventionnelles, qui sont CD4⁺ CD172⁺ mais n'expriment pas le CD103 et produisent beaucoup

d'interférons de type 1 (α/β) (Hubert et al., 2004). Ces DC plasmacytoïdes sont loin d'être minoritaires puisqu'elles sont par exemple aussi abondantes que les DC conventionnelles CD4⁺ et plus abondantes que les DC CD4⁻ dans la rate (Hubert et al., 2004).

E. Interactions entre DC et LT chez le rat B27

À la suite des deux études princeps du groupe de Taurog citées plus haut (Brebant et al., 1993, 1996), notre laboratoire a donc émis l'hypothèse que les CPA, et plus précisément les DC, du rat B27 pourraient contribuer à induire le développement de la SPA en interagissant avec des LT CD4⁺ qui infiltrent massivement les sites inflammatoires, provoquant ainsi l'apparition des manifestations cliniques. Plusieurs études ont alors été entreprises afin de caractériser les interactions entre les LT CD4⁺ et les DC du rat B27.

Une première altération fonctionnelle a été observée, à savoir la réduction de la capacité des DC B27 à induire la prolifération des LT (CD4⁺ et CD8⁺) par rapport aux DC de rats témoins (Hacquard-Bouder et al., 2004). Cette capacité réduite ne concernait que les lignées susceptibles au développement de la SpA (lignées ayant un nombre élevé de copies du HLA-B27). Les DC provenant de la lignée 21-4L (faible nombre de copies du HLA-B27 et ne développant aucun symptôme) avaient une capacité de stimulation très proche de celle des DC de rats NTG. Cette altération était spécifiquement induite par le HLA-B27 car l'expression d'un nombre élevé de copies du HLA-B7, structurellement très proche du HLA-B27, n'influçait pas non plus la capacité à induire la prolifération des LT.

Il était envisageable que cette altération fonctionnelle soit une conséquence de l'état d'inflammation chronique présent chez les rats B27. Cependant, l'observation que les DC B27 provenant de rats prémorbides, c'est-à-dire n'ayant encore développé aucune manifestation inflammatoire, ou génétiquement protégés du développement de la pathologie (rats *nude* ou Dark Agouti) avaient le même phénotype que les DC de rats B27 adultes malades a permis de réfuter cette hypothèse. Cette anomalie fonctionnelle n'était par ailleurs pas liée à un état de sous-activation des DC B27 puisque leur préincubation avec de l'IFN- γ ou du lipopolysaccharide (LPS) n'augmentait pas la prolifération qu'elles induisaient.

Des expériences de Transwell ont démontré que la capacité défectueuse des DC B27 à stimuler la prolifération des LT n'était pas liée à une anomalie de sécrétion d'un facteur soluble. En effet, les DC B27 placées dans un compartiment du système Transwell n'ont pas modifié la prolifération des LT induite par les DC NTG placées dans l'autre compartiment, pas plus que ces dernières n'ont restauré la capacité de stimulation des DC B27 (Hacquard-Bouder et al., 2004).

Ce résultat indique que le défaut de stimulation des DC B27 se produit très vraisemblablement lors du contact entre la DC et le LT. Puisque les DC stimulent les LT CD4⁺ par la voie CMH de classe II/TCR et par les molécules de costimulation (par exemple CD40 ou CD80/86), une hypothèse qui en découle serait qu'au moins une de ces voies soit altérée en présence de la DC B27, conduisant ainsi à une prolifération plus faible des LT. Le fait que la prolifération des LT induite par les DC B27 soit toujours plus faible que celle induite par les DC NTG, même en présence d'un anticorps anti-TCR qui stimule le LT indépendamment du CMH de classe II, orientait plutôt vers une altération des voies de costimulation. L'analyse de la formation de conjugués DC/LT a montré que les DC B27 formaient deux fois moins de conjugués avec les LT que les DC NTG, ce défaut étant en partie lié à la molécule de costimulation CD86. Une étude complémentaire a par ailleurs montré que les DC B27 présentent un défaut de formation de la synapse immunologique avec les LT, de manière indépendante du TCR mais dépendante des molécules de costimulation, notamment CD86 et CD28 (Hacquard-Bouder et al., 2007).

L'ensemble de ces résultats démontre que le HLA-B27 lui-même altère la communication entre DC et LT, en modifiant les voies de signalisation liées aux molécules de costimulation. Ce défaut de stimulation des DC B27 a depuis été reproduit dans d'autres lignées (Fert et al., 2008) et chez l'Homme en utilisant des DC différenciées à partir de monocytes *in vitro* (Talpin et al., 2014). D'autres altérations fonctionnelles des DC B27 ont depuis été rapportées (Tableau 10).

Sous-population de DC	Défaut fonctionnel
DC CD103 ⁺	<ul style="list-style-type: none"> _ Surexpression de protéines impliquées dans la modification des protéines et dans le chargement de peptides du CMH de classe I _ Sous-expression du CMH de classe II _ Sous-expression de protéines impliquées dans la dynamique du cytosquelette _ Motilité réduite _ Suractivation (surexpression du CD25)
DC CD4 ⁻	<ul style="list-style-type: none"> _ Viabilité réduite <i>in vitro</i> _ Fréquence réduite parmi les DC migratoires de l'intestin
DC CD4 ⁺	<ul style="list-style-type: none"> _ Susceptibilité accrue à l'apoptose induite par le CMH de classe II

Tableau 10 : Défauts fonctionnels des DC B27.

(Dhaenens et al., 2009; Utriainen et al., 2012)

Récemment, le laboratoire a par ailleurs démontré que les DC B27 induisaient préférentiellement la différenciation des LT naïfs en lymphocytes Th₁₇ *in vitro* (Glatigny et al.,

2012). Un tel biais en faveur de la différenciation Th₁₇ va dans le sens du rôle clé de l'axe IL-23/Th₁₇ dans la physiopathologie des SpA et est conforté par l'expansion spectaculaire des lymphocytes Th₁₇ dans les ganglions (mésentériques et périphériques) des rats B27. Il est intéressant de noter que cette expansion est corrélée avec l'apparition des symptômes cliniques et que la prolifération des Th₁₇ induite par les DC B27 implique encore une fois les molécules de costimulation CD86/CD28.

Nous voyons donc ainsi que la forte expression du HLA-B27 dans les DC de rat induit de nombreuses altérations fonctionnelles, et peut notamment être impliquée dans l'expansion des lymphocytes Th₁₇ considérés comme pathogènes chez le rat B27. Le rôle pathogène des Th₁₇ dans ce modèle animal reste cependant à démontrer formellement car le traitement de rats B27 avec un anticorps anti-IL-17 n'a produit aucun effet sur l'apparition des symptômes cliniques, conduisant même contre toute attente à une augmentation de la fréquence des Th₁₇ (Glatigny et al., 2012). Le fait que l'IL-17 soit capable d'effectuer un rétrocontrôle négatif sur sa propre production pourrait expliquer au moins en partie ce résultat (Smith et al., 2008a).

Les mécanismes précis par lesquels la molécule HLA-B27 induit ces anomalies ne sont à ce jour pas encore clairement établis. Afin de mieux les caractériser, le laboratoire a entrepris une comparaison du transcriptome des DC CD4⁺ de rats B27 avec celui de DC de rats témoins B7 et NTG (Fert et al., 2014). Le principal résultat de cette étude a été de montrer la sous-expression de nombreux gènes connectés à la signalisation de l'interféron, y compris le gène *Ifng*. Cette sous-expression de gènes induits par l'interféron (comme *Irf1*, *Irf7*, *Ifit2*, *Ifit3*, *Mx1*, *Ly6e*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*) a par la suite été confirmée par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) quantitative. La signature interféron (IFN) « inversée » est présente chez ces rats dès l'âge de 2 mois, persiste au moins jusqu'à 1 an, et a été mise en évidence dans les macrophages dérivés des monocytes circulants de patients atteints de SpA (Smith et al., 2008b). De manière intéressante, une surexpression de gènes liés au stress du réticulum endoplasmique (*Calr*, *Pdia3*, *Pdia4*, et *Pdia6*) a également été détectée dans les DC CD4⁺ de rats B27. La répression de la voie IFN pourrait, au moins en partie, être liée à la surexpression de *Socs3* dans ces cellules, la protéine *Socs3* étant connue pour inhiber la signalisation JAK/STAT induite par de nombreuses cytokines, dont l'IFN (Mahony et al., 2016).

Une autre observation très intéressante ayant résulté de l'étude transcriptomique comparative des DC CD4⁺ était la sous-expression des gènes *il10* et *il27a* par les DC de rats B27. En effet, l'IL-10 est une cytokine connue pour ses multiples propriétés anti-inflammatoires et est notamment capable d'inhiber directement les Th₁₇ (Huber et al., 2011), conduisant ainsi à supposer qu'une production diminuée d'IL-10 par les DC B27 pourrait être impliquée dans le développement de la SpA du rat. Cependant, le traitement de rats B27 avec de l'IL-10

recombinante n'a pas permis d'influencer significativement le développement de la SpA (Bertrand et al., 1998). Ce traitement a pourtant induit une diminution significative de la production de plusieurs cytokines pro-inflammatoires (IFN γ , TNF- α). Le résultat d'un traitement de rats B27 prémorbides avec de l'IL-10 n'a pas été publié et il se peut que l'IL-10 agisse préférentiellement sur le développement de la pathologie.

Comme nous allons le voir dans le chapitre IV, l'IL-27 est une cytokine découverte au début du siècle qui présente de nombreuses propriétés anti-inflammatoires et possède notamment une forte capacité à inhiber la différenciation Th₁₇, nous amenant à vouloir étudier son importance dans la physiopathologie de la SpA. Mais auparavant, attardons-nous sur la différenciation des LT, et plus précisément sur celle des Th₁₇ et les Treg, 2 sous-types clés ayant des effets opposés dans les pathologies inflammatoires (Noack and Miossec, 2014).

Chapitre 3. La différenciation des LT CD4⁺

Les LT CD4⁺, dits auxiliaires ou *helper*, forment à côté des LT CD8⁺, dits cytotoxiques, l'une des deux principales catégories de LT exprimant un récepteur composé de chaînes α et β , ce qui représente l'immense majorité des LT. L'autre classe qui compte pour seulement 5 % des LT étant ceux qui expriment un récepteur composé de chaînes γ et δ .

À l'opposé des LT CD8⁺ dont le mécanisme d'action passe par la lyse de leur cellule cible (car infectée par un pathogène intracellulaire ou exprimant des antigènes tumoraux), les LT CD4⁺ sont les principaux coordinateurs de la réponse immunitaire adaptative. Cette coordination passe à la fois par des molécules exprimées à leur surface mais également par les cytokines qu'elles sécrètent. Lorsqu'un LT CD4⁺ naïf reconnaît son antigène, présenté sous forme d'un dérivé peptidique par l'intermédiaire du CMH de classe II exprimé à la surface d'une CPA, il s'active tout en s'engageant dans une voie de différenciation spécifique, dépendant notamment de l'environnement cytokinique dans lequel il se trouve au moment du contact avec la CPA.

La première description des différents sous-types de LT CD4⁺ remonte à 1986, grâce aux travaux de Mosmann et al., qui ont décrit les lymphocytes Th₁, producteurs notamment d'IFN- γ , et les lymphocytes Th₂ (Mosmann et al., 1986). Cette distinction s'est enrichie plus tard de la découverte d'autres sous-types de LT CD4⁺, notamment les Th₁₇, producteurs d'IL-17, et les Treg, sous-type ayant la propriété de réguler la réponse immune.

A. Les principaux sous-types de LT CD4⁺

Les lymphocytes Th₁

La différenciation de ce sous-type de LT CD4⁺ est dépendante de l'IFN- γ et de l'IL-12. L'IFN- γ , lorsqu'il est présent dans le milieu extracellulaire, induit l'activation de STAT1 par sa phosphorylation et provoque l'augmentation de l'expression du facteur de transcription clé de cette voie : T-bet (*T-box expressed in T cells*, codé par le gène *Tbx21*). Le facteur T-bet provoque notamment une augmentation de la synthèse de la sous-unité $\beta 2$ du récepteur à l'IL-12, cette dernière venant amplifier l'expression de T-bet par l'intermédiaire de STAT4. Ces événements conduisent le lymphocyte à produire en abondance l'IFN- γ , cytokine effectrice caractéristique de la sous-population Th₁. L'IFN- γ exerce un rétrocontrôle positif sur les Th₁, contribuant à amplifier la différenciation des LT naïfs vers cette voie. Les lymphocytes Th₁ sont

principalement impliqués dans la défense contre les pathogènes intracellulaires, tels que les virus ou certaines bactéries comme les mycobactéries, dont la dissémination est inhibée par les IFN.

Les lymphocytes Th₂

La différenciation des LT CD4⁺ naïfs en Th₂ est initiée par l'IL-4, qui active STAT6 en induisant sa phosphorylation. STAT6 à son tour augmente fortement l'expression du facteur de transcription clé de la voie Th₂ : GATA-3 (guanosine-adenosine-thymidine-adenosine 3). GATA-3 est notamment impliqué dans la synthèse des cytokines caractéristiques de la voie Th₂ : l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13. De manière similaire à l'IFN- γ pour la voie Th₁, l'IL-4 exerce un rétrocontrôle positif sur la voie de différenciation Th₂. Les lymphocytes Th₂ sont principalement impliqués dans la réponse immune contre les pathogènes extracellulaires tels que les parasites en stimulant les lymphocytes B à produire des anticorps, et sont impliqués dans des maladies allergiques comme l'asthme.

Les lymphocytes Th₁₇

Les lymphocytes Th₁₇ sont impliqués dans la réponse immune contre les bactéries extracellulaires et les champignons échappant à l'action des Th₁ et Th₂. Les principales cytokines caractéristiques de cette sous-population, l'IL-17A et l'IL-17F, favorisent le recrutement des neutrophiles. Les Th₁₇ sont surtout présents dans la muqueuse intestinale où ils sont particulièrement impliqués dans la réponse immune envers le microbiote.

De nombreuses cytokines interviennent dans le développement des Th₁₇ à partir de LT naïfs. Tout d'abord, la présence dans le milieu extracellulaire de TGF- β et d'IL-6, qui activent respectivement la voie des SMAD et STAT3, induit l'expression des facteurs de transcription clé de la voie Th₁₇ : ROR α et ROR γ t. Ces facteurs induisent eux-mêmes la synthèse des cytokines effectrices de la voie Th₁₇ : les IL-17A et F, l'IL-21 et l'IL-22. En plus de ROR α et de ROR γ t, d'autres facteurs jouent un rôle important dans la différenciation Th₁₇ : IRF4 (Huber et al., 2008a), STAT3 (Durant et al., 2010), BATF (Schraml et al., 2009) et AhR (Veldhoen et al., 2008). La deuxième phase du développement des Th₁₇ est médiée par l'IL-21, qui amplifie la différenciation de cette population de manière autocrine (l'IL-21 étant également un activateur de la voie STAT3, comme l'IL-6). De plus l'IL-21 induit l'augmentation de l'expression du récepteur à l'IL-23, cytokine qui permet de stabiliser le phénotype Th₁₇, dernière phase de la différenciation de ce sous-type de LT CD4⁺ (McGeachy et al., 2009; Zhou et al., 2007).

Comme nous l'avons précédemment vu, les données issues des analyses génétiques chez les patients et celles provenant des études menées chez le rat B27 sont en faveur d'un rôle primordial des Th₁₇ dans le développement de la SpA. Il est important de souligner que la pathogénicité des Th₁₇ ne passe pas que par la synthèse d'IL-17, cytokine qui recrute et active les monocytes et les neutrophiles, les conduisant à synthétiser de nombreux médiateurs pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6, GM-CSF, métalloprotéases), mais contribue aussi à la destruction articulaire par l'expression de RANKL qui active les ostéoclastes. De plus, l'IL-17 elle-même est capable d'induire la synthèse de RANKL par les ostéoblastes (Kotake et al., 1999) et de RANK par les précurseurs ostéoclastiques (Adamopoulos et al., 2010). Toutes ces données ont fait des Th₁₇ une cible thérapeutique de grand intérêt dans la PR et dans la SpA, leur fréquence et la concentration d'IL-17 étant augmentées chez les patients affectés de ces pathologies (Lubberts, 2015). L'efficacité des traitements anti-IL-17 dans des pathologies comme la SpA ou le psoriasis (Baeten et al., 2013b; Canavan et al., 2016) vient confirmer la pathogénicité de cette sous-population de LT CD4⁺.

Bien que les Th₁₇ aient pu sembler représenter une population homogène au moment de leur découverte, plusieurs études laissent penser qu'il faut distinguer les Th₁₇ régulateurs des Th₁₇ pro-inflammatoires. Par exemple, les Th₁₇ générés en présence de TGF- β 1 et d'IL-6 sont pratiquement inefficaces pour induire l'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE), malgré leur forte production d'IL-17, alors même que des Th₁₇ générés en présence d'IL-1 β , d'IL-6 et d'IL-23 sont pathogènes dans ce modèle (Ghoreschi et al., 2010). Il a par ailleurs été démontré que l'incubation de Th₁₇, différenciés en présence de TGF- β et de l'IL-6, avec de l'IL-23 rendait ces cellules pathogènes (Lee et al., 2012). Ce résultat suggère donc fortement que l'IL-23 transforme des Th₁₇ non pathogènes en Th₁₇ pathogènes, cette propriété de l'IL-23 ayant été mise en évidence dès 2003 (Cua et al., 2003). Il a par ailleurs été démontré que l'IL-23 pouvait contrôler l'activité inflammatoire des auto-anticorps, en modifiant leur glycosylation, dans la PR (Pfeifle et al., 2016). Des études récentes se sont intéressées aux mécanismes impliqués dans la régulation de la balance entre Th₁₇ pathogènes et non-pathogènes. Un rôle très important de la molécule CD5-like, dont la perte d'expression induit la pathogénicité dans l'EAE, a été révélé (Wang et al., 2015a). La présence d'IL-1 et d'IL-23 induit par ailleurs l'expression de 3 micro ARNs (183, 96 et 182) qui contribuent à augmenter le caractère pathogène des Th₁₇ (Ichiyama et al., 2016). Cette hétérogénéité des Th₁₇ est présente chez l'Homme : *Candida albicans* induit l'expansion de Th₁₇ qui produisent à la fois de l'IL-17 et de l'IFN- γ , correspondant un phénotype pro-inflammatoire, alors que *Staphylococcus aureus* induit le développement de Th₁₇ qui produisent de l'IL-17 et de l'IL-10, soit un phénotype régulateur (Zielinski et al., 2012).

Les lymphocytes T régulateurs (Treg)

À l'opposé des Th₁, Th₂ et Th₁₇ dont la fonction est de stimuler la réponse immune contre un micro-organisme, les Treg ont pour fonction, comme leur nom l'indique, de réguler cette réponse immunitaire afin qu'elle ne soit pas délétère pour l'hôte. Il existe deux grands sous-types de Treg : les « natural Treg » (nTreg) qui se différencient dans le thymus et les « induced Treg » (iTreg) qui sont induits en périphérie.

La notion de Treg est apparue en 1995 grâce aux travaux de Sakaguchi qui a démontré l'importance cruciale d'une sous-population de LT CD4⁺ exprimant le CD25, correspondant à la sous-unité α du récepteur à l'IL-2, dans le contrôle de la réponse immune (Sakaguchi et al., 1995). Cette population, minoritaire, de LT CD4⁺ CD25⁺ empêchait le développement d'une maladie auto-immune systémique induite par le transfert de cellules CD4⁺ CD25⁻ à une souris *nude*. Des études ultérieures ont montré que ces Treg sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription Foxp3 (*Forkhead Box P3*). L'importance de Foxp3 dans la génération des Treg est montrée par son implication dans le syndrome IPEX (*X-linked Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy*) (Bennett et al., 2001). De manière similaire, les souris Scurfy développent une maladie auto-immune très sévère due à une perte de fonction de Foxp3 (Brunkow et al., 2001).

Les mécanismes impliqués dans les fonctions suppressives des Treg passent principalement par leur contact avec les LT effecteurs et/ou les CPA. Par exemple, les Treg expriment le CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4*) à leur surface et cette molécule entre en compétition avec le CD28, exprimé à la surface des LT, pour la liaison avec le CD80 et le CD86, exprimés à la surface des CPA activées. La liaison du CD28 avec CD80/86 étant cruciale pour l'activation de la réponse T, le CTLA-4 permet ainsi de limiter l'activation des LT effecteurs. Les fonctions suppressives des Treg peuvent également passer par la synthèse de cytokines anti-inflammatoires, telles que le TGF- β , l'IL-10 ou l'IL-35.

Les nTreg sont des Treg qui se sont différenciés dans le thymus et qui sont caractérisés par leur forte expression du CD25 et de Foxp3. Ils peuvent être distingués des LT effecteurs, qui expriment également le CD25 mais avec une intensité plus faible. Il faut cependant noter qu'il existe également des nTreg Foxp3⁺ n'ayant qu'une faible expression de CD25. Ces derniers perdent facilement leur expression de Foxp3 et peuvent devenir pathogènes dans un environnement inflammatoire, à la différence des Treg Foxp3⁺ CD25^{high} qui conservent leur expression de Foxp3 et gardent leur phénotype régulateur (Komatsu et al., 2014). La différenciation des nTreg à partir de thymocytes CD4⁺ Foxp3⁻ nécessite tout d'abord une activation suffisamment vigoureuse du TCR par le complexe CMH/peptide du soi exprimé à la surface des cellules épithéliales et des DC thymiques. À la suite de ce premier signal induit par

le TCR, un deuxième signal médié par le CD28 est nécessaire au développement des nTreg (Salomon et al., 2000). Enfin, les cytokines présentes dans le milieu influencent également le développement des Treg. Les souris n'exprimant pas l'IL-2 ou le CD25 ont par exemple une proportion significativement plus faible de Treg (Fontenot et al., 2005).

En complément des nTreg issus du thymus, les iTreg se développent à partir des lymphocytes T CD4⁺ CD25⁻ localisés en périphérie, surtout dans les organes lymphoïdes secondaires. Bien que les iTreg et les nTreg présentent de nombreuses similitudes (fonction suppressive et expression de Foxp3), il a été montré que les iTreg représentaient un sous-type non redondant de Treg, les deux sous-types possédant des répertoires de TCR distincts (Haribhai et al., 2011). De façon intéressante, les iTreg se développent en réponse à des molécules exogènes non pathogènes, par exemple lors de l'induction de la tolérance orale (Mucida et al., 2005). Les iTreg sont induits par l'IL-2, comme les nTreg, et le TGF- β contribue également à leur expansion (Chen et al., 2003). La présence du CTLA-4 est indispensable pour l'induction des iTreg par le TGF- β (Zheng et al., 2006). La liaison de ces deux cytokines à leur récepteur induit l'activation de STAT5, pour IL-2, et de Smad5, pour le TGF- β , pour finalement induire l'expression de Foxp3 (Zheng et al., 2007). Le développement des iTreg fait également intervenir la stimulation par le TCR : une forte stimulation inhibe l'expression de Foxp3 dans les LT alors qu'une stimulation plus faible, en coordination avec le TGF- β , promeut fortement l'expression de Foxp3 (Li et al., 2013). Enfin, l'acide rétinoïque, un métabolite de la vitamine A, participe également à l'expansion des iTreg dans l'intestin (Coombes et al., 2007). Cet acide rétinoïque est sécrété par les DC CD103⁺, qui synthétisent également le TGF- β . En résumé, une stimulation modérée du TCR dans un environnement cytokinique favorable (présence d'IL-2, de TGF- β , d'acide rétinoïque) favorise le développement d'iTreg à partir de LT CD4⁺ Foxp3⁻.

Les Treg de type 1 (Tr₁) constituent un troisième sous-type de Treg. Ces Tr₁ sécrètent de fortes quantités de TGF- β et d'IL-10, cytokines ayant des effets anti-inflammatoires sur de nombreuses populations lymphoïdes et notamment les LT et les DC (Gregori et al., 2012). Les Tr₁ sont générés à partir de LT CD4⁺ naïfs activés en présence d'IL-10. L'IL-10 exerce donc un rétrocontrôle positif vis-à-vis des Tr₁, de manière similaire à l'IFN- γ pour les Th₁ ou l'IL-4 pour les Th₂. L'IL-2 et l'IL-15 participent également à la génération de Tr₁ *in vitro*, même en absence de stimulation du TCR (Bacchetta et al., 2002). La différence majeure entre les Tr₁ et les deux autres sous-populations de Treg est que les Tr₁ n'expriment que transitoirement Foxp3 (Gregori et al., 2012).

À la manière des LT effecteurs qui sont principalement subdivisés en Th₁, Th₂ et Th₁₇, les Treg peuvent se spécialiser dans le contrôle d'un certain type de LT effecteur. Ainsi, des Treg spécialisés dans le contrôle des Th₁ (« Th₁-Treg »), des Th₂ (« Th₂-Treg ») ou des Th₁₇ (« Th₁₇-

Treg ») ont été décrits. Ces Treg effecteurs sont caractérisés par l'expression de Foxp3, de Blimp1 (*B-Lymphocyte Induced Maturation Protein 1*) et du facteur de transcription clé de la voie qu'ils contrôlent, par exemple T-bet pour les Th₁-Treg (Cretney et al., 2013).

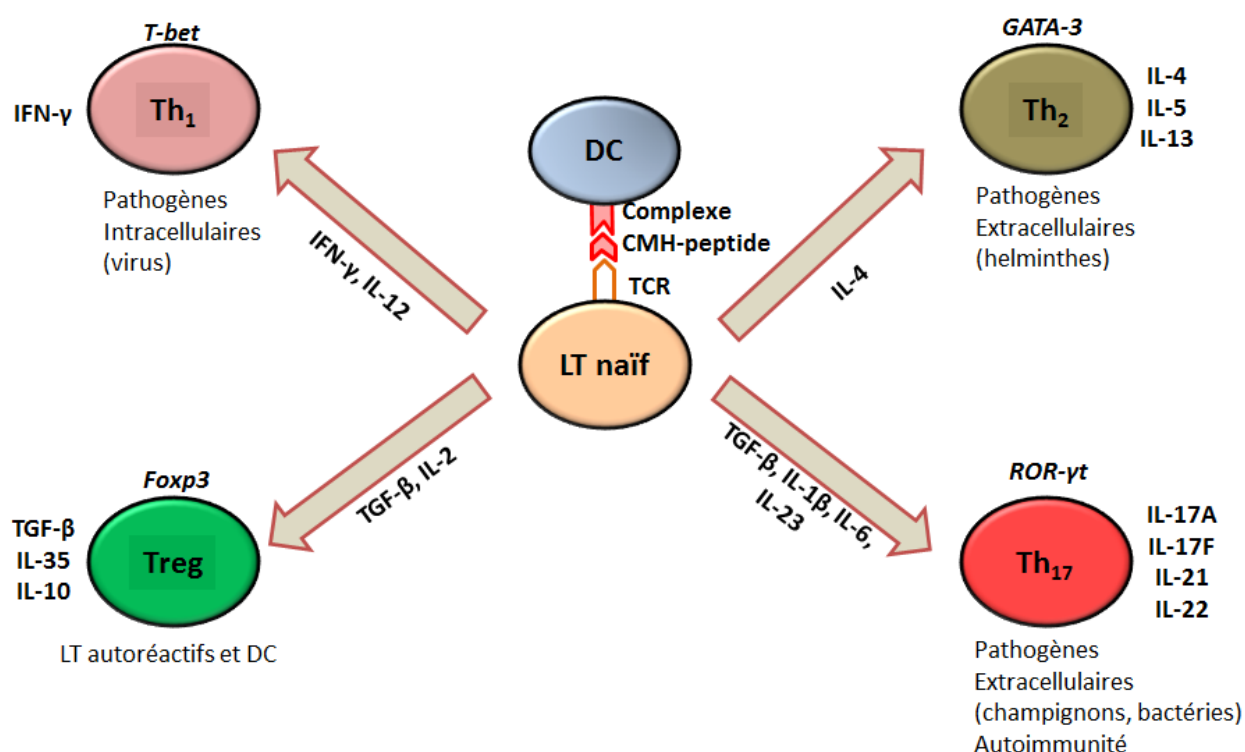


Figure 7 : Les principales voies de différenciation des LT CD4⁺.

Après avoir reçu le premier signal par son TCR, le lymphocyte T naïf peut se différencier en l'une des 4 principales sous-populations de LT CD4⁺ sous l'influence des cytokines présentes dans l'environnement. Les Th₁, Th₂ et Th₁₇ sont des LT effecteurs spécialisés dans la réponse contre certaines classes de pathogènes. Les Treg sont spécialisés dans le contrôle des LT effecteurs pour éviter l'établissement d'une réponse immune délétère pour l'hôte.

B. Plasticité des LT CD4⁺

Depuis la publication de l'article de Mosmann et al. sur la découverte des sous-populations Th₁ et Th₂, il est apparu de plus en plus clair que les LT effecteurs différenciés ne conservent pas le même phénotype tout au long de leur vie. De plus, plusieurs études ont rapporté la présence de LT exprimant simultanément des cytokines correspondant à différents sous-types (Guéry and Hugues, 2015).

Relation entre Th₁ et Th₂

Les lignées Th₁ et Th₂ sont considérées comme des lignées stables et s'excluent mutuellement. L'IFN-γ induit l'expression de T-bet qui à son tour induit l'expression de Runx3, ce dernier étant un inhibiteur de la synthèse d'IL-4, cytokine de la voie Th₂ (Naoe et al., 2007). Inversement, l'IL-4 inhibe l'expression de la sous-unité β2 du récepteur à l'IL-12, inhibant ainsi

la voie de différenciation Th₁ (Szabo et al., 1997). Cependant, les Th₂ peuvent dans certaines conditions se mettre à produire de l'IFN- γ en plus de leur synthèse d'IL-4 sous l'action d'interférons et d'IL-12 (Hegazy et al., 2010). Cette plasticité entre les Th₁ et les Th₂ semble exister également chez l'Homme, du moins *in vitro*, car des Th₁ restimulés avec de l'IL-4 et des Th₂ restimulés avec de l'IL-12 peuvent devenir IFN- γ ⁺ IL-4⁺ (Messi et al., 2003).

Relation entre Th₁/Th₂ et Th₁₇

À l'inverse des Th₁ et des Th₂ qui semblent relativement stables, les Th₁₇ montrent un haut degré de plasticité. Il a ainsi été rapporté l'existence de cellules exprimant à la fois de l'IFN- γ et de l'IL-17 ainsi que T-bet et ROR- γ t dans plusieurs pathologies inflammatoires telles que la maladie de Crohn (Annunziato et al., 2007) et la PR (Nistala et al., 2010). Cette plasticité entre les Th₁ et les Th₁₇ a également été observée dans le modèle murin de colite induite par le transfert de LT à des souris Rag^{-/-}. Liu et al. ont ainsi récemment démontré que des lymphocytes Th₁ transférés à ces souris pouvaient perdre leur expression d'IFN- γ et devenir des cellules productrices d'IL-17 sous l'influence du TGF- β , de l'IL-6 et de l'IL-23 (Liu et al., 2015). L'inverse a également été décrit : des lymphocytes Th₁₇ polarisés *in vitro* et transférés à des souris Rag^{-/-} peuvent se convertir en Th₁ producteurs d'IFN- γ et inducteurs de colite (Harbour et al., 2015). Dans l'EAE, les Th₁₇ peuvent aussi se transformer en Th₁ producteurs d'IFN- γ et cette conversion peut être induite par l'IL-12, qui augmente l'expression de T-bet et Runx1 (Wang et al., 2014), et/ou l'IL-23 qui peut également induire l'expression de T-bet (Hirota et al., 2011).

Des lymphocytes possédant un phénotype « Th_{2/17} » ont par ailleurs été observés dans la circulation de patients asthmatiques et ces cellules participent au développement de l'asthme en recrutant des leucocytes pro-inflammatoires (Wang et al., 2010). Elles expriment simultanément les facteurs de transcription GATA-3 et ROR- γ t et produisent aussi bien l'IL-17 et l'IL-22 (Th₁₇) que les IL-4, 5 et 13 (Th₂). Cette étude a permis de montrer que sous l'influence de l'IL-1, de l'IL-6 et de l'IL-21, les Th₂ pouvaient devenir sécréteurs d'IL-17. Une autre étude a démontré *in vitro* que les Th₁₇, mais pas les Th₂, pouvaient acquérir le phénotype « Th_{2/17} » sous l'influence des DC (Raymond et al., 2011). La sécrétion de cytokines de la voie Th₂ par les Th₁₇ serait, au moins en partie, due à l'IL-4 (Cosmi et al., 2010).

Relation entre Treg et Th₁₇

Une particularité commune aux Treg et Th₁₇ est l'importance du TGF- β pour leur différenciation, la présence ou non d'IL-6 indiquant vers quelle voie le LT naïf s'orientera. Dans la différenciation Th₁₇, la présence de TGF- β semble être cruciale pour générer des Th₁₇ non pathogènes, à l'opposé des Th₁₇ générés en présence d'IL-23 (Ghoreschi et al., 2010). AhR peut

également, en fonction du ligand présent, induire la différenciation soit en Th₁₇ soit en Treg (Quintana et al., 2008). Ces données suggèrent un lien très étroit entre Th₁₇ et Treg et il n'est pas étonnant de constater qu'il existe une forte plasticité entre ces deux sous-types de LT CD4⁺. Ainsi, certaines études ont-elles rapporté la production d'IL-17 par des Treg, sous l'influence de l'IL-1 et l'IL-23 (Koenen et al., 2008; Valmori et al., 2010). De façon intéressante, il a été décrit que les Treg de patients atteints de psoriasis pouvaient plus facilement devenir des Th₁₇ que les Treg de sujets sains. De plus, des LT CD4⁺ positifs pour Foxp3 et l'IL-17 sont observés dans les lésions psoriasiques, suggérant une implication de ces cellules dans le processus inflammatoire (Jorn Bovenschen et al., 2011). Dans le modèle d'arthrite expérimentale induite par le collagène, il a récemment été démontré que les lymphocytes Foxp3⁺ exprimant de faibles niveaux de CD25 avaient une expression instable de Foxp3 et pouvaient facilement devenir producteurs d'IL-17. Ces « ex-Foxp3 » producteurs d'IL-17 s'accumulent dans l'articulation arthritique grâce à l'IL-6 produite par les fibroblastes et induisent la destruction articulaire (Komatsu et al., 2014). Chez les patients atteints de MICI, une augmentation de la proportion de cellules Foxp3⁺ IL-17⁺ dans le sang a été observée et les cellules Foxp3⁺ de ces patients ont une capacité suppressive réduite de 60% par rapport aux Treg de patients sains (Ueno et al., 2013). Il est à noter que la conversion des Th₁₇ en Treg a également été décrite lors de la résolution de l'inflammation (Gagliani et al., 2015). L'ensemble de ces données suggère fortement que l'apparition d'une réponse Th₁₇ pathogène pour l'hôte pourrait être due, au moins en partie, à une altération fonctionnelle des Treg qui ne contrôlèrent plus la réponse immune de façon efficace. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'expansion considérable des Th₁₇ observée chez les rats B27 pourrait être liée à une altération de la proportion et/ou de la fonction des Treg.

C. Influence de la molécule de costimulation ICOS

Comme nous avons pu l'observer au cours de ce chapitre, l'environnement cytokinique n'est pas le seul facteur influençant le devenir d'un lymphocyte T naïf en cours de différenciation. En effet le « second signal », apporté par les molécules de costimulation exprimées à la surface de l'APC et du LT₄, est également impliqué dans l'engagement du LT naïf récemment stimulé par son TCR vers une voie de différenciation particulière.

La voie de costimulation médiée par le CD28 et ses partenaires CD80/CD86 a été la première à être décrite (Gmünder and Lesslauer, 1984) et joue un rôle essentiel dans la prolifération et la survie du LT₄. À l'opposé le CTLA-4, qui possède des propriétés inhibitrices vis-à-vis de la prolifération cellulaire, permet de contrôler ce processus en ayant une plus forte

affinité pour CD80/86 que le CD28 (Schildberg et al., 2016). Additionnellement à leur action sur la prolifération, ces molécules peuvent influencer la différenciation du LT naïf comme en témoigne l'influence de CTLA-4 sur la différenciation des lymphocytes Th₂ (Oosterwegel et al., 1999) ou T_{fh} (lymphocyte T *follicular helper*, population cruciale dans le développement de la réponse médiée par les lymphocytes B) (Wang et al., 2015).

Au cours de notre étude sur les lymphocytes Treg dans le contexte du rat B27, une molécule de costimulation a particulièrement retenu notre attention. Il s'agit d'ICOS (*Inducible Costimulator*), la seule molécule surexprimée par le LT de rats B27, comme nous le verrons en détail dans la partie « Travaux originaux ». ICOS fut décrit pour la première fois en 1999 chez l'Homme (Hutloff et al., 1999) et son homologie avec CD28 et CTLA-4 a mené de nombreuses équipes à étudier le rôle d'ICOS dans le développement de la réponse immunitaire. ICOS favorise la prolifération des LT, comme le CD28, mais les mécanismes impliqués restent à préciser (Wikenheiser and Stumhofer, 2016).

Alors que CD28 interagit avec CD80/86 exprimés à la surface des APCs, ICOS n'interagit qu'avec un seul partenaire, ICOSL (*ICOS-ligand*) qui est principalement exprimé par les APC professionnelles (LB, macrophages, DCs).

De façon intéressante, les voies de signalisation induites par ICOS et le CD28 sont proches mais possèdent des différences notables. Bien que ces deux molécules induisent l'activation des voies PI3Kinase-Akt et JNK (*c-Jun N-terminal kinase*)-p46, le CD28 favorise la voie JNK-p46 alors qu'ICOS favorise la voie PI3Kinase-Akt (Wikenheiser and Stumhofer, 2016). De plus, la partie intra-cytoplasmique d'ICOS présente un motif iProx, absent chez CD28, qui recrute la TBK1 et ce processus est crucial pour la maturation des T_{fh} induite par ICOS (Pedros et al., 2016).

Afin de mieux cerner l'importance d'ICOS au cours de la différenciation du LT, des études de souris génétiquement déficientes pour ICOS ou ICOSL (souris ICOS KO et ICOSL KO) au cours de différentes infections ont été effectuées.

Dans le contexte de la réponse Th₁, plusieurs études ont démontré qu'ICOS favorise le développement de ce sous-type de LT effecteur. Par exemple, des souris ICOS KO infectées par *Salmonella enterica* présentent une réduction du pourcentage de LT producteurs d'IFN-γ et sont moins efficaces pour contrôler l'infection que les souris ICOS WT (Vidric et al., 2006). De façon similaire, l'altération de la voie ICOS-ICOSL à l'aide d'un anticorps induit une diminution de la réponse Th₁ en réponse à une infection par *Listeria monocytogenes* (Mittrücker et al., 2002). Ces données suggèrent donc qu'ICOS favorise le développement d'une réponse Th₁, cependant d'autres données vont à l'opposé de cette hypothèse. Il a par exemple été montré que des souris ICOS KO infectées par *Mycobacterium tuberculosis* présentent un pourcentage

accru de LT CD4⁺ IFN- γ ⁺ par rapport aux souris ICOS WT (Nouailles et al., 2011). D'autre part, les souris ICOSL KO infectées par *Chlamydia muridarum* ont également une réponse Th₁ plus forte que les souris ICOSL KO (Kadkhoda et al., 2010). L'ensemble de ces données indique donc que l'influence d'ICOS sur la différenciation Th₁ est complexe et dépendante du contexte immunitaire (Wikenheiser and Stumhofer, 2016).

L'effet d'ICOS sur la polarisation Th₂ est bien moins dépendant du contexte dans lequel est fait l'étude et de nombreuses données indiquent qu'ICOS promeut le développement des Th₂. Ainsi, une réduction de la réponse Th₂ a notamment été observée chez les souris ICOS KO infectées par *Nippostrongylus brasiliensis* (Miyahira et al., 2003) ou par *Trichuris muris* (Wilson et al., 2006).

De façon similaire, le blocage de la voie ICOS-ICOSL au cours d'une infection par *Trichinella spiralis* (Scales et al., 2004) ou par *Leishmania major* (Miyahira et al., 2003) réduit l'amplitude de la réponse Th₂ caractérisée notamment par une plus faible synthèse d'IL-4.

À côté de ces effets sur les Th₁ et les Th₂, ICOS joue un rôle prépondérant dans le développement des T_{fh}, lymphocytes induisant la sélection et la survie des LB ayant la plus forte affinité pour l'antigène. Ces T_{fh} sont caractérisés par l'expression de CXCR5 qui va interagir avec CXCL13, synthétisée par les DCs folliculaires. Cet axe CXCR5/CXCL13 permet la migration du T_{fh} vers le follicule contenant les LB au sein du ganglion lymphatique. La perturbation de la voie ICOS-ICOSL réduit notamment le pourcentage de LT CD4⁺ CXCR5⁺ (Hu et al., 2009). Le facteur de transcription clé de la voie T_{fh} est Bcl-6 (Johnston et al., 2009) et ICOS stabilise l'expression de Bcl-6 par un mécanisme dépendant de l'ostéopontine (Leavenworth et al., 2015). Un autre mécanisme par lequel ICOS favorise le développement des T_{fh} implique sa capacité à réprimer l'expression de Klf-2, facteur de transcription qui inhibe l'expression de Bcl-6 (Weber et al., 2015).

Il est important de souligner qu'ICOS est également impliqué dans le développement et la fonction des Treg. Cela a été démontré dans des modèles expérimentaux d'asthme (Busse et al., 2012) et de diabète (Herman et al., 2004).

Enfin, deux articles se sont intéressés au rôle d'ICOS dans le développement des Th₁₇, population pathogène dans la SpA et en forte expansion chez le rat B27. L'équipe de Kuchroo a tout d'abord montré qu'ICOS joue un rôle majeur dans la stabilisation du phénotype Th₁₇ en réponse à une stimulation par l'IL-23 chez la souris (Bauquet et al., 2009). De façon intéressante, ICOS est également impliqué dans la synthèse d'IL-17 par les T_{fh} selon cette étude. Cet effet d'ICOS est dépendant du facteur de transcription c-maf et de l'IL-21.

Une deuxième étude publiée en 2010 s'est intéressée à la relation entre ICOS et Th₁₇ chez l'Homme (Paulos et al., 2010). Cette étude démontre qu'ICOS induit le développement de

LT naïfs en Th₁₇ en présence de cytokines polarisantes (IL-6, IL-1 β , IL-23). Cette capacité d'ICOS à favoriser le développement des Th₁₇ peut être inhibée par une stimulation simultanée par le CD28. De façon analogue aux résultats obtenus chez la souris, l'effet d'ICOS sur les Th₁₇ implique c-maf et l'IL-21.

Ces deux études indiquent donc qu'ICOS est capable de favoriser le développement d'une réponse Th₁₇. Nous avons donc émis l'hypothèse que la surexpression d'ICOS observée à la surface des LT CD4⁺ de rats B27 (section "Travaux originaux") est impliquée dans l'expansion des Th₁₇ pathogéniques dans la SpA.

Chapitre 4. L'interleukine-27, un gardien du système immunitaire

En parallèle de notre étude sur les Treg du rat B27, nous nous sommes également intéressés au cours de ce travail à la sous-expression de l'IL-27 par la DC de rat B27. Comme nous l'avons abordé dans le chapitre 2, la DC B27 présente de nombreuses altérations fonctionnelles et favorise notamment la forte expansion des Th₁₇ (Glatigny et al., 2012). Dans l'objectif de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans ce phénomène, une étude du laboratoire a comparé le transcriptome des DC CD4⁺ de rats B27 avec celui de rats témoins NTG et B7. De façon intéressante, cette étude a montré que la DC de rat B27 sous-exprime deux cytokines capables d'inhiber les Th₁₇ : l'IL-10 et l'IL-27 (Fert et al, 2014). Sachant que le traitement de rats B27 avec de l'IL-10 recombinante n'a pas permis de modifier significativement le développement des symptômes cliniques (Bertrand et al., 1998), nous avons concentré notre étude sur l'IL-27. Bien que la biologie de cette cytokine soit complexe, ses capacités à inhiber le développement des Th₁₇ et à stimuler la production d'IL-10 nous ont paru très intéressantes dans le contexte du rat B27.

A. Description de l'IL-27, de son récepteur et des cytokines apparentées

La première description de l'IL-27 date de 2002 (Pflanz et al., 2002). Cette cytokine est composée de la sous-unité p28 (connue aussi sous le nom d'IL-30) et de la protéine EB13 (*Epstein-Barr virus induced gene 3*), liées de manière non covalente. L'IL-27 fait donc partie de la famille des cytokines hétérodimériques, partageant des homologies de structure avec les autres cytokines de cette famille. Le récepteur de l'IL-27 est également hétérodimérique, composé de IL27R α (également appelé WSX-1 ou TCCR) et de gp130 (Figure 8).

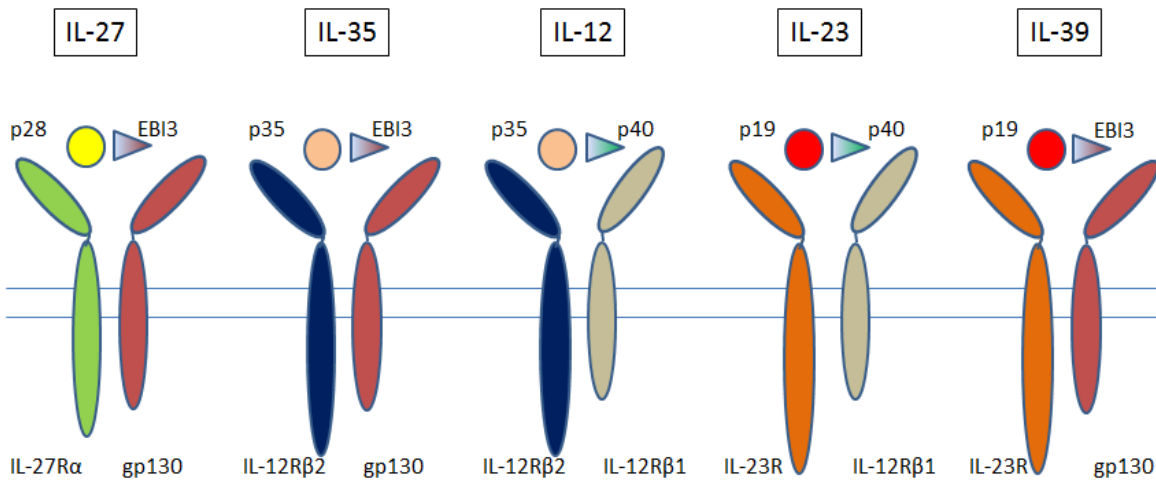


Figure 8 : Représentation schématique des cytokines hétérodimériques et de leurs récepteurs.

La biologie de ces cytokines est très complexe, puisque chaque sous-unité peut s'associer à d'autres partenaires et induire des effets biologiques distincts. En plus de son association avec p28 pour former l'IL-27, EBI3 peut se lier à p35 pour former l'IL-35 qui est principalement impliquée dans l'activité des Treg. Elle peut également se lier à p19 pour former l'IL-39 qui est produite par les LB activés et exerce des activités pro-inflammatoires mises en évidence dans le contexte du lupus (Wang et al., 2016b).

L'IL-23 (complexe p19/p40) est, comme nous l'avons déjà indiqué, impliquée dans la stabilisation du phénotype Th₁₇ (McGeachy et al., 2009). L'IL-12, formée par l'association p35/p40 est une cytokine critique pour le développement des LT de type Th₁.

Bien que la sous-unité p28 ait moins de partenaires connus qu'EBI3, il a également été décrit qu'elle pouvait s'associer à la molécule CLF-1 (*cytokine-like factor 1*); cet hétérodimère stimule les LT, les lymphocytes NK et peut induire la différenciation Th₁₇ en présence de TGF-β (Crabé et al., 2009). Il est également capable de favoriser la différenciation Th₂ ainsi que de stimuler les LB et leur différenciation en plasmocytes (Tormo et al., 2013).

Il est à noter que la p28 seule (IL-30) possède aussi des propriétés biologiques intrinsèques. Elle peut notamment inhiber la liaison IL-27/IL-27R en se fixant directement à gp130 (Stumhofer et al., 2010) et inhiber la phosphorylation de STAT1 induite par l'IL-27 (Shimozato et al., 2009).

Un niveau de complexité supplémentaire dans la biologie de cette famille de cytokines hétérodimériques vient s'ajouter en sachant que la sous-unité gp130 de l'IL-27R est impliquée dans la signalisation de nombreuses autres cytokines, comme l'IL-35 et l'IL-39 mais également l'IL-6 qui favorise notamment la différenciation Th₁₇.

De plus, il existe plusieurs isoformes d'IL-27R α . Une version tronquée soluble, ne contenant que le domaine extracellulaire du récepteur, a été décrite et cet IL-27R α soluble fait partie du récepteur à la humanin dans les cellules neuronales (Hashimoto et al., 2009). Le relargage d'IL-27R α soluble par plusieurs types cellulaires activés (LT, LB, monocytes et DC dérivées de monocytes) peut par ailleurs provenir de l'action de métalloprotéases et cet IL-27R α soluble agit comme un antagoniste naturel de l'IL-27 (Dietrich et al., 2014).

B. Régulation de l'expression de l'IL-27

Les CPA et plus précisément les DC activées sont la principale source d'IL-27 de l'organisme (Pflanz et al., 2002). Cependant, les plasmocytes, les cellules endothéliales, les trophoblastes du placenta ou encore les cellules microgliales sont également capables de produire cette cytokine (Hall et al., 2012a). Enfin, une étude récente a démontré l'existence d'un sous-type de LT CD4⁺ producteurs d'IL-27 chez des souris infectées par *Plasmodium berghei* (Kimura et al., 2016).

Du fait que l'IL-27 est composée de p28 et d'EBI3 liées de manière non covalente, l'expression de l'IL-27 est influencée par la régulation de l'expression de ces deux protéines.

L'expression d'EBI3 est induite par plusieurs stimuli. Il a été clairement démontré qu'une stimulation des *Toll-like receptors* (TLRs) induisait l'expression d'EBI3. Cette induction passe principalement par la voie NF- κ B, en aval de MyD88. L'IL-1 β pro-inflammatoire peut également stimuler la production d'EBI3 (Wirtz et al., 2005).

Les agonistes des TLR, comme les composés microbiens, sont par ailleurs capables d'induire une forte expression de la sous-unité p28 par les CPA. En plus des TLR, les interférons de type I (IFN α/β) (Iyer et al., 2010) et de type II (IFN γ) (Murugaiyan et al., 2010) augmentent l'expression de p28. Sachant que l'IL-27 est par ailleurs capable d'induire la synthèse d'IFN- γ par les lymphocytes NK et les LT, nous voyons ici que l'IL-27 peut promouvoir sa propre expression par l'intermédiaire des IFN. Il a également été rapporté que des DC incubées avec de l'IL-27 augmentaient leur synthèse d'IL-27p28, démontrant ainsi l'effet autocrine de l'IL-27 (Birkholz et al., 2014).

A l'opposé des facteurs ci-dessus capables de stimuler la production de p28, l'ostéopontine (Shinohara et al., 2008) et la fraction C5a du complément (Pawaria et al., 2014) exercent un effet inhibiteur sur la synthèse de cette sous-unité de l'IL-27.

Les principaux stimuli conduisant à l'expression de l'IL-27 sont schématisés dans la figure 9.

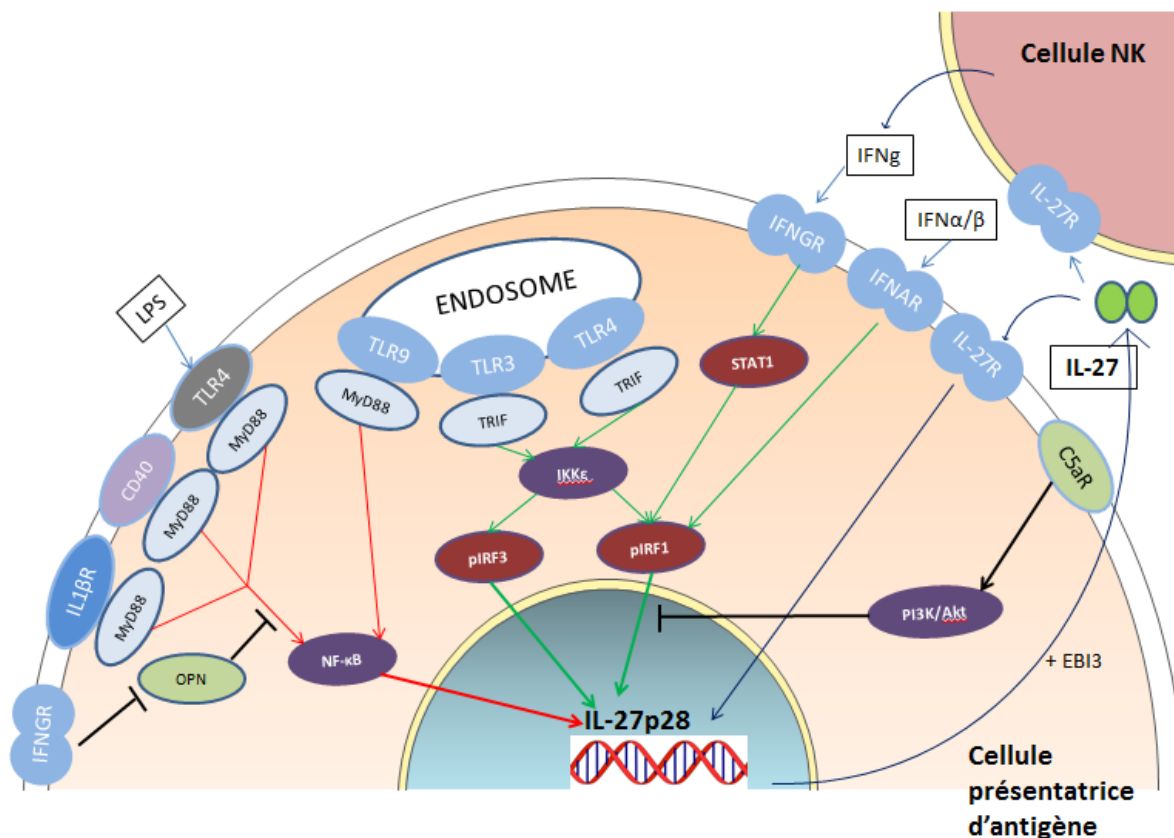


Figure 9 : Régulation de la synthèse de la sous-unité p28 de l'IL-27.

Les deux principaux stimuli induisant la synthèse d'IL-27 sont les composés d'origine microbienne, par l'intermédiaire des TLR situés à la surface cellulaire et dans les endosomes des CPA, et les interférons de type I et II. Les voies de signalisation impliquées sont surtout l'axe MyD88/NF-κB (flèches rouges), et la voie IKKε/IRF (flèches vertes). Il est à noter que l'IL-27 peut induire sa propre synthèse de manière autocrine et en stimulant la production d'IFN-γ par les cellules NK. A l'inverse, l'ostéopontine intracellulaire, dont l'expression peut être inhibée par l'IFN-γ, et le facteur C5a du complément sont capables d'inhiber la synthèse d'IL-27. Schéma adapté de (Jankowski and Wandtke, 2016).

C. Signalisation induite par l'IL-27

Une fois que l'IL-27 s'est liée à son récepteur, plusieurs voies de signalisation sont engagées pour produire les nombreux effets de cette cytokine. La principale voie de signalisation de l'IL-27 est la voie JAK/STAT (Janus Kinase/Signal transducer and activator of transcription) (Figure 10). Il existe plusieurs isoformes de STAT (STAT1 à STAT6) qui forment des homo- ou hétérodimères une fois phosphorylés par les JAKs. La liaison de l'IL-27 à son récepteur induit principalement la phosphorylation de STAT1 et STAT3 qui sont responsables d'une grande partie des effets de l'IL-27 sur le système immunitaire, comme nous le verrons dans la section suivante.

En plus de la phosphorylation de STAT1 et STAT3, l'IL-27 peut aussi induire la phosphorylation des autres isoformes de STATs dans certains types cellulaires (Jankowski and Wandtke, 2016).

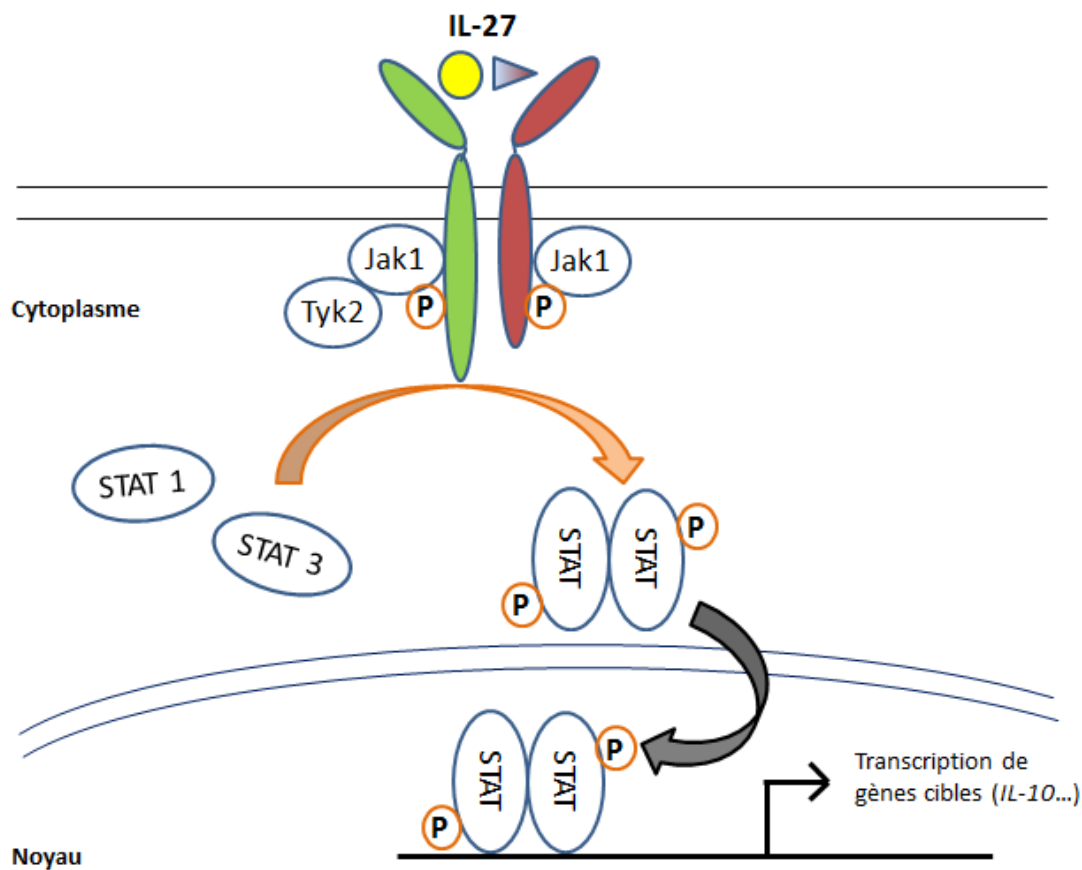


Figure 10 : Activation de la voie JAK/STAT par l'IL-27.

La liaison de l'IL-27 à son récepteur hétérodimérique (IL-27Rα + gp130) induit un changement conformationnel permettant l'activation par phosphorylation des Jak. Les Jak activées phosphorylent à leur tour les STATs cytoplasmiques (principalement STAT1 et STAT3 dans le cas de l'IL-27) qui se dimérisent et transloquent du cytoplasme au noyau, où elles induisent l'expression de nombreux gènes cibles. La signalisation induite par l'IL-27 est différente selon le type cellulaire étudié ainsi que l'état d'activation de la cellule.

D. Régulation de la réponse immunitaire par l'IL-27

L'IL-27 étant principalement produite par les CPA, de nombreuses équipes de recherches se sont attelées à caractériser les effets de cette cytokine sur le système immunitaire, ce qui a mené à la publication de résultats contradictoires. L'IL-27 est une cytokine pléiotrope, agissant sur de nombreuses sous-populations cellulaires. Elle possède aussi bien des effets pro- qu'anti-inflammatoires qui dépendent du contexte dans lequel se trouve la cellule.

Effet sur les lymphocytes Th₁

L'étude de Pflanz et al. en 2002 a démontré que l'IL-27 était capable d'agir en synergie avec l'IL-12 pour induire la prolifération et la différenciation des LT CD4⁺ naïfs en LT effecteurs

de type Th₁, producteurs d'IFN-γ (Pflanz et al., 2002). Cet effet pro-Th₁ de l'IL-27 a été confirmé depuis et il a été démontré que l'IL-27 induisait l'expression du facteur de transcription T-bet, facteur de transcription clé de la différenciation Th₁. L'augmentation de T-bet induite par l'IL-27 est médiée par STAT1, mais également par la voie MAPK/p38 (Owaki et al., 2006b). L'IL-27 possède un autre mécanisme pour favoriser la voie Th₁ qui passe par une augmentation de l'expression d'ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule-1*) et de LFA-1 (*Lymphocytes Function-associated Antigen-1*), indépendamment de T-bet (Owaki et al., 2006b). Enfin, la répression de l'expression de GATA-3, facteur de transcription clé de la différenciation Th₂ et qui inhibe le développement d'une réponse Th₁, par l'IL-27 participe indirectement à l'expansion des lymphocytes effecteurs Th₁ (Lucas et al., 2003).

À l'opposé de ses effets pro-Th₁, plusieurs études ont démontré que l'IL-27 pouvait également limiter une réponse Th₁ qui deviendrait délétère pour l'hôte si elle n'était pas stoppée à temps. Tout d'abord, l'IL-27 inhibe la production d'IL-2, cytokine qui participe à la prolifération et à la survie des Th₁ (Villarino et al., 2006), par l'intermédiaire de l'induction de SOCS3 (Owaki et al., 2006a). En plus de cette déplétion d'IL-2, l'IL-27 induit la production d'IL-10 anti-inflammatoire par les Th₁ différenciés (Batten et al., 2008). L'hypothèse d'un effet inhibiteur de l'IL-27 sur les lymphocytes Th₁ a été renforcée par l'analyse des souris n'exprimant pas d'IL-27Rα (souris IL-27Rα KO). Ces dernières n'ont pas de déficit immunitaire majeur mais développent une réponse Th₁ dérégulée en réaction à une infection, pouvant conduire à la mort de l'animal. En effet, les souris invalidées pour l'IL-27Rα et infectées par *Trypanosoma cruzi* ou *Toxoplasma gondii* ont une production accrue d'IFN-γ dans le foie, provoquant des lésions hépatiques mortelles (Hamano et al., 2003). Le contrôle de la réplication parasitaire chez ces souris est identique à celui des souris exprimant l'IL-27Rα mais elles succombent à une maladie inflammatoire induite par les LT et corrélée à de fortes concentrations d'IFN-γ (Villarino et al., 2003).

Ces résultats indiquent donc que l'IL-27 peut posséder aussi bien des propriétés stimulatrices qu'inhibitrices envers les lymphocytes Th₁, selon le contexte dans lequel se trouve la cellule.

Effet sur les lymphocytes Th₂

Un des aspects les plus clairement caractérisés de la biologie de l'IL-27 est son effet inhibiteur sur la réponse Th₂. En plus de sa capacité à réduire l'expression de GATA-3 (Lucas et al., 2003), l'IL-27 diminue également la production d'IL-5 et d'IL-13 par les lymphocytes Th₂ différenciés (Yoshimoto et al., 2007). Comme indiqué précédemment, les souris invalidées pour l'IL-27Rα et infectées par *Trypanosoma cruzi* développent des lésions hépatiques mortelles

liées à la surproduction d'IFN- γ , mais ces souris infectées ont également des concentrations élevées d'IL-4 et d'IL-5, cytokines de la voie Th₂, induisant une parasitémie prolongée (Hamano et al., 2003). Les souris IL-27R α KO sont par ailleurs plus résistantes à une infection par *Trichuris muris*, du fait de leur production accrue de cytokines de la voie Th₂ : IL-4, IL5 et IL-13 (Artis et al., 2004). Notons finalement que les lymphocytes Th₂ de patients asthmatiques résistent à l'inhibition de la réponse Th₂ par l'IL-27 en raison d'une surexpression de SOCS3, démontrant ainsi l'importance physiologique de l'effet inhibiteur de l'IL-27 sur les lymphocytes Th₂ (Chen et al., 2013b).

Effet sur les lymphocytes Th₁₇

L'effet inhibiteur de l'IL-27 sur la sous-population Th₁₇ est bien documenté. L'IL-27 inhibe la différenciation des Th₁₇ à partir de LT naïfs stimulés *in vitro* en présence de TGF- β et d'IL-6 (Batten et al., 2006). Dans cette même étude, un pourcentage accru de Th₁₇ dans le système nerveux central de souris invalidées pour l'IL-27R α développant une EAE (modèle animal de sclérose en plaques dans lequel les Th₁₇ sont cruciaux) a été rapporté. Cette inhibition du développement des Th₁₇ est liée à une réduction de l'expression de ROR α et de ROR γ par l'IL-27, les deux facteurs de transcription essentiels pour la différenciation Th₁₇ (Diveu et al., 2009; El-behi et al., 2009). De plus, l'IL-27 freine la production d'IL-17, d'IL-22 et de GM-CSF produits par ces lymphocytes Th₁₇ (Stumhofer et al., 2006).

L'effet de l'IL-27 sur les Th₁₇ déjà différenciés est cependant un sujet de controverse. En effet, une étude a montré que l'IL-27 n'exerçait aucun effet sur les Th₁₇ isolés à partir du système nerveux central (SNC) de souris développant une EAE et restimulés avec de l'IL-23 (El-behi et al., 2009). Cependant, une étude antérieure avait montré que l'IL-27 réduisait la production d'IL-17 par les Th₁₇ provenant du SNC de souris infectées par *Toxoplasma gondii* (Stumhofer et al., 2006). Une étude chez l'Homme publiée en 2011 va dans le sens d'un rôle inhibiteur de l'IL-27, à la fois sur la différenciation des Th₁₇ et sur la production d'IL-17 par les Th₁₇ déjà différenciés (Liu and Rohowsky-Kochan, 2011).

Enfin, l'IL-27 induit l'expression de CD39 sur les DC. Or, le CD39 contribue à réduire la concentration en ATP (adénosine tri-phosphate) du milieu extracellulaire, ce qui a pour conséquence une activation de l'inflammasome et une réduction de l'expansion des Th₁₇ (Mascanfroni et al., 2013).

L'IL-27 semble donc être une cible thérapeutique très prometteuse dans le cadre des pathologies liées à une réponse Th₁₇ non contrôlée, même si ses effets sur les Th₁₇ déjà différenciés restent à préciser.

Effet sur les lymphocytes T régulateurs (Treg) Foxp3⁺

Comme nous venons de le voir, l'IL-27 exerce globalement des effets anti-inflammatoires envers les Th₁, les Th₂ et les Th₁₇. Les Treg étant une sous-population de LT capable également d'inhiber les LT activés, il serait logique d'imaginer que l'IL-27 favorise le développement et/ou l'activité des Treg. Plusieurs études ont cependant montré que l'IL-27 possédait des propriétés inhibitrices envers les Treg. En effet, l'IL-27 supprime l'augmentation de l'expression de Foxp3 induite par le TGF- β . L'IL-27 réduit par ailleurs l'expression du CD25 et de CTLA-4 et diminue la capacité suppressive des Treg (Huber et al., 2008b). Deux études publiées en 2011 vont dans le sens d'un effet antagoniste de l'IL-27 sur le développement des Treg Foxp3⁺. Des souris surexprimant l'IL-27 décèdent vers 10 semaines à cause d'une inflammation non contrôlée. Cette inflammation est corrélée à une fréquence diminuée de Treg, médiée par l'IL-27 (Wojno et al., 2011). Enfin, dans un modèle de colite expérimentale induite par le transfert de cellules T, l'injection de LT n'exprimant pas l'IL-27R α a induit une colite moins forte et une plus grande proportion de Treg que les LT exprimant l'IL-27R α (Cox et al., 2011).

Cet effet inhibiteur de l'IL-27 sur les Treg n'est cependant pas si évident, puisqu'il a été montré que, chez l'Homme, l'IL-27 stimulait l'expression de Foxp3 induite par le TGF- β (Ouaked et al., 2009), allant à l'opposé de l'étude de Huber et al. L'étude de Hall et al. a par ailleurs démontré que l'IL-27 pouvait augmenter le nombre de Treg Foxp3⁺ *in vitro* (Hall et al., 2012b). De plus, le traitement de souris rendues arthritiques par immunisation contre le collagène de type II, par l'IL-27, a induit l'expansion de Treg CD25⁺ Foxp3⁺ (Moon et al., 2013). Enfin, l'IL-27 est une cytokine importante pour la survie des Treg chez la souris (Kim et al., 2013) et l'expression des molécules PD-1, CTLA-4 et GITR par les Treg, ces molécules étant impliquées dans leurs fonctions suppressives (Moon et al., 2013).

L'ensemble de ces données démontre que l'effet de l'IL-27 sur les Treg Foxp3⁺ est complexe et dépend du contexte dans lequel l'étude est faite. Il faut cependant noter que l'effet inhibiteur de l'IL-27 sur ces lymphocytes peut être indirect. Les Treg ont en effet besoin d'IL-2 pour survivre et les souris surexprimant l'IL-27 ont une production d'IL-2 considérablement réduite (Wojno et al., 2011), expliquant ainsi par voie de conséquence la diminution de la fréquence des Treg en présence d'IL-27. En plus de son action sur les Treg Foxp3⁺, l'IL-27 est également capable d'induire une population spécifique de Treg exprimant T-bet et CXCR3, spécialisée dans le contrôle de la réponse Th₁ (Hall et al., 2012b).

Effet sur les lymphocytes régulateurs de type 1 (Tr₁) producteurs d'IL-10

Parallèlement à son effet ambivalent sur les Treg Foxp3⁺, il est bien établi que l'IL-27 est une cytokine favorisant le développement des Tr₁, dont les fonctions immunosuppressives dépendent de l'IL-10 qu'elles produisent en abondance (Roncarolo et al., 2006).

Plus globalement, une série d'études a permis de démontrer que l'IL-27 stimulait la production d'IL-10 par plusieurs sous-populations de LT CD4⁺ tels que les Th₁, Th₂, ou encore les Tr₁ (Awasthi et al., 2007; Stumhofer et al., 2007). Sous l'action de l'IL-27, l'expression du facteur de transcription AhR et de son partenaire c-maf est augmentée dans les LT CD4⁺, mécanisme par lequel l'IL-27 favorise le développement des Tr₁ (Pot et al., 2009). Ces deux molécules coopèrent pour induire l'expression de l'IL-21 et de l'IL-10, cytokines favorisant le développement des Tr₁ (Apetoh et al., 2010). Un autre mécanisme par lequel l'IL-27 peut favoriser la production d'IL-10 par les LT CD4⁺ dépend de Egr-2 et du facteur de transcription Blimp-1 (Iwasaki et al., 2013).

Il est cependant à noter que l'IL-27 induit aussi un rétrocontrôle négatif sur le développement des Tr₁ en induisant l'expression de métallothionéines qui régulent négativement l'activation de STAT1 et de STAT3, aboutissant à terme à une réduction de la synthèse d'IL-10 (Wu et al., 2013).

En conclusion de cette partie, l'IL-27 possède une activité pléiotrope sur les LT, ses effets pouvant être à la fois pro et anti-inflammatoires selon le type cellulaire étudié (Figure 11).

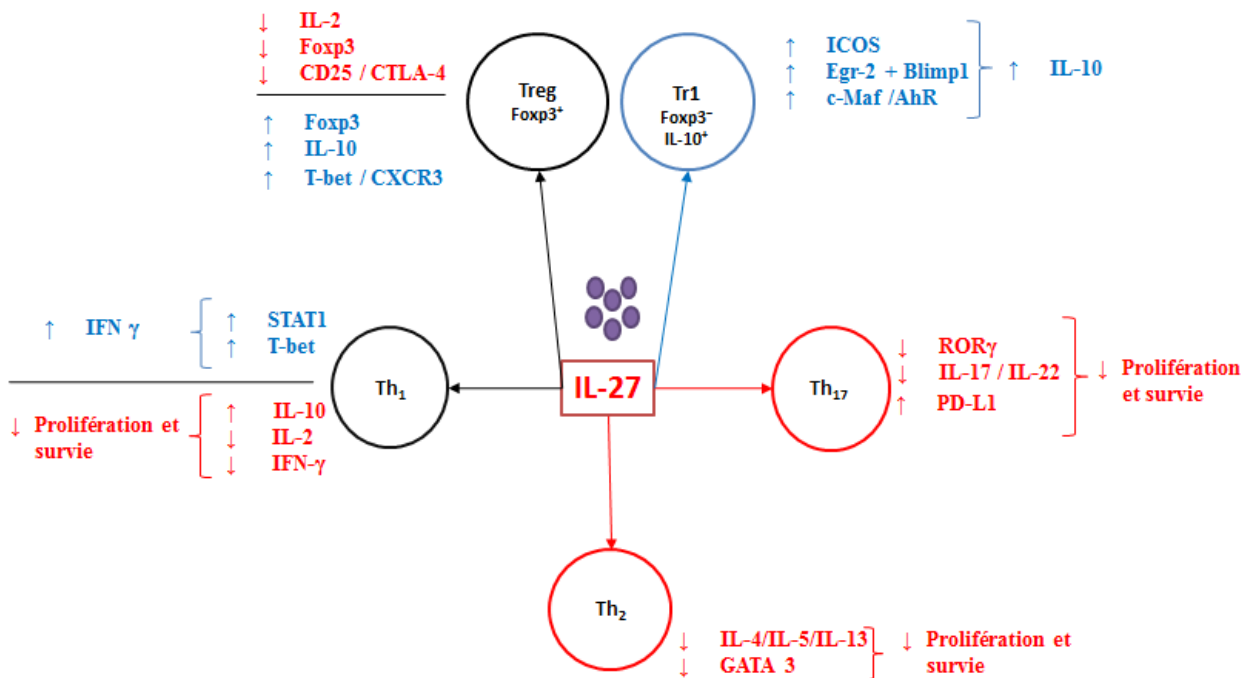


Figure 11 : Résumé de l'effet pléiotrope de l'IL-27 sur plusieurs sous-populations de LT CD4⁺.

Les Th₂ et les Th₁₇ sont inhibés par l'IL-27 (cellules rouges). Les Tr₁ sont stimulés par l'IL-27 (cellule bleue). L'effet de l'IL-27 sur les Th₁ et les Treg Foxp3⁺ est moins tranché, avec à la fois des effets stimulants et inhibiteurs (cellules noires).

Effet sur les DC

Bien que la plupart des études se soient concentrées sur l'effet de l'IL-27 sur les lymphocytes, les DC expriment également un récepteur fonctionnel à l'IL-27 et cette dernière influence leur fonction. Une étude récente a démontré que l'IL-27 améliorerait la capacité de présentation de l'antigène des DC dérivées de monocytes en augmentant l'expression du CMH de classe II et des molécules associées à l'activation des LT comme le CD40. Logiquement, les DC dérivées en présence d'IL-27 induisent une prolifération des LT plus forte qu'en son absence. Enfin, les DC différenciées en présence d'IL-27 ont une acidification des phagosomes plus importante, corrélée à une expression augmentée des V-ATPases et à une accumulation plus forte de la cathepsine D, une endopeptidase lysosomale. De ce fait, les DC dérivées en présence d'IL-27 contrôlent plus efficacement une infection par *S. aureus* (Jung et al., 2015).

À l'opposé de ces effets stimulants récemment décrits, une étude plus ancienne a montré que la stimulation de DC en présence d'IL-27 conduisait à une augmentation de l'expression de PD-L1 (aussi appelée B7-H1) et réduisait leur capacité à stimuler les LT (Karakhanova et al., 2011). Un autre effet anti-inflammatoire de l'IL-27 passe par l'induction de l'expression du CD39 sur les DC (Mascanfroni et al., 2013). Le CD39 dégrade l'ATP extracellulaire et ainsi limite l'activation de l'inflammasome. Enfin, le traitement de DC par l'IL-27 altère leur capacité de présentation de l'antigène médiée par le CMH de classe I (Morandi et al., 2014).

E. Rôle de l'IL-27 dans les pathologies inflammatoires et auto-immunes

Compte tenu des effets globalement anti-inflammatoires de l'IL-27 sur les LT, plusieurs équipes se sont intéressées à déterminer si l'IL-27 pouvait représenter une nouvelle cible thérapeutique dans les pathologies impliquant une réponse non contrôlée des LT.

Effets sur l'arthrite

Un des modèles animaux très fréquemment utilisé pour étudier les mécanismes impliqués dans le développement de l'arthrite destructrice est l'arthrite expérimentale au collagène (AEC). Le déclenchement de l'AEC nécessite à la fois une réponse cellulaire médiée par les LT et une réponse humorale médiée par les LB. Dans ce modèle, l'expression locale d'IL-27 par injection d'un adénovirus dans l'articulation permet de limiter l'inflammation et les érosions osseuses, réduisant ainsi la sévérité des symptômes cliniques (Pickens et al., 2011). L'effet anti-inflammatoire de l'IL-27 dans ce modèle est corrélé à une réduction significative du pourcentage de Th₁₇ dans l'articulation des souris traitées. Une autre étude a confirmé l'effet protecteur de l'IL-27 dans ce modèle et a montré que l'IL-27 faisait pencher la balance Th₁₇/Treg en faveur des Treg dans ce contexte (Moon et al., 2013). De manière intéressante, un effet comparable sur la balance Th₁₇/Treg a été observé sur les cellules isolées à partir du sang de patients atteints de PR.

Un autre modèle animal d'arthrite auto-immune est l'arthrite induite par adjuvant. Il consiste en l'injection d'une souche inactivée de *Mycobacterium tuberculosis* à des rats Lewis. Dans ce modèle, l'injection d'IL-27 avant ou pendant l'apparition des symptômes permet de réduire la sévérité des arthrites, et inhibe la production d'IL-17 (Rajaiah et al., 2011).

En plus de son effet inhibiteur sur les Th₁₇, il a été montré que l'IL-27 avait la capacité d'inhiber la formation des ostéoclastes, responsables de la destruction osseuse. Cette régulation des ostéoclastes peut passer par l'inhibition de leur différenciation (Kamiya et al., 2007), l'induction d'IFN- γ (Park et al., 2012), ou encore par la réduction de la signalisation induite par RANKL, facteur clé dans l'induction de l'ostéoclastogénèse (Furukawa et al., 2009).

L'ensemble de ces données indique donc que l'IL-27 exercerait un effet protecteur envers l'arthrite expérimentale. Cependant, d'autres études ont aussi démontré des effets pro-inflammatoires de l'IL-27 sur l'arthrite. En effet, des concentrations significativement plus importantes d'IL-27 sont mesurées dans le plasma de patients atteints de PR alors même que cette cytokine induit la production de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL-6 et la MMP-1 par les FLS (*Fibroblast-Like Synoviocytes*) de patients (Wong et al., 2010). De plus, dans le modèle de l'arthrite à adjuvant, la neutralisation par un anticorps de la sous-unité p28 a permis

de réduire la sévérité des symptômes, cette protection partielle étant associée à une diminution de la réponse Th₁ (Goldberg et al., 2004). Enfin, dans un autre modèle d'arthrite, induite par injection de protéoglycane (modèle PGIA), les souris déficientes en IL-27R α ont eu des symptômes retardés et une sévérité diminuée par rapport aux souris exprimant l'IL-27R α . Cette production étant là-aussi associée à une diminution du nombre de cellules produisant de l'IFN- γ , sans modification de celles produisant de l'IL-4 (Th₂) ou de l'IL-17 (Th₁₇) (Cao et al., 2008).

En résumé, l'injection d'IL-27 inhibe le développement des arthrites mais des études analysant indirectement l'effet de cette cytokine indiquent aussi qu'elle peut être délétère en induisant la production d'IFN- γ . Il est toutefois possible que la délétion de l'IL-27R α dévoile aussi l'influence de ligands de ce récepteur autres que l'IL-27 et qui n'auraient pas encore été identifiés, rendant l'interprétation de ces résultats complexe.

Effets sur la colite

Plusieurs arguments laissent penser que les Th₁₇ sont impliqués dans le développement des MICI (Weaver et al., 2013). Compte tenu de l'effet antagoniste de l'IL-27 sur cette population, l'impact de cette cytokine sur différents modèles animaux de colite a été largement étudié.

L'injection d'acide 2, 4, 6-trinitrobenzène sulfonique (TNBS) à des souris induit une colite aiguë, avec diminution transitoire du poids et de la longueur du colon. L'injection sous-cutanée d'IL-27 permet de réduire fortement l'inflammation intestinale tout en inhibant le développement des Th₁₇ et la synthèse des cytokines impliquées dans cette voie (IL-17A, IL-1 β , IL-6). L'IL-27 exerce une activité anti-inflammatoire comparable dans le modèle de colite induite par administration de dextran sodium sulfate (DSS) dans l'eau de boisson des souris (Sasaoka et al., 2011).

Un autre modèle de colite est obtenu par le transfert adoptif de LT CD4⁺ CD45RB^{hi} à des souris n'exprimant pas la recombinase Rag1 (souris Rag1^{-/-}). Rag1 jouant un rôle clé dans la recombinaison V-D-J des récepteurs lymphocytaires T et B, les souris Rag1^{-/-} n'ont aucun LT ou LB. La colite se développe environ 7 semaines après le transfert des LT CD45RB^{hi}. Dans ce modèle, l'administration intra-luminale d'IL-27, grâce à la bactérie *Lactococcus Lactis* génétiquement modifiée, a permis d'atténuer fortement la colite (Hanson et al., 2014).

Ces résultats montrent donc, dans 3 modèles expérimentaux différents, que l'administration d'IL-27 exerce un effet protecteur vis-à-vis de la colite, en faisant ainsi une nouvelle cible thérapeutique de choix pour cette pathologie (Andrews et al., 2016).

De façon analogue aux observations effectuées dans le cadre de l'arthrite, d'autres études indiquent cependant indirectement un effet promoteur possible de l'IL-27 sur la colite. Par exemple, les souris IL-10^{-/-} développent spontanément une colite, et les souris déficientes pour IL-10 et l'IL-27R α ont un retard d'apparition de cette colite, ce qui suggère dans ce cas que l'IL-27 favoriserait l'apparition de la colite (Villarino et al., 2008). Dans le modèle de colite induite par le transfert de LT CD4⁺ CD45RB^{hi}, la délétion de l'IL-27R α chez la souris donneuse (Cox et al., 2011) ou receveuse (Visperas et al., 2014) conduit à une résistance vis-à-vis de la colite. Enfin, les souris déficientes en IL-27R α ont une colite moins sévère que les souris témoins lors de l'induction par le DSS, corrélée à une réduction de l'expression d'IFN- γ , d'IL-6 et de TNF- α (Honda et al., 2005). Ce dernier résultat semble contradictoire avec l'effet protecteur induit par l'injection d'IL-27 dans le même modèle (Sasaoka et al., 2011).

Effets sur le psoriasis

L'IL-27 influence les conséquences de deux cytokines jouant un rôle important dans le développement du psoriasis, le TNF- α et l'IL-18. D'un côté, l'IL-27 réduit la synthèse d'IL-1 α et de CCL20 (qui attire les lymphocytes exprimant le CCR6, notamment les Th₁₇) induite par le TNF- α (Shibata et al., 2010). Concernant l'IL-18, l'IL-27 peut induire la synthèse de l'IL-18 binding protein (IL-18BP), un antagoniste naturel de l'IL-18, par les kératinocytes et les fibroblastes humains (Wittmann et al., 2012). Cependant, les concentrations sériques d'IL-27 sont plus élevées chez les patients atteints de psoriasis que les sujets sains et cette concentration d'IL-27 est positivement corrélée avec la sévérité de la pathologie et la concentration sérique d'IFN- γ (Shibata et al., 2010), suggérant un effet délétère de l'IL-27 par induction de la réponse Th₁. Cette hypothèse est renforcée par le fait que dans le modèle murin de psoriasis induit par l'imiquimod (agoniste des TLR 7 et 8), l'injection locale d'IL-27 en sous-cutané augmente la sévérité des lésions psoriasiques. Cette augmentation de la sévérité de la pathologie est corrélée à une augmentation de plusieurs molécules pro-inflammatoires, notamment l'IFN- γ (Shibata et al., 2013).

Effets sur l'uvéite

Le principal modèle animal pour l'étude des mécanismes physiopathologiques de l'uvéite est l'uvéite autoimmune expérimentale (EAU), dans lequel des souris sont immunisées par un peptide dérivé de la protéine *interphotoreceptor retinoid-binding protein* (IRBP). Différentes études ont montré que les Th₁ et les Th₁₇ étaient capables d'induire l'EAU. Dans ce contexte, les souris n'exprimant pas l'IL-27R α sont partiellement protégées de l'EAU à la phase précoce de la pathologie (Sonoda et al., 2007). Cette réduction des symptômes étant corrélée à

une plus faible production d'IFN- γ par les LT CD4⁺, ces données suggèrent que l'IL-27 est délétère dans la phase précoce de l'UAE par sa capacité à induire l'expression d'IFN- γ . Des résultats similaires ont été observés pour les souris n'exprimant la sous-unité EB13 de l'IL-27 (Takeda et al., 2014). Par opposition à son effet pro-Th₁, un étude de 2007 a montré que l'IL-27 était capable d'inhiber les Th₁₇ dans le modèle de l'UAE (Amadi-Obi et al., 2007). L'injection d'IL-27 à des souris immunisées par IRBP permettra de déterminer si l'IL-27 est formellement pro- ou anti-inflammatoire dans l'uvéite expérimentale.

Comme nous pouvons l'observer, l'IL-27 possède une efficacité clinique dans plusieurs modèles expérimentaux de pathologies associées à la SpA, notamment l'arthrite et la colite, dans lesquels elle réduit la proportion de Th₁₇. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'expansion des Th₁₇ observée chez le rat B27 pourrait être liée à la sous-expression de l'IL-27 par la DC de rat B27 (Fert et al., 2014).

Objectif de la thèse

La SpA représente le second rhumatisme inflammatoire chronique avec une prévalence de 0,43% en France. Il s'agit d'une pathologie extrêmement complexe dont la cause demeure encore largement inconnue à ce jour malgré les nombreuses hypothèses formulées et la découverte il y a 40 ans de sa très forte association au HLA-B27. Ce travail de thèse vise à la fois à mieux comprendre les mécanismes immunologiques impliqués dans le développement de la SpA, et à proposer de nouvelles cibles thérapeutiques, les traitements actuels, dont aucun n'est curatif, n'étant pas efficaces chez tous les patients.

Le modèle animal du rat B27 a permis de démontrer l'importance de deux populations cellulaires dans la SpA, les CPA exprimant le transgène HLA-B27, et les LT CD4⁺ qui sont les effecteurs de la pathologie. Le laboratoire a précédemment démontré une expansion biaisée des lymphocytes Th₁₇, pathogènes dans la SpA, comme a pu le démontrer l'efficacité des traitements anti-IL-17 chez l'Homme.

Nous avons exploré deux hypothèses afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la déviation de la réponse T vers la voie Th₁₇ pathogène chez le rat B27. Nous avons émis l'hypothèse que le développement de la réponse Th₁₇ chez ces rats B27 pourrait être associé à un défaut du nombre et/ou de la fonction des Treg dont le rôle est d'empêcher l'établissement d'une réponse immune pathogène pour l'hôte. Un déséquilibre de la balance Th₁₇/Treg a déjà été décrit dans plusieurs pathologies inflammatoires. Nous nous sommes donc attelés à caractériser les Treg chez le rat B27.

D'autre part, les DC qui favorisent l'expansion des Th₁₇ sous-expriment l'interleukine 27 (IL-27), cytokine anti-inflammatoire capable d'inhiber les Th₁₇ et qui réduit la sévérité des symptômes dans les modèles expérimentaux de colite et d'arthrite. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'addition d'IL-27 exogène pourrait inhiber le phénotype pro-inflammatoire des LT CD4⁺ du rat B27.

TRAVAUX ORIGINAUX

Article 1: La production accrue d'IL-17 par rapport à l'IL-10 par les Treg implique la molécule ICOS dans un modèle expérimental de spondyloarthrite

Increased Production of Interleukin-17 over Interleukin-10 by Treg Cells Implicates Inducible Costimulatory Molecule In Experimental Spondyloarthritis

Luiza M. Araujo, Ingrid Fert, Quentin Jouhault, Karine Labroquère, Muriel Andrieu, Gilles Chiocchia, Maxime Breban

Article publié dans « Arthritis & Rheumatology » en septembre 2014

Les rats transgéniques pour le HLA-B27 et la β 2-microglobuline humaine (rats B27) représentent un excellent modèle de SpA car ils développent spontanément un phénotype très proche de la SpA humaine. Par des expériences de transfert cellulaire, le rôle crucial des cellules originaires de la moelle osseuse et des LT CD4⁺ a été démontré. Une étude approfondie des LT CD4⁺ chez le rat B27 a notamment montré la forte expansion d'un sous-type particulier de LT CD4⁺, les lymphocytes Th₁₇ producteurs d'IL-17 pathogénique dans la SpA, que les DC du rat B27 induisent préférentiellement.

Nous avons émis l'hypothèse que cette expansion des Th₁₇ chez le rat B27 pourrait être liée à un défaut du nombre et/ou de la fonctionnalité des Treg, population clé dans le maintien de l'homéostasie immune.

Bien que le nombre absolu de Treg soit plus élevé dans les ganglions mésentériques de rats B27 que dans les ganglions de rats non transgéniques (NTG), la proportion de Treg par rapport aux LT effecteurs (Teff) est diminuée chez le rat B27. Cette baisse du ratio Teff/Treg n'est pas liée à une altération de la capacité suppressive des Treg de rats B27, qui est similaire à celle des Treg de rats NTG. Cependant, nous avons observé que les Treg de rats B27 présentent un déséquilibre de la balance IL-17/IL-10. En effet, ils surexpriment l'IL-17 pro-inflammatoire et sous-expriment l'IL-10 anti-inflammatoire par rapport aux Treg de rats NTG. En accord avec ce résultat, nous avons observé une augmentation de la proportion de cellules productrices d'IL-17 parmi les Treg CD25^{high} FoxP3⁺ *ex vivo*. Ainsi, il semble que les Treg de rats B27 participent à

l'établissement de l'inflammation par ce déséquilibre de la balance IL-17/IL-10. Il est important de noter que les DC de rats B27, qui participent notamment à l'expansion des Th₁₇ (Glatigny et al., 2012), sont également impliquées dans l'établissement de ce phénotype pro-inflammatoire observé chez les Treg de rats B27.

Bien que l'expression de plusieurs molécules de surface impliquées dans la fonction suppressive des Treg, comme GITR, CTLA-4 et LAG-3, soit similaire entre les Treg de rats NTG et B27, nous avons observé que les Treg de rats B27 surexpriment la molécule ICOS. Sachant qu'il a été démontré que la stimulation d'ICOS peut induire le développement de LT producteurs d'IL-17 (Paulos et al., 2010), nous avons émis l'hypothèse que cette expression accrue d'ICOS à la surface des Treg est impliquée dans le déséquilibre de la balance IL-17/IL-10 observé dans ces cellules.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons effectué des co-cultures de LT et de DC en présence ou en absence d'un anticorps bloquant l'interaction ICOS/ICOSL. De façon très intéressante, le blocage de l'interaction entre ICOS et ICOS ligand *in vitro* permet de restaurer la balance IL-17/IL-10 en faveur de l'IL-10 dans les Treg et les Teff de rats B27.

L'ensemble de ces résultats suggère donc que les Treg, notamment par leur synthèse accrue d'IL-17, participent au développement de la SpA chez le rat. Nous avons de plus mis en évidence le rôle majeur d'ICOS dans le développement de lymphocytes T producteurs d'IL-17 pathogénique chez le rat B27.

Increased Production of Interleukin-17 Over Interleukin-10 by Treg Cells Implicates Inducible Costimulator Molecule in Experimental Spondyloarthritis

Luiza M. Araujo,¹ Ingrid Fert,¹ Quentin Jouhault,¹ Karine Labroquère,² Muriel Andrieu,² Gilles Chiochia,¹ and Maxime Breban³

Objective. HLA-B27/human β_2 -microglobulin (h β_2 m)-transgenic (B27-transgenic) rats develop an inflammatory disorder resembling spondyloarthritis, with accumulation of proinflammatory Th17 cells. Because Treg cells and Th17 cells have opposing effects in inflammatory disorders, we sought to determine whether biased expansion of Th17 cells could result from altered Treg cell frequency and/or function in B27-transgenic rats.

Methods. We characterized the phenotype and function of Treg cells from B27-transgenic rats in comparison with those from control rats, by examining their expression of cell surface markers, suppressive activity, cytokine production, and differentiation pattern.

Results. In B27-transgenic rats, the preferential accumulation of CD4⁺ Teff cells over Treg cells was not

associated with a defect in Treg cell differentiation or suppressive activity. The expression of Treg cell markers was similar between B27-transgenic and control rats, with the exception of the inducible costimulator (ICOS) molecule, which was overexpressed in B27-transgenic rats. High levels of ICOS are considered to be a hallmark of Treg cells with heightened suppressive activity and interleukin-10 (IL-10) expression. Paradoxically, the production of IL-10 by Treg cells was reduced in B27-transgenic rats, whereas the production of IL-17 was enhanced. Moreover, the addition of anti-ICOS monoclonal antibodies during Treg cell differentiation in the presence of dendritic cells from B27-transgenic rats reversed this cytokine profile, restoring the balance between IL-10 and IL-17 in Treg cells from B27-transgenic rats.

Conclusion. We observed dysregulated production of IL-10 and IL-17 by Treg cells from B27-transgenic rats, which may contribute to disease development. Moreover, our data highlight a key role for ICOS signaling in the generation of imbalanced production of IL-10 and IL-17 by Treg cells in this experimental model of spondyloarthritis.

Supported by INSERM and by the French National Agency for Research (DCSPA [Molecular Role of HLA-B27 in Spondylarthritis, From Animal Model to Human Disease] grant ANR-Physiopath 2007-2011 and Investments for the Future Programme grant ANR-11-IDEX-0005-02, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire d'Excellence Inflammex).

¹Luiza M. Araujo, PhD, Ingrid Fert, MS, Quentin Jouhault, MS, Gilles Chiochia, PhD: INSERM U987 and Université de Versailles St.-Quentin-en-Yvelines, Montigny-le-Bretonneux, France, and Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, and Laboratoire d'Excellence Inflammex, Paris, France; ²Karine Labroquère, MS, Muriel Andrieu, PhD: Institut Cochin, INSERM U1016, and CNRS (UMR 8104), Paris, France; ³Maxime Breban, MD, PhD: INSERM U987 and Université de Versailles St.-Quentin-en-Yvelines, Montigny-le-Bretonneux, France, Hôpital Ambroise Paré, AP-HP, and Université de Versailles St.-Quentin-en-Yvelines, Boulogne-Billancourt, France, and Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, and Laboratoire d'Excellence Inflammex, Paris, France.

Address correspondence to Maxime Breban, MD, PhD, Hôpital Ambroise Paré, Service de Rhumatologie, 9 Avenue Charles de Gaulle, 92100 Boulogne-Billancourt, France. E-mail: maxime.breban@apr.aphp.fr.

Submitted for publication June 30, 2013; accepted in revised form June 3, 2014.

Spondyloarthritis (SpA) is a type of chronic inflammatory disorder that predominantly affects the spine and sacroiliac joints. These cardinal features frequently combine with peripheral joint arthritis, enthesitis, and extraarticular manifestations, the most frequent of which are uveitis, psoriasis, and inflammatory bowel disease, including Crohn's disease and ulcerative colitis (1). SpA is a highly heritable disorder involving multiple genetic factors, among which the HLA-B27 allele plays a prominent role (2). The association between HLA-B27 and SpA was first described 40 years ago, but the mechanism of this association remains largely unexplained (3).

Several lines of HLA-B27/human β_2 -microglobulin ($h\beta_2m$)-transgenic (B27-transgenic) rats develop a spontaneous multisystem inflammatory disease closely resembling human SpA (with colitis and psoriatic skin lesions developing in the presence of normal microbial flora) (4,5). Transfer experiments have demonstrated a fundamental role of bone marrow-derived cells bearing the HLA-B27/ $h\beta_2m$ transgene in the development of SpA and led us to speculate that such a triggering role might be attributed to antigen-presenting cells (APCs) (6). Consistent with our hypothesis, a correlation between susceptibility to SpA and several aberrant dendritic cell (DC) functions has been demonstrated in the rat model, providing evidence for the importance of these phenomena as putative causal factors in the development of SpA (7–12). One of the most striking abnormal features of B27-transgenic rat DCs is their reduced capacity to stimulate T cells by a mechanism that involves, at least in part, impaired engagement of costimulatory molecules (8–10).

In addition, it has been previously shown that proinflammatory Th17 cells are expanded in vivo in B27-transgenic rats and accumulate in parallel with disease development (13,14). Moreover, after in vitro stimulation, Th17 cells were preferentially induced and expanded by DCs from B27-transgenic rats, by a contact-dependent mechanism that may involve defective engagement of costimulatory molecules (14).

Treg cells that suppress T_H17 cell proliferation and function play an important role in maintaining peripheral tolerance and immune homeostasis. A reduction in Treg cell numbers or functionality leads to the loss of self-tolerance and an increase in autoimmunity (15–18). Two major categories of Treg cells have been described: naturally occurring, thymically derived CD4⁺CD25^{high} Treg cells and inducible Treg cells, which can be induced under particular conditions of antigenic stimulation. These cells produce antiinflammatory cytokines such as interleukin-10 (IL-10) and transforming growth factor β (TGF β), and their expansion requires the delivery of antigen stimulation and costimulatory signals by APCs (19). It has been clearly established that DCs are crucially involved in the induction of Treg cells (20,21). However, the interaction between DCs and Treg cells does not occur in a one-way direction, because several recent studies revealed that Treg cells have an impact on DC development (22–24).

In recent years, data have accumulated to show the crucial roles of Treg cells and Th17 cells in the development and/or regulation of numerous inflammatory/autoimmune disorders (25–29). Although Treg cells are

generally protective, Th17 cells enhance pathogenic responses through induction of various proinflammatory reactions (30). Given that Treg cells and Th17 cells have been described as 2 distinct subsets with opposing effects on inflammatory disorders, we hypothesized that the Th17 cell bias observed in B27-transgenic rats could potentially result from a decreased frequency and/or a functional defect of Treg cells. To test this hypothesis, we compared the phenotype and function of Treg cells in B27-transgenic rats and control rats.

MATERIALS AND METHODS

Animals. The HLA-B/ $h\beta_2m$ -transgenic rat lines used in this study were originally produced at the University of Texas Southwestern Medical Center. The disease-prone HLA-B27/ $h\beta_2m$ -transgenic rat line 33-3, bearing 55 copies of HLA-B*2705 and 28 copies of $h\beta_2m$, and the disease-free HLA-B7/ $h\beta_2m$ -transgenic rat line 120-4, bearing 52 copies of HLA-B*0702 and 26 copies of $h\beta_2m$, were both on an F344 background. The number of $h\beta_2m$ transgene copies in the 33-3 and 120-4 rat lines was recently reevaluated using a quantitative polymerase chain reaction (PCR) method that was more sensitive than the previously used dot-blot estimation (4). Nontransgenic F344 rats and their disease-prone B27-transgenic littermates were used as controls. All rats were bred and maintained under conventional conditions. Age- and sex-matched rats (2–12 months of age) were used in each experiment. Starting at 6 weeks of age, B27-transgenic rats of the 33-3 line routinely develop a spectrum of manifestations resembling human SpA, including inflammatory bowel disease similar to ulcerative colitis, peripheral arthritis, and late inflammatory skin and nail lesions resembling human psoriasis (4). All animal procedures were approved by the Institutional Animal Experimentation Ethical Committee.

Cell culture, reagents, and monoclonal antibodies. Cell cultures were performed in RPMI 1640 medium with GlutaMax I (Life Technologies) supplemented with 10% fetal calf serum, streptomycin (100 μ g/ml), 2% sodium pyruvate, 0.05 mM 2-mercaptoethanol, and 5 mM HEPES (complete medium). Purified mouse monoclonal antibodies specific for rat CD3 (clone GK.18) as well as fluorochrome-conjugated mouse monoclonal antibodies specific for rat CD4 (clone OX-38), CD25 (clone OX-39), IL-10 (clone A5-4), IL-17 (clone TC11-18H10), glucocorticoid-induced factor receptor (GITR; clone DTA-1), and lymphocyte activation gene 3 (LAG-3; clone C987W) were obtained from BD Pharmingen. Mouse anti-FoxP3 (clone FJK-16s), CTLA-4 (clone WKH203), CD62L (clone OX-85), and inducible costimulatory molecule (ICOS; clone C398.4A) monoclonal antibodies were obtained from eBioscience. Human/mouse monoclonal antibodies to STAT-3 phosphorylated at tyrosine residue 705 were purchased from BD Pharmingen. Recombinant rat IL-2 and TGF β were purchased from ImmunoTools. Phorbol myristate acetate (PMA), ionomycin, brefeldin A, and concanavalin A (Con A) were purchased from Sigma.

Cell preparation. Single-cell suspensions were prepared from lymph nodes (LNs), followed by flow cytometric

analysis using a FACSAria cell sorter (BD Biosciences). Combinations of markers were used to sort naive CD4⁺ T cells (CD4⁺CD25⁻CD62L⁺), Treg cells (CD4⁺CD25^{high}), and responder T cells (hereafter called indicator T cells [CD4⁺CD25⁻]). CD103⁺ DCs were obtained from spleen, as previously described (8,9), after digestion in collagenase D (Roche Diagnostics), centrifugation on a 14.5% Nycodenz gradient (Nycomed), and positive selection by magnetic-activated cell sorting using mouse anti-rat CD103 monoclonal antibody-coated microbeads (Miltenyi Biotec).

Flow cytometric analysis. Flow cytometry was performed using a combination of anti-CD25 and anti-FoxP3 to distinguish 2 populations of CD4⁺ T cells, namely, CD25⁺FoxP3⁺ Treg cells and activated CD25⁺FoxP3⁻ Teff cells. FoxP3 staining was performed according to the manufacturer's instructions. Labeled cells were analyzed with a FACSCanto II system (BD Biosciences). Anti-GITR, anti-LAG-3, anti-CTLA-4, and anti-ICOS were used to characterize Treg cells. Flow cytometric analysis of pSTAT-3 staining was performed according to the manufacturer's instructions by immediate fixation with BD Phosflow Fix Buffer and Perm Buffer III (BD Biosciences). For intracellular cytokine staining, LN cells were incubated for 4 hours with PMA (10 ng/ml), ionomycin (1 μg/ml), and brefeldin A (2 μg/ml), and the data were analyzed using FlowJo software (Tree Star).

In vitro suppression assay. CD4⁺CD25⁻ nontransgenic indicator T cells (2×10^5 /well) sorted by flow cytometry were cultured with nontransgenic APCs (irradiated spleen cells; 2×10^5 /well) in the presence of Con A (2 μg/ml) (Sigma), using 96-well plates. Flow cytometry-sorted CD4⁺CD25^{high} Treg cells were cultured alone (2×10^5 cells/well) or added to the indicator T cell cultures at the indicated ratios. After 48 hours, supernatants were collected to determine cytokine levels, using enzyme-linked immunosorbent assays (eBioscience), and proliferation was assessed by measuring incorporation of ³H-thymidine (Amersham Biosciences).

In vitro Treg cell differentiation. For polarization experiments, flow cytometry-sorted naive LN T cells (CD4⁺CD25⁻CD62L⁺) were cultured (5×10^5 /well) with irradiated CD103⁺ splenic DCs (1×10^5 /well) and coated with anti-CD3 monoclonal antibody (2 μg/ml) in the presence of TGFβ (2 ng/ml). IL-2 (20 ng/ml) was added on day 3, and cells were harvested on day 6 for stimulation with PMA/ionomycin and intracellular cytokine staining, as described above.

CD4⁺ T cell stimulation with IL-27 or thapsigargin. Resting CD4⁺ T cells were purified by negative selection from LN cell suspensions obtained from B27-transgenic or nontransgenic rats. Combinations of the monoclonal antibodies OX33, 3.2.3, OX42, and OX8 were used to deplete B cells, natural killer cells, monocyte/macrophages, and CD8⁺ T cells, respectively, as previously described (31). Purity (>95%) was assessed by flow cytometry. CD4⁺ T cells (2.0×10^6) were cultured with IL-27 (10 ng/ml) (ImmunoTools) for 24 hours or with thapsigargin (2.5–10 μM) (Sigma) for 1 hour. The unfolded protein response was detected by assessing X-box binding protein 1 (XBP-1) splicing, using semiquantitative PCR with the following *Xbp1*-specific primers (forward and reverse, respectively): GGATGAATGCCCTGGTTACT and CCAAAGGATATCAGACTCAGAA. The PCR product was run on a 3% agarose gel to visualize unspliced and spliced

XBP-1 products. Ethidium bromide signal was measured on a GeneGenius Imaging System (Syngene) and quantitated using ImageJ software. Percent splicing refers to the optical density of spliced bands divided by total optical density (spliced plus unspliced) $\times 100$.

Real-time PCR. RNA was extracted from mesenteric LN Treg cells (CD4⁺CD25^{high}) using an RNeasy Mini Kit (Qiagen). The RNA quality was assessed with an Agilent 2100 Bioanalyzer, and samples were quantified using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). Complementary DNA (cDNA) was transcribed with SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen), and PCR was performed using a LightCycler 480 SYBR Green I Master instrument (Roche) and a LightCycler LC480 real-time PCR system (Roche). The total amount of messenger RNA (mRNA) was normalized across samples according to endogenous *Hprt1* mRNA. The primer sequences (forward and reverse, respectively) were as follows: for *Hprt1*, TTGTGTCATCAGCGAAAGTG and ATGGCCACAGGACTAGAAC; for *Il10*, GAACCACCCGGC-ATCTACT and CAAGGAGTTGCTCCCGTTAG; for *Il17*, AGGCGGGGTTAGAATTGTCT and AAGCCACAGAA-AAACAAGAA; for *Ahr*, ATCACACGCCAGACCAGCTT and ATTCATTGCCAGGAAACCAG; for *Il21*, AAACCTCC-CCATGATGCTCAC and AGCTCCGAGTTCATTTTCCA; for *c-maf*, TCTTTTTACACCGCCTACCC and CCGGGTCAAAGGTGAGTTA; for *Tgfb*, GACTCTCCACCTGCAA-GACC and CGAGCCTTAGTTTGGACAGG; for *Rorc*, TG-ATGAGATTGCCCTCTACAC and GGAGGCCTTGTCGATGAGTC; for *Ifng*, GGCCATCAGCAACAACATAAG and TGGGTTGTTCACTCGAACTT; and for *Il22*, ACCAAGC-TCAGCAGTCACCT and AGTTCCCCGATCGCTTTAAT.

Statistical analysis. Data are expressed as the mean \pm SEM. The significance of differences was assessed using Student's unpaired 2-tailed *t*-test or the Mann-Whitney non-parametric U test. *P* values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Accumulation of activated CD25⁺FoxP3⁻ Teff cells in LNs from B27-transgenic rats. To monitor the variation of Treg cells (CD25⁺FoxP3⁺) and activated Teff cells (CD25⁺FoxP3⁻) in secondary lymphoid organs from B27-transgenic and control rats over time, we determined the percentages and numbers of these cells in mesenteric LNs. As shown in Figure 1A, the Teff cell:Treg cell ratio was similar in nontransgenic and HLA-B7-transgenic control rats. In contrast, in B27-transgenic rats, the percentage of Teff cells was increased compared with the percentage of Treg cells. As shown in Figure 1B, there were minor changes in the percentage of Treg cells and Teff cells in nontransgenic rats, from age 3 months to age 1 year. In contrast, the percentage of Teff cells was significantly higher than the percentage of Treg cells in B27-transgenic rats at age

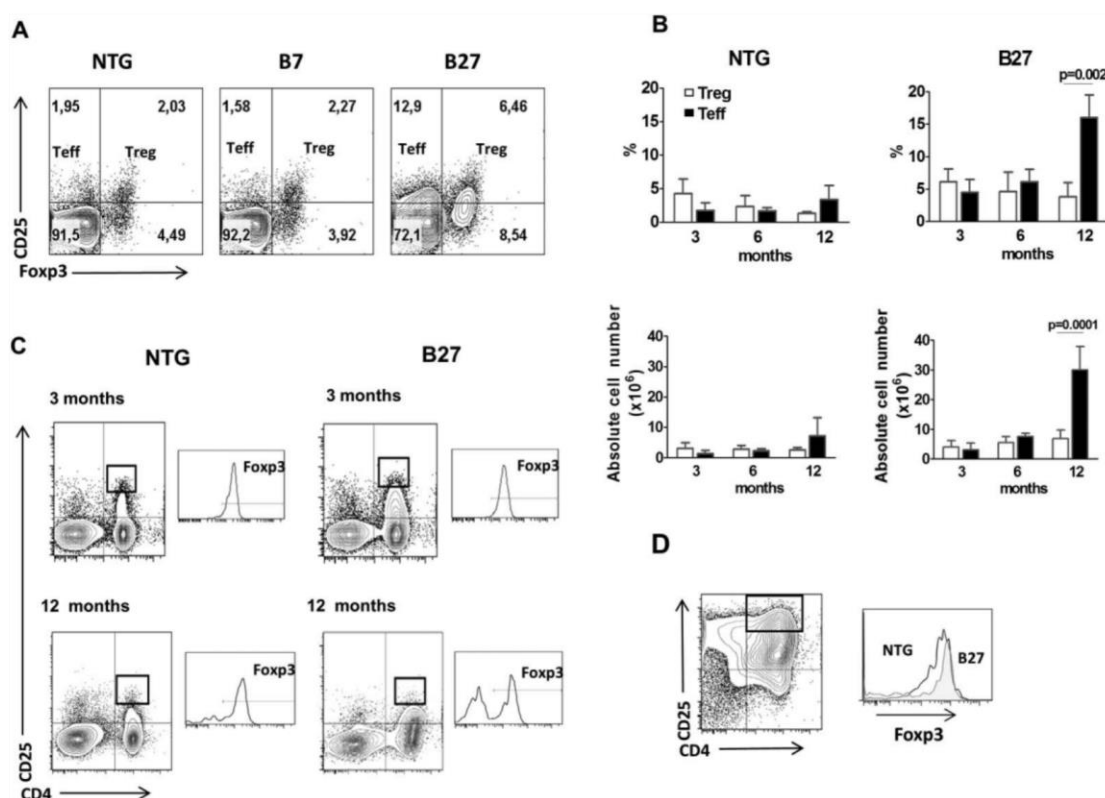


Figure 1. Accumulation of Teff cells in the lymph nodes (LNs) of HLA-B27-transgenic (B27) rats despite a normal proportion of Treg cells. **A**, Dot plots showing the percentage of Treg cells and Teff cells in mesenteric LNs from nontransgenic (NTG), B7-transgenic, and B27-transgenic rats. **B**, Percentages (top) and absolute numbers (bottom) of Treg cells (CD25+FoxP3+) and activated Teff cells (CD25+FoxP3-) in the mesenteric LNs of nontransgenic and B27-transgenic rats at different ages. Values are the mean \pm SEM of pooled results ($n = 4-8$ rats per group) and are representative of 3 independent experiments. **C**, Dot plots showing FoxP3 expression in gated CD4+CD25^{high} Treg cells (boxed areas) from 3-month-old and 1-year-old nontransgenic and B27-transgenic rats. **D**, Dot plots showing the rates of differentiation of naive T cells from B27-transgenic rats and nontransgenic rats into FoxP3+ Treg cells under in vitro Treg cell-polarizing conditions. The dot plots are representative of 3 independent experiments. In **C** and **D**, histograms are shown to the right of the dot plots. Statistical analysis was performed using Student's unpaired 2-tailed *t*-test.

1 year, which is consistent with the previously observed accumulation of Teff cells in these rats (14) (additional information is available from the corresponding author). Similar results were observed when popliteal LNs were used (additional information is available from the corresponding author).

Furthermore, at age 3 months, the majority (>90%) of CD4+CD25^{high} T cells were FoxP3+ in both nontransgenic and B27-transgenic rats, as expected. In contrast, at age 1 year, ~90% of the CD4+CD25^{high} T cells were FoxP3+ in nontransgenic rats compared with only 50% in B27-transgenic rats (Figure 1C). Therefore, to avoid contamination by Teff cells, experiments were further performed using CD4+CD25^{high} Treg cells from rats at ages 3-4 months. Such an accumulation of Teff cells in B27-transgenic rats was not associated with a defect in Treg cell differentiation potential, because we observed similar rates of differentiation of naive T cells

from B27-transgenic rats and nontransgenic rats into FoxP3+ Treg cells under in vitro Treg cell-polarizing conditions (Figure 1D).

Normal suppressive activity of Treg cells from B27-transgenic rats. Despite a decreased proportion of Treg cells relative to Teff cells in B27-transgenic rats, the suppressive activity of Treg cells was not compromised. Hence, sorted Treg cells from nontransgenic and B27-transgenic rats inhibited T cell proliferation to a similar extent (Figure 2). Importantly, Treg cells from B27-transgenic rats also efficiently inhibited the production of IL-17, IFN γ , and IL-10 by activated T cells. Interestingly, supernatants from B27-transgenic rat Treg cell cocultures at the lowest Treg cell:Teff cell ratio (1:5 and 1:25) contained higher levels of IL-17 than those from activated nontransgenic T cells alone (Figure 2). These data suggested that at low concentrations, Treg cells from B27-transgenic rats but not those from nontrans-

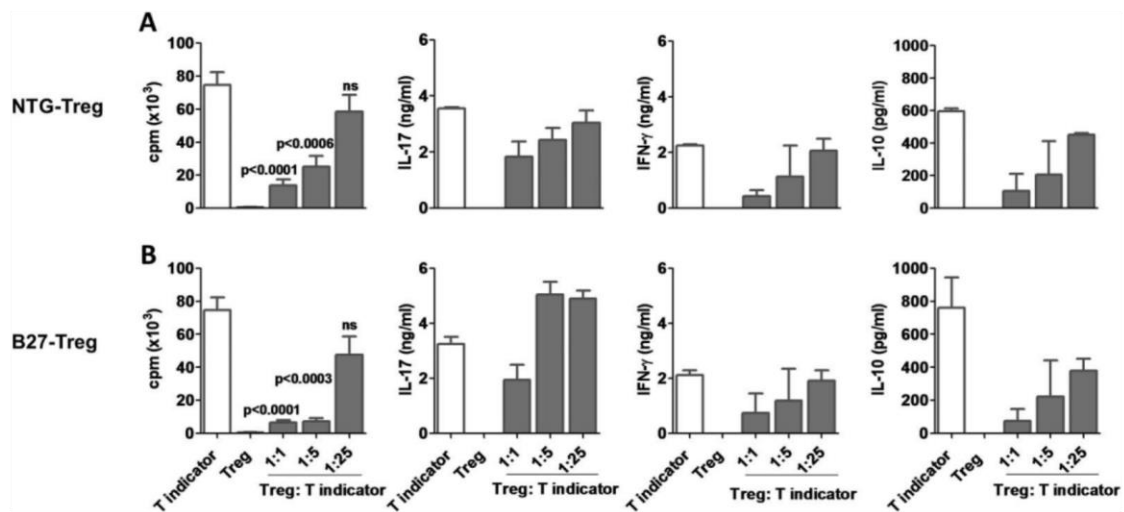


Figure 2. Normal suppressive activity of Treg cells from B27-transgenic rats. The capacity of CD4+CD25^{high} Treg cells from nontransgenic rats (A) and B27-transgenic rats (B) to inhibit concanavalin A-stimulated proliferation of CD4+CD25⁻ indicator T cells from nontransgenic rats was tested in an in vitro suppression assay, in which CD4+CD25⁻ indicator cells were stimulated alone or in the presence of increasing numbers of Treg cells, followed by measurement of ³H-thymidine incorporation. Supernatants from the same cell cultures were collected after 72 hours, and enzyme-linked immunosorbent assays were performed to analyze interleukin-17 (IL-17), interferon- γ (IFN γ), and IL-10 production. Values are the mean \pm SEM (n = 1–2 rats per experiment) and are representative of 3 independent experiments. Statistical analysis was performed using Student's unpaired 2-tailed *t*-test. NS = not significant (see Figure 1 for other definitions).

genic rats promoted and/or produced IL-17 in the presence of nontransgenic Teff cells.

Imbalanced production of IL-10 and IL-17 by Treg cells from B27-transgenic rats. We next studied the production of IL-10 and IL-17 by CD4+CD25^{high} Treg cells isolated from mesenteric LNs. The production of IL-17, as measured by real-time PCR or by intracellular cytokine detection assay, was significantly greater in the Treg cells from B27-transgenic rats than in those from nontransgenic rats (Figure 3A). Of note, IL-17 expression by CD4+CD25^{high} cells was similar in nontransgenic and B7-transgenic control rats (additional information is available from the corresponding author). Conversely, the production of IL-10 was reduced in Treg cells from B27-transgenic rats compared with those from nontransgenic rats (Figure 3A). Consistently, the percentage of IL-17+ FoxP3+ among all FoxP3+ cells was significantly increased in B27-transgenic rats compared with control rats (Figure 3A). In previous experiments, we have always used isotype control to exclude possible nonspecific FoxP3 staining (additional information is available from the corresponding author). However, the expression level of *Rorc*, the gene that codes for retinoic acid receptor γ (which is responsible for Th17 cell differentiation) was similar in Treg cells from nontransgenic rats and those from B27-transgenic rats (additional information is available from the corresponding author).

Given that activation of the transcription factor STAT-3 in Treg cells is critical for their expression of IL-10 and their capacity to limit Th17 cell responses, we performed flow cytometry to study phosphorylation of this transcription factor in Treg cells after IL-6 and IL-10 stimulation. Stimulation with IL-10 or IL-6 markedly induced pSTAT-3 in Treg cells, without a noticeable difference between nontransgenic and B27-transgenic rats (Figure 3B). Thus, it is likely that dysregulation of factors other than STAT-3 could account for the decreased expression of IL-10 observed in Treg cells from B27-transgenic rats.

Because IL-27 is crucial in promoting IL-10 production by CD4+FoxP3+ Treg cells (32), and because we recently observed decreased expression of IL-27 mRNA in B27-transgenic rat DCs (33), we examined in sorted Treg cells the expression of several genes regulated by concurrent production of IL-27 and IL-10: the transcription factors aryl hydrocarbon receptor (AhR) and c-Maf and the cytokine IL-21 (34). Interestingly, the expression of all of these genes was decreased in Treg cells from B27-transgenic rats compared with those from nontransgenic rats (Figure 3C). Thus, decreased IL-10 production by Treg cells from B27-transgenic rats may be linked, at least in part, to deficient IL-27 expression by APCs. The expression of other cytokines, including IFN γ , IL-22, and TGF β , was similar between Treg cells

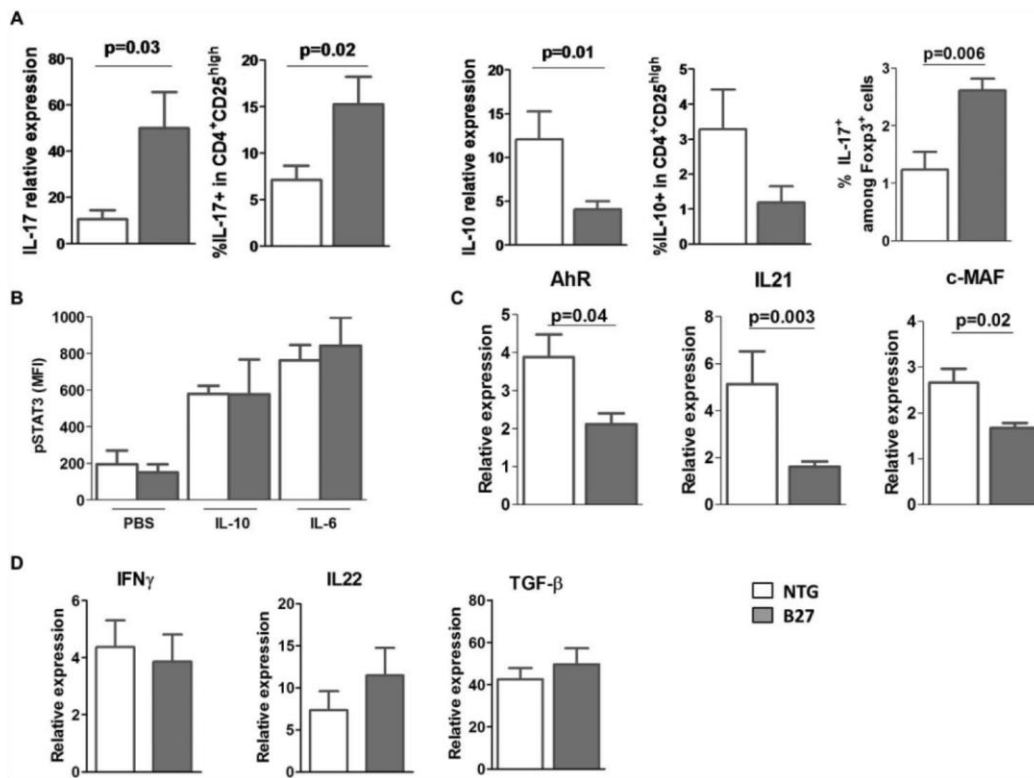


Figure 3. Imbalanced production of IL-10 and IL-17 by Treg cells from HLA-B27-transgenic (B27) rats. **A**, Left panels, IL-17 and IL-10 production by CD4+CD25^{high} Treg cells from mesenteric lymph nodes (LNs) was quantified by flow cytometry and real-time polymerase chain reaction (PCR). Values are the mean \pm SEM of the pooled results of 4 independent experiments ($n = 1-2$ rats per group in each experiment). Far right panel, The percentage of IL-17+ FoxP3+ cells among FoxP3+ cells was determined after phorbol myristate acetate/ionomycin stimulation. Values are the mean \pm SEM of the pooled results of 2 independent experiments ($n = 3-4$ rats per group in each experiment). **B**, Flow cytometric analysis of STAT-3 phosphorylation was performed after IL-10 or IL-6 stimulation of mesenteric LN cells from B27-transgenic and nontransgenic (NTG) rats. Results represent the STAT-3 mean fluorescence intensity (MFI) in gated CD4+CD25^{high} Treg cells. Values are the mean \pm SEM of the pooled results of 3 independent experiments ($n = 2$ rats per group in each experiment). **C** and **D**, Real-time PCR was performed to evaluate the relative expression of aryl hydrocarbon receptor (AhR), IL-21, and c-Maf (**C**), and IFN γ , IL-22, and transforming growth factor β (TGF β) (**D**) in ex vivo-sorted Treg cells. Values are the mean \pm SEM ($n = 7-8$ rats per group). Statistical analysis was performed using Student's unpaired 2-tailed *t*-test (**A**, **B**, and **D**) or a nonparametric Mann-Whitney U test (**C**). PBS = phosphate buffered saline (see Figure 2 for other definitions).

from B27-transgenic rats and those from control rats (Figure 3D).

Increased expression of ICOS on Treg cells from B27-transgenic rats. The expression of several characteristic Treg cell surface markers, including those associated with their suppressor function (e.g., CTLA-4, GITR, and LAG-3), was identical between Treg cells from B27-transgenic rats and those from nontransgenic control rats (additional information is available from the corresponding author). Interestingly, the expression of ICOS, a marker of activation, was significantly increased in Treg cells from B27-transgenic rats compared with those from nontransgenic rats (Figure 4A) or B7-transgenic rats (additional information is available from the corresponding author). This result was paradoxical, because high levels of ICOS expression

are considered to be characteristic of a population of Treg cells with enhanced suppressive activity and IL-10 expression (34-37). However, it was recently shown that the interaction of ICOS on T cells with its ligand (ICOSL) on APCs promoted Th17 cell responses (38).

We further tested whether ICOS expression on CD4+CD25^{high} T cells could be modulated following IL-27 exposure or induction of the unfolded protein response. The results shown in Figure 4B demonstrate a moderate increase in ICOS expression on CD4+CD25^{high} T cells from nontransgenic rats after exposure to exogenous IL-27. In contrast, no effect was observed on CD4+CD25^{high} T cells from B27-transgenic rats, as if ICOS expression on Treg cells from B27-transgenic rats could not be further increased. Moreover, no change in ICOS expression was observed after an unfolded protein

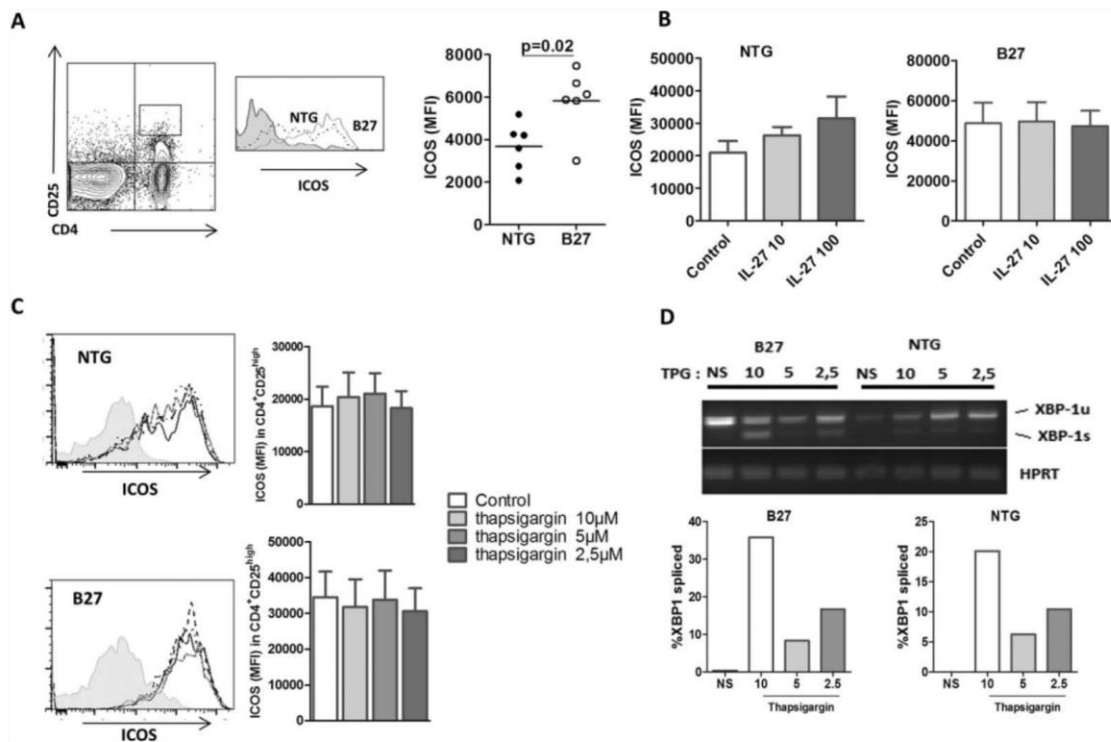


Figure 4. Increased expression of inducible costimulator (ICOS) on CD4+CD25^{high} Treg cells in mesenteric lymph nodes from nontransgenic (NTG) and HLA-B27–transgenic (B27) rats. **A**, Left, Representative dot plots of ICOS expression in Treg cells from B27-transgenic rats and nontransgenic rats. The gray histogram represents isotype control. Right, ICOS expression on CD4+CD25^{high} T cells from 3-month-old B27-transgenic and nontransgenic rats. Each symbol represents an individual rat; horizontal lines show the mean. Statistical analysis was performed using Student's unpaired 2-tailed *t*-test. Data are representative of 4 pooled experiments (*n* = 6–13 rats per group). **B**, ICOS expression on CD4+CD25^{high} Treg cells from nontransgenic and B27-transgenic rats after 24 hours of exposure to IL-27 or medium alone (control). Values are the mean \pm SEM (*n* = 2 rats per group). **C**, ICOS expression after an unfolded protein response triggered by thapsigargin. Left, Representative histograms of ICOS expression in CD4+CD25^{high} Treg cells from nontransgenic rats and B27-transgenic rats. The gray histograms represent isotype control. Right, ICOS expression in CD4+CD25^{high} Treg cells from nontransgenic and B27-transgenic rats after 1 hour of exposure to thapsigargin (TPG; 2.5–10 μ M) or medium alone (control). Values in **B** and **C** are the mean \pm SEM (*n* = 2–3 rats per group). Bar graphs show the mean \pm SEM percentage of spliced XBP-1, as quantified from the gels. **D**, The unfolded protein response as detected by assessing X-box binding protein 1 (XBP-1) splicing, using semiquantitative polymerase chain reaction. The gels are representative of 2–3 rats per group. HPRT = hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase.

response triggered by thapsigargin, as shown by XBP-1 splicing either in nontransgenic or B27-transgenic rats (Figures 4C and D).

Effect of ICOS-ICOSL blockade on imbalanced production of IL-10 and IL-17. To investigate whether the imbalanced production of IL-10 and IL-17 by Treg cells from B27-transgenic rats might depend on their interaction with APCs, we performed cocultures of polarizing or sorted Treg cells from B27-transgenic rats with magnetically sorted CD103+ splenic DCs from B27 or nontransgenic rats. After PMA/ionomycin stimulation for intracytoplasmic cytokine assay, Treg cells from B27-transgenic rats cultured with DCs from nontransgenic rats produced significantly more IL-10 and less IL-17 than those cultured with DCs from B27-transgenic rats (Figures 5A and B). In contrast, similar IL-10 and

IL-17 production was observed in cocultures of Treg cells from nontransgenic rats with DCs from nontransgenic or B27-transgenic rats (Figures 5C and D). These data indicated that the imbalance between IL-10 and IL-17 production in Treg cells that is driven by APCs from B27-transgenic rats is selective for Treg cells from B27-transgenic rats. We also investigated ICOSL expression in sorted splenic CD4+CD103+ DCs and observed no difference between nontransgenic and B27-transgenic rats DCs (additional information is available from the corresponding author).

To investigate whether the interaction between ICOS and ICOSL was directly implicated in the induction of imbalanced production of IL-10 and IL-17, we differentiated naive T cells from B27-transgenic rats *in vitro*, in the presence of CD103+ splenic DCs from

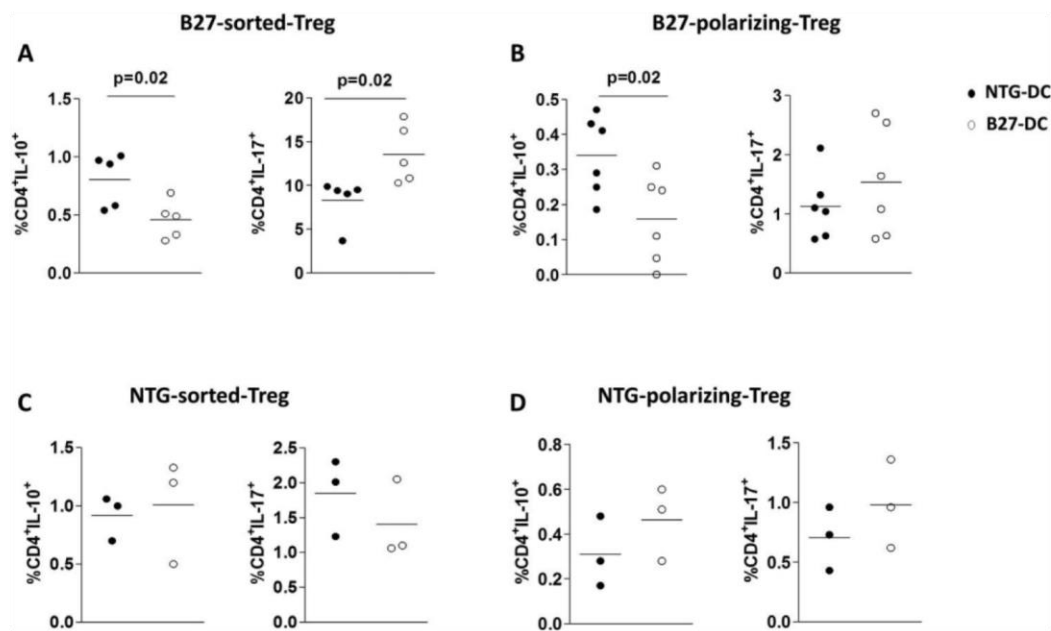


Figure 5. Imbalanced production of IL-10 and IL-17 by Treg cells from nontransgenic and B27-transgenic rats cultured with dendritic cells (DCs) from nontransgenic or B27-transgenic mice. The percentage of IL-10- and IL-17-producing T cells was determined by flow cytometric analysis of cocultures of polarizing or sorted Treg cells from B27-transgenic rats (**A** and **B**) or nontransgenic rats (**C** and **D**) with CD103+ splenic DCs from nontransgenic or B27-transgenic rats, after stimulation with phorbol myristate acetate/ionomycin. Each symbol represents a pool of 2 rats; horizontal lines show the mean. Statistical analysis was performed using Student's unpaired 2-tailed *t*-test. See Figure 4 for other definitions.

B27-transgenic rats, under Treg cell-polarizing conditions, in the presence of ICOS/ICOSL-blocking mono-

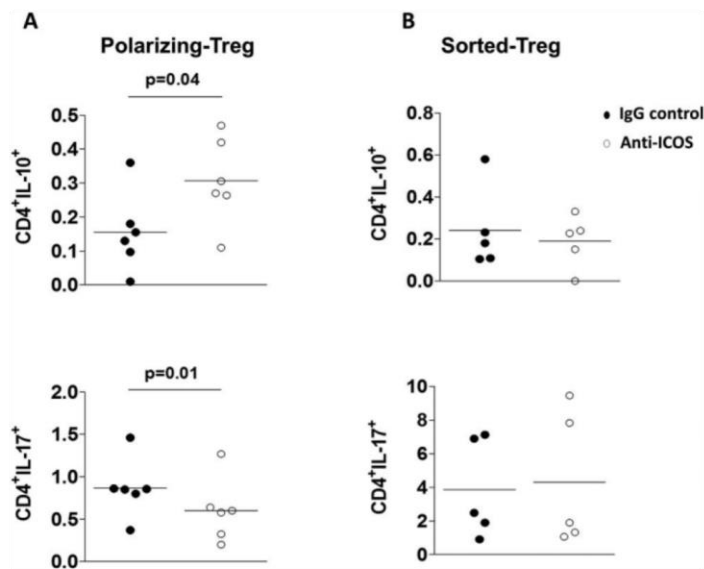


Figure 6. Blockade of the ICOS-ICOSL interaction in cocultures of polarizing Treg cells. The percentage of IL-10- and IL-17-producing T cells was determined by flow cytometric analysis of cocultures of polarizing (**A**) or sorted (**B**) CD4+CD25^{high} T cells with CD103+ splenic dendritic cells from B27-transgenic rats after stimulation with phorbol myristate acetate/ionomycin. Each symbol represents a pool of 2 rats (*n* = 5–6 pools per group); horizontal lines show the mean. Statistical analysis was performed using Student's paired 2-tailed *t*-test. See Figure 4 for definitions.

clonal antibodies. Blockade of the interaction between ICOS and ICOSL resulted in decreased IL-17 expression and increased IL-10 expression by differentiated Treg cells, thereby restoring the balance between the cytokines (Figure 6). A similar effect was observed in cocultures of Teff cells and DCs (additional information is available from the corresponding author). In contrast, we observed no effect of blocking the interaction between ICOS and ICOSL on the production of IL-10 and IL-17 by CD4+CD25^{high} T cells purified from B27-transgenic rat LNs and stimulated in the presence of DCs from B27-transgenic rats (Figure 6). Taken together, these data highlight an important role for ICOS signaling in the generation of IL-17-producing T cells in B27-transgenic rats.

DISCUSSION

It is now well established that Treg cells and Th17 cells form a functional duo, and that disruption of the optimal balance of these cells is critical to progression of inflammatory/autoimmune disorders (18). In fact, several studies have shown an enhanced Th17 cell response and a weakened Treg cell response in autoimmune diseases (39,40), indicating an important role for an imbalance between Th17 cells and Treg cells in the pathogenesis of autoimmunity. Wu et al showed that a

CCR4+CCR6+ Th17 cell-like/Treg cell imbalance existed in the peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis, suggesting its potential role in the breakdown of immune self-tolerance in this disease (41). However, a relationship between Th17 cell expansion and an abnormal suppressive function of Treg cells in SpA has not yet been clearly established.

In the present study, we confirmed an accumulation of Teff cells (previously described as exhibiting a predominant Th17 profile [14]) over Treg cells in mesenteric LNs from B27-transgenic rats that occurred in parallel with disease development. This imbalance was not associated with impaired Treg cell differentiation, suggesting that it might rather be attributable to an abnormal function of Treg cells.

Despite an imbalance in the Treg cell:Teff cell ratio in B27-transgenic rats, the *in vitro* suppressive activities of Treg cells were not compromised in these rats. This result was consistent with normal expression of surface molecules that are known to be responsible for the *in vitro* contact-dependent suppressive activity of Treg cells (i.e., CTLA-4, LAG-3, and GITR) (42). However, unlike what was observed using *in vitro* assays, soluble cytokines such as IL-10 and TGF β have been shown to be involved in Treg cell-mediated suppression *in vivo* (43,44). Interestingly, we observed a decreased proportion of IL-10+ cells among FoxP3+ Treg cells from B27-transgenic rats, whereas no alteration of TGF β expression was observed, suggesting that expansion of proinflammatory Th17 cells in B27-transgenic rats could result from deficient IL-10 production by Treg cells in these animals. Moreover, the proportion of IL-17-producing Treg cells was increased in B27-transgenic rats.

The decreased IL-10:IL-17 production ratio by B27 rat Treg cells led us to study the phosphorylation of STAT-3, which is essential for IL-10 production and function (45) as well as Th17 cell differentiation (46). However, normal levels of STAT-3 phosphorylation in Treg cells from B27-transgenic rats indicated that other factors were likely responsible for the imbalanced production of IL-10 and IL-17.

DCs may inhibit immune responses by directly promoting the activation and/or expansion of Treg cells. However, specific interactions between ligands on DCs and receptors on Treg cells (such as GITR) can also abrogate the suppressive function of Treg cells, indicating that DCs exert complex roles in modulating Treg cell function (47). Several studies from our laboratory have shown that DCs from B27-transgenic rats exhibited aberrant functions, including an impaired capacity to

stimulate T cell responses, altered cytoskeletal dynamics, reduced expression of class II major histocompatibility complex molecules, enhanced apoptotic death, and the capacity to preferentially induce an expansion of Th17 cells (8,9,11,12,14). Thus, we surmised that at least some of these alterations could contribute to disturbed DC-Treg cell interactions in B27-transgenic rats. Here, this hypothesis was confirmed, because we specifically observed reduced expression of IL-10 and overexpression of IL-17 by Treg cells from B27-transgenic rats cocultured with DCs from B27-transgenic rats but not from control rats. Interestingly, we observed that DCs from B27-transgenic rats were not inducing an imbalance between IL-10 and IL-17 in Treg cells from non-transgenic control rats, suggesting that altered signaling within both DCs and Treg cells is likely involved in increased production of IL-17 over IL-10 by Treg cells from B27-transgenic rats.

We recently reported the down-regulation of 2 major antiinflammatory cytokines, IL-10 and IL-27, in DCs from B27-transgenic rats (33). Such alterations could contribute to the imbalanced production of IL-10 and IL-17 by Treg cells, because both IL-10 and IL-27 produced by DCs dampened autoimmune inflammation by fostering the development of Treg cells that secrete IL-10 and inhibit the Th17 cell response (32,48,49). Moreover, our data are consistent with such an interpretation, because several factors expressed by Treg cells that are induced by IL-27 and directly implicated in IL-10 production by these cells, such as c-Maf, AhR, and IL-21 (34), were down-regulated in B27-transgenic rat Treg cells. Surprisingly, ICOS was overexpressed on the cell surface of Treg cells from B27-transgenic rats; this observation may appear paradoxical, because ICOS expression was previously shown to be induced by IL-27 in Treg cells, contributing to enhanced IL-10 production (32,50).

The effects of ICOS and CD28 signaling on T cell function have recently been compared, and it was shown that ICOS was more efficient than CD28 in inducing production of the proinflammatory cytokine IL-17. Moreover, when CD28 and ICOS were engaged simultaneously, CD28 exerted a "veto effect" on ICOS that significantly reduced the production of IL-17 by activated Th17 cells (38). These data indicate that a balance between CD28 and ICOS signaling critically influences the fate of Th17 cells. Of note, we previously observed that DCs from B27-transgenic rats induce Th17 cell expansion by a contact-dependent mechanism involving defective engagement of CD28 by CD86 costimulatory molecules (14). Thus, the correlation between increased

expression of ICOS and IL-17 that was observed in Treg cells from B27-transgenic rats may be consistent with these previous observations.

Moreover, blockade of the ICOS-ICOSL interaction using anti-ICOS monoclonal antibodies during cocultures of B27-transgenic rat DCs with Treg cell-differentiating cells or with CD4⁺CD25⁻ cells resulted in decreased IL-17 expression and increased IL-10 expression by those T cell subsets, thereby restoring the balance between both cytokines. This suggested that ICOS signaling may contribute to disease development in experimental SpA, particularly by facilitating the generation of abnormal IL-10/IL-17-producing Treg cells. In contrast, blockade of the ICOS-ICOSL interaction was unable to reverse the cytokine imbalance in ex vivo-sorted Treg cells, indicating that another pathway is presumably involved in driving the imbalance between IL-10 and IL-17 in differentiated Treg cells.

Similar observations in other inflammatory disorders have been reported. Blockade of the ICOS-ICOSL interaction significantly decreased IFN γ , IL-17, and tumor necrosis factor α production by peripheral blood mononuclear cells in patients with Behçet's disease and uveitis (51).

We previously reported that the administration of either recombinant IL-10 alone (52) or anti-IL-17 monoclonal antibodies alone (14) was inefficient for limiting disease development in B27-transgenic rats. This observation highlighted the notion that a single mediator was unlikely to account for the development of SpA in this model. Thus, it can be expected that modulation of the ICOS/ICOSL pathway would be a more effective therapeutic approach, by contributing to the restoration of Treg cell function.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Gaëlle Charlon, Ludovic Maingault, and Sabria Allithi from the Jacques Monod Institute (Paris, France) animal housing facility for managing and genotyping the rat colonies.

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. Breban 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. Araujo, Chiochia, Breban.

Acquisition of data. Araujo, Fert, Jouhault, Labroquère, Andrieu, Chiochia.

Analysis and interpretation of data. Araujo, Fert, Jouhault, Labroquère, Andrieu, Chiochia, Breban.

REFERENCES

- Baeten D, Breban M, Lories R, Schett G, Sieper J. Are spondylarthritides related but distinct conditions or a single disease with a heterogeneous phenotype? [review]. *Arthritis Rheum* 2013;65:12–20.
- Breban M, Miceli-Richard C, Zinovieva E, Monnet D, Said-Nahal R. The genetics of spondyloarthropathies. *Joint Bone Spine* 2006;73:355–62.
- Taurog JD. The role of HLA-B27 in spondyloarthritis. *J Rheumatol* 2010;37:2606–16.
- Taurog JD, Maika SD, Satumtira N, Dorris ML, McLean IL, Yanagisawa H, et al. Inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *Immunol Rev* 1999;169:209–23.
- Breban M, Hacquard-Bouder C, Falgarone G. Animal models of HLA-B27-associated diseases. *Curr Mol Med* 2004;4:31–40.
- Breban M, Hammer RE, Richardson JA, Taurog JD. Transfer of the inflammatory disease of HLA-B27 transgenic rats by bone marrow engraftment. *J Exp Med* 1993;178:1607–16.
- Stagg AJ, Breban M, Hammer RE, Knight SC, Taurog JD. Defective dendritic cell (DC) function in a HLA-B27 transgenic rat model of spondyloarthropathy (SpA). *Adv Exp Med Biol* 1995;378:557–9.
- Hacquard-Bouder C, Falgarone G, Bosquet A, Smaoui F, Monnet D, Ittah M, et al. Defective costimulatory function is a striking feature of antigen-presenting cells in an HLA-B27-transgenic rat model of spondylarthropathy. *Arthritis Rheum* 2004;50:1624–35.
- Hacquard-Bouder C, Chimenti MS, Giquel B, Donnadieu E, Fert I, Schmitt A, et al. Alteration of antigen-independent immunologic synapse formation between dendritic cells from HLA-B27-transgenic rats and CD4⁺ T cells: selective impairment of costimulatory molecule engagement by mature HLA-B27. *Arthritis Rheum* 2007;56:1478–89.
- Fert I, Glatigny S, Poulain C, Satumtira N, Dorris ML, Taurog JD, et al. Correlation between dendritic cell functional defect and spondylarthritides phenotypes in HLA-B27/human β_2 -microglobulin-transgenic rat lines. *Arthritis Rheum* 2008;58:3425–9.
- Dhaenens M, Fert I, Glatigny S, Haerincx S, Poulain C, Donnadieu E, et al. Dendritic cells from spondylarthritides-prone HLA-B27-transgenic rats display altered cytoskeletal dynamics, class II major histocompatibility complex expression, and viability. *Arthritis Rheum* 2009;60:2622–32.
- Utriainen L, Firmin D, Wright P, Cerovic V, Breban M, McInnes I, et al. Expression of HLA-B27 causes loss of migratory dendritic cells in a rat model of spondylarthritides. *Arthritis Rheum* 2012;64:3199–209.
- DeLay ML, Turner MJ, Klenk EI, Smith JA, Sowders DP, Colbert RA. HLA-B27 misfolding and the unfolded protein response augment interleukin-23 production and are associated with Th17 activation in transgenic rats. *Arthritis Rheum* 2009;60:2633–43.
- Glatigny S, Fert I, Blaton MA, Lories RJ, Araujo LM, Chiochia G, et al. Proinflammatory Th17 cells are expanded and induced by dendritic cells in spondylarthritides-prone HLA-B27-transgenic rats. *Arthritis Rheum* 2012;64:110–20.
- Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004;22:531–62.
- Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol* 2007;8:191–7.
- Kronenberg M, Rudensky A. Regulation of immunity by self-reactive T cells. *Nature* 2005;435:598–604.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151–64.

19. Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol* 2003;171:6323–7.
20. Yamazaki S, Patel M, Harper A, Bonito A, Fukuyama H, Pack M, et al. Effective expansion of alloantigen-specific Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by dendritic cells during the mixed leukocyte reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:2758–63.
21. Tarbell KV, Yamazaki S, Steinman RM. The interactions of dendritic cells with antigen-specific, regulatory T cells that suppress autoimmunity. *Semin Immunol* 2006;18:93–102.
22. Kryczek I, Wei S, Zou L, Zhu G, Mottram P, Xu H, et al. Induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells. *J Immunol* 2006;177:40–4.
23. Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 2000;30:1538–43.
24. Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM, Ivars F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of co-stimulatory molecules on dendritic cells in CD4⁺ CD25⁺ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* 2006;118:240–9.
25. Li MO, Wan YY, Flavell RA. T cell-produced transforming growth factor- β 1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity* 2007;26:579–91.
26. Niu Q, Huang ZC, Cai B, Wang LL, Feng WH. Study on ratio imbalance of peripheral blood Th17/Treg cells in patients with rheumatoid arthritis. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2010;26:267–9, 272. In Chinese.
27. O'Connor RA, Anderton SM. Foxp3⁺ regulatory T cells in the control of experimental CNS autoimmune disease. *J Neuroimmunol* 2008;193:1–11.
28. Brucklacher-Waldert V, Stuermer K, Kolster M, Wolthausen J, Tolosa E. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain* 2009;132:3329–41.
29. Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and T_H17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discov* 2012;11:763–76.
30. Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. The deviated balance between regulatory T cell and Th17 in autoimmunity. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2011;34:727–39.
31. Breban M, Fernandez-Sueiro JL, Richardson JA, Hadavand RR, Maika SD, Hammer RE, et al. T cells, but not thymic exposure to HLA-B27, are required for the inflammatory disease of HLA-B27 transgenic rats. *J Immunol* 1996;156:794–803.
32. Stumhofer JS, Silver JS, Laurence A, Porrett PM, Harris TH, Turka LA, et al. Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat Immunol* 2007;8:1363–71.
33. Fert I, Cagnard N, Glatigny S, Letourneur F, Jacques S, Smith JA, et al. Reverse interferon signature is characteristic of antigen-presenting cells in human and rat spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:841–51.
34. Pot C, Apetoh L, Awasthi A, Kuchroo VK. Induction of regulatory Tr1 cells and inhibition of T_H17 cells by IL-27. *Semin Immunol* 2011;23:438–45.
35. Ito T, Hanabuchi S, Wang YH, Park WR, Arima K, Bover L, et al. Two functional subsets of FOXP3⁺ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity* 2008;28:870–80.
36. Tuettenberg A, Huter E, Hubo M, Horn J, Knop J, Grimbacher B, et al. The role of ICOS in directing T cell responses: ICOS-dependent induction of T cell anergy by tolerogenic dendritic cells. *J Immunol* 2009;182:3349–56.
37. Vocanson M, Rozieres A, Hennino A, Poyet G, Gaillard V, Renaudineau S, et al. Inducible costimulator (ICOS) is a marker for highly suppressive antigen-specific T cells sharing features of T_H17/T_H1 and regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:280–9.e7.
38. Paulos CM, Carpenito C, Plesa G, Suhoski MM, Varela-Rohena A, Golovina TN, et al. The inducible costimulator (ICOS) is critical for the development of human T_H17 cells. *Sci Transl Med* 2010;2:55ra78.
39. 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 α therapy. *J Exp Med* 2004;200:277–85.
40. Boissier MC, Assier E, Falgarone G, Bessis N. Shifting the imbalance from Th1/Th2 to Th17/treg: the changing rheumatoid arthritis paradigm. *Joint Bone Spine* 2008;75:373–5.
41. Wu Y, Ren M, Yang R, Liang X, Ma Y, Tang Y, et al. Reduced immunomodulation potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells induced CCR4⁺CCR6⁺ Th/Treg cell subset imbalance in ankylosing spondylitis. *Arthritis Res Ther* 2011;13:R29.
42. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 1998;10:1969–80.
43. Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 1999;190:995–1004.
44. Suri-Payer E, Cantor H. Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4⁺CD25⁺ T cells. *J Autoimmun* 2001;16:115–23.
45. Murray PJ. STAT3-mediated anti-inflammatory signalling. *Biochem Soc Trans* 2006;34:1028–31.
46. Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol* 2007;19:281–6.
47. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 2002;3:135–42.
48. El-behi M, Ciric B, Yu S, Zhang GX, Fitzgerald DC, Rostami A. Differential effect of IL-27 on developing versus committed Th17 cells. *J Immunol* 2009;183:4957–67.
49. Batten M, Li J, Yi S, Kljavin NM, Danilenko DM, Lucas S, et al. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol* 2006;7:929–36.
50. Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH, Greenfield EA, Chang TT, Sharpe AH, et al. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* 2002;8:1024–32.
51. Usui Y, Takeuchi M, Yamakawa N, Takeuchi A, Kezuka T, Ma J, et al. Expression and function of inducible costimulator on peripheral blood CD4⁺ T cells in Behçet's patients with uveitis: a new activity marker? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:5099–104.
52. Bertrand V, Quere S, Guimbaud R, Sogni P, Chauvelot-Moachon L, Tulliez M, et al. Effects of murine recombinant interleukin-10 on the inflammatory disease of rats transgenic for HLA-B27 and human β 2-microglobulin. *Eur Cytokine Netw* 1998;9:161–70.

Article 2 : Rôle modulateur d'ICOS dans un modèle animal de spondyloarthrite

Modulator Role of Inducible Costimulator (ICOS) in Spondyloarthritis Animal

Model

Luiza M. Araujo, Quentin Jouhault, Bilade Cherqaoui, Ingrid Fert, Aude Jobart-Malfait,

Séverine Remy, Ignacio Anegon, Gilles Chiocchia, Maxime Breban

Article en préparation

Résultats obtenus :

Ce travail fait suite à l'**article 1** et approfondit l'analyse de l'importance d'ICOS dans le développement de la SpA chez le rat B27. Dans cet article nous avons observé que les lymphocytes T régulateurs de rats B27 (Treg B27) présentent un phénotype pro-inflammatoire. Ils sécrètent plus d'IL-17 pathogénique et moins d'IL-10 anti-inflammatoire que les Treg de rats non-transgéniques (NTG). Le blocage de la voie ICOS/ICOSL permet de renverser le déséquilibre de la balance IL-17/IL-10 en faveur de l'IL-10 dans les Treg de rats B27 *in vitro*.

Nous avons émis l'hypothèse qu'ICOS participe au développement de la SpA chez le rat B27, notamment en favorisant le développement de Treg producteurs d'IL-17 pro-inflammatoire. De façon intéressante, nous avons également observé une augmentation de l'expression d'ICOS à la surface des LT CD4⁺ circulants de patients atteints de SpA comparé à ceux de volontaires sains, qu'ils aient un phénotype effecteur ou régulateur (figure 12). Ce résultat renforce l'idée de l'implication d'ICOS dans le développement de la SpA.

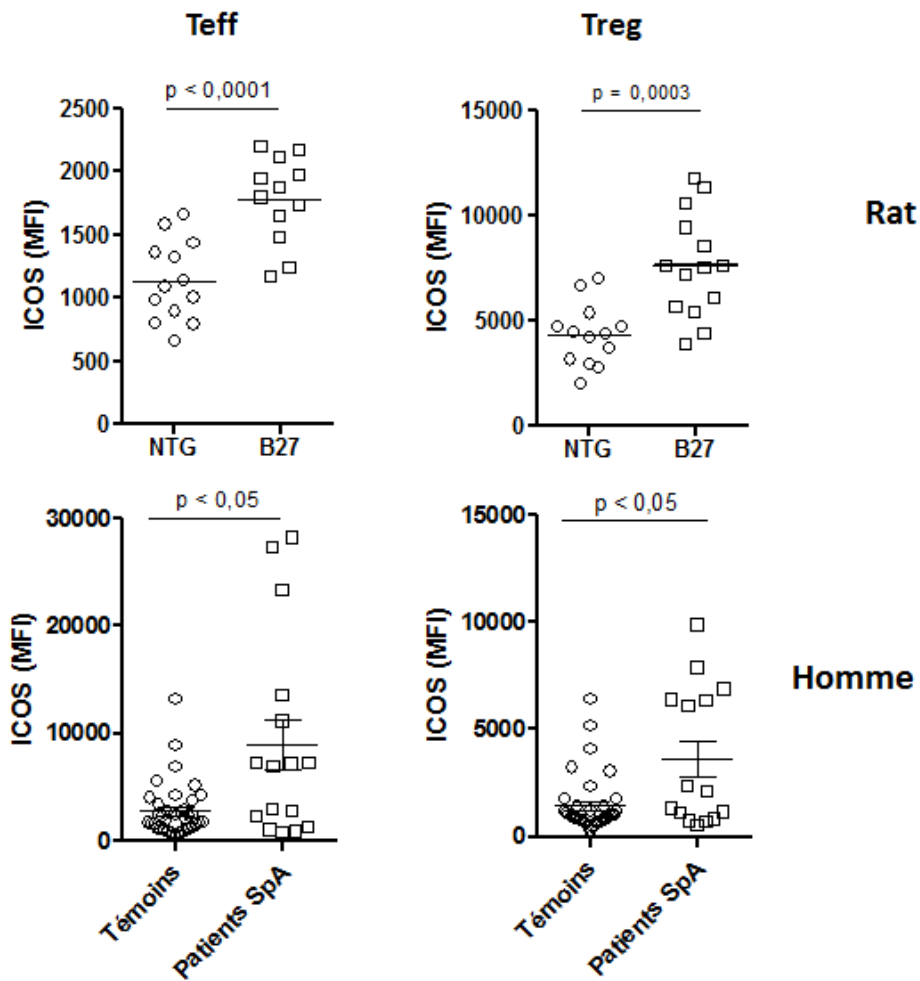


Figure 12: Analyse du niveau d'expression d'ICOS à la surface des LT CD4⁺ chez le rat et chez l'Homme

L'intensité moyenne d'expression (MFI) d'ICOS à la surface des LT CD4⁺ a été analysée par cytométrie de flux. Chez le rat, les LT CD4⁺ sont isolés à partir des ganglions mésentériques. Les LT effecteurs (Teff) sont CD4⁺ CD25⁻ et les LT régulateurs (Treg) sont CD4⁺ CD25^{high}. Les LT CD4⁺ sont analysés à partir d'un prélèvement sanguin chez l'Homme. Les Treg sont CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} et les Teff sont CD4⁺ CD45RO⁺ CD25⁺.

Génération des rats ICOS KO

Afin de confirmer les résultats obtenus *in vitro* et d'étudier l'impact d'ICOS *in vivo*, le laboratoire a établi une collaboration afin d'obtenir des rats n'exprimant pas la molécule ICOS (rats ICOS KO). L'unité INSERM 643 de Nantes a donc généré des rats ICOS KO grâce à la technologie des TALEN (*Transcription activator-like effector nuclease*). Les TALEN sont des enzymes de restriction composées d'un domaine de liaison à l'ADN spécifique de la séquence ciblée couplé à un domaine ayant la capacité de cliver l'ADN. Ces enzymes ont ainsi été utilisées pour induire une délétion de 148 paires de bases dans le gène codant pour la molécule ICOS. Le suivi de ces rats peut ainsi être fait par PCR où les amorces utilisées se situent de part et d'autre de la délétion (Figure 13). Chez un rat exprimant ICOS (rat ICOS WT), le fragment

amplifié a une taille théorique de 395 paires de bases. Chez un rat ICOS KO, ce fragment a une taille théorique de 247 paires de bases (395-148).

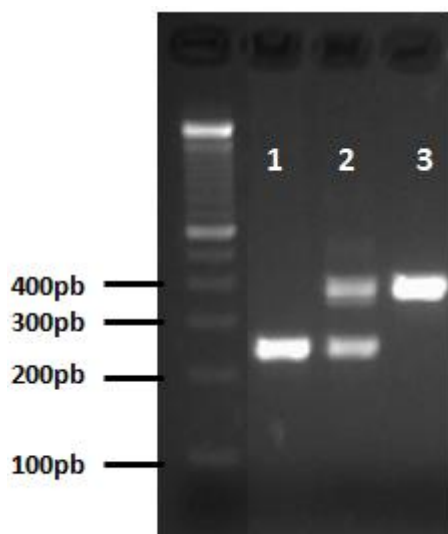


Figure 13: Electrophorèse des produits de PCR pour la détermination du génotype ICOS.

La réaction de PCR faite sur de l'ADN génomique permet de distinguer les différents génotypes possibles pour la délétion d'ICOS. La piste 1 correspond à la PCR faite à partir d'ADN extrait d'un rat ICOS KO, avec une taille théorique du fragment amplifié de 247 paires de bases (pb). La piste 3 correspond à la PCR faite à partir d'un rat ICOS « sauvage » (rat ICOS WT), avec une taille théorique du fragment amplifié de 395 paires de bases. La piste 2 montre le produit d'une PCR faite à partir d'ADN extrait d'un rat hétéryzote. Dans ce cas, les deux fragments attendus sont détectés.

L'efficacité de cette délétion a été confirmée par cytométrie de flux. En accord avec le génotypage par PCR, les rats ICOS KO ne présentent pas de cellules ICOS⁺ (Figure 14).

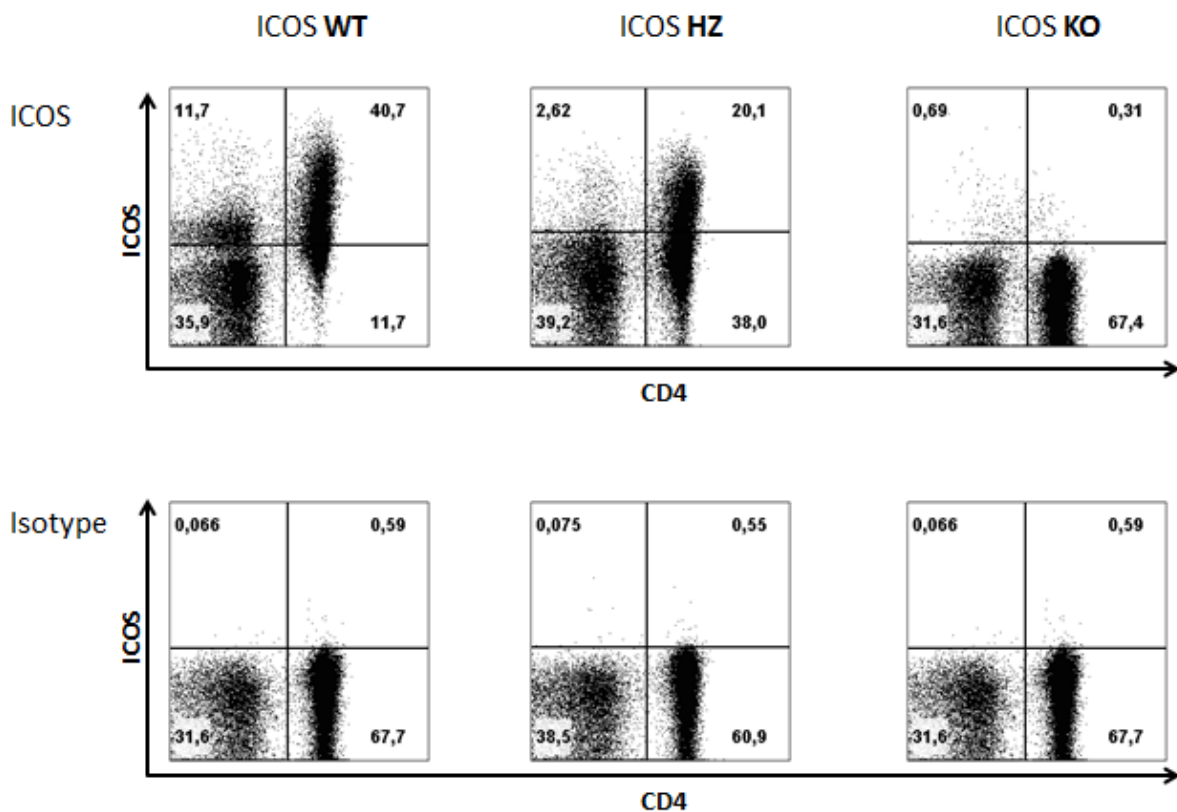


Figure 14: Analyse de l'expression d'ICOS par cytométrie de flux.

La spécificité du marquage est contrôlée à l'aide d'un anticorps isotypique (ligne Isotype). Les rats hétérozygotes pour la délétion d'ICOS (rats ICOS HZ) présentent un niveau d'expression d'ICOS plus faible que les rats sauvages (rats ICOS WT). Les rats n'exprimant pas ICOS (rats ICOS KO) ne présentent pas de cellules positives pour le marquage avec l'anticorps anti-ICOS.

Impact de la délétion d'ICOS sur le phénotype des rats B27

Nous avons ensuite étudié le développement de la SpA chez les rats B27 et NTG, de fond génétique F344 (lignée 33-3), exprimant ou n'exprimant pas ICOS (rats B27 ICOS WT et KO). Tous les rats inclus dans cette expérience ont été suivis dès la 8^{ème} semaine de vie. Les rats sont pesés et examinés toutes les semaines. Les différents symptômes cliniques, qui comprennent notamment les atteintes digestives, articulaires et cutanées, sont évalués selon la grille de scoring présentée dans le tableau 11.

Score digestif	Articulations	Lésions cutanées	Orchite
<i>Diarrhée = 0 à 4</i>	<i>Normale = 0</i>	<i>Alopécie = 1 à 4</i>	<i>Absence = 0</i>
<i>Présence d'anite = +1</i>	<i>Gonflée = 1 à 4</i>	<i>Atteinte des ongles = +1</i>	<i>Présence = 1</i>

Tableau 11: Grille d'évaluation de la sévérité des symptômes observés chez les rats B27 pour le suivi clinique

L'activité de la maladie, correspondant à la somme des scores des différents symptômes, et le score digestif chez les différents groupes étudiés sont représentés dans la

figure 15. Les rats NTG, qu'ils expriment ou non la molécule ICOS (rats NTG ICOS WT et ICOS KO) ne développent aucun symptôme clinique de manière chronique. L'apparition d'une diarrhée a été observée à partir de 10 semaines d'âge chez tous les animaux B27 ICOS WT et ICOS HZ. Les atteintes articulaires et cutanées ont été observées avec une pénétrance partielle.

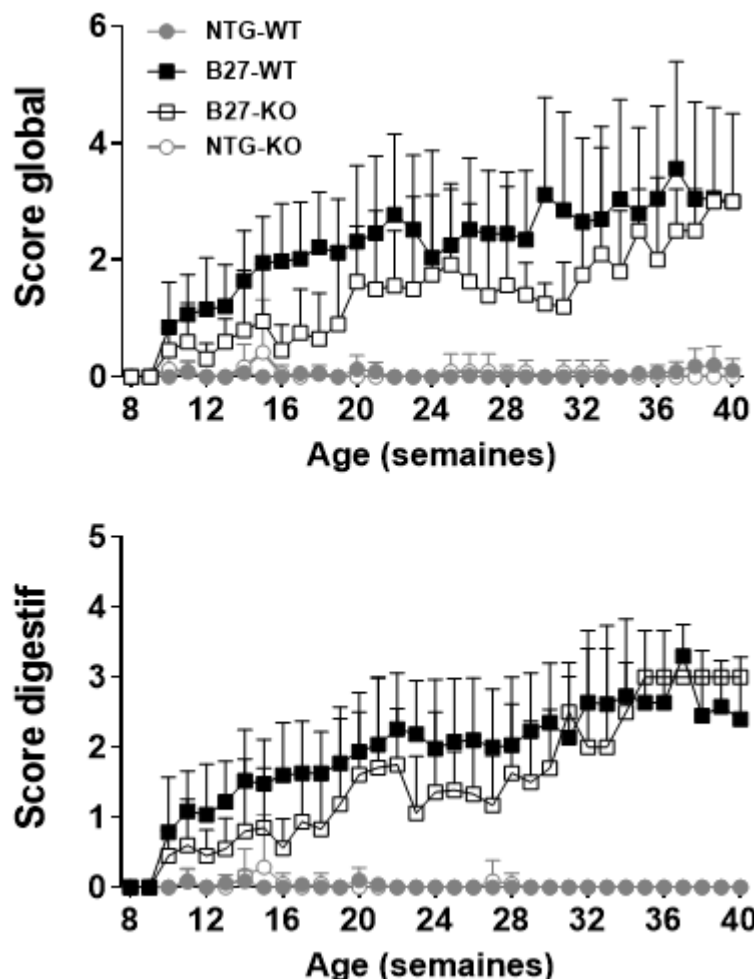


Figure 15: Activité de la pathologie des rats ICOS WT et KO

Les rats sont pesés et leur score clinique est évalué une fois par semaine. Le score global représenté en haut de la figure prend en compte les atteintes digestives, cutanées et articulaires (Tableau 11). Le score digestif ne comprend que la sévérité de la diarrhée ainsi que la présence ou non d'une anite. Chaque point représente le score moyen \pm l'écart standard à la moyenne. Chaque groupe comprend au minimum 6 animaux.

Nous pouvons ainsi constater que les rats B27 ICOS KO présentent un score global et digestif plus faible que les rats B27 ICOS WT jusqu'à 28-30 semaines. A partir de cet âge, les signes cliniques s'aggravent chez les rats B27 ICOS KO et leur sévérité rejoint celle observée chez les rats B27 ICOS WT. Ce résultat suggère donc que la délétion d'ICOS induit une protection partielle vis-à-vis de la SpA chez le rat B27 et valide l'hypothèse d'un rôle majeur

d'ICOS dans l'induction de cette pathologie. L'absence de protection totale indique cependant que d'autres facteurs, encore inconnus, sont impliqués.

Nous avons ensuite souhaité confirmer cette réduction de la sévérité des symptômes observés chez les rats B27 ICOS KO par analyse histologique du caecum (Figure 16). Des résultats similaires ont été observés lors de l'analyse histologique du colon.

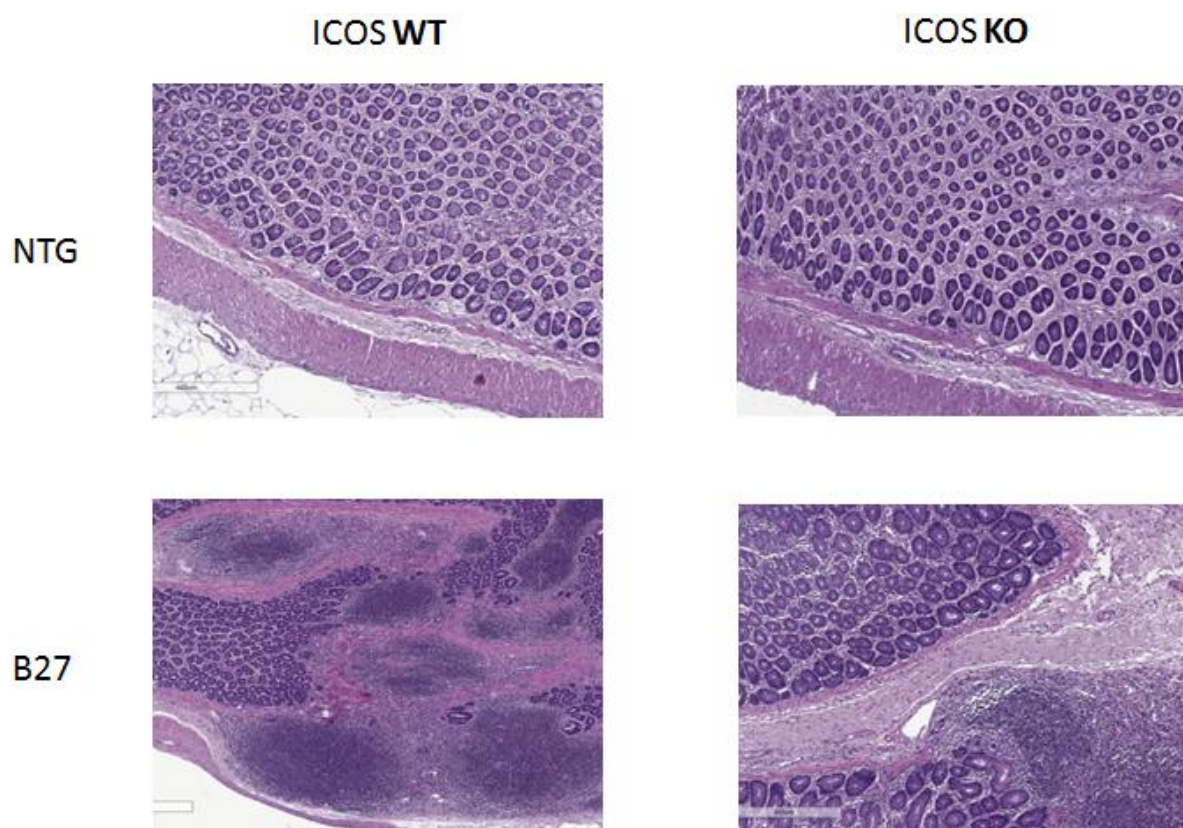


Figure 16: Observation histologique de coupes de caecum après coloration Hematoxyline/eosine

Des images représentatives obtenues dans chaque groupe sont montrées. Aucune atteinte histologique n'a été observée chez les rats NTG, même en absence d'ICOS. À l'inverse, il existe une infiltration cellulaire majeure chez les rats B27 ICOS WT, induisant une importante déstructuration du tissu.

Nous pouvons ainsi constater que l'inflammation intestinale est moins sévère chez les rats B27 ICOS KO comparé aux rats B27 ICOS WT (rats âgés de 8 mois), confirmant ainsi la sévérité réduite des symptômes cliniques observée chez les rats B27 n'exprimant pas ICOS (Figure 15).

Etant donné que nous avons observé que le blocage de la voie ICOS *in vitro* influençait la production cytokinique des LT CD4⁺, notamment en diminuant la production d'IL-17, nous avons ensuite analysé la production cytokinique des LT CD4⁺ dans les ganglions mésentériques et dans la rate (Figure 18).

Ganglions mésentériques

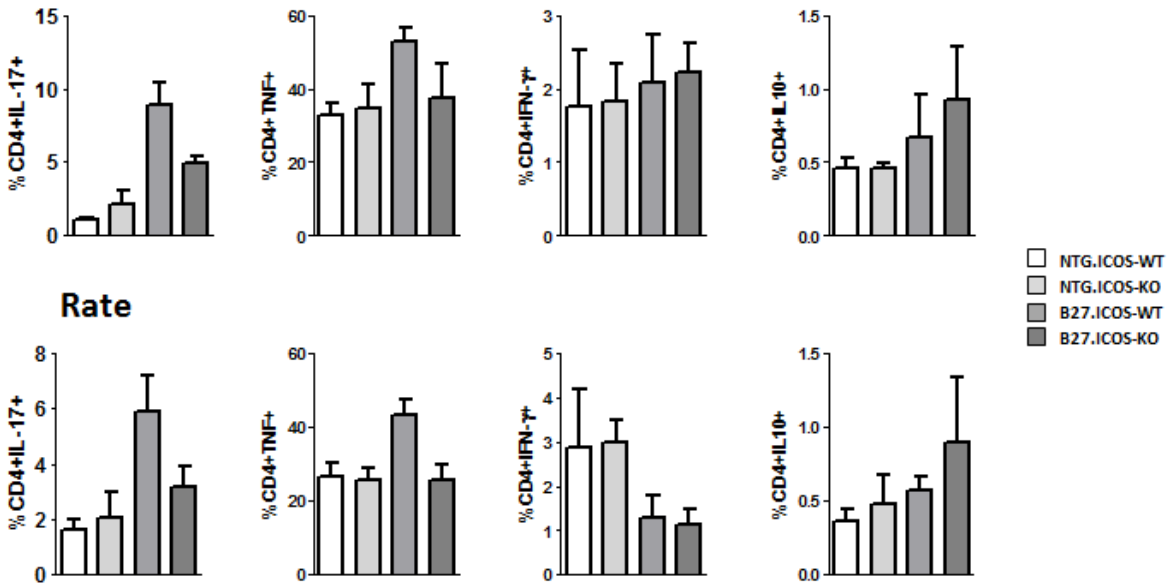


Figure 17: Analyse par cytométrie de flux de la production d'IL-17, de TNF- α , d'IFN- γ et d'IL-10 par les LT CD4⁺.

La production intracytoplasmique des différentes cytokines est analysée par marquage intracellulaire après stimulation par phorbol-myristate-acétate (PMA)/ionomycine/Bréfeldine A.

De façon intéressante, nous pouvons observer que les rats B27 ICOS KO ont des proportions plus faibles de LT CD4⁺ producteurs d'IL-17 et de TNF- α que les rats B27 ICOS WT, à la fois dans les ganglions et dans la rate (rats âgés de 8 mois). Il semble également y avoir une augmentation de la proportion de LT producteurs d'IL-10 mais cette différence est non significative.

L'effet protecteur de la délétion d'ICOS sur la sévérité des symptômes observés chez le rat B27 est donc corrélée à une baisse de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-17, TNF- α).

L'ensemble de ces résultats corrobore donc les données obtenues *in vitro* (article 1) et renforce l'idée d'un rôle clé de la molécule ICOS dans le développement et le maintien du déséquilibre de la balance IL-17/IL-10 observée dans les LT CD4⁺ du rat B27, ainsi que dans le développement de la SpA, tout du moins chez le rat B27.

Article 3 : Régulation de l'inflammation par l'IL-27 dans un modèle animal de spondyloarthrite

Regulation of inflammation by IL-27 in a rat model of spondyloarthritis

Quentin Jouhault, Guillaume Morelle, Ingrid Fert, Maxime Breban, Luiza M. Araujo, Gilles Chiocchia

Article en préparation

Des expériences de transfert cellulaire ont démontré le rôle crucial des deux populations cellulaires, les cellules dendritiques (DC) et les LT CD4⁺ dans le développement de la SpA chez le rat B27. Les DC de rats B27 présentent plusieurs altérations fonctionnelles. Elles favorisent notamment l'expansion des lymphocytes Th₁₇ (Glatigny et al., 2012), et déséquilibrent la production cytokinique des Treg, en favorisant la synthèse d'IL-17 et en réduisant la production d'IL-10 (article 1).

Peu de temps avant mon arrivée au laboratoire, une analyse transcriptomique des DC de rats B27 a montré une sous-expression de l'IL-27 par ces cellules (Fert et al., 2014). Comme nous l'avons précédemment vu, l'IL-27 est une cytokine aux effets pleiotropes (Chapitre IV), mais sa capacité à inhiber les Th₁₇ et à induire la production d'IL-10 est bien documentée.

Nous nous sommes proposé dans ce travail d'étudier l'effet de l'addition d'IL-27 exogène sur le phénotype pro-inflammatoire observé chez les LT CD4⁺ de rats B27. Conformément aux données de la littérature, l'IL-27 induit une diminution de la synthèse d'IL-17 et une augmentation de la production d'IL-10 par les Treg et les Teff de rats B27 cultivés avec des DC. De façon intéressante, nous avons également étudié l'effet de l'IL-27 sur la polarisation *in vitro* de LT naïfs vers un phénotype Treg ou Th₁₇. Dans les deux cas, l'IL-27 inhibe significativement le développement de LT producteurs d'IL-17, tout en augmentant la synthèse d'IL-10. De façon similaire aux données obtenues chez le rat, l'IL-27 réduit également la production d'IL-17 par les LT CD4⁺ isolés à partir du sang de patients atteints de SpA.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 3, la liaison de l'IL-27 à son récepteur induit principalement l'activation de la voie JAK/STAT et plus précisément la phosphorylation de STAT1 et STAT3. Bien que les LT CD4⁺ de rats B27 aient une capacité à induire la phosphorylation de STAT1 et 3 en réponse à l'IL-27 similaire à celle des LT CD4⁺ de rats NTG, nous avons observé que les LT CD4⁺ de rats B27 expriment plus de STAT3, indépendamment de son statut de phosphorylation. Étant donné l'importance de STAT3 dans le développement des Th₁₇, cette augmentation de STAT3 pourrait être impliquée dans l'expansion des Th₁₇ observée chez le rat B27.

Sachant que l'IL-10 est une cytokine également capable d'inhiber la production d'IL-17 par les LT, nous nous sommes demandé si l'effet anti-IL-17 de l'IL-27 était dépendant de l'IL-10. L'utilisation d'un anticorps bloquant a démontré que l'inhibition de la synthèse d'IL-17 par l'IL-27 est indépendante de l'IL-10.

Au cours des expériences de co-cultures, nous avons également observé que l'IL-27 réduit significativement l'expression d'ICOS à la surface des LT CD4⁺. Étant donné que le blocage de la voie ICOS/ICOSL induit aussi une baisse de l'expression d'IL-17 et une augmentation de la synthèse d'IL-10, nous nous sommes demandé si les effets de l'IL-27 étaient dépendants d'ICOS. L'utilisation des rats B27 ICOS KO a permis de montrer que l'IL-27 est également capable de réduire significativement la production d'IL-17 par les LT CD4⁺ de ces rats. Ce résultat démontre que l'effet anti-IL-17 de l'IL-27 ne requiert pas la présence d'ICOS.

L'ensemble de ces résultats démontre la forte capacité anti-inflammatoire de l'IL-27 sur les lymphocytes T et nous pensons que l'IL-27 peut représenter une nouvelle stratégie thérapeutique prometteuse dans la SpA.

Regulation of inflammation by IL-27 in a rat model of spondyloarthritis

Quentin Jouhault,^{1,2} Guillaume Morelle,^{1,2} Ingrid Fert,^{1,2} Maxime Breban,^{1,2,3} Luiza M. Araujo,^{1,2} Gilles Chiochia^{1,2,4}

1 – INSERM U1173, UFR Simone Veil, Versailles-Saint Quentin University, France

2 – Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire d'Excellence, Paris, France

3 – Rheumatology Division, Ambroise Paré Hospital (AP-HP), Boulogne-Billancourt, France

4 – Haematology-Immunology Division, Ambroise Paré Hospital (AP-HP), Boulogne-Billancourt, France

ABSTRACT

Objective: Development of spondyloarthritis (SpA)-like phenotype in B27 rats expressing HLA-B27 and human β 2-microglobulin (h β 2m) is correlated with several aberrant dendritic cell (DC) functions. We recently reported that B27-rat DCs promote a biased expansion of proinflammatory IL-17 producing CD4⁺ T cells (Th₁₇ cells). Moreover they decrease IL-10 and heighten IL-17 productions by CD4⁺ regulatory T cells (Treg) associated to ICOS overexpression. Given that B27 DCs also underexpress IL-27, which induces differentiation of IL-10⁺ regulatory T cell type 1 (Tr1) and inhibits Th₁₇ cells, we surmised that addition of exogenous IL-27 could reverse the proinflammatory phenotype observed in B27 CD4⁺ T cells.

Methods: Sorted T cell subsets were cocultured with CD103⁺ DCs from B27 rats in presence or absence of IL-27. Naive T cells were polarized *in vitro* in Treg or Th₁₇ conditions. Cytokine production was evaluated by flow cytometry after PMA/ionomycin stimulation and by ELISA in the culture supernatants.

Results: The addition of IL-27 reduces IL-17 and enhances IL-10 productions by differentiated T cells from B27 rats. Moreover, IL-27 drastically reduces the generation of IL-17 producing T cells from Treg- and Th₁₇-polarising cultures. This reduction was correlated with an increase in IL-10 and IFN- γ productions. Interestingly, IL-27 efficiently inhibited the production of IL-17 by CD4⁺ T cells from SpA patients. Although IL-27 reduced ICOS expression, its presence is not required for the anti-inflammatory effect of IL-27. This effect is also IL-10 independent.

Conclusion: Our results reveal a strong effect of IL-27 on the generation and maintenance of IL-17 producing T cells in animal model of SpA. Other factors than IL-10 and ICOS were likely responsible for the anti-inflammatory effect of IL-27. Our study highlights IL-27 as a new potential therapeutic target in SpA.

Keywords: SpA, IL-27, Th₁₇, IL-10, dendritic cells

INTRODUCTION

Spondyloarthritis (SpA) is a group of chronic inflammatory disorders that mainly affect axial skeleton (spine and sacroiliac joints). These cardinal features combine with peripheral joint arthritis, enthesitis, and extraarticular manifestations as uveitis, psoriasis or inflammatory bowel disease. It affects approximately 0.5% of the population and is strongly associated with the class I major histocompatibility complex (MHC) antigen HLA-B27. This association was described 40 years ago but the mechanisms underlying induction of SpA by HLA-B27 still remain largely unexplained.¹

The 33-line of HLA-B27/human β 2-microglobulin (h β 2m)-transgenic (B27-rats) has proved to be a relevant model of chronic inflammatory disease linked to the HLA-B27 molecule since it develops a spontaneous complex inflammatory disorder characterized by an ulcerative colitis, arthritis and psoriatic skin and nail lesions developing in the presence of regular microbiota.²

Using this animal model, cell transfer experiments have demonstrated a fundamental role of CD4⁺ T cells and bone-marrow derived cells bearing HLA-B27/hB2m transgene in the development of inflammatory disease.^{3,4} Subsequent studies revealed a correlation between several dysfunctions of dendritic cells (DCs) and susceptibility to multisystem inflammatory disease.^{5,6}

We have been previously shown that DCs from B27-rats promoted a biased expansion of pro-inflammatory Th₁₇ cells, which might participate to disease development.⁷ More recently, we reported an altered DC–T cell interaction, which results in decreased production of interleukin (IL)-10 and heightened production of IL-17 by CD4⁺ regulatory T cells.⁸ Aberrant DC functions from B27-rats are also characterized by a defect in IFN- γ signaling and a deficiency of IL-10 and IL-27 productions that were observed by transcriptomic and confirmed by RT-PCR analyses.⁹

IL-27 is a member of the IL-12 family.¹⁰ It is composed of two subunits: IL-27p28 (also known as IL-27a and IL-30) and Epstein–Barr virus induced gene 3 (EBI3 also known as IL-27b). IL-27 is mainly produced by activated antigen presenting cells (APCs) as dendritic cells and binds to a receptor composed of WSX-1 (TCCR, IL-27R α) and gp130 (IL-6R β). IL-27R is expressed by numerous cell populations as T and B lymphocytes, dendritic cells, monocytes or endothelial cells.^{11,12} IL-27

binding to its receptor induces activation of the JAK/STAT and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK pathways).¹³

First studies showed that IL-27 is a pro-inflammatory cytokine by inducing Th₁ responses.¹⁰ IL-27 increases T-bet expression, a Th₁-specific transcription factor,¹⁴ and induces IFN- γ production by naive T cells. However subsequent studies revealed a more complex role of IL-27 in the regulation of T cell responses. Indeed, it was showed that IL-27 is able to inhibit the differentiation of Th₁₇ cells¹⁵ by antagonizing the expression of the Th₁₇ transcription factor ROR γ .¹⁶ IL-27 is also able to induce differentiation of IL-10-producing regulatory T cell type 1 (Tr₁) cells which have immunosuppressive properties on Th₁₇ cells and produce IL-10.^{17,18}

Given that both IL-10 and IL-27 produced by DCs may contribute to dampen autoimmune inflammation by favoring the differentiation of Tr₁ and inhibiting the generation of Th₁₇ cells, we surmised that deficient production of those anti-inflammatory cytokines by DC from B27-rats could be a key element in the emergence of Th₁₇-driven inflammatory disease in B27-rats. Our data are consistent with such an interpretation, because several factors expressed by Treg cells that are induced by IL-27 and directly implicated in IL-10 production by these cells, such as c-Maf, AhR, and IL-21, were down-regulated in B27-transgenic rat Treg cells.⁸

Currently all available treatments can alleviate inflammation but none are able to cure SpA.¹⁹ Given that IL-27 plays a role in modulating Th₁₇ cells, a crucial population in the deleterious process of SpA inflammation, we believe that use of IL-27 may be useful in ameliorating inappropriate immune responses observed in B27 rats and opens up perspectives on opportunities to develop new therapies SpA disorders. Moreover, IL-27 has been used as a potential therapy to reduce inflammation in several autoimmune and inflammatory experimental diseases.²⁰⁻²²

It is important to emphasize that different genetic approaches (candidate-gene and genome-wide studies) have recently revealed several new loci residing outside of the MHC region that are involved in the predisposition to SpA. Interestingly, among which some are involved in IL-23 and Th₁₇ signaling including *IL27A* gene coding for the p28 subunit of IL-27.²³

Thus in this study our main objective is to investigate the *in vitro* effect IL-27 on SpA experimental model and open up perspectives to develop new therapies on SpA disorders.

MATERIALS AND METHODS

Rats. The HLA-B/h β_2m -transgenic line B27 was originally produced at the University of Texas Southwestern, Medical Center. The disease-prone rats of the 33-3 line, bearing 55 copies of HLA-B*2705 and 28 copies of h β_2m on a Fisher background, were bred and maintained under conventional conditions. Nontransgenic (NTG) littermates from the 33-3 line were used as controls. Age- and sex-matched rats (3-8 months) were used in each experiment. Study procedures were approved by the Institutional Animal Experimentation Ethical Committee.

Cell culture reagents and monoclonal antibodies. Cell culture medium used in this study was RPMI 1640 with Glutamax I (Life Technologies), supplemented with 10% fetal calf serum, streptomycin and penicillin (100 μ g/mL), 2% sodium pyruvate, 0.05 mM β -mercaptoethanol and 10 mM HEPES (complete medium). Recombinant IL-27, IL-6, IL-1 β , IL-23, TGF- β cytokines and IL-10 blocking antibody were obtained from R&D Systems. Purified mouse anti-rat CD3 and fluorochrome conjugated mouse anti-rat CD4 and anti-IFN- γ were purchased from BD Pharmingen. Fluorochrome conjugated mouse anti-rat CD62L, inducible costimulatory molecule (ICOS), IL-17 and CD25 were obtained from eBioscience. Neutralizing antibodies anti-IFN- γ and anti-IL-4 were obtained from eBioscience and BD Pharmingen, respectively. Human/mouse monoclonal antibodies to STAT1 phosphorylated at Tyrosine 701 and STAT3 phosphorylated at Tyrosine 705 were obtained from BD Pharmingen. Recombinant rat IL-2 was purchased from Immunotools. Phorbol myristate acetate (PMA), ionomycin, brefeldin A and mitomycin C were purchased from Sigma.

Rat Cell preparation: Single-cell suspensions were prepared from mesenteric lymph nodes. T cell subpopulations were isolated by sorting on a FACS Aria III sorter (BD Biosciences). Combination of surface markers were used to sort Treg cells (CD4⁺ CD25^{high}), Teff cells (CD4⁺ CD25⁻ CD62L⁻), activated T cells (CD4⁺ CD25⁺) and naive T cells (CD4⁺ CD25⁻ CD62L⁺). The proportion of FoxP3⁺ into CD4⁺ CD25^{high} Treg was assessed by flow cytometry and the majority (>90%) of Treg were FoxP3⁺. FoxP3 staining was performed according to manufacturer's instructions (eBioscience). CD103⁺ dendritic cells were obtained from spleen as previously described.^{24,25} Briefly, spleens were digested with Collagenase D (2mg/mL; Roche Diagnostics). After centrifugation on a 14.5% Nycodenz

gradient (Nycomed), positive selection was performed by magnetic cell sorting with anti-rat CD103 microbeads with an AutoMacs Pro Separator (Miltenyi Biotec).

Human cell preparation and culture: Peripheral blood mononuclear cells were isolated from healthy control and SpA patients by Ficoll (GE Healthcare) density gradient centrifugation. The characteristics of SpA patients are shown in Supplementary Table 1. CD4⁺ T cells were magnetically sorted from the CD14⁻ fraction using anti human CD4 particles (BD Biosciences) and cultured during 6 days with IL-2 (10 ng/ml), soluble anti-CD28 (2 µg/ml) and coated-anti-CD3 (10 µg/ml) in the presence or absence of IL-27 (40 ng/ml) in complete medium. At day 6, supernatants were harvested for measure of cytokine levels by ELISA and cells were stimulated with PMA/ionomycin/BFA for 6 hours for intracellular cytokine staining.

T lymphocytes and dendritic cells cocultures: Flow cytometry sorted-CD4⁺ CD25^{high} Treg cells or CD4⁺ CD25⁻ CD62L⁻ effector T cells were cultured (10⁵ cells/well) with APCs (CD103⁺ splenic DCs pre-treated with mitomycin C at 0.5 mg/ml) (0.4 x 10⁵ cells/well) and stimulated with coated-anti-CD3 (2 µg/mL) in presence or absence of recombinant mouse IL-27 (5ng/ml). After 3 days, supernatants were collected to analyze cytokine levels by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) and cells were restimulated for 4 hours with PMA (10 ng/mL), ionomycin (1 µg/mL) and brefeldin A (2 µg/mL) for intracellular cytokine staining assay performed according to manufacturer's instructions. Stained cells were analyzed with a BD LSR Fortessa cell analyzer (BD Biosciences) using FlowJo software (TreeStar).

T cell differentiation Assays. For Treg differentiation experiments, flow-cytometry sorted naive T cells (CD4⁺ CD25⁻ CD62L⁺) were cultured (5 x 10⁵ cells / well) with APCs (CD103⁺ splenic DCs pre-treated with mitomycin C at 0.5 mg/ml) (10⁵ cells / well) in the presence of coated-anti-CD3 (2 µg/ml), TGF-β (2 ng/ml), and neutralizing antibodies anti-IFNγ and anti-IL-4 (10 µg/ml). For Th₁₇ differentiation experiments, recombinant IL-6, IL-1β and IL-23 (20 ng/ml) were added in the milieu. To study the effect of IL-27, we performed cocultures in presence of recombinant mouse IL-27 (5 ng/ml). Media supplemented with recombinant IL-2 (20 ng/ml) was added on day 3. After 72

hours (day 6), supernatants were harvested for analysis of cytokine production by ELISA and cells were stimulated with PMA/ionomycin/BFA for intracellular cytokine staining.

STAT phosphorylation Assays. Single-cell suspensions of mesenteric lymph nodes were stimulated with IL-27 (5 ng/ml) or PBS for 10 minutes at 37°C. After fixation during 10 minutes with Fix 1 Buffer (BD Biosciences), cells were stained with BD PhosFlow antibodies to pSTAT1 (pY701) and pSTAT3 (pY705) according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences).

Determination of total STAT 1 and 3 by flow cytometry. Single-cell suspensions of mesenteric lymph nodes were stained with anti-STAT1 and anti-STAT3 (BD Biosciences) according to manufacturer's instructions.

Determination of cytokine levels by specific ELISA. IL-17 (eBioscience), IL-10 and IFN- γ (R&D Systems) levels were determined in cultures supernatants by sandwich enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) according to the manufacturer's instructions. Concentrations are calculated from calibration curves from serial dilutions of recombinant standards in each assay. The sensitivity of IL-17, IL-10 and IFN- γ assays was 10 pg/mL. Multiplex ELISA assay was performed using Bio-Plex Pro Rat Cytokine Panel (Biorad) accordingly to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis. Data are expressed as the mean \pm SEM. Statistical comparisons between groups were determined by a two-tailed paired Student's *t* test. *P* values < 0.05 were considered significant.

RESULTS

IL-27 reverses imbalanced production of IL-17 and IL-10 by T cell subsets from B27 rats.

Given that IL-17 producing T cells are expanded in B27 rats we sought to determine whether exogenous IL-27 could have the inhibitor effect on effector T cells (Teff: CD4⁺ CD25⁻ CD62L⁻). As shown in Figures 1A and 1B, in presence of IL-27, cocultures of sorted Th-17 cells and DCs produced decrease IL-17-levels. Interestingly, increased IL-10 levels were detected in supernatants of these cocultures (Figure 1B). In order to investigate the effect of IL-27 on imbalanced production of IL-17 and IL-10 by Tregs from B27 rats, we performed cocultures of sorted Treg cells (CD4⁺ CD25^{high}) with CD103⁺ DCs from B27 rats in the presence or absence of recombinant murine IL-27. IL-27 was able to decrease the percentage of IL-17⁺ cells (Figure 1C) and significantly inhibited IL-17 levels produced in supernatants. We also observed a slight increase in IL-10 production in presence of IL-27 (Figure 1D). Analysis by multiplex ELISA assay revealed that IL-17 and IL-10 were the most abundant cytokines produced by Treg cells *in vitro* in comparison to a panel of 11 cytokines (Supplementary Figure 1).

IL-27 decreases IL-17⁺ T cells generation from B27 naive T cells.

It was previously described that IL-27 can influence T cell differentiation by supporting Th₁ and Tr₁ differentiations and inhibiting Th₁₇ commitment.¹² Given that DCs from B27 rats induce IL-17 production by Treg cells⁸ and Th₁₇ expansion⁷ we tested if IL-27 could also inhibit *in vitro* IL-17 producing-Treg differentiation from naive T cells. A decreased proportion of IL-17 positive T cells was observed in cocultures of naive T cells and CD103⁺ DCs under Treg polarizing conditions in the presence of IL-27 (Figure 1E). Furthermore a decreased production of IL-17 and an increased production of IL-10 were observed in the cocultures supernatants in presence of IL-27 (Figure 1F). We observed an increased number of IFN- γ -producing T cells and high levels of IFN- γ in presence of IL-27 (Supplementary Figure 2) confirming the pro-Th₁ role of that cytokine on the differentiation of naive T cells. Similarly, when we cultured sorted naive T cells with CD103⁺ DCs under Th₁₇-polarizing

conditions we observed that IL-27 reduced the proportion of IL-17 producing T cells (Figure 1G) and IL-17 production in supernatants (Figure 1H). However, no change in IL-10 production was observed in presence of IL-27 (Figure 1H). In these conditions, IL-27 also increased IFN- γ production detected in culture supernatants (Supplementary Figure 2). Our data show an inhibitory effect of IL-27 on - differentiated and polarizing Treg- and Th₁₇ cultures demonstrating an anti-inflammatory effect of IL-27 on the generation and maintenance of IL-17 producing T cells in animal model of SpA. Taken together, these results highlight an important modulatory role of IL-27 in the expansion of Th₁₇ cells confirming that deficiency of IL-27 production by DC from B27 rats⁹ may be a key element in the emergence of Th₁₇-driven inflammatory disease in B27 rats.

Given that both DC and T cells express a functional IL-27R we first studied the effect of IL-27 on each population independently. Interestingly, we also observed anti-inflammatory effect of IL-27 on activated and effector T cells in the absence of DCs (Supplementary Figure 3). Exogenous IL-27 decreased the production of IL-17 in both cultures. Unlike the results observed previously with cocultures in presence of dendritic cells, in these conditions, IL-27 was not able to increase IFN- γ production (Supplementary Figure 4). Furthermore, IL-27 also inhibited the generation of IL-17 producing T cells from naive T cells stimulated with soluble anti-CD28 without DCs (Supplementary Figure 5). In these conditions, IL-27 decreased IL-17 and increased IL-10 and IFN- γ productions. Thus, IL-27 reduces the proinflammatory state of differentiated T cells from B27 rats by its capacity to decrease IL-17 and increase IL-10 productions. Conversely, IL-27 treatment of DCs before coculture had no effect on the expression of co-stimulatory molecules (CD40, CD86) and CMH (class I and II) or on the capacity of these cells to expand IL-17⁺ T cells (data not shown). Therefore, we focused our study of the IL-27 effect on T cells cultured without DCs.

IL-27 induces similar STAT1/3 phosphorylation in NTG and B27 CD4⁺ T cells despite increased levels of STAT3 in B27 rats.

It is well established that IL-27 induces the phosphorylation of STAT1 and STAT3 after binding to IL-27R and activation of these STATs are required for inhibition of Th₁₇ differentiation and induction of

IL-10 production¹⁸. Thus, we studied the phosphorylation of STAT1 and STAT3 by flow cytometry after IL-27 stimulation. As shown in Figure 2A, IL-27 induced phosphorylation of pSTAT1 and pSTAT3 in approximately 80% and 40% of B27 Tregs respectively. There was no significant difference of pSTAT1/3 between NTG and B27 Tregs (Figure 2B). Similar results were observed in several T cell subsets (data not shown). These results indicate that after IL-27 stimulation, T cell subsets from NTG and B27, have a similar capacity to induce pSTAT. On the other hand, when we analyzed total STAT1/3 levels in CD4⁺ T cells we observed an increased level of STAT3 in Treg cells (Figure 2C) and other T cell subsets (data not shown) from B27 rats.

IL-10 and ICOS are not necessary for the anti-IL-17 effect of IL-27

Given that IL-27 induces both differentiation of IL-10-producing Tr₁ and inhibition of Th₁₇ cells generation we hypothesized that decreased IL-17 production induced by IL-27 could be dependent on IL-10 production by T cells from B27 rats. To test this hypothesis we studied IL-27 effect only on T cells, performing cultures of CD4⁺CD25⁺ activated cells in presence of IL-27 and IL-10-blocking monoclonal antibody. *In vitro* activated CD4⁺ CD25⁺ T cells are the most important producers of IL-17 among CD4⁺ T cells in absence of dendritic cells. The IL-27 addition resulted in decreased IL-17 production and increased IL-10 production by these cells (Supplementary Figure 3). As shown in Figure 3, the presence of α -IL-10 blocking antibody no abolished anti-inflammatory effect of IL-27 on IL-17 production. Concomitantly, IL-27 inhibited the generation of IL-17⁺ T cells from naive T cells under Th₁₇ polarizing conditions when IL-10 was blocked (Figure 3B). These data show that the inhibitory effect of IL-27 on IL-17 production and Th₁₇ cells differentiation is IL-10 independent.

We previously demonstrated that blockade of ICOS/ICOSL pathway results in increased IL-10 and decreased IL-17 productions by CD4⁺ T cells from B27 rats⁸. Given that addition of exogenous IL-27 has the same effect on those cells we wondered if IL-27 could directly influence ICOS expression. Interestingly, we observed a decreased expression of ICOS on activated T cells and naive T cells cultured in Treg or Th₁₇ polarizing conditions (Figure 4A). To investigate whether decreased ICOS

expression is associated to anti-inflammatory effect of IL-27, we cultured CD4⁺ CD25⁺ T cells from B27 ICOS Knock-Out rats (B27 ICOS KO) in the presence of IL-27. As shown in Figure 4C, IL-27 reduced the proportion of IL-17⁺ T cells after 3 days of culture from both B27 ICOS WT and B27 ICOS KO rats. Similarly, IL-27 decreased IL-17 and tended to increase IL-10 levels in supernatants of activated T cells from B27 ICOS-WT and B27 ICOS KO. These results indicate that the presence of ICOS is not required for the action of IL-27 on CD4⁺ T cells from B27 rats.

IL-27 decreases IL-17 production by peripheral CD4⁺ T cells from SpA patients and healthy controls.

Given that IL-27 inhibits the production of IL-17 by several CD4⁺ T cells in B27 rats, it is tempting to think that IL-27 could have the same effect in IL-17⁺ producing cells from human samples. Thus, we cultured CD4⁺ T cells isolated from the blood of SpA patients and healthy controls in the presence of IL-27 during 6 days. Similarly to the results observed in B27 rats, the presence of IL-27 reduced the proportion of IL-17 positive CD4⁺ T cells (Figure 5A) and reduced the level of IL-17 in the supernatant (Figure 5B). In contrast to our results obtained in B27 rats, no changes were observed in IFN- γ and IL-10 levels in supernatants of cultures in presence of IL-27 (Figure 5B) suggesting a differential effect of IL-27 on human and rat CD4⁺ T cells.

DISCUSSION

SpA is a chronic inflammatory disorder with simultaneous bone destruction and ossification which can ultimately lead to debilitating ankylosis. The etiology of SpA is still uncertain despite numerous hypotheses.¹ Imbalance of the Th₁₇/Treg equilibrium seems to have a strong impact on the development of several inflammatory diseases. The pathogenicity of IL-17 in the context of SpA is clearly established²⁶ and given the crucial role T cells in the development of rat SpA⁴ Th₁₇ cells are considered pathogenic in this pathology. The reasons for the spectacular expansion of Th₁₇ cells in the mesenteric lymph nodes of these rats⁷ are not fully understood but DCs are involved in this process. Given the under-expression of IL-27 by B27 DCs⁹ and the unusual secretion of IL-17 by Treg⁸ we wondered if IL-27, a cytokine able to decrease IL-17 production by several T cell subsets,¹¹ could reverse these inflammatory phenotypes and further could be a potential therapeutic target in SpA.

To our knowledge, this study is the first description of the modulatory effect of IL-27 on rat CD4⁺ T cells and in the context of SpA. We clearly showed that IL-27 is able to reverse the proinflammatory profile of differentiated Treg and Teff from B27 rats by inhibiting IL-17- and increasing IL-10 productions. Moreover we also observed that IL-27 can drastically reduce the generation of Th17 from naive T cells by favoring the development of IFN- γ ⁺ T cells and IL-10 synthesis. Interestingly, IL-27 also reduces the frequency of IL-17⁺ T cells from peripheral CD4⁺ T cells of SpA patients. These results are very promising and we hypothesize that IL-27 could be a new therapeutic target in SpA by countering the expansion of Th₁₇ cells and by reversing the imbalanced production of IL-17 and IL-10 by Treg. Our data are consistent with several studies which demonstrated a protective effect of IL-27 in animal models of arthritis^{21,27,28} and colitis^{22,29} involving Th₁₇ cells.

Th₁₇ commitment can be induced by several cytokine cocktails including TGF- β , IL-1, IL-6 or IL-21. IL-23 is important in the stabilization of the Th₁₇ phenotype³⁰ and is a potent inducer of the Th₁₇ pathogenicity³¹⁻³³. Th₁₇ differentiation relies on the transcription factors ROR γ t in rodents and RORc in humans which are considered to be master regulators of Th₁₇ generation. However, Th₁₇

development is also promoted by additional transcription factors³⁴ and particularly by STAT3.³⁵ Interestingly, we observed an elevated level of STAT3 in CD4⁺ T cells from B27 rats, independently of its phosphorylation status. A similar increase in the level of STAT3 was described in the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients affected by rheumatoid arthritis.³⁶ This elevated expression of STAT3 was correlated with an increased proportion of Th₁₇ cells and a decreased frequency of Treg cells in the blood of RA patients. It is then tempting to think that the Th₁₇ expansion in B27 rats is also linked to this increase in STAT3 expression. However further studies are needed to decipher the induction of STAT3 in this context.

The inhibitory effect of IL-27 on differentiated Th₁₇ cells is quite unexpected because it was previously shown that IL-27 has no effect on committed mouse Th₁₇ cells.³⁷ However in this study we observed inhibitory effect of IL-27 in both *ex vivo* sorted IL-17 producing T cells and *in vitro* polarized Th₁₇ from B27 rats. In addition to species differences, it seems that *in vitro* polarized Th₁₇ cells and *ex vivo* sorted T cells have a different response to IL-27.

The fact that IL-27 induces IFN- γ production by naive T cells polarized in Treg or Th17 *in vitro* but diminishes IFN- γ production by already differentiated T cells in our system is in accordance with the ambiguous effect of IL-27 on Th₁ cells. Indeed, the first description of IL-27¹⁰ and other studies^{14,38} revealed the pro-Th₁ role of IL-27 notably by inducing T-bet expression in naive T cells. However IL-27 has also the capacity to limit excessive Th₁ response by induction of IL-10 expression³⁹ and a CXCR3⁺ T-bet⁺ Treg subset specialized in the control of Th₁ responses.⁴⁰ Our results reinforce the importance of a well-timed action of IL-27 in the control of immune responses as already described in the context of influenza infection.⁴¹

Despite a significant effect of IL-27 on IL-17 production by human peripheral CD4⁺ T cells IL-27 was not able to increase IL-10 production by those cells. It is quite unexpected because previous reports revealed a positive effect of IL-27 on IL-10 production by human CD4⁺ T cells. However, Kumar et al. stimulated whole blood cells and not isolated CD4⁺ T cells with tuberculosis antigens.⁴² Moreover they used a blocking antibody to study the impact of IL-27. Given that IL-27R is expressed by

numerous cell subsets in addition to CD4⁺ T cells¹¹ the stimulation of IL-10 production by IL-27 in humans could be due to the stimulation of other cell subtypes as dendritic cells.

To test the importance of this increased IL-10 production by IL-27 we blocked IL-10 with a neutralizing antibody. We observed no significant alteration in the reduction of IL-17 synthesis induced by IL-27 in the presence of the anti-IL-10 antibody. Despite Hanson and colleagues demonstrated the crucial role of IL-10 for the anti-inflammatory effect of IL-27 *in vivo*²² Fitzgerald and colleagues also showed that IL-10 is not required for the suppression of Th₁₇ cells in the context of EAE.⁴³ These findings suggest that IL-27 can induce several distinct mechanisms to reduce inflammation depending on experimental conditions. In B27 rats these mechanisms seem to be IL-10 independent *in vitro*.

It was previously demonstrated that the induction of Tr₁ cells by IL-27 relies on the induction of three key components : the transcription factor c-maf, the cytokine IL-21 and ICOS.⁴⁴ This study showed that IL-27 is a potent inducer of ICOS expression in mouse CD4⁺ T cells. Another paper demonstrated induction of ICOS⁺ T_{fh} cells by IL-27.⁴⁵ It was therefore unexpected to observe that IL-27 decreases ICOS expression in our system. It is important to note that CD4⁺ T cells from B27 rats have an increased ICOS expression⁸ and our results suggest that IL-27 affects ICOS expression differently in mice and rats.

Although Th₁₇ cells can produce significant amounts of pathogenic IL-17, IL-17 production is not exclusively due to those cells. An enhanced IL-17 secretion by positive γ/δ T cells was previously reported in the blood of AS patients⁴⁶ and an expansion of type 3 innate lymphoid cells (ILC3) producing IL-17 was observed in several organs including gut and synovial fluid of AS patients.⁴⁷ γ/δ T cells express a functional IL-27R and are sensitive to IL-27.⁴⁸ IL-27 reduced the secretion of Th2 related cytokines, increased IFN- γ production but did not affect IL-17 production by γ/δ T cells from healthy donors. To our knowledge there is no published data on the effect of IL-27 on ILC3. It would be interesting to study the effect of IL-27 on γ/δ T cells and ILC3 from SpA patients.

Given the strong anti-IL-17 effect of IL-27 on CD4⁺ T cells we propose that IL-27 could be a new promising therapeutic target in SpA. Previous reports showed that administration of IL-10⁴⁹ or IL-17 blockade⁷ alone could not be able to counter the development of rat SpA. However we think that IL-27 could be able to reduce the severity of symptoms in this rat model of SpA by influencing both cytokines.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Inflammex Laboratory of Excellence for financial support, Benoit Maury from the Cymages platform for generation of cytometry data and Aude Robert from Pelvipharm for managing the rat colonies.

REFERENCES

1. Bowness, P. Hla-B27. *Annu. Rev. Immunol.* **33**, 29–48 (2015).
2. Vieira-Sousa, E., van Duivenvoorde, L. M., Fonseca, J. E., Lories, R. J. & Baeten, D. L. Review: Animal Models as a Tool to Dissect Pivotal Pathways Driving Spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol.* **67**, 2813–2827 (2015).
3. Breban, M., Hammer, R. E., Richardson, J. A. & Taurog, J. D. Transfer of the inflammatory disease of HLA-B27 transgenic rats by bone marrow engraftment. *J. Exp. Med.* **178**, 1607–1616 (1993).
4. Breban, M. *et al.* T cells, but not thymic exposure to HLA-B27, are required for the inflammatory disease of HLA-B27 transgenic rats. *J. Immunol.* **156**, 794–803 (1996).
5. Dhaenens, M. *et al.* Dendritic cells from spondylarthritis-prone HLA-B27-transgenic rats display altered cytoskeletal dynamics, class II major histocompatibility complex expression, and viability. *Arthritis Rheum.* **60**, 2622–2632 (2009).
6. Utriainen, L. *et al.* Expression of HLA-B27 causes loss of migratory dendritic cells in a rat model of spondylarthritis. *Arthritis Rheum.* **64**, 3199–3209 (2012).
7. Glatigny, S. *et al.* Proinflammatory Th17 cells are expanded and induced by dendritic cells in spondylarthritis-prone HLA-B27-transgenic rats. *Arthritis Rheum.* **64**, 110–120 (2012).
8. Araujo, L. M. *et al.* Increased Production of Interleukin-17 Over Interleukin-10 by Treg Cells Implicates Inducible Costimulator Molecule in Experimental Spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol.* **66**, 2412–2422 (2014).
9. Fert, I. *et al.* Reverse Interferon Signature Is Characteristic of Antigen-Presenting Cells in Human and Rat Spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol.* **66**, 841–851 (2014).
10. Pflanz, S. *et al.* IL-27, a Heterodimeric Cytokine Composed of EBI3 and p28 Protein, Induces Proliferation of Naive CD4⁺ T Cells. *Immunity* **16**, 779–790 (2002).
11. Yoshida, H. & Hunter, C. A. The Immunobiology of Interleukin-27. *Annu. Rev. Immunol.* **33**, 417–443 (2015).

12. Iwasaki, Y., Fujio, K., Okamura, T. & Yamamoto, K. Interleukin-27 in T Cell Immunity. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 2851–2863 (2015).
13. Jankowski, M. & Wandtke, T. *Interleukin-27: Biological Properties and Clinical Application*. (Springer, 2016).
14. Owaki, T., Asakawa, M., Fukai, F., Mizuguchi, J. & Yoshimoto, T. IL-27 induces Th1 differentiation via p38 MAPK/T-bet- and intercellular adhesion molecule-1/LFA-1/ERK1/2-dependent pathways. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **177**, 7579–7587 (2006).
15. Batten, M. *et al.* Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat. Immunol.* **7**, 929–936 (2006).
16. Khan, D., Dai, R., Karpuzoglu, E. & Ahmed, S. A. Estrogen increases, whereas IL-27 and IFN-gamma decrease, splenocyte IL-17 production in WT mice. *Eur. J. Immunol.* **40**, 2549–2556 (2010).
17. Apetoh, L. *et al.* The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat. Immunol.* **11**, 854–861 (2010).
18. Pot, C., Apetoh, L., Awasthi, A. & Kuchroo, V. K. Induction of regulatory Tr1 cells and inhibition of TH17 cells by IL-27. *Semin. Immunol.* **23**, 438–445 (2011).
19. Sieper, J. & Poddubnyy, D. New evidence on the management of spondyloarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **12**, 282–295 (2016).
20. Fitzgerald, D. C. *et al.* Suppressive effect of IL-27 on encephalitogenic Th17 cells and the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **179**, 3268–3275 (2007).
21. Pickens, S. R. *et al.* Local expression of interleukin-27 ameliorates collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **63**, 2289–2298 (2011).
22. Hanson, M. L. *et al.* Oral Delivery of IL-27 Recombinant Bacteria Attenuates Immune Colitis in Mice. *Gastroenterology* **146**, 210–221.e13 (2014).

23. International Genetics of Ankylosing Spondylitis Consortium (IGAS) *et al.*
Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nat. Genet.* **45**, 730–738 (2013).
24. Hacquard-Bouder, C. *et al.* Defective costimulatory function is a striking feature of antigen-presenting cells in an HLA–B27–transgenic rat model of spondylarthropathy. *Arthritis Rheum.* **50**, 1624–1635 (2004).
25. Hacquard-Bouder, C. *et al.* Alteration of antigen-independent immunologic synapse formation between dendritic cells from HLA–B27–transgenic rats and CD4+ T cells: Selective impairment of costimulatory molecule engagement by mature HLA–B27. *Arthritis Rheum.* **56**, 1478–1489 (2007).
26. Baeten, D. *et al.* Secukinumab, an Interleukin-17A Inhibitor, in Ankylosing Spondylitis. *N. Engl. J. Med.* **373**, 2534–2548 (2015).
27. Niedbala, W. *et al.* Interleukin 27 attenuates collagen-induced arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **67**, 1474–1479 (2008).
28. Rajaiiah, R., Puttabyatappa, M., Polumuri, S. K. & Moudgil, K. D. Interleukin-27 and interferon-gamma are involved in regulation of autoimmune arthritis. *J. Biol. Chem.* **286**, 2817–2825 (2011).
29. Sasaoka, T. *et al.* Treatment with IL-27 attenuates experimental colitis through the suppression of the development of IL-17-producing T helper cells. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **300**, G568–G576 (2011).
30. Zhou, L. *et al.* IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat. Immunol.* **8**, 967–974 (2007).
31. Ghoreschi, K. *et al.* Generation of pathogenic TH17 cells in the absence of TGF- β signalling. *Nature* **467**, 967–971 (2010).
32. Lee, Y. *et al.* Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat. Immunol.* **13**, 991–999 (2012).

33. Pfeifle, R. *et al.* Regulation of autoantibody activity by the IL-23-TH17 axis determines the onset of autoimmune disease. *Nat. Immunol.* (2016). doi:10.1038/ni.3579
34. Guéry, L. & Hugues, S. Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity. *BioMed Res. Int.* **2015**, 314620 (2015).
35. Durant, L. *et al.* Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. *Immunity* **32**, 605–615 (2010).
36. Dong, L. *et al.* Decreased expression of microRNA-21 correlates with the imbalance of Th17 and Treg cells in patients with rheumatoid arthritis. *J. Cell. Mol. Med.* **18**, 2213–2224 (2014).
37. El-behi, M. *et al.* Differential effect of IL-27 on developing versus committed Th17 cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 4957–4967 (2009).
38. Kamiya, S. *et al.* An Indispensable Role for STAT1 in IL-27-Induced T-bet Expression but Not Proliferation of Naive CD4+ T Cells. *J. Immunol.* **173**, 3871–3877 (2004).
39. Batten, M. *et al.* Cutting Edge: IL-27 Is a Potent Inducer of IL-10 but Not FoxP3 in Murine T Cells. *J. Immunol.* **180**, 2752–2756 (2008).
40. Hall, A. O. *et al.* The cytokines interleukin 27 and interferon- γ promote distinct Treg cell populations required to limit infection-induced pathology. *Immunity* **37**, 511–523 (2012).
41. Liu, F. D. M. *et al.* Timed action of IL-27 protects from immunopathology while preserving defense in influenza. *PLoS Pathog.* **10**, e1004110 (2014).
42. Kumar, N. P. *et al.* IL-27 and TGF β mediated expansion of Th1 and adaptive regulatory T cells expressing IL-10 correlates with bacterial burden and disease severity in pulmonary tuberculosis. *Immun. Inflamm. Dis.* **3**, 289–299 (2015).
43. Fitzgerald, D. C. *et al.* Independent and interdependent immunoregulatory effects of IL-27, IFN- β , and IL-10 in the suppression of human Th17 cells and murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **190**, 3225–3234 (2013).
44. Pot, C. *et al.* Cutting edge: IL-27 induces the transcription factor c-Maf, cytokine IL-21, and the costimulatory receptor ICOS that coordinately act together to promote

- differentiation of IL-10-producing Tr1 cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 797–801 (2009).
45. Batten, M. *et al.* IL-27 supports germinal center function by enhancing IL-21 production and the function of T follicular helper cells. *J. Exp. Med.* **207**, 2895–2906 (2010).
46. Kenna, T. J. *et al.* Enrichment of circulating interleukin-17–secreting interleukin-23 receptor–positive γ/δ T cells in patients with active ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* **64**, 1420–1429 (2012).
47. Ciccia, F. *et al.* Type 3 innate lymphoid cells producing IL-17 and IL-22 are expanded in the gut, in the peripheral blood, synovial fluid and bone marrow of patients with ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* **74**, 1739–1747 (2015).
48. Morandi, F., Prigione, I. & Airoidi, I. Human TCR $\gamma\delta$ + T cells represent a novel target for IL-27 activity. *Eur. J. Immunol.* **42**, 1547–1552 (2012).
49. Bertrand, V. *et al.* Effects of murine recombinant interleukin-10 on the inflammatory disease of rats transgenic for HLA-B27 and human 2-microglobulin. *Eur. Cytokine Netw.* **9**, 161–70 (1998).

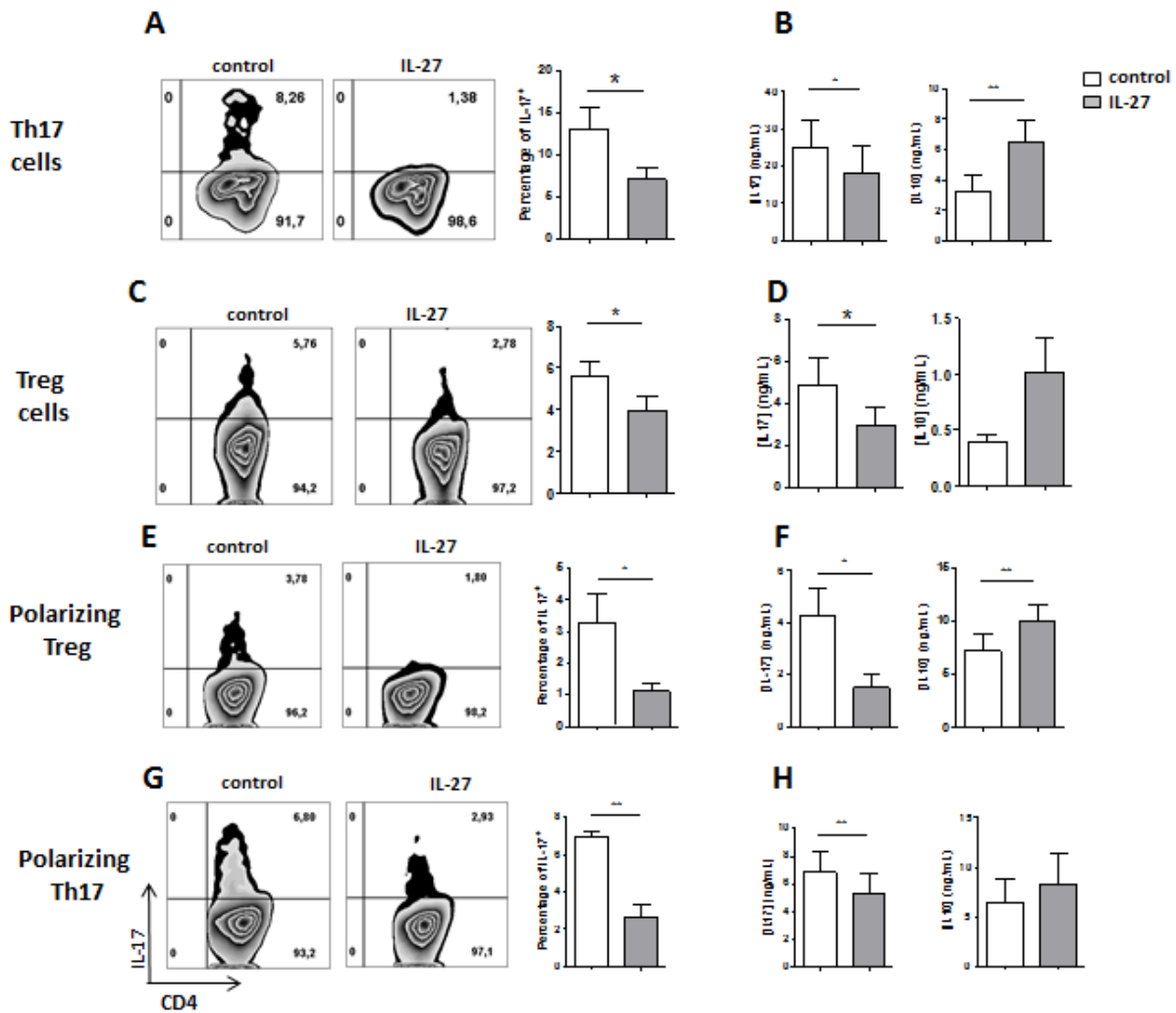


Figure 1: Immunoregulatory effect of IL-27 on IL-17/IL-10 production by T subsets cells from B27 rats.

(A-D) The percentage of IL-17-producing T cells was evaluated by flow cytometry (A and C) after coculture of sorted sorted Teff ($CD4^+ CD25^- CD62L^-$; A-B) or Treg ($CD4^+ CD25^{high}$; C-D) with $CD103^+$ DCs. (B and D) IL-17 and IL-10 levels were evaluated at day 3 in the supernatants of cocultures by ELISA. Values are the mean \pm SEM of minimum 4 independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

(E-H) The percentage of IL-17-producing T cells was evaluated after coculture of naive T cells ($CD4^+ CD25^- CD62L^+$) in Treg (TGF- β ; E-F) or Th₁₇ (TGF- β + IL-6 + IL-1 + IL-23; G-H) polarizing conditions with $CD103^+$ DCs. (F and H) IL-17 and IL-10 levels were evaluated by ELISA at day 6 in the supernatants. Values are the mean \pm SEM of minimum 5 independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

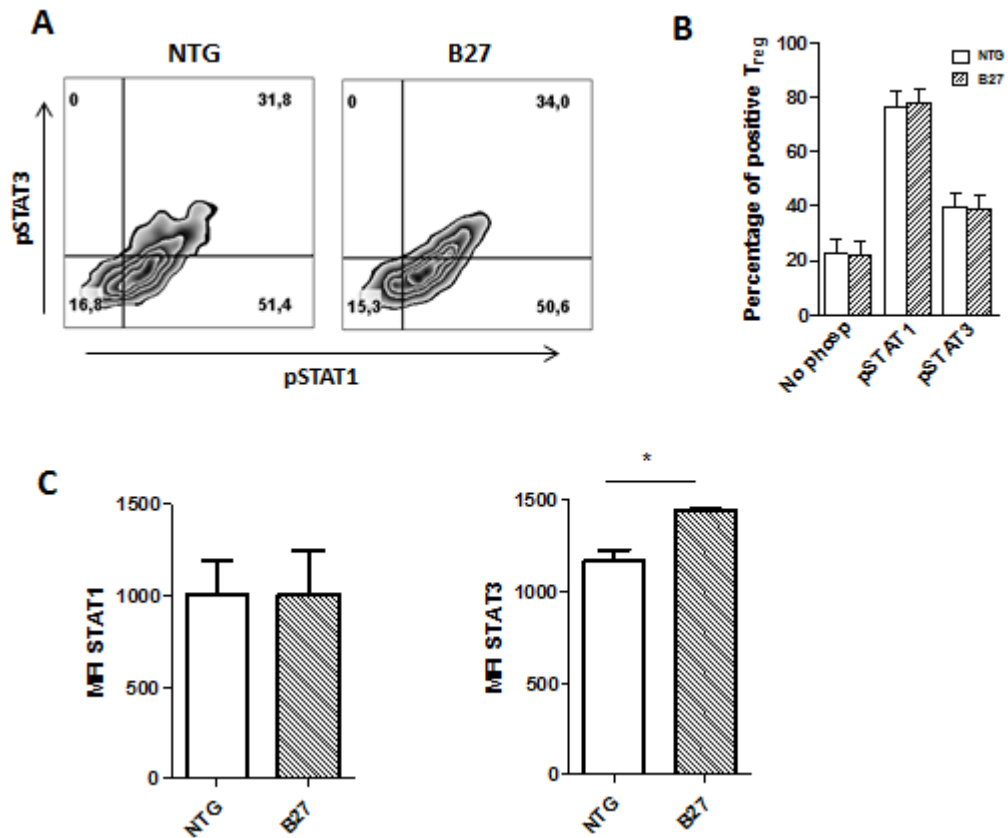


Figure 2: IL-27 induces similar phosphorylation of STAT1 and STAT3 in NTG and B27 Treg despite increased STAT3 level in B27 T cells.

(A) Representative data of B27 MLN cells stimulated 10 minutes in the presence of PBS (shaded curve) or IL-27 (black curve) and stained intracellularly for phosphorylated STAT1 (Tyr701) and STAT3 (Tyr705), in the gated CD4⁺ CD25^{high} Treg cells.

(B) MLN cells from NTG and B27 rats were stimulated 10 minutes with IL-27. STAT1 and STAT3 phosphorylation state was analyzed in the gated CD4⁺ CD25^{high} Treg cells. Values are the mean \pm SEM of 6 independent experiments.

(C) MLN cells from NTG and B27 rats were stained for STAT1 and STAT3. STAT levels were analyzed in gated CD4⁺ CD25^{high} Treg cells. Values are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. *p<0.05

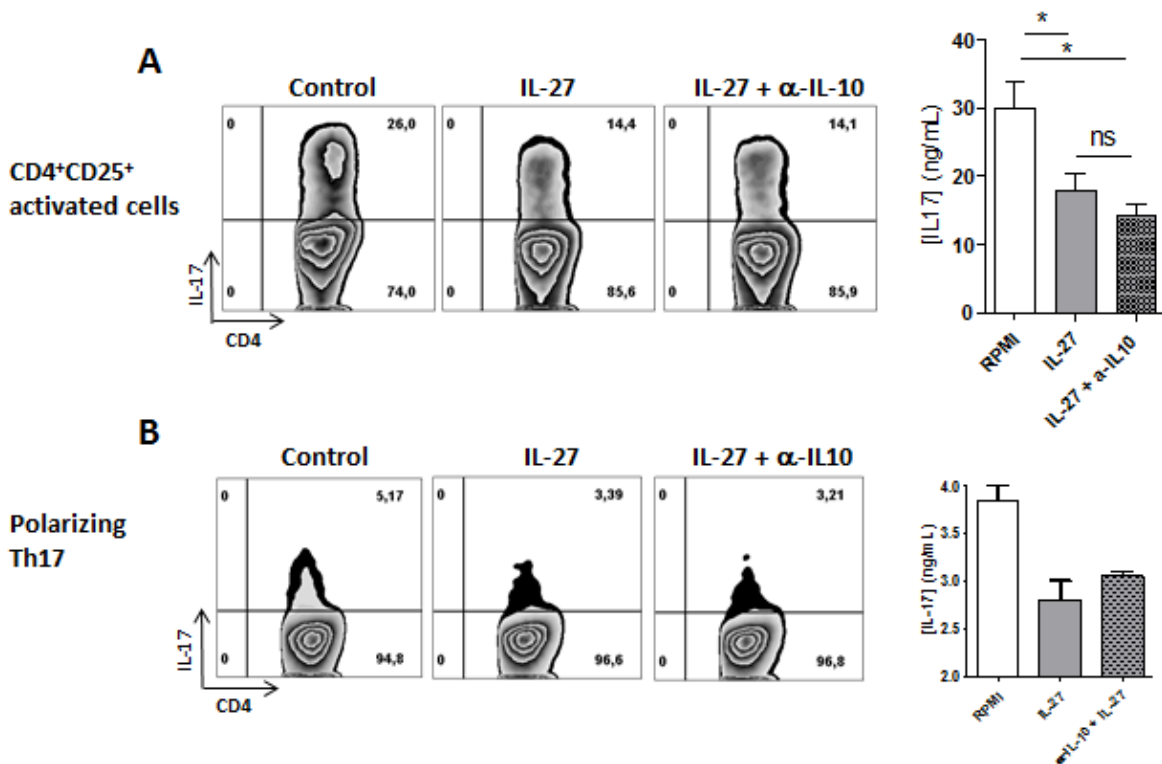


Figure 3: Decreased IL-17 production induced by IL-27 is IL-10 independent.

(A) Representative results of CD4⁺ CD25⁺ activated T cells cultured 3 days with coated α -CD3 and soluble α -CD28 in the presence or absence of IL-27 and an α -IL-10 blocking antibody. * $p < 0.05$, ns = not significant.

(B) Representative results of naive T cells cultured during 6 days in Th₁₇ polarizing conditions with coated α -CD3 and soluble α -CD28 in the presence or absence of IL-27 and an α -IL-10 blocking antibody. The percentage of IL-17⁺ cells was evaluated by flow cytometry (left) and IL-17 production was analyzed by ELISA (right).

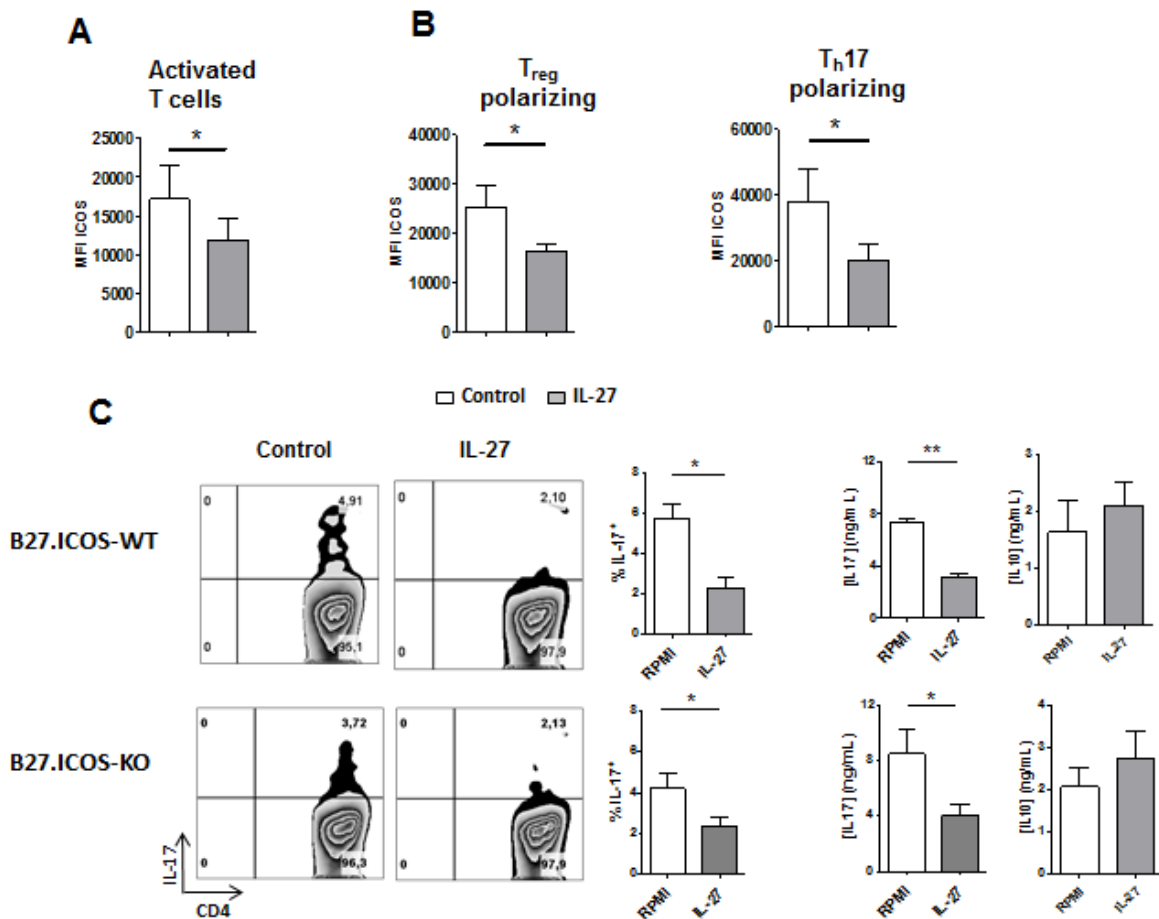


Figure 4: ICOS is not required for the inhibition of IL-17 production by IL-27.

(A) ICOS expression on cultured CD4⁺ CD25⁺ activated T cells and (B) on naive T cells differentiated in Treg-polarizing or Th17-polarizing conditions in presence or absence of IL-27. Values are the mean \pm SEM of at least 4 independent experiments. * $p < 0.05$

(C) Left, representative results of CD4⁺ CD25⁺ activated T cells from B27 ICOS WT and ICOS KO rats cultured 3 days with coated α -CD3 in the presence or absence of IL-27. Right, IL-17 and IL-10 concentrations were evaluated by ELISA. Values are the mean \pm SEM of 4 independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

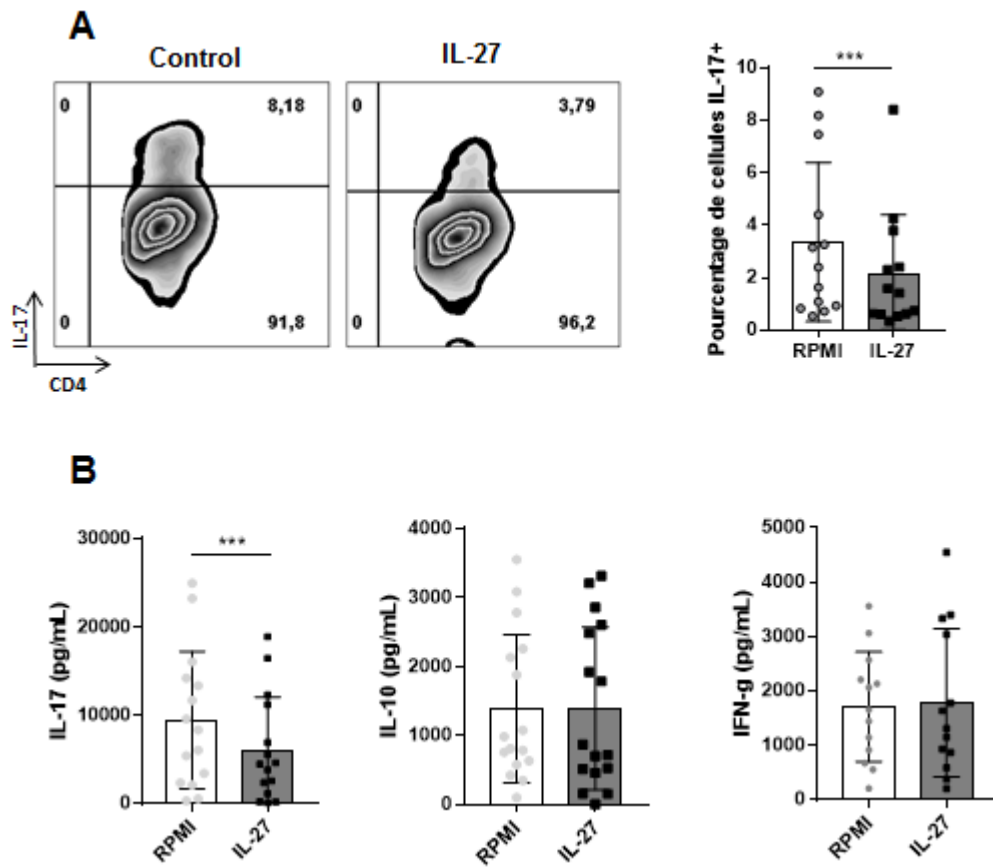


Figure 5: IL-27 decreases IL-17 production of peripheral CD4+ T cells from SpA patients.

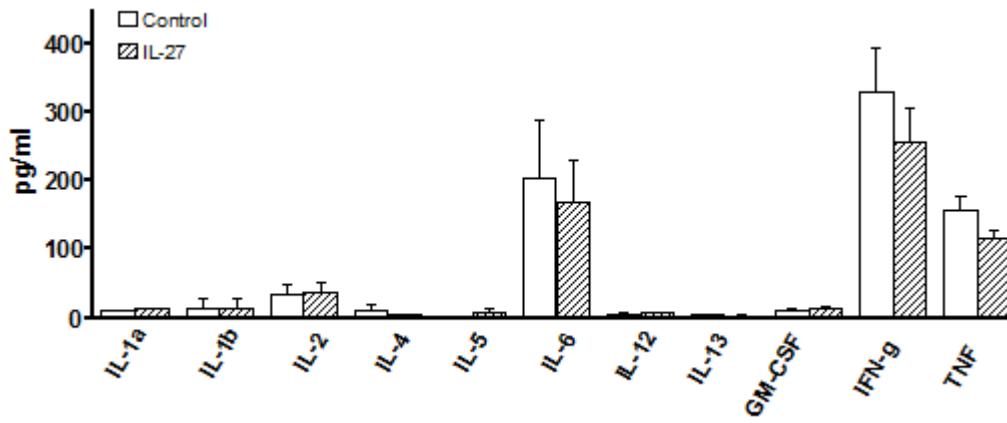
(A) Left, representative results of CD4⁺ T cells from SpA patients cultured during 6 days with IL-2 in the presence or absence of IL-27. ***p < 0.001

(B) IL-17, IL-10 and IFN γ concentrations were analyzed by ELISA. ***p < 0.001

	SpA patients (n=16)
Age (range) in years	49 (29-72)
Sex, no male	10
HLA-B27 +	15
SpA subtype, no	
AS	8
PsA	3
uSpA	3
Medications, no. taking	
NSAIDs	5
Sulfasalazine	2
TNF inhibitor	6

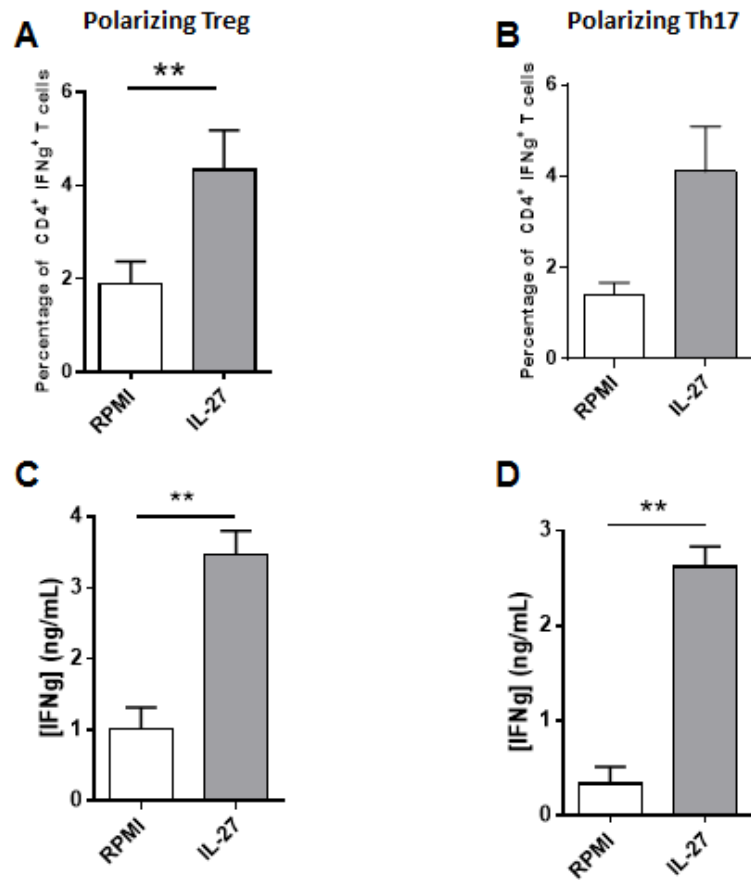
Supplementary Table 1: Characteristics of the study population.

AS: ankylosing spondylitis; PsA: psoriatic arthritis; uSpA undifferentiated spondyloarthritis; NSAIDs: non-steroid antiinflammatory drugs.



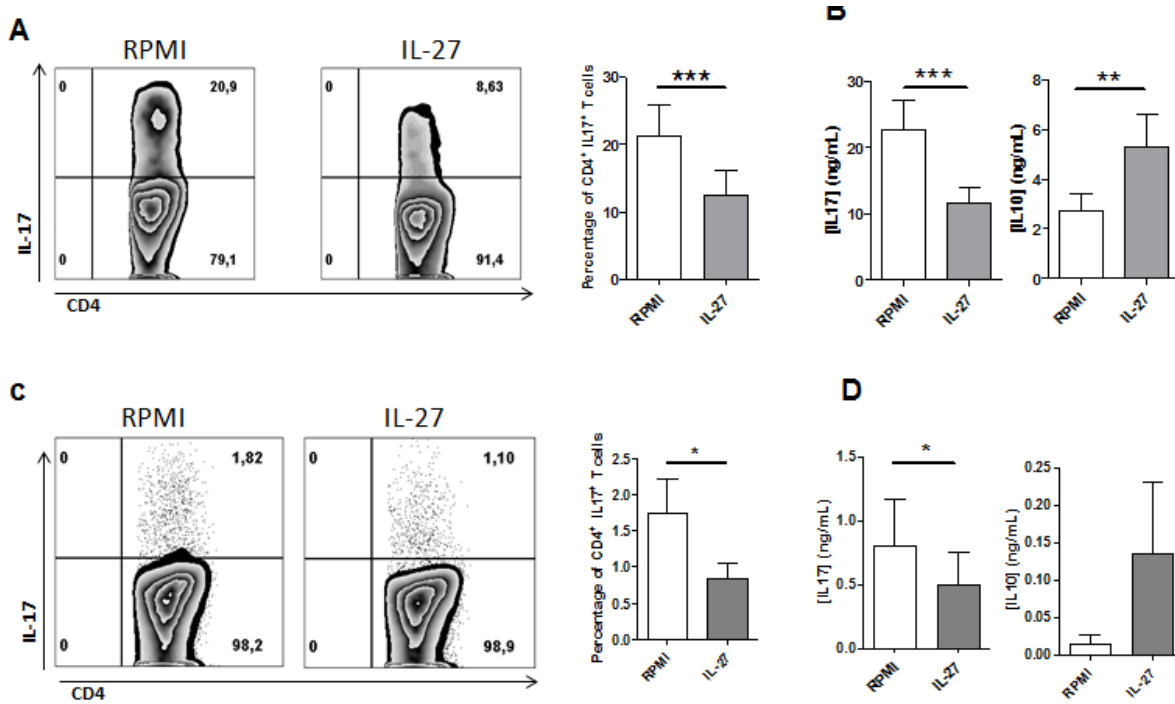
Supplementary Figure 1: Cytokine production by B27 Treg cells cocultured with DCs in the presence or absence of IL-27

A panel of 11 cytokines was studied using multiplex ELISA assay in the supernatants of the cocultures. Values are the mean \pm SEM of 4 independent experiments.



Supplementary Figure 2: IL-27 upregulates IFN- γ production by Treg and Th₁₇ polarizing T cells from B27 rats.

CD4⁺ CD25⁻ CD62L⁺ naive T cells were polarized in vitro in Treg (A) or Th₁₇ (B) during 6 days in presence or absence of IL-27 and the percentage of IFN- γ positive cells was evaluated by flow cytometry. (C and D) IFN- γ level was evaluated by ELISA in the supernatants. Values are the mean \pm SEM of minimum 4 independent experiments. ** $p < 0.01$



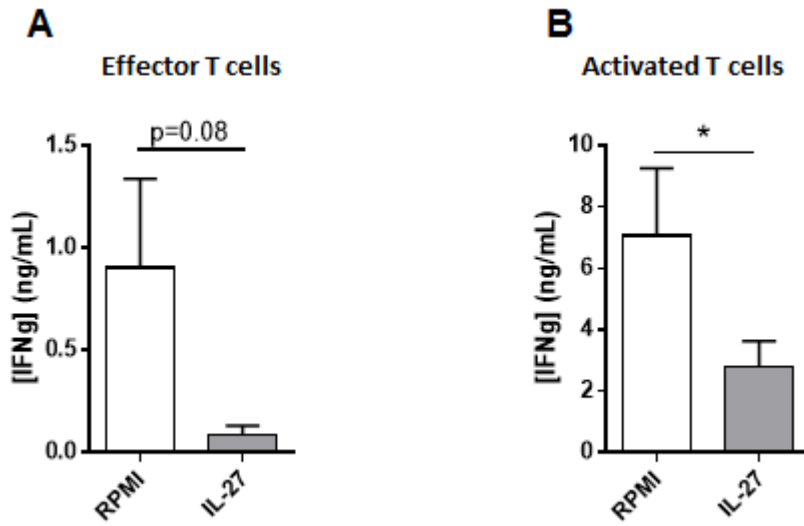
Supplementary Figure 3: Anti inflammatory effect of IL-27 on activated T cells and on effector T cells in the absence of DCs.

(A) Representative data of CD4⁺ CD25⁺ activated T cells cultured 3 days in the presence or absence of IL-27.

(B) IL-17 and IL-10 levels were evaluated by ELISA in the supernatants at the end of the culture (day 3). Values are the mean \pm SEM of 7 independent experiments. ** p< 0.01, *** p< 0.001

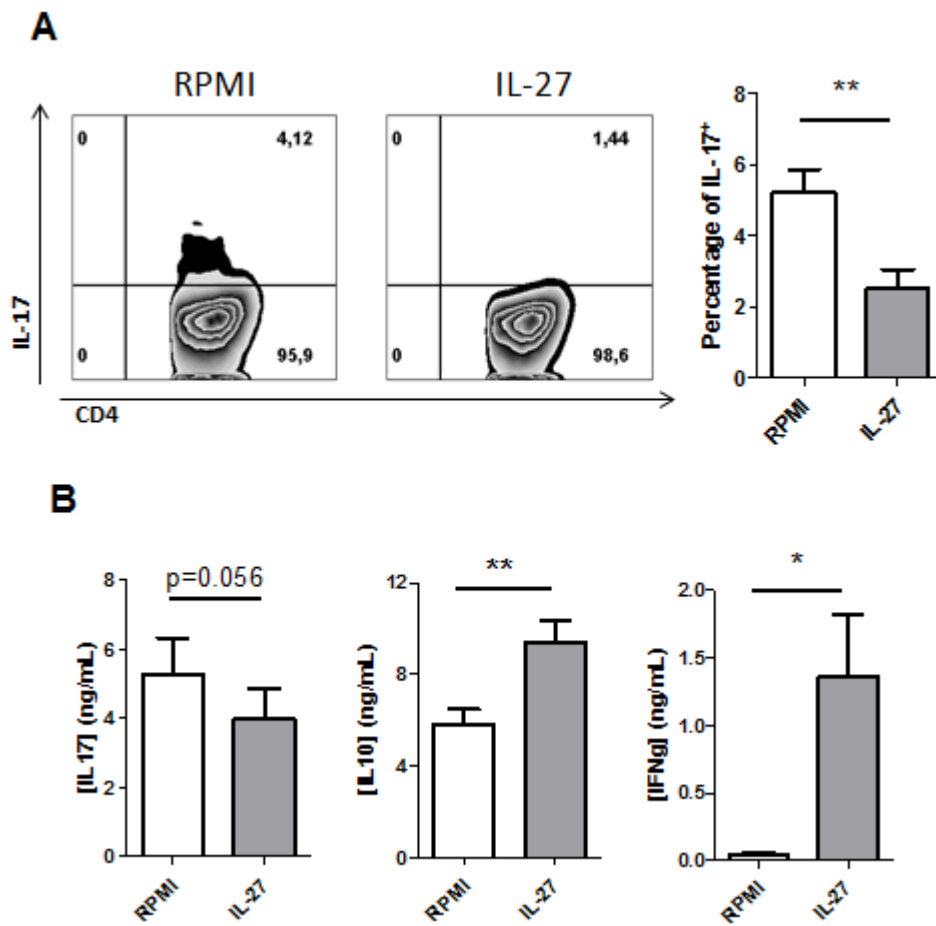
(C) Representative data of CD4⁺ CD25⁻ CD62L⁻ effector T cells cultured 3 days in the presence or absence of IL-27.

(D) IL-17 and IL-10 levels were evaluated by ELISA in the supernatants at the end of the culture (day 3). Values are the mean \pm SEM of 7 independent experiments. *p<0.05



Supplementary Figure 4: IL-27 decreases IFN- γ production by effector T cells and activated T cells in the absence of DCs.

CD4⁺ CD25⁻ CD62L⁻ effector T cells (A) and CD4⁺ CD25⁺ activated T cells (B) were cultured 3 days in presence or absence of IL-27 and IFN- γ level was evaluated by ELISA in the supernatants. Values are the mean \pm SEM of minimum 4 independent experiments. * $p < 0.05$



Supplementary Figure 5: Anti inflammatory effect of IL-27 on the differentiation of naive T cells in the absence of DCs.

(A) The percentage of IL-17-producing T cells was evaluated by flow cytometry after culture of naive T cells (CD4⁺ CD25⁻ CD62L⁺) in Th₁₇ (TGF-β + IL-6 + IL-1 + IL-23) polarizing conditions with anti-CD3/anti-CD28 stimulation.

(B) IL-17, IL-10 and IFN-γ levels were evaluated by ELISA at day 6 in the supernatants. Values are the mean ± SEM of minimum 5 independent experiments. * p < 0.05; ** p < 0.01

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La SpA est une pathologie multifactorielle avec une importante composante génétique, dominée par le HLA-B27. Ce facteur génétique est presque nécessaire au développement de la SpA (sa prévalence pouvant atteindre jusqu'à 90% chez les patients atteints de SA) mais est clairement insuffisante. La très grande majorité des personnes HLA-B27⁺ ne développeront pas de SpA au cours de leur vie. Ce rôle clé du HLA-B27 est renforcé par l'étude des rats transgéniques pour le HLA-B27 et la $\beta 2$ microglobuline humaine ($\beta 2m$) qui développent spontanément un phénotype très proche de la SpA humaine avec une prévalence de 100%. L'étude de ce modèle animal a permis de faire de nombreuses avancées dans la compréhension de la physiopathologie de la SpA et le rôle clé des cellules originaires de la moelle osseuse et des LT CD4⁺ est bien établi (Brebant et al., 1993, 1996).

Il faut cependant souligner que plusieurs dizaines de copies du HLA-B27 et de la $\beta 2m$ sont requises pour que le phénotype apparaisse alors que chez l'Homme il ne peut y avoir que 2 copies au maximum. Cela suggère que des niveaux anormalement élevés de B27 sont nécessaires au développement de la pathologie et pourraient être un élément d'explication à la très faible pénétrance de la SpA observée chez les personnes HLA-B27⁺. Une étude de 2002 va dans ce sens car elle a démontré que les patients atteints de SpA avaient en moyenne une expression augmentée de HLA-B27 à la surface des cellules mononuclées du sang périphériques (PBMC) (Cauli et al., 2002). En plus de l'importance d'un nombre élevé de copies de HLA-B27, il est tout à fait probable que les mécanismes impliqués dans le développement de la SpA chez le rat puissent être différents de ceux impliqués dans la SpA humaine (Vieira-Sousa et al., 2015). Par exemple, le rôle de l'UPR a bien été démontré chez le rat B27 (DeLay et al., 2009) mais n'a pas été retrouvé chez les patients atteints de SpA (Ciccina et al., 2014; Neerinckx et al., 2014).

Néanmoins, l'implication de la voie IL-23/Th₁₇ semble commune au rat B27 et à la SpA humaine. Chez l'Homme, plusieurs études génétiques ont révélé l'association entre SpA et SNP situés au niveau de gènes liés à la voie Th₁₇ et notamment *IL23R* (Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC) et al., 2010). L'efficacité et la récente mise sur le marché d'un traitement anti-IL-17 (le secukinumab) atteste du caractère pathogène de l'IL-17 dans la SpA. Chez le rat B27, plusieurs études ont montré une augmentation de l'expression de l'IL-17. Elle peut être induite par la réponse UPR (DeLay et al., 2009), ou par les cellules dendritiques qui favorisent l'expansion des LT effecteurs et particulièrement ceux qui produisent de l'IL-17 (Glatigny et al., 2012; Utriainen et al., 2012). L'inhibition de la production d'IL-17 semble donc être une cible thérapeutique de choix dans le contexte de la SpA mais les mécanismes impliqués dans l'expansion de ces cellules sont encore à élucider. C'est dans cette optique d'une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de la SpA et dans la

découverte de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles que mon travail de thèse s'est inscrit.

Balance Th₁₇/Treg chez le rat B27.

La première hypothèse que nous avons émise est l'expansion des Th₁₇ observée chez le rat B27 pourrait être liée à un défaut des Treg, population cruciale dans la régulation de la réponse immune. De manière intéressante, nous avons observé que le nombre absolu de Treg chez le rat B27 était supérieur à celui observé chez le rat NTG. Cependant cette augmentation ne compense absolument pas la forte expansion de LT activés Foxp3⁻ et le ratio Teff/Treg est en défaveur des Treg chez le rat B27. Nous avons également observé que les Treg de rats B27 ont une capacité suppressive similaire aux Treg de rats NTG. Ce résultat a été retrouvé chez les patients atteints de SpA. Il a été démontré que dans l'intestin de ces patients, il existe une réponse Treg active dépendante de l'IL-10 (Ciccia et al., 2010).

Au cours de cette étude, nous n'avons malheureusement pu étudier qu'une sous-population de Treg, aucun marqueur de surface spécifique des Treg n'ayant été décrit chez le rat. Nous avons ciblé notre étude sur la population CD4⁺ CD25^{high} qui exprime à plus de 90% le facteur Foxp3. Il n'est donc pas à exclure que certaines sous-populations de Treg autres que les CD25^{high} Foxp3⁺ soient sous-représentées chez le rat B27. Par ailleurs, le pourcentage de Foxp3⁺ parmi les CD25^{high} diminue drastiquement chez le rat B27 à partir de 6 mois, ce qui ne nous permet pas d'étudier cette population de Treg à partir de cet âge. Il serait par exemple intéressant d'étudier si la capacité suppressive des Treg est conservée au cours du vieillissement chez le rat B27.

Ces résultats laissent penser que l'expansion des Th₁₇ n'est pas due à un défaut des Treg et que le système immunitaire essaye de compenser cette expansion en induisant le développement des LT régulateurs. Cependant, il nous est apparu étonnant que les surnageants de culture avec un faible ratio Teff/Treg présentent des concentrations d'IL-17 plus élevées que les cultures avec des Teff seules. Ces données indiquent que les Treg peuvent promouvoir la production d'IL-17 par les Teff ou se mettre à produire eux-mêmes de l'IL-17. En analysant de plus près ces Treg de rats B27, nous avons observé que leur production d'IL-17 était plus forte que celle des Treg de rats NTG. Parallèlement, la production d'IL-10 par les Treg B27 est diminuée. Ils présentent donc un phénotype qui favorise le développement de l'inflammation.

Plasticité des Treg

Ces résultats vont dans le sens d'une altération de la fonctionnalité des Treg dans les maladies inflammatoires chroniques. Un phénotype similaire a été décrit dans le psoriasis (Jorn Bovenschen et al., 2011). Cette étude a démontré que les Treg CD4⁺ CD25^{high} (la même population que celle que nous avons étudiée chez le rat B27) isolés à partir du sang de patients atteints de psoriasis actif sont capables de venir de grands producteurs d'IL-17 en réponse à une stimulation *in vitro* par le CD3 et le CD28. Ces Treg ont également une plus forte tendance à perdre leur expression de Foxp3 et à exprimer ROR- γ t, notamment sous l'influence de l'IL-23. Il est important de noter que dans notre étude nous n'avons étonnamment pas observé d'augmentation de l'expression de ROR- γ t dans les Treg de rats B27, malgré cette augmentation de l'expression d'IL-17.

Un changement du phénotype des Treg a également été décrit chez les patients atteints de PR (Wang et al., 2015b). Une augmentation de la fréquence de Treg producteurs d'IL-17 a été observée dans le sang, et encore plus dans le liquide synovial, de patients PR. Cette augmentation pourrait être en partie due aux plus fortes concentrations d'IL-6 et d'IL-23 observées chez ces patients. De façon intéressante, seuls les Treg producteurs d'IL-17 isolés à partir du sang gardent leur capacité suppressive, ceux isolés à partir du liquide synovial ayant une capacité suppressive diminuée. Ces Treg producteurs d'IL-17 circulants étant corrélés à une activité de la pathologie et à une intensité de l'inflammation plus faibles, les auteurs suggèrent que ces « Treg-17 » du sang sont protecteurs, alors que les « Treg-17 » du liquide synovial, induits par l'environnement inflammatoire, sont pathogènes. Il serait intéressant de pouvoir suivre *in vivo* la plasticité des Treg chez le rat B27 afin de voir les Treg producteurs d'IL-17 proviennent de Treg ou de Th₁₇. Le faible nombre d'outils disponibles chez le rat pour étudier les Treg ne nous permet pas encore de répondre à cette question. Il est cependant possible que le développement fulgurant de la technologie Crispr/Cas9 puisse amener au développement de nouveaux rats transgéniques où l'expression de marqueurs intracellulaires est couplée à l'expression d'un fluorochrome. Une telle technologie a par exemple permis de démontrer la plasticité des Th₁₇ vers le phénotype Treg chez la souris au cours de la résolution de l'inflammation (Gagliani et al., 2015).

ICOS et Treg

Suite à cette découverte du déséquilibre de la balance IL-17/IL-10 chez les Treg de rats B27, nous nous sommes attelés à essayer de comprendre les mécanismes sous-jacents. Nous n'avons pas observé de changement significatif dans l'expression de plusieurs molécules de surface impliquées dans les fonctions suppressives des Treg, tels que GITR ou CTLA-4, ce qui est

en accord avec leur capacité suppressive non altérée. Nous avons cependant remarqué une forte augmentation de l'expression d'ICOS à la surface de ces cellules. De façon intéressante, l'expression d'ICOS-ligand à la surface des CPA a été reliée à l'induction d'une réponse Th₁₇, et 40% des Th₁₇ du sang circulant expriment ICOS (Paulos et al., 2010). Cette donnée nous a amenés à étudier l'effet du blocage *in vitro* de la voie ICOS/ICOSL sur les productions d'IL-17 et d'IL-10 par les Treg B27. L'inhibition de cette voie de costimulation permet de renverser le déséquilibre de la balance IL-17/IL-10 en faveur de l'IL-10, démontrant l'importance d'ICOS dans cette altération des Treg.

Nous avons tout d'abord été étonnés par cette expression accrue d'ICOS à la surface de Treg produisant peu d'IL-10 car il avait été précédemment démontré que l'expression d'ICOS à la surface des Treg CD25⁺ était associée à une forte production d'IL-10 et à une capacité suppressive accrue (Vocanson et al., 2010). Dans le cas d'une infection par un helminthe, l'absence d'ICOS est également liée à un défaut de production d'IL-10 par les Treg et à une mort accrue de ces cellules par apoptose (Redpath et al., 2013). L'expression d'ICOS est de plus liée à l'induction de l'anergie des LT CD4⁺ par les DC immatures (Tuettenberg et al., 2009). Enfin, une étude génétique a démontré une association entre SpA et un polymorphisme situé au niveau du gène codant pour ICOS-ligand (International Genetics of Ankylosing Spondylitis Consortium (IGAS) et al., 2013) ce qui renforce l'hypothèse d'un rôle majeur de la voie ICOS/ICOSL dans la SpA.

Cependant le rôle d'ICOS sur les Treg reste relativement peu étudié par rapport à son influence sur d'autres sous-populations de LT, notamment les Th₂ et les T_{fh} (Wikenheiser and Stumhofer, 2016). ICOS est une molécule de costimulation possédant une forte homologie avec le CD28 et CTLA-4 et de nombreuses recherches se sont concentrées sur son rôle dans l'immunité adaptative depuis sa découverte il y a presque 20 ans (Hutloff et al., 1999).

SpA et T_{fh}

Grâce à l'analyse de nombreux modèles d'infection chez la souris, il a été démontré qu'ICOS peut promouvoir ou inhiber la réponse Th₁ en fonction du pathogène étudié. L'absence d'ICOS est également globalement liée à une baisse de la réponse Th₂ (Wikenheiser and Stumhofer, 2016). À côté de ces effets sur les Th₁ et les Th₂, ICOS est surtout impliqué dans la formation des centres germinatifs et la différenciation des T_{fh} qui jouent un rôle clé dans le développement de la réponse humorale médiée par les lymphocytes B. L'interaction ICOS/ICOSL favorise notamment l'expression de Bcl-6, facteur de transcription clé de la voie T_{fh}, et de CXCR5, récepteur de chimiokine spécifique de cette sous-population qui permet leur migration vers la zone B du ganglion (Moser, 2015). ICOS est également important dans la

survie des T_{fh} et dans le contact entre le T_{fh} et le LB en cours de différenciation en plasmocyte. L'ensemble de ces données suggère un rôle important des lymphocytes B dans le développement de la SpA. Malheureusement il existe très peu de données publiées à ce sujet. Néanmoins, il a été montré que les patients atteints de SpA, la fréquence de T_{fh} et de plasmocytes est diminuée dans le sang (Bautista-Caro et al., 2014). De plus, les T_{fh} de patients SpA sont moins aptes à aider les lymphocytes B *ex vivo*. Les auteurs suggèrent que ces T_{fh} pourraient être par exemple retenus dans les tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT ; *gut-associated lymphoid tissue*). Une étude de 2015 va cependant à l'opposé de ce résultat car elle montre que les patients SpA avec une maladie active ont un pourcentage plus élevé de T_{fh} circulants que les patients SPA avec une maladie peu active ou les volontaires sains (Wu et al., 2015b). Le rôle des T_{fh} dans la SpA humaine est donc encore très incertain.

SpA et réponse humorale ?

Les T_{fh} sont spécialisés dans le développement de la réponse B et quelques travaux se sont intéressés aux lymphocytes B et aux anticorps dans la SpA. Une étude de Baeten et al indique que les infiltrats inflammatoires observés dans les articulations de patients atteints de SpA peuvent contenir des lymphocytes B mais de façon moins importante que chez les patients atteints de PR (Baeten et al., 2000). Quelques données suggèrent également la présence d'auto-anticorps dans la SpA bien que cette maladie soit considérée « séronégative ». Une étude a montré que près de la moitié (44%) des patients atteints de SpA présentent une large réponse autoanticorps contre seulement 8% des volontaires sains (Wright et al., 2012). De façon intéressante, la réponse autoanticorps est biaisée vers des antigènes du tissu conjonctif et squelettique chez les patients SpA. Une deuxième étude récente a également démontré une augmentation de la concentration d'autoanticorps dirigés contre noggin et la sclérostine dans le sérum de patients SpA (Tsui et al., 2014). Il est à noter que la concentration de sclérostine est également diminuée dans le sérum de patients SpA (Appel et al., 2009). Ces deux protéines présentent un intérêt particulier dans la SpA car ce sont deux inhibiteurs des voies BMP et Wnt/ β -caténine qui favorisent la formation osseuse. Ainsi la néoformation d'os observée chez les patients SpA pourrait être, au moins en partie, due à une activité inhibitrice réduite de noggin et sclérostine à cause de cette augmentation de la réponse humorale dirigée contre ces protéines.

Il a également été montré que la SpA est fortement associée à la présence d'autoanticorps dirigés contre le peptide CLIP, issu du clivage du CD74 (aussi appelée chaîne invariante Ii, qui se lie au CMH de classe II nouvellement synthétisé dans le RE) (Baraliakos et al., 2014). La SpA est également associée à la présence d'autoanticorps dirigés contre PPM1A

(*Protein Phosphatase Magnesium Dependent 1A*) à la fois chez les patients SpA et chez le rat B27 (Kim et al., 2014). Cette protéine PPM1A est directement impliquée dans le remodelage osseux puisqu'elle peut directement induire le développement des ostéoblastes (Kim et al., 2014) et influencer la voie des BMP en diminuant l'expression des protéines de signalisation Smad (Kokabu et al., 2010).

Enfin, une étude récente a démontré que la détection d'anticorps anti-nucléaires était plus fréquente parmi les patients atteints de RhumPso que parmi la population de volontaires sains (Silvy et al., 2015).

L'ensemble de ces données laisse penser que la réponse humorale pourrait également participer au développement de la SpA et les résultats de l'essai clinique de phase 2 du rituximab (traitement anti-CD20 qui réduit le nombre de LB) montrent que ce traitement peut être efficace chez les patients qui n'ont pas reçu d'anti-TNF (Song et al., 2010). Néanmoins, le nombre de patients étudiés était très faible (10 patients SpA sans anti-TNF et 10 patients SpA ayant préalablement reçu un anti-TNF) et une étude sur un échantillon plus important est indispensable pour conclure définitivement sur l'efficacité du rituximab dans la SpA. De plus, 2 patients n'ayant pas de lymphocytes B ont développé une SpA (Baeten et al., 2008), ce qui représente un fort argument contre l'hypothèse d'une implication de ces cellules dans cette pathologie.

Bien que ces résultats laissent supposer d'un rôle de la réponse B, potentiellement menée par les T_{fh} , dans la SpA, le caractère pathologique de cette voie reste à démontrer. Cela n'exclut toutefois pas une implication d'ICOS, suggérée par nos résultats, par d'autres mécanismes tels que l'induction de lymphocytes Th_{17} .

Influence des DC dans le déséquilibre IL-17/IL-10 chez les Treg

Comme nous l'avons précédemment vu, les DC de rats B27 ont de nombreux défauts fonctionnels et participent notamment à l'expansion des LT producteurs d'IL-17 (Glatigny et al., 2012). De façon intéressante, les expériences de co-cultures ont permis de montrer que les DC B27 sont aussi capable d'induire le déséquilibre IL-17/IL-10 observé chez les Treg de rats B27. Cependant, les DC B27 ne sont pas capables d'influencer la balance cytokinique des Treg des rats NTG. Ainsi, il est très probable que l'altération de la synthèse d'IL-17 et d'IL-10 soit également liée à des défauts intrinsèques aux LT, et dans ce cas aux Treg, issus du rat B27.

Ce résultat renforce donc l'idée d'un rôle important des DC dans l'induction de la SpA, tout du moins chez le rat B27, de par leur induction d'un caractère pro-inflammatoire chez les LT régulateurs qui vont ainsi participer au développement de l'inflammation par leur production d'IL-17. Il faut toutefois souligner que ce défaut n'est pas lié à une modification de

l'expression d'ICOS-ligand qui est similaire entre les DC de rats NTG et B27. Un candidat probable est le CD28 car il a précédemment été montré que l'hypostimulation des LT et l'induction des Th₁₇ par les DC B27 impliquait notamment l'axe CD86/CD28. L'étude de Paulos *et al* publiée en 2010 va également dans ce sens. En effet, elle révèle que la stimulation d'ICOS de LT CD4⁺ non polarisés en présence de cytokines pro-Th₁₇ booste la production d'IL-17. Cependant lorsque CD28 est stimulé en même temps qu'ICOS dans les mêmes conditions, la production d'IL-17 est réduite (Paulos et al., 2010). Les auteurs en déduisent donc que le CD28 exerce un « effet véto » sur ICOS. Cependant cette induction de Th₁₇ par ICOS passe par l'augmentation de l'expression de c-maf et IL-21, alors que nos résultats indiquent paradoxalement une baisse de l'expression de ces deux molécules chez le rat B27. Cette baisse peut cependant être reliée à la sous-expression de l'IL-27 par les DC B27 car elle est capable d'induire l'expression de c-maf et de l'IL-21 (Pot et al., 2009).

Il semble donc que l'induction de Th₁₇ par ICOS chez le rat B27 passe par d'autres mécanismes que l'induction de c-maf et l'IL-21 et qui restent à préciser. L'influence du CD28 sur la différenciation Th₁₇ a également été montré chez la souris, où une stimulation de LT CD4⁺ naïfs de la rate en présence de CD28 diminue le pourcentage de Th₁₇ générés (Bouguermouh et al., 2009). Cette balance CD28/ICOS sur l'induction des Th₁₇ semble jouer un rôle important chez le rat B27. Des résultats préliminaires obtenus au cours de ce travail de thèse ont par exemple montré une forte corrélation entre le ratio ICOS/CD28 et le pourcentage de cellules productrices d'IL-17 au cours de la polarisation de LT naïfs de rats B27 en Th₁₇.

Importance d'ICOS *in vivo*

L'ensemble des données obtenues *in vitro* nous a conduits à vouloir confirmer l'importance d'ICOS dans le développement du phénotype pro-Th₁₇ observé chez le rat B27. Afin d'étudier l'impact d'ICOS *in vivo*, nous nous sommes tournés vers la création de rats B27 n'exprimant pas ICOS (rats B27 ICOS KO). Les fondateurs de la lignée ICOS KO étant des rats avec un fond génétique Sprague-Dawley, nous avons tout d'abord effectué un backcross afin de transférer la mutation ICOS-KO sur le fond génétique Fisher (F344) que nous utilisons au laboratoire. La SpA du rat étant fonction du fond génétique (par exemple les rats B27 avec un fond génétique Dark Agouti ne développent aucun symptôme), il ne faut donc pas exclure l'hypothèse que la très faible proportion de fond génétique Sprague-Dawley restante chez le rat B27 ICOS-KO ait une influence sur le phénotype observé. Nous n'avons toutefois pas observé de différence significative sur l'apparition et la sévérité des symptômes cliniques entre les rats B27 Fisher et les rats B27 Fisher/Sprague-Dawley. Il est à noter que nous n'avons également pas observé de différence entre les rats B27 sauvages (rats B27-ICOS^{+/+}) et hétérozygotes (rats

B27-ICOS^{+/-}) pour la mutation ICOS. L'absence d'ICOS n'a par ailleurs pas d'impact majeur chez les rats non transgéniques.

Lors de notre suivi clinique des rats B27 ICOS KO, de 6 à 40 semaines de vie, nous avons observé une diminution significative de la sévérité des symptômes par rapport aux rats B27 exprimant ICOS. Cette diminution est très claire au niveau de la diarrhée, qui reste très faible jusqu'à l'âge de 6 mois. À partir 6 mois, nous observons une aggravation du phénotype chez les rats ICOS KO et leur score clinique rejoint celui des rats B27 exprimant ICOS. L'analyse histologique du système digestif de ces rats montre que les rats B27 ICOS KO ont une inflammation intestinale moins importante que les rats B27 ICOS WT, même après 6 mois de vie. De façon très intéressante cette protection partielle est associée à une réduction significative du pourcentage de cellules Th₁₇ et de celles produisant du TNF- α . De plus, nous avons observé une augmentation de la proportion de cellules produisant de l'IL-10.

ICOS et Th₁₇

Bien que la délétion d'ICOS soit associée à une baisse importante du pourcentage de Th₁₇ dans les ganglions mésentériques de rats B27 *in vivo*, il est important de noter que ce pourcentage reste plus élevé que celui retrouvé dans les ganglions de rats NTG, qu'ils expriment ou non ICOS. Ainsi, une autre hypothèse pour expliquer pourquoi les rats B27 ICOS KO ne sont que partiellement protégés est que les rats B27 ne développent les symptômes qu'à partir d'une certaine concentration d'IL-17 ou d'un certain pourcentage de Th₁₇. Comme ICOS est impliqué dans l'expansion des Th₁₇ et la synthèse d'IL-17 par les Treg de rats B27, son absence *in vivo* pourrait donc induire un retard dans l'augmentation graduelle de la production d'IL-17 par les LT CD4⁺. Une perspective de ce travail serait donc de mesurer à différents âges le pourcentage de Th₁₇ dans les ganglions de rats B27 n'exprimant pas ICOS et d'observer si ce pourcentage est corrélé à l'aggravation retardée des symptômes. Les difficultés rencontrées pour l'expansion de la lignée ICOS KO ne nous ont malheureusement pas permis d'effectuer cette expérience au cours de ce travail de thèse.

De façon très intéressante, nous avons également observé que lorsque nous cultivons des LT activés (CD4⁺ CD25⁺) de rats B27 pendant 3 jours avec une stimulation par anti-CD3, les LT issus de rats B27 ICOS KO produisent plus d'IL-17 que les LT activés issus de rats B27 qui expriment ICOS, alors même que le pourcentage de LT producteurs d'IL-17 est plus faible. Ce résultat laisse donc penser que les LT CD25⁺ de rats B27 ICOS KO ont un seuil d'activation plus faible que ceux de rats B27, conduisant à une production plus forte d'IL-17. Cela pourrait donc expliquer pourquoi les rats B27 ICOS KO, malgré leur pourcentage plus faible de Th₁₇, développent une SpA pouvant être très sévère à partir de 6-8 mois.

Ces résultats sont en accord avec nos observations *in vitro* et confirment l'hypothèse que la surexpression d'ICOS participe au développement de la SpA chez le rat B27. Néanmoins la protection conférée par la délétion d'ICOS n'est que partielle et ne concerne que les rats âgés de moins de 7 mois. D'autres mécanismes sont donc en jeu et restent encore à préciser.

STAT3 et SpA

Etant donné que la différenciation des Th₁₇ repose sur plusieurs facteurs de transcription et notamment STAT3 (Durant et al., 2010), qui est également important pour la synthèse d'IL-10, nous nous sommes intéressés à l'expression et à l'activation de ce facteur de transcription. Bien que nous n'ayons pas observé de différence de phosphorylation de STAT3 et réponse à l'IL-6 ou à l'IL-27, il existe une surexpression de STAT3, indépendamment de son statut de phosphorylation, dans les LT de rats B27. Aucune augmentation n'a été observée pour STAT1, qui oriente principalement vers la voie Th₁ (activé notamment par l'IFN- γ et l'IL-27). De façon intéressante, cette surexpression de STAT3 « total » a également été observée dans les PBMC de patients atteints de PR (Dong et al., 2014). Ce niveau anormalement élevé de STAT3 est couplé à une augmentation de la fréquence des Th₁₇ ainsi qu'à une baisse de la fréquence de Treg et de l'expression de Foxp3. Les auteurs proposent que cette augmentation de STAT3 participe au déséquilibre Th₁₇/Treg observé dans le sang de patients PR et pourrait donc avoir également lieu chez le rat B27. Un dernier élément en faveur d'un rôle délétère de STAT3 dans les rhumatismes est que l'expression de STAT3 est corrélée positivement à la sévérité de la synovite chez les patients atteints de PR. En accord avec ce résultat, l'utilisation d'un ARN interférant dirigé contre STAT3 sur les LT CD4⁺ de patients PR permet de diminuer le pourcentage de Th₁₇ et d'augmenter celui de Treg (Ju et al., 2012).

Inhibition des LT producteurs d'IL-17 par l'IL-27

Comme nous l'avons vu précédemment, les DC de rats B27 présentent plusieurs altérations fonctionnelles et favorisent notamment l'expansion des Th₁₇. Peu de temps avant mon arrivée au laboratoire, l'analyse transcriptomique de ces DC a révélé qu'elles sous-expriment deux cytokines antiinflammatoires l'IL-10 et l'IL-27. Etant donné que le traitement de rats B27 avec de l'IL-10 recombinante n'a pas permis de réduire la sévérité des symptômes (Bertrand et al., 1998), nous nous sommes focalisés sur l'IL-27 au cours de ce travail de thèse. Bien que la biologie de cette cytokine soit très complexe, il est clairement établi que cette cytokine inhibe le développement des Th₁₇ et favorise l'expression de l'IL-10. De plus, une association génétique entre *IL27A*, qui code pour la sous-unité p28 de l'IL-27, et la SpA a été démontrée (International Genetics of Ankylosing Spondylitis Consortium (IGAS) et al., 2013)

renforçant l'idée un rôle de cette cytokine dans la SpA. Nous avons émis l'hypothèse que la sous-expression d'IL-27 par les DC du rat B27 participe activement au développement du phénotype pro-inflammatoire des LT B27.

Du fait de l'absence d'IL-27 recombinante de rat disponible dans le commerce, nous avons effectué notre étude *in vitro* avec une IL-27 recombinante de souris, l'homologie entre rat et souris pour p28 et EB13 étant respectivement de 89 et 91%. Cette IL-27 recombinante est constituée des deux sous-unités liées de manière covalente (IL-27 « *single-chain* »), ce qui diffère de l'IL-27 « biologique » où les sous-unités ne sont pas liées de manière covalente et peuvent donc interagir avec d'autres partenaires. Cette IL-27 *single-chain* a été utilisée dans plusieurs études et notamment *in vivo*, que ce soit chez le rat ou chez la souris (Hanson et al., 2014; Rajaiah et al., 2011; Sasaoka et al., 2011). Il ne faut donc pas exclure l'hypothèse que l'utilisation d'une IL-27 où p28 et EB13 ne sont pas liées de manière covalente donne des résultats différents de ceux que nous avons obtenus. Il est important de souligner qu'au cours de cette étude nous avons testé l'effet de la p28 seule et nous n'avons pas observé de phosphorylation de STAT1 et 3 ou de diminution du pourcentage de cellules productrices d'IL-17 en réponse à l'addition de p28. Cela suggère donc fortement que les effets que nous observons sont spécifiques de l'IL-27.

Etant donné que le développement de la SpA chez le rat B27 repose à la fois sur la présence de cellules dérivées de la moelle osseuse B27⁺ et des LT CD4⁺, nous avons dans un premier temps effectué des co-cultures de LT CD4⁺ isolés à partir des ganglions mésentériques avec des DC isolées à partir de la rate de rats B27. Que les LT CD4⁺ aient un phénotype effecteur ou régulateur, l'ajout d'IL-27 exogène réduit significativement la production d'IL-17 tout en augmentant celle d'IL-10, confirmant l'effet anti-IL-17 bien établi de l'IL-27 sur les LT CD4⁺ (Iwasaki et al., 2015). Avant d'envisager un traitement de rats B27 avec de l'IL-27, nous avons d'abord voulu déterminer si l'IL-27 pouvait également inhiber le développement de cellules productrices d'IL-17 à partir de LT naïfs. De manière similaire aux résultats obtenus à partir de LT déjà différenciés, l'IL-27 inhibe la génération de LT IL-17⁺ dans des conditions de polarisation vers le phénotype Treg (présence de TGF- β) ou vers le phénotype Th₁₇ (présence de TGF- β , d'IL-6, d'IL-1 β et d'IL-23). L'IL-27 augmente là-encore la production d'IL-10 par les LT.

L'ensemble de ces résultats est en accord avec les données de la littérature qui montrent clairement que l'IL-27 inhibe le développement des Th₁₇. Cependant son effet inhibiteur sur les LT producteurs d'IL-17 déjà différenciés contredit les résultats d'El-behi et al. qui n'ont pas observé d'effet inhibiteur de l'IL-27 sur les Th₁₇ déjà différenciés (El-behi et al., 2009). Une première différence entre cette étude et la nôtre est que nous travaillons chez le rat alors que l'équipe d'El-Behi a étudié l'effet de l'IL-27 sur les LT de souris. De plus, les Th₁₇

ont été générés *in vitro* en présence de TGF- β et d'IL-6 puis mis au repos 2 jours en présence d'IL-2 alors que nous avons étudié l'effet de l'IL-27 sur des populations isolées *ex vivo*.

La sous-expression d'IL-27 par les DC de rats B27 participe donc à l'établissement du phénotype pro-inflammatoire observé dans les LT CD4⁺ de rats B27 (expansion de Th₁₇ et déséquilibre cytokinique dans les Treg). Afin de renforcer l'idée de l'IL-27 comme nouvelle cible thérapeutique dans la SpA, nous avons cultivé des LT CD4⁺ isolés à partir du sang de patients SpA, tous porteurs du HLA-B27, avec de l'IL-27 recombinante humaine. Nous avons pu ainsi confirmer l'effet inhibiteur de l'IL-27 sur la production d'IL-17 mais n'avons pas observé d'augmentation de la synthèse d'IL-10. Ces LT CD4⁺ ne sont cependant pas isolés depuis un site inflammatoire, à la différence des LT CD4⁺ du rat B27 que nous avons isolé à partir des ganglions mésentériques. Il serait par exemple intéressant d'étudier la réponse à l'IL-27 des LT CD4⁺ obtenus à partir du tissu synovial de patients SpA.

Perspective de l'essai préclinique avec l'IL-27

Ces données très prometteuses nous ont donc amenés à vouloir traiter *in vivo* des rats B27 avec de l'IL-27 recombinante car nous pensons que l'IL-27 est capable de diminuer la sévérité des symptômes observés chez le rat B27 en modulant la balance IL-17/IL-10 dans les LT. L'IL-27 recombinante de souris que nous avons utilisée pour nos expériences *in vitro* est cependant inutilisable *in vivo* chez le rat car elle risque d'induire une immunogénicité lors de son administration prolongée. Nous nous sommes donc tournés vers la production d'une IL-27 recombinante de rat à l'aide du système baculovirus/cellule d'insecte Sf9 en collaboration avec l'unité INSERM U1179. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à obtenir une IL-27 suffisamment pure pour envisager l'essai préclinique et les quantités d'IL-27 obtenues après production étaient trop faibles. Malgré la présence de deux protéines contaminantes de nature inconnue, les premiers tests fonctionnels montrent que l'IL-27 recombinante de rat diminue la synthèse d'IL-17 par les LT CD4⁺ *in vitro* et induit la phosphorylation de STAT1 et de STAT3 de façon similaire à l'IL-27 de souris. Il est important de souligner que la solution ne contenant que les protéines contaminantes et pas d'IL-27 n'a eu aucun effet sur la production d'IL-17. Ce résultat est donc encourageant et nous espérons débiter l'essai préclinique dans les prochaines semaines.

Effet de l'IL-27 chez le rat B27 *in vivo* ?

Bien que les Th₁₇ soient de très bonnes productrices d'IL-17, la synthèse de cette cytokine n'est pas seulement due cette seule population cellulaire. Il a été rapporté une augmentation de la proportion de LT CD4⁺ γ/δ producteurs d'IL-17 dans le sang de patients

atteints de SpA (Kenna et al., 2012), ainsi qu'une augmentation de la fréquence d'ILC3 dans l'intestin (Ciccia et al., 2015). Ces ILC3 sont cependant particuliers car ils sont caractérisés par l'expression de T-bet, sans expression de RORc. L'IL-27 est capable de moduler l'activité des LT CD4⁺ γ/δ (Morandi et al., 2012) et il a été rapporté que l'IL-27 peut inhiber les ILC2 (Moro et al., 2016), mais aucune donnée n'est pour l'instant publiée sur son effet sur les ILC3. L'IL-27 peut également réguler le recrutement des neutrophiles (Watzlawick et al., 2015), qui constituent une population importante de l'infiltrat inflammatoire observé chez le rat B27 (van Duivenvoorde et al., 2012). Enfin, les mastocytes représentent une population cellulaire d'intérêt dans la SpA et surtout dans la SpA périphérique où ces cellules sont d'importantes productrices d'IL-17 (Noordenbos et al., 2012). Le ciblage de cette population par le nilotinib a récemment démontré une efficacité chez les patients atteints de SpA périphérique (Paramarta et al., 2016). Les effets de l'IL-27 sur cette population sont cependant mal définis car elle peut favoriser la production de cytokines pro-inflammatoires par les mastocytes (Pflanz et al., 2004), mais les souris IL-27R α KO développent une mastocytose, suggérant un rôle inhibiteur de l'IL-27 sur les mastocytes (Artis et al., 2004). Il est donc fortement probable que l'IL-27 influencera de nombreuses populations cellulaires autres que les Th₁₇ chez le rat B27 et l'étude la réponse immune chez ces rats traités par l'IL-27 nous permettra de mieux comprendre les effets biologiques de cette cytokine *in vivo*.

Mécanisme d'action de l'IL-27

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'IL-27 possède un effet ambigu sur la production d'IFN- γ . Elle peut favoriser le développement des Th₁ (Pflanz et al., 2002) mais son absence peut induire une production d'IFN- γ non contrôlée lors d'une infection (Hamano et al., 2003). Nous avons pu observer cet effet ambivalent de l'IL-27 sur la production d'IFN- γ au cours de ce travail car l'IL-27 réduit la production d'IFN- γ par les LT CD25⁺ alors qu'elle induit une production d'IFN- γ par les LT naïfs polarisés *in vitro*. Ces données sont en accord avec l'idée que l'IL-27 possède une « fenêtre d'action » pour la régulation de la réponse immune. Elle fut par exemple décrite dans le cas d'une infection par le virus de la grippe chez des souris (Liu et al., 2014). Le traitement tardif par l'IL-27 permet de réduire l'atteinte pulmonaire induite par le virus alors qu'un traitement précoce aggrave la pathologie.

Après avoir démontré l'effet anti-Th₁₇ de l'IL-27 sur les différentes sous-populations de LT CD4⁺ du rat B27, nous nous sommes attelés à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans cette inhibition de la production d'IL-17. Sachant que les DC et les LT expriment un récepteur à l'IL-27 fonctionnel, nous nous sommes concentrés sur l'effet de l'IL-27 sur les LT CD4⁺ seuls car nous avons observé que la culture de DC pendant une nuit en présence d'IL-27,

avant leur mise en culture avec des LT CD4⁺, n'a presque aucun effet. Le pourcentage de LT producteurs d'IL-17 induit par les DC pré-incubées avec de l'IL-27 est en effet similaire à celui induit par les DC non traitées. De plus, l'IL-27 n'influence pas l'expression des molécules de costimulation (CD40, CD86) ou du CMH à la surface des DCs. À l'inverse, la culture de LT CD4⁺, sans DC, en présence d'IL-27 permet de réduire la production d'IL-17 et d'augmenter celle d'IL-10 de façon significative. Ces résultats suggèrent que l'IL-27 influence peu la fonction des DC mais modifie profondément le phénotype des LT du rat B27 *in vitro*.

Nous avons montré que l'effet inhibiteur de l'IL-27 sur la production d'IL-17 est indépendant de l'IL-10, bien qu'elle soit capable d'inhiber la production d'IL-17 par les LT CD4⁺ (Slight et al., 2013). Il avait précédemment été démontré que l'effet anti-inflammatoire de l'IL-27 sur la colite *in vivo* est dépendant de l'IL-10 (Hanson et al., 2014) mais une autre étude a montré que l'IL-27 peut inhiber les Th₁₇ indépendamment de cette cytokine dans le contexte de l'EAE (Fitzgerald et al., 2013). Ces données suggèrent que l'IL-27 possède plusieurs mécanismes d'action pour inhiber l'inflammation et dans le cas du rat B27, l'inhibition de la production d'IL-17 est indépendante de l'IL-10. Une comparaison du transcriptome de LT cultivés en présence ou non d'IL-27 permettra de mieux définir les voies impliquées dans l'effet anti-inflammatoire de l'IL-27.

IL-27 et ICOS

Etant donné que l'addition d'IL-27 et le blocage de la voie ICOSL/ICOS influencent de façon similaire la balance IL-17/IL-10 et qu'il a été démontré que l'IL-27 pouvait influencer l'expression d'ICOS (Batten et al., 2010; Pot et al., 2009), nous nous sommes demandés si l'action de l'IL-27 passait par la modulation d'ICOS dans notre système. Bien que l'IL-27 réduise significativement l'expression d'ICOS à la surface des LT, nous avons observé que la réduction de la synthèse d'IL-17 par l'IL-27 ne nécessite pas la présence d'ICOS. Cette baisse d'expression d'ICOS par l'IL-27 semble étonnante car les données de la littérature indiquent une augmentation de l'expression d'ICOS par l'IL-27. Néanmoins, dans notre étude les LT de rats B27 expriment de façon anormalement élevée la molécule ICOS mais il semble que l'IL-27 affecte différemment l'expression d'ICOS chez le rat et chez la souris. Il faut cependant signaler que nos résultats obtenus par cytométrie tendent à montrer que le pouvoir inhibiteur de l'IL-27 semble plus faible sur les LT de rats B27 ICOS KO que sur ceux de rats B27 ICOS WT. Cela suggère que la diminution de la production d'IL-17 par l'IL-27 est partiellement dépendante d'ICOS. Ce résultat n'est malheureusement pas confirmé par le dosage de l'IL-17 dans le surnageant des cultures mais il n'est pas à exclure que ICOS et l'IL-27 agissent, au moins en partie, de manière concertée sur la production d'IL-17 par les LT CD4⁺.

CONCLUSION

Bien que la prise en charge de la SpA se soit fortement améliorée ces dernières années, les traitements anti-TNF α et anti-IL-17 n'ont pas d'effet sur une proportion non négligeable de patients et représentent un coût important. Malgré la connaissance depuis 40 ans de l'association entre SpA et HLA-B27, les mécanismes impliqués dans le développement de cette pathologie restent non élucidés mais la pathogénicité de la voie Th₁₇ est bien établie. Au cours de ce travail de thèse, nous avons cherché à comprendre les causes de l'expansion des LT CD4⁺ producteurs d'IL-17 chez le rat B27, excellent modèle animal de SpA, avec pour objectif secondaire la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Ce travail a participé à la découverte du rôle d'ICOS et de l'IL-27 dans cette pathologie. Bien que l'effet de l'IL-27 soit à confirmer *in vivo*, son activité anti-inflammatoire a déjà été démontrée dans d'autres modèles animaux de colite et d'arthrite, deux symptômes associés à la SpA. Nous pensons qu'elle sera capable, comme la délétion d'ICOS, de réduire la sévérité des symptômes chez le rat B27. Par leur capacité à réduire la synthèse d'IL-17 pro-inflammatoire et à induire la production d'IL-10, nous pensons que l'IL-27 et ICOS représentent deux nouvelles perspectives thérapeutiques prometteuses dans le traitement de la SpA.

BIBLIOGRAPHIE

Adamopoulos, I.E., Chao, C.-C., Geissler, R., Laface, D., Blumenschein, W., Iwakura, Y., McClanahan, T., and Bowman, E.P. (2010). Interleukin-17A upregulates receptor activator of NF-kappaB on osteoclast precursors. *Arthritis Res. Ther.* *12*, R29.

Adamopoulos, I.E., Tessmer, M., Chao, C.-C., Adda, S., Gorman, D., Petro, M., Chou, C.-C., Pierce, R.H., Yao, W., Lane, N.E., et al. (2011). IL-23 is critical for induction of arthritis, osteoclast formation, and maintenance of bone mass. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *187*, 951–959.

Al-Mossawi, M.H., Ridley, A., Kiedel, S., and Bowness, P. (2013). The role of natural killer cells, gamma delta T-cells and other innate immune cells in spondyloarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* *25*, 434–439.

Amadi-Obi, A., Yu, C.-R., Liu, X., Mahdi, R.M., Clarke, G.L., Nussenblatt, R.B., Gery, I., Lee, Y.S., and Egwuagu, C.E. (2007). TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nat. Med.* *13*, 711–718.

Amor, B., Dougados, M., and Mijiyawa, M. (1990). [Criteria of the classification of spondylarthropathies]. *Rev. Rhum. Mal. Ostéo-Articul.* *57*, 85–89.

Andrews, C., McLean, M.H., and Durum, S.K. (2016). Interleukin-27 as a Novel Therapy for Inflammatory Bowel Disease: A Critical Review of the Literature. *Inflamm. Bowel Dis.* *22*, 2255–2264.

Annunziato, F., Cosmi, L., Santarlasci, V., Maggi, L., Liotta, F., Mazzinghi, B., Parente, E., Fili, L., Ferri, S., Frosali, F., et al. (2007). Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J. Exp. Med.* *204*, 1849–1861.

Apetoh, L., Quintana, F.J., Pot, C., Joller, N., Xiao, S., Kumar, D., Burns, E.J., Sherr, D.H., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2010). The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat. Immunol.* *11*, 854–861.

Appel, H., Ruiz-Heiland, G., Listing, J., Zwerina, J., Herrmann, M., Mueller, R., Haibel, H., Baraliakos, X., Hempfing, A., Rudwaleit, M., et al. (2009). Altered skeletal expression of sclerostin and its link to radiographic progression in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* *60*, 3257–3262.

Appel, H., Maier, R., Bleil, J., Hempfing, A., Loddenkemper, C., Schlichting, U., Syrbe, U., and Sieper, J. (2013). In Situ Analysis of Interleukin-23- and Interleukin-12-Positive Cells in the Spine of Patients With Ankylosing Spondylitis. *Arthritis Rheum.* *65*, 1522–1529.

Artis, D., Villarino, A., Silverman, M., He, W., Thornton, E.M., Mu, S., Summer, S., Covey, T.M., Huang, E., Yoshida, H., et al. (2004). The IL-27 receptor (WSX-1) is an inhibitor of innate and adaptive elements of type 2 immunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *173*, 5626–5634.

Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC), Reveille, J.D., Sims, A.-M., Danoy, P., Evans, D.M., Leo, P., Pointon, J.J., Jin, R., Zhou, X., Bradbury, L.A., et al. (2010). Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci. *Nat. Genet.* *42*, 123–127.

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.

Bacchetta, R., Sartirana, C., Levings, M.K., Bordignon, C., Narula, S., and Roncarolo, M.-G. (2002). Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines. *Eur. J. Immunol.* *32*, 2237–2245.

Bachem, A., Güttler, S., Hartung, E., Ebstein, F., Schaefer, M., Tannert, A., Salama, A., Movassaghi, K., Opitz, C., Mages, H.W., et al. (2010). Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* *207*, 1273–1281.

Baeten, D., Demetter, P., Cuvelier, C., Van Den Bosch, F., Kruithof, E., Van Damme, N., Verbruggen, G., Mielants, H., Veys, E.M., and De Keyser, F. (2000). Comparative study of the synovial histology in rheumatoid arthritis, spondyloarthropathy, and osteoarthritis: influence of disease duration and activity. *Ann. Rheum. Dis.* *59*, 945–953.

Baeten, D., Demetter, P., Cuvelier, C.A., Kruithof, E., Van Damme, N., De Vos, M., Veys, E.M., and De Keyser, F. (2002). Macrophages expressing the scavenger receptor CD163: a link between immune alterations of the gut and synovial inflammation in spondyloarthropathy. *J. Pathol.* *196*, 343–350.

Baeten, D., Kruithof, E., Breban, M., and Tak, P.P. (2008). Spondylarthritis in the absence of B lymphocytes. *Arthritis Rheum.* *58*, 730–733.

Baeten, D., Breban, M., Lories, R., Schett, G., and Sieper, J. (2013a). Are spondylarthritis related but distinct conditions or a single disease with a heterogeneous phenotype? *Arthritis Rheum.* *65*, 12–20.

Baeten, D., Baraliakos, X., Braun, J., Sieper, J., Emery, P., van der Heijde, D., McInnes, I., van Laar, J.M., Landewé, R., Wordsworth, P., et al. (2013b). Anti-interleukin-17A monoclonal antibody secukinumab in treatment of ankylosing spondylitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet* *382*, 1705–1713.

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.

Baraliakos, X., Baerlecken, N., Witte, T., Heldmann, F., and Braun, J. (2014). High prevalence of anti-CD74 antibodies specific for the HLA class II-associated invariant chain peptide (CLIP) in patients with axial spondyloarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *73*, 1079–1082.

Batten, M., Li, J., Yi, S., Kljavin, N.M., Danilenko, D.M., Lucas, S., Lee, J., de Sauvage, F.J., and Ghilardi, N. (2006). Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat. Immunol.* *7*, 929–936.

Batten, M., Kljavin, N.M., Li, J., Walter, M.J., Sauvage, F.J. de, and Ghilardi, N. (2008). Cutting Edge: IL-27 Is a Potent Inducer of IL-10 but Not FoxP3 in Murine T Cells. *J. Immunol.* *180*, 2752–2756.

Batten, M., Ramamoorthi, N., Kljavin, N.M., Ma, C.S., Cox, J.H., Dengler, H.S., Danilenko, D.M., Caplazi, P., Wong, M., Fulcher, D.A., et al. (2010). IL-27 supports germinal center function by enhancing IL-21 production and the function of T follicular helper cells. *J. Exp. Med.* *207*, 2895–2906.

Bauquet, A.T., Jin, H., Paterson, A.M., Mitsdoerffer, M., Ho, I.-C., Sharpe, A.H., and Kuchroo, V.K. (2009). The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nat. Immunol.* *10*, 167–175.

Bautista-Caro, M.-B., Arroyo-Villa, I., Castillo-Gallego, C., Miguel, E. de, Peiteado, D., Plasencia-Rodríguez, C., Villalba, A., Sánchez-Mateos, P., Puig-Kröger, A., Martín-Mola, E., et al. (2014). Decreased Frequencies of Circulating Follicular Helper T Cell Counterparts and Plasmablasts in Ankylosing Spondylitis Patients Naïve for TNF Blockers. *PLOS ONE* *9*, e107086.

- Benjamin, R., and Parham, P. (1990). Guilt by association: HLA-B27 and ankylosing spondylitis. *Immunol. Today* *11*, 137–142.
- Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., Whitesell, L., Kelly, T.E., Saulsbury, F.T., Chance, P.F., and Ochs, H.D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* *27*, 20–21.
- Bertrand, V., Quéré, S., Guimbaud, R., Sogni, P., Chauvelot-Moachon, L., Tulliez, M., Lamarque, D., Charreire, J., Giroud, J.P., Couturier, D., et al. (1998). Effects of murine recombinant interleukin-10 on the inflammatory disease of rats transgenic for HLA-B27 and human 2-microglobulin. *Eur. Cytokine Netw.* *9*, 161–170.
- Birkholz, J., Doganci, A., Darstein, C., Gehring, S., Zepp, F., and Meyer, C.U. (2014). IL-27 improves migrational and antiviral potential of CB dendritic cells. *Hum. Immunol.* *75*, 584–591.
- Bollow, M., Fischer, T., Reissshauer, H., Backhaus, M., Sieper, J., Hamm, B., and Braun, J. (2000). Quantitative analyses of sacroiliac biopsies in spondyloarthropathies: T cells and macrophages predominate in early and active sacroiliitis- cellularity correlates with the degree of enhancement detected by magnetic resonance imaging. *Ann. Rheum. Dis.* *59*, 135–140.
- Bosmann, M., and Ward, P.A. (2013). Modulation of inflammation by interleukin-27. *J. Leukoc. Biol.* *94*, 1159–1165.
- Bouguermouh, S., Fortin, G., Baba, N., Rubio, M., and Sarfati, M. (2009). CD28 co-stimulation down regulates Th17 development. *PLoS One* *4*, e5087.
- Bowness, P. (2015). Hla-B27. *Annu. Rev. Immunol.* *33*, 29–48.
- Bowness, P., Ridley, A., Shaw, J., Chan, A.T., Wong-Baeza, I., Fleming, M., Cummings, F., McMichael, A., and Kollnberger, S. (2011). Th17 Cells Expressing KIR3DL2+ and Responsive to HLA-B27 Homodimers Are Increased in Ankylosing Spondylitis. *J. Immunol.* *186*, 2672–2680.
- Breban, M., Hammer, R.E., Richardson, J.A., and Taurog, J.D. (1993). Transfer of the inflammatory disease of HLA-B27 transgenic rats by bone marrow engraftment. *J. Exp. Med.* *178*, 1607–1616.
- Breban, M., Fernández-Sueiro, J.L., Richardson, J.A., Hadavand, R.R., Maika, S.D., Hammer, R.E., and Taurog, J.D. (1996). T cells, but not thymic exposure to HLA-B27, are required for the inflammatory disease of HLA-B27 transgenic rats. *J. Immunol.* *156*, 794–803.
- Breban, M., Hacquard-Bouder, C., and Falgarone, G. (2004). Animal Models of HLA-B27-Associated Diseases. *Curr. Mol. Med.* *4*, 31–40.
- Brender, C., Tannahill, G.M., Jenkins, B.J., Fletcher, J., Columbus, R., Saris, C.J.M., Ernst, M., Nicola, N.A., Hilton, D.J., Alexander, W.S., et al. (2007). Suppressor of cytokine signaling 3 regulates CD8 T-cell proliferation by inhibition of interleukins 6 and 27. *Blood* *110*, 2528–2536.
- Brown, M.A., Kennedy, L.G., MacGregor, A.J., Darke, C., Duncan, E., Shatford, J.L., Taylor, A., Calin, A., and Wordsworth, P. (1997). Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins: the role of genes, HLA, and the environment. *Arthritis Rheum.* *40*, 1823–1828.
- Brown, M.A., Kenna, T., and Wordsworth, B.P. (2016). Genetics of ankylosing spondylitis--insights into pathogenesis. *Nat. Rev. Rheumatol.* *12*, 81–91.

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

Busse, M., Krech, M., Meyer-Bahlburg, A., Hennig, C., and Hansen, G. (2012). ICOS mediates the generation and function of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells conveying respiratory tolerance. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *189*, 1975–1982.

Canavan, T.N., Elmets, C.A., Cantrell, W.L., Evans, J.M., and Elewski, B.E. (2016). Anti-IL-17 Medications Used in the Treatment of Plaque Psoriasis and Psoriatic Arthritis: A Comprehensive Review. *Am. J. Clin. Dermatol.* *17*, 33–47.

Cao, Y., Doodles, P.D., Glant, T.T., and Finnegan, A. (2008). IL-27 induces a Th1 immune response and susceptibility to experimental arthritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 922–930.

Cargill, M., Schrodi, S.J., Chang, M., Garcia, V.E., Brandon, R., Callis, K.P., Matsunami, N., Ardlie, K.G., Civeello, D., Catanese, J.J., et al. (2007). A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am. J. Hum. Genet.* *80*, 273–290.

Cauli, A., Dessole, G., Fiorillo, M.T., Vacca, A., Mameli, A., Bitti, P., Passiu, G., Sorrentino, R., and Mathieu, A. (2002). Increased level of HLA-B27 expression in ankylosing spondylitis patients compared with healthy HLA-B27-positive subjects: a possible further susceptibility factor for the development of disease. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *41*, 1375–1379.

Chen, Q., Swaminathan, S., Yang, D., Dai, L., Sui, H., Yang, J., Hornung, R.L., Wang, Y., Huang, D.W., Hu, X., et al. (2013a). Interleukin-27 Is a Potent Inhibitor of cis HIV-1 Replication in Monocyte-Derived Dendritic Cells via a Type I Interferon-Independent Pathway. *PLOS ONE* *8*, e59194.

Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of Peripheral CD4+CD25– Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. *J. Exp. Med.* *198*, 1875–1886.

Chen, Z., Wang, S., Erekosima, N., Li, Y., Hong, J., Qi, X., Merkel, P., Nagabhushanam, V., Choo, E., Katial, R., et al. (2013b). IL-4 confers resistance to IL-27-mediated suppression on CD4+ T cells by impairing signal transducer and activator of transcription 1 signaling. *J. Allergy Clin. Immunol.* *132*, 912-921-5.

Chong, W.P., Horai, R., Mattapallil, M.J., Silver, P.B., Chen, J., Zhou, R., Sergeev, Y., Villasmil, R., Chan, C.-C., and Caspi, R.R. (2014). IL-27p28 inhibits central nervous system autoimmunity by concurrently antagonizing Th1 and Th17 responses. *J. Autoimmun.* *50*, 12–22.

Chung, H.Y., Machado, P., van der Heijde, D., D’Agostino, M.-A., and Dougados, M. (2012). Smokers in early axial spondyloarthritis have earlier disease onset, more disease activity, inflammation and damage, and poorer function and health-related quality of life: results from the DESIR cohort. *Ann. Rheum. Dis.* *71*, 809–816.

Ciccìa, F., Bombardieri, M., Principato, A., Giardina, A., Tripodo, C., Porcasi, R., Peralta, S., Franco, V., Giardina, E., Craxi, A., et al. (2009). Overexpression of interleukin-23, but not interleukin-17, as an immunologic signature of subclinical intestinal inflammation in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* *60*, 955–965.

Ciccìa, F., Accardo-Palumbo, A., Giardina, A., Di Maggio, P., Principato, A., Bombardieri, M., Rizzo, A., Alessandro, R., Ferrante, A., Principe, S., et al. (2010). Expansion of intestinal CD4+CD25^{high} Treg cells in patients with ankylosing spondylitis: A putative role for interleukin-10 in preventing intestinal Th17 response. *Arthritis Rheum.* *62*, 3625–3634.

Ciccìa, F., Accardo-Palumbo, A., Rizzo, A., Guggino, G., Raimondo, S., Giardina, A., Cannizzaro, A., Colbert, R.A., Alessandro, R., and Triolo, G. (2014). Evidence that autophagy, but not the unfolded protein response, regulates the expression of IL-23 in the gut of patients with ankylosing spondylitis and subclinical gut inflammation. *Ann. Rheum. Dis.* *73*, 1566–1574.

Ciccìa, F., Guggino, G., Rizzo, A., Saieva, L., Peralta, S., Giardina, A., Cannizzaro, A., Sireci, G., Leo, G.D., Alessandro, R., et al. (2015). Type 3 innate lymphoid cells producing IL-17 and IL-22 are expanded in the gut, in the peripheral blood, synovial fluid and bone marrow of patients with ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* *74*, 1739–1747.

Ciccìa, F., Ferrante, A., and Triolo, G. (2016). Intestinal dysbiosis and innate immune responses in axial spondyloarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.*

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

Cortes, A., Pulit, S.L., Leo, P.J., Pointon, J.J., Robinson, P.C., Weisman, M.H., Ward, M., Gensler, L.S., Zhou, X., Garchon, H.-J., et al. (2015). Major histocompatibility complex associations of ankylosing spondylitis are complex and involve further epistasis with ERAP1. *Nat. Commun.* *6*, 7146.

Cosmi, L., Maggi, L., Santarlasci, V., Capone, M., Cardilicchia, E., Frosali, F., Querci, V., Angeli, R., Matucci, A., Fambrini, M., et al. (2010). Identification of a novel subset of human circulating memory CD4(+) T cells that produce both IL-17A and IL-4. *J. Allergy Clin. Immunol.* *125*, 222-230-4.

Costantino, F., Talpin, A., Said-Nahal, R., Goldberg, M., Henny, J., Chiocchia, 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. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* *67*, 1525–1534.

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

Costello, M.-E., Ciccìa, F., Willner, D., Warrington, N., Robinson, P.C., Gardiner, B., Marshall, M., Kenna, T.J., Triolo, G., and Brown, M.A. (2014). Intestinal dysbiosis in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ*.

Cox, J.H., Kljavin, N.M., Ramamoorthi, N., Diehl, L., Batten, M., and Ghilardi, N. (2011). IL-27 promotes T cell-dependent colitis through multiple mechanisms. *J. Exp. Med.* *208*, 115–123.

Crabé, S., Guay-Giroux, A., Tormo, A.J., Duluc, D., Lissilaa, R., Guilhot, F., Mavoungou-Bigouagou, U., Lefouili, F., Cagnet, I., Ferlin, W., et al. (2009). The IL-27 p28 subunit binds cytokine-like factor 1 to form a cytokine regulating NK and T cell activities requiring IL-6R for signaling. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *183*, 7692–7702.

Cretney, E., Kallies, A., and Nutt, S.L. (2013). Differentiation and function of Foxp3(+) effector regulatory T cells. *Trends Immunol.* *34*, 74–80.

Cua, D.J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C.A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., et al. (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* *421*, 744–748.

- De Vos, M., Mielants, H., Cuvelier, C., Elewaut, A., and Veys, E. (1996). Long-term evolution of gut inflammation in patients with spondyloarthritis. *Gastroenterology* *110*, 1696–1703.
- 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.
- Dernis, E., Said-Nahal, R., D’Agostino, M.-A., Aegerter, P., Dougados, M., and Breban, M. (2009). Recurrence of spondylarthritis among first-degree relatives of patients: a systematic cross-sectional study. *Ann. Rheum. Dis.* *68*, 502–507.
- Dhaenens, M., Fert, I., Glatigny, S., Haerinck, S., Poulain, C., Donnadieu, E., Hacquard-Bouder, C., André, C., Elewaut, D., Deforce, D., et al. (2009). Dendritic cells from spondylarthritis-prone HLA-B27-transgenic rats display altered cytoskeletal dynamics, class II major histocompatibility complex expression, and viability. *Arthritis Rheum.* *60*, 2622–2632.
- Di Meglio, P., Di Cesare, A., Laggner, U., Chu, C.-C., Napolitano, L., Villanova, F., Tosi, I., Capon, F., Trembath, R.C., Peris, K., et al. (2011). The IL23R R381Q gene variant protects against immune-mediated diseases by impairing IL-23-induced Th17 effector response in humans. *PLoS One* *6*, e17160.
- Dibra, D., Cutrera, J., Xia, X., Kallakury, B., Mishra, L., and Li, S. (2012). Interleukin-30: a novel anti-inflammatory cytokine candidate for prevention and treatment of inflammatory cytokine-induced liver injury. *Hepatology*. Baltimore, Md *55*, 1204–1214.
- Diegelmann, J., Olszak, T., Göke, B., Blumberg, R.S., and Brand, S. (2012). A Novel Role for Interleukin-27 (IL-27) as Mediator of Intestinal Epithelial Barrier Protection Mediated via Differential Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) Protein Signaling and Induction of Antibacterial and Anti-inflammatory Proteins. *J. Biol. Chem.* *287*, 286–298.
- Dietrich, C., Candon, S., Ruemmele, F.M., and Devergne, O. (2014). A soluble form of IL-27R α is a natural IL-27 antagonist. *J. Immunol.* Baltimore, Md *192*, 5382–5389.
- Diveu, C., McGeachy, M.J., Boniface, K., Stumhofer, J.S., Sathe, M., Joyce-Shaikh, B., Chen, Y., Tato, C.M., McClanahan, T.K., de Waal Malefyt, R., et al. (2009). IL-27 blocks ROR γ c expression to inhibit lineage commitment of Th17 cells. *J. Immunol.* Baltimore, Md *182*, 5748–5756.
- Dong, L., Wang, X., Tan, J., Li, H., Qian, W., Chen, J., Chen, Q., Wang, J., Xu, W., Tao, C., et al. (2014). Decreased expression of microRNA-21 correlates with the imbalance of Th17 and Treg cells in patients with rheumatoid arthritis. *J. Cell. Mol. Med.* *18*, 2213–2224.
- Dougados, M., van der Linden, S., Juhlin, R., Huitfeldt, B., Amor, B., Calin, A., Cats, A., Dijkmans, B., Olivieri, I., and Pasero, G. (1991). The European Spondylarthritis Study Group preliminary criteria for the classification of spondylarthritis. *Arthritis Rheum.* *34*, 1218–1227.
- Duerr, R.H., Taylor, K.D., Brant, S.R., Rioux, J.D., Silverberg, M.S., Daly, M.J., Steinhart, A.H., Abraham, C., Regueiro, M., Griffiths, A., et al. (2006). A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* *314*, 1461–1463.
- van Duivenvoorde, L.M., Dorris, M.L., Satumtira, N., van Tok, M.N., Redlich, K., Tak, P.P., Taurog, J.D., and Baeten, D.L. (2012). Relationship between inflammation, bone destruction, and osteoproliferation in the HLA-B27/human β 2-microglobulin-transgenic rat model of spondylarthritis. *Arthritis Rheum.* *64*, 3210–3219.

Durant, L., Watford, W.T., Ramos, H.L., Laurence, A., Vahedi, G., Wei, L., Takahashi, H., Sun, H.-W., Kanno, Y., Powrie, F., et al. (2010). Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. *Immunity* 32, 605–615.

Dutertre, C.-A., Wang, L.-F., and Ginhoux, F. (2014). Aligning bona fide dendritic cell populations across species. *Cell. Immunol.* 291, 3–10.

El-behi, M., Ciric, B., Yu, S., Zhang, G.-X., Fitzgerald, D.C., and Rostami, A. (2009). Differential effect of IL-27 on developing versus committed Th17 cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 4957–4967.

Evans, D.M., Spencer, C.C.A., Pointon, J.J., Su, Z., Harvey, D., Kochan, G., Oppermann, U., Opperman, U., Dilthey, A., Pirinen, M., et al. (2011). Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. *Nat. Genet.* 43, 761–767.

Feldtkeller, E., Khan, M.A., van der Heijde, D., van der Linden, S., and Braun, J. (2003). Age at disease onset and diagnosis delay in HLA-B27 negative vs. positive patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol. Int.* 23, 61–66.

Fert, I., Glatigny, S., Poulain, C., Satumtira, N., Dorris, M.L., Taurog, J.D., and Breban, M. (2008). Correlation between dendritic cell functional defect and spondylarthritis phenotypes in HLA-B27/HUMAN β 2-microglobulin–transgenic rat lines. *Arthritis Rheum.* 58, 3425–3429.

Fert, I., Cagnard, N., Glatigny, S., Letourneur, F., Jacques, S., Smith, J.A., Colbert, R.A., Taurog, J.D., Chiochia, G., Araujo, L.M., et al. (2014). Reverse Interferon Signature Is Characteristic of Antigen-Presenting Cells in Human and Rat Spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol.* 66, 841–851.

Fitzgerald, D.C., Fonseca-Kelly, Z., Cullimore, M.L., Safabakhsh, P., Saris, C.J.M., Zhang, G.-X., and Rostami, A. (2013). Independent and interdependent immunoregulatory effects of IL-27, IFN- β , and IL-10 in the suppression of human Th17 cells and murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 190, 3225–3234.

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.

François, R.J., Gardner, D.L., Degraeve, E.J., and Bywaters, E.G. (2000). Histopathologic evidence that sacroiliitis in ankylosing spondylitis is not merely enthesitis. *Arthritis Rheum.* 43, 2011–2024.

Furukawa, M., Takaishi, H., Takito, J., Yoda, M., Sakai, S., Hikata, T., Hakozi, A., Uchikawa, S., Matsumoto, M., Chiba, K., et al. (2009). IL-27 abrogates receptor activator of NF-kappa B ligand-mediated osteoclastogenesis of human granulocyte-macrophage colony-forming unit cells through STAT1-dependent inhibition of c-Fos. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 2397–2406.

Gagliani, N., Vesely, M.C.A., Iseppon, A., Brockmann, L., Xu, H., Palm, N.W., de Zoete, M.R., Licona-Limón, P., Paiva, R.S., Ching, T., et al. (2015). Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature* 523, 221–225.

Ganguly, D., Haak, S., Sisirak, V., and Reizis, B. (2013). The role of dendritic cells in autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 566–577.

Garbers, C., Spudy, B., Aparicio-Siegmund, S., Waetzig, G.H., Sommer, J., Hölscher, C., Rose-John, S., Grötzinger, J., Lorenzen, I., and Scheller, J. (2013). An interleukin-6 receptor-dependent molecular switch mediates signal transduction of the IL-27 cytokine subunit p28 (IL-30) via a gp130 protein receptor homodimer. *J. Biol. Chem.* 288, 4346–4354.

Geyer, H., Hartung, E., Mages, H.W., Weise, C., Belužić, R., Vugrek, O., Jonjic, S., Kroczek, R.A., and Voigt, S. (2014). Cytomegalovirus expresses the chemokine homologue vXCL1 capable of attracting XCR1+ CD4- dendritic cells. *J. Virol.* 88, 292–302.

Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.-P., Tato, C.M., McGeachy, M.J., Konkel, J.E., Ramos, H.L., Wei, L., Davidson, T.S., Bouladoux, N., et al. (2010). Generation of pathogenic TH17 cells in the absence of TGF- β signalling. *Nature* 467, 967–971.

Glatigny, S., Fert, I., Blaton, M.A., Lories, R.J., Araujo, L.M., Chiocchia, 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.

Glintborg, B., Højgaard, P., Lund Hetland, M., Steen Krogh, N., Kollerup, G., Jensen, J., Chrysidis, S., Jensen Hansen, I.M., Holland-Fischer, M., Højland Hansen, T., et al. (2016). Impact of tobacco smoking on response to tumour necrosis factor-alpha inhibitor treatment in patients with ankylosing spondylitis: results from the Danish nationwide DANBIO registry. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 55, 659–668.

Gmünder, H., and Lesslauer, W. (1984). A 45-kDa human T-cell membrane glycoprotein functions in the regulation of cell proliferative responses. *Eur. J. Biochem.* 142, 153–160.

Goldberg, R., Wildbaum, G., Zohar, Y., Maor, G., and Karin, N. (2004). Suppression of ongoing adjuvant-induced arthritis by neutralizing the function of the p28 subunit of IL-27. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 173, 1171–1178.

Gregori, S., Goudy, K.S., and Roncarolo, M.G. (2012). The cellular and molecular mechanisms of immuno-suppression by human type 1 regulatory T cells. *Front. Immunol.* 3, 30.

Gringhuis, S.I., Kaptein, T.M., Wevers, B.A., van der Vlist, M., Klaver, E.J., van Die, I., Vriend, L.E.M., de Jong, M.A.W.P., and Geijtenbeek, T.B.H. (2014). Fucose-based PAMPs prime dendritic cells for follicular T helper cell polarization via DC-SIGN-dependent IL-27 production. *Nat. Commun.* 5, 5074.

Guéry, L., and Hugues, S. (2015). Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity. *BioMed Res. Int.* 2015, 314620.

Hacquard-Bouder, C., Falgarone, G., Bosquet, A., Smaoui, F., Monnet, D., Ittah, M., and Breban, M. (2004). Defective costimulatory function is a striking feature of antigen-presenting cells in an HLA-B27-transgenic rat model of spondylarthropathy. *Arthritis Rheum.* 50, 1624–1635.

Hacquard-Bouder, C., Chimenti, M.-S., Giquel, B., Donnadieu, E., Fert, I., Schmitt, A., André, C., and Breban, M. (2007). Alteration of antigen-independent immunologic synapse formation between dendritic cells from HLA-B27-transgenic rats and CD4+ T cells: Selective impairment of costimulatory molecule engagement by mature HLA-B27. *Arthritis Rheum.* 56, 1478–1489.

Hall, A.O., Silver, J.S., and Hunter, C.A. (2012a). The immunobiology of IL-27. *Adv. Immunol.* 115, 1–44.

Hall, A.O., Beiting, D.P., Tato, C., John, B., Oldenhove, G., Lombana, C.G., Pritchard, G.H., Silver, J.S., Bouladoux, N., Stumhofer, J.S., et al. (2012b). The cytokines interleukin 27 and interferon- γ promote distinct Treg cell populations required to limit infection-induced pathology. *Immunity* 37, 511–523.

Hamano, S., Himeno, K., Miyazaki, Y., Ishii, K., Yamanaka, A., Takeda, A., Zhang, M., Hisaeda, H., Mak, T.W., Yoshimura, A., et al. (2003). WSX-1 is required for resistance to *Trypanosoma cruzi* infection by regulation of proinflammatory cytokine production. *Immunity* 19, 657–667.

- Hamilton, L., Gilbert, A., Skerrett, J., Dickinson, S., and Gaffney, K. (2011). Services for people with ankylosing spondylitis in the UK—a survey of rheumatologists and patients. *Rheumatology* 50, 1991–1998.
- Hammer, R.E., Maika, S.D., Richardson, J.A., Tang, J.P., and Taurog, J.D. (1990). Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell* 63, 1099–1112.
- Hanson, M.L., Hixon, J.A., Li, W., Felber, B.K., Anver, M.R., Stewart, C.A., Janelins, B.M., Datta, S.K., Shen, W., McLean, M.H., et al. (2014). Oral Delivery of IL-27 Recombinant Bacteria Attenuates Immune Colitis in Mice. *Gastroenterology* 146, 210–221.e13.
- Harbour, S.N., Maynard, C.L., Zindl, C.L., Schoeb, T.R., and Weaver, C.T. (2015). Th17 cells give rise to Th1 cells that are required for the pathogenesis of colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 7061–7066.
- Haribhai, D., Williams, J.B., Jia, S., Nickerson, D., Schmitt, E.G., Edwards, B., Ziegelbauer, J., Yassai, M., Li, S.-H., Relland, L.M., et al. (2011). A Requisite Role for Induced Regulatory T Cells in Tolerance Based on Expanding Antigen Receptor Diversity. *Immunity* 35, 109–122.
- Haroon, N., Tsui, F.W.L., Chiu, B., Tsui, H.W., and Inman, R.D. (2010). Serum cytokine receptors in ankylosing spondylitis: relationship to inflammatory markers and endoplasmic reticulum aminopeptidase polymorphisms. *J. Rheumatol.* 37, 1907–1910.
- Hashimoto, Y., Kurita, M., and Matsuoka, M. (2009). Identification of soluble WSX-1 not as a dominant-negative but as an alternative functional subunit of a receptor for an anti-Alzheimer's disease rescue factor Humanin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 389, 95–99.
- Hegazy, A.N., Peine, M., Helmstetter, C., Panse, I., Fröhlich, A., Bergthaler, A., Flatz, L., Pinschewer, D.D., Radbruch, A., and Löhning, M. (2010). Interferons direct Th2 cell reprogramming to generate a stable GATA-3(+)T-bet(+) cell subset with combined Th2 and Th1 cell functions. *Immunity* 32, 116–128.
- Hennerici, T., Pollmann, R., Schmidt, T., Seipelt, M., Tackenberg, B., Möbs, C., Ghoreschi, K., Hertl, M., and Eming, R. (2016). Increased Frequency of T Follicular Helper Cells and Elevated Interleukin-27 Plasma Levels in Patients with Pemphigus. *PLoS One* 11, e0148919.
- Herman, A.E., Freeman, G.J., Mathis, D., and Benoist, C. (2004). CD4+CD25+ T Regulatory Cells Dependent on ICOS Promote Regulation of Effector Cells in the Prediabetic Lesion. *J. Exp. Med.* 199, 1479–1489.
- Hirahara, K., Ghoreschi, K., Yang, X.-P., Takahashi, H., Laurence, A., Vahedi, G., Sciumè, G., Hall, A.O., Dupont, C.D., Francisco, L.M., et al. (2012). Interleukin-27 priming of T cells controls IL-17 production in trans via induction of the ligand PD-L1. *Immunity* 36, 1017–1030.
- Hirota, K., Duarte, J.H., Veldhoen, M., Hornsby, E., Li, Y., Cua, D.J., Ahlfors, H., Wilhelm, C., Tolaini, M., Menzel, U., et al. (2011). Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat. Immunol.* 12, 255–263.
- Hisada, M., Kamiya, S., Fujita, K., Belladonna, M.L., Aoki, T., Koyanagi, Y., Mizuguchi, J., and Yoshimoto, T. (2004). Potent antitumor activity of interleukin-27. *Cancer Res.* 64, 1152–1156.
- Hoentjen, F., Tonkonogy, S.L., Liu, B., Sartor, R.B., Taurog, J.D., and Dieleman, L.A. (2006). Adoptive transfer of nontransgenic mesenteric lymph node cells induces colitis in athymic HLA-B27 transgenic nude rats. *Clin. Exp. Immunol.* 143, 474–483.

- Honda, K., Nakamura, K., Matsui, N., Takahashi, M., Kitamura, Y., Mizutani, T., Harada, N., Nawata, H., Hamano, S., and Yoshida, H. (2005). T helper 1-inducing property of IL-27/WSX-1 signaling is required for the induction of experimental colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* *11*, 1044–1052.
- Hu, Y.-L., Metz, D.P., Chung, J., Siu, G., and Zhang, M. (2009). B7RP-1 blockade ameliorates autoimmunity through regulation of follicular helper T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 1421–1428.
- Huang, F.-P., Platt, N., Wykes, M., Major, J.R., Powell, T.J., Jenkins, C.D., and MacPherson, G.G. (2000). A Discrete Subpopulation of Dendritic Cells Transports Apoptotic Intestinal Epithelial Cells to T Cell Areas of Mesenteric Lymph Nodes. *J. Exp. Med.* *191*, 435–444.
- Huber, M., Brüstle, A., Reinhard, K., Guralnik, A., Walter, G., Mahiny, A., Löw, E. von, and Lohoff, M. (2008a). IRF4 is essential for IL-21-mediated induction, amplification, and stabilization of the Th17 phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 20846–20851.
- Huber, M., Steinwald, V., Guralnik, A., Brüstle, A., Kleemann, P., Rosenplänter, C., Decker, T., and Lohoff, M. (2008b). IL-27 inhibits the development of regulatory T cells via STAT3. *Int. Immunol.* *20*, 223–234.
- Huber, S., Gagliani, N., Esplugues, E., O'Connor, W., Huber, F.J., Chaudhry, A., Kamanaka, M., Kobayashi, Y., Booth, C.J., Rudensky, A.Y., et al. (2011). Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3⁻ and Foxp3⁺ regulatory CD4⁺ T cells in an interleukin-10 dependent manner. *Immunity* *34*, 554–565.
- Hubert, F.-X., Voisine, C., Louvet, C., Heslan, M., and Josien, R. (2004). Rat plasmacytoid dendritic cells are an abundant subset of MHC class II+ CD4+CD11b-OX62- and type I IFN-producing cells that exhibit selective expression of Toll-like receptors 7 and 9 and strong responsiveness to CpG. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 7485–7494.
- Hutloff, A., Dittrich, A.M., Beier, K.C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., and Kroczeck, R.A. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* *397*, 263–266.
- Ichiyama, K., Gonzalez-Martin, A., Kim, B.-S., Jin, H.Y., Jin, W., Xu, W., Sabouri-Ghomi, M., Xu, S., Zheng, P., Xiao, C., et al. (2016). The MicroRNA-183-96-182 Cluster Promotes T Helper 17 Cell Pathogenicity by Negatively Regulating Transcription Factor Foxo1 Expression. *Immunity* *44*, 1284–1298.
- International Genetics of Ankylosing Spondylitis Consortium (IGAS), Cortes, A., Hadler, J., Pointon, J.P., Robinson, P.C., Karaderi, T., Leo, P., Cremin, K., Pryce, K., Harris, J., et al. (2013). Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nat. Genet.* *45*, 730–738.
- Iwasaki, Y., Fujio, K., Okamura, T., Yanai, A., Sumitomo, S., Shoda, H., Tamura, T., Yoshida, H., Charnay, P., and Yamamoto, K. (2013). Egr-2 transcription factor is required for Blimp-1-mediated IL-10 production in IL-27-stimulated CD4⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.* *43*, 1063–1073.
- Iwasaki, Y., Fujio, K., Okamura, T., and Yamamoto, K. (2015). Interleukin-27 in T Cell Immunity. *Int. J. Mol. Sci.* *16*, 2851–2863.
- Iyer, S.S., Ghaffari, A.A., and Cheng, G. (2010). Lipopolysaccharide-mediated IL-10 transcriptional regulation requires sequential induction of type I IFNs and IL-27 in macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 6599–6607.

- Jacques, P., and McGonagle, D. (2014). The role of mechanical stress in the pathogenesis of spondyloarthritis and how to combat it. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* *28*, 703–710.
- Jacques, P., Lambrecht, S., Verheugen, E., Pauwels, E., Kollias, G., Armaka, M., Verhoye, M., Linden, A.V. der, 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.
- Jankowski, M., and Wandtke, T. (2016). *Interleukin-27: Biological Properties and Clinical Application* (Springer).
- Johnston, R.J., Poholek, A.C., DiToro, D., Yusuf, I., Eto, D., Barnett, B., Dent, A.L., Craft, J., and Crotty, S. (2009). Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science* *325*, 1006–1010.
- Jorn Bovenschen, H., van de Kerkhof, P.C., van Erp, P.E., Woestenenk, R., Joosten, I., and Koenen, H.J.P.M. (2011). Foxp3+ Regulatory T Cells of Psoriasis Patients Easily Differentiate into IL-17A-Producing Cells and Are Found in Lesional Skin. *J. Invest. Dermatol.* *131*, 1853–1860.
- Ju, J.H., Heo, Y.-J., Cho, M.-L., Jhun, J.-Y., Park, J.-S., Lee, S.-Y., Oh, H.-J., Moon, S.-J., Kwok, S.-K., Park, K.-S., et al. (2012). Modulation of STAT-3 in rheumatoid synovial T cells suppresses Th17 differentiation and increases the proportion of Treg cells. *Arthritis Rheum.* *64*, 3543–3552.
- Jung, J.-Y., Roberts, L.L., and Robinson, C.M. (2015). The presence of interleukin-27 during monocyte-derived dendritic cell differentiation promotes improved antigen processing and stimulation of T cells. *Immunology* *144*, 649–660.
- Kadi, A., Izac, B., Said-Nahal, R., Leboime, A., Praet, L.V., Vlam, K. de, Elewaut, D., Chiochia, G., and Breban, M. (2013a). Investigating the genetic association between ERAP1 and spondyloarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *72*, 608–613.
- Kadi, A., Costantino, F., Izac, B., Leboime, A., Said-Nahal, R., Garchon, H.-J., Chiochia, G., and Breban, M. (2013b). Brief report: the IL23R nonsynonymous polymorphism rs11209026 is associated with radiographic sacroiliitis in spondyloarthritis. *Arthritis Rheum.* *65*, 2655–2660.
- Kadkhoda, K., Wang, S., Joyee, A.G., Fan, Y., Yang, J., and Yang, X. (2010). Th1 cytokine responses fail to effectively control Chlamydia lung infection in ICOS ligand knockout mice. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *184*, 3780–3788.
- Kamiya, S., Owaki, T., Morishima, N., Fukai, F., Mizuguchi, J., and Yoshimoto, T. (2004). An Indispensable Role for STAT1 in IL-27-Induced T-bet Expression but Not Proliferation of Naive CD4+ T Cells. *J. Immunol.* *173*, 3871–3877.
- Kamiya, S., Nakamura, C., Fukawa, T., Ono, K., Ohwaki, T., Yoshimoto, T., and Wada, S. (2007). Effects of IL-23 and IL-27 on osteoblasts and osteoclasts: inhibitory effects on osteoclast differentiation. *J. Bone Miner. Metab.* *25*, 277–285.
- Karakhanova, S., Bedke, T., Enk, A.H., and Mahnke, K. (2011). IL-27 renders DC immunosuppressive by induction of B7-H1. *J. Leukoc. Biol.* *89*, 837–845.
- 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.
- Kenna, T.J., Davidson, S.I., Duan, R., Bradbury, L.A., McFarlane, J., Smith, M., Weedon, H., Street, S., Thomas, R., Thomas, G.P., et al. (2012). Enrichment of circulating interleukin-17-secreting

interleukin-23 receptor–positive γ/δ T cells in patients with active ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* *64*, 1420–1429.

Khare, S.D., Luthra, H.S., and David, C.S. (1995). Spontaneous inflammatory arthritis in HLA-B27 transgenic mice lacking beta 2-microglobulin: a model of human spondyloarthropathies. *J. Exp. Med.* *182*, 1153–1158.

Kim, G., Shinnakasu, R., Saris, C.J.M., Cheroutre, H., and Kronenberg, M. (2013). A novel role for IL-27 in mediating the survival of activated mouse CD4 T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *190*, 1510–1518.

Kim, Y.-G., Sohn, D.H., Zhao, X., Sokolove, J., Lindstrom, T.M., Yoo, B., Lee, C.-K., Reveille, J.D., Taurog, J.D., and Robinson, W.H. (2014). Role of protein phosphatase magnesium-dependent 1A and anti-protein phosphatase magnesium-dependent 1A autoantibodies in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* *66*, 2793–2803.

Kimura, D., Miyakoda, M., Kimura, K., Honma, K., Hara, H., Yoshida, H., and Yui, K. (2016). Interleukin-27-Producing CD4(+) T Cells Regulate Protective Immunity during Malaria Parasite Infection. *Immunity* *44*, 672–682.

Kingsbury, D.J., Mear, J.P., Witte, D.P., Taurog, J.D., Roopenian, D.C., and Colbert, R.A. (2000). Development of spontaneous arthritis in beta2-microglobulin-deficient mice without expression of HLA-B27: association with deficiency of endogenous major histocompatibility complex class I expression. *Arthritis Rheum.* *43*, 2290–2296.

Koenen, H.J.P.M., Smeets, R.L., Vink, P.M., van Rijssen, E., Boots, A.M.H., and Joosten, I. (2008). Human CD25^{high}Foxp3^{pos} regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood* *112*, 2340–2352.

Kokabu, S., Nojima, J., Kanomata, K., Ohte, S., Yoda, T., Fukuda, T., and Katagiri, T. (2010). Protein phosphatase magnesium-dependent 1A-mediated inhibition of BMP signaling is independent of Smad dephosphorylation. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *25*, 653–660.

Kollnberger, S., Bird, L., Sun, M.-Y., Retiere, C., Braud, V.M., McMichael, A., and Bowness, P. (2002). Cell-surface expression and immune receptor recognition of HLA–B27 homodimers. *Arthritis Rheum.* *46*, 2972–2982.

Kollnberger, S., Bird, L.A., Roddis, M., Hacquard-Bouder, C., Kubagawa, H., Bodmer, H.C., Breban, M., McMichael, A.J., and Bowness, P. (2004). HLA-B27 heavy chain homodimers are expressed in HLA-B27 transgenic rodent models of spondyloarthritis and are ligands for paired Ig-like receptors. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *173*, 1699–1710.

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+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nat. Med.* *20*, 62–68.

Kontoyiannis, D., Pasparakis, M., Pizarro, T.T., Cominelli, F., and Kollias, G. (1999). Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity* *10*, 387–398.

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.

van Kuijk, A.W.R., Reinders-Blankert, P., Smeets, T.J.M., Dijkmans, B. a. C., and Tak, P.P. (2006). Detailed analysis of the cell infiltrate and the expression of mediators of synovial inflammation and

joint destruction in the synovium of patients with psoriatic arthritis: implications for treatment. *Ann. Rheum. Dis.* *65*, 1551–1557.

Leavenworth, J.W., Verbinnen, B., Yin, J., Huang, H., and Cantor, H. (2015). A p85 α -osteopontin axis couples the receptor ICOS to sustained Bcl-6 expression by follicular helper and regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *16*, 96–106.

Lee, Y., Awasthi, A., Yosef, N., Quintana, F.J., Xiao, S., Peters, A., Wu, C., Kleinewietfeld, M., Kunder, S., Hafler, D.A., et al. (2012). Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat. Immunol.* *13*, 991–999.

Li, C., Ebert, P.J.R., and Li, Q.-J. (2013). T Cell Receptor (TCR) and Transforming Growth Factor β (TGF- β) Signaling Converge on DNA (Cytosine-5)-methyltransferase to Control forkhead box protein 3 (foxp3) Locus Methylation and Inducible Regulatory T Cell Differentiation. *J. Biol. Chem.* *288*, 19127–19139.

Li, X., Mai, J., Virtue, A., Yin, Y., Gong, R., Sha, X., Gutchigian, S., Frisch, A., Hodge, I., Jiang, X., et al. (2012). IL-35 is a novel responsive anti-inflammatory cytokine--a new system of categorizing anti-inflammatory cytokines. *PLoS One* *7*, e33628.

Lin, P., Bach, M., Asquith, M., Lee, A.Y., Akileswaran, L., Stauffer, P., Davin, S., Pan, Y., Cambronne, E.D., Dorris, M., et al. (2014). HLA-B27 and Human β 2-Microglobulin Affect the Gut Microbiota of Transgenic Rats. *PLOS ONE* *9*, e105684.

van der Linden, S., Valkenburg, H.A., and Cats, A. (1984a). Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum.* *27*, 361–368.

van der Linden, S.M., Valkenburg, H.A., de Jongh, B.M., and Cats, A. (1984b). The risk of developing ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals. A comparison of relatives of spondylitis patients with the general population. *Arthritis Rheum.* *27*, 241–249.

Liu, H., and Rohowsky-Kochan, C. (2011). Interleukin-27-mediated suppression of human Th17 cells is associated with activation of STAT1 and suppressor of cytokine signaling protein 1. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* *31*, 459–469.

Liu, F.D.M., Kenngott, E.E., Schröter, M.F., Kühl, A., Jennrich, S., Watzlawick, R., Hoffmann, U., Wolff, T., Norley, S., Scheffold, A., et al. (2014). Timed action of IL-27 protects from immunopathology while preserving defense in influenza. *PLoS Pathog.* *10*, e1004110.

Liu, H.-P., Cao, A.T., Feng, T., Li, Q., Zhang, W., Yao, S., Dann, S.M., Elson, C.O., and Cong, Y. (2015). TGF- β converts Th1 cells into Th17 cells through stimulation of Runx1 expression. *Eur. J. Immunol.* *45*, 1010–1018.

Liu, L., Zhang, M., Jenkins, C., and MacPherson, G.G. (1998). Dendritic Cell Heterogeneity In Vivo: Two Functionally Different Dendritic Cell Populations in Rat Intestinal Lymph Can Be Distinguished by CD4 Expression. *J. Immunol.* *161*, 1146–1155.

López-Larrea, C., Mijiyawa, M., González, S., Fernández-Morera, J.L., Blanco-Gelaz, M.A., Martínez-Borra, J., and López-Vázquez, A. (2002). Association of ankylosing spondylitis with HLA-B*1403 in a West African population. *Arthritis Rheum.* *46*, 2968–2971.

Lubberts, E. (2015). The IL-23-IL-17 axis in inflammatory arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* *11*, 415–429.

- Lucas, S., Ghilardi, N., Li, J., and Sauvage, F.J. de (2003). IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naïve CD4+ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 15047–15052.
- Mahony, R., Ahmed, S., Diskin, C., and Stevenson, N.J. (2016). SOCS3 revisited: a broad regulator of disease, now ready for therapeutic use? *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *73*, 3323–3336.
- Mascanfroni, I.D., Yeste, A., Vieira, S.M., Burns, E.J., Patel, B., Sloma, I., Wu, Y., Mayo, L., Ben-Hamo, R., Efroni, S., et al. (2013). IL-27 acts on DCs to suppress the T cell response and autoimmunity by inducing expression of the immunoregulatory molecule CD39. *Nat. Immunol.* *14*, 1054–1063.
- May, E., Dorris, M.L., Satumtira, N., Iqbal, I., Rehman, M.I., Lightfoot, E., and Taurog, J.D. (2003). CD8 $\alpha\beta$ T Cells Are Not Essential to the Pathogenesis of Arthritis or Colitis in HLA-B27 Transgenic Rats. *J. Immunol.* *170*, 1099–1105.
- Mayer, K.D., Mohrs, K., Reiley, W., Wittmer, S., Kohlmeier, J.E., Pearl, J.E., Cooper, A.M., Johnson, L.L., Woodland, D.L., and Mohrs, M. (2008). Cutting edge: T-bet and IL-27R are critical for in vivo IFN-gamma production by CD8 T cells during infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 693–697.
- 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 Behcet disease. *Nat. Rev. Rheumatol.* *11*, 731–740.
- Mease, P.J. (2011). Psoriatic arthritis: update on pathophysiology, assessment and management. *Ann. Rheum. Dis.* *70*, i77–i84.
- 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.
- Messi, M., Giacchetto, I., Nagata, K., Lanzavecchia, A., Natoli, G., and Sallusto, F. (2003). Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human TH1 and TH2 lymphocytes. *Nat. Immunol.* *4*, 78–86.
- Mielants, H., Veys, E.M., Cuvelier, C., De Vos, M., Goemaere, S., De Clercq, L., Schatteeman, L., and Elewaut, D. (1995). The evolution of spondyloarthropathies in relation to gut histology. II. Histological aspects. *J. Rheumatol.* *22*, 2273–2278.
- Mittrücker, H.-W., Kursar, M., Köhler, A., Yanagihara, D., Yoshinaga, S.K., and Kaufmann, S.H.E. (2002). Inducible costimulator protein controls the protective T cell response against *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *169*, 5813–5817.
- Miyahira, Y., Akiba, H., Ogawa, S.-H., Ishi, T., Watanabe, S., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Aoki, T., Tezuka, K., Abe, R., et al. (2003). Involvement of ICOS-B7RP-1 costimulatory pathway in the regulation of immune responses to *Leishmania major* and *Nippostrongylus brasiliensis* infections. *Immunol. Lett.* *89*, 193–199.
- Moll, J.M., Haslock, I., Macrae, I.F., and Wright, V. (1974). Associations between ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, Reiter’s disease, the intestinal arthropathies, and Behcet’s syndrome. *Medicine (Baltimore)* *53*, 343–364.

Moon, S.-J., Park, J.-S., Heo, Y.-J., Kang, C.-M., Kim, E.-K., Lim, M.-A., Ryu, J.-G., Park, S.J., Park, K.S., Sung, Y.-C., et al. (2013). In vivo action of IL-27: reciprocal regulation of Th17 and Treg cells in collagen-induced arthritis. *Exp. Mol. Med.* *45*, e46.

Morandi, F., Prigione, I., and Airoidi, I. (2012). Human TCR $\gamma\delta$ + T cells represent a novel target for IL-27 activity. *Eur. J. Immunol.* *42*, 1547–1552.

Morandi, F., Carlo, E.D., Ferrone, S., Petretto, A., Pistoia, V., and Airoidi, I. (2014). IL-27 in Human Secondary Lymphoid Organs Attracts Myeloid Dendritic Cells and Impairs HLA Class I–Restricted Antigen Presentation. *J. Immunol.* *192*, 2634–2642.

Morishima, N., Owaki, T., Asakawa, M., Kamiya, S., Mizuguchi, J., and Yoshimoto, T. (2005). Augmentation of effector CD8+ T cell generation with enhanced granzyme B expression by IL-27. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *175*, 1686–1693.

Moro, K., Kabata, H., Tanabe, M., Koga, S., Takeno, N., Mochizuki, M., Fukunaga, K., Asano, K., Betsuyaku, T., and Koyasu, S. (2016). Interferon and IL-27 antagonize the function of group 2 innate lymphoid cells and type 2 innate immune responses. *Nat. Immunol.* *17*, 76–86.

Morris, R.I., Metzger, A.L., Bluestone, R., and Terasaki, P.I. (1974). HL-A-W27—a useful discriminator in the arthropathies of inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* *290*, 1117–1119.

Moser, B. (2015). CXCR5, the Defining Marker for Follicular B Helper T (TFH) Cells. *Front. Immunol.* *6*.

Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *136*, 2348–2357.

Mucida, D., Kutchukhidze, N., Erazo, A., Russo, M., Lafaille, J.J., and Curotto de Lafaille, M.A. (2005). Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J. Clin. Invest.* *115*, 1923–1933.

Murphy, T.L., Grajales-Reyes, G.E., Wu, X., Tussiwand, R., Briseño, C.G., Iwata, A., Kretzer, N.M., Durai, V., and Murphy, K.M. (2016). Transcriptional Control of Dendritic Cell Development. *Annu. Rev. Immunol.* *34*, 93–119.

Murugaiyan, G., Mittal, A., and Weiner, H.L. (2010). Identification of an IL-27/osteopontin axis in dendritic cells and its modulation by IFN- γ limits IL-17-mediated autoimmune inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 11495–11500.

Naoe, Y., Setoguchi, R., Akiyama, K., Muroi, S., Kuroda, M., Hatam, F., Littman, D.R., and Taniuchi, I. (2007). Repression of interleukin-4 in T helper type 1 cells by Runx/Cbf beta binding to the Il4 silencer. *J. Exp. Med.* *204*, 1749–1755.

Neerinckx, B., Carter, S., and Lories, R.J. (2014). No evidence for a critical role of the unfolded protein response in synovium and blood of patients with ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* *73*, 629–630.

Nistala, K., Adams, S., Cambrook, H., Ursu, S., Olivito, B., de Jager, W., Evans, J.G., Cimaz, R., Bajaj-Elliott, M., and Wedderburn, L.R. (2010). Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 14751–14756.

Noack, M., and Miossec, P. (2014). Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun. Rev.* *13*, 668–677.

- Noordenbos, T., Yeremenko, N., Gofita, I., van de Sande, M., Tak, P.P., Cañete, J.D., and Baeten, D. (2012). Interleukin-17-positive mast cells contribute to synovial inflammation in spondylarthritis. *Arthritis Rheum.* *64*, 99–109.
- Nouailles, G., Day, T.A., Kuhlmann, S., Loewe, D., Dorhoi, A., Gamradt, P., Hurwitz, R., Jörg, S., Pradl, L., Hutloff, A., et al. (2011). Impact of inducible co-stimulatory molecule (ICOS) on T-cell responses and protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur. J. Immunol.* *41*, 981–991.
- Oosterwegel, M.A., Mandelbrot, D.A., Boyd, S.D., Lorsbach, R.B., Jarrett, D.Y., Abbas, A.K., and Sharpe, A.H. (1999). The role of CTLA-4 in regulating Th2 differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *163*, 2634–2639.
- Ouaked, N., Mantel, P.-Y., Bassin, C., Burgler, S., Siegmund, K., Akdis, C.A., and Schmidt-Weber, C.B. (2009). Regulation of the *foxp3* gene by the Th1 cytokines: the role of IL-27-induced STAT1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 1041–1049.
- Owaki, T., Asakawa, M., Kamiya, S., Takeda, K., Fukai, F., Mizuguchi, J., and Yoshimoto, T. (2006a). IL-27 Suppresses CD28-Medicated IL-2 Production through Suppressor of Cytokine Signaling 3. *J. Immunol.* *176*, 2773–2780.
- Owaki, T., Asakawa, M., Fukai, F., Mizuguchi, J., and Yoshimoto, T. (2006b). IL-27 induces Th1 differentiation via p38 MAPK/T-bet- and intercellular adhesion molecule-1/LFA-1/ERK1/2-dependent pathways. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 7579–7587.
- Paramarta, J.E., Turina, M.C., Noordenbos, T., Heijda, T.F., Blijdorp, I.C., Yeremenko, N., and Baeten, D. (2016). A proof-of-concept study with the tyrosine kinase inhibitor nilotinib in spondyloarthritis. *J. Transl. Med.* *14*, 308.
- Park, J.-S., Jung, Y.O., Oh, H.-J., Park, S.J., Heo, Y.-J., Kang, C.-M., Kwok, S.-K., Ju, J.H., Park, K.S., Cho, M.-L., et al. (2012). Interleukin-27 suppresses osteoclastogenesis via induction of interferon- γ . *Immunology* *137*, 326–335.
- Paulos, C.M., Carpenito, C., Plesa, G., Suhoski, M.M., Varela-Rohena, A., Golovina, T.N., Carroll, R.G., Riley, J.L., and June, C.H. (2010). The inducible costimulator (ICOS) is critical for the development of human T(H)17 cells. *Sci. Transl. Med.* *2*, 55ra78.
- Pawaria, S., Ramani, K., Maers, K., Liu, Y., Kane, L.P., Levesque, M.C., and Biswas, P.S. (2014). Complement component C5a permits the coexistence of pathogenic Th17 cells and type I IFN in lupus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *193*, 3288–3295.
- Pedros, C., Zhang, Y., Hu, J.K., Choi, Y.S., Canonigo-Balancio, A.J., Yates, J.R., Altman, A., Crotty, S., and Kong, K.-F. (2016). A TRAF-like motif of the inducible costimulator ICOS controls development of germinal center TFH cells via the kinase TBK1. *Nat. Immunol.* *17*, 825–833.
- Perona-Wright, G., Kohlmeier, J.E., Bassity, E., Freitas, T.C., Mohrs, K., Cookenham, T., Situ, H., Pearce, E.J., Woodland, D.L., and Mohrs, M. (2012). Persistent loss of IL-27 responsiveness in CD8+ memory T cells abrogates IL-10 expression in a recall response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 18535–18540.
- Pfeifle, R., Rothe, T., Ipseiz, N., Scherer, H.U., Culemann, S., Harre, U., Ackermann, J.A., Seefried, M., Kleyer, A., Uderhardt, S., et al. (2016). Regulation of autoantibody activity by the IL-23-TH17 axis determines the onset of autoimmune disease. *Nat. Immunol.*
- Pflanz, S., Timans, J.C., Cheung, J., Rosales, R., Kanzler, H., Gilbert, J., Hibbert, L., Churakova, T., Travis, M., Vaisberg, E., et al. (2002). IL-27, a Heterodimeric Cytokine Composed of EBI3 and p28 Protein, Induces Proliferation of Naive CD4+ T Cells. *Immunity* *16*, 779–790.

- Pflanz, S., Hibbert, L., Mattson, J., Rosales, R., Vaisberg, E., Bazan, J.F., Phillips, J.H., McClanahan, T.K., Malefyt, R. de W., and Kastelein, R.A. (2004). WSX-1 and Glycoprotein 130 Constitute a Signal-Transducing Receptor for IL-27. *J. Immunol.* *172*, 2225–2231.
- Pickens, S.R., Chamberlain, N.D., Volin, M.V., Mandelin, A.M., Agrawal, H., Matsui, M., Yoshimoto, T., and Shahrara, S. (2011). Local expression of interleukin-27 ameliorates collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* *63*, 2289–2298.
- Pot, C., Jin, H., Awasthi, A., Liu, S.M., Lai, C.-Y., Madan, R., Sharpe, A.H., Karp, C.L., Miaw, S.-C., Ho, I.-C., et al. (2009). Cutting edge: IL-27 induces the transcription factor c-Maf, cytokine IL-21, and the costimulatory receptor ICOS that coordinately act together to promote differentiation of IL-10-producing Tr1 cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *183*, 797–801.
- Quintana, F.J., Basso, A.S., Iglesias, A.H., Korn, T., Farez, M.F., Bettelli, E., Caccamo, M., Oukka, M., and Weiner, H.L. (2008). Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* *453*, 65–71.
- Rajaiah, R., Puttabyatappa, M., Polumuri, S.K., and Moudgil, K.D. (2011). Interleukin-27 and interferon-gamma are involved in regulation of autoimmune arthritis. *J. Biol. Chem.* *286*, 2817–2825.
- Ramos, M., Alvarez, I., Sesma, L., Logean, A., Rognan, D., and Castro, J.A.L. de (2002). Molecular Mimicry of an HLA-B27-derived Ligand of Arthritis-linked Subtypes with Chlamydial Proteins. *J. Biol. Chem.* *277*, 37573–37581.
- Rath, H.C., Herfarth, H.H., Ikeda, J.S., Grenther, W.B., Hamm, T.E., Balish, E., Taurog, J.D., Hammer, R.E., Wilson, K.H., and Sartor, R.B. (1996). Normal luminal bacteria, especially *Bacteroides* species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats. *J. Clin. Invest.* *98*, 945–953.
- Raymond, M., Van, V.Q., Wakahara, K., Rubio, M., and Sarfati, M. (2011). Lung dendritic cells induce TH17 cells that produce TH2 cytokines, express GATA-3, and promote airway inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* *128*, 192–201.e6.
- Redlich, K., Görtz, B., Hayer, S., Zwerina, J., Kollias, G., Steiner, G., Smolen, J.S., and Schett, G. (2004). Overexpression of tumor necrosis factor causes bilateral sacroiliitis. *Arthritis Rheum.* *50*, 1001–1005.
- Redpath, S.A., van der Werf, N., Cervera, A.M., MacDonald, A.S., Gray, D., Maizels, R.M., and Taylor, M.D. (2013). ICOS controls Foxp3(+) regulatory T-cell expansion, maintenance and IL-10 production during helminth infection. *Eur. J. Immunol.* *43*, 705–715.
- Reveille, J.D. (2011). The genetic basis of spondyloarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *70*, i44–i50.
- Roncarolo, M.G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K., and Levings, M.K. (2006). Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol. Rev.* *212*, 28–50.
- Rudwaleit, M., van der Heijde, D., Landewé, R., Listing, J., Akkoc, N., Brandt, J., Braun, J., Chou, C.T., Collantes-Estevez, E., Dougados, M., et al. (2009). The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. *Ann. Rheum. Dis.* *68*, 777–783.
- Rudwaleit, M., van der Heijde, D., Landewé, R., Akkoc, N., Brandt, J., Chou, C.T., Dougados, M., Huang, F., Gu, J., Kirazli, Y., et al. (2011). The Assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general. *Ann. Rheum. Dis.* *70*, 25–31.

- Ruutu, M., Thomas, G., Steck, R., Degli-Esposti, M.A., Zinkernagel, M.S., Alexander, K., Velasco, J., Strutton, G., Tran, A., Benham, H., et al. (2012). β -glucan triggers spondylarthritis and Crohn's disease-like ileitis in SKG mice. *Arthritis Rheum.* *64*, 2211–2222.
- 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.* *155*, 1151–1164.
- Salcedo, R., Stauffer, J.K., Lincoln, E., Back, T.C., Hixon, J.A., Hahn, C., Shafer-Weaver, K., Malyguine, A., Kastelein, R., and Wigginton, J.M. (2004). IL-27 mediates complete regression of orthotopic primary and metastatic murine neuroblastoma tumors: role for CD8⁺ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *173*, 7170–7182.
- 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.
- Sasaoka, T., Ito, M., Yamashita, J., Nakajima, K., Tanaka, I., Narita, M., Hara, Y., Hada, K., Takahashi, M., Ohno, Y., et al. (2011). Treatment with IL-27 attenuates experimental colitis through the suppression of the development of IL-17-producing T helper cells. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* *300*, G568–G576.
- Scales, H.E., Ierna, M.X., Gutierrez-Ramos, J.-C., Coyle, A.J., Garside, P., and Lawrence, C.E. (2004). Effect of inducible costimulator blockade on the pathological and protective immune responses induced by the gastrointestinal helminth *Trichinella spiralis*. *Eur. J. Immunol.* *34*, 2854–2862.
- Schildberg, F.A., Klein, S.R., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2016). Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family. *Immunity* *44*, 955–972.
- 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.
- Schraml, B.U., Hildner, K., Ise, W., Lee, W.-L., Smith, W.A.-E., Solomon, B., Sahota, G., Sim, J., Mukasa, R., Cemerski, S., et al. (2009). The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation. *Nature* *460*, 405–409.
- Sharma, G., Dutta, R.K., Khan, M.A., Ishaq, M., Sharma, K., Malhotra, H., and Majumdar, S. (2014). IL-27 inhibits IFN- γ induced autophagy by concomitant induction of JAK/PI3 K/Akt/mTOR cascade and up-regulation of Mcl-1 in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv infected macrophages. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *55*, 335–347.
- 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.
- Shen, H., Goodall, J.C., and Gaston, J.S.H. (2010). Frequency and phenotype of T helper 17 cells in peripheral blood and synovial fluid of patients with reactive arthritis. *J. Rheumatol.* *37*, 2096–2099.
- 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 spondyloarthritis by acting on ROR- γ t⁺ CD3⁺CD4⁺CD8⁻ enthesal resident T cells. *Nat. Med.* *18*, 1069–1076.

- Shibata, S., Tada, Y., Kanda, N., Nashiro, K., Kamata, M., Karakawa, M., Miyagaki, T., Kai, H., Saeki, H., Shirakata, Y., et al. (2010). Possible Roles of IL-27 in the Pathogenesis of Psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* *130*, 1034–1039.
- Shibata, S., Tada, Y., Asano, Y., Yanaba, K., Sugaya, M., Kadono, T., Kanda, N., Watanabe, S., and Sato, S. (2013). IL-27 Activates Th1-Mediated Responses in Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Lesions. *J. Invest. Dermatol.* *133*, 479–488.
- Shimizu, S., Sugiyama, N., Masutani, K., Sadanaga, A., Miyazaki, Y., Inoue, Y., Akahoshi, M., Katafuchi, R., Hirakata, H., Harada, M., et al. (2005). Membranous Glomerulonephritis Development with Th2-Type Immune Deviations in MRL/lpr Mice Deficient for IL-27 Receptor (WSX-1). *J. Immunol.* *175*, 7185–7192.
- Shimozato, O., Sato, A., Kawamura, K., Chiyo, M., Ma, G., Li, Q., and Tagawa, M. (2009). The secreted form of p28 subunit of interleukin (IL)-27 inhibits biological functions of IL-27 and suppresses anti-allogeneic immune responses. *Immunology* *128*, e816-825.
- Shinohara, M.L., Kim, J.-H., Garcia, V.A., and Cantor, H. (2008). Engagement of the type I interferon receptor on dendritic cells inhibits T helper 17 cell development: role of intracellular osteopontin. *Immunity* *29*, 68–78.
- Sieper, J., and Poddubnyy, D. (2016). New evidence on the management of spondyloarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* *12*, 282–295.
- Sieper, J., Braun, J., Rudwaleit, M., Boonen, A., and Zink, A. (2002). Ankylosing spondylitis: an overview. *Ann. Rheum. Dis.* *61 Suppl 3*, iii8-18.
- Silvy, F., Bertin, D., Bardin, N., Auger, I., Guzian, M.-C., Mattei, J.-P., Guis, S., Roudier, J., and Balandraud, N. (2015). Antinuclear Antibodies in Patients with Psoriatic Arthritis Treated or Not with Biologics. *PLOS ONE* *10*, e0134218.
- Slight, S.R., Monin, L., Gopal, R., Avery, L., Davis, M., Cleveland, H., Oury, T.D., Rangel-Moreno, J., and Khader, S.A. (2013). IL-10 Restrains IL-17 to Limit Lung Pathology Characteristics following Pulmonary Infection with *Francisella tularensis* Live Vaccine Strain. *Am. J. Pathol.* *183*, 1397–1404.
- Smith, E., Stark, M.A., Zarbock, A., Burcin, T.L., Bruce, A.C., Vaswani, D., Foley, P., and Ley, K. (2008a). IL-17A inhibits the expansion of IL-17A-producing T cells in mice through “short-loop” inhibition via IL-17 receptor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 1357–1364.
- Smith, J.A., Barnes, M.D., Hong, D., DeLay, M.L., Inman, R.D., and Colbert, R.A. (2008b). Gene expression analysis of macrophages derived from ankylosing spondylitis patients reveals interferon- γ dysregulation. *Arthritis Rheum.* *58*, 1640–1649.
- Song, I.-H., Heldmann, F., Rudwaleit, M., Listing, J., Appel, H., Braun, J., and Sieper, J. (2010). Different response to rituximab in tumor necrosis factor blocker-naïve patients with active ankylosing spondylitis and in patients in whom tumor necrosis factor blockers have failed: a twenty-four-week clinical trial. *Arthritis Rheum.* *62*, 1290–1297.
- Sonoda, K.-H., Yoshimura, T., Takeda, A., Ishibashi, T., Hamano, S., and Yoshida, H. (2007). WSX-1 plays a significant role for the initiation of experimental autoimmune uveitis. *Int. Immunol.* *19*, 93–98.
- Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1973). IDENTIFICATION OF A NOVEL CELL TYPE IN PERIPHERAL LYMPHOID ORGANS OF MICE. *J. Exp. Med.* *137*, 1142–1162.

- Stumhofer, J.S., Laurence, A., Wilson, E.H., Huang, E., Tato, C.M., Johnson, L.M., Villarino, A.V., Huang, Q., Yoshimura, A., Sehy, D., et al. (2006). Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat. Immunol.* *7*, 937–945.
- Stumhofer, J.S., Silver, J.S., Laurence, A., Porrett, P.M., Harris, T.H., Turka, L.A., Ernst, M., Saris, C.J.M., O’Shea, J.J., and Hunter, C.A. (2007). Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat. Immunol.* *8*, 1363–1371.
- Stumhofer, J.S., Tait, E.D., Quinn, W.J., Hosken, N., Spudy, B., Goenka, R., Fielding, C.A., O’Hara, A.C., Chen, Y., Jones, M.L., et al. (2010). A role for IL-27p28 as an antagonist of gp130-mediated signaling. *Nat. Immunol.* *11*, 1119–1126.
- Szabo, S.J., Dighe, A.S., Gubler, U., and Murphy, K.M. (1997). Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J. Exp. Med.* *185*, 817–824.
- Takeda, A., Hamano, S., Yamanaka, A., Hanada, T., Ishibashi, T., Mak, T.W., Yoshimura, A., and Yoshida, H. (2003). Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *170*, 4886–4890.
- Takeda, A., Hasegawa, E., Fukuhara, T., Hirakawa, S., Yamada, H., Yang, Y., Yoshimura, T., Hisatomi, T., Oshima, Y., Yoshida, H., et al. (2014). EBI3 is pivotal for the initiation of experimental autoimmune uveitis. *Exp. Eye Res.* *125*, 107–113.
- Talpin, A., Costantino, F., Bonilla, N., Leboime, A., Letourneur, F., Jacques, S., Dumont, F., Amraoui, S., Dutertre, C.-A., Garchon, H.-J., et al. (2014). Monocyte-derived dendritic cells from HLA-B27+ axial spondyloarthritis (SpA) patients display altered functional capacity and deregulated gene expression. *Arthritis Res. Ther.* *16*.
- Taurog, J.D., Maika, S.D., Simmons, W.A., Breban, M., and Hammer, R.E. (1993). Susceptibility to inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rat lines correlates with the level of B27 expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *150*, 4168–4178.
- Taurog, J.D., Richardson, J.A., Croft, J.T., Simmons, W.A., Zhou, M., Fernández-Sueiro, J.L., Balish, E., and Hammer, R.E. (1994). The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J. Exp. Med.* *180*, 2359–2364.
- Taurog, J.D., Maika, S.D., Satumtira, N., Dorris, M.L., McLean, I.L., Yanagisawa, H., Sayad, A., Stagg, A.J., Fox, G.M., Lê O’Brien, A., et al. (1999). Inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *Immunol. Rev.* *169*, 209–223.
- Taurog, J.D., Dorris, M.L., Satumtira, N., Tran, T.M., Sharma, R., Dressel, R., van den Brandt, J., and Reichardt, H.M. (2009). Spondylarthritis in HLA-B27/human beta2-microglobulin-transgenic rats is not prevented by lack of CD8. *Arthritis Rheum.* *60*, 1977–1984.
- Taurog, J.D., Rival, C., van Duivenvoorde, L.M., Satumtira, N., Dorris, M.L., Sun, M., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Hamra, F.K., Hammer, R.E., et al. (2012). Autoimmune epididymoorchitis is essential to the pathogenesis of male-specific spondylarthritis in HLA-B27-transgenic rats. *Arthritis Rheum.* *64*, 2518–2528.
- Tormo, A.J., Meliani, Y., Beaupré, L.A., Sharma, M., Fritz, J.H., Elson, G., Crabé, S., and Gauchat, J.-F. (2013). The composite cytokine p28/cytokine-like factor 1 sustains B cell proliferation and promotes plasma cell differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *191*, 1657–1665.

- Tran, T.M., Dorris, M.L., Satumtira, N., Richardson, J.A., Hammer, R.E., Shang, J., and Taurog, J.D. (2006). Additional human beta2-microglobulin curbs HLA-B27 misfolding and promotes arthritis and spondylitis without colitis in male HLA-B27-transgenic rats. *Arthritis Rheum.* *54*, 1317–1327.
- Trinité, B., Voisine, C., Yagita, H., and Josien, R. (2000). A Subset of Cytolytic Dendritic Cells in Rat. *J. Immunol.* *165*, 4202–4208.
- Tsui, F.W.L., Tsui, H.W., Las Heras, F., Pritzker, K.P.H., and Inman, R.D. (2014). Serum levels of novel noggin and sclerostin-immune complexes are elevated in ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* *73*, 1873–1879.
- van Tubergen, A. (2015). The changing clinical picture and epidemiology of spondyloarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* *11*, 110–118.
- Tuettenberg, A., Huter, E., Hubo, M., Horn, J., Knop, J., Grimbacher, B., Kroczeck, R.A., Stoll, S., and Jonuleit, H. (2009). The Role of ICOS in Directing T Cell Responses: ICOS-Dependent Induction of T Cell Anergy by Tolerogenic Dendritic Cells. *J. Immunol.* *182*, 3349–3356.
- Turner, M.J., Sowders, D.P., DeLay, M.L., Mohapatra, R., Bai, S., Smith, J.A., Brandewie, J.R., Taurog, J.D., and Colbert, R.A. (2005). HLA-B27 Misfolding in Transgenic Rats Is Associated with Activation of the Unfolded Protein Response. *J. Immunol.* *175*, 2438–2448.
- Ueno, A., Jijon, H., Chan, R., Ford, K., Hirota, C., Kaplan, G.G., Beck, P.L., Iacucci, M., Fort Gasia, M., Barkema, H.W., et al. (2013). Increased prevalence of circulating novel IL-17 secreting Foxp3 expressing CD4+ T cells and defective suppressive function of circulating Foxp3+ regulatory cells support plasticity between Th17 and regulatory T cells in inflammatory bowel disease patients. *Inflamm. Bowel Dis.* *19*, 2522–2534.
- Utriainen, L., Firmin, D., Wright, P., Cerovic, V., Breban, M., McInnes, I., and Milling, S. (2012). Expression of HLA-B27 causes loss of migratory dendritic cells in a rat model of spondylarthritis. *Arthritis Rheum.* *64*, 3199–3209.
- Valmori, D., Raffin, C., Raimbaud, I., and Ayyoub, M. (2010). Human ROR γ t+ TH17 cells preferentially differentiate from naive FOXP3+Treg in the presence of lineage-specific polarizing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 19402–19407.
- Van Praet, L., Jans, L., Carron, P., Jacques, P., Glorieus, E., Colman, R., Cypers, H., Mielants, H., De Vos, M., Cuvelier, C., et al. (2014). Degree of bone marrow oedema in sacroiliac joints of patients with axial spondyloarthritis is linked to gut inflammation and male sex: results from the GIANT cohort. *Ann. Rheum. Dis.* *73*, 1186–1189.
- Veldhoen, M., Hirota, K., Westendorf, A.M., Buer, J., Dumoutier, L., Renauld, J.-C., and Stockinger, B. (2008). The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* *453*, 106–109.
- Vidric, M., Bladt, A.T., Dianzani, U., and Watts, T.H. (2006). Role for inducible costimulator in control of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice. *Infect. Immun.* *74*, 1050–1061.
- Vieira-Sousa, E., van Duivenvoorde, L.M., Fonseca, J.E., Lories, R.J., and Baeten, D.L. (2015). Review: Animal Models as a Tool to Dissect Pivotal Pathways Driving Spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol.* *67*, 2813–2827.
- Villarino, A., Hibbert, L., Lieberman, L., Wilson, E., Mak, T., Yoshida, H., Kastelein, R.A., Saris, C., and Hunter, C.A. (2003). The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection. *Immunity* *19*, 645–655.

- Villarino, A.V., Stumhofer, J.S., Saris, C.J.M., Kastelein, R.A., Sauvage, F.J. de, and Hunter, C.A. (2006). IL-27 Limits IL-2 Production during Th1 Differentiation. *J. Immunol.* *176*, 237–247.
- Villarino, A.V., Artis, D., Bezbradica, J.S., Miller, O., Saris, C.J.M., Joyce, S., and Hunter, C.A. (2008). IL-27R deficiency delays the onset of colitis and protects from helminth-induced pathology in a model of chronic IBD. *Int. Immunol.* *20*, 739–752.
- Visperas, A., Do, J.S., Bulek, K., Li, X., and Min, B. (2014). IL-27, targeting antigen-presenting cells, promotes Th17 differentiation and colitis in mice. *Mucosal Immunol.* *7*, 625–633.
- Vocanson, M., Rozieres, A., Hennino, A., Poyet, G., Gaillard, V., Renaudineau, S., Achachi, A., Benetiere, J., Kaiserlian, D., Dubois, B., et al. (2010). Inducible costimulator (ICOS) is a marker for highly suppressive antigen-specific T cells sharing features of TH17/TH1 and regulatory T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* *126*, 280–289, 289-7.
- Voisine, C., Hubert, F.-X., Trinité, B., Heslan, M., and Josien, R. (2002). Two Phenotypically Distinct Subsets of Spleen Dendritic Cells in Rats Exhibit Different Cytokine Production and T Cell Stimulatory Activity. *J. Immunol.* *169*, 2284–2291.
- Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L., and Shortman, K. (2000). CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *164*, 2978–2986.
- Wang, C., Yosef, N., Gaublot, J., Wu, C., Lee, Y., Clish, C.B., Kaminski, J., Xiao, S., Zu Horste, G.M., Pawlak, M., et al. (2015a). CD5L/AIM Regulates Lipid Biosynthesis and Restrains Th17 Cell Pathogenicity. *Cell* *163*, 1413–1427.
- Wang, C.J., Heuts, F., Ovcinnikovs, V., Wardzinski, L., Bowers, C., Schmidt, E.M., Kogimtzis, A., Kenefeck, R., Sansom, D.M., and Walker, L.S.K. (2015). CTLA-4 controls follicular helper T-cell differentiation by regulating the strength of CD28 engagement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 524–529.
- Wang, R., Dasgupta, A., and Ward, M.M. (2016a). Comparative efficacy of non-steroidal anti-inflammatory drugs in ankylosing spondylitis: a Bayesian network meta-analysis of clinical trials. *Ann. Rheum. Dis.* *75*, 1152–1160.
- Wang, R.-X., Yu, C.-R., Mahdi, R.M., and Egwuagu, C.E. (2012). Novel IL27p28/IL12p40 cytokine suppressed experimental autoimmune uveitis by inhibiting autoreactive Th1/Th17 cells and promoting expansion of regulatory T cells. *J. Biol. Chem.* *287*, 36012–36021.
- Wang, T., Sun, X., Zhao, J., Zhang, J., Zhu, H., Li, C., Gao, N., Jia, Y., Xu, D., Huang, F.-P., et al. (2015b). Regulatory T cells in rheumatoid arthritis showed increased plasticity toward Th17 but retained suppressive function in peripheral blood. *Ann. Rheum. Dis.* *74*, 1293–1301.
- Wang, X., Lin, Z., Wei, Q., Jiang, Y., and Gu, J. (2009). Expression of IL-23 and IL-17 and effect of IL-23 on IL-17 production in ankylosing spondylitis. *Rheumatol. Int.* *29*, 1343–1347.
- Wang, X., Wei, Y., Xiao, H., Liu, X., Zhang, Y., Han, G., Chen, G., Hou, C., Ma, N., Shen, B., et al. (2016b). A novel IL-23p19/Ebi3 (IL-39) cytokine mediates inflammation in Lupus-like mice. *Eur. J. Immunol.* *46*, 1343–1350.
- Wang, Y., Godec, J., Ben-Aissa, K., Cui, K., Zhao, K., Pucsek, A.B., Lee, Y.K., Weaver, C.T., Yagi, R., and Lazarevic, V. (2014). The transcription factors T-bet and Runx are required for the ontogeny of pathogenic interferon- γ -producing T helper 17 cells. *Immunity* *40*, 355–366.
- Wang, Y.-H., Voo, K.S., Liu, B., Chen, C.-Y., Uygungil, B., Spoede, W., Bernstein, J.A., Huston, D.P., and Liu, Y.-J. (2010). A novel subset of CD4(+) T(H)2 memory/effector cells that produce

inflammatory IL-17 cytokine and promote the exacerbation of chronic allergic asthma. *J. Exp. Med.* 207, 2479–2491.

Watzlawick, R., Kenngott, E.E., Liu, F.D.M., Schwab, J.M., and Hamann, A. (2015). Anti-Inflammatory Effects of IL-27 in Zymosan-Induced Peritonitis: Inhibition of Neutrophil Recruitment Partially Explained by Impaired Mobilization from Bone Marrow and Reduced Chemokine Levels. *PLOS ONE* 10, e0137651.

Weaver, C.T., Elson, C.O., Fouser, L.A., and Kolls, J.K. (2013). The Th17 Pathway and Inflammatory Diseases of the Intestines, Lungs, and Skin. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 8, 477–512.

Weber, J.P., Fuhrmann, F., Feist, R.K., Lahmann, A., Al Baz, M.S., Gentz, L.-J., Vu Van, D., Mages, H.W., Haftmann, C., Riedel, R., et al. (2015). ICOS maintains the T follicular helper cell phenotype by down-regulating Krüppel-like factor 2. *J. Exp. Med.* 212, 217–233.

Weinreich, S., Eulderink, F., Capkova, J., Pla, M., Gaede, K., Heesemann, J., van Alphen, L., Zurcher, C., Hoebe-Hewryk, B., and Kievits, F. (1995). HLA-B27 as a relative risk factor in ankylosing enthesopathy in transgenic mice. *Hum. Immunol.* 42, 103–115.

Wellcome Trust Case Control Consortium, Australo-Anglo-American Spondylitis Consortium (TASC), Burton, P.R., Clayton, D.G., Cardon, L.R., Craddock, N., Deloukas, P., Duncanson, A., Kwiatkowski, D.P., McCarthy, M.I., et al. (2007). Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat. Genet.* 39, 1329–1337.

Wikenheiser, D.J., and Stumhofer, J.S. (2016). ICOS Co-Stimulation: Friend or Foe? *Front. Immunol.* 7, 304.

Wilson, E.H., Zaph, C., Mohrs, M., Welcher, A., Siu, J., Artis, D., and Hunter, C.A. (2006). B7RP-1-ICOS interactions are required for optimal infection-induced expansion of CD4⁺ Th1 and Th2 responses. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 177, 2365–2372.

Wirtz, S., Becker, C., Fantini, M.C., Nieuwenhuis, E.E., Tubbe, I., Galle, P.R., Schild, H.-J., Birkenbach, M., Blumberg, R.S., and Neurath, M.F. (2005). EBV-induced gene 3 transcription is induced by TLR signaling in primary dendritic cells via NF-kappa B activation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 174, 2814–2824.

Wittmann, M., Doble, R., Bachmann, M., Pfeilschifter, J., Werfel, T., and Mühl, H. (2012). IL-27 Regulates IL-18 Binding Protein in Skin Resident Cells. *PLOS ONE* 7, e38751.

Wojno, E.D.T., Hosken, N., Stumhofer, J.S., O’Hara, A.C., Mauldin, E., Fang, Q., Turka, L.A., Levin, S.D., and Hunter, C.A. (2011). A role for IL-27 in limiting T regulatory cell populations. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 187, 266–273.

Wong, C.K., Chen, D.P., Tam, L.S., Li, E.K., Yin, Y.B., and Lam, C.W.K. (2010). Effects of inflammatory cytokine IL-27 on the activation of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 12, R129.

Wright, C., Sibani, S., Trudgian, D., Fischer, R., Kessler, B., LaBaer, J., and Bowness, P. (2012). Detection of multiple autoantibodies in patients with ankylosing spondylitis using nucleic acid programmable protein arrays. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 11, M9.00384.

Wu, C., Pot, C., Apetoh, L., Thalhamer, T., Zhu, B., Murugaiyan, G., Xiao, S., Lee, Y., Rangachari, M., Yosef, N., et al. (2013). Metallothioneins negatively regulate IL-27-induced type 1 regulatory T-cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 7802–7807.

- Wu, S., Cho, E., Li, W.-Q., Han, J., and Qureshi, A.A. (2015a). Alcohol intake and risk of incident psoriatic arthritis in women. *J. Rheumatol.* *42*, 835–840.
- Wu, S., Yang, T., Pan, F., Xia, G., Hu, Y., Liu, L., Fan, D., Duan, Z., Ding, N., Xu, S., et al. (2015b). Increased frequency of circulating follicular helper T cells in patients with ankylosing spondylitis. *Mod. Rheumatol.* *25*, 110–115.
- Yoshida, H., and Hunter, C.A. (2015). The Immunobiology of Interleukin-27. *Annu. Rev. Immunol.* *33*, 417–443.
- Yoshimoto, T., Yoshimoto, T., Yasuda, K., Mizuguchi, J., and Nakanishi, K. (2007). IL-27 suppresses Th2 cell development and Th2 cytokines production from polarized Th2 cells: a novel therapeutic way for Th2-mediated allergic inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *179*, 4415–4423.
- Zeboulon-Ktorza, N., Boelle, P.Y., Nahal, R.S., D’agostino, M.A., Vibert, J.F., Turbelin, C., Madrakian, H., Durand, E., Launay, O., Mahr, A., et al. (2013). Influence of environmental factors on disease activity in spondyloarthritis: a prospective cohort study. *J. Rheumatol.* *40*, 469–475.
- Zhang, J.-R., Liu, X.-J., Xu, W.-D., and Dai, S.-M. (2016). Effects of tumor necrosis factor- α inhibitors on new bone formation in ankylosing spondylitis. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* *83*, 257–264.
- Zheng, S.G., Wang, J.H., Stohl, W., Kim, K.S., Gray, J.D., and Horwitz, D.A. (2006). TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *176*, 3321–3329.
- Zheng, S.G., Wang, J., Wang, P., Gray, J.D., and Horwitz, D.A. (2007). IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 2018–2027.
- 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.
- Zielinski, C.E., Mele, F., Aschenbrenner, D., Jarrossay, D., Ronchi, F., Gattorno, M., Monticelli, S., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2012). Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- γ or IL-10 and are regulated by IL-1 β . *Nature* *484*, 514–518.

Annexe 1

Dendritic and-T cells Interactions in Spondyloarthritis

Quentin Jouhault, Luiza M. Araujo, Kétia Ermoza, Maxime Breban & Gilles Chiochia

Revue en préparation

Dendritic and-T cells Interactions in Spondyloarthritis

Quentin Jouhault,^{1,2} Luiza M. Araujo,¹ Kétia Ermoza,^{1,2} Maxime Breban^{1,2,3} & Gilles Chiocchia^{1,2,4}

1 – INSERM U1173, UFR Simone Veil, Université Versailles-Saint-Quentin en Yvelines, France

2 – Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire d'Excellence, Paris, France

3 – Rheumatology Division, Ambroise Paré Hospital (AP-HP), Boulogne-Billancourt, France

4 – Haematology-Immunology Division, Ambroise Paré Hospital (AP-HP), Boulogne-Billancourt, France

Abstract

Spondyloarthritis (SpA) is a group of chronic inflammatory disorders with axial and peripheral symptoms. A strong association of SpA with the human leukocyte antigen (HLA) class I molecule B27 is known since 40 years but the pathogenic role of HLA-B27 remains largely unexplained. Studies using transgenic rats overexpressing HLA-B27 (B27 rats) revealed the fundamental role of antigen-presenting cells and CD4⁺ T cells in the development of SpA. This review aims to summarize the current knowledge about interactions between these cells in B27 rats and patients with SpA. Current data from animal models show that dendritic cells support the pathogenic expansion of Th₁₇ cells, in part by impaired costimulatory signaling. Furthermore, recent clinical trials support the importance of the IL-23/Th₁₇ axis in SpA. However, the precise role of dendritic cells in human SpA is not well established. Given the critical role of dendritic cells in the control of T cell responses, characterization of their interaction with CD4⁺ T cells in this pathology may lead to the development of novel targeted therapies.

Introduction

Spondyloarthritis (SpA) encompasses several chronic inflammatory disorders mainly affecting the spine and the sacro-iliac joint (axial manifestations). These symptoms can combine with peripheral arthritis, enthesitis and with extra-articular manifestations as anterior uveitis, psoriasis and inflammatory bowel diseases (Crohn's disease and ulcerative colitis). The different forms of SpA are traditionally ankylosing spondylitis (AS), arthritis associated with inflammatory bowel disease (IBD), psoriatic arthritis (PsA), reactive arthritis (ReA) and undifferentiated SpA (uSpA). Recently, the Assessment of Spondyloarthritis International Society (ASAS) proposed a new classification for SpA, subdividing it into axial and peripheral SpA (Rudwaleit et al., 2009, 2011).

SpA affects 0.5-1% of the population and its prevalence in the French population was recently evaluated to 0.43% (Costantino et al., 2015a). Despite the fact that the strong association between SpA and the class I major histocompatibility complex (MHC) antigen HLA-B27 was described 40 years ago, the precise mechanisms implied in the development of SpA by HLA-B27 remain still elusive (Bowness, 2015). The role of HLA-B27 in this disorder is highlighted by several animal models particularly by rats overexpressing HLA-B27 and human β 2 microglobulin (h β 2m). These rats spontaneously develop a phenotype closely resembling human SpA with chronic intestinal inflammation, arthritis, spondylitis and psoriasis, in the presence of normal microbial flora (Breban et al., 2004; Taurog et al., 1994; Vieira-Sousa et al., 2015). These animal models are extensively used to better understand the cellular and molecular mechanisms involved in SpA. Using animal model, Breban and colleagues showed by cell transfer experiments the fundamental role of B27⁺ bone marrow (BM) cells (Breban et al., 1993) and CD4⁺ T cells (Breban et al., 1996) in the induction of SpA. It is interesting to note that CD8⁺ T cells are dispensable for the development of SpA in experimental model (May et al., 2003), despite the fact that HLA-B27 is a MHC class I

molecule which presents antigenic peptides to those cells. This strong association between SpA and class I MHC led to the creation of the “arthritogenic peptide” theory, corroborated by the recent “MHC-I-opathy” concept (McGonagle et al., 2015). In this theory, SpA and Behçet disease are triggered by mechanical stress and/or microbial products presented by class I MHCs to CD8⁺ T cells which reinforce aberrant innate immune reactions at sites of injury. The strong influence of ERAP1 polymorphisms in SpA susceptibility is a powerful argument in favor of this theory (Cortes et al., 2015; Costantino et al., 2015b). However, the absence of a clearly identified arthritogenic peptide and the minor role of CD8⁺ T cells in B27 rats challenge this “arthritogenic peptide” concept (Bowness, 2015).

Essential role of antigen-presenting cells and CD4⁺ T cells in animal model of SpA

Two pivotal studies demonstrated the crucial role of B27⁺ bone marrow (BM) - derived cells and CD4⁺ T cells (Breban et al., 1993, 1996). The possibility that BM-derived antigen-presenting cells (APCs) bearing the B27 transgenic locus could influence the thymic selection process of the T-cell repertoire, and thereby contribute to disease pathogenesis, was examined. However this hypothesis was ruled out, because contact of pathogenic T cells with the B27 molecule in the thymus was not required for trigger the disease (Breban et al., 1996). Several evidences highlighted the role of BM cells in SpA induction. For instance, the transfer of disease with fetal liver cells from disease-prone transgenic lines suggested that neither mature effector cells nor active disease in the donors was necessary for induction of disease in the recipients. Remission of the spontaneous disease in irradiated transgenic rats was induced by engraftment of nontransgenic (NTG) bone marrow. These results suggest that the expression of HLA-B27 in bone marrow-derived cells alone is sufficient for the development of B27-associated disease. Furthermore,

successful disease transfer by using transferred lymphoid cell populations from disease-prone transgenic lines into irradiated disease-resistant transgenic and NTG recipients, required engraftment of bone marrow cells (Breban et al., 1993).

Concerning T cells, their fundamental role in the induction of rat SpA is demonstrated by the absence of disease manifestations in nude B27 rats that lack thymically derived T lymphocytes (Breban et al., 1996). Strikingly, transfer of CD4⁺ T cells into these nude B27 rats restored the development of the disease in a more efficient manner than CD8⁺ T cells. This is in accordance with the fact that depletion of CD8⁺ T cells has no impact on the development of rat SpA (May et al., 2003). More recently, Hoentjen and colleagues showed that transfer of mesenteric lymph node (MLN) cells, including lymphocytes, originating from B27 or NTG rats into athymic B27⁺ rats induces colitis in recipient rats (Hoentjen et al., 2006). These results highly suggest that activation of effector T cells by B27⁺ cells from the BM is a crucial mechanism in experimental SpA.

Taken together, these results demonstrate the crucial role of two populations: one or several cell types derived from a B27⁺ bone-marrow and CD4⁺ T cells (Table 1).

Table 1: Summary of cell transfer experiments performed in B27 rats

Donor cells	Receiver	Disease induction	Reference
Bone marrow from disease-prone B27 ⁺ rat	Lethally irradiated disease-resistant B27 ⁺ rat	Yes	(Breban et al., 1993)
Bone marrow from disease-resistant B27 ⁺ rat	Lethally irradiated disease-resistant B27 ⁺ rat	No	(Breban et al., 1993)
Bone marrow from NTG rat	Lethally irradiated disease-prone B27 ⁺ rat	Remission	(Breban et al., 1993)
Spleen from disease-prone B27 ⁺ rat	Sublethally irradiated disease-resistant B27 ⁺ rat	Very low penetrance	(Breban et al., 1993)
Spleen from disease-prone B27 ⁺ rat	Lethally irradiated disease-resistant B27 ⁺ rat	Yes	(Breban et al., 1993)
Fetal liver from disease-prone B27 ⁺ rat	Lethally irradiated NTG rat	Yes	(Breban et al., 1993)
T cells from disease-prone B27 ⁺ rat	Disease-prone B27 ⁺ nude rat	Yes	(Breban et al., 1996)
Mesenteric lymph nodes from NTG rat	Disease-prone B27 ⁺ nude rat	Yes	(Hoentjen et al., 2009)
Mesenteric lymph nodes from disease-prone B27 ⁺ rat	NTG nude rat	No	(Hoentjen et al., 2009)

It was then logical to speculate that the cells originating from the bone marrow responsible for the induction of SpA in B27 rats are the antigen-presenting cells (APCs) – i.e.

monocytes/macrophages, activated B cells or dendritic cells (DCs) - given their ability to stimulate T cell responses. Although the formal identification of the type of APC responsible for is still missing, we and others hypothesized that DCs are central in SpA induction because they are the most potent activators of CD4⁺ T cells and HLA-B27 expression leads to several altered DCs functions linked to the biased T cell response observed in B27 rats.

In rat, dendritic cells encompass three subpopulations. Two are the conventional dendritic cells expressing different levels of CD103, an α E integrin: CD103⁺CD4⁻CD172⁻ DC (cDC1) and CD103⁺CD4⁺CD172⁺ DC (cDC2). The third is rat plasmacytoid dendritic cells: CD103⁻CD4⁺CD172⁺ DC (Hubert et al., 2004). Although commonly found in the same area, such as organ lymphoid and non-lymphoid, conventional DCs can be distinguished by, morphology, markers and function.

Rat cDC1, the mouse homologous CD8 α ⁺ DC cell, were first described as a subpopulation present in small intestinal lamina propria, which carried epithelium-derived apoptotic bodies inside their cytoplasm. In contrast to cDC2, the cDC1 subpopulation expresses a chemokine receptor, XCR1, which mediates the migration of cDC1 following XCL1 ligand stimulation (Geyer et al., 2014). Expression of XCR1 defines this population as the rat homologous of blood CD141⁺ DC in humans (Bachem et al., 2010; Dutertre et al., 2014). Furthermore, TLR3 is the mainly present TLR (Hubert et al., 2006). This population has the profile of immature population. During this period, cDC1 can induce a caspase-independent cell death to another cell although they do not express NKp46 (Chauvin et al., 2008; Trinité et al., 2005).

Rat cDC2, which are equivalent to mouse resident CD4⁺CD11b⁺ DC cells, are present in T cell zone, represent around 20% of the spleen DC (Vremec et al., 2000) and display a longer *in vitro* lifespan compared to their counterparts, cDC1. They were first described in

small intestine lamina propria as a cell population exhibiting many small spiky processes and long pseudopodia. They also expressed a nonspecific esterase, CD11b/c, MHC class II, Thy-1, CD172 (Liu et al., 1998) and all described toll like receptor (TLR) except for TLR-3, -7, and -9 (Voisine et al., 2002) (Table 2). These DCs are responsible for a potent naive T cell priming, effective T cell activation (Liu et al., 1998) and stimulation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells proliferation (Voisine et al., 2002).

It had been shown that cDC1 can also cross-present to CD8⁺ T cells, like their human homologous.

Table 2: Conventional dendritic cells in humans and rats

	c DC1		c DC2	
	Human	Rat	Human	Rat
Markers	CD205, XCR1, CLEC9A, FLT3, CD162	CD205, CD11, CD103, ICAM-1, FLT3, XCR1, NKRP1	CD1c, CD172a, CD11b+/-, CD11c, FLT3	CD172a, CD4, CD5, CD90, CD11b/c, ICAM-1, FLT3
TLR	3, 10	3	1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10	1, 2, 4, 5, 6
Secreted cytokines	IL-12, IFN- β , CXCL10	IL-12, TNF- α	IL-1 α / β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-23, TNF- α , TGF- β , IFN- β	IL-1, IL-6, IL-23, TNF- α , TGF- β

Interactions between DC and T cells in SpA animal models

The first alteration observed in DCs from B27 rats (B27-DCs) was a defective capacity to stimulate T cell proliferation (Hacquard-Bouder et al., 2004). This defect was not linked to transgene overexpression given that HLA-B7 overexpressing DCs have a similar capacity to stimulate T cell proliferation than DCs from NTG rats. Moreover, this defect was not due to an underactivated state of B27-DCs because pre-activation of these DCs with LPS or interferon- γ (IFN- γ) was not able to reverse their failure to stimulate T cells. It is also not a consequence of chronic inflammation, since DCs from premorbid B27 transgenic rats and

DCs from B27 nude rats had the same defective capacity. Interestingly, B27-DCs form less conjugates with CD4⁺ T cells in comparison to NTG DCs. It was also shown that B27 DCs still have a decreased capacity to stimulate T cells in the presence of Concanavalin A or an anti-TCR α/β antibody. These results indicate that this defect is independent of TCR engagement but associated to costimulatory molecules expressed by DCs and T cells, as CD86 and CD2/CD4 respectively (Hacquard-Bouder et al., 2004, 2007). Interestingly, a strict correlation between DC functional defect and spondyloarthritis phenotypes was observed in several HLA-B27 transgenic lines (Fert et al., 2008). It is important to note that decreased ability to stimulate T cell proliferation is only observed with DCs from disease-prone transgenic rats carrying high HLA-B27 and h β 2m copy numbers, because DCs from disease-resistant rats carrying low HLA-B27 and h β 2m copy numbers induced near-normal proliferation of T cells in comparison to DCs from NTG rats. Several studies demonstrated other aberrant functions in HLA-B27- transgenic rat DCs (Table 3).

Table 3: Functional defects of conventional DCs in B27 rats

DC subtype	Functional defect	Reference
Whole CD103 ⁺ DCs	Up-regulation of proteins involved in protein processing and/or class I MHC peptide loading complex	(Dhaenens et al., 2009)
	Decreased class II MHC expression	
	Decreased expression of proteins involved in actin dynamics	
	Reduced motility	
	More activated phenotype (increased expression of CD25)	
CD4 ⁻ DC	Reduced viability <i>in vitro</i>	(Dhaenens et al., 2009)
	Reduced frequency among migrating intestinal lymph DCs	(Utriainen et al., 2012)
CD4 ⁺ DC	Increased susceptibility to MHC class II-induced apoptosis	(Dhaenens et al., 2009)

These results indicate a strong effect of HLA-B27 itself on the ability of DCs to communicate with CD4⁺ T cells and reinforce the idea of a central role of DCs in the induction of SpA in B27 rats. However, these functional defects do not highlight the precise mechanisms by which HLA-B27 induces rat SpA. To more thoroughly investigate such issue,

transcriptomic analysis comparing *ex vivo* purified CD103⁺CD4⁺ splenic DCs between B27 rats and control HLA-B7/NTG rats was done (Fert et al., 2014) because CD4⁺ splenic DCs are more potent activators of CD4⁺ T cells than CD4⁻ DCs (Voisine et al., 2002),

Transcriptomic analysis of B27 DCs

IFN signaling was the most significantly affected pathway in B27 rat DCs, with a majority of genes connected to IFN being under-expressed, as compared to controls. This pattern was already present at disease onset, persisted over time, and was conserved in two disease-prone B27 rat lines. In addition to this reverse IFN signature, an up-regulation of genes linked to ER stress (i.e., *Calr*, *Pdia3*, *Pdia4*, and *Pdia6*) was observed. Interestingly, it was found that in B27 rat DCs, found an upregulation of suppressor of cytokine signaling-3 that may account for reverse IFN signaling, The meta-analysis between rat conventional DCs and human monocyte-derived macrophages data revealed IFN-regulated genes that were negatively regulated both in human and rat SpA: *Irf1*, *Stat1*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Ifit3*, *Ddx60* and *Epsti1*.

On the other hand, it was observed a decreased expression of *Il10* and *Il27* mRNAs in B27 DCs. IL-10 is an anti-inflammatory cytokine which inhibits expression of proinflammatory cytokines and chemokines by T cells and decreased IL-10 expression by DCs could be important in SpA pathogenesis. Nevertheless, this hypothesis is challenged by the fact that recombinant IL-10 administration to B27 rats had no impact on disease expression despite decreased expression of inflammatory cytokines, as TNF- α and IFN- γ (Bertrand et al., 1998). Similarly to IL-10, IL-27 has broad anti-inflammatory properties, mainly by inducing IL-10 production by several CD4⁺ T cell subsets and by inhibiting the development of Th₁₇ cells (Iwasaki et al., 2015; Yoshida and Hunter, 2015). Importantly, IL-

IL-27 production by DCs is induced by IFN- γ , thus decreased IL-27 production observed in B27-DCs might be partly due to this reverse IFN signature. Decreased IL-27 and IL-10 productions could partially explain the expansion of Th₁₇ cells induced by B27 DCs. However, further investigations are needed to define the role of these expanded Th₁₇ cells by B27 DCs in the induction of SpA. Clinical efficacy of secukinumab (an anti-IL-17A antibody) in SpA (Baeten et al., 2013) corroborates the idea of a relevant role of IL-17 in pathogenesis of SpA.

DC and T cell subsets interactions

As highlighted above, HLA-B27 expression has a broad effect on the phenotype of dendritic cells and several studies have been conducted to decipher the effects of these altered DCs on the differentiation and the function of the other crucial cell type involved in rat SpA, CD4⁺ T cells.

DC and T cell differentiation

The critical role for T cells in the B27-transgenic rat model of SpA is well established (Breban et al., 1996). Furthermore, several lines of evidence strongly support a direct role for CD4⁺ T cells, whereas CD8⁺ T cells appear to be dispensable (May et al., 2003). The defective capacity of B27 DCs to stimulate the proliferation of T cells is also observed with naive T cells (Hacquard-Bouder et al., 2004). Paradoxically to this defective capacity, DCs from B27 rats induce an expansion of IL-17-producing cell from naive T cells (Utriainen et al., 2012). Moreover, B27 DCs influence the development of regulatory T cells by fostering the emergence of IL-17⁺ regulatory T cells from naive T cells cultured in Treg-polarizing

conditions (TGF- β followed by IL-2) despite no influence on the percentage of FoxP3⁺ T cells generated in these conditions (Araujo et al., 2014).

DC and Th₁₇ cells

An expansion of CD4⁺ T cells in the LNs draining the sites of inflammation in B27-transgenic rats was observed (Glatigny et al., 2012). Interestingly, the frequency of CD4⁺ T cells has also been shown to be increased in the peripheral blood of SpA patients (Shen et al., 2009). After characterization of cytokines produced by CD4⁺ T cells, we observed a preferential expansion of TNF- α and IL-17A-producing cells, which paralleled disease development, likely corresponding to Th₁₇ cells. Notably, this increase appeared later in the popliteal LNs than in the MLNs, parallel to the development of arthritis. Strikingly, B27 DCs (whole CD103⁺ DCs or DCs isolated by the method described by Knight et al. (Knight et al., 1983)) support this Th₁₇ expansion. Furthermore, this Th₁₇ induction by B27 DCs is contact dependent and involves the CD28/CD86 axis (Glatigny et al., 2012).

Another mechanism for dendritic cells to induce SpA could be production of IL-23 which is critical for the terminal differentiation of Th₁₇ cells (McGeachy et al., 2009). Several studies reveal an important role of IL-23 in the inflammation process. Importantly, mice overexpressing IL-23 by mini circle injection in the tail spontaneously develop enthesitis, a specific symptom of SpA, involving an unusual population of IL-23R⁺ CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻ T cells (Sherlock et al., 2012). Moreover, Delay et al. showed an increased expression of IL-23 in CD11b/c⁺ APCs (containing macrophages and DCs), correlated with increased expression of IL-17 by CD4⁺ T cells (DeLay et al., 2009). Furthermore, the SpA-like pathology observed in SKG mice - which have a muted ZAP70 protein - treated with curdlan is dependent on CD4⁺

T cells and on IL-23 (Ruutu et al., 2012). Altogether, these results indicate an important role of IL-17 and IL-23 in the development of SpA.

DC and regulatory T cells (Treg)

Given that Treg cells and Th₁₇ cells have been described as 2 distinct subsets with opposing effects on inflammatory disorders, one could hypothesize that the Th₁₇ cell bias observed in B27-transgenic rats could potentially result from a decreased frequency and/or a functional defect of Treg cells. To test this hypothesis, a comparative study the phenotype and function of Treg cells was performed in B27-transgenic rats and control rats. An accumulation of effector T cells (such as Th₁₇ profile) over Treg cells in mesenteric LNs from B27-transgenic rats occurred in parallel with disease development. This imbalance was not correlated with impaired Treg cell differentiation, suggesting that it might rather be attributable to an abnormal function of Treg cells. Despite this imbalanced Treg:Teff cell ratio, the *in vitro* suppressive activities of Treg cells were not compromised in these rats. However, we observed a decreased proportion of IL-10⁺ cells among FoxP3⁺ Treg cells from B27-transgenic rats, whereas no alteration of TGF- β expression was observed, suggesting that expansion of proinflammatory Th₁₇ cells in B27-transgenic rats could result from deficient IL-10 production by Treg cells in these animals. Moreover, the proportion of IL-17⁺ producing Treg cells was increased in B27- transgenic rats. Cocultures of polarizing or sorted Treg cells from B27-transgenic rats with magnetically sorted CD103⁺ splenic DCs from B27 or nontransgenic rat confirmed that imbalanced production of IL-10 and IL-17 by Treg cells from B27-transgenic rats depends on their interaction with APCs. Interestingly, the expression of ICOS, a marker of activation, was significantly increased in Treg cells from B27-transgenic rats compared with those from nontransgenic or B7-transgenic control rats. This result was paradoxical, because high levels of ICOS expression are considered to be

characteristic of a population of Treg cells with enhanced suppressive activity and IL-10 expression (Vocanson et al., 2010). However, it was recently shown a relevant role for ICOS signaling in the generation and maintenance of human Th₁₇ cells (Paulos et al., 2010).

To investigate whether the interaction between ICOS and ICOSL was directly implicated in the induction of imbalanced production of IL-10 and IL-17, the ICOS–ICOSL interaction was blocked using anti-ICOS monoclonal antibody during cocultures of B27-transgenic rat DCs with Treg cell–differentiating cells or with CD4⁺CD25⁻ cells. Blockade of ICOS-ICOSL pathway resulted in decreased IL-17 expression and increased IL-10 expression by differentiated Treg cells, thereby restoring the balance between the cytokines. This suggested that ICOS signaling may contribute to disease development in experimental SpA, particularly by facilitating the generation of abnormal IL-10/IL-17–producing Treg cells. In contrast, blockade of the ICOS–ICOSL interaction was unable to reverse the cytokine imbalance in *ex vivo*–sorted Treg cells, indicating that another pathway is presumably involved in driving the imbalance between IL-10 and IL-17 in differentiated Treg cells.

Additional theories of HLA-B27 pathogenesis

Other hypotheses were advanced to explain SpA pathogenesis, including misfolding of HLA-B27 which results in an unfolded protein response (UPR) (Turner et al., 2005) and recognition of HLA-B27 homodimers (B27₂) by killer cell immunoglobulin-like receptor 3DL2 (KIR3DL2) positive cells (Bowness, 2015). For the first hypothesis, upregulated HLA-B27 expression was correlated with increased UPR in macrophages of B27 rats (Turner et al., 2007) and this increased UPR was linked to IL-23 expression (DeLay et al., 2009). Further studies are required to determine if DCs also present increased IL-23 production in

response to UPR in B27 rats. For the second hypothesis, it was recently shown that the blockade of B27₂/KIR3DL2 interaction decreased expansion of pro-inflammatory CD4⁺ T cells in B27 rats (Belaunzaran et al., 2015).

SpA in animal models: Summary

Antigen-presenting cells, including DCs, and CD4⁺ T cells are crucial in the development of rat SpA as demonstrated by cell transfer experiments. These cells present several functional defects but further studies are needed to better understand how HLA-B27 induces arthritis and colitis in B27 rats. However, there is strong evidence for the leading role of the Th₁₇ axis, at least in part induced by DCs, in the development of this pathology (Figure 1).

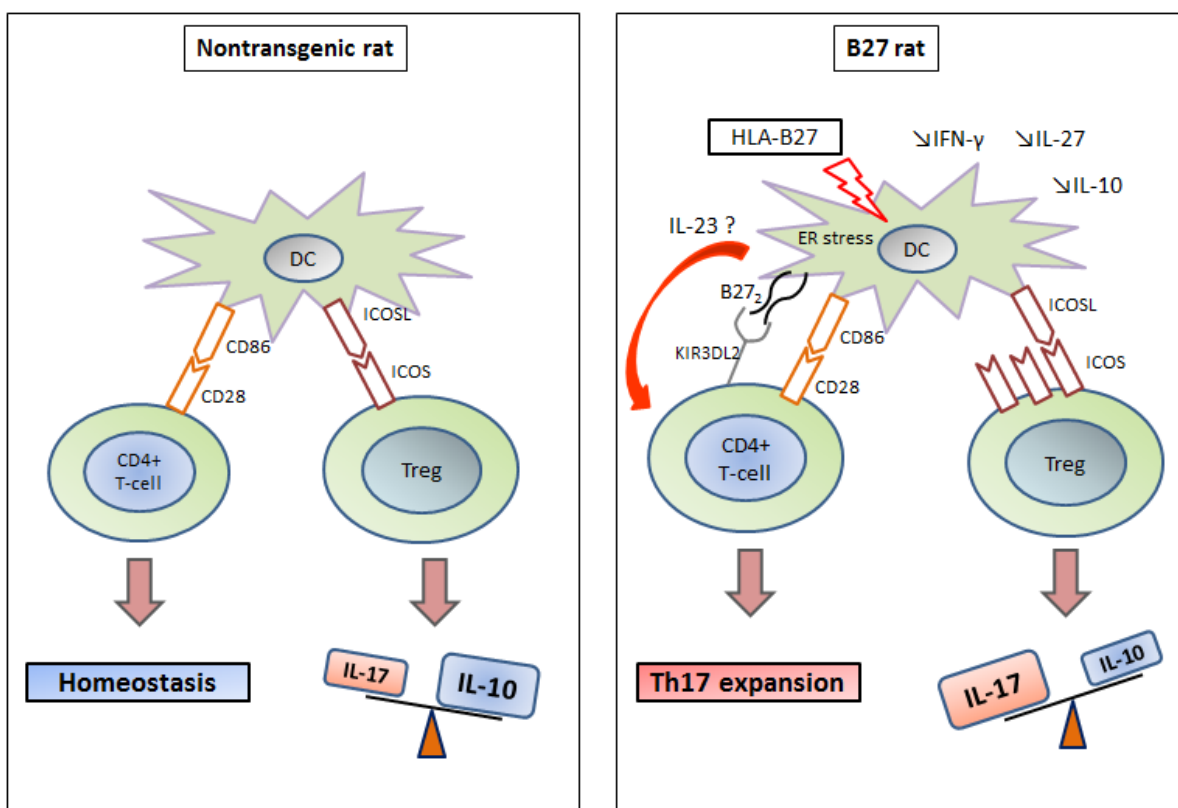


Figure 1: DCs and CD4⁺ T cells in rat SpA.

DCs from B27 rats display several functional defects. They have a “reverse” IFN signature and underexpress IL-27 and IL-10. The CD28/CD86 and ICOSL/ICOS axes are involved in Th₁₇ expansion and biased cytokine expression by regulatory T cells in B27 rats. Additionally, IL-23 production by dendritic cells may reinforce the development of IL-17⁺ CD4⁺ T cells. Interaction between HLA-B27 homodimers (B27₂) and KIR3DL₂ also induces Th₁₇ expansion. These events might participate to the establishment of chronic inflammation.

DCs and CD4⁺ T cells interactions in SpA patients

Despite the fact that B27 rats spontaneously present a phenotype closely resembling human SpA with a high penetrance (Vieira-Sousa et al., 2015), the mechanisms involved in the development of rat SpA may be slightly different from those involved in human spondyloarthritis. For example, around 70% of SpA patients are HLA-B27⁺ but 95% of HLA-B27⁺ people remain healthy (Reveille, 2011). However, there is a growing body of evidence supporting the role of DCs and Th₁₇ cells in the pathogenesis of human SpA. First, GWAS studies revealed an association between AS and several genes involved in the IL-23/Th₁₇ pathway, as *IL23R*, *IL12B*, *TYK2* and *STAT3* (Davidson et al., 2011; (igas), 2013; (tasc), 2010). Moreover, association of *IL27A* and *ICOSL* with SpA supports a role of IL-27 and ICOSL/ICOS pathway in humans, as in B27 rats. *PTGER4* is also associated with SpA and encodes a prostaglandin receptor able to induce IL-23 production by DCs (Ma et al., 2016).

IL-23 positive CD1a⁺ dendritic cells were detected in some facet joints of AS patients, in addition to other IL-23 positive cells as macrophages (Appel et al., 2013). Strikingly, the presence of infiltrating mononuclear cells with dendritic morphology expressing IL-23p19 was demonstrated within inflammatory lesions in the gut of AS patients (Ciccia et al., 2009). It was also shown that monocytes-derived DCs (MD-DCs) from AS patients produce IL-23 in response to TLR stimulation but without difference with MD-DCs from healthy controls (Prevosto et al., 2012). Of note, our team recently demonstrated that MD-DCs from axial SpA patients have a decreased capacity to stimulate allogeneic T cells (Talpin et al., 2014), similar to the functional default observed in DCs from B27 rats. These results suggest that dendritic cells might be involved in the development of Th₁₇ response in SpA patients, at least by IL-23 production.

The increased unfolded protein response observed in B27 rats was not confirmed in the gut of patients with AS (Ciccia et al., 2014). Instead of UPR, an increased expression of

IL23p19 in response to autophagy was observed. The authors also observed HLA-B27 misfolding which could be responsible for increased autophagy response in AS patients. Interestingly, interaction of B27 free heavy chains on APCs with KIR3DL2⁺ T cells was shown to induce proinflammatory T cell response in SpA patients by promoting Th₁₇ cell differentiation and IL-17 production (Ridley et al., 2016). Furthermore, an increased proportion of CD4⁺ T cells expressing KIR3DL2 was described in patients with SpA and these cells are enriched for the expression of IL-23R and IL-17 (Bowness et al., 2011). These results support the idea of an altered communication between DCs and CD4⁺ T cells in SpA patients. HLA-B27 might induce cellular stress in DCs and interact with KIR3DL2⁺ T cells. These events lead to increased IL-17 production by T cells and IL-17 will promote inflammation in cooperation with other proinflammatory cytokines as TNF- α . Of note, IL-17 production is not exclusively due to Th₁₇ cells but can also be linked to $\gamma\delta$ -T cells (Kenna et al., 2012) or type 3 innate lymphoid cells (Ciccia et al., 2015) in SpA.

Importantly, there is an increased proportion of circulating Th₁₇ cells in patients with AS in comparison to healthy controls and AS patients treated with TNF- α inhibitors (Limón-Camacho et al., 2012). About the percentage of circulating Treg in SpA patients, conflicting results exist. Appel and colleagues showed no difference between patients with SpA and healthy controls in blood (Appel et al., 2011), in contrast to other studies which observed decreased proportions of circulating Treg in patients with AS (Wu et al., 2011; Xueyi et al., 2012). However, an increased proportion of Tregs was observed in the synovial fluid (Cao et al., 2004) and in the intestine of patients with SpA (Ciccia et al., 2010), suggesting a recruitment from the blood to inflamed organs. Tregs from patients with SpA were able to inhibit proliferation of effector T cells but it could be insufficient to fully control inflammation in SpA patients.

Conclusion

Dysregulated T cell response is central in SpA pathogenesis as revealed by the efficacy of anti-TNF- α and anti-IL-17 therapies. Dendritic cells play a critical role in controlling the immune response and present several altered functions in B27 rats and patients with SpA. Their communication with CD4⁺ T cells is altered and they induce a biased expansion of proinflammatory Th₁₇ cells by impaired costimulatory signaling and probably by IL-23 production. The involvement of costimulatory molecules as ICOS was not confirmed in patients with SpA and need further investigations. Unraveling the precise mechanisms by which DCs favor inflammation in SpA may lead to the development of novel targeted therapies in SpA.

References

- Appel, H., Wu, P., Scheer, R., Kedor, C., Sawitzki, B., Thiel, A., Radbruch, A., Sieper, J., and Syrbe, U. (2011). Synovial and peripheral blood CD4+FoxP3+ T cells in spondyloarthritis. *J. Rheumatol.* *38*, 2445–2451.
- Appel, H., Maier, R., Bleil, J., Hempfing, A., Loddenkemper, C., Schlichting, U., Syrbe, U., and Sieper, J. (2013). In Situ Analysis of Interleukin–23– and Interleukin-12–Positive Cells in the Spine of Patients With Ankylosing Spondylitis. *Arthritis Rheum.* *65*, 1522–1529.
- Araujo, L.M., Fert, I., Jouhault, Q., Labroquère, K., Andrieu, M., Chiocchia, G., and Breban, M. (2014). Increased Production of Interleukin-17 Over Interleukin-10 by Treg Cells Implicates Inducible Costimulator Molecule in Experimental Spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol.* *66*, 2412–2422.
- Bachem, A., Güttler, S., Hartung, E., Ebstein, F., Schaefer, M., Tannert, A., Salama, A., Movassaghi, K., Opitz, C., Mages, H.W., et al. (2010). Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* *207*, 1273–1281.
- Baeten, D., Baraliakos, X., Braun, J., Sieper, J., Emery, P., van der Heijde, D., McInnes, I., van Laar, J.M., Landewé, R., Wordsworth, P., et al. (2013). Anti-interleukin-17A monoclonal antibody secukinumab in treatment of ankylosing spondylitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet* *382*, 1705–1713.
- Belaunzaran, O.M., Kleber, S., Schauer, S., Hausmann, M., Nicholls, F., Broek, M.V. den, Payeli, S., Ciurea, A., Milling, S., Stenner, F., et al. (2015). HLA-B27-Homodimer-Specific Antibody Modulates the Expansion of Pro-Inflammatory T-Cells in HLA-B27 Transgenic Rats. *PLOS ONE* *10*, e0130811.
- Bertrand, V., Quéré, S., Guimbaud, R., Sogni, P., Chauvelot-Moachon, L., Tulliez, M., Lamarque, D., Charreire, J., Giroud, J.P., Couturier, D., et al. (1998). Effects of murine recombinant interleukin-10 on the inflammatory disease of rats transgenic for HLA-B27 and human 2-microglobulin. *Eur. Cytokine Netw.* *9*, 161–170.
- Bowness, P. (2015). Hla-B27. *Annu. Rev. Immunol.* *33*, 29–48.
- Bowness, P., Ridley, A., Shaw, J., Chan, A.T., Wong-Baeza, I., Fleming, M., Cummings, F., McMichael, A., and Kollnberger, S. (2011). Th17 Cells Expressing KIR3DL2+ and Responsive to HLA-B27 Homodimers Are Increased in Ankylosing Spondylitis. *J. Immunol.* *186*, 2672–2680.
- Breban, M., Hammer, R.E., Richardson, J.A., and Taurog, J.D. (1993). Transfer of the inflammatory disease of HLA-B27 transgenic rats by bone marrow engraftment. *J. Exp. Med.* *178*, 1607–1616.
- Breban, M., Fernández-Sueiro, J.L., Richardson, J.A., Hadavand, R.R., Maika, S.D., Hammer, R.E., and Taurog, J.D. (1996). T cells, but not thymic exposure to HLA-B27, are required for the inflammatory disease of HLA-B27 transgenic rats. *J. Immunol.* *156*, 794–803.
- Breban, M., Hacquard-Bouder, C., and Falgarone, G. (2004). Animal models of HLA-B27-associated diseases. *Curr. Mol. Med.* *4*, 31–40.
- Cao, D., Vollenhoven, R. van, Klareskog, L., Trollmo, C., and Malmström, V. (2004). CD25brightCD4+ regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease. *Arthritis Res. Ther.* *6*, R335–R346.
- Chauvin, C., Philippeau, J.-M., Hémond, C., Hubert, F.-X., Wittrant, Y., Lamoureux, F., Trinité, B., Heymann, D., Rédini, F., and Josien, R. (2008). Killer dendritic cells link innate and adaptive immunity against established osteosarcoma in rats. *Cancer Res.* *68*, 9433–9440.

- Ciccia, F., Bombardieri, M., Principato, A., Giardina, A., Tripodo, C., Porcasi, R., Peralta, S., Franco, V., Giardina, E., Craxi, A., et al. (2009). Overexpression of interleukin-23, but not interleukin-17, as an immunologic signature of subclinical intestinal inflammation in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* *60*, 955–965.
- Ciccia, F., Accardo-Palumbo, A., Giardina, A., Di Maggio, P., Principato, A., Bombardieri, M., Rizzo, A., Alessandro, R., Ferrante, A., Principe, S., et al. (2010). Expansion of intestinal CD4+CD25high Treg cells in patients with ankylosing spondylitis: A putative role for interleukin-10 in preventing intestinal Th17 response. *Arthritis Rheum.* *62*, 3625–3634.
- Ciccia, F., Accardo-Palumbo, A., Rizzo, A., Guggino, G., Raimondo, S., Giardina, A., Cannizzaro, A., Colbert, R.A., Alessandro, R., and Triolo, G. (2014). Evidence that autophagy, but not the unfolded protein response, regulates the expression of IL-23 in the gut of patients with ankylosing spondylitis and subclinical gut inflammation. *Ann. Rheum. Dis.* *73*, 1566–1574.
- Ciccia, F., Guggino, G., Rizzo, A., Saieva, L., Peralta, S., Giardina, A., Cannizzaro, A., Sireci, G., Leo, G.D., Alessandro, R., et al. (2015). Type 3 innate lymphoid cells producing IL-17 and IL-22 are expanded in the gut, in the peripheral blood, synovial fluid and bone marrow of patients with ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* *74*, 1739–1747.
- Cortes, A., Pulit, S.L., Leo, P.J., Pointon, J.J., Robinson, P.C., Weisman, M.H., Ward, M., Gensler, L.S., Zhou, X., Garchon, H.-J., et al. (2015). Major histocompatibility complex associations of ankylosing spondylitis are complex and involve further epistasis with ERAP1. *Nat. Commun.* *6*, 7146.
- Costantino, F., Talpin, A., Said-Nahal, R., Goldberg, M., Henny, J., Chiocchia, 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. *Arthritis Rheumatol.* *Hoboken NJ* *67*, 1525–1534.
- Davidson, S.I., Liu, Y., Danoy, P.A., Wu, X., Thomas, G.P., Jiang, L., Sun, L., Wang, N., Han, J., Han, H., et al. (2011). Association of STAT3 and TNFRSF1A with ankylosing spondylitis in Han Chinese. *Ann. Rheum. Dis.* *70*, 289–292.
- 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.
- Dutertre, C.-A., Wang, L.-F., and Ginhoux, F. (2014). Aligning bona fide dendritic cell populations across species. *Cell. Immunol.* *291*, 3–10.
- Fert, I., Glatigny, S., Poulain, C., Satumtira, N., Dorris, M.L., Taurog, J.D., and Breban, M. (2008). Correlation between dendritic cell functional defect and spondylarthritis phenotypes in HLA-B27/HUMAN β 2-microglobulin-transgenic rat lines. *Arthritis Rheum.* *58*, 3425–3429.
- Fert, I., Cagnard, N., Glatigny, S., Letourneur, F., Jacques, S., Smith, J.A., Colbert, R.A., Taurog, J.D., Chiocchia, G., Araujo, L.M., et al. (2014). Reverse Interferon Signature Is Characteristic of Antigen-Presenting Cells in Human and Rat Spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol.* *66*, 841–851.
- Geyer, H., Hartung, E., Mages, H.W., Weise, C., Belužić, R., Vugrek, O., Jonjic, S., Kroczeck, R.A., and Voigt, S. (2014). Cytomegalovirus expresses the chemokine homologue vXCL1 capable of attracting XCR1+ CD4- dendritic cells. *J. Virol.* *88*, 292–302.

- Glatigny, S., Fert, I., Blaton, M.A., Lories, R.J., Araujo, L.M., Chiocchia, 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.
- Hacquard-Bouder, C., Falgarone, G., Bosquet, A., Smaoui, F., Monnet, D., Ittah, M., and Breban, M. (2004). Defective costimulatory function is a striking feature of antigen-presenting cells in an HLA-B27-transgenic rat model of spondylarthropathy. *Arthritis Rheum.* *50*, 1624–1635.
- Hacquard-Bouder, C., Chimenti, M.-S., Giquel, B., Donnadieu, E., Fert, I., Schmitt, A., André, C., and Breban, M. (2007). Alteration of antigen-independent immunologic synapse formation between dendritic cells from HLA-B27-transgenic rats and CD4+ T cells: Selective impairment of costimulatory molecule engagement by mature HLA-B27. *Arthritis Rheum.* *56*, 1478–1489.
- Hoentjen, F., Tonkonogy, S.L., Liu, B., Sartor, R.B., Taurog, J.D., and Dieleman, L.A. (2006). Adoptive transfer of nontransgenic mesenteric lymph node cells induces colitis in athymic HLA-B27 transgenic nude rats. *Clin. Exp. Immunol.* *143*, 474–483.
- Hubert, F.-X., Voisine, C., Louvet, C., Heslan, M., and Josien, R. (2004). Rat plasmacytoid dendritic cells are an abundant subset of MHC class II+ CD4+CD11b-OX62- and type I IFN-producing cells that exhibit selective expression of Toll-like receptors 7 and 9 and strong responsiveness to CpG. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 7485–7494.
- Hubert, F.-X., Voisine, C., Louvet, C., Heslan, J.-M., Ouabed, A., Heslan, M., and Josien, R. (2006). Differential pattern recognition receptor expression but stereotyped responsiveness in rat spleen dendritic cell subsets. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 1007–1016.
- (igas), I.G. of A.S.C. (2013). Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nat. Genet.* *45*, 730–738.
- Iwasaki, Y., Fujio, K., Okamura, T., and Yamamoto, K. (2015). Interleukin-27 in T Cell Immunity. *Int. J. Mol. Sci.* *16*, 2851–2863.
- Kenna, T.J., Davidson, S.I., Duan, R., Bradbury, L.A., McFarlane, J., Smith, M., Weedon, H., Street, S., Thomas, R., Thomas, G.P., et al. (2012). Enrichment of circulating interleukin-17-secreting interleukin-23 receptor-positive γ/δ T cells in patients with active ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* *64*, 1420–1429.
- Knight, S.C., Mertin, J., Stackpoole, A., and Clark, J. (1983). Induction of immune responses in vivo with small numbers of veiled (dendritic) cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *80*, 6032–6035.
- Limón-Camacho, L., Vargas-Rojas, M.I., Vázquez-Mellado, J., Casasola-Vargas, J., Moctezuma, J.F., Burgos-Vargas, R., and Llorente, L. (2012). In vivo peripheral blood proinflammatory T cells in patients with ankylosing spondylitis. *J. Rheumatol.* *39*, 830–835.
- Liu, L., Zhang, M., Jenkins, C., and MacPherson, G.G. (1998). Dendritic Cell Heterogeneity In Vivo: Two Functionally Different Dendritic Cell Populations in Rat Intestinal Lymph Can Be Distinguished by CD4 Expression. *J. Immunol.* *161*, 1146–1155.
- Ma, X., Aoki, T., and Narumiya, S. (2016). Prostaglandin E2-EP4 signaling persistently amplifies CD40-mediated induction of IL-23 p19 expression through canonical and non-canonical NF- κ B pathways. *Cell. Mol. Immunol.* *13*, 240–250.
- May, E., Dorris, M.L., Satumtira, N., Iqbal, I., Rehman, M.I., Lightfoot, E., and Taurog, J.D. (2003). CD8 $\alpha\beta$ T Cells Are Not Essential to the Pathogenesis of Arthritis or Colitis in HLA-B27 Transgenic Rats. *J. Immunol.* *170*, 1099–1105.

- 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 Behcet disease. *Nat. Rev. Rheumatol.* *11*, 731–740.
- Paulos, C.M., Carpenito, C., Plesa, G., Suhoski, M.M., Varela-Rohena, A., Golovina, T.N., Carroll, R.G., Riley, J.L., and June, C.H. (2010). The inducible costimulator (ICOS) is critical for the development of human T(H)17 cells. *Sci. Transl. Med.* *2*, 55ra78.
- Prevosto, C., Goodall, J.C., and Hill Gaston, J.S. (2012). Cytokine secretion by pathogen recognition receptor-stimulated dendritic cells in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *J. Rheumatol.* *39*, 1918–1928.
- Reveille, J.D. (2011). The genetic basis of spondyloarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *70*, i44–i50.
- Ridley, A., Hatano, H., Wong-Baeza, I., Shaw, J., Matthews, K.K., Al-Mossawi, H., Ladell, K., Price, D.A., Bowness, P., and Kollnberger, S. (2016). Activation-Induced Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor 3DL2 Binding to HLA–B27 Licenses Pathogenic T Cell Differentiation in Spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol.* *68*, 901–914.
- Rudwaleit, M., van der Heijde, D., Landewé, R., Listing, J., Akkoc, N., Brandt, J., Braun, J., Chou, C.T., Collantes-Estevez, E., Dougados, M., et al. (2009). The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. *Ann. Rheum. Dis.* *68*, 777–783.
- Rudwaleit, M., van der Heijde, D., Landewé, R., Akkoc, N., Brandt, J., Chou, C.T., Dougados, M., Huang, F., Gu, J., Kirazli, Y., et al. (2011). The Assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general. *Ann. Rheum. Dis.* *70*, 25–31.
- Ruutu, M., Thomas, G., Steck, R., Degli-Esposti, M.A., Zinkernagel, M.S., Alexander, K., Velasco, J., Strutton, G., Tran, A., Benham, H., et al. (2012). β -glucan triggers spondylarthritis and Crohn's disease–like ileitis in SKG mice. *Arthritis Rheum.* *64*, 2211–2222.
- 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- γ t+ CD3+CD4-CD8- enthesal resident T cells. *Nat. Med.* *18*, 1069–1076.
- Talpin, A., Costantino, F., Bonilla, N., Leboime, A., Letourneur, F., Jacques, S., Dumont, F., Amraoui, S., Dutertre, C.-A., Garchon, H.-J., et al. (2014). Monocyte-derived dendritic cells from HLA-B27+ axial spondyloarthritis (SpA) patients display altered functional capacity and deregulated gene expression. *Arthritis Res. Ther.* *16*.
- (tasc), T.A.-A.-A.S.C. (2010). Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci. *Nat. Genet.* *42*, 123–127.
- Taurog, J.D., Richardson, J.A., Croft, J.T., Simmons, W.A., Zhou, M., Fernández-Sueiro, J.L., Balish, E., and Hammer, R.E. (1994). The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J. Exp. Med.* *180*, 2359–2364.

- Trinité, B., Chauvin, C., Pêche, H., Voisine, C., Heslan, M., and Josien, R. (2005). Immature CD4-CD103+ rat dendritic cells induce rapid caspase-independent apoptosis-like cell death in various tumor and nontumor cells and phagocytose their victims. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *175*, 2408–2417.
- Turner, M.J., Sowders, D.P., DeLay, M.L., Mohapatra, R., Bai, S., Smith, J.A., Brandewie, J.R., Taurog, J.D., and Colbert, R.A. (2005). HLA-B27 Misfolding in Transgenic Rats Is Associated with Activation of the Unfolded Protein Response. *J. Immunol.* *175*, 2438–2448.
- Turner, M.J., DeLay, M.L., Bai, S., Klenk, E., and Colbert, R.A. (2007). HLA-B27 up-regulation causes accumulation of misfolded heavy chains and correlates with the magnitude of the unfolded protein response in transgenic rats: Implications for the pathogenesis of spondylarthritis-like disease. *Arthritis Rheum.* *56*, 215–223.
- Utriainen, L., Firmin, D., Wright, P., Cerovic, V., Breban, M., McInnes, I., and Milling, S. (2012). Expression of HLA-B27 causes loss of migratory dendritic cells in a rat model of spondylarthritis. *Arthritis Rheum.* *64*, 3199–3209.
- Vieira-Sousa, E., van Duivenvoorde, L.M., Fonseca, J.E., Lories, R.J., and Baeten, D.L. (2015). Review: Animal Models as a Tool to Dissect Pivotal Pathways Driving Spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol.* *67*, 2813–2827.
- Vocanson, M., Rozieres, A., Hennino, A., Poyet, G., Gaillard, V., Renaudineau, S., Achachi, A., Benetiere, J., Kaiserlian, D., Dubois, B., et al. (2010). Inducible costimulator (ICOS) is a marker for highly suppressive antigen-specific T cells sharing features of TH17/TH1 and regulatory T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* *126*, 280–289, 289-7.
- Voisine, C., Hubert, F.-X., Trinité, B., Heslan, M., and Josien, R. (2002). Two Phenotypically Distinct Subsets of Spleen Dendritic Cells in Rats Exhibit Different Cytokine Production and T Cell Stimulatory Activity. *J. Immunol.* *169*, 2284–2291.
- Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L., and Shortman, K. (2000). CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *164*, 2978–2986.
- Wu, Y., Ren, M., Yang, R., Liang, X., Ma, Y., Tang, Y., Huang, L., Ye, J., Chen, K., Wang, P., et al. (2011). Reduced immunomodulation potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells induced CCR4+CCR6+ Th/Treg cell subset imbalance in ankylosing spondylitis. *Arthritis Res. Ther.* *13*, R29.
- Xueyi, L., Lina, C., Zhenbiao, W., Qing, H., Qiang, L., and Zhu, P. (2012). Levels of Circulating Th17 Cells and Regulatory T Cells in Ankylosing Spondylitis Patients with an Inadequate Response to Anti-TNF- α Therapy. *J. Clin. Immunol.* *33*, 151–161.
- Yoshida, H., and Hunter, C.A. (2015). The Immunobiology of Interleukin-27. *Annu. Rev. Immunol.* *33*, 417–443.