



HAL
open science

Rôle de l'interleukine-33 dans des modèles expérimentaux d'inflammation chronique

Sara Khaleghparast Athari

► **To cite this version:**

Sara Khaleghparast Athari. Rôle de l'interleukine-33 dans des modèles expérimentaux d'inflammation chronique. Biologie cellulaire. Université Sorbonne Paris Cité, 2015. Français. NNT : 2015US-PCD063 . tel-01686637

HAL Id: tel-01686637

<https://theses.hal.science/tel-01686637>

Submitted on 17 Jan 2018

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.

UNIVERSITÉ PARIS 13-SORBONNE PARIS CITÉ

UFR SANTÉ-MÉDECINE-BIOLOGIE HUMAINE

Année 2015

THÈSE

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS 13

Discipline : Biologie

Rôle de l'interleukine-33 dans des modèles expérimentaux d'inflammation chronique

Présentée par

Sara Khaleghparast Athari

Soutenue publiquement le 17 novembre 2015

Jury

Pr Hubert Marotte (Université de Saint-Etienne)	Rapporteur
Pr Jean-François Zagury (CNAM, Paris)	Rapporteur
Pr Gérard Perret (Université Paris 13)	Examineur
Pr Natacha Bessis (Université Paris 13)	Directeur

L'éducation est l'arme la plus puissante qu'on puisse utiliser pour changer le monde.

Nelson Mandela

A mes parents, mon frère et mon grand-père

Avec toute ma reconnaissance

REMERCIEMENTS

At the beginning, I would like to mention that accomplishment of this Ph.D was not achievable without the generous support and assistance of a large number of people whose knowledge, dedication, confidence, and responsibility always inspired me to continue this path.

As such, I would like to express my gratitude to **Prof. Jean-François Zagury** and **Prof. Hubert Marotte** for accepting to be reporters of my Ph.D work and for the time they spent to evaluate it. I also thank **Prof. Gerard Perret** who has honoured me by accepting to be examiner of my thesis.

I would also acknowledge **Prof. Marie Christophe Boissier**, director of research laboratory, UMR 1125, for welcoming me as a master and then Ph.D student in his laboratory. I would appreciate the invaluable advices given to me by Prof Marie Christophe Boissier throughout my thesis that have helped me to progress in this work.

I particularly would like to mention my regard and gratitude to my supervisor, **Prof. Natacha Bessis**, whose expertise and comprehensive knowledge added a significant value to my experience in this lab. I appreciate also your effort for review and correction of this manuscript.

My special thanks go to **Prof. F  r  dric Caux**, for his excellent idea which led us to develop our project on psoriasis and made a memorable cooperation with him and his student. Thank you, Mr Caux for your contribution and the time you spent to discuss about psoriasis and IL-33. I appreciate your encouragement, patience, and flexibility that made a good experience.

I thank **Prof. Heiko G. R  del** and his Ph.D student, **Maryline** for a memorable collaboration in an interesting project, social stress effect on immunity. Thank you for trusting me, for the advice you gave to me, and for your availability whenever I needed.

A warm thanks to our laboratory engineers, **Delphine** and **Roxane** for their technical assistance and support. Delphine, I appreciate your punctuality, accuracy, and attention to details particularly on difficult experiments. Your vast technical knowledge especially in flow cytometry was always a great assistance to my project. Roxane, thanks for your time, patience and continued help during these years.

I would also like to thank my kind colleagues at UMR 1125: **Anne Denys** for her helpful advices, **J  r  me Biton** for his preliminary results and his contribution throughout this work that allowed me to progress and **Nadia**.

A special thanks to **Aur  lie**, our previous Master student for her kind assistance and her good humour.

I would like to mention my thanks to **Eric Assier** for his points on scientific and non-scientific subjects. Thank you, Eric for your kindness, understanding and readiness to answer my “morning” questions and correcting me in French as my second language. I never forget your helps and encouragement.

I am thankful to **Hanna Hlawaty** for her helpful scientific and non-scientific advices, and for the conversations that we have always had together during the laboratory courses. I never forget your advices, helps, encouragement and most importantly your readiness to hearing me.

I would like to thank **Matthieu** for helping me to improve my French, for his knowledge in informatics and for helping me to prepare this manuscript.

My warm gratitude to our young dermatologist, **Elodie**, for her effective assistance, particularly in histology part of psoriasis project. Thank you for exchanging the information, and for your contribution to this project.

I am thankful to our colleagues in Animal Facility, **Stephane, Sonia** and **Samira** for their help, responsibility and contribution.

I would like to thank the kind friends that I met in lab:

Laure, my friend, if this manuscript is well written (I hope) this is due to your help, otherwise it was so hard for me to write a manuscript in a language which is not my mother tongue. I am very grateful for the time that you spent to review and correct the manuscript. Thanks for your kindness, understanding, support and availability. Whenever I needed, you were always ready to listen to me. I always value and remember the good time we have had together.

Benjamin (joon), who as a good friend was always ready to help and give his best advices to me during these years. Many thanks for your support, kindness, sense of humor and for the memorable times that we shared. I wish you a good luck for your thesis in the year ahead.

Kasia, thanks for your positive thoughts, well-wishes/prayers, phone calls, texts, visits (especially with the delicious polish chocolates). Thanks for being there whenever I needed you. I wish you a good luck for the last year of your thesis.

To my friends:

Nathalie, thank you for listening to me, giving helpful advices, and supporting me through this journey from Master1 to the end of my PhD. Thank you for all good times that we spent together in Besançon and then in Paris and for all conversations we have had. Finally, thank you for your unique Quebec pine nuts.

Masi, It doesn't matter where we are in this world (in Iran or France) I know that I have always your support and encouragement and for that I thank you.

A special thanks to my lovely cousin **Shima** for her endless encouragement, moral and emotional supports from the beginning of this journey during all these years in France.

My deepest thanks go to **Antoine** for his continued moral support throughout this experience. I would never have made it without your support.

A special thanks to my family. Words cannot express how grateful I am to have a lovely Mother, **Fati** and a good Father, **Kioumars**, for their unconditional love and all sacrifices they have made for me. Thanks for your sophisticated supports from beginning of my master until now, that

helped me to follow my dreams. You inspired and motivated me to finish my degree. I LOVE YOU.

I am thankful to my unique beloved brother, **Amir**, for his support from the beginning of this journey. I cannot describe how lucky I am to have you in my life. Thank you for helping me in some important stages of my life, especially during the years of PhD.

I finish this manuscript by thinking of my grandpa, **Ali** (Baba Bozorgi), who taught me how to love and respect others. Thanks for your love and nice memories you created for us.

SOMMAIRE

SOMMAIRE DES FIGURES	11
ABREVIATIONS	13
INTRODUCTION	19
1. L'inflammation chronique	20
1.1 La polyarthrite rhumatoïde.....	20
1.1.1 Présentation	20
- Historique.....	20
- Epidémiologie.....	20
- Aspects cliniques	21
- Diagnostic et évolution	21
- Etiologie	22
1.1.2 Immunopathologie de la PR.....	26
- Acteurs cellulaires	27
- Rôle des cytokines dans la PR.....	31
1.1.3 Les traitements de la PR.....	36
- Les traitements de fond.....	36
- Les traitements ciblés	36
1.1.4 Les modèles expérimentaux de la PR.....	39
- L'arthrite expérimentale au collagène (AEC).....	39
- L'arthrite de la souris transgénique pour le TNF- α humain.....	39
- Le modèle de KBxN	40
1.2 Le psoriasis.....	41
1.2.1 Présentation	41
- Epidémiologie.....	41
- Aspects cliniques	41
- Etiologie	41
1.2.2 Immunopathologie du psoriasis	42
- Les médiateurs cellulaires.....	42
- Les médiateurs cytokiniques	45

1.2.3 Les modèles expérimentaux de psoriasis.....	48
- Modèle de psoriasis induit par xénogreffe chez les souris SCID	48
- Psoriasis de souris transgénique STAT-3.....	48
- Psoriasis induit par l'imiquimod (IMQ).....	48
2. Les lymphocytes T régulateurs.....	49
2.1 Présentation	49
2.2 Les LT régulateurs Foxp3 ⁻	49
2.2.1 Les Tr1	49
2.2.2 Les Th3	49
2.2.3 Les iTreg35	50
2.3 Les LT régulateurs Foxp3 ⁺	50
2.3.1 Les marquages des Tregs	50
2.3.2 Distribution tissulaire des Tregs.....	51
2.3.3 La migration des Tregs	51
2.4 Développement des Tregs.....	52
2.4.1 Développement des nTregs.....	52
2.4.2 Développement des iTregs.....	53
2.5 Activité suppressive des Tregs	53
2.5.1 Modulation de la fonction des cellules dendritiques	53
2.5.2 Sécrétion des cytokines.....	54
2.5.3 Perturbation du métabolisme.....	56
2.5.4 Induction de la cytolyse	56
2.6 Rôle physiopathologique des lymphocytes T régulateurs.....	59
2.6.1 Les maladies auto-immunes	59
- Sclérose en plaques (SEP)	59
- Diabète de type 1	59
- Maladies inflammatoires de l'intestin	60
2.6.2 Psoriasis.....	60
2.6.3 Cancer	61
2.6.4 Graft versus host disease (GVHD).....	61
2.7 Lymphocytes T régulateurs et immunothérapie	62
3. L'interleukine-33 (IL-33)	63

3.1 Présentation	63
- Historique.....	63
- Structure et localisation	63
3.2 Expression de l'IL 33	64
3.2.1 Distribution cellulaire et tissulaire.....	64
3.2.2 Régulation de l'expression de l'IL-33	65
- Reconnaissance des signaux de danger exogènes (PAMPs).....	66
- Induction de l'expression de l'IL-33 par des cytokines pro-inflammatoires	66
- Induction de l'expression de l'IL-33 par le stress cellulaire.....	66
3.2.3 Mécanismes de libération de l'IL-33	67
- Libération par les cellules apoptotiques.....	67
- Libération par les cellules nécrotiques	67
3.3 Récepteur de l'IL-33.....	70
3.3.1 La famille des récepteurs TLR/IL-1(Toll-like/IL-1)	70
3.3.2 ST2 : le récepteur de l'IL-33	71
3.3.3 Les corécepteurs.....	71
3.3.4 Signalisation de l'IL-33 via ST2L	73
3.4 Rôle de l'IL-33.....	75
3.4.1 Rôle de l'IL-33 nucléaire.....	75
3.4.2 Rôle de l'IL-33 libérée	75
- Immunité innée.....	75
- Immunité adaptative	78
- Cellules non hématopoïétiques.....	81
3.5 Implication physiopathologique de l'IL-33	83
3.5.1 Cancer	83
3.5.2 Inflammation allergique.....	84
- Asthme.....	84
- Rhinite allergique	86
- Allergie cutanée	87
3.5.3 Psoriasis.....	87
3.5.4 Maladies auto-immunes.....	88
- Maladies inflammatoires de l'intestin	88
- Diabète	88

- Sclérose en plaques	89
- Polyarthrite rhumatoïde	90
OBJECTIFS	91
RESULTATS	93
I ARTICLE n°1	94
II ARTICLE n°2	134
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	157
1. Effet thérapeutique de l'IL-33 dans l'arthrite	158
1.1 L'IL-33 induit une réponse de type 2 dans l'AEC.....	159
1.2 Rôle des Tregs dans l'effet thérapeutique de l'IL-33.....	162
1.3 L'axe IL-33/ST2 comme cible thérapeutique.....	167
2. L'effet de l'IL-33 endogène dans l'inflammation chronique	168
2.1 L'IL-33 endogène n'est pas cruciale pour le développement de l'inflammation chronique.....	168
2.2 L'absence d'IL-33 ne modifie pas les réponses des sous populations de LT	169
2.3 Activité ostéoclastogénique accrue en absence de l'IL-33.....	170
CONCLUSION	172
BIBLIOGRAPHIE	174
ANNEXE	201
III ARTICLE n°3	202
RESULTATS	204
DISCUSSION	212
RÉFÉRENCE	216

SOMMAIRE DES FIGURES

Figure 1: Mécanismes immunopathologiques de la PR	27
Figure 2: Interactions entre cytokines et cellules impliquées dans la physiopathologie du psoriasis	47
Figure 3: Fonction d'immunorégulation des Tregs suppressives via quatre mécanismes	58
Figure 4: Organisation de la séquence de la protéine IL-33 humaine et murine	64
Figure 5: Expression cellulaire et tissulaire des ARNm de l'IL-33 humaine et murine..	65
Figure 6: Site de clivage des caspases sur l'IL-33 humaine et murine..	67
Figure 7 : Sites de clivage des protéases inflammatoires sur l'IL-33 humaine.....	69
Figure 8: Superfamille du récepteur l'IL-1.	70
Figure 9: Formation du complexe trimérique composé de ST2 lié à son ligand IL-33 et IL-1RAcP.....	72
Figure 10 : Mécanismes de la voie de signalisation de l'IL-33/ST2L.	74
Figure 11: Mode d'action de l'IL-33 sur les cellules B1.....	80
Figure 12: Rôle de l'IL-33 sur les cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques.	82
Figure 13 : Rôle de l'IL-33 dans l'asthme.....	85
Figure 14: Représentation schématique de la contribution de l'IL-33 dans la polarisation d'AAM et l'inflammation des voies aériennes	86
Figure 15: CD39 et CD73 sont impliqués dans l'activité suppressive des Tregs	165

ABREVIATIONS

AAM	Alternatively activated macrophages
ACPA	Anti-citrullinated protein/peptide antibodies
ACR	American congress of rheumatology
AD	Atopic dermatitis
ADN	Acide désoxyribonucléique (Deoxyribonucleic acid)
ADP	Adenosine diphosphate
AEC	Arthrite expérimentale au collagène (Collagen-induced arthritis)
AhR	Aryl hydrocarbon receptor
AMP	Adenosine monophosphate
Arg	Arginine
ARN m	Acide ribonucléique messager (Messenger ribonucleic acid)
Asp	Aspartic acid
ATP	Adenosine triphosphate
BAL	Broncho alveolar lavage fluid
Breg	B regulatory cells
CII	Collagène de type II (Type II collagen)
CBM	Chromatine binding motif
CDs	Cellules dendritiques (Dendritic cells)
CLP	Common lymphoid progenitor
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité (Major histocompatibility complex)
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein
CPA	Cellules présentatrices d'antigènes (Antigen-presenting cells)
CRP	C- reactive protein
CSK	C-Src kinase
DSS	Dextran sodium sulfate
DF	Dermal fibroblasts

EAE	Encéphalomyélite autoimmune expérimentale (Experimental autoimmune encephalomyelitis)
EBV	Epstein-Barr virus
EBI3	Epstein-Barr virus induced gene3
EC	Epithelial cells
E-NTPDase	Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase
Fc	Fragment crystallizable region
FR	Facteur rhumatoïde (Rheumatoid factor)
GM-CSF	Granulocyte macrophage - colony stimulating factor
GVHD	Graft-versus-host disease
G6PI	Glucose-6-phosphate isomerase
HEV	High endothelial venules
HLA	Human leukocyte antigens
HPA	Hypothalamo-pituitary-adrenal
HTH	Hélice-tour-hélice (Helix-turn-helix)
hTNF-α	humanTNF- α
IL-1RAcp	Interleukin-1 receptor accessory protein
IBD	Inflammatory bowel disease
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
Id2	Inhibitor of DNA binding 2
IDO	Indoleamine-pyrole 2, 3-dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine (Interleukin)
ILC2s	Type 2 innate lymphoid cells
IMQ	Imiquimod
IPEX	Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome

IRAK	Interleukin-1 receptor-associated kinase
IRF	Interferon regulatory factor
JAK	Janus kinase
KC	Keratinocyte derived chemokine
LAG-3	Lymphocyte activation gene-3
LB	Lymphocytes B (B lymphocytes)
LCE	Late cornified envelop
LES	Lupus érythémateux systémique (Systemic lupus erythematosus)
LF	Lung fibroblasts
LT	Lymphocytes T (T lymphocytes)
LTconv	Lymphocytes T conventionnel (Conventional T lymphocytes)
Lyp	Lymphoid tyrosine phosphatase
M1	Macrophage de type I (Type I macrophage)
M2	Macrophage de type II (Type II macrophage)
MC	Monocytes
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MCS-F	Macrophage colony stimulating factor
MD2	Myeloid differentiation factor 2
MDSC	Myeloid derived suppressor cells
MIP-2	Macrophage inflammatory protein- 2
MLD-STZ	Multiple low-dose streptozotocin
MFI	Mean fluorescence intensity
MMP	Matrix metalloproteinases
MO	Moelle esseuse
MTX	Méthotrexate (Methotrexate)
MYD88	Myeloid differentiation primary response 88
NET	Neutrophil extracellular traps

NF	Nuclear factor
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NK	Natural killer
NO	Nitric-oxide
NOD	Non-obese -diabetic
Nrp1	Neuropilin-1
nTreg	Natural Treg
OVA	Ovalbumine
PAD	Peptidyl arginine deiminase
PAH	Polycyclic aromatic hydrocarbon
PAMP	Pathogen associated molecular patterns
PCR	Polymerase chain reaction
PGE2	Prostaglandine E2
PR	Polyarthrite rhumatoïde (Rheumatoid arthritis)
PTPN22	Protein tyrosine phosphatase, nonreceptor type 22
PVB-19	Parvovirus B-19
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RIG-1	Retinoic acid-inducible gene 1
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROS	Radicaux libres oxygénés (Reactive oxygen species)
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
Sca1	Stem cell antigen-1
SCF	Stem cell factor
SEB	Staphylococcal enterotoxin B
SEP	Sclérose en plaques (Multiple sclerosis)
SMC	Smooth muscle cells
SNC	Système nerveux central (Central nervous system)

SS	Syndrome de Sjögren (Sjögren syndrome)
sST2	soluble ST2
STAT4	Signal transducer and activator of transcription protein 4
TACE	Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme
TAK1	Transforming growth factor beta-activated kinase 1
TCDD	Tetrachlorodibenzo-p-dioxin
TCZ	Tocilizumab
TGF-β	Transforming growth factor beta
Th	T helper
TLR	Toll-like receptors
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha
TRAF-C5	TNF receptor associated factor- complement component C5
TRAF6	TNF receptor associated factor 6
TRAP	Tartrate resistant acid phosphatase
Treg	T regulatory cells
Trp	Tryptophan
UV	Ultraviolet
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VP1	Viral Protein 1
VS	Vitesse de sédimentation (Erythrocyte sedimentation rate)

INTRODUCTION

1. L'inflammation chronique

L'inflammation est une réponse immunitaire de l'organisme à des agressions dues par exemple à une brûlure, à une infection par un agent pathogène ou des lésions mécaniques ou chimiques. On distingue l'inflammation aiguë et l'inflammation chronique.

Les inflammations chroniques sont caractérisées par une durée prolongée, plusieurs semaines ou plusieurs mois. Ce processus est productif lorsqu'il entraîne une destruction tissulaire et des tentatives de réparation évoluant simultanément. Notre travail a porté sur deux modèles de l'inflammation chronique qui sont la polyarthrite rhumatoïde (PR) et le psoriasis.

1.1 La polyarthrite rhumatoïde

1.1.1 Présentation

- Historique

La polyarthrite rhumatoïde (PR) a été décrite pour la première fois en 1800 dans la thèse d'Augustin Jacob Landré-Beauvais sous le terme de «goutte asthétique primitive». Les travaux de ce dernier ont permis de définir cette maladie avec un caractère chronique et déformant associé à une alternance entre des phases de poussées et de rémission. La thèse de Landré-Beauvais est longtemps restée méconnue et il faudra attendre jusqu'à la soutenance de la thèse de Jean-Martin Charcot (Landré-Beauvais, 2001) pour qu'elle soit reconnue. Jean-Martin Charcot, au cours d'une étude réalisée parmi 41 patients, a étudié les symptômes de la maladie, l'âge de son apparition et la distribution des articulations atteintes. Dans certains cas, il a remarqué le caractère héréditaire de cette maladie. Cette étude constitue le précurseur des recherches modernes sur la PR (Fraser, 1982). D'autre part, le nom de polyarthrite rhumato ide a été suggéré en 1859 par Alfred Garrod. Il a différencié la goutte de la goutte rhumatismale et ses études ont permis d'établir les bases de la recherche sur l'étiologie de cette maladie (Entezami et al., 2011).

- Epidémiologie

La polyarthrite rhumato ide est le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires chroniques. Il touche 3 fois plus les femmes que les hommes. La prévalence de cette maladie est estimée dans une fourchette entre 0.5 et 1% de la population adulte mondiale et est de 0.33% en France (Roux et al., 2007). De plus la fréquence de cette maladie augmente avec l'âge (Scott et al. 2010).

- Aspects cliniques

La PR est une maladie auto-immune chronique caractérisée par une inflammation articulaire qui s'accompagne d'une inflammation de la membrane synoviale. Cette maladie affecte particulièrement les petites articulations des mains et des pieds. Cependant, l'inflammation des grandes articulations est également fréquente (Bartok and Firestein, 2010). Aussi, au cours de l'arthrite, les cellules de la membrane synoviale, les synoviocytes, prolifèrent de manière anormale et génèrent un tissu inflammatoire nommé « pannus synovial ». Ce dernier envahit le cartilage et la matrice osseuse ce qui provoque la destruction du cartilage et l'érosion osseuse. Ce processus se traduit cliniquement par des douleurs, un gonflement des articulations et une limitation de la mobilité chez les patients. La PR est considérée comme une affection systémique, souvent associée à une manifestation extra-articulaire cutanée (nodule sous-cutané) et spécifique d'organes qui peut toucher les poumons (pleurites), le coeur (péricardie), les yeux (sclérite) (Prete et al. 2011). Par conséquent, le caractère systémique de cette maladie peut induire des complications qui aboutissent à la diminution de l'espérance de vie ces patients.

- Diagnostic et évolution

La PR est une maladie hétérogène qui peut se présenter sous une forme légère jusqu'à une forme sévère. Diagnostiquer précocement la maladie permet de choisir des traitements ciblés afin de bien la maîtriser. La nouvelle classification, reportée par l'American congress of rheumatology (ACR) et l'European League Against Rheumatism (EULAR) en 2010, présente de nouveaux critères de la PR afin d'améliorer le diagnostic précoce de la maladie (Aletaha et al. 2010).

Le diagnostic de la PR est basé sur différents critères obtenus par les signes cliniques, l'imagerie des articulations et les tests sérologiques.

L'imagerie, sert à rechercher l'érosion ou le pincement articulaire. L'examen biologique qui comporte une évaluation de la VS (Vitesse de sédimentation) et du taux de CRP (C-reactive protein), permet de détecter une inflammation systémique non spécifique. La forte concentration de cette protéine a été révélée dans le sang des patients PR (Niu and Chen, 2014).

Le FR (Facteur rhumatoïde) et les ACPA (Anti-citrullinated protein/peptide antibodies) peuvent aussi être détectés et dosés par l'examen biologique. Le FR, un auto-anticorps des classes IgM, IgG ou IgA dirigés contre la partie Fc (Fragment constant) des immunoglobulines G, est présent chez plus de 75% des patients. Aussi, il n'est pas spécifique à la PR et existe également dans

d'autres maladies auto-immunes comme le LES (Lupus érythémateux systémique) et le SS (Syndrome de Sjögren) (Nijenhuis et al. 2004).

Les ACPA sont des anticorps auto-immuns qui résultent de la transition d'Arg (Arginine) en citrulline spécifiques des patients PR (Nijenhuis et al. 2004). Ces anticorps peuvent exister 10 ans avant l'apparition de la maladie. Ceci suggère que les ACPA constituent un facteur de pronostic et de diagnostic de la PR. Ils induisent la différenciation des précurseurs ostéoclastogéniques en ostéoclastes. Ces derniers induisent la résorption osseuse chez les patients atteints de PR (Klareskog et al. 2008). En outre, la présence d'ACPA dans le sang périphérique des patients prédit une évolution vers une PR plus sévère et destructive.

- Etiologie

Les déclencheurs principaux de la polyarthrite rhumatoïde sont inconnus. La PR est une maladie multifactorielle soutenue par des facteurs environnementaux et génétiques. Ceux-ci semblent être nécessaires mais pas suffisants dans le développement de la maladie. En revanche, ils peuvent être responsables de différents signes cliniques et peuvent permettre d'apporter une réponse au traitement.

➤ *Les facteurs génétiques*

La prévalence de la maladie chez des sujets apparentés au premier degré avec un patient atteint de PR est plus élevée (entre 2% et 12%). De plus, des études transversales effectuées sur des jumeaux ont montré que le taux de concordance pour la PR est plus élevé chez les jumeaux monozygotes (12 à 30% de la concordance) que chez les dizygotes (5 à 10 % de la concordance). Par conséquent, ces études confirment l'implication de facteurs génétiques dans la susceptibilité à la PR (MacGregor et al., 2000).

Implication du CMH

Parmi les gènes responsables de l'apparition et du développement de la PR, le rôle important du CMH a été mis en évidence. Parmi des allèles dans la région de l'HLA-DR, les allèles HLA-DR1 et HLA-DR4 sont associés à la susceptibilité à la PR. Ces allèles codent une séquence homologue contenant 5 acides aminés. Cette séquence s'appelle l'épitope partagé et elle est associée à l'apparition d'ACPA dans la PR (Gregersen et al. 1987).

Implication des gènes non CMH

Le facteur génétique le plus important en dehors de la région de l'HLA est associé aux gènes contenant le PTPN22 (Protein tyrosine phosphatase, non receptor type 22), le PADI4 (Peptidyl arginine deiminase, type IV), le CTLA4, ou les gènes des différentes cytokines comme le TNF- α , l'IL-1, l'IL-10 et l'IL-18 ou le TRAF1-C5.

Ici, nous discutons de quelques gènes principaux intervenant dans la PR.

PTPN22

Ce gène code une tyrosine phosphatase intracellulaire, Lyp, qui est associée à une tyrosine kinase C-src (Csk). Ce complexe est capable d'inhiber l'activation des cellules T à travers une régulation négative de la voie de signalisation via le TCR.

Des études sur la population caucasienne ont montré qu'une mutation non sens sur le codon 620 de ce gène mène à un changement de l'acide aminé Arg en Trp (tryptophane). Cette mutation abolit l'interaction entre Lyp et C-src ce qui induit la dérégulation de l'activation des lymphocytes T aboutissant à la suractivation de ces cellules. Ce dernier est lié au risque d'apparition ou au développement de l'arthrite. En outre, la même mutation peut conduire à d'autres maladies auto-immunes comme le LES, la sclérose systémique, le diabète type 1 (Stanford and Bottini, 2014).

PADI4

Le PAD est un enzyme responsable de la citrullination des résidus arginines et l'apparition des auto-anticorps spécifiques de la PR. La famille des PAD comprend trois isoenzymes PADI1, PADI4 et PADI6.

L'association de l'expression de PADI4 avec la PR a été montrée au sein de la population japonaise. Une méta-analyse par Lee et al a montré que dans la population asiatique, les polymorphismes exoniques, PADI4-94, PADI4-104 et PADI4-90 sont significativement associés à la PR, tandis que chez les européens PADI4-94 a été associé au développement de la PR. En revanche, les résultats d'une étude réalisée sur les patients atteints de PR en Espagne, en France et au Royaume-Uni n'ont trouvé aucune association entre ce gène et la polyarthrite rhumatoïde (Lee et al. 2007, Kurko et al., 2013).

TRAF1-C5

TRAF1 est un membre de la famille des récepteurs du TNF. Il est impliqué dans les voies de signalisation de l'apoptose, dans la prolifération et la différenciation cellulaire, dans l'activation et l'inhibition des cytokines et dans le remodelage osseux.

Le gène C5 code un composant du complément qui intervient dans la destruction tissulaire en recrutant des cellules synoviales inflammatoires. Plusieurs études sur les différentes populations ont mis évidence l'association de ce gène avec la PR.

➤ *Les facteurs environnementaux*

TABAC

La fumée du tabac est le facteur de risque le plus important parmi les facteurs environnementaux qui provoquent la polyarthrite rhumatoïde. Le risque de la PR est lié au tabagisme et reste élevé jusqu'à 20 ans après l'arrêt de la consommation (Bang et al., 2010). Une cigarette contient plusieurs composants toxiques comme PAH (Polycyclic aromatic hydrocarbon). La liaison des PAH à son récepteur spécifique, AhR (Aryl hydrocarbon receptor) a des conséquences pathologiques. Le TCDD (2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin.) est un membre de la famille PAH que se trouve dans le tabac. Une étude effectuée par Kobayashi a montré une forte expression d'AhR dans le tissu synovial des patients atteints de PR. Dans la même étude l'effet pro-inflammatoire du TCDD a été expliqué par une augmentation de l'expression des cytokines IL-1 β , IL-6 et IL-8 secrétées par les synoviocytes des patients atteints de PR cultivés en présence de TCDD (Kobayashi et al. 2008). En outre, il a été suggéré que le tabac, en induisant la citrullination, pourrait s'associer à la production d'ACPA. Le tabagisme pourrait induire la production des radicaux libres activant des facteurs de transcription redox-sensibles tels qu'AP-1. Ce dernier, induit l'expression de PADI4 via sa liaison au promoteur de PADI4, responsable de la citrullination. Par conséquent, le tabagisme augmente le risque de développer la maladie particulièrement chez les patients porteurs d'un ou deux exemplaires de l'épitope partagé (Bang et al. 2010, Makrygiannakis et al. 2008).

Les agents infectieux

L'infection par différents agents pathogènes, qu'ils s'agissent de virus ou bactéries, est liée à la polyarthrite rhumatoïde. EBV (Epstein-Barr virus) est un virus de la famille des Herpesviridae avec un ADN linéaire double brin de 172 kb. L'infection par l'EBV est une infection répandue estimée à environ 98% de la population mondiale. Ce virus est responsable de la mononucléose infectieuse et est associé à certains néoplasies, lymphome de Burkitt, carcinome nasopharyngé, maladie de Hodgkin. Des études différentes ont montré la présence de ce virus dans le liquide synovial et le sang de patients atteints de PR. Aussi, les examens sérologiques ont montré un taux important d'anticorps anti EBV chez les patients atteints de PR (Balandraud et al., 2003).

L'implication de ce virus dans la PR correspond à une homologie entre de séquences d'acides aminés entre une glycoprotéine gp110 d'EBV et certains sous-types de HLA-DR4. Chez les patients atteints de PR, les lymphocytes T répondent faiblement à l'épitope partagée de la gp110 présentée par l'HLA-DR4 bien que cette réponse soit plus importante chez les sujets sains (Toussirot and Roudier, 2007). Cependant, même si l'implication de l'EBV dans la PR est connue, aucun effet direct de ce virus n'est démontré à ce jour.

Le parvovirus B19 (PVB-19) est un virus impliqué dans la PR. Ce virus fait partie de la famille des Parvoviridae et il possède un ADN simple brin codant deux protéines structurales de la capsid (VP1 and VP2) et des protéines non structurales. L'ADN de ce virus a été détecté dans le tissu synovial de beaucoup de patients arthritiques et aussi rarement chez les patients atteints d'arthrose ou d'autres maladies inflammatoires (Takahashi et al. 1998). L'incubation des lignées primaires des cellules synoviales humaines avec le sérum B19 positif isolé des patients PR a montré une augmentation de l'invasion cellulaire induite par B19, et l'anticorps neutralisant B19 abroge l'invasion induite (Ray et al. 2001). Ceci suggère une association entre la présence du B19 et la PR. En revanche, certaines études sur des tests sérologiques et des PCR pour B19 n'ont trouvé aucune différence significative entre les patients atteints de PR et les patients arthrosiques ou d'autres maladies articulaires inflammatoires. Dans certaines études, la prévalence des IgG contre le B19 s'est révélée élevée dans le groupe de patients atteints de PR et également dans le groupe de sujets non arthritiques par rapport des sujets sains (Kerr et al., 1996, Harrison et al., 1998). Par conséquent, l'implication de l'infection par le parvovirus B19 dans la PR reste controversée.

La *porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) est un autre agent infectieux qui pourrait être impliqué dans l'apparition de la PR. Cette bactérie, qui est associée aux parodontopathies exprime une PAD capable de citrulliner des protéines chez les individus infectés. Etant donné le rôle important des protéines citrullinées dans la PR, *P. gingivalis* pourrait faciliter la présentation d'auto-antigène et la perte de la tolérance immunitaire. Dans ce sens, une étude a montré la présence d'un taux important d'anticorps anti- *P. gingivalis* dans le serum des patients atteints de PR par rapport aux sujets sains. Cette présence était positivement corrélée avec le taux d'anticorps anti protéines citrulinées (Bellatin et al., 2012).

Une étude récente en confirmant l'étude précédente, a détecté la présence d'un taux plus important d'anticorps anti- *P. gingivalis* dans le serum des patients atteints de PR en comparant avec les patients atteints d'une autre maladie inflammatoire chronique (Inflammation de l'intestin) et ils

ont aussi observé une tendance par rapport aux patients atteints de spondylarthrite (Rinaudo-Gaujous et al. 2013).

D'autres agents infectieux interviennent aussi dans le déclenchement de la maladie. Cependant, l'effet direct de ces agents n'a pas encore été clairement démontré. D'autres facteurs environnementaux, comme le statut social, le régime alimentaire, sont impliqués dans le déclenchement de la PR.

Les facteurs hormonaux

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie qui affecte 2 à 3 fois plus les femmes que les hommes. Les raisons de cette tendance ne sont pas complètement claires. Cependant, elles semblent être liées aux hormones sexuelles. En effet, différentes études ont montré que l'incidence de la maladie augmente juste après la première grossesse et aussi à la ménopause. En revanche, il a été observé une rémission ou une amélioration de la maladie chez 75% des patientes au cours de leur grossesse. Cette amélioration est expliquée par la sécrétion d'un taux important des œstrogènes, de la progestérone et du cortisol induisant la transition des cytokines Th1 aux cytokines Th2 (Marder and Somers, 2014).

1.1.2 Immunopathologie de la PR

Quand un certain nombre de facteurs génétiques et environnementaux sont réunis, ils peuvent être liés à la perte de tolérance du système immunitaire contre des protéines du soi. La réponse contre ces auto-antigènes se traduit par une réaction inflammatoire exagérée, en particulier dans les articulations. Dans ce sens, les mécanismes immunopathologiques de la PR font intervenir de nombreux acteurs cellulaires et moléculaires (des cytokines, des chimiokines et les prostaglandines) engendrant l'inflammation chronique de la PR (Figure1).

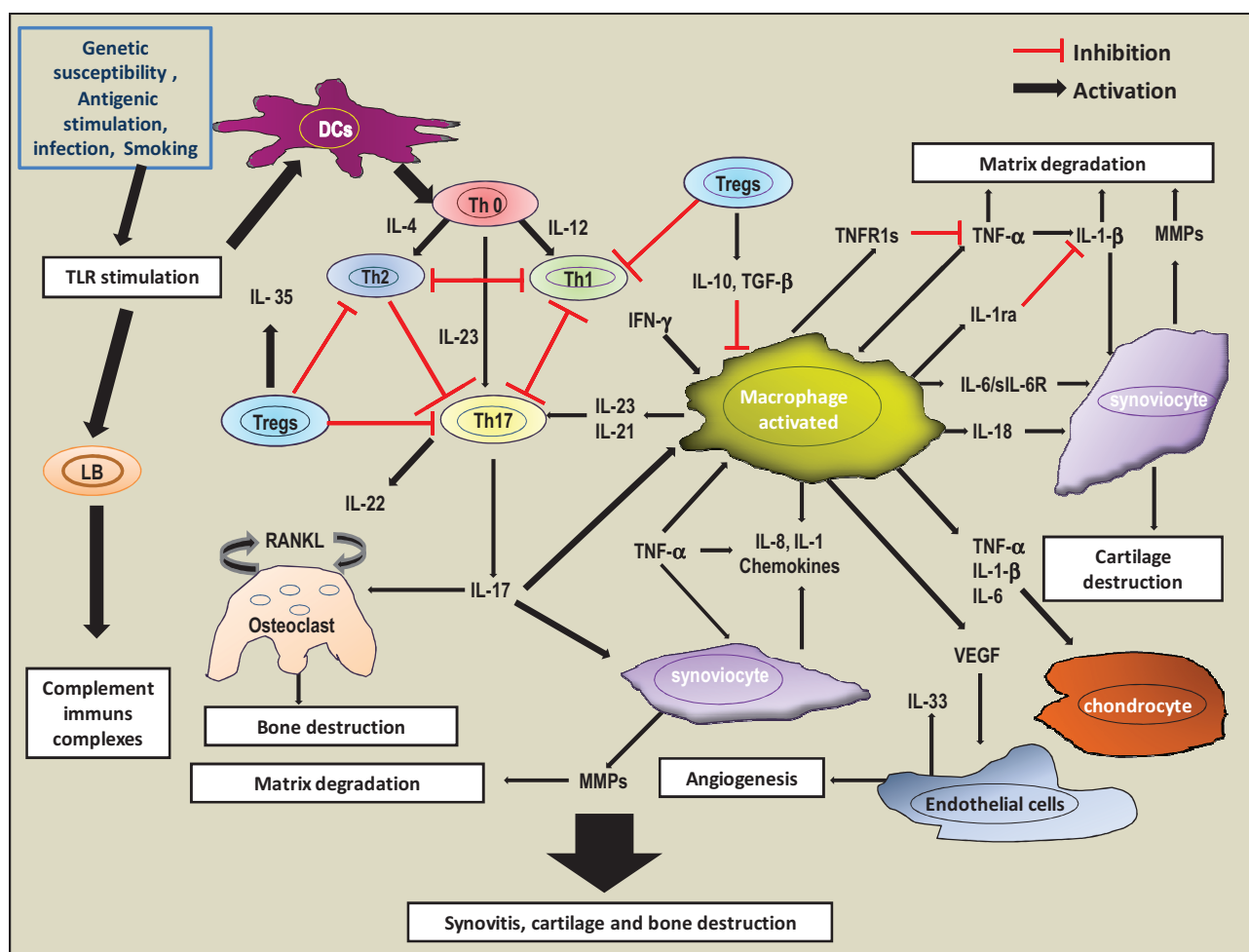


Figure 1 : Mécanismes immunopathologiques de la PR : Le PR est le résultat d'une dérégulation des chaînes cellulaires et cytokiniques qui mène une destruction cartilage et la resorption osseuse.

-Acteurs cellulaires

➤ Les cellules ostéoarticulaires

Les cellules ostéoarticulaires comprennent les synoviocytes, les ostéoclastes et les chondrocytes qui interviennent dans la dégradation des articulations et de l'os.

L'activation de ces cellules conduit à une amplification de l'inflammation dans la PR.

Les synoviocytes sont de deux types : les synoviocytes macrophagiques (type A) et les cellules synoviocytes fibroblastiques (type B). Les synoviocytes type A sont d'origine monocyttaire et sont des cellules présentatrices antigènes ou phagocytaires. Dans la PR, ces cellules sont actives et produisent des prostaglandines, des leucotriènes, des radicaux libres et des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 et le TNF- α dans la synoviale. Les synoviocytes type A sont

abondants dans les articulations des patients atteints de PR (Imboden, 2009). Les synoviocytes type B produisent les composants essentiels du liquide synovial tels que l'acide hyaluronique, les collagènes et la fibronectine I. Ils sont de ce fait impliqués dans le remodelage de la matrice synoviale. Au cours de la PR, ces cellules acquièrent une capacité proliférative importante, ainsi qu'un phénotype envahissant sous influence des cytokines pro-inflammatoires. Ces cellules en sécrétant des protéases comme des MMP, particulièrement MMP3 et des cathepsines, (notamment cathepsine K) interviennent dans l'inflammation et la destruction articulaire (Bottini and Firestein, 2013).

Les ostéoclastes sont les cellules responsables de la destruction articulaire et osseuse. Lors de la PR, le phénomène de formation des ostéoclastes (ostéoclastogénèse) est maintenu sous l'influence de différentes cytokines pro-inflammatoires. Le RANKL est l'une des cytokines régulatrices majeures de l'ostéoclastogénèse. Le TNF- α , l'IL-1, l'IL-6 et le MCP-1 sécrétés par les lymphocytes, les macrophages et les neutrophiles favorisent également l'ostéoclastogénèse et la résorption osseuse.

Les chondrocytes sont les cellules qui composent le cartilage et couvrent la surface de l'articulation. Rappelons que le cartilage est constitué d'une matrice essentiellement composée de collagène de type II (CII), de protéoglycans liés à des polymères d'acide hyaluronique et de protéines COMP (Cartilage oligomer matrix protein). Dans le contexte normal, l'homéostasie des chondrocytes est contrôlée (Otero and Goldring, 2007).

➤ Les cellules de l'immunité innée

Les cellules dendritiques (CD)

Dans la synoviale des patients atteints de PR, il y a une infiltration massive des cellules dendritiques. Une corrélation entre le nombre de CD plasmiques dans le tissu synovial des patients atteints de PR et les taux d'anticorps-anti protéines citrullinées (CCP) suggère l'implication des ces cellules dans la PR (Gierut et al., 2010).

Les macrophages

Les macrophages sont des cellules phagocytaires résidentes des tissus. Ils existent deux types de macrophages : les macrophages de type I (M1), ce sont les macrophages classiques, inflammatoires, et les macrophages de type II (M2), dits macrophages alternatifs, ils ont une action anti-inflammatoire. Les macrophages activés sont capables de phagocyter les antigènes et sécrètent des cytokines comme le TNF- α , l'IL-1, le GM-CSF, l'IL-12, l'IL-15 et IL-18 ainsi que

des chimiokines. Ceux-ci facilitent les interactions cellulaires avec d'autres cellules et protéines sur le site de l'inflammation. Les macrophages sont connus comme une source importante des cytokines dans la synoviale. En outre, un déséquilibre des M1 et M2 a été montré dans la PR (Li et al. 2012b).

Les neutrophiles

Parmi toutes les cellules impliquées dans la pathologie de la PR, les neutrophiles possèdent le plus grand potentiel cytotoxique. Ces cellules sont capables de sécréter des enzymes (élastase, gélatinase, gelatinase-associated lipocalin et collagénase) et des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les neutrophiles sécrètent également des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , l'IL-1, IL-18, IL-15, IL-6 et BAFF) et des chimiokines qui conduisent à l'inflammation. Ils peuvent également libérer des NET (Neutrophil extracellular traps) contenant de la chromatine associée à des enzymes de granules afin de lyser les micro-organismes extracellulaires. La présence de neutrophiles activés dans le liquide synovial et le pannus de nombreux patients atteints de PR a été mise en évidence. Les neutrophiles actifs produisent des ROS à l'origine de la création d'un environnement hypoxique au sein des articulations des patients. Les neutrophiles des patients atteints de PR ont une tendance accrue à former des NET qui renferment des protéines citrullinées. On trouve d'ailleurs des ACPAs dans le sérum de ces patients (Wright et al. 2014).

➤ *Les cellules de l'immunité adaptative*

Les lymphocytes B

Des lymphocytes B sont présents dans le tissu synovial des patients atteints de PR. Ces cellules en présentant des auto-antigènes, peuvent activer les lymphocytes T auto-réactifs et aussi produire des anticorps auto-immuns, notamment des ACPA dans la PR. Dans ce sens, une étude a montré la présence de précurseurs de cellules B productrices d'ACPA dans le liquide synovial des patients atteints de PR (Reparon-Schuijt et al., 2001). Plus tard, une autre étude a montré la capacité des LB isolés du sang périphérique des patients atteints de PR pour produire des ACPA *in vitro* (Bellatin et al., 2012).

La déplétion de ces cellules par un anticorps anti CD20 (Rituximab) est une stratégie thérapeutique efficace dans la PR (Browning, 2006) notamment chez les patients atteints de PR ACPA positifs. Cela confirme le rôle important des LB et des ACPA dans cette maladie (Modi et al., 2013).

Les lymphocytes T

Les lymphocytes T sont des cellules régulatrices importantes dans l'inflammation articulaire de la polyarthrite rhumatoïde. Parmi les lymphocytes T, les cellules T auxiliaires Th 1 (T helper) et Th17 ont des rôles majeurs dans la PR.

Les lymphocytes Th1

Les Th1 sont des cellules différenciées à partir de LT CD4 naïfs en présence d'IL-12. Dans ce sens, ils expriment des facteurs de transcription T-bet et STAT4 (Signal transducer and activator of transcription). Ces cellules sont responsables de l'immunité cellulaire contre les antigènes intracellulaires et les réactions d'hypersensibilité retardées. Ces cellules actives sont capables de sécréter des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-2, l'IFN- γ et le TNF- α et la lymphotoxine. Elles peuvent aussi activer les macrophages à fin de phagocyter les antigènes. L'activation anormale des Th1 a été mise en évidence dans plusieurs maladies auto-immunes comme la PR. Une augmentation de ces cellules a été observée dans le sang périphérique et la membrane synoviale des patients atteints de PR en comparant avec les sujets sains (Chen et al., 2012). En outre, les cytokines sécrétées des Th1 induisent la sécrétion des cytokines destructrices du cartilage via les macrophages et les synoviocytes (Panayi et al., 1992). L'ensemble de ces études mettent en évidence l'implication des Th1 dans la PR.

Les lymphocytes Th2

Les cellules Th2 sont des cellules responsables de l'immunité humorale contre les antigènes extracellulaires, notamment des parasites. Ils se différencient à partir de CD4 naïfs en présence de l'IL-4. Ces cellules sont caractérisées par l'expression des facteurs de transcription STAT5 et GATA3 et leur sécrétion de cytokines anti-inflammatoires notamment l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13.

Les cellules Th1 et Th2 exercent un rétrocontrôle négatif l'un sur l'autre, elles se régulent mutuellement. Par exemple, la génération du Th1 est inhibée en présence l'IL-4 et la prolifération du Th2 est bloquée sous influence de l'IFN- γ . Par conséquent, il existe une balance entre ces deux cellules Th1 et Th2. Un déséquilibre entre Th1 et Th2 en faveur de la réponse Th1 est lié à plusieurs maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde. Il a initialement été démontré que le ratio Th1/Th2 dans le sang des patients atteints de PR est bien corrélé avec le score de la maladie (Schulze-Koops and Kalden, 2001).

Les lymphocytes Th17

Le Th17 est un type des cellules T helper différenciées à partir de lymphocytes CD4 naïfs sous l'influence des cytokines IL-6 et TGF- β . Ils expriment les facteurs transcription ROR- γ et STAT3. Ces cellules expriment essentiellement de l'IL-17A et d'autres cytokines comme le TNF- α , l'IL-6, l'IL-22, l'IL-17F, l'IL-21 et le GM-CSF et aussi RANKL et TNF- α , deux cytokines favorisant l'ostéoclastogénèse. L'IL-17A sécrétée par les Th17, interagit avec son récepteur exprimé par les synoviocytes type B induisant la libération de facteurs solubles dégradant le cartilage (Saidenberg-Kermanac'h et al. 2004, Adamopoulos and Bowman, 2008). En outre, l'IL-17 sécrété, en induisant de la sécrétion de TNF- α , d'IL-1 β et d'IL-6 par les macrophages, participe à la destruction du cartilage et à la résorption osseuse. L'IL-17 se trouve dans le liquide synovial des patients atteints de PR. La surexpression de cette cytokine a aussi été démontrée dans des cultures de PBMC et dans le sérum des patients arthritiques (Stamp et al. 2004, Lundy et al. 2007).

Les lymphocytes régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs (Tregs) représentent une population immuno-régulatrice qui joue un rôle très important dans le maintien de la tolérance au soi. Plusieurs études ont démontré l'implication des Tregs dans le développement de la PR. Un déficit dans la fonction suppressive des Tregs a été observé chez les patients arthritiques alors que leur variation quantitative n'est pas claire. La présence de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-17 crée un environnement dans la synoviale des patients atteints de PR qui peut influencer sur la capacité suppressive des Tregs (Boissier et al. 2009). Nous reviendrons plus loin au détail sur ces cellules.

- Rôle des cytokines dans la PR

Les cytokines sécrétées par de différentes cellules contrôlent une grande variété de processus inflammatoires impliqués dans la PR. Il existe ainsi, un déséquilibre entre les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires en faveur des cytokines inflammatoires.

Ici, nous nous exposerons plus en détail le rôle de certaines cytokines cruciales dans la physiopathologie de la PR.

➤ *Le TNF- α*

Le TNF- α est une cytokine impliquée dans l'inflammation, la défense anti-tumorale, l'infection et l'apoptose. Il se retrouve sous deux formes: l'une membranaire et l'autre soluble. Tout d'abord, cette protéine est synthétisée en tant que protéine membranaire et est clivée par une enzyme TACE (Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme). Ce clivage génère la forme soluble du TNF- α (sTNF- α). Au cours de l'inflammation, l'infection ou le stress cellulaire, le TNF- α est sécrété par différentes cellules incluant les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules B et les cellules T, les cellules mésenchymateuses, les kératinocytes et les cellules épithéliales.

Le TNF- α fonctionne via ses deux récepteurs, le TNFR1 et le TNFR2. Le TNF- α soluble interagit avec le TNF-R1 et le TNFR2 se lie préférentiellement au TNF- α membranaire (Vasanthi et al., 2007).

L'implication du TNF- α dans la PR a été proposée pour la première fois dans une étude qui a démontré le potentiel de cette cytokine pour induire la synthèse de collagénases et de PGE2 qui jouent un rôle dans la destruction du cartilage et de l'os (Dayer et al. 1985). En plus, la sécrétion de cette cytokine par des cellules monocytaires de la synoviale des patients PR *in vitro* a renforcé l'hypothèse du rôle inflammatoire du TNF- α dans la PR. Le blocage du TNF- α dans la même contexte inhibe la production spontanée des autres cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et le GM-CSF ou la chimiokine IL-8 (Haworth et al., 1991). L'expression du TNF- α et son récepteur a été mise en évidence dans le tissu articulaire des patients PR (Chu et al. 1991). En outre, il a été montré dès 1992 que l'administration d'anticorps neutralisant du TNF- α dans le modèle de l'arthrite expérimentale au collagène chez la souris diminuait l'inflammation et la destruction articulaire (Williams et al., 1992). L'ensemble de ces résultats mettent en évidence l'implication du TNF- α dans la PR et l'intérêt thérapeutique de son inhibition dans cette pathologie.

➤ *IL-1 (L'Interleukine-1)*

Les cytokines de la famille de l'IL-1 sont au nombre de onze parmi lesquels, l'IL-1 α , l'IL-1 β . Ces deux formes partagent le même récepteur, IL-R1. L'IL-1 α et β sont abondamment sécrétées dans la membrane synoviale. Elles sont capables d'induire la sécrétion des cytokines par les cellules mononucléaires de la synoviale et par les chondrocytes. L'activation des fibroblastes par l'IL-1 conduit aussi à la production des prostaglandines et MMP (Dayer, 2003). L'inhibition des effets de l'IL-1 dans différents modèles d'arthrite est efficace pour réduire l'inflammation et la destruction articulaire (Joosten et al., 1999). De même, les souris déficientes pour le récepteur

antagoniste de l'IL-1, l'IL-1Ra, développent une arthrite spontanée. Dans ce modèle, l'arthrite est dépendante des cellules Th17 sécrétrices l'IL-17 (Nakae et al., 2003). Toutes ces données mettent en évidence l'avantage thérapeutique de l'inhibition de l'IL-1 dans le contrôle de la PR.

➤ *L'IL-6*

L'IL6 est une glycoprotéine clé dans la régulation de l'inflammation aigüe et chronique. Le rôle de cette cytokine est associé à son récepteur hétérodimérique constitué d'une chaîne α et une chaîne transmembranaire α gp130. Cependant, il existe une autre forme de récepteur, IL-6R soluble (sIL-6R) qui est générée par le clivage enzymatique de l'IL-6R membranaire ou par le processus d'épissage alternatif. L'IL-6 est sécrété par des types cellulaires variés comme les LT, LB, les macrophages, les mastocytes, les neutrophiles, les éosinophiles, les cellules gliales, les chondrocytes et les cellules endothéliales (Brennan and McInnes, 2008). De nombreuses études ont montré le rôle crucial de cette cytokine dans les maladies auto-immunes comme la PR. L'IL-6 est surexprimée dans le liquide synovial et dans le sérum des patients atteints de PR. Cette expression a été corrélée positivement avec l'activité de la maladie (Houssiau et al., 1988). En revanche, une concentration élevée du récepteur soluble de l'IL-6 a été également mise en évidence dans le liquide synovial des patients atteints de PR (Kotake et al., 1996). De plus, dans le modèle de l'arthrite au collagène, l'inhibition de l'IL-6 ou de l'IL-6R protège des souris de l'arthrite. L'implication de cette cytokine dans la PR est liée à sa capacité à induire la prolifération et la différenciation des LB en plasmocytes produisant les ACPA. En outre, cette cytokine en stimulant la production de RANKL par les cellules synoviales et les MMPs par les synoviocytes et les chondrocytes, participe à l'ostéoclastogenèse (Hashizume and Mihara, 2011).

➤ *La famille de l'IL-12*

Cette famille se compose de différentes cytokines, IL-12, IL-23, IL-27 et IL-35. Les quatre cytokines de cette famille sont des hétérodimères composés d'une chaîne α (p19, p28 ou p35) et d'une chaîne β (p40 ou EB13).

L'IL-12

L'IL-12 est constitué de deux sous unités (p35/p40). Elle est exprimée par les cellules dendritiques, les lymphocytes B, les monocytes/macrophages. Cette cytokine exerce sa fonction via la liaison spécifique avec son récepteur, IL-12R qui comporte deux sous unités : l'IL-12R β 1 et

l'IL-12R β 2. La liaison de l'IL12 à son récepteur induit l'activation des facteurs transcription des Th1.

L'IL-12 semble avoir un rôle régulateur dans l'arthrite. Tout d'abord, l'expression importante de cette cytokine a été montrée dans le sang et le liquide synovial des patients atteints de PR, en comparaison des patients atteints de l'arthrose. Cette expression a été corrélée positivement avec l'activité de la maladie. De plus, un excès de cellules Th1 et un défaut de cellules Th2 ont été mise en évidence dans le liquide synovial des patients de PR. Ceci suggère l'implication de l'IL-12 dans l'induction de la réponse Th1 au cours de la PR. La sévérité de l'AEC est accrue après injection d'IL-12 en phase précoce. Cependant, le traitement avec un anticorps anti p40 dans une arthrite établie augmente la sévérité de la maladie (Pope and Shahrara, 2013). Ces résultats suggèrent que l'IL-12 pourrait avoir un rôle pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire selon que le traitement intervient en phase d'initiation ou de maladie établie.

L'IL-23

L'IL-23 est composée de deux sous unités (p19/p40). Cette cytokine est sécrétée par les CD4 activées et les macrophages. Elle transmet son signal via la liaison à son récepteur hétérodimérique qui est composé de deux sous unités d'IL-12R β 1 et d'IL-23R. L'IL-23 sécrétée est nécessaire à la survie cellulaire et à l'expansion des Th17. En activant les Th17, cette cytokine induit indirectement la sécrétion d'IL-17 qui est une cytokine pro-ostéoclastogénèse (Li et al., 2010). Dans ce contexte l'AEC est diminuée chez la souris déficiente en IL-23 (p19^{-/-}) (Murphy et al., 2003). Enfin, dans le liquide synovial et le sérum des patients atteints de PR l'expression de la sous-unité de p19 de l'IL-23 et l'IL-17 est augmentée (Pope and Shahrara, 2013).

L'ensemble de ces données montrent l'implication majeure de cette cytokine dans le développement de l'arthrite.

L'IL-27

L'IL-27 est une cytokine composée de deux sous unités (p28/Ebi3). Elle est sécrétée par les CPAs et son effet est lié à son récepteur, composé de l'IL-27R α et de la gp130. L'interaction entre l'IL-27 et son récepteur induit l'activation de la voie de signalisation de JAKs qui aboutit à la phosphorylation des facteurs transcriptions STAT conduisant à l'expression des gènes effecteurs. L'implication de l'IL-27 dans l'arthrite a été suggérée par le fait que l'on retrouve des taux élevés de cette cytokine dans le liquide synovial des patients atteints de PR. L'IL-27 peut avoir un rôle pro-inflammatoire dans l'arthrite en activant STAT1 ce qui favorise la différenciation des Th1

sécréteurs d'IFN- γ . (Jankowski et al. 2010). Dans ce sens, une étude dans un modèle d'arthrite dépendant des Th1, l'arthrite induite par protéoglycanes, a montré une arthrite réduite chez les souris déficientes en IL-27R par rapport aux souris sauvages. Cette diminution était liée à une réduction de la production d'IFN- γ sécrété par le Th1 (Diveu et al., 2008). En revanche, l'administration d'IL-27 au cours de la phase précoce de l'AEC réduit le nombre de Th17 (Pickens et al., 2011). L'effet anti-inflammatoire de cette cytokine pourrait passer par l'inhibition de la différenciation des Th17 via l'IL-6 et le TGF- β . Cependant, la sévérité de l'AEC a été augmentée chez les souris qui reçoivent l'injection de cette cytokine lors de la phase tardive.

Les patients atteints de PR peuvent également répondre différemment à la thérapie contre l'IL-27 selon le stade de développement de la maladie. Cette cytokine peut intervenir dans l'homéostasie osseuse. Elle peut supprimer directement l'expression de RANK sur les cellules myéloïdes, inhibant alors la différenciation des pré-ostéoclastes en ostéoclastes matures (Kalliolias et al., 2010).

L'IL-35

L'IL-35 est un autre membre cytokinique de la famille d'IL-12 qui est produite par les Tregs. Nous discutons de cette cytokine plus tard dans le chapitre 2, page 55.

1.1.3 Les traitements de la PR

- Les traitements de fond

Il s'agit des traitements dans le but de ralentir ou d'inhiber le développement de la maladie. Parmi les traitements de fond, le méthotrexate (MTX) est connu comme le traitement de référence "Gold Standard" de la PR. C'est un agent anti métabolique qui inhibe la fonction de l'enzyme dihydrofolate réductase qui favorise la conversion du dihydrofolate en une forme active du folate dans le métabolisme de l'acide folique. Les autres molécules efficaces ayant une toxicité acceptable au long cours sont la sulfasalazine, la salozopyrine et le léflunomid.

- Les traitements ciblés

Les traitements anti-cytokines

Différentes stratégies sont utilisées pour bloquer ou neutraliser des cytokines impliquées dans la physiopathologie de la PR. Afin d'inhiber les effets délétères des cytokines, plusieurs anticorps monoclonaux sont développés contre une cytokine ou leur récepteurs.

Les antis TNF- α

L'idée de traitement ciblant le TNF provient de deux études expérimentales. Elles montraient que l'administration d'anticorps monoclonaux anti-TNF diminuait l'AEC (Williams et al., 1992) et que la souris transgénique pour le TNF humain (h TNF) développait une arthrite destructive importante (Keffer et al., 1991). Pour la première fois, en 1993, une étude a fait état du succès d'un traitement basé sur les anticorps anti TNF- α sur 10 patients atteints de PR réfractaires (Elliott et al., 1994). Actuellement, il existe cinq antagonistes du TNF- α dans le traitement de la PR incluant l'éta nercept (Enbrel), l'infliximab (Remicade), l'adalimumab (Humira), le certolizumab pegol (Cimzia) et le golimumab (Simponi).

L'éta nercept est une protéine de fusion associant la fraction P75 du récepteur soluble du TNF- α avec fragment Fc d'une IgG1 humaine. Ce médicament empêche donc la liaison entre le TNF- α et ses récepteurs.

L'infliximab est un anticorps monoclonal chimérique IgG1 (humain-murin) qui se fixe au TNF- α humain et il ne lui permet pas de se lier à ses récepteurs. Chez les patients atteints de PR, le

traitement seul par infliximab, ou associé au MTX, induit une réduction significative des lésions articulaires et une diminution du recrutement cellulaire sur le site inflammatoire (Lina et al., 2011). Cependant, les traitements anti TNF- α sont des vraies immunosuppresseurs que rendent les patients plus sensibles aux infections et les exposent à un risque accru de développer certaines tumeurs. Les risques infectieux, en particulier celui de la tuberculose, représentent le principal problème. Les syndromes lupiques et des maladies démyélinisantes sont également d'autres effets secondaires observés chez une minorité de patients (Vasanthi et al. 2007). Si le risque de néoplasie reste discutable, il existe un consensus sur une augmentation du risque d'infection sous anti-TNF. En particulier les anti-TNF sont associés à un risque accru de réactivation d'une tuberculose latente et à un risque accru de développement une tuberculose en cas de contact avec *mycobactérium tuberculosis*.

D'autres effets indésirables décrits sous anti-TNF et liés à leur action immunorégulatrice sont des syndrômes lupiques et des maladies démyélinisantes.

Les anti l'IL-6

Ce traitement est basé sur un anticorps monoclonal humanisé, nommé tocilizumab (TCZ), qui est dirigé contre le récepteur de l'IL-6. Le premier essai clinique concernant l'effet du tocilizumab a été effectué sur sept patients avec une maladie inflammatoire lympho proliférative chronique caractérisée par une croissance des ganglions lymphatiques et une production massive d'IL-6 par les cellules B du centre germinatif. L'administration de tocilizumab améliore les symptômes cliniques et diminue le taux de CRP dans le sérum de ces patients (Nishimoto et al., 2000). Plus tard, les essais cliniques ont prouvé l'efficacité remarquable du TCZ dans la PR et l'arthrite juvénile idiopathique. Les essais cliniques sur les patients atteints de PR au Japon ont montré que l'administration de tocilizumab en monothérapie était aussi efficace que la combinaison des anti-TNF- α avec le méthotrexate. En outre, le TCZ pourrait entraîner plusieurs effets secondaires comme des troubles digestifs, hépatiques et hématologiques (Kang et al., 2015).

Les traitements anti-lymphocytes

Anti-lymphocytes B

Ce type de traitement est basé sur la déplétion des lymphocytes B par utilisation d'un anticorps dirigé contre une protéine de surface des lymphocytes B (CD20). Le rituximab est un anticorps

monoclonal chimérique neutralisant le CD20 qui permet de diminuer le nombre de cellules B de façon substantielle (Edwards and Cambridge, 2006).

L'abatacept (CTLA4-Ig)

Il s'agit d'une protéine de fusion qui comprend le domaine extracellulaire du CTLA-4 humain et une partie Fc de l'IgG1 humain. Cet anticorps inhibe la voie de co-stimulation des lymphocytes T en se liant spécifiquement à CD80 et à CD86.

Le traitement anti- tyrosines kinases

Le mécanisme d'action de la plupart des cytokines impliquées dans la physiopathologie de la PR est lié à leurs voies de signalisation. Celles-ci sont en majorité contrôlées par les kinases de la famille JAK au niveau intracellulaire. Cette famille de protéines kinases est constituée de quatre membres: Jak1, Jak2, Jak3 et Tyk2 qui transmettent le signal via la voie de JAK/STAT. Le développement d'inhibiteurs ciblés contre ces kinases est l'une des nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces dans le traitement de la PR. Ces inhibiteurs inhibent des kinases de la famille JAK, empêchent le recrutement des facteurs transcription des STAT et l'expression des gènes nécessaires à la réponse pro-inflammatoire.

Le tofacinib est un inhibiteur de Jak 1/3 potentiellement efficace dans le traitement de la PR. En inhibant JAK3, il bloque l'activation des voies de signalisations des cytokines IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21, qui contrôlent l'activation des lymphocytes, leur prolifération et leur survie. Cette molécule inhibe également la sécrétion d'IFN- γ en inhibant de voie signalisation dépendante de JAK1 (Choy et al., 2013). La sécurité et l'efficacité du tofacitinib ont été étudiées dans six essais de phase 3 et son utilisation a été suggérée en cas d'échec du traitement par le méthotrexate (He et al., 2013).

1.1.4 Les modèles expérimentaux de la PR

L'utilisation des modèles animaux dans l'arthrite nous permet d'étudier des mécanismes physiopathologiques de cette maladie. Différents modèles expérimentaux d'arthrite spontanée ou d'arthrite induite ont été établis chez la souris et d'autres espèces. Ici, nous citerons quelques exemples de ces modèles.

- L'arthrite expérimentale au collagène (AEC)

L'AEC est l'un des modèles les plus anciens de la PR. Ce modèle est particulièrement utilisé pour étudier les mécanismes cellulaires de la maladie ou pour développer de nouvelles cibles thérapeutiques contre la PR comme les traitements anti-TNF- α ou anti-IL-6.

Le modèle de l'AEC se caractérise par une hyperplasie synoviale, une infiltration du tissu synovial par des cellules inflammatoires et une dégradation du cartilage et de l'os. Comme la PR, la susceptibilité à l'AEC chez la souris est liée à l'expression de gènes spécifiques du CMH II désigné chez la souris comme le complexe H-2.

Dans le modèle classique, l'AEC chez les souris est induite par immunisation avec du CII bovin. La souche la plus sensible à l'AEC expérimente H-2^a (les souris DBA/I). Néanmoins, les souris C57BL/6 expérimentant H-2^b peuvent aussi développer une AEC après immunisation par du CII de poulet.

L'immunopathologie de l'AEC est liée à une réponse des LT et des LB contre le CII. Les LT activés contre le collagène, sont capables d'induire l'arthrite chez les souris naïves. Les LB ont également un rôle dans l'activation des lymphocytes T spécifiques au collagène et ils sont responsables de la production d'anticorps anti-CII. En outre, les LT en synergie avec les LB, activent d'autres types cellulaires comme les neutrophiles, les macrophages, les synoviocytes et les chondrocytes (Brand et al., 2007).

- L'arthrite de la souris transgénique pour le TNF- α humain

Les souris transgéniques pour le TNF- α humain (Tg197) expriment le cDNA de ce gène modifié dans sa séquence 3' UTR. Cette séquence est remplacée par la région 3' UTR du gène β -globine. Cette modification induit une arthrite spontanée chronique dès 3 à 4 semaines d'âge (Keffer et al., 1991). L'arthrite chez ces souris se manifeste sous la forme d'un gonflement des articulations, des

troubles dans le mouvement et une perte de poids. Ces souris développent également une hyperplasie de la membrane synoviale avec des articulations infiltrées par les cellules polynucléaires et les lymphocytes.

- Le modèle de KBxN

Ce modèle est le résultat du croisement entre une souris C57BL/6 transgénique pour le TCR (souris KRN) avec une souris immuno-déficiente NOD. Le TCR chez la souris KRN reconnaît un peptide dérivé de la G6PI (Glucose-6-phosphate isomerase), enzyme cytosolique exprimée de façon ubiquitaire dans différentes cellules. L'activation des cellules T via le TCR, induit l'activation des LB produisant des auto-anticorps contre le G6PI. Ces anticorps déclenchent une arthrite chronique sévère à partir de 3 semaines d'âge (Nandakumar and Holmdahl, 2006).

En outre, le transfert de sérum des souris K/BxN contenant des auto-anticorps contre la G6PI aux souris naïves induit également une arthrite spontanée, suivie une phase de déclin quinze jours après le transfert de sérum (Monach et al., 2008).

1.2 Le psoriasis

1.2.1 Présentation

- Epidémiologie

Le psoriasis est une maladie inflammatoire chronique de la peau qui affecte entre 1% et 2% de la population mondiale. Il évolue par poussées et rémissions et il n'y a pas de prévalence de sexe. (Parisi et al., 2013).

- Aspects cliniques

Le psoriasis est cliniquement caractérisé, le plus souvent, par des plaques arrondies ou ovalaires, érythémato-squameuses bien limitées. Leur distribution est habituellement symétrique sur les convexités (coudes et genoux, lombes). Les autres formes cliniques de cette maladie sont le psoriasis inversé, touchant les grands plis (aines, aisselles, régions sous mammaires), le psoriasis pustuleux et le psoriasis en gouttes. Il existe trois formes graves de cette maladie comme psoriasis érythrodermique, les psoriasis pustuleux généralisé et la forme associée à un rhumatisme avec arthrites destructrices (Nedoszytko et al., 2014).

- Etiologie

Bien que l'étiologie de cette maladie ne soit pas complètement élucidée, il existe des facteurs génétiques et environnementaux qui interviennent dans le psoriasis.

➤ *Les facteurs génétiques*

La prévalence de la maladie chez des sujets apparentés au premier degré avec un patient atteint de psoriasis est plus élevée. En outre des études effectuées sur des jumeaux ont montré que le taux de concordance pour cette maladie est plus élevé chez les jumeaux monozygotes (65 à 72%) que chez les dizygotes (15 à 30%) (Perera et al. 2012). L'ensemble de ces études confirme l'implication de facteurs génétiques dans la susceptibilité au psoriasis.

Implication du CMH

Les études de liaison génétique font apparaître le locus PSORS1 comme un déterminant majeur du psoriasis. Ce locus, situé sur le chromosome 6p, est associé aux gènes CMH-I, et notamment à l'allèle HLA-Cw6. Les patients porteurs de cet allèle ont un risque 10 fois plus élevé de développer un psoriasis (Chandra et al., 2015).

Implication des gènes non-CMH

Plusieurs études ont mis en évidence d'autres gènes non CMH qui confèrent une susceptibilité au psoriasis comme les gènes codant LCE (Late cornified envelop), IL-23, IL17 et NF-kB (Chandra et al. 2015).

➤ *Les facteurs environnementaux*

La prévalence du psoriasis est augmentée chez des patients tabagiques. Même si le fumeur est sevré, le risque d'apparition du psoriasis persiste encore 20 ans après le sevrage (Naldi et al., 2005).

L'effet du stress et des médicaments peuvent aussi être impliqués dans le développement de cette maladie ainsi que des facteurs mécaniques qui induisent un traumatisme cutané.

1.2.2 Immunopathologie du psoriasis

- Les médiateurs cellulaires

➤ *Immunité innée*

Les kératinocytes

Les KCs sont les cellules majoritaires de l'épiderme. Ils permettent le maintien de l'intégrité de la peau qui sert de barrière mécanique, ainsi que dans l'initiation et l'entretien des réponses immunitaires de la peau.

Dans le psoriasis, la vitesse de la prolifération des KCs est augmentée, ce qui conduit à la maturation incomplète de ces cellules lors de la différenciation épidermique. Les KC peuvent également produire des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 α , l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-15, l'IL-18 et l'IL-20, ainsi que des facteurs pro-angiogéniques, tels que le VEGF. L'ensemble du processus pathologique du psoriasis semblent être médiés par ces cytokines (Balato et al., 2012a).

Les cellules dendritiques

Plusieurs études ont montré que les CD ont un rôle important dans le psoriasis.

Dans le derme, le rôle pathologique de deux types de CD, les CD plasmacytoïdes et les myéloïdes a été mis en évidence dans le psoriasis. Dans le psoriasis, les pCDs sont activées suite à l'activation des TLR-9 et -7, et sécrètent en retour de l'IFN- α qui favorise la maturation et l'activation des mCDs (Gilliet et al., 2008). La présence d'un grand nombre de mDC dans le derme au niveau des lésions cutanées psoriasiques, par rapport à celui d'une peau de sujet sain, suggère

que ces cellules pourraient jouer un rôle crucial dans le psoriasis (Albanesi et al., 2009). Les mCD sont activées via l'IFN- α sécrété par les pCDs, qui sécrètent l'IL-23. Cette dernière induit la différenciation des Th17. En outre, les cellules mCD activées sont capables de sécréter l'IFN- γ qui induit les Th1. Dans ce sens, une étude a montré que les mCDs isolées des lésions psoriasiques sont capables d'induire la polarisation des LT vers un profil Th1 ou Th17 (Zaba et al., 2009).

Les macrophages

L'IFN- γ sécrété par les cellules T psoriasiques peut induire la sécrétion de chimiokines comme MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein 1) afin de recruter des monocytes du sang vers le derme où ils se différencient en macrophages. Ces derniers, une fois activés, sécrètent à leur tour de grandes quantités de TNF- α impliqué dans l'inflammation du psoriasis (Perera et al., 2012).

Les neutrophiles

Les neutrophiles infiltrent la peau des patients atteints de psoriasis. Ces cellules peuvent former des NET qui est composés de chromatine associée à des enzymes comme l'élastase pour lyser les antigènes extracellulaires comme l'ADN ou l'ARN associé à la protéine anti-microbienne comme le LL-37 (Pinegin et al., 2015). Les neutrophiles de la peau de patients atteints de psoriasis ont une forte tendance à former des NET en comparaison à des sujets sains. Dans ce sens, chez les mêmes patients, l'IL-17 est libérée par les neutrophiles lors de la formation des NET au sein des lésions psoriasiques (Lin et al., 2011).

➤ *Immunité adaptative*

Les lymphocytes T

CD8⁺

Plusieurs études ont mis en évidence l'importance de cette population dans le psoriasis. Le pourcentage de CD8 est élevé chez les patients atteints de psoriasis par rapport aux sujets sains (Kapp, 1990). En outre, une étude récente a montré une augmentation des CD8 dans les lésions cutanées de patients atteints de psoriasis. Cette étude a révélé que les CD8 constituent une source de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- γ , l'IL-17 et l'IL-22 dans les lésions cutanées du psoriasis (Hijnen et al., 2013).

Les cellules CD4⁺

Th1

Ces cellules sécrètent des cytokines telles que l'IFN- γ et le TNF qui favorisent le développement et la persistance des lésions psoriasiques. Ces cytokines peuvent activer les voies de NF- κ B, STAT-1 qui régulent l'expression de nombreuses molécules comme iNOS, IL-8, impliquées dans la réponse inflammatoire (Das et al., 2009).

Th17

Ces cellules se différencient en présence d'IL-23 sécrétée par les CD dans le psoriasis. Les Th17 se trouvent en plus grand nombre au sein des plaques psoriasiques chez les patients atteints de psoriasis que les sujets sains. Ces cellules sont responsables de la sécrétion des cytokines IL-17, IL-22 et TNF- α qui interviennent dans l'inflammation (Jadali and Eslami, 2014).

Treg

Le rôle des Tregs dans le psoriasis n'est pas encore clair. Des résultats contradictoires montrent une diminution numérique ou un déficit de l'activité suppressive de cette population chez les patients atteints de psoriasis (Richetta et al., 2011, Sugiyama et al., 2005). En revanche, d'autres études ont démontré que les Tregs sont augmentés dans le sang périphérique et des lésions psoriasiques et que cette augmentation est positivement corrélée avec la sévérité de la maladie (Zhang et al., 2010, Yan et al., 2010).

Une étude récente a montré un phénotype inflammatoire des cellules Tregs isolées à partir des lésions de patients atteints de psoriasis sévère. Ces Tregs ont été identifiées comme des cellules sécrétrices d'IL-17 qui se sont différenciées sous l'influence de l'IL-23 (Bovenschen et al., 2011).

Les lymphocytes T $\gamma\delta$

Ces cellules se trouvent en abondance dans l'épiderme et le derme des souris et représentent 4% des leucocytes dermiques humains. Le pourcentage de cette population cellulaire est élevé dans la peau des patients atteints de psoriasis.

Une fois que les mCD sont activées, elles sécrètent l'IL-23. Cette cytokine peut induire les LT $\gamma\delta$ via les récepteurs de l'IL23R. Ces cellules sécrètent en retour de l'IL-17. Les LT $\gamma\delta$ sont connus comme étant une source importante d'IL-17 dans le derme des patients atteints de psoriasis (Cai et al., 2011). Une étude récente a montré que le traitement par MTX dans le modèle expérimentale de psoriasis induit par l'imiquimod chez les souris, diminue la sévérité et le développement de la

maladie. Cette diminution est associée à la baisse de l'expression des LT $\gamma\delta$ sécrétants d'IL-17 dans la peau (Byamba et al., 2014). Ces cellules sécrètent également l'IL-22 qui est une autre cytokine pro-inflammatoire impliquée dans le psoriasis.

- Les médiateurs cytokiniques

De nombreuses cytokines contribuent à l'apparition et au développement du psoriasis. Les cytokines IFN-(α , γ), IL-1 (α , β), IL-36 (α , β , γ), IL-22, TNF- α , IL-17 et IL-23 jouent des rôles majoritaires dans cette maladie. Nous détaillons ici les plus importantes.

➤ *TNF- α*

Cette cytokine est sécrétée par différentes cellules, notamment par les mastocytes, les Th1 et les Th17 qui se trouvent dans la peau. Un taux élevé de TNF- α est retrouvé dans le sang et dans la peau des patients souffrants de psoriasis (Balato et al., 2012a). La thérapie anti-TNF est une stratégie efficace pour contrôler le psoriasis.

➤ *IL-17*

Plusieurs équipes ont mis en évidence la sécrétion de cette cytokine dans les lésions des patients atteints de psoriasis. Chez les patients et dans les modèles expérimentaux, l'IL-17 peut être sécrétée par les cellules CD8, Th17, les T $\gamma\delta$. Cette cytokine induit différentes cellules comme les kératinocytes et les fibroblastes sécrétant nombreux médiateurs inflammatoires incluant les cytokines (Ha et al., 2014). Ces derniers peuvent recruter différentes cellules inflammatoires dont les neutrophiles.

Il a été montré que la thérapie anti IL-17A est une stratégie thérapeutique efficace dans le traitement du psoriasis (Hueber et al., 2010).

➤ *IL-23*

L'IL-23 est sécrétée principalement par les mCD et en faible quantité par les kératinocytes. Cette cytokine induit l'expression de l'IL-17 par les Th17. Une étude a montré une sécrétion importante d'IL-23 dans les lésions psoriasiques. La présence de l'IL-23 dans cette étude a été associée à une augmentation des Th17 chez les patients atteints de psoriasis (Lee et al., 2004). En outre, l'injection intracutanée de cette cytokine chez les souris induit le développement des signes cliniques du psoriasis comme l'érythème, l'infiltration des cellules inflammatoires ainsi qu'une hyperprolifération de l'épiderme (Zheng et al., 2007).

De même, l'administration d'anticorps anti IL-23 (anti p40) montre que l'inhibition de cette cytokine est une stratégie thérapeutique efficace. L'ensemble ces résultats confirment le rôle pro-inflammatoire de cette cytokine dans la physiopathologie du psoriasis (Krueger et al., 2007).

➤ *IL-22*

Une expression élevée de l'ARNm de l'IL-22 a été mise en évidence dans les lésions psoriasiques ainsi que dans le sérum des patients atteints de psoriasis (Wolk et al., 2004). Cette cytokine est sécrétée principalement par les Th17, les LT $\gamma\delta$ et les CD8. Elle induit la prolifération des kératinocytes. De plus, dans le psoriasis, l'IL-22 peut induire l'expression des protéines pro-inflammatoires comme la β -défensine, S100 et le peptide anti-microbien LL-37(Wolk et al., 2006).

➤ *IFN- α*

Une étude a montré que l'inhibition de la voie signalisation de l'IFN- α chez les souris déficientes en IRF-2 (IFN regulatory factor) protège les souris du développement du psoriasis dans le modèle de psoriasis induit par xénogreffe. Ceci suggère que l'IFN- α joue un rôle important dans le développement de cette maladie (Nestle et al., 2005). Une autre étude a montré une apparition ou une aggravation de lésions du psoriasis chez des patients traités par l'IFN- α pour l'hépatite C (Afshar et al., 2013). Cette cytokine peut être sécrétée par les CD8 activées et induire les Th1 et les Th17.

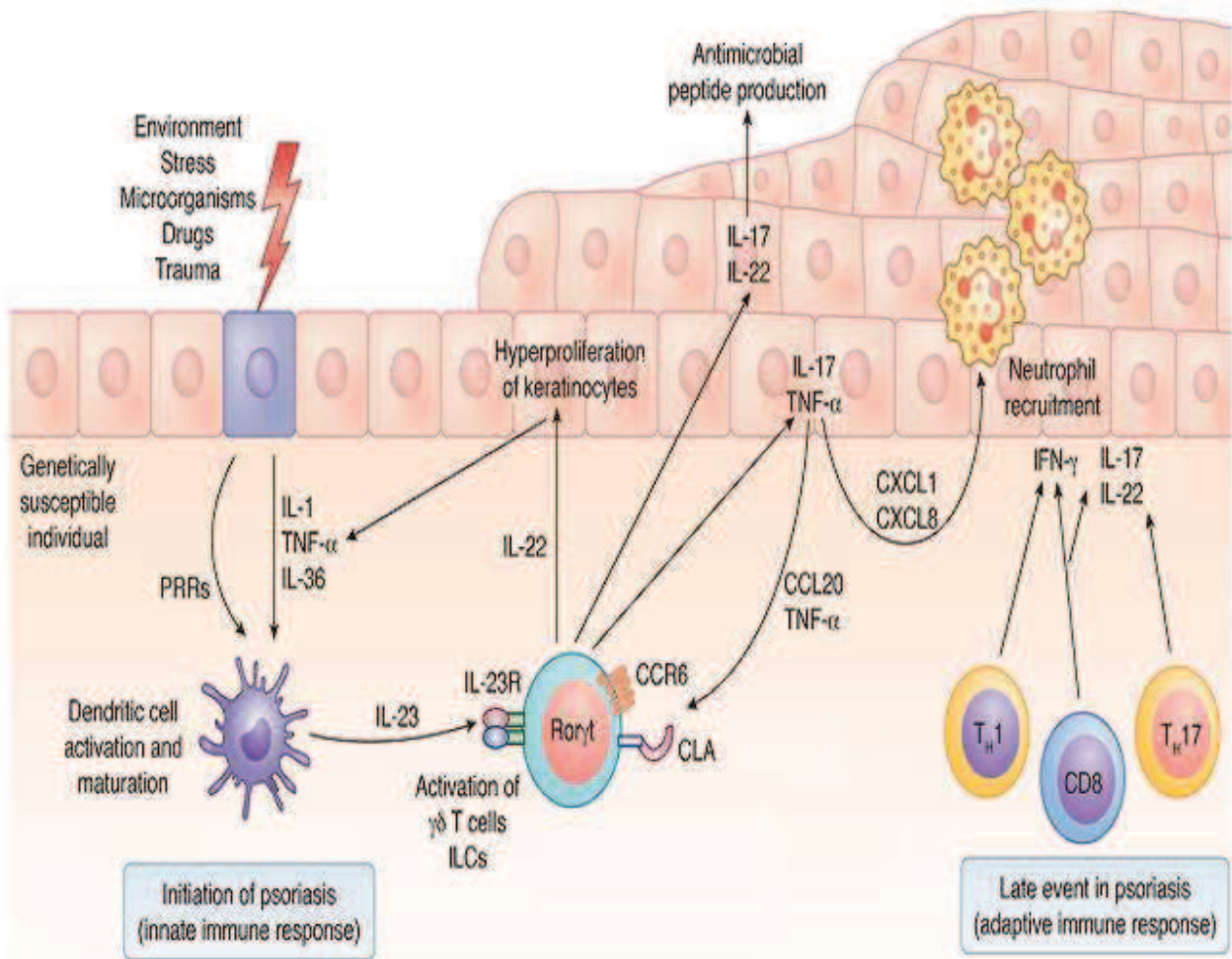


Figure 2 : Interaction entre cytokines et cellules impliquées dans la physiopathologie du psoriasis (Becher and Pantelyushin, 2012).

1.2.3 Les modèles expérimentaux de psoriasis

Plusieurs approches expérimentales ont été élaborées pour étudier les mécanismes physiopathologiques du psoriasis. Nous en citons quelques unes.

- Modèle de psoriasis par xéno greffe chez les souris SCID

Ce modèle est obtenu en réalisant une greffe de peau lésée de patients atteints de psoriasis chez des souris SCID BALB/c. Les souris receveuses de greffe développent un psoriasis en plaques identique à celui de l'homme. Les caractéristiques histologiques du psoriasis dans ce modèle peuvent être maintenues pendant une durée de 16 à 20 semaines après la greffe. On trouve une infiltration importante des CD4 et des Th17 au sein des lésions psoriasiques. Ce modèle a été utilisé pour développer le traitement anti IL-17 dans le psoriasis (Raychaudhuri and Raychaudhuri, 2010).

- psoriasis de souris transgénique STAT-3

La souris transgénique STAT-3, (Tg (KRT5-Stat3)), surexprime le gène Stat3, sous l'influence du promoteur de la kératine 5 (KRT5). Les kératines 5 sont exprimées au niveau de l'épiderme.

Cette modification génique induit des lésions cutanées similaires au psoriasis. Dans ce modèle, on observe une hyperplasie de l'épiderme et une infiltration de cellules inflammatoires comme CD4⁺, CD8⁺ et les neutrophiles au niveau du derme (Gudjonsson et al., 2007).

Il existe aussi des autres modèles des souris transgéniques qui développent le psoriasis, notamment les souris transgéniques l'IL-20, Tg (KRT14-Il20) et les souris transgéniques leptine, Tg (KRT5-Lep).

- Psoriasis induit par l'imiquimod (IMQ)

L'IMQ est un ligand agoniste du TLR7. La présence de ce ligand peut activer les pCD qui expriment le TLR7. L'application quotidienne d'IMQ sur la peau des souris induit une inflammation cutanée avec les lésions qui ressemblent à celles du psoriasis en plaques. Le psoriasis induit par IMQ, est dépendant de la présence des cellules T et des cytokines comme l'IL-23, l'IL-17 et l'IL-22. Ce modèle est un modèle rapide et pratique qui permet en outre d'élucider des mécanismes pathogéniques et d'évaluer de nouvelles thérapies dans le psoriasis (Van der Fits et al., 2009). Dans notre travail, nous avons utilisé ce modèle du psoriasis induit par l'IMQ.

2. Les lymphocytes T régulateurs

2.1 Présentation

Gershon et Kondo ont découvert dès 1970 que les cellules T pouvaient non seulement exalter la réponse immunitaire mais elles peuvent aussi l'inhiber ou la diminuer. Ces cellules ont d'abord été qualifiées de cellules T suppressives (Gershon and Kondo, 1970). Jusqu'au 1980, on manquait des marqueurs permettant d'identifier spécifiquement ces cellules et la méconnaissance des mécanismes par lesquels elles exerçaient leur activité suppressive, ne permettait pas d'établir un lien entre des Tregs et la tolérance immunitaire. Plus tard, la découverte de l'anergie et de la délétion clonale dans la tolérance immunitaire a renforcé des études sur ces cellules (Pullen et al. 1988).

On peut classer les Tregs selon leur expression de Foxp3 en deux populations.

2.2 Les LT régulateurs Foxp3⁻

2.2.1 Les Tr1

Les cellules Tr1 sont connues pour leur importante capacité sécrétrice d'IL-10. Elles sont aussi capables de sécréter du TGF- β chez l'homme et la souris. En outre elles secrètent de petites quantités d'autres cytokines comme IL-2, IL-5 et IFN- γ . Puisqu'il n'existe pas de marquage spécifique pour identifier ces cellules, elles sont identifiées en tant que Tregs sécrétant de l'IL-10 et du TGF- β qui n'expriment pas consécutivement Foxp3 (Peterson, 2012).

L'activité suppressive de Tr1 est dépendante de l'IL-10. Dans ce sens, une étude *in vitro* a montré que les Tr1 incubées en présence d'anticorps neutralisant l'IL-10 perdent leur capacité suppressive. Ces cellules sont capables d'inhiber la colite induite par le transfert de CD4⁺ CDRB^{hi} *in vivo* chez les souris (Groux et al., 1997). L'injection de Tr1 chez les souris dans l'AEC diminue la sévérité et l'incidence de la maladie (Martire et al. 2010). La faible fréquence de ces cellules dans la synoviale des patients atteints de PR est inversement corrélée avec la fréquence des Th1 (Yudoh et al., 2000). Par conséquent, toutes ces études suggèrent l'importance de cette sous population de Tregs dans les maladies auto-immunes

2.2.2 Les Th3

Les Th3 ont été identifiées pour la première fois dans le modèle de l'EAE (Encéphalomyélite auto-immune expérimentale). Cette étude a mis en évidence que l'induction des cellules Th3

productrices de TGF- β inhibait la maladie (Kuerten et al. 2006). Ces cellules sont caractérisées par leur absence d'expression de Foxp3 et leur importante capacité à sécréter du TGF- β , cytokine par laquelle elles exercent leur action suppressive. Chez la souris, les Th3 sont capables d'inhiber le développement de la colite (Weiner et al., 2011).

2.2.3 Les iTreg35

Les cellules iTregs 35 sont caractérisées par leur capacité de sécrétion d'IL-35. Ces cellules ont une capacité suppressive importante dépendant de l'IL-35. Dans ce sens, elles inhibent l'inflammation dans les modèles d'IBD (Inflammatory bowel disease) et d'EAE chez les souris (Collison et al., 2010). Cependant, le rôle anti-inflammatoire de l'IL-35 n'est pas si claire, et dans notre laboratoire, nous avons montré que cette cytokine exerçait plutôt un rôle pro-inflammatoire dans l'AEC (Thiolat et al., 2014a).

Dans la suite de ce manuscrit, nous parlerons uniquement des lymphocytes T régulateurs Foxp3⁺ nommés Tregs

2.3 Les LT régulateurs Foxp3⁺

2.3.1 Les marquages des Tregs

En 2001 l'induction de la mutation sur le gène codant Foxp3 a montré spontanément une auto-immunité scurfy chez la souris et IPEX chez l'Homme (Brunkow et al. 2001, Wildin et al. 2001). Par la suite, il a été montré que Foxp3 est exprimé exclusivement par les Tregs et cette protéine est depuis reconnue comme le marqueur spécifique des Tregs. En revanche, puisque ce marqueur est une protéine intracellulaire, l'analyse fonctionnelle de Tregs Foxp3⁺ est impossible. Par conséquence, il faudrait identifier d'autres marqueurs membranaires spécifiques qui permettent de faire des analyses fonctionnelles. Les Tregs peuvent être identifiés en CD4⁺CD25⁺ (chaîne α du récepteur de l'IL-2) chez les souris. Cette population est identifiée chez l'Homme par une forte expression de CD25 (CD25^{high}) et une faible expression de la molécule CD127 (chaîne α du récepteur de l'IL-7). Dans ce sens, environ 90% des Tregs CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} expriment Foxp3 (Liu et al., 2006).

Les Tregs expriment également la Neuropilin 1 (Nrp1) qui est l'un des récepteurs membranaires du VEGF (Vascular endothelial growth factor). L'expression de ce récepteur est élevée sur les Tregs et est corrélée avec l'expression de Foxp3. A l'inverse, son expression est faible sur les

Tregs Foxp3⁻. La Nrpl joue un rôle important dans l'activité suppressive de Tregs alors qu'il ne participe pas dans la différenciation et la maturation des Tregs. (Lin et al. 2013).

2.3.2 Distribution tissulaire des Tregs

Les Tregs ont été retrouvés initialement dans les organes lymphoïdes secondaires chez les souris et dans le sang périphérique de l'homme. Aujourd'hui, nous savons que ces cellules se trouvent dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes. Ces cellules expriment un nombre important de molécules d'adhérence et de récepteurs aux chimiokines qui leur permettent de migrer vers les sites inflammatoires. L'expression des récepteurs de homing a également un rôle crucial dans la distribution tissulaire de cette population cellulaire. Par exemple, l'expression de la chaîne E α d'intégrine (CD103) et de la molécule CCR4, récepteur de chimiokines, sur les Tregs est importante pour la migration dans la peau. Le déficit ou la suppression de l'expression de l'une de ces molécules sur les Tregs induit une maladie auto-immune de la peau (Sakaguchi et al., 2008). Les cellules Tregs peuvent aussi être trouvées en abondance au sein des tumeurs, où elles inhibent la réponse anti-tumorale et la clairance des tumeurs. Dans le cas de l'inflammation, en fonction du tissu impliqué, ces cellules se retrouvent dans le site spécifique de l'inflammation, par exemple dans le liquide synovial de patients atteints de PR (Cao, 2010).

2.3.3 La migration des Tregs

Quand les Tregs quittent le thymus, ils circulent dans le sang et ils migrent au travers de l'HEV (High endothelial venules) vers les organes lymphoïdes secondaires. Cette migration est due à l'interaction de la L-selectine (CD62L) et du récepteur CCR7 exprimé par les Tregs avec leurs ligands respectifs, PNA α (Peripheral node addressin) et CCL21 exprimés par l'HEV. Les cellules Tregs qui se développent dans le thymus comprennent une population homogène de cellules CD25^{hi}CD62L⁺CCR7⁺ qui migrent préférentiellement vers les tissus lymphoïdes secondaires (Campbell and Koch, 2011).

CD62L est une molécule d'adhérence intervenant dans l'extravasation lymphocytaire vers les organes lymphoïdes. Différentes études ont montré que les CD4⁺ CD25⁺ CD62L⁺ qui ont migré dans les organes lymphoïdes secondaires sont plus abondants que les Tregs CD4⁺CD25⁺CD62^{low/-}. Dans ce sens, l'injection de CD4⁺ CD25⁺ CD62L⁺ isolée de la rate des souris naïves en souris NOD, retarde ou évite le développement de diabète (Szanya et al., 2002) ou la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD) (Ermann et al. 2005). L'absence d'expression de CCR7 dans les Tregs apporte un déficit dans leur migration vers les ganglions. De même, chez ces souris les Tregs

n'exercent plus leur activité suppressive dans l'IBD (Schneider et al. 2007). En conséquence, CD62L et CCR7 sont nécessaires pour la migration des Tregs dans le ganglion et pour leur fonction suppressive. La migration des Tregs dépend aussi de l'inflammation et de la nature de la réponse inflammatoire locale. Les Tregs possèdent d'autres récepteurs homings comme CCR1, CCR2, CCR4, CCR5, CCR8, CXCR4, CXCR5, $\alpha 4\beta 1$ intégrin, $\alpha E\beta$ intégrin et le ligand sélectin P et E qui leur permettent de migrer vers le site de l'inflammation.

2.4 Développement des Tregs

Les cellules Tregs en fonction de l'endroit de leur développement, sont classées en deux catégories : les lymphocytes T régulateurs naturels (nTregs) et les lymphocytes T régulateurs induits (iTregs). Les nTregs sont générés dans le thymus, alors que les iTregs sont différenciés en périphérique à partir de cellules $CD4^+ Foxp3^-$.

2.4.1 Développement des nTregs

Le développement des nTregs dans le thymus nécessite tout d'abord un premier signal fourni par le TCR. Cependant, le premier signal n'est pas suffisant pour initier le développement des Tregs. Le signal secondaire est en effet nécessaire et est induit par interaction entre molécules de co-stimulation, exprimées sur les nTregs et leurs ligands exprimés sur les CPA. Les molécules de co-stimulation contribuant au développement des Tregs comprennent la molécule CD28 qui se lie aux molécules CD80/86 (B7) exprimées par les CPA. Lors de cette interaction, la molécule CD28, grâce à son domaine intra-cytoplasmique, se lie à la protéine tyrosine kinase Lck. Ceci est essentiel pour l'expression de Foxp3.

L'IL-2 a un rôle important dans le développement et le maintien des Tregs et son absence induit une diminution de 50% du nombre de Tregs dans le thymus (Tai et al. 2005). Le déficit en CD25 est lié quant à lui à une fonction réduite des Tregs. En outre, une étude a montré que la liaison de l'IL-2 à son récepteur sur les nTregs, induit l'activation du facteur de transcription STAT5. Ce facteur se fixe sur le promoteur de Foxp3 et induit l'expression de Foxp3 par les Tregs (Burchill et al. 2007). La déficience en IL-7 ou IL-15 ou en les deux cumulées, n'affecte pas l'expression de Foxp3 exprimé par les thymocytes des souris (Bayer et al. 2008). En revanche, l'absence de la sous unité γc commune aux récepteurs des cytokines IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21 inhibe la différenciation des nTregs.

Le TGF- β est une autre cytokine impliquée dans la tolérance immunitaire et le développement des nTregs. Les souris déficientes en TGF- β 1 meurent de maladies auto-immunes car cette cytokine influence directement la survie de Treg. Cependant, le TGF- β n'est pas essentiel pour l'expression de Foxp3 au cours du développement des nTregs (Yuan and Malek, 2012).

2.4.2 Développement des iTregs

Les cellules CD4⁺Foxp3⁻ naïves du thymus peuvent se différencier en cellules iTregs en périphérie. Différentes études ont montré que les iTregs peuvent être générés *in vitro* à partir des CD4⁺ Tconv naïves (CD4⁺ CD25⁻) isolées des ganglions ou du sang périphérique en présence d'IL-2 et de TGF- β (Schmitt and Williams, 2013). Le TGF- β favorise la liaison de NFAT et Smad3 à l'enhancer de gène Foxp3 et induit la transcription de Foxp3 (Tone et al., 2008). L'absence d'IL-2 a une influence négative sur le développement des iTregs. Le développement des iTregs dépend également de l'activation de STAT5 qui est maintenu par la signalisation de l'IL-2R (Yuan and Malek, 2012).

2.5 Activité suppressive des Tregs

Les lymphocytes T régulateurs sont capables de maintenir la tolérance du système immunitaire en inhibant une large spectre de populations cellulaires comprenant les cellules NK (Natural killer), NKT, les lymphocytes T et B, les cellules dendritiques et les monocytes. Ils exercent leurs activités suppressives via quatre mécanismes qui sont : la modulation de la fonction des cellules dendritiques, la sécrétion de cytokines et de molécules inhibitrices, l'induction de la cytolysse et la perturbation du métabolisme (Figure3).

2.5.1 Modulation de la fonction des cellules dendritiques

- Interactions cellulaires dépendantes de CTLA-4

CTLA-4 est une molécule de co-stimulation qui est exprimée à la surface des lymphocytes T auxiliaires activés. Le rôle de CTLA-4 dans l'activité suppressive des Tregs a été mis en évidence en utilisant les souris déficientes en CTLA-4 ou l'anticorps neutralisant de CTLA-4 (Takahashi et al. 2000). Au moment de l'interaction entre les Tregs et les CD, CTLA-4 exprimée par les Tregs, est en compétition avec le récepteur CD28 exprimé par les T effecteurs, pour la liaison à leur ligand B7 exprimé par les CD. Par conséquent, la liaison entre le CTLA-4 et B7 empêche l'activation des Tconv.

L'interaction entre CTLA-4 et B7, induit l'expression du facteur transcription foxO3 par les cellules dendritiques. FoxO3 inhibe la production des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-6. En outre, les CD s sécrètent l'enzyme IDO (Indoleamine 2,3-dioxygénase) suite à leur interaction avec les Tregs. Cet enzyme est une métallo-enzyme intra-cytoplasmique capable de dégrader et de transformer le tryptophane (Trp) en un métabolite pro-apoptique, la kynurénine. L'appauvrissement de tryptophane par l'IDO peut inhiber les cycles cellulaires et la différenciation des LT. Dans ce sens, une étude a montré que les souris déficientes en IDO sont plus susceptibles à l'EAE. Cette déficience est liée à une diminution des Tregs et à l'induction des réponses Th1 et Th17 (Yan et al. 2010).

- Interactions cellulaires indépendantes du CTLA-4

LAG-3 (Lymphocyte activation gene-3) est abondamment exprimée sur les Tregs actifs. L'implication de cette protéine dans la fonction suppressive des Tregs a été suggérée par une étude montrant qu'un anticorps neutralisant LAG-3 est capable d'inhiber l'activité suppressive des Tregs *in vitro* et *in vivo* (Huang et al. 2004).

LAG-3 est capable de se lier au CMH II exprimé par les CPAs. La liaison de LAG-3 avec le CMH II exprimé par les CD s immatures, induit un signal négatif pour la maturation et la capacité immunostimulante des CD s (Liang et al., 2008).

La neuropiline1 exprimée par les Tregs favorise la création d'une synapse immunologique entre les Tregs et les CD s . Cette synapse contrôle le déroulement de la réponse immunitaire. La neutralisation de la Nrp1 par un anticorps anti Nrp1 abroge l'activité suppressive des Tregs. Cela suggère l'implication de Nrp-1 dans l'activité immunoregulatrice des Tregs (Sarris et al. 2008).

2.5.2 Sécrétion des cytokines

- Transforming growth factor-beta (TGF- β)

Le TGF- β est une cytokine intervenant dans l'induction des iTregs. Cette cytokine est essentielle pour la fonction immunosuppressive des Tregs. Il a été rapporté que les Tregs déficients en TGF- β ne sont pas capables de supprimer la prolifération de cellules T conv *in vitro* (Marie et al., 2005).

La production de cette cytokine via les Tregs contrôle la réponse immunitaire induite par un allergène (Joetham et al., 2007) et empêche l'apparition ou le développement de la colite chez les souris (Schmidt et al., 2012). Le TGF- β produit par les Tregs peut également contrôler la

prolifération des CD8⁺ et leur fonction dans les îlots pancréatiques et retarder le développement du diabète chez les souris Tet-TNF- α /CD80 (Green et al. 2003).

- IL-10

L'IL-10 secrétée par les Tregs est capable de diminuer l'expression du CMH II et des molécules CD80/CD86 sur les macrophages et les CD. Ce mécanisme inhibe l'activation et la prolifération des T CD4⁺. En outre, l'IL-10 peut inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines et des récepteurs de chimiokines par les CD et les macrophages activés (Palomares et al., 2014). Le rôle anti-inflammatoire de cette cytokine secrétée par les Tregs a été montré dans la prévention de la colite (Chaudhry et al., 2011). Deux études ont également montré que l'IL-10 est cruciale pour inhiber la réponse des Th17 dans ce modèle (Huber et al. 2011). En outre, cette cytokine inhibe les Th1 et exerce de ce fait un effet négatif sur la sécrétion de l'IFN- γ dans un modèle d'inflammation cutanée. (Sojka and Fowell, 2011).

- IL-35

Cette cytokine appartient à la famille de l'IL-12. Elle est formée par l'association de p35, sous unité commune à l'IL-12, et d'EBI3 (Epstein-Barr virus induced gene3) sous unité commune à l'IL-27. Cette cytokine est exprimée principalement par les Tregs et elle se lie à son récepteur composé des sous unités de l'IL-12R β 2 et gp130. Cette interaction induit le recrutement des protéines kinases STAT1 et STAT4 qui induit l'expression des gènes cibles ainsi que les gènes du p35 et Ebi3. Ce dernier permet de former une boucle de rétroaction positive augmentant ainsi l'expression d'IL-35 (Olson et al. 2013).

L'implication de l'IL-35 dans la fonction immunorégulatrice des Tregs a été suggérée pour la première fois chez les souris déficientes en p35 ou en EBI3. Les Tregs isolés de ces souris ont une activité suppressive réduite *in vitro* contre la prolifération des Tconv et sont capables d'inhiber l'IBD (Collison et al. 2007). Le rôle suppressif de cette cytokine a été étudié dans différentes pathologies. Une étude *in vitro* a montré que le traitement des LT naïfs murins avec l'IL-35 favorise un phénotype iTr35 protecteur contre l'IBD (Collison et al. 2010). En outre, l'injection de cette cytokine diminue la sévérité d'AEC (Niedbala et al., 2007). Dans ce modèle, l'IL-35 est capable d'induire une population régulatrice CD4⁺ CD39⁺ qui inhibe l'AEC. Cependant le rôle de cette cytokine n'est pas si clair. Une étude récente de notre laboratoire a montré le rôle pro-inflammatoire de cette cytokine dans l'AEC (Thiolat et al., 2014a).

2.5.3 Perturbation du métabolisme

- Consommation de l'IL-2

L'IL-2 est une cytokine nécessaire pour la prolifération, le maintien et la survie des LT. La consommation de l'IL-2 par les Tregs pourrait priver les Tconv d'IL-2 et induire leur apoptose. Cela est possible seulement quand les cellules sont situées à moins d'une dizaine de micromètre. En revanche, dans le cas de l'activation des Tconv, l'action suppressive dépendante de l'IL-2 des Tregs sur les Tconv est inefficace (Vignali et al. 2008).

- Métabolisme de l'adénosine

L'adénosine est une molécule immunorégulatrice, générée par la réaction entre l'ATP (Adenosine triphosphate) ou l'ADP (Adenosine diphosphate) avec la famille des ectonucléotidases comme CD39 et CD73. Le rôle anti-inflammatoire de cette molécule est associé à ses quatre récepteurs A₁, A_{2A}, A_{2B} et A₃ qui sont couplés à une protéine G (Ernst et al. 2010). Les molécules CD39 et CD73 sont exprimées d'une manière importante sur les Tregs. L'adénosine générée sous l'influence de CD39 et CD73, se lie au récepteur A_{2A} exprimé sur les Teffs et inhibe directement la production des cytokines inflammatoires comme l'IL-2, l'IL-4, l'IFN- γ , l'IL-6 (Zarek et al. 2008). D'ailleurs, l'adénosine qui se lie au récepteur A_{2B} peut modifier l'immunogénéité et la maturation des CD_s. Ces derniers induisent indirectement une baisse de la stimulation des LT auxiliaires (Wilson et al. 2009). Le rôle immunorégulateur de l'adénosine a été observé pour la première fois dans un modèle de colite. Les Tregs isolés des souris déficientes en A_{2A} ne sont pas capables de protéger les souris de la colite alors que les Tregs normaux inhibent la maladie chez les souris. (Naganuma et al. 2006).

2.5.4 Induction de la cytolyse

Ce processus se compose de la libération de molécules cytolytiques comme les granzymes A et B ainsi que les perforines par les Tregs.

- Les granzymes

Les granzymes appartiennent à la famille des sérines protéases qui exercent une activité cytotoxique pour lyser leur cible cellulaire. Dans ce sens, les granzymes ont besoin des protéines perforines afin de pénétrer à l'intérieur des cellules, où elles peuvent induire l'apoptose.

Il a été admis pendant longtemps que la cytolyse induite par les granzymes était seulement exercée par les CD8 cytotoxiques et les NK. Plus tard Grossman et al ont montré que les Tregs exprimaient également fortement les granzymes A et faiblement les granzymes B.

Le granzyme A au sein des Tregs exercent une cytotoxicité dépendante de la perforine contre les CD4⁺ et les CD8⁺ actifs, les monocytes et les CD8 (Grossman et al. 2004). D'ailleurs, les Tregs murins expriment fortement les granzymes B et la perforine afin de tuer les cellules NK et les CD8 (Cao et al., 2007).

- Les galectines

Ce sont des protéines qui se caractérisent par leurs interactions spécifiques avec la β -galactoside. Ces protéines sont secrétées par les Tregs et peuvent induire l'apoptose des T conv.

La galectine-1 est sécrétée essentiellement par les Tregs et se lie à de nombreux ligands sur les LT. Les conséquences de cette liaison sont l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose et l'inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires. Le blocage de cette protéine diminue l'effet inhibiteur des Tregs chez les souris et l'homme. Cet effet inhibiteur est reproduit chez les Tregs générés de souris déficientes en galactine-1.

La galactine-10 est exclusivement exprimée de manière intracellulaire dans les Tregs. L'inhibition de cette protéine par des siRNA inhibe partiellement la fonction suppressive des Tregs. Les ligands intracellulaires de la galectine-10 n'ont pas été identifiés (Kubach et al. 2007, Shevach, 2009).

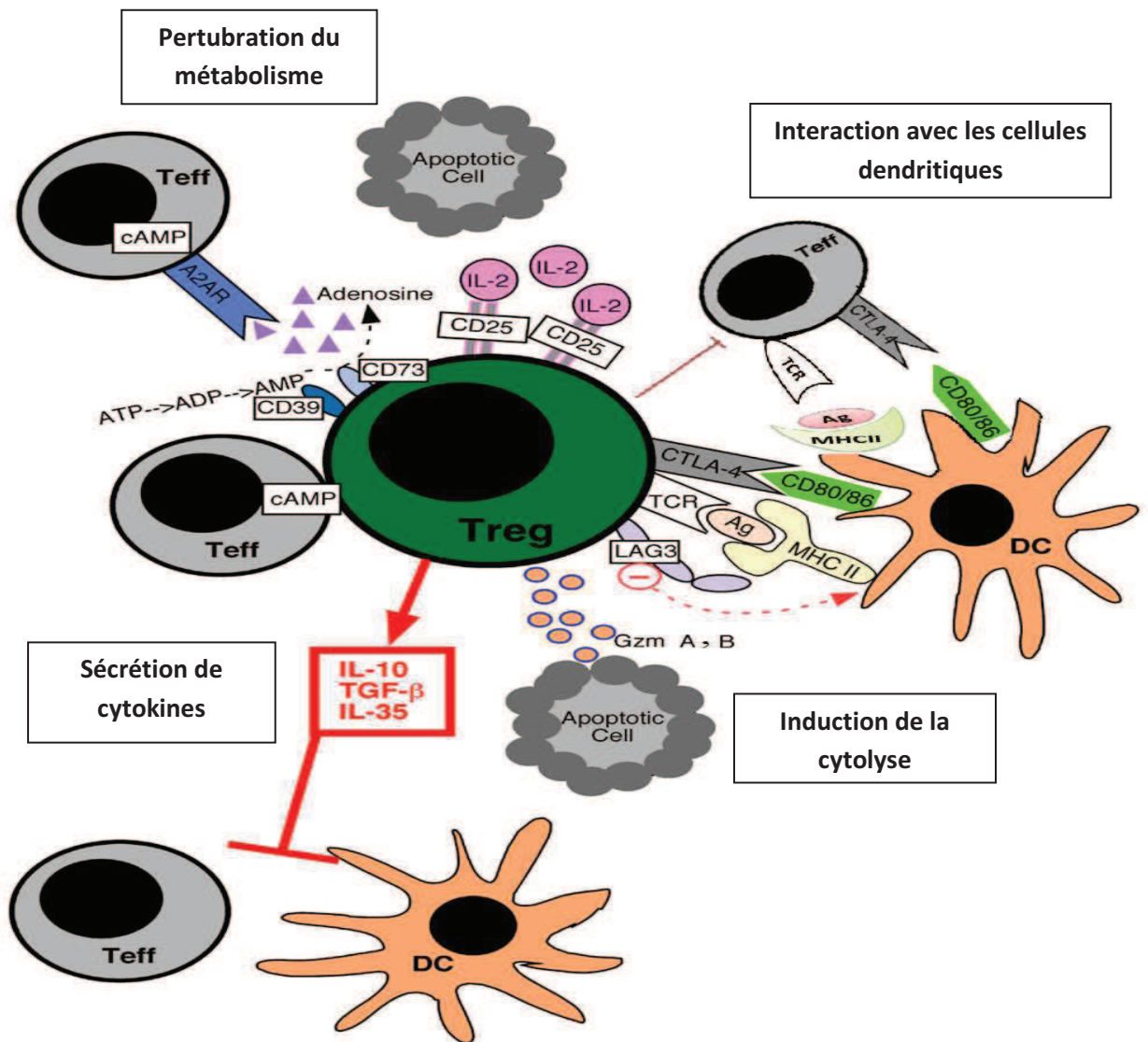


Figure 3 : Fonction d'immunorégulation des Tregs suppressives via quatre mécanismes.

2.6 Rôle physiopathologique des lymphocytes T régulateurs

La dérégulation de la tolérance immunitaire est liée à diverses pathologies. Par conséquent, les Tregs en tant que cellules médiatrices de la tolérance ont un rôle important dans l'apparition des pathologies. Ici nous citons quelques exemples des pathologies dans lesquelles les Tregs sont impliqués.

2.6.1 Les maladies auto-immunes

- Sclérose en plaques (SEP)

Le SEP est une maladie auto-immune chronique du système nerveux central (SNC), caractérisée par une démyélinisation, une perte axonale, et une atrophie cérébrale. Cette maladie est liée à l'infiltration des Th17 sécrétants d'IL-17A dans le SNC. Dans ce sens, l'inhibition de l'IL-17 ou le déficit de cette cytokine chez les souris réduit le développement d'EAE chez les souris (Komiya et al. 2006). D'ailleurs, dans le même modèle, les Tregs inhibent les Th1 pathogènes spécifiques de la myéline. Dans ce sens, le transfert des Tregs CD25⁺ améliore l'EAE alors qu'une déplétion de ces cellules par l'anticorps anti-CD25 exacerbe la maladie. Dans le sang périphérique des patients atteints de SEP, la proportion des Tregs est variable puisqu'elle peut être diminuée ou normale (Huan et al., 2005, Venken et al. 2006). Cependant la fonction suppressive des Tregs chez les patients atteints de SEP est fortement diminuée. Cette diminution a été corrélée avec la baisse de l'expression de CTLA-4 par les Tregs (Sellebjerg et al., 2012). En outre, une réduction de la fréquence de l'expression des Tregs CD39⁺ est observée chez les patients atteints de SEP (Fletcher et al., 2009).

- Diabète de type 1

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune caractérisée par la destruction des cellules beta des îlots de Langerhans qui conduit à l'hyperglycémie. L'immunologie de cette maladie est liée aux cellules Th1/Th17. Dans le modèle expérimental du diabète, chez les souris NOD, le transfert des Tregs isolés des souris résistantes au diabète ou les Tregs générés *in vitro* inhibe la maladie (Tarbell et al., 2004). Chez les patients, les Tregs présentent un déficit fonctionnel pour l'inhibition de la prolifération des LT conv et aussi pour la sécrétion d'IFN- γ (Lindley et al., 2005). Différentes études ont montré que les LTconv de patients diabétiques sont résistants à la suppression induite par les Tregs.

-Maladies inflammatoires de l'intestin

Le terme IBD comprend deux maladies principales qui sont la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse. Elles sont caractérisées par l'activation des cellules Th1, Th17 et une déficience en Tregs. Concernant le rôle des Tregs dans l'IBD, il a été démontré que la déficience de l'expression de Foxp3 conduit à un syndrome d'IPEX qui affecte essentiellement les intestins. Ceci montre le rôle important des Tregs dans le tractus gastrointestinal. Dans la plupart des études, un défaut numérique des Tregs dans l'IBD est rapporté. Bien que la fréquence des Tregs soit diminuée dans le sang périphérique chez les patients atteints d'IBD (Maul et al., 2005, Wang et al., 2011b), ces cellules se retrouvent à une fréquence plus élevée dans la muqueuse de patients. Dans ce sens, il semblerait que cette augmentation ne suffise pas à inhiber la maladie. Cependant, une étude récente a proposé que l'environnement inflammatoire de la muqueuse colique des patients atteints de la maladie Crohn contribue à la génération d'une population de Tregs Foxp3⁺ productrices d'IL-17 (Hovhannisyan et al., 2011). D'autre part, Kryczek et al ont observé la présence de la même population cellulaire chez les patients atteints de colite (Kryczek et al., 2011).

2.6.2 Psoriasis

Le psoriasis est une maladie inflammatoire chronique qui est caractérisé par une hyperplasie de l'épiderme et une infiltration de leucocytes dans la peau. Cette maladie est fortement associée aux Th17 et à l'IL-23. Des études menées sur des patients psoriatiques ont démontré que la fréquence des Tregs est variable.

Une étude a montré une fréquence élevée des Tregs dans le sang périphérique des ces patients. En outre, cette augmentation a été corrélée positivement avec la sévérité de la maladie (Chen et al., 2008). En revanche une autre étude a montré que le pourcentage des Tregs est diminué dans le sang périphérique de patients psoriatiques. Cependant, la fréquence des Tregs est améliorée chez ces patients après un traitement par anti TNF- α (Richetta et al., 2011). Un défaut dans l'activité suppressive des Tregs isolés du sang périphérique et de la peau de patients atteints de psoriasis en comparaison aux sujet sains a été rapporté (Mattozzi et al. 2013). Une étude récente a montré que les cellules Tregs issus de patients avec un psoriasis sévère sont capables de se différencier en cellules productrices d'IL-17A. L'augmentation des Tregs chez ces patients est associée avec une forte expression de ROR γ t et une diminution des Foxp3 (Mattozzi et al., 2013).

2.6.3 Cancer

Les études sur le rôle des Tregs dans le cancer montrent une fréquence élevée de ces cellules au sein des tissus tumoraux de divers types de cancers comme celui du sein, des poumons, du foie, du pancréas et les cancers gastro-intestinaux ainsi que les mélanomes malins. Les cellules tumorales sécrètent des cytokines comme le VEGF (Vascular endothelial growth factor), l'IL-10 et le TGF- β . Ces cytokines peuvent induire le recrutement des Tregs. En outre, dans un environnement tumoral, les Tregs peuvent être activés sélectivement par les CD_s présentatrices d'antigènes tumoraux. Ces derniers induisent la prolifération des Tregs inhibant l'activation des Tconv et la progression tumorale. Le recrutement des Tregs au sein des tumeurs est également lié à la sécrétion des chimiokines produites par les cellules cancéreuses (Cao, 2010). Dans ce sens, l'expression des chimiokines CCL17 et CCL22 par la tumeur dans le cancer gastrique est corrélée à une augmentation des Tregs (Nishikawa and Sakaguchi, 2010).

2.6.4 Graft -versus -host disease (GVHD)

Cette maladie est une complication majeure, observée fréquemment à la suite de greffe de cellules de la moelle osseuse et de cellules souches. La GVHD résulte de l'attaque des tissus receveurs par les lymphocytes du donneur. Cette pathologie ne survient que lorsque le donneur et le receveur ne sont pas partiellement compatibles, et que le receveur est profondément immunodéprimé ou tolérant vis-à-vis du donneur. Plusieurs études chez les souris ont montré que les Tregs CD4⁺ CD25⁺ qui inhibent l'expansion des lymphocytes alloréactifs, jouent un rôle important dans le contrôle du rejet de greffe. Dans ce sens, une étude dans un modèle de greffe de moelle osseuse d'une souris C57/BL6 à une souris de BALB/c a montré que les Tconv du donneur induisaient une GVHD létale. Cependant le co-transfert des Tregs et des Tconv du donneur induit une protection contre la GVHD chez les souris receveuses de la greffe (Hoffmann et al., 2002, Choi and Reddy, 2014). Chez l'homme, un taux important de Treg CD4⁺ Foxp3⁺ a été observé parmi les cellules receveuses après une greffe de cellules souches du sang (Rezvani et al. 2006). Cette augmentation est associée à la diminution du risque de GVHD. En outre, une autre étude a montré que chez les patients atteints de GVHD sévère, réfractaire à la corticothérapie, l'administration d'une faible dose d'IL-2 pendant 8 semaines améliore la GVHD (Koreth et al., 2011).

2.7 Lymphocytes T régulateurs et immunothérapie

Les Tregs jouent un rôle clé dans l'immunorégulation et leur activation, expansion ou inhibition pourrait donc constituer une stratégie thérapeutique dans différentes pathologies. Par exemple la déplétion des Tregs dans le cancer est une stratégie connue afin de favoriser l'action effectrice des LT dans l'environnement tumoral.

Actuellement un traitement utilisant un anti-CD25 (Denileukin diftitox) est en développement pour certains cancers pulmonaires, de l'ovaire et du sein et inhibe les Tregs dans l'environnement tumoral. Une étude a montré qu'une seule dose de ce médicament chez les patientes atteintes d'un cancer des ovaires diminue la fréquence des iTregs et augmente la fréquence des Tconv (Zou, 2006).

Enfin, un essai clinique basé sur le transfert adoptif de Treg dans la GVHD montre des résultats encourageants chez l'homme. Le fait de pouvoir expandre des Tregs *ex vivo* et *in vitro* et la possibilité du transfert adoptif des ces cellules, représentent des stratégies possibles pour traiter les maladies auto-immunes.

3. L'interleukine-33 (IL-33)

3.1 Présentation

- Historique

En 2003, l'équipe de Jean-Philippe Girard, a découvert une protéine de 30 kD fortement exprimée dans le noyau des HEV dans les amygdales, les plaques de Peyer, les ganglions lymphatiques. Elle a montré que cette protéine, grâce à une partie amino-terminale de structure hélice-tour-hélice (HTH) composée de 1-60 acides aminés (aa), est capable de se lier à l'ADN. Par conséquent, une hypothèse a été émise selon laquelle cette protéine posséderait une fonction de facteur nucléaire. Grâce à ces capacités, elle a donc été nommée NF (Nuclear factor)-HEV (Baekkevold et al., 2003). Deux ans plus tard, le NF-HEV a été reconnu comme un nouveau membre de la famille de l'IL-1 qui est un ligand du récepteur orphelin de l'IL-1, ST2. Suite à cela, le NF-HEV a été renommé IL-33 ou IL-1F (Schmitz et al., 2005).

- Structure et localisation

Le locus du gène codant pour l'IL-33 se trouve sur le chromosome 9 chez l'homme (9p24.1) et sur le chromosome 19 chez la souris (19q1). Ce gène s'étend sur 40kb d'ADN génomique et contient 8 exons. Il code pour la protéine IL-33 de 30kDa, elle est composée de 270 résidus chez les 2 espèces. On retrouve deux parties conservées qui sont les parties N-terminale (1-65 aa) et C-terminale (112-270 aa) (Figure 4.A).

Une étude en immunofluorescence réalisée sur des cellules HEK transfectées avec le gène de l'IL-33 associé au gène rapporteur de la GFP a montré que la partie N-terminale de cette protéine était responsable de sa localisation nucléaire. En outre, plusieurs études réalisées *in vitro* ont mis en évidence une superposition entre l'expression de l'IL-33 et le marquage nucléaire au DAPI. Ceci suggérerait une interaction de cette cytokine avec l'hétérochromatine. Cette interaction est réalisée grâce au motif en HTH (40-58 aa) de la partie N-terminale de la cytokine avec dimère d'histones H2A-H2B dans la structure nucléosomique de la chromatine (Roussel et al., 2008) (Figure 4 B). La délétion du motif HTH empêche l'IL-33 sa localisation nucléaire et sa liaison avec l'hétérochromatine (Schmitz et al., 2005).

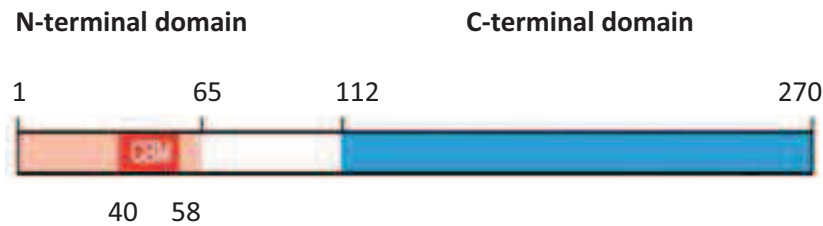
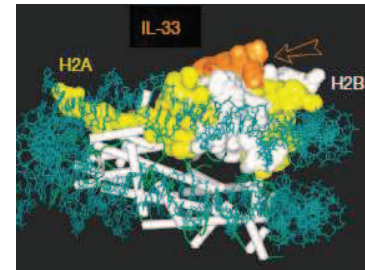
A**B**

Figure 4: Organisation de la séquence de la protéine IL-33 humaine et murine. La modélisation moléculaire du complexe CBM de l'IL-33-nucléosome sur la base de la structure aux rayons X (Roussel et al., 2008).A: l'IL-33 contient deux parties conservées N-terminale et C-terminale. La partie N-terminale contient un motif de liaison à la chromatine (CBM) 40-58 aa. La partie C-terminale contient le domaine de l'IL-1. B : L'IL-33 se lie à la chromatine via l'interaction du CBM avec le dimère d'histones H2A-H2B.

La partie C-terminale est une partie nécessaire pour la liaison de l'IL-33 à son récepteur ST2. Les résultats obtenus de la structure secondaire de l'IL-33 par résonance magnétique nucléaire (RMN) a montré la présence d'une structure β -trèfle, comprenant 12 brin β et 2 hélices- α , qui est caractéristique des cytokines de la famille de l'IL-1 dans la partie C-terminale. Cette structure permet à l'IL-33 d'interagir avec le ST2 (Lingel et al., 2009).

3.2 Expression de l'IL-33

3.2.1 Distribution cellulaire et tissulaire

L'analyse de l'expression de l'ARNm de l'IL-33 par RT-PCR a montré que l'ARNm de l'IL-33 est largement exprimé dans de nombreux tissus, mais que son expression est limitée à certains types cellulaires.

Chez la souris et l'homme, une forte expression de l'ARNm de l'IL-33 est retrouvée dans l'estomac, les poumons, la moelle épinière, le cerveau et la peau. L'ARNm de l'IL-33 a été observé aussi dans les tissus lymphatiques, le pancréas, les reins, le vagin et le cœur. Au niveau cellulaire, l'IL-33 est exprimée principalement d'une manière constante par des cellules épithéliales. En outre, les cellules musculaires lisses (SMC) humaines de divers tissus ainsi que, les fibroblastes et les kératinocytes expriment constitutivement l'ARNm de l'IL-33. Les cellules dendritiques et les macrophages actifs sont les seules cellules immunitaires qui présentent une faible quantité d'ARNm de l'IL-33 humain. En revanche, chez les souris l'ARNm de l'IL-33 est exprimé dans les cellules dendritiques au repos et au sein des macrophages actifs (Figure 5).

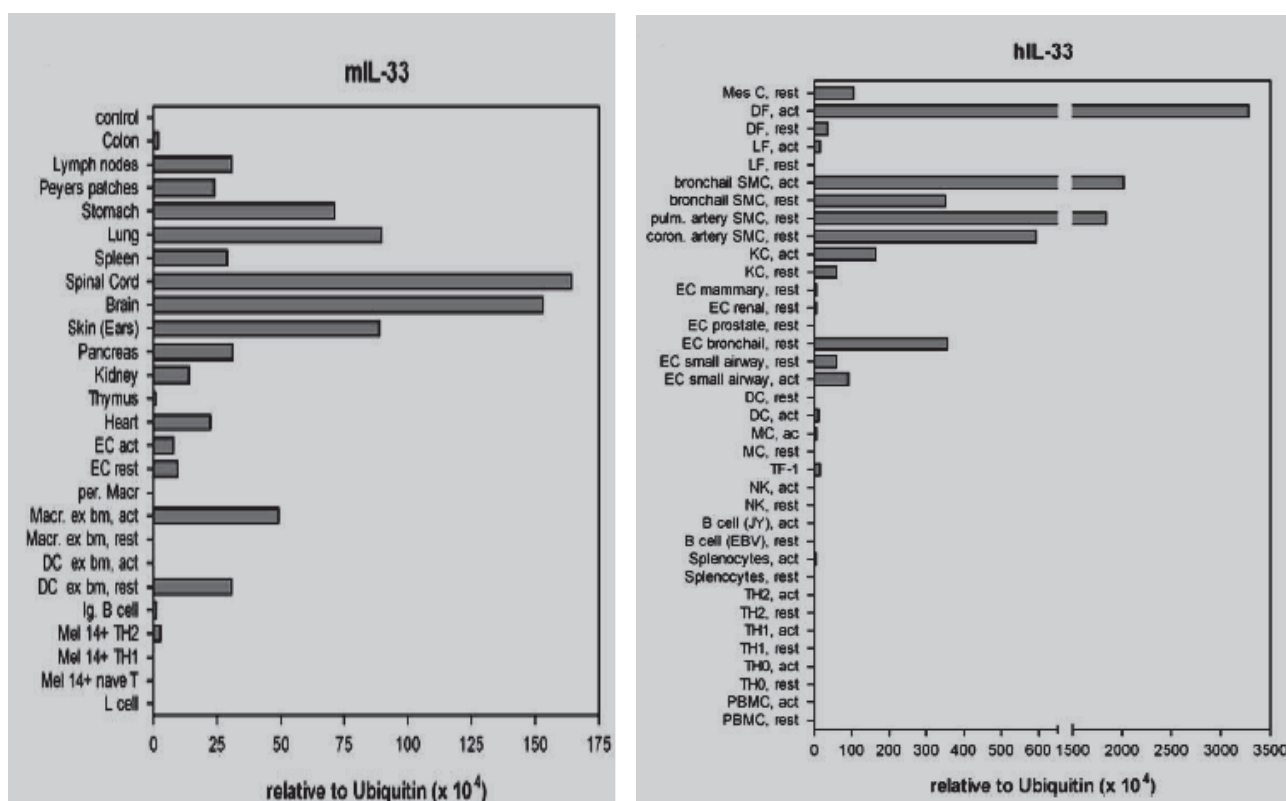


Figure 5: Expression cellulaire et tissulaire des ARNm de l'IL-33 humaine et murine (Schmitz et al., 2005a) . Abréviations : fibroblastes dermiques (DF); fibroblastes du poumon (LF), les cellules épithéliales (EC), les monocytes (MC).

Des analyses immunohistochimiques réalisées sur des tissus de souris déficientes en IL-33 et porteuses d'un gene rapporteur Lac-Z a montré que la protéine IL-33 est exprimée dans le noyau des cellules épithéliales des poumons (pneumocytes), de la peau, de l'estomac, du vagin et des glandes salivaires. En outre, chez l'homme l'IL-33 est constitutivement exprimée de façon importante dans des cellules endothéliales d'HEV des tissus comme le colon, les poumons, les seins et le col de l'utérus. En revanche, chez les souris l'expression de cette protéine par les cellules endothéliales est induite en cas de l'inflammation (Pichery et al., 2012).

3.2.2 Régulation de l'expression de l'IL-33

A l'exception des cellules épithéliales, des fibroblastes et des cellules endothéliales humaines qui expriment l'IL-33 de façon constitutive, les autres types cellulaires expriment cette cytokine de manière induite. Dans ce sens, nous citons quelques médiateurs impliqués dans l'expression induite de l'IL-33.

- Reconnaissance des signaux de danger exogènes (PAMPs)

Plusieurs études ont montré l'implication des PAMP, comprenant les ligands de TLR ou les ligands non TLR, dans l'expression de l'ARNm ou la protéine de l'IL-33 dans différentes cellules. Une étude a montré que la sécrétion d'IL-33 est induite par les cellules gliales des souris activées via des PAMP expérimentels les ligands des TLR2, TLR3, TLR4 et TLR9 (Hudson et al., 2008).

Plus tard, d'autres études ont détecté la sécrétion induite de cette cytokine dans les macrophages activés par des CpG via le TLR9 (Shimosato et al., 2010) et dans des cellules épithéliales cornées activées via principalement Poly I:C (TLR3), le LPS (TLR4) et la flagelline (TLR5) (Zhang et al., 2011). Une autre étude plus récente a montré que les cellules fibroblastiques embryonnaires sont capables de sécréter l'IL-33 lorsqu'elles sont exposées aux ligands des TLR3, 4 et 9 ou aux ligands non TLR

comme le MDA5 et le RIG-I (Retinoic acid-inducible gene 1) (Polumuri et al., 2012). Les cellules dendritiques sont capables de sécréter l'IL-33 après activation par le LPS via leur récepteur TLR4 (Yanagawa et al., 2011).

- Induction de l'expression de l'IL-33 par des cytokines pro- inflammatoires

Le TNF- α , l'IFN- γ et l'IL-1 β sont des cytokines qui induisent l'expression de l'IL-33. Une étude *in vitro* sur les fibroblastes synoviaux de patients atteints de PR ont montré que l'expression de cette cytokine est augmentée avec l'IL- β ou le TNF- α ou les deux (Palmer et al., 2009). En effet, l'action majeure du TNF- α en tant que cytokine pro-inflammatoire sur l'induction de l'expression de l'IL-33 a été étudiée au cours de plusieurs études. Cette cytokine induit la sécrétion de l'IL-33 par les kératinocytes (Meephansan et al., 2012), les cellules épithéliales, les cellules SMC aériennes (Préfontaine et al., 2009) et les cellules adipeuses humaines (Wood et al., 2009). En outre, l'IFN- γ est capable d'induire la sécrétion d'IL-33 dans les kératinocytes stimulés par du TNF- α . De même, un travail récent a montré que l'expression de l'IL-33 par les kératinocytes seulement chez l'homme est induite par l'IFN- γ ou l'IFN- γ /EGF (Sundnes et al., 2015).

- Induction de l'expression de l'IL-33 par le stress cellulaire

Les stress cellulaires externes induits par exemple par des détergents, les forces mécaniques ou le changement rapide de température, peuvent induire l'expression de l'IL-33 par les cellules endothéliales et les cellules fibroblastiques (Cayrol and Girard, 2009). De plus, l'expression de cette cytokine par les kératinocytes peut être induite par le stress induit par les radiations ultraviolettes (UV). Cette expression est dépendante de la voie de signalisation du NF- κ B (Ivanov et al., 2010).

3.2.3 Mécanismes d'expression de l'IL-33

- Libération par les cellules apoptotiques

Tout d'abord il a été montré que l'IL-33 synthétisée sous sa forme pleine taille de 30 kDa peut être clivée par la caspase-1 lors de sa libération. Le site de clivage se trouvait dans la partie C-terminal de la protéine, après l'acide aminé Ser111. Ce clivage génère une forme mature de l'IL-33₁₁₂₋₂₇₀ humaine de 20-22 kDa qui est biologiquement active pour induire les cytokines de type 2 *in vitro* et *in vivo* (Schmitz et al., 2005). En revanche, une autre équipe a suggéré que le clivage via la caspase-1 rapporté par Schmitz se produit sur la partie N-terminale (Cayrol and Girard, 2009). Ils ont observé que le site de clivage de l'IL-33 par la caspase-1 se trouve après un acide aspartique (Asp)₁₇₈ dans la partie C-terminale. En outre, ils ont trouvé que lors de l'apoptose, la caspase-3 et la caspase-7 clivent l'IL-33 en pleine taille, sur le même site clivage que la caspase-1. Ce clivage génère deux fragments : l'IL-33₁₋₁₇₈ de 20-22 kDa et l'IL-33₁₇₉₋₂₇₀ de 12-12 kDa (chez l'homme) l'IL-33₁₋₁₇₅ et l'IL-33₁₇₆₋₂₆₆ (chez la souris) biologiquement inactif (Figure 6). Une autre équipe, en confirmant l'effet de caspase-3 et caspase-7 dans la maturation de l'IL-33 a suggéré que l'inactivation biologique de l'IL-33 lors de l'apoptose permet d'inhiber l'effet pro-inflammatoire de l'IL-33 qui peut conduire à une réponse pro-inflammatoire non désirée au cours de la mort cellulaire programmée (Lüthi et al., 2009).

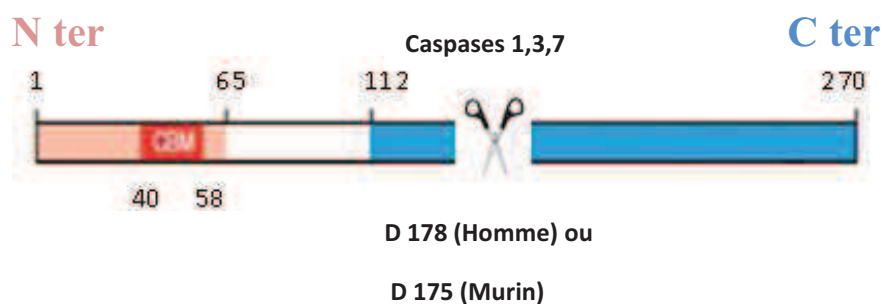


Figure 6: Site de clivage des caspases sur l'IL-33 humaine et murine. Les caspases clivent l'IL-33 sur le site Asp (D) qui se trouve sur la partie C-terminale, au sein du domain IL-1 de cette cytokine.

- Libération par les cellules nécrotiques

Les membres de la famille de l'IL-1 ne possèdent pas de peptide signal pour induire leur sécrétion. Dans ce sens, l'équipe de Philippe Girard a suggéré que l'IL-33 pourrait être sécrétée par les

cellules nécrotiques et pourrait servir d'alarmine afin de transmettre le signal de danger au système immunitaire. Cette équipe, en se plaçant dans des conditions expérimentales de stress comme le dommage cellulaire ou de nécrose cellulaire sur les cellules endothéliales, a révélé l'expression de l'IL-33 de pleine taille. Nous rappelons que les autres alarmines comme HGMB sont libérées également en cas de nécrose cellulaire, de stress cellulaire, sous la contrainte d'une force mécanique ou en cas de dommage cellulaire (Cayrol and Girard, 2009). Par conséquent, l'IL-33 est aujourd'hui reconnue comme une alarmine. La libération de l'IL-33 dans le cas de la nécrose a été également montrée par des fibroblastes synoviaux de patients atteints de PR (Matsuyama et al., 2012), des épithéliums aériens dans le modèle d'asthme et dans les kératinocytes de souris exposés à des UV dans un modèle de l'eczéma (Cevikbas and Steinhoff, 2012). Une étude récente a suggéré que l'IL-33 libérée par les cellules nécrotiques est clivée par les cellules de l'immunité innées. Dans ce sens, ils ont montré que l'IL-33 libérée par les cellules endothéliales nécrotiques est clivée *in vitro* par les sérines protéases sécrétées des neutrophiles comprennent l'élastase et la cathépsine G. Le clivage de cette cytokine via l'élastase produit la forme mature de l'IL-33₉₅₋₂₇₀ de 20 kD et via la cathépsine G génère les formes matures de, l'IL-33₉₉₋₂₇₀ de 21 kD et l'IL-33₁₀₉₋₂₇₀ 18 kD. Les sites de clivage se trouvent en amont du domaine N-terminal de l'IL-33 humaine et particulièrement en Ile 98 pour l'élastase et en Phe 94, Leu 108 pour la cathépsine G (Figure 7). Les trois formes de l'IL-33 matures sont capables d'induire leurs cibles cellulaires comme les basophiles ou les mastocytes dans le contexte *in vitro* ainsi que les granulocytes et les monocytes *in vivo*. Ils ont aussi rapporté que l'IL-33 mature de souris est générée par clivage via la cathépsine G au niveau de la Phe 101 de la protéine ou via l'élastase au niveau de l'Ala 103 et Ile 110. L'incubation de la protéine de l'IL-33 murine avec la cathépsine G produit l'IL-33₁₀₂₋₂₆₆ de 20 kDa et avec l'élastase génère deux fragments de l'IL-33₁₀₄₋₂₆₆ et l'IL-33₁₁₁₋₂₆₆ de 20 et 18 kDa. Ces fragments de protéines sont biologiquement actifs (Lefrançois et al., 2012).

Les mastocytes appartiennent aux cellules de l'immunité innée, ils sont recrutés au moment du danger au niveau du site de l'inflammation et libèrent de grandes quantités de sérine protéases. Ces protéases comprennent le chymase, la tryptase et le granzyme B. Ces protéases sont capables de cliver l'IL-33 de pleine taille au sein du domaine central, entre les parties de C-terminale et N-terminale pour générer une forme mature et biologiquement active de l'IL-33. Dans ce sens, l'incubation de ces protéases avec l'IL-33 humaine de pleine taille a montré que la chymase génère deux fragments qui sont l'IL-33₉₅₋₂₇₀ et l'IL-33₁₁₀₋₂₇₀ de 18 et 20 kDa respectivement. La

tryptase produit trois fragments dont les principaux sont l'IL-33₁₀₇₋₂₇₀ de 18 kDa, l'IL-33₇₉₋₂₇₀, et l'IL-33₇₂₋₂₇₀ de 26 kDa. Le granzyme B permet aussi de générer l'IL-33₁₁₁₋₂₇₀ clivée de 20 kDa et une autre forme inconnue de 25kDa à partir de l'IL-33 de pleine taille. Les mutations ponctuelles sur le gène de l'IL-33 ont montré que le site de clivage de la cytokine humaine correspondante se trouve en Leu 108 et Phe 94 pour la chymase, pour la tryptase existe en l'Arg 106 et en lysine (K) 77-78, K 71. Le granzyme B clive son substrat en Asp110 de l'IL-33, alors que son second site de clivage n'a pas encore été identifié (Lefrançais et al., 2014) (Figure7).

Parmi toutes les formes matures de l'IL-33, les formes générées via le clivage par la chymase et l'IL-33₁₀₇₋₂₇₀ générée via la tryptase ont une activité biologique plus importante que l'IL-33 de pleine taille. Elles sont capables d'induire la sécrétion de l'IL-5 et l'IL-6 par les basophiles et les mastocytes *in vitro*. Ces trois fragments induisent également une réponse de type 2 plus importante via l'activation des cellules ILC2 *in vivo* (Lefrançais et al., 2014). Les résultats de deux études ont suggéré que le mécanisme de clivage de l'IL-33 pourrait potentialiser la réponse immunitaire à travers une forme fortement active de cette cytokine impliquée dans de nombreuses pathologies.

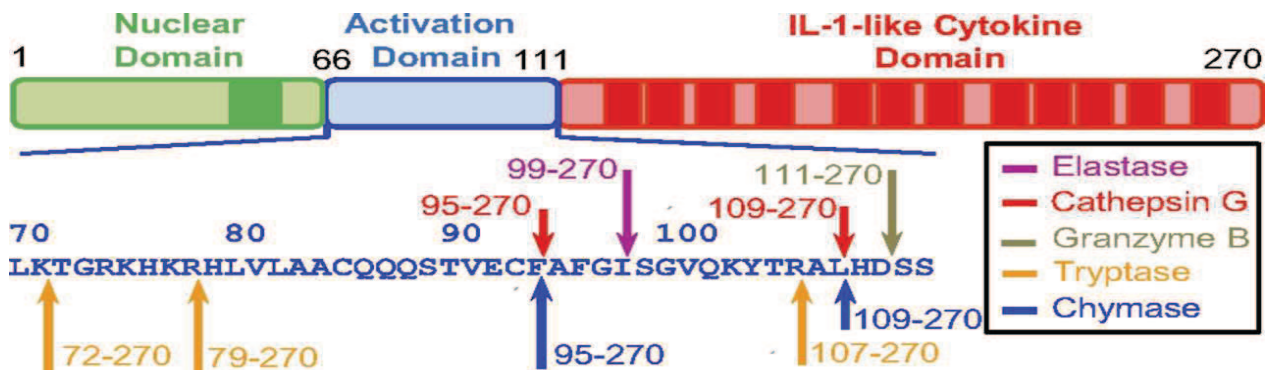


Figure 7 : Sites de clivage des protéases inflammatoires sur l'IL-33 humaine (Lefrançais et al., 2014). Le site de clivage de protéases inflammatoires libérées par les neutrophiles et mastocytes se trouve sur un domaine entre les parties N-terminale (1-65 aa) et C- terminale (112-270aa).

3.3 Récepteur de l'IL-33

3.3.1 La famille des récepteurs TLR/IL-1(Toll-like/IL-1)

Les membres de cette superfamille sont définis par un domaine intracellulaire commun nommé TIR. La famille TLR/IL-1R est divisée en trois sous-familles selon leurs domaines extracellulaires: la sous-famille du récepteur de l'IL-1(IL-1R), la sous-famille des TLR et les molécules adaptatrices de la famille MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88). La sous-famille de l'IL-1R est généralement caractérisée par une partie extracellulaire qui contient 3 motifs immunoglobulines (sauf pour l'IL-1R8 qui a un seul motif) à la suite d'une partie transmembranaire et une partie intracellulaire de TIR. La sous-famille TLR est caractérisée par des motifs extracellulaires répétés riches en leucine avec deux parties transmembranaire et TIR. Le ST2 (également connu sous le nom d'IL1RL1, DER4, T1 et FIT-1) est un membre de la famille des récepteurs TLR/IL-1 et, précisément, il est le récepteur orphelin de la famille du récepteur de l'IL-1 (Figure 8).

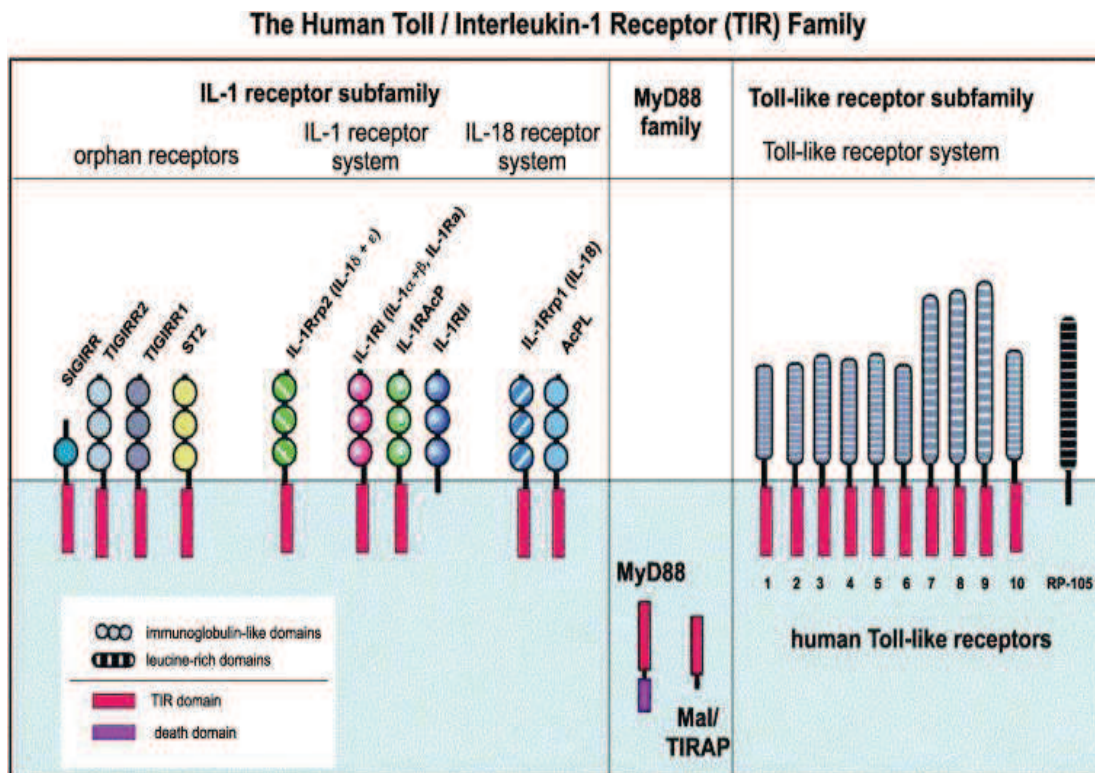


Figure 8: Superfamille du récepteur l'IL-1(Martin and Wesche, 2002) . La famille TIR se compose de trois sous-familles, deux sous-familles de récepteurs et une famille de l'adaptateur MyD88.

3.3.2 ST2 : le récepteur de l'IL-33

Le gène de ST2 se trouve sur le chromosome 2 chez l'homme et sur le chromosome 1 chez la souris. Ce récepteur comporte 4 isoformes, générées par épissages alternatifs de l'ARNm correspondant. Ces isoformes se composent d'une forme longue transmembranaire de ST2L, d'une forme courte soluble sécrétée (sST2), d'une forme variée ancrée à la membrane (vST2) et d'une forme variante de ST2L ayant perdu le domaine transmembranaire (vST2L).

Comme tous les membres de la famille des récepteurs d'IL-1 (à l'exception de SIGIRR), la forme transmembranaire de ST2L contient une partie extracellulaire formée par trois domaines de type Ig, suivi d'un seul domaine transmembranaire, et un domaine de signalisation intracellulaire. La liaison de ST2L avec la cytokine IL-33 déclenche un signal intracellulaire qui permet d'activer les réponses immunitaires dépendantes de l'IL-33.

Le sST2 est le récepteur soluble de l'IL-33. A l'inverse de sa forme membranaire, il ne possède pas de domaines transmembranaires ni cytoplasmiques et comprend une séquence de neuf acides aminés extracellulaires. Ce récepteur est considéré comme un récepteur antagoniste qui se lie à l'IL-33 pour empêcher l'interaction entre cette cytokine et le ST2L. Cela inhibe la voie de signalisation liée au complexe de l'IL-33/ST2L. La perte du troisième motif d'immunoglobuline et un épissage alternatif dans la partie C-terminale de ST2, entraînent la forme vST2 qui ne possède qu'une queue hydrophobe, alors que l'épissage alternatif conduisant à la délétion du domaine transmembranaire de ST2L, produit vST2L. Ce dernier a été identifié chez le poulet (Kakkar and Lee, 2008).

3.3.3 Les corécepteurs

IL-1RAcP

En générale, les cytokines de la famille de l'IL-1 se lient à un complexe de récepteurs qui se compose d'un récepteur primaire de la famille de l'IL-1 et d'un corécepteur nécessaire pour augmenter l'affinité de la liaison entre le récepteur et la cytokine et induire ainsi la signalisation. Dans ce sens, la signalisation des cytokines de la famille de l'IL-1 est médiée par la combinaison de la cytokine/récepteur avec la protéine accessoire du récepteur de l'IL-1 R (IL-1RAcP). L'IL-1RAcP reconnaît le récepteur de l'IL-1 et forme un complexe suite à un rapprochement par les domaines de TIR. En 2007, une étude a montré que l'IL-1RAcP est nécessaire dans la signalisation de l'IL-33/ST2 (Ali et al., 2007). Dans ce sens, lorsque l'IL-33 se lie à son récepteur ST2, cela induit un changement de conformation du ST2 qui permet de recruter de l'IL-1RAcP (Figure 9).

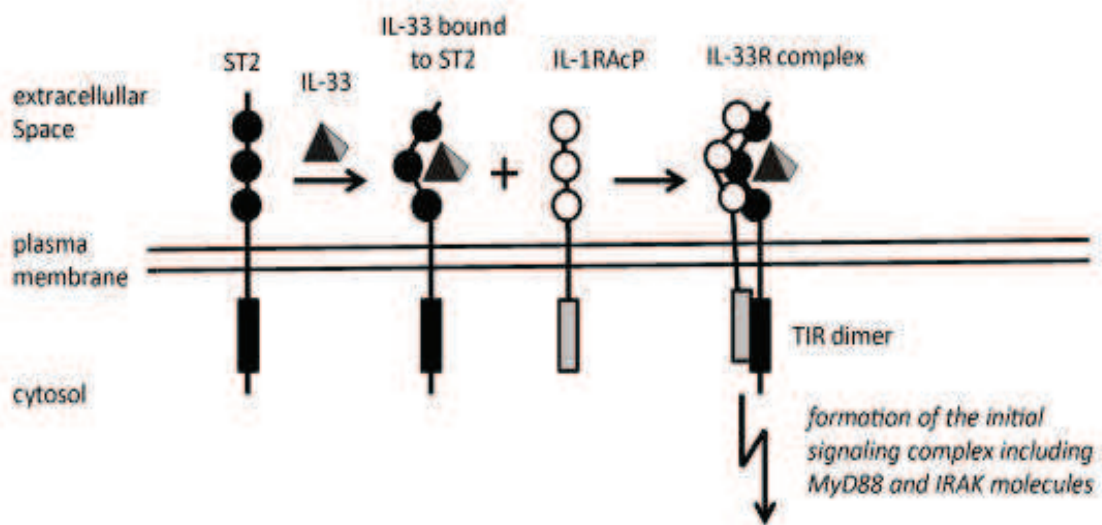


Figure 9: Formation du complexe trimérique composé de ST2 lié à son ligand IL-33 et IL-1RAcP (Martin, 2013). L'IL-33 se lie à ST2, ce qui induit un changement de conformation de ST2. Cela favorise la liaison de l'IL-1RAcP au ST2 par leur domaine TIR.

SIGIRR

La protéine SIGIRR (Single Ig IL-1-related receptor) est un corécepteur de la famille de l'IL-1R ayant un seul motif Ig extracellulaire. Ce corécepteur fonctionne en tant que régulateur négatif de la signalisation liée à la famille TIR/IL-1R. Le rôle négatif de SIGIRR est lié à l'interaction de son domaine extracellulaire Ig avec les corécepteurs. Il peut également interagir via son domaine TIR avec le domaine TIR des récepteurs afin d'empêcher les récepteurs de s'associer à leur ligand. Dans la signalisation de l'IL-33/ST2L, le SIGIRR, en exerçant le même mécanisme, est capable d'interférer sur la formation du complexe du ST2/IL-33 (Bulek et al., 2009).

c-Kit

Le récepteur c-kit (CD117) est une protéine transmembranaire codée par l'oncogène c-Kit qui a une activité tyrosine kinase. Il a été montré que l'expression de ce récepteur sur les mastocytes est cruciale pour l'effet cellulaire de l'IL-33. La co-stimulation de c-kit avec son ligand et le facteur de cellules souches (SCF) sont nécessaires pour rapprocher les deux récepteurs IL-1RAcP et ST2L afin d'induire la voie IL-33/ST2 (Drube et al., 2010).

3.3.4 Signalisation de l'IL-33 via ST2L

La voie de signalisation de l'IL-33 est initiée après liaison de l'IL-33 à ST2. Cela induit le recrutement du corécepteur de l'IL-1RAcp qui s'associe au complexe de ST2L/IL-33. A la suite d'un rapprochement des deux domaines TIR, la protéine adaptatrice de MyD88 est recrutée par interaction entre son domaine TIR avec les domaines TIR du complexe actif. Le MyD88 initie une cascade de signalisation en recrutant et activant certaines protéines kinases IRAK (Interleukin-1 receptor-associated kinase) comme IRAK 1 et 4, le récepteur TRAF6 (TNF receptor-associated factor 9) et une ligase E3 ubiquitine qui permet d'induire les chaînes de polyubiquitinylation. Ces derniers mènent l'activation d'une protéine kinase TAK1 (Transforming growth factor- β -activated kinase 1) qui conduit à l'activation de la voie classique du NF- κ B, et la voie MAP Kinase comprenant la phosphorylation des protéines comme la protéine kinase P38 et JNK (c-Jun N-terminal kinase). Ces deux voies sont impliquées dans l'induction de l'expression des gènes codant pour des cytokines (IL-5, IL-13, IL-6), des chimiokines (IL-8, MCP-1) ou des molécules d'adhérence (ICAM-1, VCAM-1) impliquées dans la réponse immunitaire (Figure 10).

Necrosis

Apoptosis

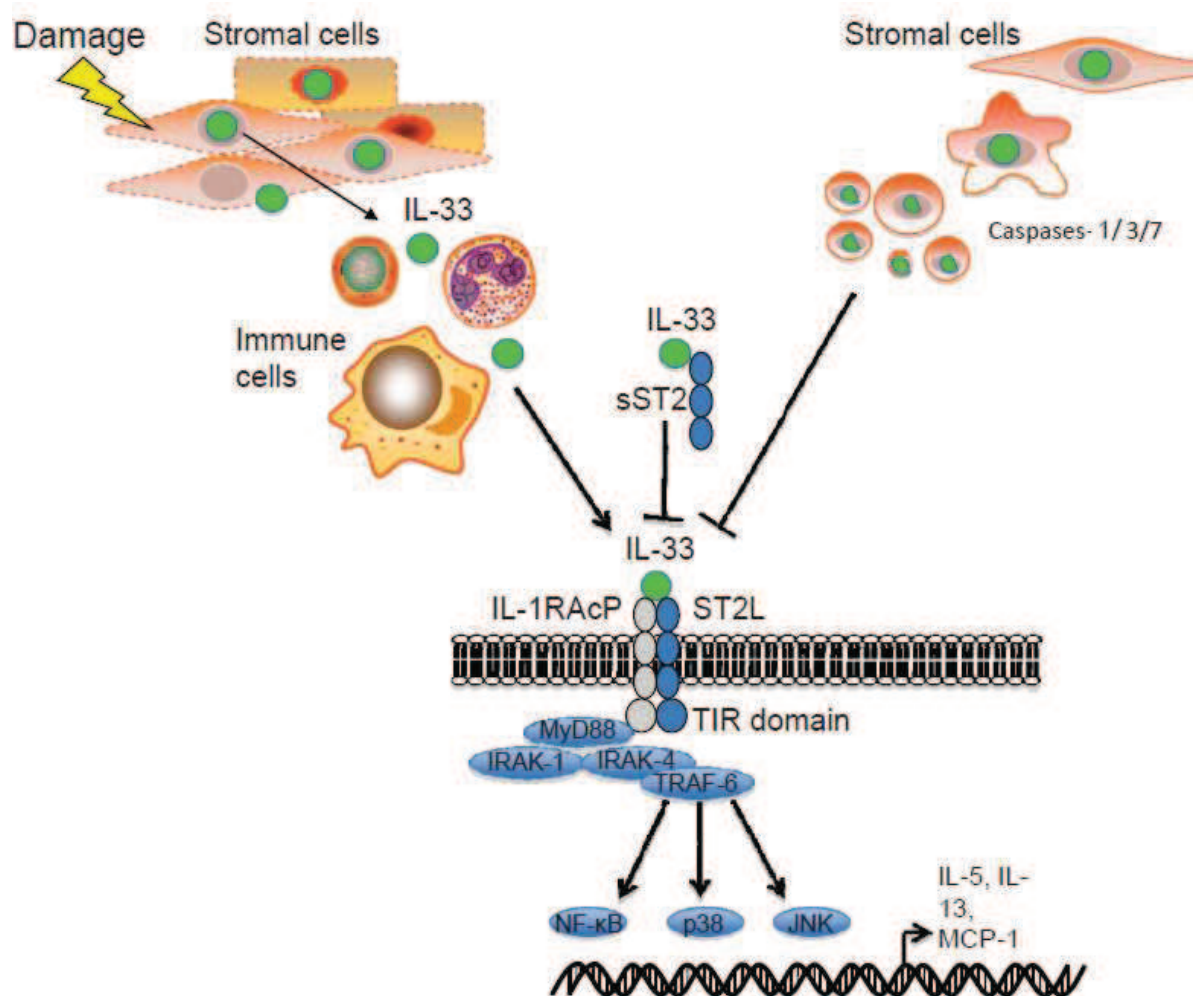


Figure 10 : Mécanismes de la voie de signalisation de l'IL-33/ST2L (Miller, 2011). La formation du complexe trimérique composé de l'IL-33, ST2L et de l'IL-1RAcP, induit le recrutement de MyD88 et IRAK-1/4. Cela conduit à l'activation du facteur de transcription facteur nucléaire B (NF-κB). La protéine kinase est activée par un mitogène (MAPK), et est médiée par l'activation des kinases ERK, p38 et JNK (Jun kinase N-terminal).

3.4 Rôle de l'IL-33

L'IL-33 est une protéine qui a une double propriété. Elle peut être stockée dans le noyau comme un facteur nucléaire intracellulaire ou elle peut être libérée par un mécanisme de sécrétion non conventionnel encore mal compris.

3.4.1 Rôle de l'IL-33 nucléaire

L'IL-33 nucléaire se lie à la chromatine et dans certain cas elle intervient dans la régulation négative de l'expression des gènes des protéines nécessaires pour la réponse immunitaire. Une étude *in vitro* réalisée sur des cellules épithéliales transfectées par le gène de l'IL-33 a montré que cette protéine nucléaire exerce une activité répressive dans la transcription génique. Cette observation confirme la capacité de cette cytokine à interagir avec la chromatine (Carriere et al., 2007). Une autre étude a montré que lors que la stimulation pour activer des voies NF-KB est faible, l'IL-33 de pleine taille est capable d'interagir avec NF-kB. Il est suggéré que la partie N-terminale de l'IL-33 contient deux domaines fonctionnels différents, un domaine de CBM (Chromatine binding motif) (40-58aa) nécessaire pour l'interaction avec la chromatine afin de la compacter et un autre domaine (66-109aa) pour interagir avec l'une des sous unités de NF-kB, p 65 et diminuer l'activité de NF-kB. Dans ce sens, la formation du complexe IL-33/ p65 NF-kB pourrait éventuellement réduire l'expression des gènes liés au NF-kB notamment les gènes des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α . Cela pourrait atténuer la réponse du système immunitaire (Ali et al., 2011).

3.4.2 Rôle de l'IL-33 libérée

Le rôle de l'IL-33 extracellulaire dépend de sa liaison avec son récepteur notamment le ST2L et des cellules qui expriment ce récepteur. Ici nous citons quelques cibles cellulaires de l'IL-33.

➤ Immunité innée

Mastocytes

L'IL-33 peut activer fortement les cellules immunitaires innées telles que les mastocytes (MC) ce qui conduit à la libération de médiateurs actifs tels que le VEGF, l'histamine, les leukotérines et le PGE2. La dégranulation de ces cellules est liée à une stimulation préalable par les IgE (pontage des IgE).

Les mastocytes activés par l'IL-33 initient une cascade de réactions en produisant des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-6, l'IL-5, l'IL-10, l'IL-13, le GM-CSF ainsi que les

chimiokines CXCL8 et CCL1 qui conduisent au recrutement des cellules inflammatoires. L'IL-33 est également impliquée dans la survie et la maturation des mastocytes (Lunderius-Andersson et al., 2012).

Neutrophiles

Plusieurs études ont montré que l'IL-33 est capable de recruter les neutrophiles dans différents modèles d'inflammation. Dans ce sens, cette cytokine pourrait interagir directement avec les neutrophiles afin de les recruter au site de l'inflammation. En outre, cette cytokine, en activant les macrophages qui produisent le TNF- α , l'IL-1 β , le CXCL1 et le CCL3 peut indirectement recruter les neutrophiles (Verri et al., 2010).

Basophiles

Les basophiles qui expriment ST2 sont une cible cellulaire de l'IL-33 qui peut induire la sécrétion de différentes cytokines comme l'IL-4, l'IL-13 *in vitro*. En outre, il a été montré que les basophiles périphériques secrètent l'IL-5 et l'IL-9 en réponse à l'IL-33 (Suzukawa et al. 2008).

Eosinophiles

L'effet de l'IL-33 sur les éosinophiles est rapporté majoritairement comme étant indirect. Cette population cellulaire est activée la plupart de temps en faisant intervenir d'autres cellules cibles de l'IL-33 comme les ILC2 sécrétrices d'IL-5. En revanche, une étude a montré l'action directe de l'IL-33 sur les éosinophiles. En effet, l'IL-33 peut induire l'augmentation de l'expression des molécules d'adhérence comme CD11 sur les éosinophiles, ce qui leur permet de survivre et la sécrétion de cytokines comme l'IL-8 (Suzukawa et al., 2008).

Cellules dendritiques

Bien que les cellules dendritiques expriment faiblement le ST2 à leur surface, elles peuvent répondre à l'IL-33 en induisant l'expression du CMH II et de CD86 à la surface des CD. Ces deux molécules interviennent directement dans le développement et la survie des CD générées dans la MO. En outre, les cellules dendritiques incubées avec l'IL-33 sont capables d'orienter les cellules CD4⁺ naïves vers un profil Th2 sécrétrice l'IL5 et de l'IL13 (Mayuzumi et al., 2009).

Macrophages

Selon le microenvironnement, les macrophages peuvent se différencier en plusieurs sous-populations comme les macrophages M1 responsables de la réponse inflammatoire de type 1 ou M2 qui favorisent la réponse immunitaire de type 2.

L'IL-33 exerce des rôles complexes sur les macrophages. Il a été montré que l'IL-33 favorise la réponse de type 1 en réponse aux macrophages traités par du LPS. En effet, cette cytokine, en augmentant l'expression du TLR4 et de MD2 (Myeloid differentiation protein 2), renforce la réponse de type 1 consistant en la sécrétion de TNF- α via les macrophages (Espinassous et al., 2009). Cependant cette cytokine intervient également dans la polarisation des macrophages vers le profil M2. Dans ce sens, une étude a montré que l'IL-33 favorise *in vitro* et *in vivo* la polarisation des macrophages humains ou murins stimulés par l'IL-13 vers des macrophages de type 2 produisant de l'arginase-1, du CCL17 et du CCL24. Cet effet de l'IL-33 est dépendant de l'IL-13 qui augmente l'expression de ST2 sur les macrophages (Kurowska-Stolarska et al., 2009). En outre, l'IL-33 inhibe l'ostéoclastogénèse à partir des cellules mononucléées de moelle osseuse et elle favorise donc la différenciation de ces cellules vers les cellules M2 (Da Luz et al., 2014).

Cellules NK et iNKT

Bien que l'IL-33 induise la sécrétion de cytokines de type 2 par les cellules, son effet sur les cellules NKT et NK favorise la réponse type 1 (Smithgall et al., 2008). Cette cytokine, non seulement en présence d' α -galactosylcéramide, induit la sécrétion d'IFN- γ par les cellules iNKT, mais peut induire également la sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK et iNKT en présence d'IL-12 sécrétée par les cellules dendritiques (Bourgeois et al., 2009).

Très récemment, un groupe a montré que l'absence de l'expression du récepteur de l'IL-33 (IL1r11) sur les cellules NK chez les souris infectées par CMV, mène à un déficit dans l'expansion des cellules mémoires. Cette étude suggère le rôle précoce de l'IL-33 pour induire la prolifération des cellules NK naïves et mémoires pour la protection anti-virale (Nabekura et al., 2015).

Cellules lymphoïde innée de type 2 (ILC2)

Les ILCs2 font partie de la grande famille des cellules lymphoïde innée. Cette population cellulaire est générée à partir des progéniteurs lymphoïdes dans le MO, les CLP, (Common lymphoid progenitor). Cette population cellulaire est caractérisée par l'expression de la chaîne γ commune du récepteur de l'IL-2 (CD25) et également par un répresseur transcriptionnel Id2 (Inhibitor of DNA binding 2) (Spits and Di Santo, 2011). En outre, ces cellules expriment les molécules CD45, CD90 (Thy1.2) et le récepteur α de l'IL-7 (CD127). Ces cellules expriment également le ST2, l'IL17R (le récepteur de l'IL-25), le c-Kit et le Sca1 (Stem cell antigen-1). Les ILC2 chez l'homme se trouvent dans les organes tapissés de muqueuse comme les intestins, les poumons ou le fœtus et dans le sang périphérique chez les adultes. Chez les souris, cette

population se trouve dans les intestins et les poumons, et également dans les tissus adipeux, la rate et le foie. Les ILC2 activées sont capables de sécréter rapidement les cytokines de type 2 comme l'IL-13 et l'IL-5. Cela suggère un rôle régulateur de cette population dans l'inflammation. Grâce à l'expression de ST2, elles sont capables de répondre à la sécrétion de l'IL-33 en cas de l'inflammation. Dans ce sens, une étude a mis en évidence la sécrétion des cytokines IL-13 ou/et IL-5 par les cellules ILC2 *in vitro* et *in vivo* en présence d'IL-33. Cette réponse est observée dans le modèle d'asthme induit par l'*Alternaria alternata* dans lequel l'IL-33 aggrave la maladie en initiant la réponse de type 2 (Bartemes et al., 2012).

Cellules myéloïdes suppressives (MDSC)

Les MDSC (Myeloid-derived suppressor cells) correspondent à une population hétérogène de la lignée myéloïde à laquelle les cellules dendritiques, les macrophages et les neutrophiles appartiennent également. Chez les souris, ces cellules sont largement définies comme des cellules Gr-1⁺ CD11b⁺ qui se trouvent en abondance dans les tissus lymphoïdes de souris porteuses de tumeurs, ainsi que chez des souris souffrant de maladies infectieuses (Youn et al., 2008). Les MDSC humaines sont identifiées comme les cellules CD11b⁺, CD33⁺, HLA-DR^{low-neg} et elles peuvent être divisées en CD14⁻ granulocytaires et en CD14⁺ sous-types monocytaires (Youn et al., 2008). Ces cellules sont principalement caractérisées par leur capacité immunosuppressive à inhiber les réponses des LT (Diaz-Montero et al., 2009). Ces cellules en exprimant le ST2 à leur surface, peuvent être l'une des cibles cellulaires de l'IL-33. L'IL-33 peut entraîner l'expansion de ces cellules *in vivo* et stimuler leur activité suppressive (Turnquist et al., 2011).

➤ Immunité adaptative

Lymphocytes T

Les cellules CD4⁺

Les cellules CD4 naïves n'expriment pas le récepteur ST2. D'ailleurs, une étude a montré que l'expression de ST2 sur les cellules CD4 naïves est liée à l'acquisition du profil Th2 suite à l'expression de GATA-3. Dans ce sens, la présence de l'IL-33 *in vitro* induit la sécrétion d'IL-5 et d'IL-13 par les cellules Th2 et ces sécrétions sont augmentées lorsque l'expression de ST2 est plus importante (Guo et al., 2009). Une autre étude a montré que l'IL-33 peut induire la différenciation des CD4⁺ naïves murines et humaines en une population de LT productrice l'IL-5, responsable d'induire l'asthme indépendamment de l'IL-4 (Kurowska-Stolarska et al., 2008). L'autre population cellulaire de LT générée à partir des CD4⁺ correspond aux Tregs qui expriment ST2.

Pour la première fois, une étude a révélé l'expression de ST2 sur les Tregs des souris receveuses de greffe cardiaque. Dans cette étude, l'administration d'IL-33 induit des Tregs ST2⁺ qui permettent de prolonger la survie du greffon. Dans ce sens, l'IL-33 favorise une réponse immunosuppressive en activant la capacité suppressive des Tregs (Turnquist et al., 2011)

Les cellules CD8⁺

L'expression de ST2 sur les cellules T CD8 naïves n'est pas détectable. En revanche, sur les CD8 actives, l'expression de ST2 est liée à celle de T-bet. L'IL-33 est impliquée dans l'expansion clonale des CD8, la différenciation de cellules effectrices et l'activité cytotoxique des CD8⁺ en réponse à l'ARN et l'ADN viral ou les PAMP bactériens (Bonilla et al., 2012, Ngoi et al., 2012). Dans ce sens, l'IL-33 en synergie avec le TCR ou l'IL-12 sur les CD8s peut induire la sécrétion d'IFN- γ chez les souris et l'homme (Li et al., 2012a). Dans ce sens, l'IL-33 favorise une réponse de type 1 anti-tumorale et anti-virale ou bactérienne.

Lymphocytes B

Parmi les LB, les cellules B1 sont une population minoritaire qui exprime ST2 à leur surface. L'IL-33 induit la prolifération des cellules B1 qui produisent les cytokines de type 2 comme l'IL-5 et l'IL-13, ainsi que la production d'IgM *in vitro* et *in vivo*. En outre, l'IL-33 peut induire les LB1 indirectement, via l'induction des mastocytes, des éosinophiles, des cellules Th2 qui sécrètent également l'IL-5 (Komai-Koma et al., 2011) (Figure 11).

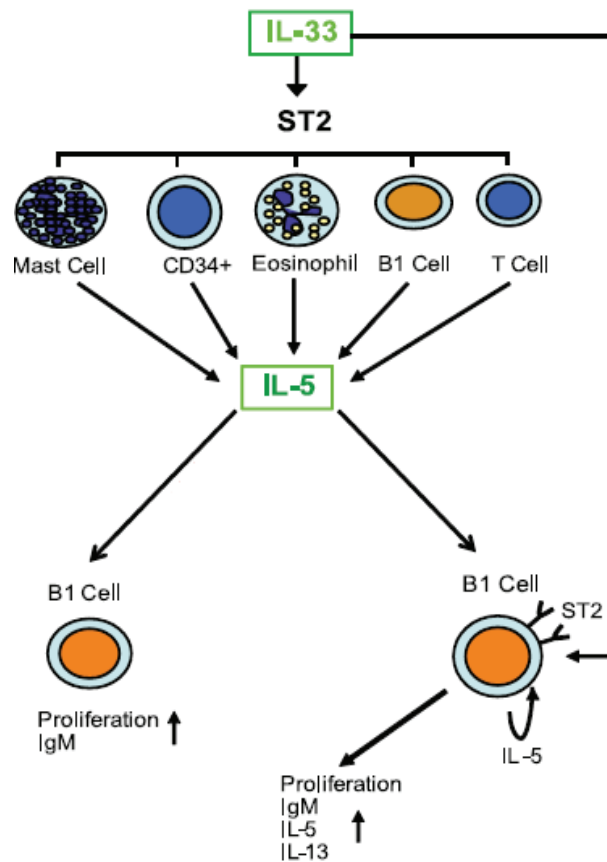


Figure 11: Mode d'action de l'IL-33 sur les cellules B1 (Komai-Koma et al., 2011) : l'interaction de l'IL-33 avec ST2 exprimé sur une variété de cellules, induit la production d'IL-5 qui est principalement responsable de la prolifération des LB1 et de la synthèse d'IgM, IL-5 et IL-13 par les cellules B1. L'IL-33 peut également se lier directement aux cellules B1 naïves, ce qui conduit à une augmentation de la synthèse d'IL-5 qui peut agir à son tour de manière autocrine afin d'induire la prolifération de cellules B1.

Les lymphocytes B régulateurs (Breg) constituent une autre population de LB qui exprime ST2. Similaire aux Tregs, cette population exerce une activité immunorégulatrice médiée par la libération de cytokines comme l'IL-10. L'injection d'IL-33 recombinante aux souris augmente la sécrétion d'IL-10 par les Breg et leur capacité suppressive contre la prolifération et la division des cellules Beff (CD23⁺). Ce mécanisme est par exemple à l'origine de la protection de l'inflammation muqueuse dans un modèle murin (Sattler et al., 2014).

➤ Cellules non hématopoïétiques

Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sont à la fois des cellules sécrétrices d'IL-33 et des cibles cellulaires pour cette cytokine. La sécrétion d'IL-33 peut induire l'expression des molécules d'adhérence sur les cellules endothéliales comme ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine et la sécrétion d'IL-6, des chimiokines MCP-1 et IL-8. L'expression de ces molécules favorise le recrutement des leucocytes et l'interaction des lymphocytes recrutés avec les cellules endothéliales via les protéines d'adhérence, sont des événements nécessaires dans la réponse inflammatoire au cours de nombreuses pathologies, dont l'athérosclérose (Demyanets et al., 2011). Une autre étude a montré que l'IL-33 augmente la prolifération, la migration, et la différenciation morphologique des cellules endothéliales. Cette cytokine réduit l'expression de la protéine cadhérine et augmente ainsi la perméabilité vasculaire des cellules endothéliales et l'angiogenèse *in vivo* et *in vitro* (Choi et al., 2009). Cet effet, qui est dépendant de l'expression de ST2 sur les cellules endothéliales, augmente la production de médiateurs de l'angiogenèse tel que le NO (Monoxyde d'azote). Nous rappelons que le mécanisme de l'angiogenèse est associé à l'apparition de l'inflammation.

Les cellules fibroblastiques

Les cellules fibroblastiques sont aussi des cellules productrices d'IL-33 qui peuvent être ciblées également par l'IL-33. En présence d'IL-33, ces cellules peuvent déclencher une réponse pro-inflammatoire en sécrétant des chimiokines recrutant les neutrophiles.

L'ensemble de ces découvertes montrent que l'IL-33 joue une fonction multi-immune et que, selon les cibles cellulaires et le microenvironnement, cette cytokine peut induire différentes réponses comme les réponses Th1, Th2, la réponse pro-inflammatoire ou au contraire anti-inflammatoire (Figure 12).

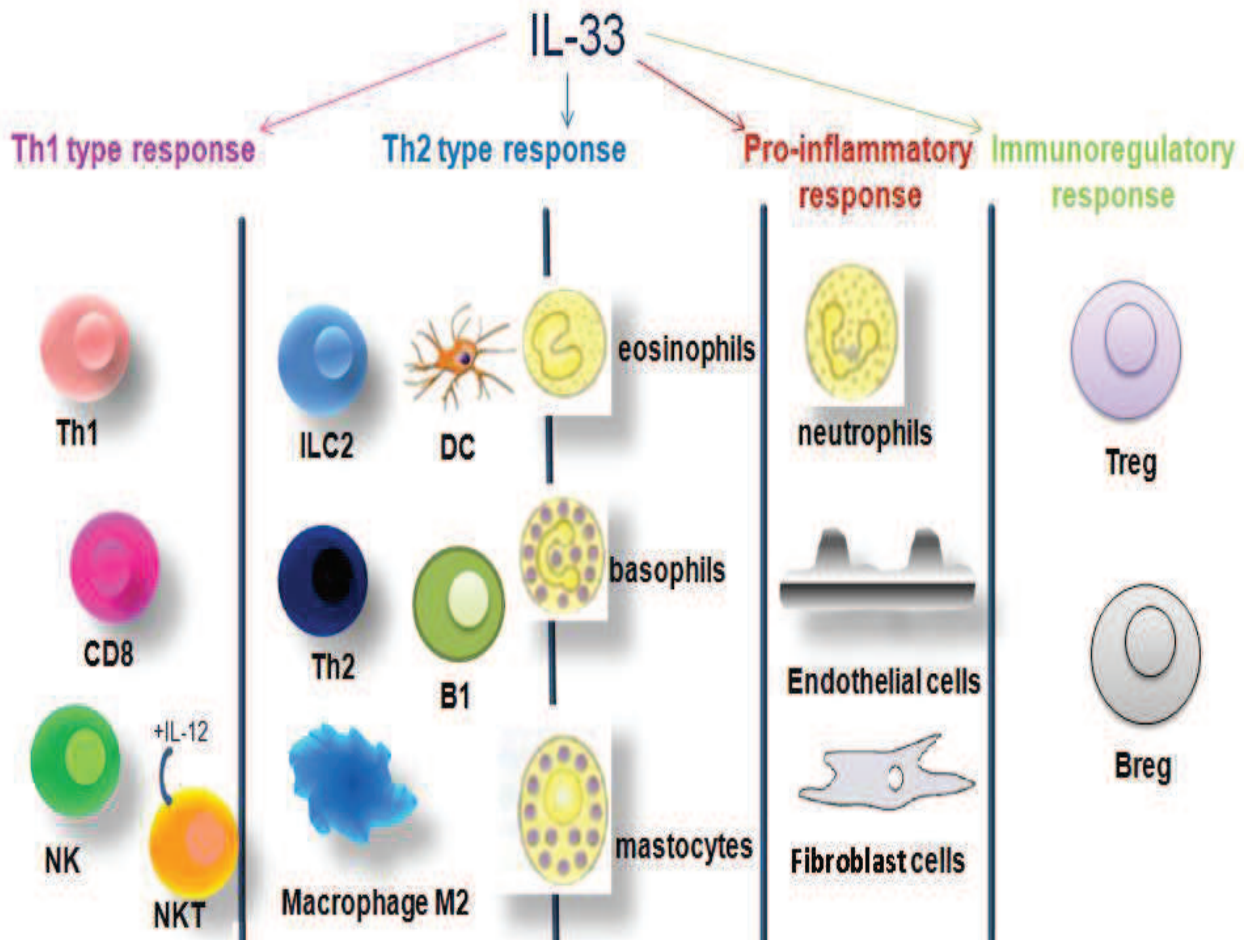


Figure 12: Rôle de l'IL-33 sur les cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques. L'IL-33 peut induire la réponse Th1, Th2, la réponse pro-inflammatoire ou immunoregulatrice en fonction des ses cibles cellulaire et microenvironnement cytokinique.

3.5 Implication physiopathologique de l'IL-33

3.5.1 Cancer

Rappelons que l'IL-33 est capable de stimuler la prolifération, la migration et la différenciation des cellules endothéliales. Cette cytokine augmente la perméabilité des cellules endothéliales induites qui produisent le NO impliqué dans l'angiogenèse. Par conséquent, l'IL-33 peut être un médiateur de l'angiogenèse tumorale (Tsuchiya et al., 2004). Plusieurs études ont mis en évidence une expression de ST2 sur des lignées cellulaires leucémiques et des lymphomes T de patients, ce qui suggère le rôle de ST2 ou de l'IL-33 dans le cancer. Une étude a démontré la diminution de la croissance tumorale et du processus métastatique des tumeurs chez des souris déficientes en ST2 en cas de carcinome. Ceci est associé à une augmentation des cellules NK IFN- γ ⁺ et des cellules T CD8⁺ (Jovanovic et al., 2011). Dans ce sens, le même groupe a récemment mis en évidence une augmentation de l'ARNm de l'IL-33 et de la protéine endogène correspondante dans les cellules tumorales. L'injection d'IL-33 chez les souris induit la progression des tumeurs du sein, et des métastases des poumons et du foie. Cet effet est lié à l'induction des M2, des MDSC et des Tregs IL-10⁺ chez les souris traitées par IL-33. En outre, l'administration d'IL-33 induit également des ILC2 productrices d'IL-13 dans la rate et sur le site des tumeurs de ces souris (Jovanovic et al., 2014).

Un rôle anti-tumoral de l'IL-33 a aussi été montré dans un modèle expérimental de métastases des poumons. Dans ce sens, l'administration d'IL-33 induit des ILC2 qui sécrètent de l'IL-5. Ce dernier induit les éosinophiles qui exercent une activité anti-tumorale afin d'inhiber la progression des métastases pulmonaires et une invasion tumorale (Ikutani et al., 2012). En outre, une étude récente montre également le rôle anti-tumoral de l'IL-33 chez les souris traitées par les lignées B16 ou 4T1 respectivement pour le mélanome ou le cancer du sein. La surexpression de l'IL-33 sur ces cellules tumorales induit une réponse anti-tumorale de type I en activant les cellules CD8⁺ sécrétrices d'IFN- γ et de granzymes B (Gao et al., 2015). Dans ces conditions, l'IL-33 induit également une réponse anti-tumorale de type 1 en activant les cellules NK IFN- γ ⁺.

Par conséquent, l'IL-33 joue un rôle paradoxal dans la tumorigénèse qui dépend des cellules ciblées par cette cytokine, du stade de développement des tumeurs et du type de tissu atteint.

3.5.2 Inflammation allergique

- Asthme

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique qui touche les voies respiratoires. L'asthme est principalement caractérisé par la réponse Th2 liée aux lymphocytes, éosinophiles, mastocytes et aux cytokines IL- 4, -5 et -13. Une étude réalisée sur les patients a mis en évidence une surexpression des ARNm de l'IL-33 dans les SMCs de poumons de patients atteints d'asthme. Cette expression est corrélée à la sévérité de la maladie. Cette étude pour la première fois a proposé l'IL-33 comme un nouveau marqueur de l'inflammation d'un asthme sévère et réfractaire (Préfontaine et al., 2009). Le rôle crucial de l'IL-33 endogène dans l'asthme a été montré pour la première fois dans le modèle d'asthme induit par l'ovalbumine (OVA) chez les souris déficientes en IL-33. L'absence de cette cytokine induit une diminution des éosinophiles dans le lavage broncho-alvéolaire (BAL). La résultante de l'administration intranasale d'IL- 33 chez les souris est la production de mucus, le recrutement des éosinophiles producteurs d'IL-5 et d'IL-13 (Liu et al., 2009). Dans le même sens, le traitement par anticorps anti-IL-33 chez les souris immunisées par OVA réduit la sécrétion d'IgE et une augmentation du nombre d'éosinophiles, de lymphocytes et de la concentration d'IL- 4 , IL- 5 et IL- 13 dans le BAL (Liu et al., 2009). De même, l'IL-33 peut stimuler l'allergie des voies respiratoires en activant les ILC2. En effet, dans le modèle d'asthme induit via un allergène (la papaïne) et les acariens, l'administration d'IL-33 conduit à l'augmentation du nombre d'ILC2 sécrétrices d'IL-13 et -5 dans les poumons (Kamijo et al., 2013). Dans ce sens, l'IL-13 induit la prolifération des cellules de Goblet dans les poumons et l'IL-5 active les éosinophiles (Figure 13).

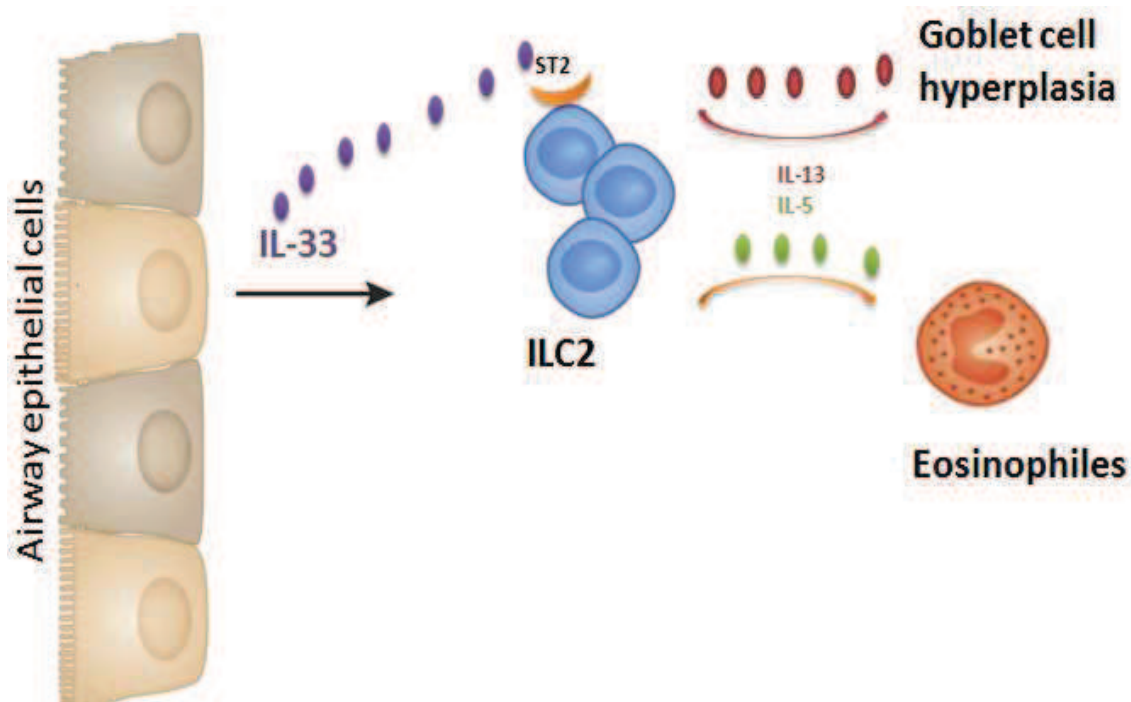


Figure 13 : Rôle de l'IL-33 dans l'asthme: L'IL-33 est abondamment exprimée dans les cellules épithéliales des voies respiratoires et induit une réponse de type 2 via les ILC2s sécrétrices d'IL-5 et d'IL-13. L'ILC2 induit par l'IL-33 peut stimuler à son tour les éosinophiles et l'hyperplasie des cellules caliciformes qui peuvent déclencher l'asthme.

Conformément à toutes les études sur le rôle de l'IL-33 dans l'asthme, une étude chez les souris déficientes en ST2 a montré une diminution de l'inflammation des voies respiratoires induite par l'OVA qui a été associée à une diminution de la différenciation des macrophages actifs (AAM). Dans ce sens, il a été suggéré que l'IL-33, en synergie avec l'IL-13, favorise la polarisation des cellules AAM qui produisent des niveaux élevés de CCL24 et de CCL17 de manière dépendante de l'IL-13 à partir de moelle osseuse. Ces deux chimiokines, dans le cas de l'inflammation, recrutent des cellules pro-inflammatoires qui initient l'asthme (Kurowska-Stolarska et al., 2009) (Figure 14).

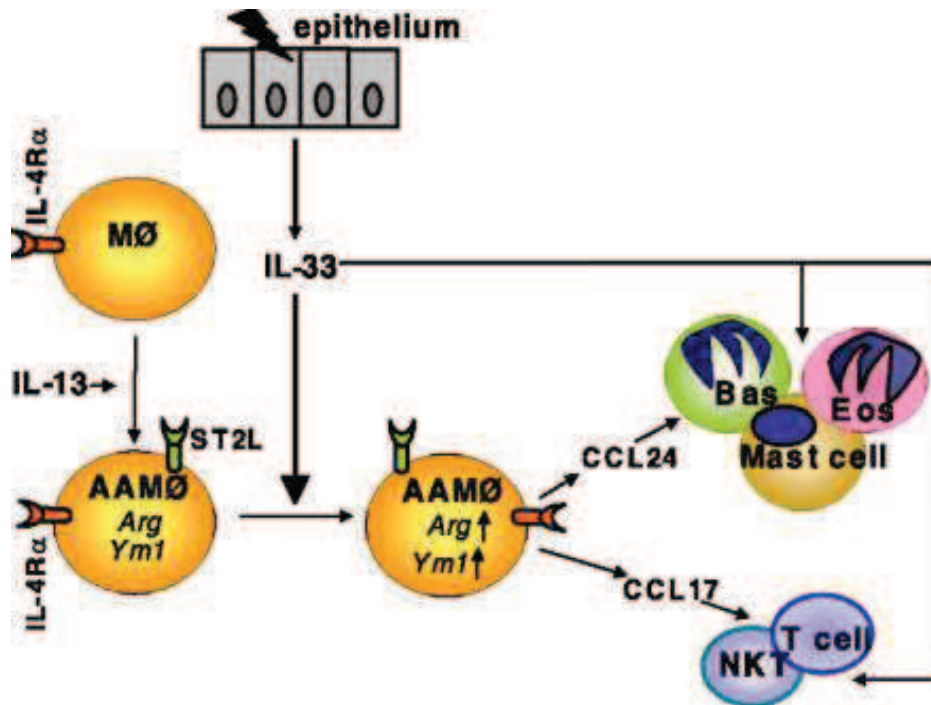


Figure 14: Représentation schématique de la contribution de l'IL-33 dans la polarisation d'AAM (Macrophages alternativement activés) et l'inflammation des voies aériennes (Kurowska-Stolarska et al., 2009). L'IL-33 libérée lors des dommages des cellules épithéliales agit en synergie avec l'IL-13 pour induire le récepteur au mannose sur les macrophages (IL-4Ra). Cette synergie induit la polarisation des macrophages vers AAM. L'IL-33 induit l'expression de l'arginase I et Ym1 ainsi que la production de CCL24 et de CCL17, et recrute des cellules inflammatoires. AAM : Macrophage type 2 (M2)

- Rhinite allergique

L'IL-33 peut déclencher une réaction allergique sur d'autres organes comme dans le cas de la rhinite allergique qui est une inflammation des parois nasales induite par des allergènes comme les pollens. Une étude a révélé une concentration élevée d'IL-33 dans le sérum des patients atteints de rhinite allergique en comparaison de sujet sains (Kamekura et al., 2012). En outre, le rôle crucial de l'IL-33 dans la rhinite allergique a été démontré chez les souris déficientes en IL-33. Ces souris sont protégées de la rhinite allergique induite par les pollens. La même étude a également mis en évidence l'expression élevée en IL-33 par les cellules épithéliales nasales chez les souris allergiques. Cette augmentation se traduit cliniquement par des éternuements en phase précoce et

l'accumulation des éosinophiles et des basophiles en phase tardive dans la muqueuse nasale (Haenuki et al., 2012). Chez les patients atteints de rhinite chronique, un grand nombre d'ILC2 a été trouvé dans les polypes nasaux. Cela pourrait induire une réponse immunitaire de type 2 en réponse à la sécrétion d'IL-33 (Mjösberg et al., 2011).

- Allergie cutanée

La dermatite atopique (AD) est une maladie inflammatoire chronique de la peau qui est associée à la réponse de type 2, notamment la sécrétion d'IL-13 et -4 au sein de lésions cutanées. Une expression importante d'ARNm de ST2 et d'IL-1RAcP a été révélée dans les lésions cutanées de patients atteints d'AD. La biopsie des lésions cutanées des patients atopiques révélait une infiltration importante par des ILC2s qui expriment ST2. L'incubation *in vitro* des ILC2 isolées de ces patients avec de l'IL-33 induit une activation de la sécrétion d'IL-13 et IL-5 par ces cellules (Salimi et al., 2013). En outre, les souris transgéniques pour l'IL-33 développent une inflammation cutanée associée à l'infiltration des ILC2 (Imai et al., 2013). Ceci suggère un rôle pro-inflammatoire de l'IL-33 dans l'AD via une réponse de type2 induite par les ILC2.

Dans un modèle expérimental d'AD chez les souris sensibilisées par de l'OVA, l'expression de ST2 par les éosinophiles et les mastocytes produisant IgE augmente dans la peau. En outre, l'expression d'ARNm des cytokines IL-4 et IL-13, est corrélée avec l'expression de ST2 dans ce modèle (Cevikbas and Steinhoff, 2012). D'ailleurs, l'expression de ST2 et de l'IL-33 est induite et également augmentée dans d'autres modèles d'AD induite par les acariens ou les entérotoxines B staphylococciques (SEB). Cette augmentation est associée à l'expression d'IL-4, IL-13, de TNF- α et d'INF- γ chez les souris atteintes de l' AD (Savinko et al., 2012).

3.5.3 Psoriasis

L'expression d'IL-33 est élevée dans la peau, notamment dans les kératinocytes de patients atteints de psoriasis. La sécrétion de cette cytokine dans les kératinocytes peut être induite par le TNF- α *in vitro* (Balato et al., 2012b). En outre, cette sécrétion pourrait être régulée par une autre cytokine pro-inflammatoire, l'IL-17A *in vitro* (Meehansan et al., 2013). L'ensemble de ces études suggère que l'IL-33 pourrait être impliquée dans le psoriasis. Nous reviendrons en détail dans la discussion sur le rôle de l'IL-33 dans le psoriasis.

3.5.4 Maladies auto-immunes

- Maladies inflammatoires de l'intestin

Les IBD regroupent deux pathologies inflammatoires chroniques qui affectent les intestins : la colite ulcéreuse et la maladie de Crohn. Ici nous discutons du rôle de l'IL-33 dans la colite qui est caractérisée par l'activation des cellules Th1 et Th17 et par le déficit en cellules Tregs.

La surexpression des ARNm de l'IL-33 a été révélée par des analyses réalisées sur des biopsies de la muqueuse intestinale des patients atteints de colite en comparant de sujets sains dans plusieurs études. Cette expression a été mise en évidence dans les cellules myofibroblastiques et les cellules épithéliales de la muqueuse. En outre, une expression élevée d'IL-33 et de sST2 se trouve également dans le sérum des patients atteints de colite (Pastorelli et al., 2010). L'IL-33 jouerait donc un rôle pro-inflammatoire dans la colite. D'ailleurs, chez les souris déficientes en IL-33, on observe un retard et une diminution de la sévérité de la colite induite par le DSS (Dextran sodium sulfate). Cet effet est associé à une réduction de la sécrétion des chimiokines qui recrutent les neutrophiles comme l'IL-1 β , le TNF, KC (Keratinocyte-derived chemokine) et MIP-2 (Macrophage inflammatory protein 2) au cours de la maladie (Oboki et al., 2010).

Une autre étude a également mis en évidence une aggravation de la colite ulcéreuse induite par le DSS chez les souris traitées par l'IL-33 recombinante. Cet effet pro-inflammatoire de l'IL-33 pourrait se traduire par l'induction de la sécrétion de l'IL-4 par les éosinophiles, les basophiles ou les mastocytes et par la sécrétion de VEGF comme facteur angiogénique (Pushparaj et al., 2013). Enfin, les souris ST2^{-/-} développent une colite induite par le DSS ou le TNBS avec une sévérité moindre (Sedhom et al., 2013).

En revanche, le rôle anti-inflammatoire de l'IL-33 dans la colite a été proposé pour la première fois via l'expansion des Tregs qui expriment ST2. Dans cette étude, l'injection d'IL-33 induit les Tregs Foxp3⁺ qui protègent les souris de la colite induite par le TNBS. D'ailleurs, la déplétion des Tregs par l'anticorps anti-CD25 chez les mêmes souris aggrave la colite (Duan et al., 2012).

- Diabète

Diabète de type 1

Rappelons que cette maladie est associée aux réponses Th1 et Th17. Les souris déficientes en ST2 sont susceptibles au diabète induit par le MLD-STZ (Multiple low-dose streptozotocin) qui est

associé à la perte des cellules bêta. Dans ce sens, l'expression de TNF- α et d'IFN- γ est considérablement augmentée dans les ganglions lymphatiques pancréatiques 10 jours après l'induction du diabète (Zdravkovic et al., 2009). En outre, l'aggravation du diabète chez les souris en absence de ST2 est associée à une augmentation des cellules CD8⁺, CD4⁺ TNF- α ⁺, et CD4⁺ IFN- γ ⁺ dans le pancréas et la sécrétion des cytokines TNF- α , IFN- γ et l'IL-17 dans le sérum des souris (Zdravkovic et al., 2013). En revanche, les souris déficientes pour l'IL-33 ne sont pas affectées dans ce même modèle de diabète (Oboki et al., 2010).

Diabète de type 2 et obésité

L'IL-33 et le ST2 sont exprimés dans les adipocytes et les tissus adipeux. Il a été montré que l'IL-33 est capable d'induire la sécrétion des cytokines de type 2 comme l'IL-5 et l'IL-13 à partir des adipocytes *in vitro*. Dans ce sens, le stockage des lipides est réduit et est lié à une diminution de l'expression de plusieurs gènes associés au métabolisme lipidique comme C/EBP α , SREBP-1c, LXR α , LXR β et PPAR γ (Miller et al., 2010). Le rôle protecteur de l'IL-33 dans le diabète peut se traduire également par sa capacité à induire la réponse de type 2, en favorisant un profil M2 (Miller, 2011). En outre, cette cytokine est capable d'activer un type de cellules, les FALC (Fat associated lymphoid cluster) sécrétrices des cytokines de type 2 dans le tissu adipeux (Moro et al., 2010). Dans ce sens, les souris déficientes en ST2 après 6 mois de régime gras, développent une masse importante de gras avec une déficience de sécrétion de l'insuline (Miller, 2011). Recemment une étude a montré que l'injection de l'IL-33 induit les Tregs ST2L sécrétrice de l'IL-10 qui se trouve les tissus adipeux visceral chez les souris obèse (Han et al., 2015). Ceci mène une réduction de l'hyperinsulinémie.

- Sclérose en plaques

Le cerveau et la moelle épinière sont des organes qui possèdent la plus importante expression d'IL-33. Parmi les cellules du système nerveux central (SNC), les astrocytes et les cellules de la microglie expriment le ST2 et l'IL1Racp (Andre et al., 2005). L'IL-33 peut induire la prolifération des cellules microgliales et l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et le TNF- α , ainsi que l'expression du facteur anti-inflammatoire IL-10 en même temps dans le SNC. Cela suggère le rôle régulateur de l'IL-33 dans le système nerveux central (Yasuoka et al., 2011). L'ARNm de l'IL-33 et la protéine correspondante sont exprimés d'une manière plus élevée dans les lésions, le plasma et la substance blanche des patients atteints de SEP en comparant des sujets sains (Hudson et al., 2008).

Le rôle de l'IL-33 et son mode d'action dans la SEP ont été étudiés en utilisant le modèle expérimental de l'EAE. Il a été démontré que l'injection d'IL-33 à partir de J12 après l'induction de la maladie protège les souris contre l'EAE. Ce rôle protecteur de l'IL-33 a été confirmé chez les souris KO ST2 qui ont développé une maladie plus sévère que les souris sauvages après induction de l'EAE. Dans ce sens, l'effet bénéfique de l'IL-33 chez les souris atteintes d'EAE est associé à sa capacité à induire une réponse de type 2 via les M2 dans la rate et les ganglions ainsi que l'expansion des Tregs dans la moelle épinière des souris traitées par l'IL-33 (Jiang et al., 2012). En revanche, dans une autre étude, l'inhibition de l'IL-33 à partir de J0 jusqu'à J18 après l'immunisation diminue l'inflammation dans la moelle épinière. Cela est lié à un taux d'expression réduit d'ARNm de l'IL-17, de l'IFN- γ , de ROR γ t et de T-bet et une augmentation de l'IL-10 et le TGF- β dans la moelle épinière de souris atteintes d'EAE par rapport aux souris non traitées (Li et al., 2012c). Ceci suggère un rôle anti-inflammatoire de l'IL-33 dans l'EAE lorsqu'elle est injectée en phase active de la maladie.

Cependant, Oboki et al en utilisant les souris déficientes en IL-33 ont montré que l'IL-33 n'est pas nécessaire au développement de l'EAE (Oboki et al., 2010) .

- La polyarthrite rhumatoïde

L'IL-33 est sécrétée par les cellules endothéliales et les fibroblastes de la membrane synoviale humaine (Carriere et al., 2007). En outre, l'expression de cette cytokine est augmentée dans les synoviocytes de patients atteints de PR (Xu et al., 2008). Cette expression est augmentée en présence de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et/ou le TNF- α *in vitro*. Le blocage de ST2 chez les souris réduit la sévérité de l'AEC. L'ensemble des études précédentes propose l'implication de l'IL-33 dans l'arthrite. Nous reviendrons plus précisément du rôle de l'IL-33 dans la PR dans la partie discussion (Palmer et al., 2009).

OBJECTIFS

L'IL-33 est impliquée dans un grand nombre de processus immunitaires, de la défense anti-tumorale à la défense anti-infectieuse en passant par l'allergie et l'autoimmunité. Ses fonctions varient avec le contexte physiopathologique et elle peut aussi bien induire un phénomène inflammatoire qu'une immunité de type 2 selon l'environnement cellulaire et cytokinique.

L'objectif de ce travail a été d'élucider le rôle de cette cytokine au cours de phénomènes d'inflammation chroniques expérimentaux. Notre étude s'est articulée autour deux axes distincts :

- 1) La première étape a été d'étudier le rôle de l'IL-33 exogène, c'est-à-dire administrée *in vivo* sous forme recombinante, et les mécanismes d'action de cette cytokine dans un modèle murin de PR, l'arthrite expérimentale au collagène (**Article1**).
- 2) La deuxième étape a été d'évaluer le rôle de l'IL-33 endogène, c'est-à-dire naturellement produite par l'organisme au cours de phénomènes d'inflammation chronique. Ici, nous avons utilisé des souris déficientes en IL-33 (IL-33^{-/-}) et deux modèles d'inflammation murin, l'arthrite au collagène et le psoriasis induit par l'imiquimod (**Article2**).

RESULTATS

I ARTICLE n°1

Interleukin-33 inhibits experimental arthritis development and promotes Foxp3⁺ regulatory T-cells and the establishment of a type-2 immune response.

Jérôme Biton, Sara Khaleghparast Athari *, Allan Thiolat *, François Santinon, Delphine Lemeiter, Roxane Hervé, Laure Delavallée, Anais Levascot, Stéphane Roga, Patrice Decker, Jean-Philippe Girard, André Herbelin, Marie-Christophe Boissier, and Natacha Bessis.

*Contribution égale

Soumis

L'IL-33 est considérée comme une cytokine non conventionnelle, qui peut avoir un profil pro-inflammatoire dû à sa fonction d'alarmine, mais aussi un inducteur de la réponse immune de type Th2. De ce fait, elle peut inhiber la réponse Th1 et donc diminuer l'inflammation dans les maladies comme l'hépatite, la colite, l'EAE ou l'athérosclérose. Cependant, les mêmes mécanismes peuvent favoriser différents types d'allergies. De plus, il a été démontré récemment qu'en induisant l'expansion des Tregs *in vitro* et *in vivo*, cette cytokine, protège les souris du rejet de greffe cardiaque, ainsi que de la colite.

Dans ce contexte, le rôle de l'IL-33 dans les maladies inflammatoires, notamment la PR, est complexe et difficilement prédictible.

Notre étude a été réalisée afin de définir le rôle de l'IL-33 dans l'arthrite. Nous avons étudié les effets et modes d'action de cette cytokine administrée sous forme recombinante dans l'arthrite expérimentale au collagène. Nous avons démontré pour la première fois que l'administration de l'IL-33 du jour 0 à 4 et du jour 21 à 25 après l'induction de l'AEC inhibe complètement le développement des arthrites évaluées cliniquement et histologiquement. Sur le plan cellulaire, cet effet était lié à une réponse immunitaire de type-2, avec une expansion y compris des éosinophiles, des lymphocytes Th2, et des ILC2, ainsi que d'une augmentation des taux de cytokine Th2 dans le sérum des souris traitées par IL-33.

De plus, notre travail a permis de mettre en évidence l'interaction entre l'IL-33 et les lymphocytes T régulateurs. En effet, le traitement IL-33 induisait une hausse de la fréquence des Tregs, augmentait leurs capacités répressives et induisait l'émergence d'une population de Treg CD39⁺ d'une manière dépendante de ST2L.

Dans un domaine axé principalement sur la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques, notre travail en démontrant l'effet anti-inflammatoire puissant d'IL-33 exogène dans l'AEC, constitue une mise en garde pour le développement de traitements basés sur l'inhibition de l'axe l'IL-33/ST2. D'autres études, en particulier chez l'homme, seront nécessaires pour déterminer les effets de l'IL-33 dans la PR.

Interleukin-33 inhibits experimental arthritis development and promotes Foxp3⁺ regulatory T-cells and the establishment of a type-2 immune response.

Jérôme Biton^{a,b,c}, Sara Khaleghparast Athari^{a,b}*, Allan Thiolat^{a,b}*, François Santinon^{a,b}, Delphine Lemeiter^{a,b}, Roxane Hervé^{a,b}, Laure Delavallée^{a,d}, Anais Levascot^e, Stéphane Roga^f, Patrice Decker^{a,b}, Jean-Philippe Girard^f, André Herbelin^e, Marie-Christophe Boissier^{a,b,g}, and Natacha Bessis^{a,b}.

^a INSERM, U1125, F-93017, Bobigny, France; ^b Sorbonne Paris Cité Université Paris 13, F-93017, Bobigny, France; ^c Present address: INSERM UMRS 1138 Equipe 13, Centre de Recherche des Cordeliers, F-75006, Paris, France; ^d Present address: INSERM UMRS 1138 Equipe 19, Centre de Recherche des Cordeliers, F-75006, Paris, France; ^e INSERM U1082, Pôle Biologie Santé, BP 633, 86022, Poitiers, France; ^f Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS) CNRS-Université de Toulouse III, Toulouse, France; ^g Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Avicenne, Service de Rhumatologie, F-93009, Bobigny, France.

* equal contribution

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

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

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

Key words: IL-33, arthritis, Th2 cells, innate type 2 lymphoid cells, regulatory T cells.

Competing interests: none

Funding: This work was funded by the Fondation Arthritis Courtin and Pfizer.

ABSTRACT

Objectives IL-33 is strongly involved in several inflammatory and autoimmune disorders. However, its contribution to chronic autoimmune inflammation, such as rheumatoid arthritis (RA), is ill defined. Here, we aimed at deciphering the role of IL-33 in a model of RA, namely collagen induced arthritis (CIA).

Methods Mice were immunized with type II collagen and treated with rIL-33 or PBS. Clinical and histological arthritis were monitored. Then, most experiments were performed 28 days after CIA induction. Type 2 cytokine levels in the plasma and their secretion by CD4⁺ T cells were assessed. The proportion of eosinophils, type-2 innate lymphoid cells (ILC2), Th2 cells and Foxp3⁺ regulatory T-cells (Tregs) were determined. IL-33 direct effect on Treg was assessed *in vitro* and *in vivo* by studying their ST2L expression. Finally, IL-33 impact on Treg suppressive activity was evaluated by studying CD39 expression and by performing *ex vivo* functional assay.

Results IL-33 strongly suppressed CIA. This effect was related to an enhanced type-2 immune response, including the expansion of eosinophils, Th2 cells, ILC2, and an increase in type 2 cytokine levels in the serum of IL-33 treated mice. Moreover, our work brings out the interplay between IL-33 and Treg. IL-33 treatment of CIA dramatically majors Treg frequency, increases their suppressive capacities and induces the emergence of a CD39^{+high} Treg population in a ST2L dependant manner.

Conclusions These data reveal a powerful anti-inflammatory mechanism by which IL-33 inhibits arthritis development, thus updating and strengthening the crucial role of IL-33 in RA.

INTRODUCTION

IL-33 is a barrier-tissue expressed cytokine that when released targets its receptor ST2 to promote Th2 response, mast cells, eosinophils and basophils (1–4). It also promotes type-2 innate lymphoid cells (ILC2), a population which represent a critical source of type 2 cytokines *in vivo* (5). IL-33 is an unconventional cytokine since it has a pro-inflammatory face related to its alarmin function, but it can also suppress inflammation in some clinical settings by driving type-2 immunity. This is illustrated by the protective role of IL-33 in hepatitis (6), colitis (7), experimental autoimmune encephalomyelitis (8), uveitis (9) and atherosclerosis (10). However, a similar amplification of this type-2 immune response, initiated by IL-33, aggravates asthma which is clearly a Th2 driven disease (11). Moreover, it has recently been shown that IL-33 can activate and promote CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T lymphocyte (Treg) expansion *in vitro* and *in vivo*, thus protecting mice from cardiac transplant rejection (12).

Here, we investigated the role of IL-33 in a model of chronic inflammatory arthritis. Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic joint disease whose hallmark is hyperplastic synovitis responsible for cartilage and bone destruction. Factors such as TNF- α , IL-1 and chemokines induce synovial cell activation and proliferation, production of metalloproteinases and free radicals by macrophages, neutrophils, synoviocytes, and chondrocytes, directly leading to destruction of neighbouring tissues (13). In contrast, Treg function is altered in RA (14) and those cells are protective in experimental models of RA (15,16).

Some works suggest a functional role of the IL-33/ST2 axis in the pathogenesis of human and mouse arthritis. In RA patients, only few data on the role of IL-33 are available. IL-33 levels in serum and synovial fluid are elevated and strong IL-33 expression can be detected in RA synovium (17,18). IL-33 synergistically enhances immune complex-induced TNF- α and IL-8 production in cultured human synovium-derived mast cells (19). In mouse models, while arthritis is reduced in ST2 KO or in anti-ST2 treated mice (20–22), it does not differ in IL-33 KO mice compared to WT mice (23,24). These studies in arthritis models underscore the complex nature of IL-33 and the necessity to establish how endogenous or administered IL-33 contributes to the inflammatory and regulatory pathways, respectively involved in arthritis pathophysiology and its control.

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

MATERIALS AND METHODS

Mice

Male mice aged 6 to 9 weeks and belonging to the C57BL/6 strain were purchased from Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France). All procedures were approved by the Animal Care Use Committee of the Paris 13 University (Bobigny, France) and the ethical comitee Charles Darwin.

Collagen-induced arthritis induction and evaluation

Arthritis was induced with native chicken collagen type II (CII, MD biosciences, Switzerland, Zürich). At 9 weeks of age, male C57BL/6 mice were injected intradermally at the base of the tail with 50µg of CII emulsified in complete Freund's adjuvant (CFA, mdbiosciences). On day 21, a booster subcutaneous injection of CII emulsified in CFA was given. A blinded procedure was used to monitor clinical and histological arthritis in all four limbs, as previously described (25,26).

Sources of IL-33

For *in vitro* experiments, murine rIL-33 was purchased from R&D Systems (Abingdon, UK). For all *in vivo* treatments, we used a purified recombinant mIL-33 (aa 109-266), provided by Dr JP Girard laboratory (CNRS, Toulouse, France). It was obtained from a mouse cDNA encoding IL-33 aa 109-266 which was subcloned into expression vector pET-15b (Novagen), and mouse rIL-33 was produced in E.coli BL21pLysS (Novagen) and purified on Ni-NTA agarose (Qiagen), according to the manufacturer's instructions.

Treatments

C57BL/6 mice were treated i.p daily by rIL-33 (1 µg per mouse) or by PBS for 10 days from day 1 to 5 and from day 21 to 25, or only from day 21 to 25 in Figure S4. In some experiment, mice received an anti-CD25 antibody (clone PC-61.5.3, Bio X cell) or control rat IgG1 (Bio X cell) with or without rIL-33 (1 µg per mouse) for 5 consecutive days.

Cell and tissue preparation

Leukocytes from the spleen were prepared using a cell strainer, and red blood cells were lysed in hemolysis buffer (NH₄CL, KHCO₃, and EDTA). Afferent and popliteal lymph nodes were dissected out of the hind limbs and leukocytes were prepared using a homogenizer. Blood was collected by heart puncture, and for cell analysis, red blood cells were lysed in hemolysis buffer. For bone marrow, the femur and the tibia from both hind legs were removed and freed of soft tissue attachments, and the extreme distal tip of each extremity were cut off. PBS–EDTA solution was forced through the bone with a syringe. After dispersing cell clumps, the cell suspension was centrifuged (400 g, 10 min, 4°C) and resuspended in 1 ml PBS–EDTA.

Flow cytometry

For Treg cell, Th2 cell or Tconv cell study, cells were stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-ST2 (clone DJ8) (MD biosciences), R-Phycoerythrin (PE)-labelled anti-CD39 (clone 24DMS1) (eBioscience, San Diego, CA, USA) or PE-labeled anti-CTLA-4 (clone UC10-4F10-11) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and PerCP.Cy5.5-labeled anti-CD4 (clone RM4-5) (BD Biosciences). The APC-labeled anti-Foxp3 (clone FJK-16s) Staining Set (eBioscience) was used for intracellular staining according to the manufacturer's recommendations. In *in vitro* experiments, a PE-labeled anti- CD25 (Clone PC61) (Biolegend) was used. For eosinophil study, cells were stained with FITC-labeled anti-CD11c (clone HL3) and PE-labeled anti-Siglec-F (cloneE50-2440) (all from BD bioscience). Finally, for ILC2 staining, cells were stained with FITC-labeled anti-ST2 (clone DJ8) (MD biosciences), PE-labeled anti-Lin (including anti-CD3 (clone 2C11), anti-Ly6G/Ly6C (clone RB6-8C5), anti-CD11b (clone M1/70), anti-CD45R/B220 (RA3-6B2) and anti-TER-119 (clone Ter-119)) (Biolegend, San Diego, CA, USA), APC-labeled anti-CD25 (clone PC61) (BD Bioscience), V450-labeled anti-Sca1 (clone D7)

(BD Biosciences) and APC-eFluor®780-labeled anti-cKit (clone ACK2) (eBioscience). Cells were stained at 4°C in PBS containing 2% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) and 0.01 M sodium azide, incubated for 30 min with 2.4G2 monoclonal antibody to block the Fcγ receptors (BD Biosciences) and incubated for 30 min with appropriate dilutions of various monoclonal antibodies or corresponding isotypes control coupled to FITC, PE, PerCP-Cy-5.5, APC, V450 or APC-eFluor®780. Flow cytometry was performed on a FACScalibur or on a BD LSRFortessa cell analyzer (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). Dead cells were excluded based on forward and side scatter characteristics. Reported statistical data are based on at least 1000 events gated on the population of interest. Results were analyzed using CellQuest Pro software or FACSDiva software (BD Biosciences). FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA) was used for graphical representations.

***In vitro* experiments**

Splenocytes were harvested from C57BL/6 male mice at 9 weeks age and seeded (1×10^5) in RPMI 1640 with 10% FCS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 50 µM 2-ME, 1M HEPES, and 5µg/ml of soluble anti-CD3 (clone 2C11) (BD Biosciences), in U-bottomed 96-well plates. Cells were incubated for 18 hours or 30 hours with or without 20 ng/ml of rmIL-33 (R&D systems) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. In some experiments, CD4⁺CD25⁺ cells were purified from the spleen of C57BL/6 male mice as described below and seeded for 72 hours (5×10^4) in the same culture medium as aforementioned with or without 5µg/ml of soluble anti-CD3, 2µg/ml of anti-CD28 (clone 37.51, BD Biosciences), 25 ng/ml of rIL-2 (eBiosciences) and rIL-33 (R&D systems) at indicated doses.

Lymphocyte purification

CD4⁺CD25⁻ and CD4⁺CD25⁺ T cells from the spleen were purified using the Regulatory T Cell Isolation Kit according to the manufacturer's protocol (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany). In brief, CD4⁺CD25⁺ T cells were isolated using a two-step procedure. First, CD4⁺ T cells were isolated by negative selection using a cocktail of biotin-conjugated antibodies, anti-Biotin Microbeads, LD column, and QuadroMACS (all from Miltenyi Biotec). Then, CD4⁺ T cells were directly labeled with a PE-conjugated anti-CD25 antibody and anti-PE MicroBeads. The cell suspension was loaded onto an MS column, which was placed in the magnetic field of a MACS

separator (OctoMACS, Miltenyi Biotec). The flow-through cells were collected and used as CD4⁺CD25⁻ cells, whereas the retained cells were eluted from the column and used as CD4⁺CD25⁺ Treg cells. To increase purity, two consecutive column-runs were performed. Flow cytometry analysis showed that purity of the CD4⁺CD25⁻ and CD4⁺CD25⁺ cell-enriched fractions was 90%-95% (data not shown).

Measurement of CD4⁺ CD25⁻ conventional T-cell cytokines secretion

Spleen CD4⁺ CD25⁻ ($1 \cdot 10^6$) T cells (Tconv) were stimulated for 18 h with PMA (50 ng/ml) and ionomycin (1 µg/ml) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO). Cytokines (IL-4, IL-13, IL-5, IFN-γ, IL-10, IL-6, TNF-α, IL-17) levels in culture supernatants were measured by multiplex protein analysis using the kit milliplex mouse cytokine magnetic bead (Merck Millipore Billerica, MA, USA) according to the manufacturer's instructions and data were analysed with Bioplex 200 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Assessment of Treg suppressive effect on CD4⁺ CD25⁻ conventional T cells

Spleen CD4⁺ CD25⁻ T cells (Tconv) were prelabeled with 5 µM carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 10 minutes. ($1 \cdot 10^5$) were co-cultured in RPMI 1640 with 10% FCS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 50 µM 2-ME, 1 M HEPES, and 5 µg/mL of soluble anti-CD3 (clone 2C11) (BD Biosciences), in U-bottomed 96-well plates with Treg ($1 \cdot 10^5$) to produce Tconv/Treg ratios of 1/1. Controls were performed using non-CFSE-labeled Tconv cells instead of Treg (CD4⁺ CD25⁻; $1 \cdot 10^5$). APCs ($1 \cdot 10^5$) treated with mitomycin were added to the culture medium. The cells were then incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. After 4 days of culture, the cells were stained with APC-labeled anti-CD4 (clone RM4-5, BD Biosciences) and Tconv proliferation was then determined for each Tconv:Treg ratio using flow cytometry to measure the CFSE dilution. Data were analyzed using CellQuest Pro software (BD Biosciences). IFN-γ levels in culture supernatants were measured using commercially available ELISA kits (Quantikine, R&D Systems, Abingdon, UK), according to the manufacturer's instructions. The sensitivity of the cytokine assays was 2 pg/ml.

ATPase assay

Magnetically sorted spleen CD4⁺CD25⁺ cells were incubated in 96-well round-bottom plates with medium containing 50 μM ATP (Sigma) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere during 20 minutes. ATP concentration was determined in VICTOR X Multilabel Plate Readers (Perkin Elmer) using the CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega). The percentage of ATP hydrolysed was determined as follows: = ((Ucl of 50μM ATP without Treg – Ucl of 50μM ATP with Treg)/ Ucl of 50μM ATP without Treg) x 100.

Cytokines and IgE assay in the serum

Cytokines (IL-4, IL-13, IL-5, IFN-γ, IL-10, IL-6, TNF-α, IL-17) levels in plasma from CIA mice treated or not with IL-33 were measured using the kit milliplex mouse cytokine magnetic bead (Merck Millipore) according to the manufacturer's instructions and data were analysed with Bioplex 200 (Biorad). IgE levels were determined in the serum by ELISA (mouse IgE, ELISA MAXTM Standard Sets, Biolegend) according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

According to data distribution, a parametric (ANOVA) or a non-parametric test (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney), with appropriate post-hoc comparisons, was used to compare data across the different groups. Clinical scores curves were compared with ANOVA. Categorical data were compared by χ^2 test. Pearson's correlation was used to correlate CD39 MFI and frequency of cells expressing ST2L among CD4⁺ Foxp3⁺ CD39⁺ cells (Figure 6). All statistical analyses were performed using STATVIEW version 5.0 Software (Abacus Concepts, CA, USA).

RESULTS

IL-33 treatment dramatically improves arthritis development.

We first investigated the effect of recombinant IL-33 on the development of CIA. Mice were treated i.p daily with IL-33 from days 1 to 5 and from days 21 to 25 after CIA induction. IL-33 almost completely inhibited clinical signs of arthritis compared to control mice (Figure 1A). Moreover, the mean maximal arthritis score (A_{\max}) and arthritis incidence were dramatically reduced in IL-33 treated mice compared to PBS control mice (Figure 1B and C). Finally, histological examination at day 42 also revealed an important decrease in joint inflammation and destruction in IL-33 treated mice (Figure 1D, E, F, G).

Expansion of eosinophils and Th2 cells in IL-33 treated mice reveals the establishment of a type-2 immune response.

IL-33/ST2 pathway is essential in type-2 immune response establishment (1). Consequently, we investigated whether the inhibitory effect of IL-33 on CIA development involved eosinophils and Th2 cells. First, IL-33 induced a threefold increase of eosinophils frequency, defined as $SSC^{\text{high}} CD45^+ Siglec-F^+ CD11c^-$ cells, among total blood leucocytes (Figure 2A and B) (27). Moreover IgE and Th2-cytokine (IL-4, IL-5, IL-10, and a trend for IL-13) levels were increased in the plasma of IL-33 treated mice, also signing a type-2 immune response, while IL-17 and IL-6 levels were decreased (Figure 2C and D). TNF- α and IFN- γ were detected but no difference was observed between groups (data not shown).

Afterward, we investigated the proportion of Th2 cells defined as $CD4^+ Foxp3^- ST2L^+$ cells (28) in the spleen and the blood (28). First, the total leukocyte count in the spleen was markedly increased in IL-33 treated mice (PBS treated mice: 81.6×10^6 and IL-33 treated mice: 143.6×10^6 , $p < 0.0001$). IL-33 induced a threefold increase of Th2 cells number in the spleen (Figure 3B). Moreover, the percentage of $CD4^+ Foxp3^-$ conventional T cells (Tconv) expressing ST2L in the spleen (Figure 3C) and in the blood (Figure 3E) were increased in IL-33 treated mice compared with PBS mice. Finally, we assessed *ex vivo* cytokine production by Tconv defined as $CD4^+ CD25^-$ cells. Tconv from the spleen of IL-33 treated mice produced more IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13 than did those from the PBS group but surprisingly also more IL-6 (Figure 3F). All together these results showed that IL-33 induces globally a shift toward type-2 immunity in CIA mice.

ILC2 are involved in the type-2 immune shift induced by IL-33 in CIA.

ILC2 are strongly associated in the establishment of type-2 immunity and IL-33 promotes their expansion. It is not known, however, whether IL-33 can promote such an innate type-2 immune response in arthritis. Consequently and according to above results, ILC2 proportion was determined in the bone marrow and in the spleen of IL-33 and PBS treated CIA mice. ILC2 were identified as a lineage-negative $SSC^{\text{low}} FSC^{\text{low}}$ population expressing ST2L and Sca-1 (Figure 4A). Consistent with previous reports, most of these cells expressed CD25 and were only partially positive for c-Kit (29,30). In bone marrow, IL-33 treatment of CIA dramatically increased the proportion of ILC2 (Figure 4B). We observed a similar result in the spleen where the frequency and the number of ILC2 were increased by six fold after IL-33 treatment (Figure 4C and 4D).

IL-33 promotes Treg expansion in CIA and increases ST2L expression.

Treg are able to prevent autoimmunity, and to respond to IL-33 thanks to their expression of ST2L (12). Therefore, we investigated whether the mechanism of action of IL-33 in CIA involved Treg. In the spleen, IL-33 treatment induced an increased Treg ($CD4^+ Foxp3^+$ cells) and Tconv numbers (Figure 5B and 5D). However, Tconv percentage in the spleen was decreased in IL-33 treated mice compared to control group (Figure 5E), while Treg frequency was increased (Figure 5C). Consequently, there was an increase of the Treg/Tconv ratio in IL-33 treated CIA mice (Figure 5F), showing a shift in favor of Treg. Likewise, in lymph nodes (LN) and blood from IL-33 treated mice, the frequency of Treg was increased while Tconv frequency decreased, although differences were non-significant (Table S1). Consequently, the Treg/Tconv ratio was increased in the blood of IL-33 treated CIA mice (Table S1). We next tried to determine whether IL-33 acts directly on Treg in CIA mice by studying their ST2L expression 28 days after CIA induction (Figure 5G). IL-33 treatment induced a twofold increase of the frequency of Treg expressing ST2L in the spleen (Figure 5H). This was accompanied by an increased MFI of ST2L among Treg $ST2L^+$ (Figure 5I). Afterwards, we analyzed the increased number of Treg after IL-33 treatment of CIA mice upon differential gating on Treg $ST2L^+$ and Treg $ST2L^-$. IL-33 treatment induced only a 2.5-fold increase in $ST2L^-$ Treg cell count, while the number of $ST2L^+$ Treg was multiplied by six (Figure 5J). This result suggests that IL-33 induced-Treg expansion is likely to be a direct effect of

IL-33 on ST2L⁺ Treg. In LN and in blood, the frequency of Treg expressing ST2L was also increased in IL-33 treated mice (Figure S1A and C). IL-33 also induced *in vitro* an increased percentage of Treg expressing ST2L after a stimulation of 18 and 30 hours (Figure S1E and F).

IL-33 modifies Treg phenotype and enhances Treg suppressive activity in CIA.

Then, we characterized the biological effect of IL-33 on Treg activation. First, we studied the expression of CD39 by Treg 28 days after CIA induction (Figure 6A). CD39 expression on splenic Treg was higher in IL-33 treated mice compared with PBS group (Figure 6B and C). The same result was observed in LN, but not in the blood (Table S1). Moreover, we observed a twofold increase of CD39^{high} Treg frequency among CD39⁺ Treg in the spleen of IL-33 treated mice (Figure 6D). The percentage of Treg expressing ST2L and CD39 MFI among CD39⁺ Treg in mice treated or not with IL-33 were correlated. This suggested a link between the expression of these two molecules on Treg (Figure 6E). To strengthen this data, we determined CD39 MFI among CD39⁺ Treg expressing or not ST2L in IL-33 treated mice. ST2L⁺ Treg population had a twofold higher CD39 MFI than non-expressing ST2L Treg (Figure 6F). A similar result was observed in LN concerning CD39 MFI in IL-33 treated mice according to ST2L expression (ST2L⁺ Treg: 273.3±6.3 and ST2L⁻ Treg: 152.6 ±4.7, $p<0.001$). Accordingly, IL-33 induced-CD39 expression by Treg is probably restricted to ST2L⁺ cells. CD39 expression on Treg is related to their suppressive activity since membrane-expressed CD39 catalyses extracellular ATP hydrolysis (31–33) Consequently, we determined IL-33 impact on the ATPase activity of Treg (CD4⁺ CD25⁺ cells). We observed an increase, although non-significant, of the ATPase activity of Treg in IL-33 treated CIA mice (Figure 6G). Moreover, CTLA-4 membrane expression on Treg from LN (Table S1) and the spleen (data not shown) were slightly increased in IL-33 treated mice. Finally, we determined *ex vivo* the ability of Treg to suppress Tconv proliferation. We found no significant difference in Treg capacity to inhibit Tconv proliferation between IL-33 treated mice and control group (data not shown). On the contrary, IL-33 treatment dramatically enhanced the ability of Treg to suppress IFN- γ secretion by Tconv (Figure 6H).

IL-33 amplifies a CD25⁻ Treg population and prevents from total Treg depletion

To further study the implication of Treg in IL-33 therapeutic effect, we performed pilot experiments *in vivo* by studying IL-33 mediated effect in the absence of CD25⁺ Treg. By using a

depleting anti-CD25 antibody, we first checked that CD4⁺Foxp3⁺ cells frequency was decreased in the blood of injected mice, which was actually the case as compared to isotype control group (Figure S2A). However, when IL-33 was co-administered with the anti-CD25 Ab, Treg frequency reached a similar level to the one observed in isotype control group (Figure S2A). To determine which Treg population was restored when IL-33 was co-administered with anti-CD25 Ab, both frequencies of CD4⁺ Foxp3⁺ Treg expressing CD25 or not were determined. Figure S2B shows that CD4⁺Foxp3⁺ Treg expressing CD25⁺ cells were, as expected, depleted by an anti-CD25 Ab even in the presence of IL-33. In contrast, CD4⁺Foxp3⁺CD25⁻ cells were strongly expanded by IL-33 treatment in the presence of the anti-CD25 Ab (Figure S2C). Thus, strikingly, in absence of CD25 expressing Treg, IL-33 is still able to induce a substantial expansion of CD4⁺ Foxp3⁺ CD25⁻ cells, thus highlighting the strong impact of IL-33 on Treg. These findings also indicate that CD25 depletion do not represent a reliable model to decipher IL-33 effect on CIA development in absence of Treg.

Then, to confirm and further decipher the strong impact of IL-33 on Treg, we performed *in vitro* experiments. It has been amply demonstrated that cytokines such as IL-2 and TGFβ play a crucial role in the maintenance of Foxp3 and CD25 expression in Treg cultures (34). Accordingly and in order to determine whether IL-33 has also a direct impact on Treg maintenance *in vitro*, we evaluated the impact of IL-33 on Treg. IL-2 was used as a positive control and, as expected, it allowed a substantial maintenance of CD4⁺Foxp3⁺ cells in culture compared to the other groups (Figure S3A and B). Remarkably, IL-33 was also able, in a dose dependant manner, to maintain a higher frequency of CD4⁺Foxp3⁺ cells compared to unstimulated and to anti-CD3+anti-CD28 stimulated cells (Figure S3A and B). Since we have shown that, *in vivo*, CD4⁺Foxp3⁺ CD25⁻ cells unaffected by CD25 depletion were strongly expanded by IL-33 (Figure S2C), we dissected IL-33 impact on Treg according to CD25 expression. As shown on Figure S3C, IL-33 at 60ng/ml induced a 30 fold increase of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ cells frequency compared to unstimulated cells and a 3 fold increase compared to anti-CD3+anti-CD28 stimulated cells. Finally, we confirmed, *in vitro*, that IL-33 is also able to expand CD25⁻ Treg while IL-2 as no impact on this non-expressing CD25 cells (Figure S3D). This last result is in accordance with the fact that *in vivo*, in absence of IL-2 signaling, IL-33 is still able to induce a substantial expansion of Treg.

DISCUSSION

Our study shows a previously undescribed capacity of IL-33 to dramatically suppress CIA development. This therapeutic effect was strong, long-lasting and associated with a shift toward type-2 immune response, including the expansion of eosinophils, Th2 cells and ILC2. Moreover, our work reveals the central role of Treg in the inhibitory effect of IL-33 on CIA development.

Treatment of CIA by repeated administration of IL-33 led to a strong increase in Th2 cytokine levels in the plasma. These cytokines, such as IL-4 and IL-13 exert therapeutic properties in various RA models and are certainly strongly involved in the therapeutic effect of IL-33 in our study (35,36). In contrast, IL-6 and IL-17 concentration in plasma are decreased after IL-33 treatment. Furthermore, in our CIA experiments IL-33 induces a shift toward Th2 cells. However, it appears that IL-33 is a switch-hitting cytokine which can have different functions either associated in driving Th2-immune response or Th1-immune response when delivered *in vivo*. For instance, it can promote IFN- γ secretion by CD8 T cells in a model of virus infection (37), and interact directly with NK and NKT cells to induce this cytokine (3). In the same way, IL-33 blockade ameliorates hepatic injury by reducing IFN- γ secretion in a mouse model (38). How one method elicits Th2 responses and other Th1 responses *in vivo* is unclear. It is possible that different routes of delivery and even different doses have different outcomes.

ILC2 are a newly defined member of the lymphoid lineage strongly involved in the establishment of a type-2 immunity, notably by producing high amounts of IL-13 and IL-5, and low amounts of IL-4 (39). However, to our knowledge the role of ILC2 in chronic inflammation of autoimmune origin has not been described yet, but since they produce type-2 cytokines, their role should be benefic in Th1-Th17 driven autoimmune disease such as RA. In our study, IL-33 treatment was associated with a dramatic expansion of ILC2 in the bone marrow and in the spleen of IL-33 treated mice. Thus, ILC2 are likely to participate to the therapeutic effect of IL-33 in CIA by promoting the establishment of the type-2 immune response observed in our experiments.

Treg are key players in the control of RA (14,40) and its models (41). We hypothesized that the strong anti-inflammatory effect of IL-33 in CIA is in part mediated through Treg expansion and activation. Indeed, our work shows that IL-33 administration *in vivo* increases the frequency of Treg, confirming *in vitro* and *in vivo* data obtained in two other studies performed in ConA-induced hepatitis (42) and in a cardiac allograft model (12). It was also shown in a recent study that IL-33 is a key regulator of intestinal immune response by promoting Treg in the intestine

(43). Moreover, IL-33 induced-expansion of Treg can lead to an anti-inflammatory therapeutic effect in experimental colitis (44) and prevention of transplant rejection (12). In our study, we show that IL-33 treatment induced higher rates of ST2L⁺ Treg than ST2L⁻ Treg, suggesting that IL-33 induced-Treg expansion is likely to be a direct effect of IL-33 on ST2L⁺ Treg. This ST2L⁺ Treg population has recently been shown to be an activated subset of Foxp3⁺ cells, demonstrated by a higher expression of ICOS and CD44 compared with their ST2L⁻ counterpart (45). We can therefore hypothesize that IL-33 therapeutic effect in CIA is, at least in part, related to the expansion of a more activated Treg cell population. Similarly, we showed a higher CD39 expression on Treg of IL-33 treated mice. Indeed, membrane-expressed CD39 catalyses extracellular ATP hydrolysis and, together with CD73, results in the production of adenosine, an anti-inflammatory mediator. CD39 expression on Treg has been thus associated with increased suppressive potency, of which one effect is suppression of Th17 cell (31,32) Moreover, alterations in the CD39/CD73 machinery lead to loss of Treg function and to auto-immunity (33). CD39⁺ Treg are impaired in patients with multiple sclerosis (31). Furthermore, this CD39⁺ Treg population expands during multiple sclerosis remissions and after anti-inflammatory treatment in CIA (31,46). We recently shown that treatment of CIA and of RA patients with an antibody against IL-6R also involved CD39⁺ Treg cells (46). We therefore hypothesized that IL-33 allows the generation of a more potent suppressive Treg population capable of inducing metabolic changes (ATP hydrolysis) that protect against joint inflammation. We observed *ex vivo* that IL-33 enhances the ability of Treg to inhibit IFN- γ secretion by Tconv, without increasing the inhibition of Tconv proliferation by Treg. Interestingly, anti-TNF- α antibody (infliximab) frequently used in RA treatment, was also found to enhance inhibition of IFN- γ secretion of Tconv by Treg without altering their proliferation (47).

Lastly, by using a depleting anti-CD25 antibody, we tried to determine more precisely the place of Treg in the therapeutic effect of IL-33. This strategy was almost completely efficient to deplete CD25-expressing Treg, while its capacity to enhance CIA development has been shown in others studies (15,16). Unexpectedly, the slight amount of CD4⁺ Foxp3⁺ CD25⁻ cells unaffected by CD25 depletion was strongly expanded by IL-33 treatment. This action of IL-33 on non expressing CD25 Treg led to a similar CD4⁺ Foxp3⁺ cells frequency in isotype control treated mice and in anti-CD25+IL-33 treated mice. We can hypothesis that Treg from mice treated with anti-CD25 and IL-33 have a higher expression of ST2L and an increased functionality than those of the isotype control group. Moreover, our *in vitro* data also reveals that IL-33 is able to directly

sustain a robust Foxp3 expression on Treg expressing or not CD25. Consequently, since IL-33 has a strong impact on non-expressing CD25 Treg, a population which exhibits regulatory properties in human (48) and in mice (49) CD25 depletion does not allow us to decipher IL-33 effect on CIA development. Interestingly, it was recently shown that one mode of action of IL-33 on Treg involved dendritic cells (45). In fact, IL-33 is able to stimulate IL-2 secretion by CD11c⁺ DC expressing ST2L and this IL-2 production drives Treg expansion. Accordingly, the strong therapeutic effect of IL-33 observed in our work could be in part mediated by an increased IL-2 secretion by DC (45). However, in our study IL-33 is able to induce Treg expansion in anti-CD25 treated mice. Consequently and in the light of results obtained in CD25 depletion experiments, in absence of the alpha chain of the IL-2 receptor, IL-33 is still able to induce Treg expansion probably independently of IL-2 by a direct effect on ST2L-expressing Treg. Finally, this set of experiments reinforces the strong impact of IL-33 on both CD25⁺ and CD25⁻ Treg subpopulations, therefore strengthening the involvement of these cells in the therapeutic effect of IL-33 in CIA.

Most of the works deciphering the involvement of IL-33 in RA, studied the functional role of the IL-33/ST2 axis. In mouse models of arthritis involving active immunization, the use of ST2 KO mice, ST2 blockade or injection of sST2 decreased immune responses and severity of arthritis. This suggested a pathogenic role for IL-33, signaling through ST2L, in these experimental models (20–22). However, while arthritis is reduced in ST2 KO mice, it did not differ in IL-33 KO mice compared to WT mice (23,24). One hypothesis of this striking contrast could be that ST2L can cross-activate other signaling pathways in addition to IL-33 mediated signals (50). Thus, all results obtained by inhibiting ST2L or in ST2L KO mice do not necessary allow to conclude on the role of IL-33 in RA process.

The direct involvement of IL-33 in the inflammatory effector phase of arthritis had been reported in two studies. The first one, in concordance with our result, was performed in the KRN model of RA and reported a suppression of joint inflammation by IL-33, by enhancing the production of Th2 cytokines and by upregulating FcγRIIB on macrophages (51). However, the second one concluded to a pathogenic role of late IL-33 administration in CIA by activating mast cells (22). But the main difference with our study is based on the therapeutic window employed since we administrated IL-33 both at the induction of CIA, from day 1 to 5, and then at the boost from day 21 to 25. In the study from Xu et al, IL-33 was administered only from day 21 to day 25. By using the same kinetic treatment, we partially confirmed this result. In fact, we observed in IL-33 treated mice a slight and non-significant increase in arthritis clinical signs (Figure S4A), while

joint destruction and inflammation were unmodified (Figure S4D-E). This differential effect of IL-33 according to the therapeutic window used, could probably be explained by the fact that ST2L⁺ Treg, Th2 cells and ILC2 expansion was much weaker in CIA mice receiving IL-33 only from day 21 to day 25 than in mice treated from day 1 to 5 and then from day 21 to 25 (Figure S4F). We can therefore hypothesize that early administration of IL-33 is likely to allow the shift to a type-2 immune response and to Treg activation as we showed. In contrast, a late administration of IL-33 would probably occur too late to promote efficiently Treg expansion, to induce a strong shift toward a type-2 immune response and finally to inhibit arthritis development (Figure S4). Consequently, in a context where joint inflammation is probably already installed, IL-33 treatment only from day 21 to 25 may only exacerbate inflammation by inducing neutrophil and/or mast cells migration within the joint. Interestingly, the anti-arthritic effect of IL-33 may be also related to its expression in the bone tissue in which it acts as a bone-protective cytokine blocking osteoclastogenesis, as shown in human-TNF-transgenic mice, a model of RA. Importantly, IL-33 can also inhibit human osteoclast differentiation from BM precursors *in vitro* (52).

Overall, it is now well established that IL-33 is able to suppress inflammation by driving type-2 immunity and/or by boosting Treg activity, a phenomenon observed in our study but also in many murine models of human disease (6–9). For the first time, we highlight the protective effect of IL-33 in CIA and related it to the emergence of type 2 immunity and to the expansion of a CD39⁺ Treg population. In RA, a disease in which Treg are clearly defective (14), the powerful effect of IL-33 on those cells should not be ignored. Finally, in a field mainly focused on the search of new therapeutic targets, our work by demonstrating the powerful anti-inflammatory capacity of exogenous IL-33 in CIA, provides a warning signal concerning the development of treatment based on IL-33/ST2 axis inhibition. Other studies, particularly in human, will be necessary to determine which effect of IL-33 in RA, anti- or pro-inflammatory, outperforms the other and should be targeted.

Acknowledgments:

We are grateful to Stephane Roga and Jean-Philippe Girard for providing recombinant murine IL-33. We thank Nadège Brunel for multiplex experiments (INSERM IFR65 : Institut de recherche en santé Saint-Antoine, Paris, France). Jérôme Biton received funding from the *Conseil Général de Seine Saint Denis*, *French Society for Rheumatology*, and *Fondation du Judaïsme Français*. We thank Clément Lourdes (University of Paris 13, Paris, France), Stéphane Chambris and Sonia Varela (animal facilities, University of Paris 13, Paris, France) for their outstanding technical assistance.

REFERENCE

1. Pecaric-Petkovic T, Didichenko SA, Kaempfer S, Spiegl N, Dahinden CA. Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. *Blood* 2009;113:1526–34.
2. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 2005;23:479–90.
3. Bourgeois E, Van LP, Samson M, Diem S, Barra A, Roga S, et al. The pro-Th2 cytokine IL-33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN-gamma production. *Eur J Immunol* 2009;39:1046–55.
4. Besnard A-G, Togbe D e., Couillin I, Tan Z, Zheng S-G, Erard F o., et al. Inflammasome - IL-1 - Th17 response in allergic lung inflammation. *J Mol Cell Biol* 2011. Available at: <http://dx.doi.org/10.1093/jmcb/mjr042>.
5. Licona-Limón P, Kim LK, Palm NW, Flavell RA. TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol* 2013;14:536–542.
6. Milovanovic M, Volarevic V, Radosavljevic G, Jovanovic I, Pejnovic N, Arsenijevic N, et al. IL-33/ST2 axis in inflammation and immunopathology. *Immunol Res* 2012;52:89–99.
7. Groß P, Doser K, Falk W, Obermeier F, Hofmann C. IL-33 attenuates development and perpetuation of chronic intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2012;18:1900–1909.
8. Jiang H-R, Milovanović M, Allan D, Niedbala W, Besnard A-G, Fukada SY, et al. IL-33 attenuates EAE by suppressing IL-17 and IFN- γ production and inducing alternatively activated macrophages. *Eur J Immunol* 2012;42:1804–1814.
9. Barbour M, Allan D, Xu H, Pei C, Chen M, Niedbala W, et al. IL-33 attenuates the development of experimental autoimmune uveitis. *Eur J Immunol* 2014.
10. Miller AM, Xu D, Asquith DL, Denby L, Li Y, Sattar N, et al. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J Exp Med* 2008;205:339–46.
11. Wills-Karp M, Rani R, Dienger K, Lewkowich I, Fox JG, Perkins C, et al. Trefoil factor 2 rapidly induces interleukin 33 to promote type 2 immunity during allergic asthma and hookworm infection. *J Exp Med* 2012;209:607–22.
12. Turnquist HR, Zhao Z, Rosborough BR, Liu Q, Castellaneta A, Isse K, et al. IL-33 expands suppressive CD11b⁺ Gr-1(int) and regulatory T cells, including ST2L⁺ Foxp3⁺ cells, and mediates regulatory T cell-dependent promotion of cardiac allograft survival. *J Immunol* 2011;187:4598–610.
13. Boissier M-C. Cell and cytokine imbalances in rheumatoid synovitis. *Jt Bone Spine Rev Rhum* 2011;78:230–234.

14. Nadkarni S, Mauri C, Ehrenstein MR. Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta. *J Exp Med* 2007;204:33–9.
15. Morgan ME, Suttmuller RP, Witteveen HJ, Duivenvoorde LM van, Zanelli E, Melief CJ, et al. CD25+ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:1452–60.
16. Nguyen LT, Jacobs J, Mathis D, Benoist C. Where FoxP3-dependent regulatory T cells impinge on the development of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56:509–20.
17. Carriere V, Roussel L, Ortega N, Lacorre DA, Americh L, Aguilar L, et al. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U A* 2007;104:282–7.
18. Talabot-Ayer D, Gabay C, Palmer G. Reply to Xie et al. about the article “Distinct serum and synovial fluid interleukin (IL)-33 levels in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and osteoarthritis.” *Joint Bone Spine* 2013;80:117–8.
19. Kashiwakura J, Yanagisawa M, Lee H, Okamura Y, Sasaki-Sakamoto T, Saito S, et al. Interleukin-33 synergistically enhances immune complex-induced tumor necrosis factor alpha and interleukin-8 production in cultured human synovium-derived mast cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2013;161 Suppl 2:32–6.
20. Leung BP, Xu D, Culshaw S, McInnes IB, Liew FY. A novel therapy of murine collagen-induced arthritis with soluble T1/ST2. *J Immunol* 2004;173:145–50.
21. Palmer G, Talabot-Ayer D, Lamacchia C, Toy D, Seemayer CA, Viatte S, et al. Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 2009;60:738–49.
22. Xu D, Jiang HR, Kewin P, Li Y, Mu R, Fraser AR, et al. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. *Proc Natl Acad Sci U A* 2008;105:10913–8.
23. Martin P, Talabot-Ayer D, Seemayer CA, Vigne S, Lamacchia C, Rodriguez E, et al. Disease severity in K/BxN serum transfer-induced arthritis is not affected by IL-33 deficiency. *Arthritis Res Ther* 15:R13.
24. Talabot-Ayer D, Martin P, Seemayer CA, Vigne S, Lamacchia C, Finckh A, et al. Immune-mediated experimental arthritis in IL-33 deficient mice. *Cytokine* 2014;69:68–74.
25. Clavel G, Valvason C, Yamaoka K, Lemeiter D, Laroche L, Boissier MC, et al. Relationship between angiogenesis and inflammation in experimental arthritis. *Eur Cytokine Netw* 2006;17:202–10.
26. Saidenberg-Kermanac’h N, Bessis N, Lemeiter D, Vernejoul MC de, Boissier MC, Cohen-Solal M. Interleukin-4 cellular gene therapy and osteoprotegerin decrease inflammation-associated bone resorption in collagen-induced arthritis. *J Clin Immunol* 2004;24:370–8.

27. Wen T, Besse JA, Mingler MK, Fulkerson PC, Rothenberg ME. Eosinophil adoptive transfer system to directly evaluate pulmonary eosinophil trafficking in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:6067–6072.
28. Löhning M, Stroehmann A, Coyle AJ, Grogan JL, Lin S, Gutierrez-Ramos JC, et al. T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:6930–6935.
29. Klein Wolterink RGJ, Kleinjan A, Nimwegen M van, Bergen I, Bruijn M de, Levani Y, et al. Pulmonary innate lymphoid cells are major producers of IL-5 and IL-13 in murine models of allergic asthma. *Eur J Immunol* 2012;42:1106–1116.
30. Brickshawana A, Shapiro VS, Kita H, Pease LR. Lineage(-)Sca1+c-Kit(-)CD25+ cells are IL-33-responsive type 2 innate cells in the mouse bone marrow. *J Immunol Baltim Md* 1950 2011;187:5795–5804.
31. Fletcher JM, Lonergan R, Costelloe L, Kinsella K, Moran B, O’Farrelly C, et al. CD39+Foxp3+ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *J Immunol* 2009;183:7602–10.
32. Ye ZJ, Zhou Q, Zhang JC, Li X, Wu C, Qin SM, et al. CD39+ regulatory T cells suppress generation and differentiation of Th17 cells in human malignant pleural effusion via a LAP-dependent mechanism. *Respir Res* 2011;12:77.
33. Sauer AV, Brigida I, Carriglio N, Hernandez RJ, Scaramuzza S, Clavenna D, et al. Alterations in the adenosine metabolism and CD39/CD73 adenosinergic machinery cause loss of Treg cell function and autoimmunity in ADA-deficient SCID. *Blood* 2012;119:1428–39.
34. Chen Q, Kim YC, Laurence A, Punkosdy GA, Shevach EM. IL-2 controls the stability of Foxp3 expression in TGF-beta-induced Foxp3+ T cells in vivo. *J Immunol Baltim Md* 1950 2011;186:6329–6337.
35. Bessis N, Boissier MC, Ferrara P, Blankenstein T, Fradelizi D, Fournier C. Attenuation of collagen-induced arthritis in mice by treatment with vector cells engineered to secrete interleukin-13. *Eur J Immunol* 1996;26:2399–403.
36. Cottard V, Mulleman D, Bouille P, Mezzina M, Boissier MC, Bessis N. Adeno-associated virus-mediated delivery of IL-4 prevents collagen-induced arthritis. *Gene Ther* 2000;7:1930–9.
37. Bonilla WV, Fröhlich A, Senn K, Kallert S, Fernandez M, Johnson S, et al. The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral CD8+ T cell responses. *Science* 2012;335:984–989.
38. Chen J, Duan L, Xiong A, Zhang H, Zheng F, Tan Z, et al. Blockade of IL-33 ameliorates Con A-induced hepatic injury by reducing NKT cell activation and IFN- γ production in mice. *J Mol Med Berl Ger* 2012;90:1505–1515.
39. Walker JA, Barlow JL, McKenzie AN. Innate lymphoid cells--how did we miss them? *Nat Rev Immunol* 2013;13:75–87.

40. Nie H, Zheng Y, Li R, Guo TB, He D, Fang L, et al. Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF-alpha in rheumatoid arthritis. *Nat Med* 2013;19:322–8.
41. Biton J, Semerano L, Delavallee L, Lemeiter D, Laborie M, Grouard-Vogel G, et al. Interplay between TNF and regulatory T cells in a TNF-driven murine model of arthritis. *J Immunol* 2011;186:3899–910.
42. Volarevic V, Mitrovic M, Milovanovic M, Zelen I, Nikolic I, Mitrovic S, et al. Protective role of IL-33/ST2 axis in Con A-induced hepatitis. *J Hepatol* 2012;56:26–33.
43. Schiering C, Krausgruber T, Chomka A, Fröhlich A, Adelman K, Wohlfert EA, et al. The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. *Nature* 2014;513:564–568.
44. Duan L, Chen J, Zhang H, Yang H, Zhu P, Xiong A, et al. Interleukin-33 ameliorates experimental colitis through promoting Th2/Foxp3+ regulatory T-cell responses in mice. *Mol Med Camb Mass* 2012;18:753–761.
45. Matta BM, Lott JM, Mathews LR, Liu Q, Rosborough BR, Blazar BR, et al. IL-33 Is an Unconventional Alarmin That Stimulates IL-2 Secretion by Dendritic Cells To Selectively Expand IL-33R/ST2+ Regulatory T Cells. *J Immunol Baltim Md* 2014;193:4010–4020.
46. Thiolat A, Semerano L, Pers YM, Biton J, Lemeiter D, Portales P, et al. Interleukin-6 receptor blockade enhances CD39+ regulatory T cell development in rheumatoid arthritis and in experimental arthritis. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ* 2014;66:273–283.
47. 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-TNFalpha therapy. *J Exp Med* 2004;200:277–85.
48. Bonelli M, Savitskaya A, Steiner C-W, Rath E, Smolen JS, Scheinecker C. Phenotypic and functional analysis of CD4+ CD25- Foxp3+ T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol Baltim Md* 2009;182:1689–1695.
49. Ono M, Shimizu J, Miyachi Y, Sakaguchi S. Control of autoimmune myocarditis and multiorgan inflammation by glucocorticoid-induced TNF receptor family-related protein(high), Foxp3-expressing CD25+ and CD25- regulatory T cells. *J Immunol Baltim Md* 2006;176:4748–4756.
50. Kamradt T, Drube S. A complicated liaison: IL-33 and IL-33R in arthritis pathogenesis. *Arthritis Res Ther* 2013;15:115.
51. Anthony RM, Kobayashi T, Wermeling F, Ravetch JV. Intravenous gammaglobulin suppresses inflammation through a novel T(H)2 pathway. *Nature* 2011;475:110–3.

52. Zaiss MM, Kurowska-Stolarska M, Bohm C, Gary R, Scholtysek C, Stolarski B, et al. IL-33 shifts the balance from osteoclast to alternatively activated macrophage differentiation and protects from TNF-alpha-mediated bone loss. *J Immunol* 2011;186:6097–105.

Figure Legends

Fig.1. IL-33 treatment inhibits collagen-induced arthritis (CIA). All C57BL/6 mice were immunized with chicken collagen II emulsified in CFA on day 0 and on day 21. Mice were treated i.p daily with 100 μ L of rIL-33 at 10 μ g/ml (1 μ g per mouse) for 10 days, from day 1 to 5 and from day 21 to 25 (n=15, black squares). Control mice received 100 μ l of phosphate buffer saline (PBS) (n=14, grey circle). On day 28, mice were given i.p injection of LPS 055:B5 (50 μ g/mice) (LPL203, Biochem, Meudon, France). Mice were killed at day 42, paws were removed and histological sections of the knee were prepared and stained with hematoxylin and eosin. **(A)** Clinical arthritis scores. **(B)** Frequency of arthritis. **(C)** Mean maximal arthritis score (Amax). **(D)** Histological joint inflammation score. **(E)** Histological joint destruction score. Histological slide at day 42 of one representative PBS control mouse **(F)** and of one representative IL-33 treated mouse **(G)**. Black arrow shows joint destruction, and white arrow shows synovial infiltration. Except in **(B)**, data are expressed as mean \pm SEM. * p <0.0001 IL-33 vs PBS (one-way ANOVA). Data are representative of one experiment out of 3 similar experiments.

Fig.2. IL-33 treatment induces a shift toward a type-2 immune response by promoting eosinophils and by increasing Th2 cytokine levels in plasma.

C57BL/6 mice were immunized with CII/CFA at days 0 and 21, and they were treated i.p daily with rIL-33 (1 μ g per mouse) from day 1 to 5 and from day 21 to 25. Control mice received PBS. All mice were euthanized 28 days after the first immunization with CII/CFA. **(A)**, **(B)** Blood cells (8 mice per group) were labeled with fluorochrome-conjugated anti-CD11c and anti-Siglec-F. **(A)** Representative dot plot of SSC^{high} CD45⁺ Siglec-F⁺ CD11c⁻ cells frequency in IL-33 treated mice and in PBS control mice. **(B)** SSC^{high} CD45⁺ Siglec-F⁺ CD11c⁻ cells frequency amount whole blood leucocytes. **(C)** IgE levels in the plasma and **(D)** Cytokine (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, and IL-17) levels in the plasma were determined at day 28. Data are given as mean \pm SEM for each group. Data are representative of one experiment out of 3 similar experiments. Mann Whitney test was used for statistical analysis.

Fig.3. IL-33 treatment promotes Th2 cells and dramatically increases Th2 cytokines secretion by Tconv. C57BL/6 mice were immunized with CII/CFA and treated as in Figure 2.

Control mice received PBS. All mice were euthanized 28 days after the first immunization with CII/CFA. **(A)** As shown on this representative dot plot, Th2 cells were defined as CD4⁺ Foxp3⁻ cells expressing ST2L. Representative histogram of ST2L expression among CD4⁺ Foxp3⁻ cells in IL-33 treated mice and in PBS control mice. **(B, C, D)** Splenocytes and **(E)** blood cells (10 mice per group) were labeled with fluorochrome-conjugated anti-ST2L, anti-CD4 and anti-Foxp3. **(B)** CD4⁺ Foxp3⁻ ST2L⁺ (Th2) cells number. **(C)** Percentage of ST2L⁺ cells among CD4⁺Foxp3⁻ cells. **(D)** ST2L MFI on ST2L⁺CD4⁺Foxp3⁻ cells. **(E)** Percentage of ST2L⁺ cells among CD4⁺Foxp3⁻ cells. **(F)** Cytokine (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, and IL-17) levels were determined at day 28 post CIA induction in PMA-ionomycin stimulated Tconv supernatant from IL-33 (n=8) and PBS (n=8) treated mice. Data are given as mean ± SEM for each group. Mann Whitney test was used for statistical analysis.

Fig.4. IL-33 treatment strongly expands ILC2. Mice are the same as in Figure 3. Splenocytes and bone marrow cells were labeled with fluorochrome-conjugated anti-ST2L, anti-Lin, anti-Sca-1, anti-CD25 and anti-cKit. **(A)** Identification of ILC2 in the bone marrow by flow cytometry is shown in representative mice. Cells were gated on the FSC^{low}SSC^{low} Lin⁻ fraction and then ILC2 frequency was determined by gating on Sca-1⁺ ST2L⁺ cells. Histograms shows CD25 and c-Kit expression among FSC^{low}SSC^{low} Lin⁻ Sca-1⁺ ST2L⁺. **(B)** Percentage of ILC2 (FSC^{low}SSC^{low} Lin⁻ Sca-1⁺ ST2L⁺ cells) among total bone marrow cells. **(C)** Percentage of ILC2 among total splenocytes. **(D)** ILC2 number in the spleen. Data are given as mean ± SEM for each group. Mann Whitney test was used for statistical analysis.

Fig.5. IL-33 treatment expands Treg and induces an increased expression of ST2L. C57BL/6 mice were immunized with CII/CFA at days 0 and 21, and they were treated i.p daily with rIL-33 (1 µg per mouse) (n=10) from day 1 to 5 and from day 21 to 25. Control mice (n=10) received PBS. All mice were euthanized 28 days after the first immunization with CII/CFA. Splenocytes were stained with fluorochrome-conjugated anti-CD4, anti-ST2L and anti-Foxp3. **(A)** As shown on this representative dot plot, Tconv were defined as CD4⁺ Foxp3⁻ cells and Treg as CD4⁺ Foxp3⁺ cells. **(B)** Treg number. **(C)** Treg percentages among splenocytes. **(D)** Tconv number. **(E)** Tconv percentages among splenocytes. **(F)** %Treg/%Tconv ratio. **(G)** Representative dot plot of ST2L expression among Treg in one IL-33 treated mouse and in one PBS control mouse. **(H)**

Percentage of ST2L⁺ cells among CD4⁺Foxp3⁺ cells. **(I)** ST2L MFI on ST2L⁺ Treg. **(J)** Fold increase in Treg number in IL-33 treated mice according to ST2L expression. Data are given as mean ± SEM for each group. Data are representative of one experiment out of 3 similar experiments. Mann Whitney test was used for statistical analysis.

Fig.6. IL-33 treatment enhances Treg activity. The mice are the same as in Figure 5. **(A) to (F):** Splenocytes were labeled with fluorochrome-conjugated anti-ST2L, anti-CD4, anti-Foxp3 and anti-CD39. **(A)** Representative dot plot of CD39 expression among CD4⁺ Foxp3⁺ cells in IL-33 treated mice and in PBS control mice. **(B)** Percentage of CD39⁺ cells among CD4⁺Foxp3⁺ cells. **(C)** CD39 MFI on CD39⁺ Treg. **(D)** Frequency of Treg CD4⁺ Foxp3⁺ CD39^{high} among Treg CD4⁺ Foxp3⁺ CD39⁺. **(E)** Correlation of the frequency of Treg CD4⁺ Foxp3⁺ expressing ST2L and CD39 MFI in mice treated or not with IL-33. **(F)** Comparison of CD39 MFI among CD4⁺ Foxp3⁺ CD39⁺ ST2L⁺ cells and among CD4⁺ Foxp3⁺ CD39⁺ ST2L⁻ cells, in IL-33 treated mice. **(G)** CD4⁺ CD25⁺ ATPase activity. **(H)** *In vitro* IFN- γ concentration after 4 days of co-culture of CD4⁺ CD25⁻ cells and CD4⁺ CD25⁺ cells. Data are given as mean ± SEM for each group. Data represent one experiment representative of 2 similar experiments. Pearson's correlation was used to correlate CD39 MFI among CD4⁺ Foxp3⁺ CD39⁺ cells and frequency of CD4⁺ Foxp3⁺ cells expressing ST2L. Mann Whitney test was used for the other statistical analysis.

Supplementary legends to figure

Fig.S1. IL-33 treatment expands Treg expressing ST2L in the blood, the LN and *in vitro*. (A-D) The mice are the same as in Figure 5. **(A), (B)** LN cells and **(C), (D)** blood cells were stained with fluorochrome-conjugated anti-CD4, anti-ST2L and anti-Foxp3. **(E)** and **(F)** Splenocytes from naïve C57BL/6 mice were incubated in culture medium containing anti-CD3 (5 μ g/ml) and with (n=3) or without IL-33 (20 ng/ml) for 18H or 30H (n=3). **(A)** Percentage of ST2L⁺ cells among CD4⁺FoxP3⁺ cells. **(B)** ST2L MFI on ST2L⁺ Treg. **(C)** Percentage of ST2L⁺ cells among CD4⁺FoxP3⁺ cells. **(D)** ST2L MFI on ST2L⁺ Treg in the blood. **(E)** Percentage of ST2L⁺ cells among CD4⁺FoxP3⁺ cells. **(F)** Percentage of ST2L⁺ cells among CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ cells. Data are given as mean ± SEM for each group. Data represent one experiment representative of 3 similar experiments. Mann-Whitney test was used for statistical analysis.

Fig S2: IL-33 treatment strongly expands Treg in vivo even after CD25⁺ cells depletion. C57BL/6 mice were immunized with CII/CFA at days 0 and they were treated i.p with anti-CD25 antibody (400µg per injection) (n=12) or with corresponding Isotype Control antibody (Iso Ct) (n=12) (400µg per injection) at day 7 and day 3 before CIA induction and at day 4, 10 and 12 after CIA induction. Half mice in each group were treated i.p daily with rIL-33 (1 µg per mouse) from day 7 to 12. Finally, 4 groups of mice were made: mice treated with anti-CD25 (n=6), mice treated with anti-CD25 + IL-33 (n=6), mice treated with Iso Ct (n=6) and mice treated with Iso Ct + IL-33 (n=6). All mice were euthanized at day 20 and blood was collected by heart puncture. Total leucocytes were stained with fluorochrome-conjugated anti-CD4, anti-CD25 and anti-Foxp3. **(A)** Percentage of CD4⁺ Foxp3⁺ cells among total leucocytes. **(B)** Percentage of CD4⁺ Foxp3⁺ CD25⁺ cells among total leucocytes. **(C)** Percentage of CD4⁺ Foxp3⁺ CD25⁻ cells among total leucocytes. Data are given as mean ± SEM for each group. Mann Whitney test was used for statistical analysis.

FigS3: IL-33 has a strong impact on CD25⁺ and CD25⁻ Treg expansion, in vitro. CD4⁺CD25⁺ cells (5.10⁴/well) from naive C57BL/6 mouse spleen were isolated and incubated for 72h in culture medium with or without, according to each culture condition: anti-CD3 (5µg/ml) + anti-CD28 (2µg/ml), IL-33 (20 or 60ng/ml), IL-2 (25ng/ml). **(A)** Histograms are shown for one representative result of each culture condition. **(B)** Percentage of CD4⁺ Foxp3⁺ cells. **(C)** Data are expressed as fold-increase of CD4⁺ Foxp3⁺ CD25⁺ cells frequency normalized to unstimulated cells. **(D)** Data are expressed as fold-increase of CD4⁺ Foxp3⁺ CD25⁻ cells frequency normalized to unstimulated cells. Data are given as mean ± SEM and represent one experiment representative of 2 similar experiments. * p<0.05 vs the other groups. #p<0.05 vs the unstimulated, anti-CD3+anti-CD28 and IL-2 groups. & p<0.05 vs anti-CD3+anti-CD28, IL-33(20ng/ml) and IL-33(60ng/ml) groups. ** p<0.05 vs unstimulated, IL-33(60ng/ml) and IL-2 groups. ###p<0.05 vs the unstimulated and IL-2 groups.

Fig S4. Late IL-33 administration doesn't significantly affect collagen-induced arthritis development (CIA). All C57BL/6 mice were immunized with chicken collagen II emulsified in CFA on day 0 and on day 21. Mice were treated i.p daily with 100µL of rIL-33 at 10µg/ml (1 µg per mouse) for 5 days from day 21 to 25 (n=12, black squares). Control mice received 100µl of

phosphate buffer saline (PBS) (n=12, grey circle). On day 28, mice were given i.p injection of LPS 055:B5 (50µg/mice) (LPL203, Biochem, Meudon, France). Mice were killed at day 49, paws were removed and histological sections of the knee were prepared and stained with hematoxylin and eosin. **(A)** Clinical arthritis scores. **(B)** Frequency of arthritis. **(C)** Mean maximal arthritis score (Amax). **(D)** Histological joint inflammation score. **(E)** Histological joint destruction score. **(F)** Fold increase in the percentage of CD4⁺FoxP3⁺ Treg expressing ST2L⁺ among CD4⁺FoxP3⁺ Treg, Th2 cells (ST2L⁺ cells among CD4⁺FoxP3⁻ cells) and ILC2 (defined as in Figure 4) between mice treated with rIL-33 from day 1 to day 5 (white bars) or from day 1 to day 5 + day 21 to day25 (black bars), and PBS treated mice. Except in **B**, data are expressed as mean ± SEM. LN: lymph nodes, Bl: Blood; BM: bone marrow; n.s. non significant. Data are given as mean ± SEM for each group. Mann-Whitney test was used for statistical analysis.

Table Legend

Table S1: IL-33 treatment effect on Treg number, frequency and expression of CTLA-4 and CD39 in blood and LN.

The mice are the same as in Figure 2. Blood cells and LN cells were labeled with fluorochrome-conjugated anti-CD4, anti-FoxP3, anti-ST2L and anti-CD39 or anti-CTLA-4. Data are given as mean±SEM. (1) p<0,02, (2) p<0,0001, (3) p=0,05 vs. IL-33 treated mice (Mann-Whitney test).

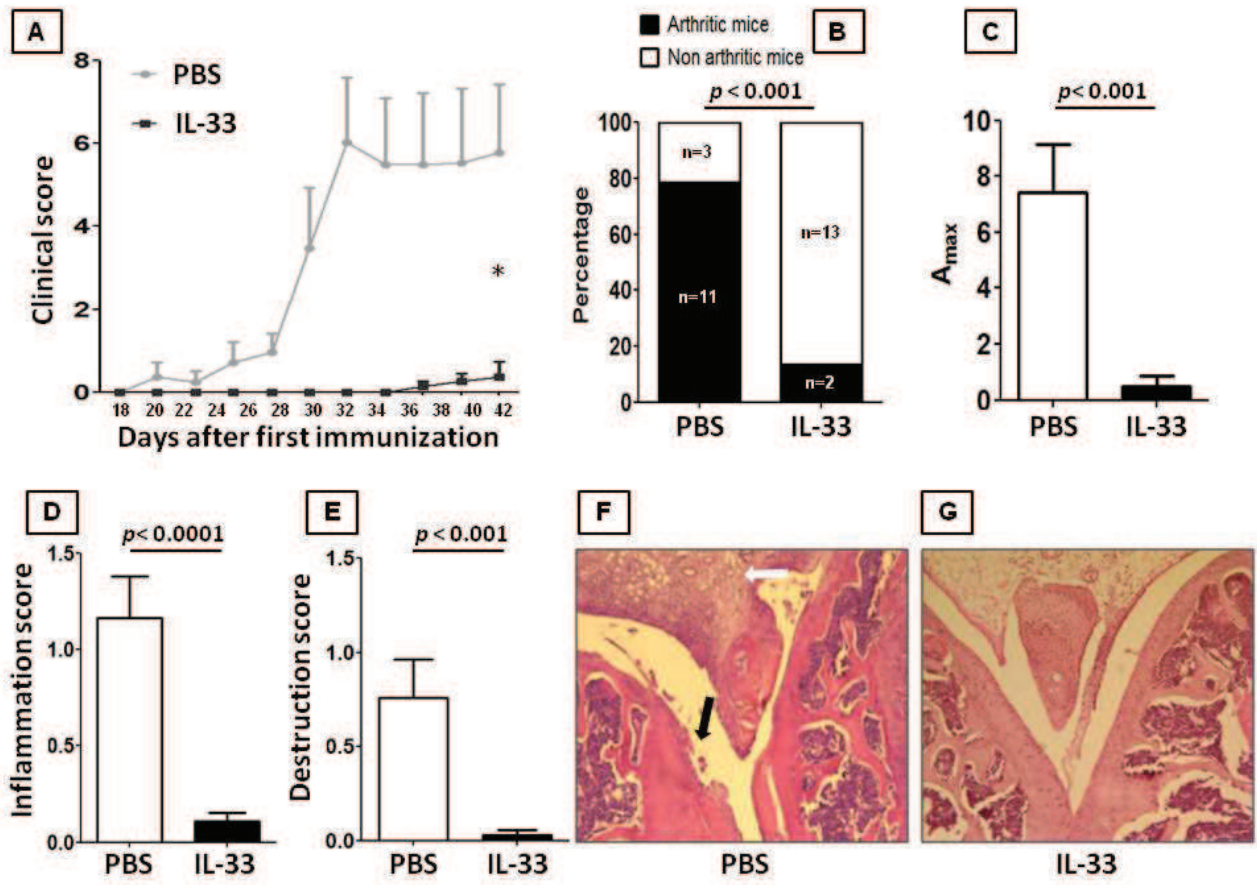


Figure 1

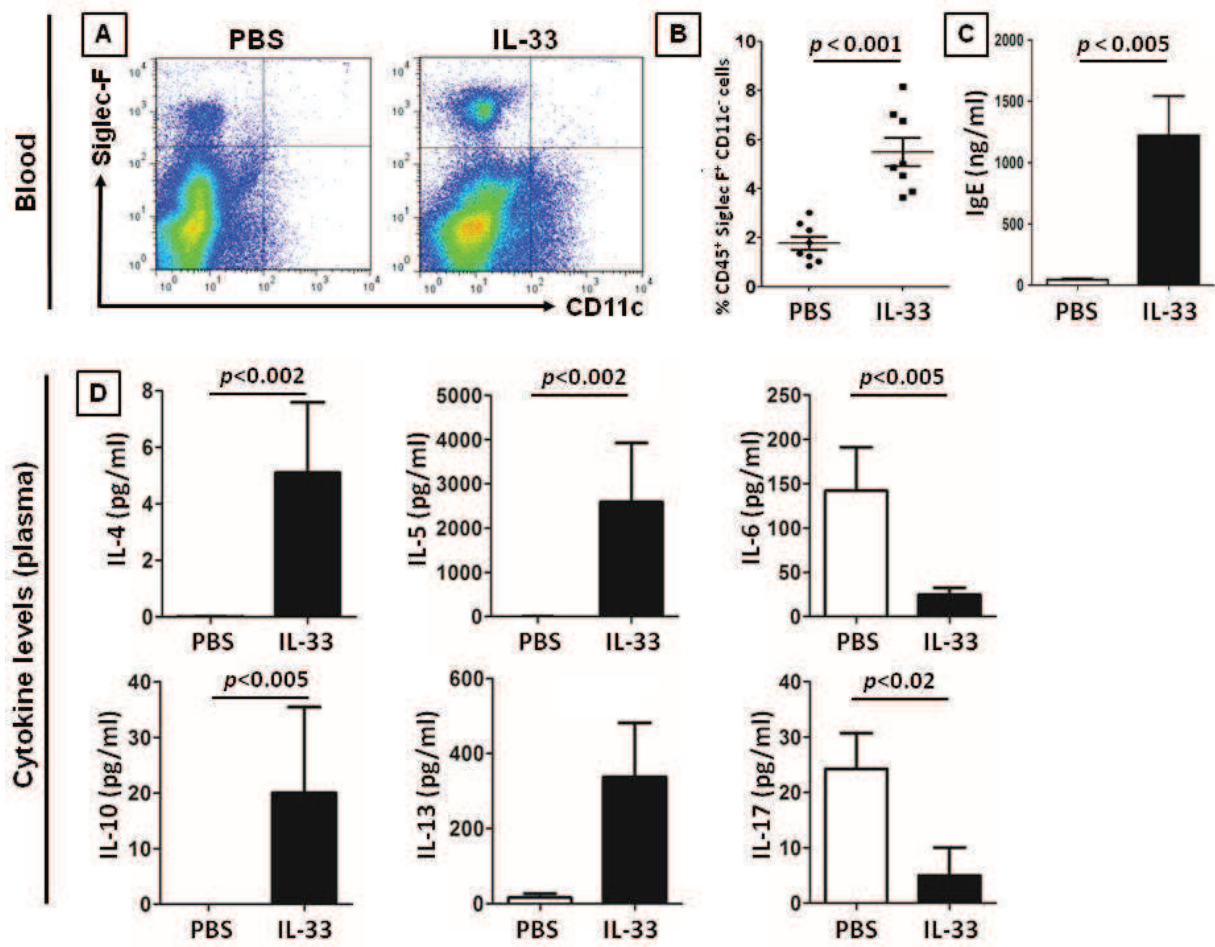


Figure 2

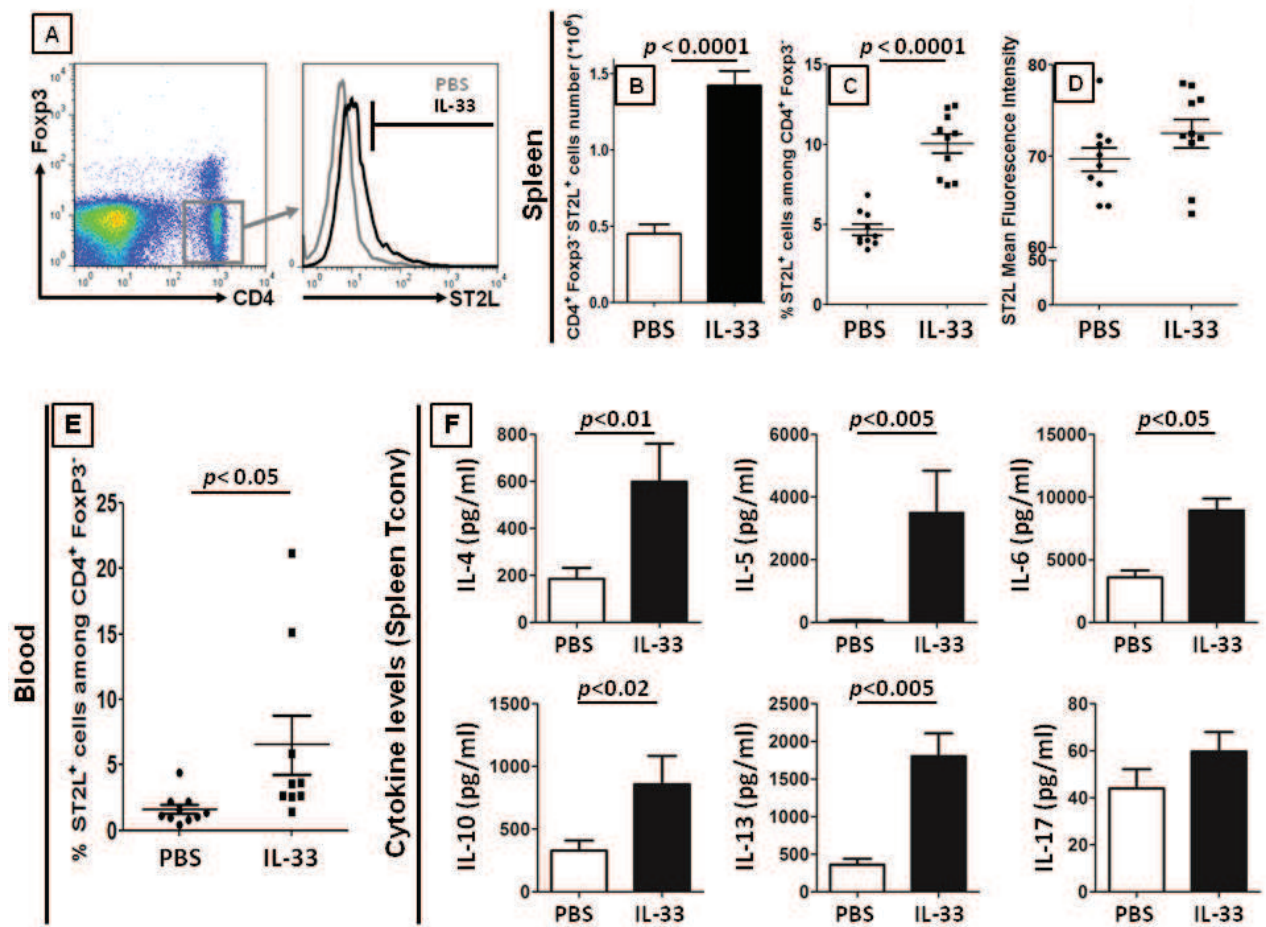


Figure 3

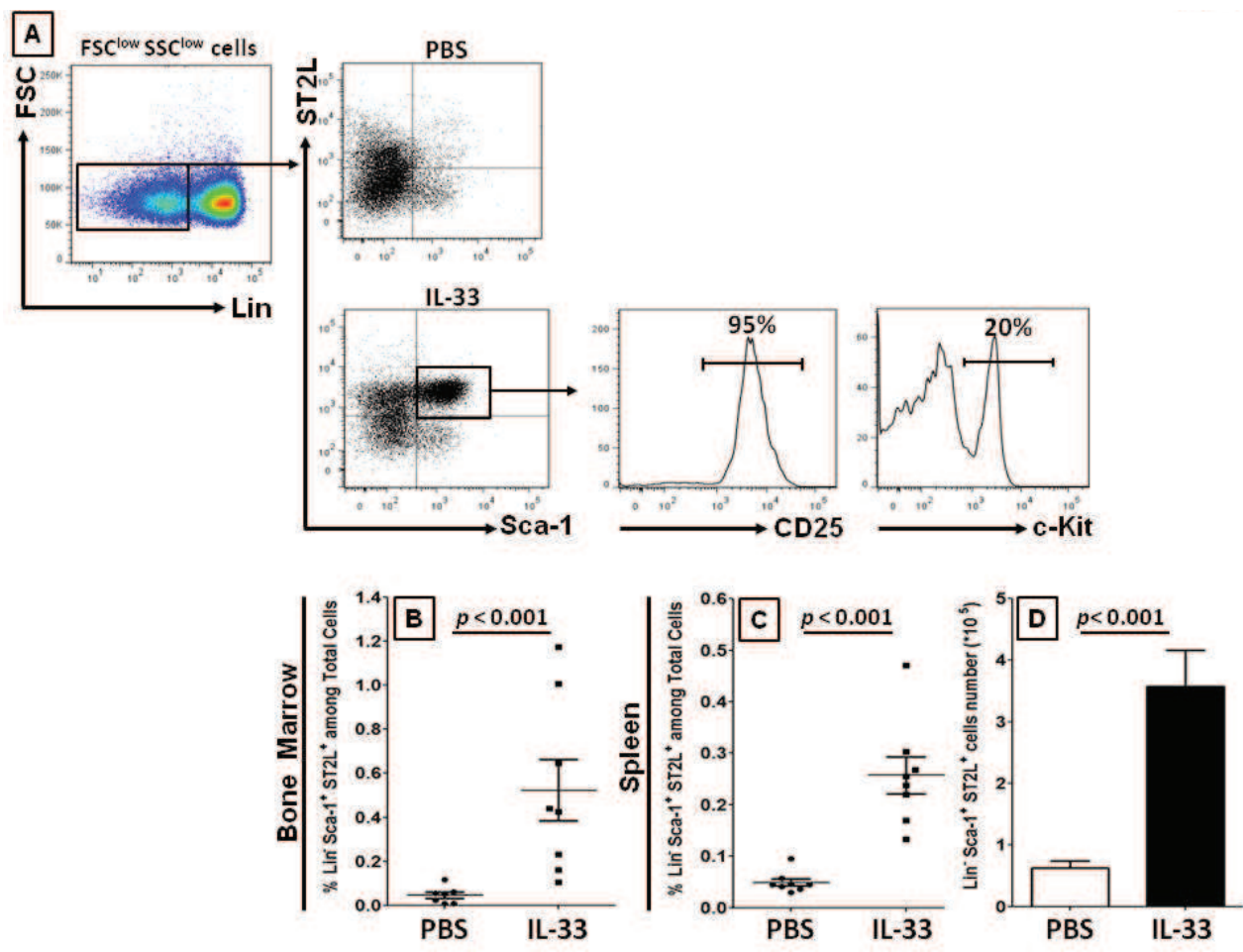


Figure 4

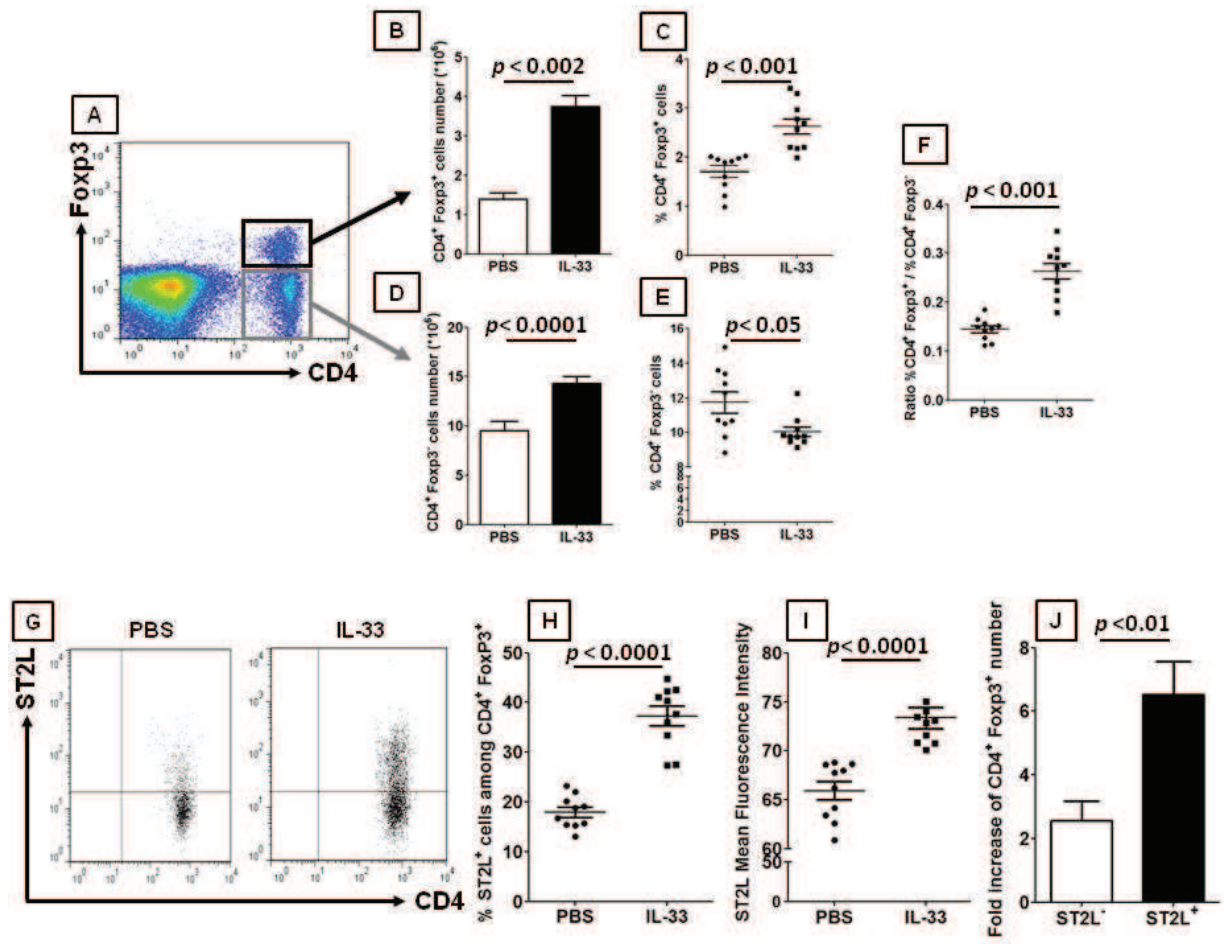


Figure 5

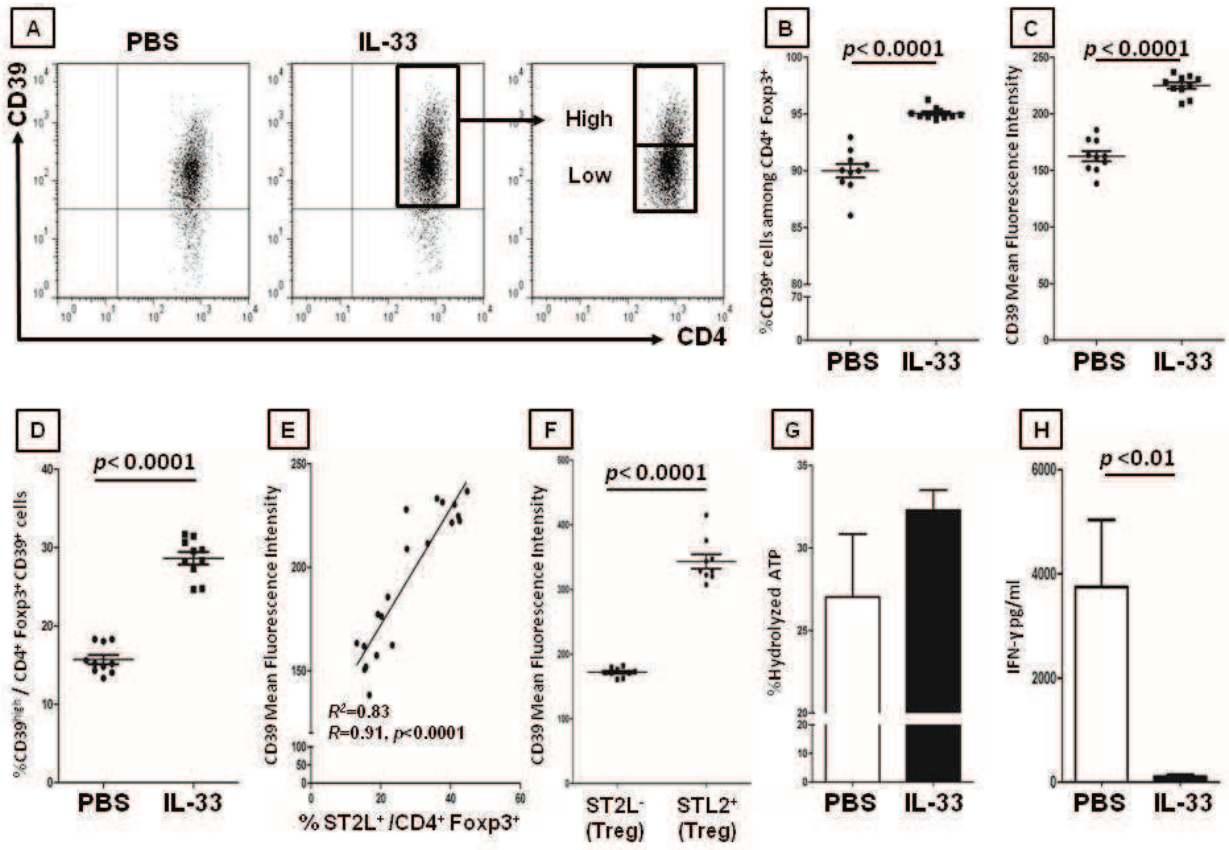


Figure 6

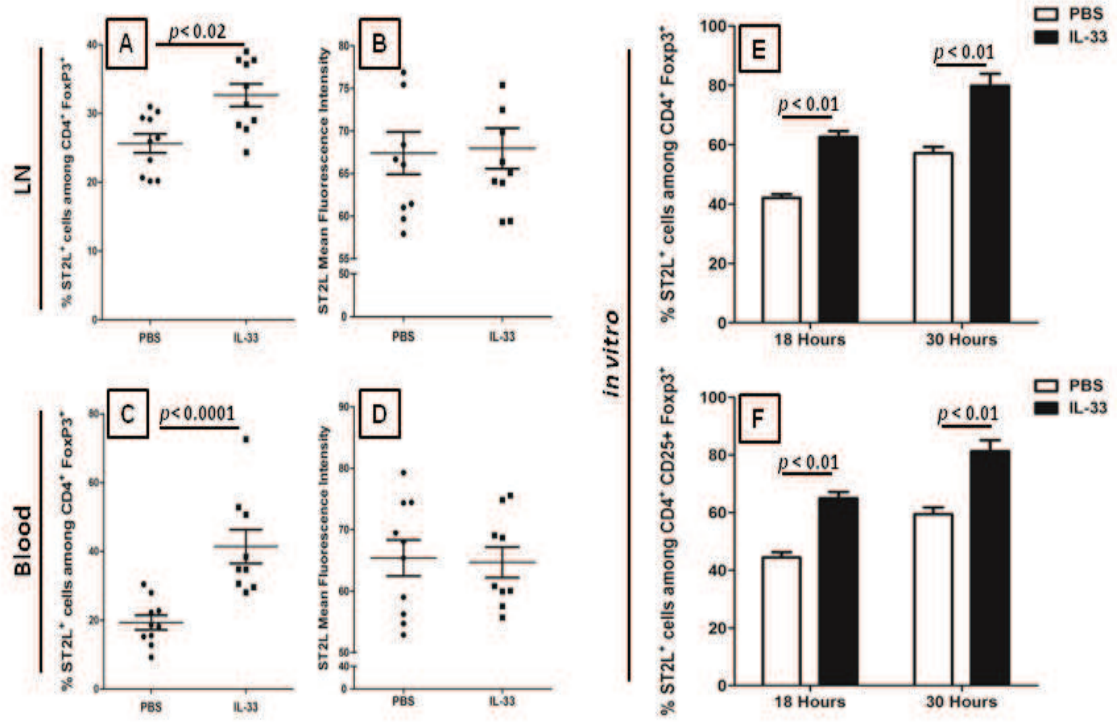


Figure S1

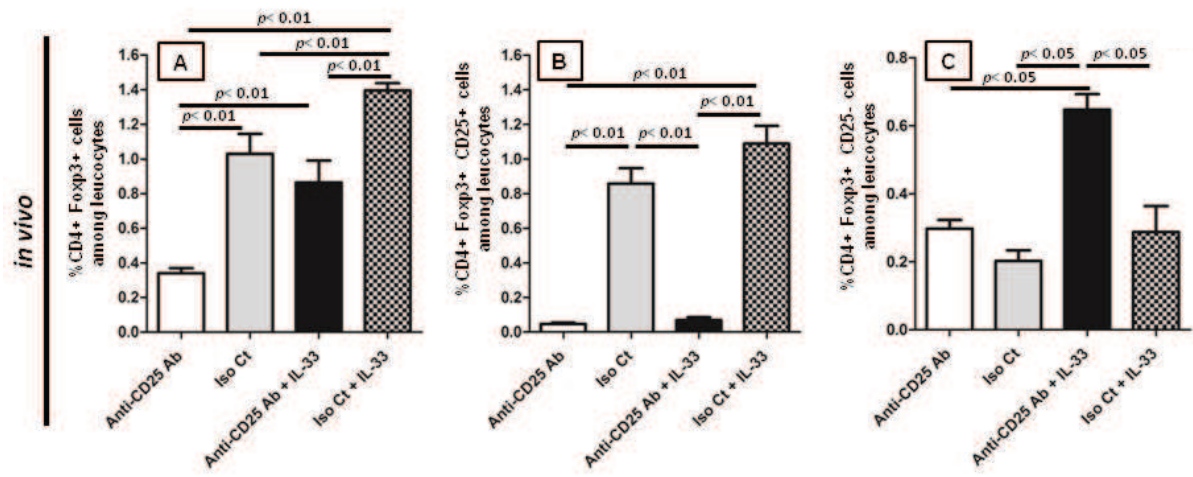


Figure S2

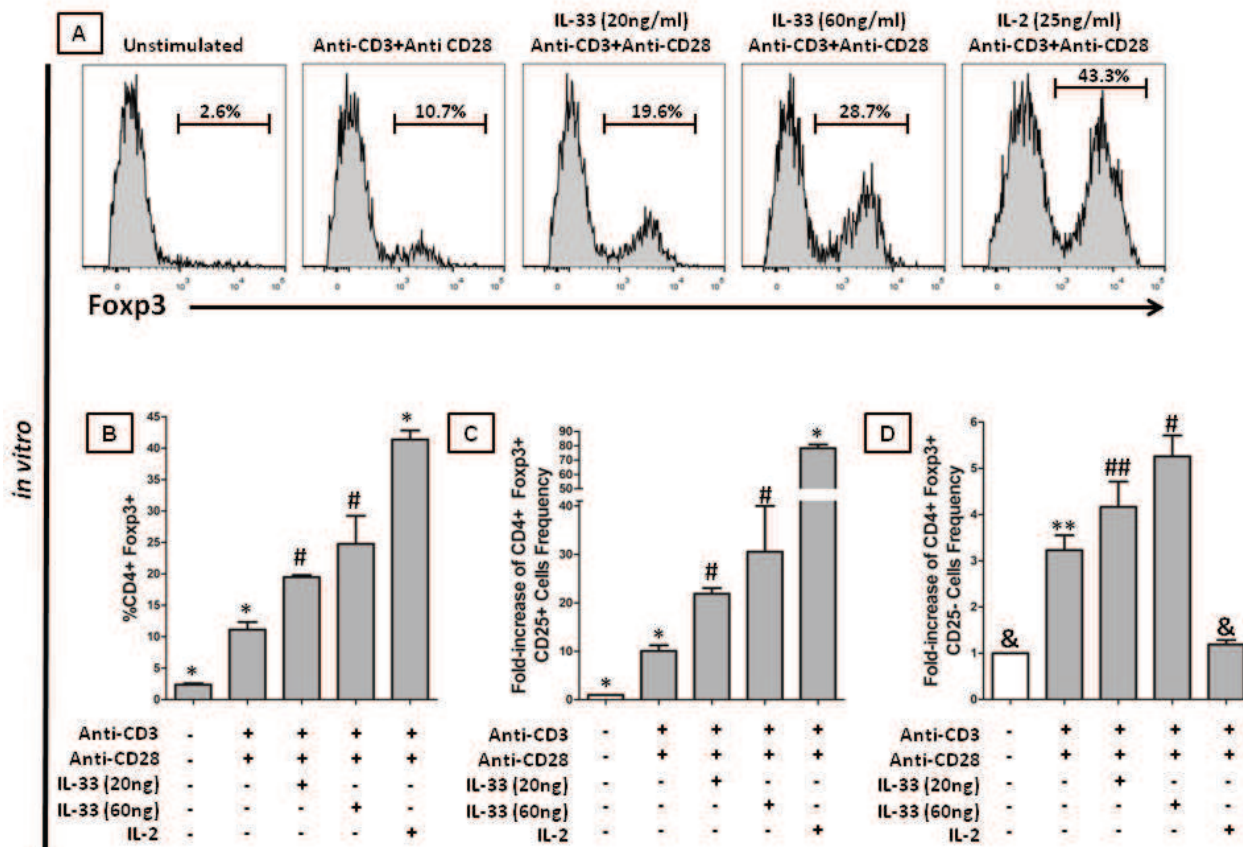


Figure S3

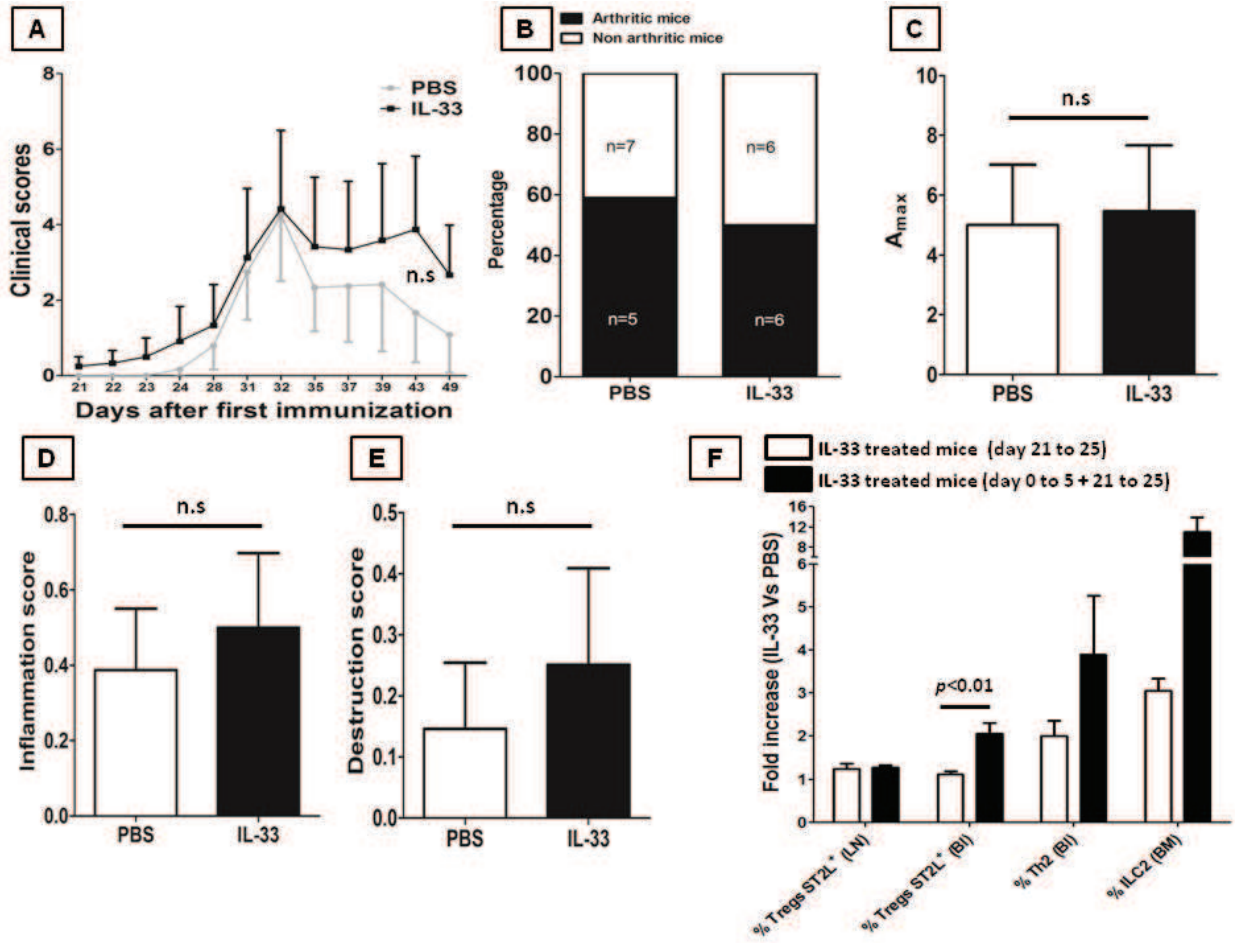


Figure S4

Group	Tconv	Treg	% Tconv	% Treg	Ratio	CD39		CTLA-4		
	number x 10 ⁵	number x 10 ⁶			(%Treg/ %Tconv)	%	MFI	%	MFI	
LN	PBS	2.48 ± 0.30	0.50 ± 0.06	14.04 ± 0.49	2.91 ± 0.10	0.21 ± 0.01	89.17 ± 0.34 ⁽¹⁾	169.63 ± 4.98 ⁽²⁾	9.68 ± 0.55 ⁽²⁾	19.84 ± 0.98
	IL-33	2.09 ± 0.45	0.47 ± 0.08	13.29 ± 0.67	3.17 ± 0.10	0.24 ± 0.01	92.06 ± 0.36	187.66 ± 6.30	11.79 ± 0.98	20.30 ± 1.18
Blood	PBS	N.D.	N.D.	8.95 ± 0.88	0.89 ± 0.09	0.10 ± 0.01 ⁽²⁾	75.24 ± 1.80	83.73 ± 2.90	35.10 ± 3.17	34.09 ± 2.71
	IL-33	N.D.	N.D.	7.17 ± 0.69	1.06 ± 0.13	0.15 ± 0.01	77.43 ± 2.69	86.09 ± 3.89	41.11 ± 3.65	37.35 ± 5.35

Table S1

II ARTICLE n°2

Collagen-induced arthritis and imiquimod-induced psoriasis development is unaffected by the absence of interleukin-33.

Sara Khaleghparast Athari Elodie Poirier Jérôme Biton, Luca Semerano, Roxane Hervé, Aurélie Raffailac, Delphine Lemeiter, André Herbelin, Jean-Philippe Girard, Frédéric Caux, Marie-Christophe Boissier, Natacha Bessis.

Article en cours de rédaction

L'interleukine-33 est impliquée dans la pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde (PR) et ses modèles, et dans notre premier article, nous avons démontré un rôle anti-inflammatoire majeur de l'IL-33 exogène dans l'arthrite induite par le collagène. Son rôle physiopathologique, endogène, dans la PR n'est pourtant pas clairement élucidé. Par exemple, les souris déficientes pour le récepteur ST2 sont plus sensibles à l'arthrite (Xu et al., 2008), alors que la maladie n'est pas modifiée chez les souris déficientes pour l'IL-33 dans le modèle de l'AEC chez la souris DBA/1 (Talabot-Ayer et al., 2014) et dans le modèle KBN (Martin et al., 2013). Dans cette seconde partie, afin de mieux comprendre le rôle endogène de l'IL-33 au cours de l'arthrite, nous avons utilisé un outil original: des souris déficientes pour le gène de l'IL-33 mais exprimant le gène rapporteur lacZ sous contrôle du promoteur de l'IL-33. Nous avons ainsi pu étudier le profil d'expression de l'IL-33 au cours des différentes phases de l'AEC. Nous avons aussi caractérisé la réponse immunitaire chez ces animaux au cours de la maladie afin de mieux comprendre pourquoi elle était également sensible à l'AEC que les souris sauvages. Puis, pour élargir notre étude à une maladie présentant de nombreux mécanismes communs avec la PR, nous avons choisi de travailler dans un modèle d'inflammation cutanée, le psoriasis induit par imiquimod, chez les souris déficientes en IL-33

Collagen-induced arthritis and imiquimod-induced psoriasis development is unaffected by the absence of interleukin-33.

Sara Khaleghparast Athari^{a,b}, Elodie Poirier^{a,b}, Jérôme Biton^{a,b,c}, Luca Semerano^{a,b,e}, Roxane Hervé^{a,b}, Aurélie Raffailac^{a,b}, Delphine Lemeiter^{a,b}, André Herbelin^d, Jean-Philippe Girard^f, Frédéric Caux^{a,b,g}, Marie-Christophe Boissier^{a,b,e}, Natacha Bessis^{a,b}.

^a INSERM, U1125, F-93017, Bobigny, France; ^b Sorbonne Paris Cité Université Paris 13, F-93017, Bobigny, France; ^c Present address: INSERM UMRS 1138 Equipe 13, Centre de Recherche des Cordeliers, F-75006, Paris, France; ^d INSERM U1082, Pôle Biologie Santé, BP 633, 86022, Poitiers, France; ^e Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Avicenne Hospital, Rheumatology Dpt, F-93009, Bobigny, France. ^f Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS) CNRS-Université de Toulouse III, Toulouse, France, ^gAssistance Publique-Hôpitaux de Paris, Avicenne Hospital, Dermatology Dpt, F-93009, Bobigny, France.

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

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

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

Key words: IL-33, arthritis, psoriasis, T cells.

Competing interests: none

Abstract

Background and objectives: Interleukin (IL)-33 is a dual cytokine with both an alarmin role and a Th2-like inducing effect. It is involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA) and its models, and we recently demonstrated that exogenous IL-33 was able to inhibit collagen-induced arthritis (CIA) in C57Bl/6 mice. However, its physiopathological role in RA is unclear. For instance, mice deficient for its receptor ST2 are less susceptible to arthritis, while the disease is not modified in IL-33 deficient mice. We aimed at studying the immune response in wild type mice and IL-33 deficient mice with CIA. To further understand the place of endogenous IL-33 in inflammatory diseases, we also studied its role in a model of skin inflammation. **Material and methods:** CIA was induced in IL-33-lacZ gene trap (*IL-33^{-/-}*) reporter strain mice. These mice, generated on a C57BL/6 background, are deficient for IL-33 gene but express lacZ under the IL-33 promoter. IL-33 expression was analyzed by X-Gal staining in various mice compartments. CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T cells (Tregs), Th1 and Th17 frequencies were evaluated by flow cytometry in *wt* and *IL-33^{-/-}* mice. Bone resorption was studied by evaluating osteoclasts activity on a synthetic mineral matrix. Psoriasis-like skin inflammation was induced by imiquimod skin application. **Results:** We first confirmed that *IL-33^{-/-}* mice develop CIA with similar severity than wild-type (*wt*) littermates mice. IL-33 promoter activity was detected in the joints of *IL-33^{-/-}* mice after CIA induction. Tregs, Th1 and Th17 frequencies were not modified in the spleen and lymph nodes of both strains. After CIA induction, osteoclast activity was higher in *IL-33^{-/-}* mice than in *wt* mice, although differences were not significant. Interestingly, psoriasis development was not impaired in *IL-33^{-/-}* mice. **Conclusions:** Despite its expression in the synovium of arthritic mice, IL-33 is not required for CIA development, any more than in psoriasis. Its absence also doesn't influence T cell shift toward Th1, Th17 or Tregs sub-populations. Altogether, these data and our previous ones, showing that exogenous IL-33 can almost completely inhibit CIA development, suggest that this cytokine is not crucial for chronic inflammation development, but that the development of treatment based on IL-33/ST2 axis targeting should be considered.

Introduction

IL-33 is a member of the IL-1 family, which includes IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-3, and IL-37, and the receptor antagonists IL-1Ra, IL-36Ra (1). It is localized in the cell nucleus (2) and it was first described as a cytokine being passively released by necrotic epithelial and endothelial cells in case of tissue damage during infection or inflammatory diseases, in which case it acts as an alarmin. But IL-33-expressing cells also include other cells of stromal and parenchymal origin, such as macrophages, dendritic cells, mast cells, smooth muscle cells, fibroblast cells, glial cells, osteoblasts, synoviocytes and adipocytes.

IL-33 signals via a heteromeric receptor that consists of ST2 and IL-1R accessory protein (IL-1RAcP). Virtually all types of immune cells and numerous types of non-immune cells respond to IL-33 via its receptor. Immune cells expressing IL-33 receptor include Th2 cells (but not Th1 and Th17), all PMNs, iNKT cells, NK cells, LB, macrophages, dendritic cells type 2 innate lymphoid cells (ILC2) (3). The expression pattern of IL-33 receptor indicates that it regulates a complex cellular network consisting of immune cells and non-immune cells (4). IL-33 is presently considered a dual-role cytokine that can both promote and reduce inflammation depending on the tissue and cytokine environment. It controls inflammation either positively or negatively; and in both cases the process is complex. Its pro-inflammatory face is related to the involvement of IL-33/ST2 system in the regulation of each phase of a generic inflammatory pathway consisting of inducers, sensors, mediators, and effectors. Indeed, when tissues receive insults which can lead to inflammation, the major sources of IL-33 are epithelial cells, endothelial cells, or tissue macrophages. In this case, IL-33 induces the production of additional inflammatory mediators and amplifies the inflammatory response. The anti-inflammatory face of IL-33 is related to its capacity to suppress inflammation in some clinical settings by driving type 2 immunity. It acts by promoting either M2 macrophage (5) or Th2 T-cell differentiation (6). IL-33 also expands and induces high levels of IL-5 and IL-13 production by ILC2.

Some works suggest a functional role of the IL-33/ ST2 axis in the pathogenesis of human and mouse arthritis. In RA patients, IL-33 levels in serum and synovial fluid are elevated (6, 7) and strong IL-33 expression can be detected in endothelial cells and fibroblasts in human RA synovium (2, 8). Interleukin-33 synergistically enhances immune complex-induced tumor necrosis factor alpha and interleukin-8 production in cultured human synovium-derived mast cells (9). In mouse models of experimental arthritis involving active immunization, such as collagen- and

antigen-induced arthritis, the use of ST2 knockout (KO) mice, ST2 blockade or injection of soluble sST2 leads to decreased immune responses and severity of arthritis suggesting a pathogenic role for IL-33, signalling through ST2, in these experimental models (9, 10, 11, 12,13). However, while arthritis is reduced in ST2 KO mice, it does not differ in IL-33 KO mice compared to WT mice (14) and sT1/ST2, the decoy receptor for IL-33, had no effect on arthritis (14).

These studies in arthritis models underscore the complex nature of IL-33 and one need to establish how endogenous or administered IL-33 contributes to the regulatory and inflammatory pathways culminating in arthritis pathology and control.

Material and methods

Material and methods

1. Mice

IL-33^{-/-} mice were given by JP Girard and generated as described in (15). In these mice, a β -geo insertion disrupts production of the IL-33 protein and is useful to visualize the activity of the endogenous IL-33 promoter, through X-Gal staining (β -galactosidase activity). Heterozygote IL-33^{+/-} mice were generated by breeding C57Bl/6 mice (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) and IL-33^{-/-} mice. Then IL-33^{+/-} mice were bred together and resulting homozygous IL-33^{+/+} wild type mice were used as controls in all our experiments.

2. Collagen-induced arthritis induction and evaluation

Arthritis was induced with native chicken collagen type II (CII, MD biosciences, Switzerland, Zürich). At 10 to 12 weeks of age, male C57BL/6 mice were injected intradermally at the base of the tail with 50 μ g of CII emulsified in complete Freund's adjuvant (CFA, mdbiosciences). On day 21, a booster subcutaneous injection of CII emulsified in CFA was given. A blinded procedure was used to monitor clinical and histological arthritis in all four limbs, as previously described (16,17).

3. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation induction and evaluation

Psoriasis was induced with commercially IMQ cream (5%; Aldara Cream; MEDA AB). Mice, male, 9 to 11 weeks of age received a daily topical application of 62.5 mg of IMQ cream on the

shaved back skin for 10 consecutive days. A blinded procedure was used to monitor psoriasis-like skin inflammation induced on mice shaved back skin. Every day, clinical scoring of psoriasis was done based on the human clinical Psoriasis Area and Severity Index (PASI). Three parameters were evaluated included erythema, scaling, and thickening and were scored independently on a scale from 0 to 4: 0, none; 1, slight; 2, moderate; 3, marked; 4, very marked. The cumulative score was done by addition of the three previous parameters with a scale from 0 to 12. For histological assessment, skin samples from back skin were fixed in 10% formalin for at least 24 h at room temperature and embedded in paraffin. Four μm deparaffinised sections were stained with HES before microscopic observation (optical microscopy). Epidermal thickness was evaluated with Archimed software (Microvision, LES ULIS, France) and by averaging the 5 to 10 values of independent fields of skin for each mouse.

3. β -galactosidase detection

Hind paws were dissected and fixed in a solution of glutaraldehyde 25% for 2 to 4 hours at room temperature. Knee joints were then injected with the chromogenic substrate X-Gal (from lacZ Tissue staining kit, invivoGene, Toulouse, France) and incubated in that solution for 3h at 37 °C under shaking. The paws were then washed overnight in PBS 1X (37 °C). Seven μm sections were prepared and stained with hemalun and eosin (H&E) before microscopic observation.

Skin sample were dissected, stored at -80° until use. Five micrometers cryosections were performed on skin sample embedded in OCT, then fixed 10 min in PBS with 0.2% glutaraldehyde and rinsed three times in washing buffer (MgCL₂ 2mM, Na desoxycholate 0.01%, Igepal 0.02%, PBS) for 5 minutes. For β -gal staining, the slices were incubated overnight with X-gal (1mg/ml) in staining buffer (potassium ferricyanide 6 mM, potassium ferrocyanide 6mM), over night at 37°C. The sections were then rinsed in PBS, distilled water and counterstained with eosin. Blue color was detected by light microscopy.

4. IL-33 detection by immunofluorescence

Paraffin sections (5-7 μm) were deparaffinized in Zylene mix of isomers solution (CARLO ERBA Reagents) and rehydrated in graded alcohol series. Then the sections were washed in distilled water and boiled in a microwave oven for epitope retrieval in Sodium Citrate Buffer (10mM, pH 6). The slides were then incubated with a polyclonal goat IgG against mouse IL-33 (Clone: Q8BVZ5, 1:200, R&D System) or control isotype (Polyclonal goat IgG, 1:200 R&D System),

then washed in PBS (5 minutes, three times), and incubated with Dunkel IgG against Goat IgG conjugated with Northern Lights 557 (1:200 R&D System) in darkness. Slides were counterstained with DAPI.

5. Osteoclastogenesis and bone resorption

For osteoclastogenesis assays, anterior paws were dissected to collect bone marrow cells. Then, 2×10^5 cells were plated in triplicate for each mouse, on 96-well plates with receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) (100 ng/mL), macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) (30 ng/mL) in 5% CO₂ at 37°C. TRAP staining (Acid Phosphatase, Leukocyte TRAP Kit, SIGMA ALDRICH) was then performed at day 5 and osteoclasts were identified as TRAP-positive cells with \geq three nuclei.

For bone resorption assay, bone marrow cells were isolated as described above. Then, 4×10^5 cells were cultured with mouse M-CSF (30 ng/ml) and mouse RANKL (100 ng/ml) on an OsteoAssay plate (Corning) containing a synthetic mineral matrix with 5% CO₂ at 37°C. At day 8, bone resorption was analyzed. Experiment was performed in triplicate wells for each mouse and image was obtained from each entire well. Number of resorption spots and percentage of resorbing area were evaluated by Image J software and mean number of each triplicate was calculated.

6. Cell and tissue preparation

Leukocytes from the spleen were prepared using a cell strainer, and red blood cells were lysed in hemolytic buffer (NH₄CL, KHCO₃, and EDTA). Afferent and popliteal lymph nodes were dissected out of the hind limbs and leukocytes were prepared using a homogenizer. Blood was collected by heart puncture, and for cell analysis, red blood cells were lysed in hemolytic buffer. Leukocytes were stained by PercPCyc5.5-anti CD4 (clone RM4-5) (BD Biosciences) antibody. The APC-anti-Foxp3 (clone FJK-16s) (eBioscience) Staining Set was used for intracellular staining. To generate Th1 and Th17 cells, 10^6 leucocytes were stimulated with PMA (50 ng/ml) and ionomycin (1 μ g/ml)(SIGMA ALDRICH) in the presence of monensin (BD Biosciences) for 4H. For intracellular IFN- γ and IL-17 staining, CD4⁺ cells were first stained by surface marker and permeabilised with Cytotfix/Cytoperm (BD Bioscience). They were then stained with APC-anti IFN γ (clone XMG1.2) or PE-anti IL-17 (clone TC11-18H10) (BD Biosciences). Flow cytometry was performed on a FACS Calibur(Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). Dead cells were excluded based on forward and side scatter characteristics (BD Biosciences) and results were analyzed using CellQuest Pro software (BD Biosciences).

Results

Endogenous IL-33 is expressed in mouse joint

To evaluate IL-33 promoter activity in the joint of mice with or without arthritis, X-Gal staining of knee joint from IL-33^{-/-} or *wt* IL-33^{+/+} mice was performed. As expected, no β-galactosidase activity was observed in joint from wild-type mice, which do not contain the IL-33–LacZ construction (Figure 1A and B). In contrast, lacZ expression was detected in IL-33^{-/-} mice without CIA meaning that IL-33 promoter is constitutively active in naïve mice (Figure 1C and D). We then analyzed expression of IL-33 in mice with CIA at day 10 or day 35, and found an expression of lacZ in joint tissues (Figure 1E and F).

Collagen-induced arthritis is unaffected by the absence of IL-33

We then investigated the consequences of IL-33 deficiency on the development of CIA. Clinical scoring showed that IL-33^{-/-} mice developed a similar course of arthritis than wild-type mice (Figure 2A). Moreover, neither the mean maximal arthritis score (A_{\max}) nor onset of arthritis were modified in IL-33^{-/-} mice compared to *wt* control mice (Figure 2B and C). Finally, histological examination at day 45 also revealed no effect of IL-33 deficiency in joint inflammation (IL-33^{-/-} group: 0.77±0.23 vs *wt* group: 0.74±0.18) and destruction (IL-33^{-/-} group: 0.44±0.16 vs *wt* group: 0.38±0.13).

Influence of endogenous IL-33 on T cell subsets frequencies during CIA

Since IL-33 was previously shown to induce a type 2 immune response (18–21) and regulatory T cells expansion (22) (23), we asked if, despite the lack of IL-33 deficiency effect on CIA, this absence of cytokine could lead to a modified T cell profile in CIA. We thus evaluated the frequencies of CD4⁺ T cell subpopulations at day 45 after CIA induction in *wt* and IL-33^{-/-} mice. Figure 3 shows that neither regulatory T cells defined as CD4⁺FoxP3⁺ cells, nor Th1 or Th17 cell frequencies were modified in the spleen (and in the LN, data not shown) of IL-33^{-/-} mice as compared to *wt* mice during CIA.

Osteoclastogenesis and osteoclast activity in arthritic IL-33^{-/-} mice

IL-33 has been shown previously to protect from bone resorption, while its role in osteoclastogenesis is unclear (24). To examine whether IL-33 deficiency influences osteoclast formation during CIA, osteoclasts were generated from bone marrow in vitro, as described in

materials and methods. Figure 4A shows that the number of osteoclasts was similar in both strains of mice, meaning that the absence of IL-33 unaffected osteoclastogenesis during CIA. We then examined bone resorption activity in those mice and shown that *wt* mice had both a lower number of resorption spots and a percentage of resorbing area than IL-33^{-/-} mice, although differences were not significant (Figure 4B). This was even more pronounced when we excluded mice that did not develop any arthritis from the analysis (Figure 4C). These data suggest that IL-33 is involved in bone resorption during CIA.

Psoriasis-like skin inflammation development is not impaired in IL-33^{-/-} mice

Psoriasis is a companion disease of rheumatoid arthritis, thus we aimed at comparing imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in *wt* and IL-33^{-/-} mice. Two days after the start of IMQ application, the back skin of the mice started to display signs of skin erythema and further thickness and squama from day 3. A typical example of the psoriatic-like skin lesions are shown in figure 5A and 5B. Histological slides of the skin at day 10 after the first application of IMQ are also shown (Figure 5C and 5D). The independent scores in a representative experiment are depicted in Fig 6 (A-C). From days 3 onward, inflammation continually increased in severity up to the end of the experiment. All parameters of the total score (thickness, squama and erythema) were similar in IL-33^{-/-} and *wt* mice (Figure 6D). There were no statistically differences by comparing the area under the curve between the two groups. Epidermal thickness was quantified on skin histological slides and was also comparable in both groups, mean of 40.91 μm for IL-33^{-/-} group and 44.23 μm for *wt* mice (p=0.39 t-student test) (Figure 6E), confirming the clinical analysis.

Since we've observed that IL-33 promoter activity was active within the joint of mice during CIA, we asked whether IL-33 was expressed in the skin during IMQ-induced skin inflammation. We could first observe directly IL-33 expression by immunofluorescence staining of IL-33 on skin samples 11 days after daily stimulation by IMQ. As expected, IL-33^{-/-} mice showed no expression of IL-33 (Figure 7A), whereas *wt* mice with or without IMQ application showed a nuclear expression in keratinocytes (Figure 7B-C). We also evaluated IL-33 promoter activity through X-Gal staining in the skin of IL-33^{-/-} mice (Figure 7 D-E) which showed a similar pattern than in *wt* mice stained for IL-33, namely a lacZ staining within the basal layer keratinocytes of the epidermis (D). As expected, no lacZ detection was observed in *wt* mice (E).

Discussion

In this study we investigated the impact of IL-33 deficiency in two models of chronic inflammation, namely CIA in C57BL/6 mice, and imiquimod-induced psoriasis. We show that psoriasis and arthritis develop independently of IL-33, despite IL-33 promoter activation within the synovium during the course of the disease, and despite also the IL-33 expression in the skin. Interestingly, IL-33 was also detected in the synovium of RA patients (2, 8) and in lesions of psoriatic patients (24, 25). Serum IL-33 levels are also increased in RA (6, 7) and in patients with psoriasis (25). The lack of IL-33 involvement in CIA confirms other studies in alternate models of RA, namely CIA in DBA/1 mice, K/Ban serum transfer-induced arthritis and antigen-induced arthritis (14, 27). In concordance with these observations, experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis is also not impaired in IL-33 deficient mice, nor is it true in Con A-induced hepatitis, streptozocin -induced diabetes (28). Conversely, IL-33 deficiency ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis, and confers a resistance to LPS-induced endotoxin shock in mice (28). These two models involve innate immunity, while acquired immunity is rather involved in the above models of inflammation. It thus seems that IL-33 is a major amplifier of systemic innate, rather than acquired immunity.

Strikingly, some studies showed that ST2-deficient mice display reduced severity of arthritis in the model of K/BxN serum transfer (14). These data suggest a crucial role of this receptor in the development of joint inflammation. This obviously contrasts with all the concordant studies performed in experimental chronic autoimmunity on IL-33-deficient mice. A similar contrast has been observed in other models such as OVA-induced airway inflammation (28). One hypothesis to explain these apparent discrepancies is the existence of another ligand of ST2, even if, to date, no study has revealed a potential candidate.

RA and psoriasis are chronic inflammatory diseases characterized by an increased frequency of Th1 and Th17 cells. In the blood of patients with active RA there is an increase in Th17 contrasting with a decrease in the frequency of Treg (29). Similarly, an enhanced secretion of IL-17 was observed in the skin of patients with psoriasis. Moreover, these patients display a positive correlation between Th17/Treg cells ratio in the skin and disease activity, together with a decrease in the frequency and suppressive activity of Tregs (30).

In our work, we observed that the frequencies of Treg, Th1 and Th17 were not modified in the spleen and lymph nodes of IL-33 deficient mice compared to *wt* in either CIA or in psoriasis.

Given the role of the cells in both models, this may explain why disease severity is not modified in the absence of IL-33.

RA is characterized by bone resorption and cartilage destruction. IL-33 is involved in bone inflammation (31) and osteoblasts isolated from IL-33 transgenic mouse can produce a significant bone matrix *in vitro*. Additionally, number of osteoclasts is decreased in these animals (32). An anti-osteoclastogenic effect of IL-33 was also demonstrated in ST2 deficient mice which display decreased bone density together with an increased osteoclasts number. Moreover, administration of IL-33 in hTNF- α transgenic mice, which develop spontaneous arthritis, inhibits bone destruction and reduces the number of osteoclasts (33). Taken together, these studies show the inhibitory effect of IL-33 on osteoclasts and led us to evaluate for the first time osteoclastogenesis osteoclast formation was induced by culturing isolated bone marrow cells with RANKL and MCS-F for five days, followed by TRAP staining. We have shown a comparable osteoclastogenesis in IL-33 deficient and wild-type mice.

However the resorption activity of a synthetic bone matrix by osteoclasts from IL-33 deficient mice was higher than those of wild type mice. The differences were not significant, probably due to the small effective. In addition, we believe that the effect of IL-33 on bone resorption is not sufficient to change the clinical evolution of CIA. IL-33 may not have a direct role on osteoclasts but rather it may exert its anti-osteoclastogenic activity via other cells like osteoblasts (31).

In conclusion, even if IL-33 is expressed within the synovium of arthritic mice, CIA develops independently of IL-33, just like in psoriasis. Its absence also doesn't influence T cell shift toward Th1, Th17 or Tregs sub-populations. Altogether, these data and our previous ones, showing that exogenous IL-33 can almost completely inhibit CIA development, suggest that this cytokine is not crucial for chronic inflammation development, but that the development of treatment based on IL-33/ST2 axis targeting should be considered.

References

1. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* 2013;39:1003–1018.
2. Carriere V, Roussel L, Ortega N, Lacorre DA, Americh L, Aguilar L, et al. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U A* 2007;104:282–7.
3. Walker JA, Barlow JL, McKenzie AN. Innate lymphoid cells--how did we miss them? *Nat Rev Immunol* 2013;13:75–87.
4. Villarreal DO, Weiner DB. Interleukin 33: a switch-hitting cytokine. *Curr Opin Immunol* 2014;28:102–106.
5. Hazlett LD, McClellan SA, Barrett RP, Huang X, Zhang Y, Wu M, et al. IL-33 shifts macrophage polarization, promoting resistance against *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:1524–32.
6. Matsuyama Y, Okazaki H, Tamemoto H, Kimura H, Kamata Y, Nagatani K, et al. Increased levels of interleukin 33 in sera and synovial fluid from patients with active rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2010;37:18–25.
7. Hong YS, Moon SJ, Joo YB, Jeon CH, Cho ML, Ju JH, et al. Measurement of interleukin-33 (IL-33) and IL-33 receptors (sST2 and ST2L) in patients with rheumatoid arthritis. *J Korean Med Sci* 2011;26:1132–9.
8. Talabot-Ayer D, Gabay C, Palmer G. Reply to Xie et al. about the article “Distinct serum and synovial fluid interleukin (IL)-33 levels in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and osteoarthritis.” *Joint Bone Spine* 2013;80:117–8.
9. Kashiwakura J, Yanagisawa M, Lee H, Okamura Y, Sasaki-Sakamoto T, Saito S, et al. Interleukin-33 synergistically enhances immune complex-induced tumor necrosis factor alpha and interleukin-8 production in cultured human synovium-derived mast cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2013;161 Suppl 2:32–6.
10. Leung BP, Xu D, Culshaw S, McInnes IB, Liew FY. A novel therapy of murine collagen-induced arthritis with soluble T1/ST2. *J Immunol* 2004;173:145–50.
11. Xu D, Jiang HR, Kewin P, Li Y, Mu R, Fraser AR, et al. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. *Proc Natl Acad Sci U A* 2008;105:10913–8.
12. Palmer G, Talabot-Ayer D, Lamacchia C, Toy D, Seemayer CA, Viatte S, et al. Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 2009;60:738–49.
13. Verri WA Jr, Souto FO, Vieira SM, Almeida SC, Fukada SY, Xu D, et al. IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1697–703.

14. Martin P, Talabot-Ayer D, Seemayer CA, Vigne S, Lamacchia C, Rodriguez E, et al. Disease severity in K/BxN serum transfer-induced arthritis is not affected by IL-33 deficiency. *Arthritis Res Ther* 2013;15:R13.
15. Palmer G, Gabay C. Interleukin-33 biology with potential insights into human diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7:321–9.
16. Pichery M, Mirey E, Mercier P, Lefrancais E, Dujardin A, Ortega N, et al. Endogenous IL-33 is highly expressed in mouse epithelial barrier tissues, lymphoid organs, brain, embryos, and inflamed tissues: in situ analysis using a novel Il-33-LacZ gene trap reporter strain. *J Immunol* 2012;188:3488–95.
17. Clavel G, Valvason C, Yamaoka K, Lemeiter D, Laroche L, Boissier MC, et al. Relationship between angiogenesis and inflammation in experimental arthritis. *Eur Cytokine Netw* 2006;17:202–10.
18. Saidenberg-Kermanac'h N, Bessis N, Lemeiter D, Vernejoul MC de, Boissier MC, Cohen-Solal M. Interleukin-4 cellular gene therapy and osteoprotegerin decrease inflammation-associated bone resorption in collagen-induced arthritis. *J Clin Immunol* 2004;24:370–8.
19. Pecaric-Petkovic T, Didichenko SA, Kaempfer S, Spiegl N, Dahinden CA. Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. *Blood* 2009;113:1526–34.
20. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 2005;23:479–90.
21. Bourgeois E, Van LP, Samson M, Diem S, Barra A, Roga S, et al. The pro-Th2 cytokine IL-33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN-gamma production. *Eur J Immunol* 2009;39:1046–55.
22. Besnard A-G, Togbe D e., Couillin I, Tan Z, Zheng S-G, Erard F o., et al. Inflammasome - IL-1 - Th17 response in allergic lung inflammation. *J Mol Cell Biol* 2011. Available at: <http://dx.doi.org/10.1093/jmcb/mjr042>.
23. Turnquist HR, Zhao Z, Rosborough BR, Liu Q, Castellaneta A, Isse K, et al. IL-33 expands suppressive CD11b⁺ Gr-1(int) and regulatory T cells, including ST2L⁺ Foxp3⁺ cells, and mediates regulatory T cell-dependent promotion of cardiac allograft survival. *J Immunol* 2011;187:4598–610.
24. Cordero da Luz FA, s, Lima Oliveira AP, Borges D, Brí C, Gido P, et al. The Physiopathological Role of IL-33: New Highlights in Bone Biology and a Proposed Role in Periodontal Disease. *Mediators Inflamm* 2014;2014:e342410.
25. Balato A, Lembo S, Mattii M, Schiattarella M, Marino R, Paulis A De, et al. IL-33 is secreted by psoriatic keratinocytes and induces pro-inflammatory cytokines via keratinocyte and mast cell activation. *Exp Dermatol* 2012;21:892–894.
26. Mitsui A, Tada Y, Takahashi T, Shibata S, Kamata M, Miyagaki T, et al. Serum IL-33 levels are increased in patients with psoriasis. *Clin Exp Dermatol* 2015.

27. Talabot-Ayer D, Martin P, Seemayer CA, Vigne S, Lamacchia C, Finckh A, et al. Immune-mediated experimental arthritis in IL-33 deficient mice. *Cytokine* 2014;69:68–74.
28. Oboki K, Ohno T, Kajiwara N, Arae K, Morita H, Ishii A, et al. IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:18581–18586.
29. 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.
30. Zhang L, Yang X-Q, Cheng J, Hui R-S, Gao T-W. Increased Th17 cells are accompanied by FoxP3(+) Treg cell accumulation and correlated with psoriasis disease severity. *Clin Immunol Orlando Fla* 2010;135:108–117.
31. Saidi S, Bouri F, Lencel P, Duplomb L, Baud’huin M, Delplace S, et al. IL-33 is expressed in human osteoblasts, but has no direct effect on bone remodeling. *Cytokine* 2011;53:347–354.
32. Keller J, Catala-Lehnen P, Wintges K, Schulze J, Bickert T, Ito W, et al. Transgenic over-expression of interleukin-33 in osteoblasts results in decreased osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;417:217–222.
33. Zaiss MM, Kurowska-Stolarska M, Bohm C, Gary R, Scholtysek C, Stolarski B, et al. IL-33 shifts the balance from osteoclast to alternatively activated macrophage differentiation and protects from TNF-alpha-mediated bone loss. *J Immunol* 2011;186:6097–105.

Figures legends

Fig 1: LacZ expression in mouse joints with or without collagen-induced arthritis. Knee joint section of mice or without CIA (**A, B, C, D**) or with CIA (day 10 (**E, F**) or day 35 (**G, H**) after CIA induction) were stained with X-gal and blue staining was observed at x10 (**A, C, E, G**) or x40 (**B, D, F, H**) magnification. IL-33^{+/+} wild type mice (**A, B**) and IL-33^{-/-} mice (**C, D, E, F, G, H**) were analyzed. These slides are representative of 8 wt mice, 8 IL-33^{-/-} mice without CIA, 5 IL-33^{-/-} mice at day 10 after CIA, and 4 IL-33^{-/-} mice at day 35 after CIA.

Figure 2: IL-33 deficiency doesn't affect collagen-induced arthritis IL-33^{-/-} mice (n=13) open circles and wt mice (n= 9, closed circles) were immunized with chicken collagen II emulsified in CFA on day 0 and on day 21. (**A**) Clinical arthritis scores. (**B**) Mean maximal arthritis score (Amax). (**C**) Mean onset of arthritis. Data are expressed as mean ± SEM. Data are representative of one experiment out of 2 similar experiments.

Figure 3: Effect of IL-33 deficiency on helper T cell subsets. Figure 2. They were immunized with CII/CFA at days 0 and 21, were euthanized 45 days after the first immunization with CII/CFA. In 9 mice randomly selected in both groups, splenocytes were stained with fluorochrome-conjugated anti-CD4, anti-Foxp3, anti-IFN γ and anti-IL-17 antibodies. Treg were defined as CD4⁺ Foxp3⁺ cells, and Th1 and Th17 are defined as CD4⁺ IFN γ ⁺ and CD4⁺ IL-17⁺ cells, respectively. The percentage of FoxP3⁺ (**A**), IFN γ ⁺ (**B**), and IL-17⁺ cells (**C**), among CD4⁺ cells are shown. Data are representative of one experiment out of 2 similar experiments..

Figure 4: Osteoclastogenesis and bone resorption activity in wt and IL-33^{-/-} mice with CIA. Mice are the same than in Figure 2. 12 wt and 12 IL-33^{-/-} mice were randomly chosen at day 45 post CIA induction to a process to osteoclastogenesis (**A**) and bone resorption activity evaluation (**B**) as described in material and methods. Bone resorption was evaluated according to number of spot resorption and percentage of resorbing area. Arthritic mice (**C**) were defined as mice with a clinical score of arthritis >0 for at least one day during CIA course (IL-33^{-/-} mice n=6, and wt mice n=5). Data are expressed as mean (**A**) or mean ± SEM (**B-C**).

Fig 5: IMQ-induced skin inflammation in mice representative example. C57BL/6 mice, IL-33^{-/-} and *wt*, were daily treated with IMQ cream or vehicle cream (Vaseline), applied on the shaved back skin. Phenotypical presentation of mouse back skin after shaving before cream application showed a thin skin, white without scales (A). These characteristics are maintained 4 days after Vaseline application (B). On the contrary, IMQ treated mice developed: erythema infiltration and squama which appeared at day 4 similarly in both IL-33^{-/-} (C) and *wt* (D) mice, picture and the phenotypical parameters of skin inflammation were increased similarly in both group with more scales and an increased infiltration at day 9 (E). Histological slides (x 200) of back skin 11 days after IMQ application in IL-33^{-/-} mice (F) and *wt* mice (G), with acanthosis and hyperkeratosis. Control *wt* mice without IMQ application histological slide is shown in (H).

Fig 6: IMQ-induced skin inflammation develops independently of IL-33 IL-33^{-/-} (n=6) or *wt* (n=6) mice were treated daily with IMQ cream. Erythema, squama, and thickness of the back skin was scored daily on a scale from 0 to 4 (A-C). Additionally, the cumulative score (erythema plus squama plus thickness) is depicted (D). Symbols indicate mean score ± SEM of 6 mice per group. Additionally, epidermal thickness was measured on histological slides of the skin at day 11 and the scores are depicted individually in all mice (n=6 in both groups). The experiment shown is representative of 2 experiments.

Figure 7: IL-33 expression and promotor activation in the skin during IMQ-induced skin inflammation. Skin samples, at day 11 after daily IMQ treatments were analyzed with immunofluorescence staining for IL-33. IL-33^{-/-} mice showed no expression of IL-33 (A) whereas *wt* mice had an expression of IL-33 (red) in keratinocyte nucleus (B) in the same manner as *wt* mice not treated with Aldara (C). On the panel of bottom the activity of the endogenous IL-33 promoter, through X-Gal staining shown on IL-33^{-/-} mice with an expression in basal layer keratinocytes of the epidermis (D) and no detection in *wt* mice (E) (x200).

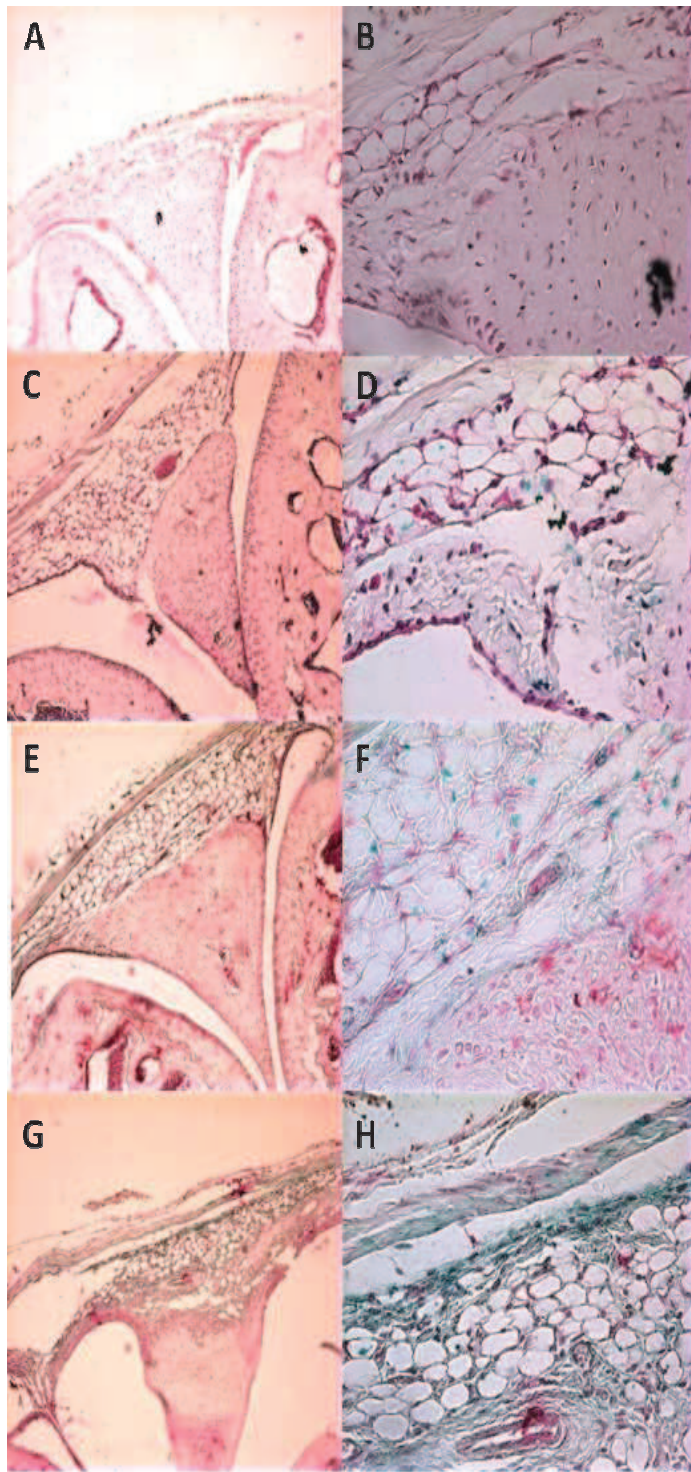


Figure 1

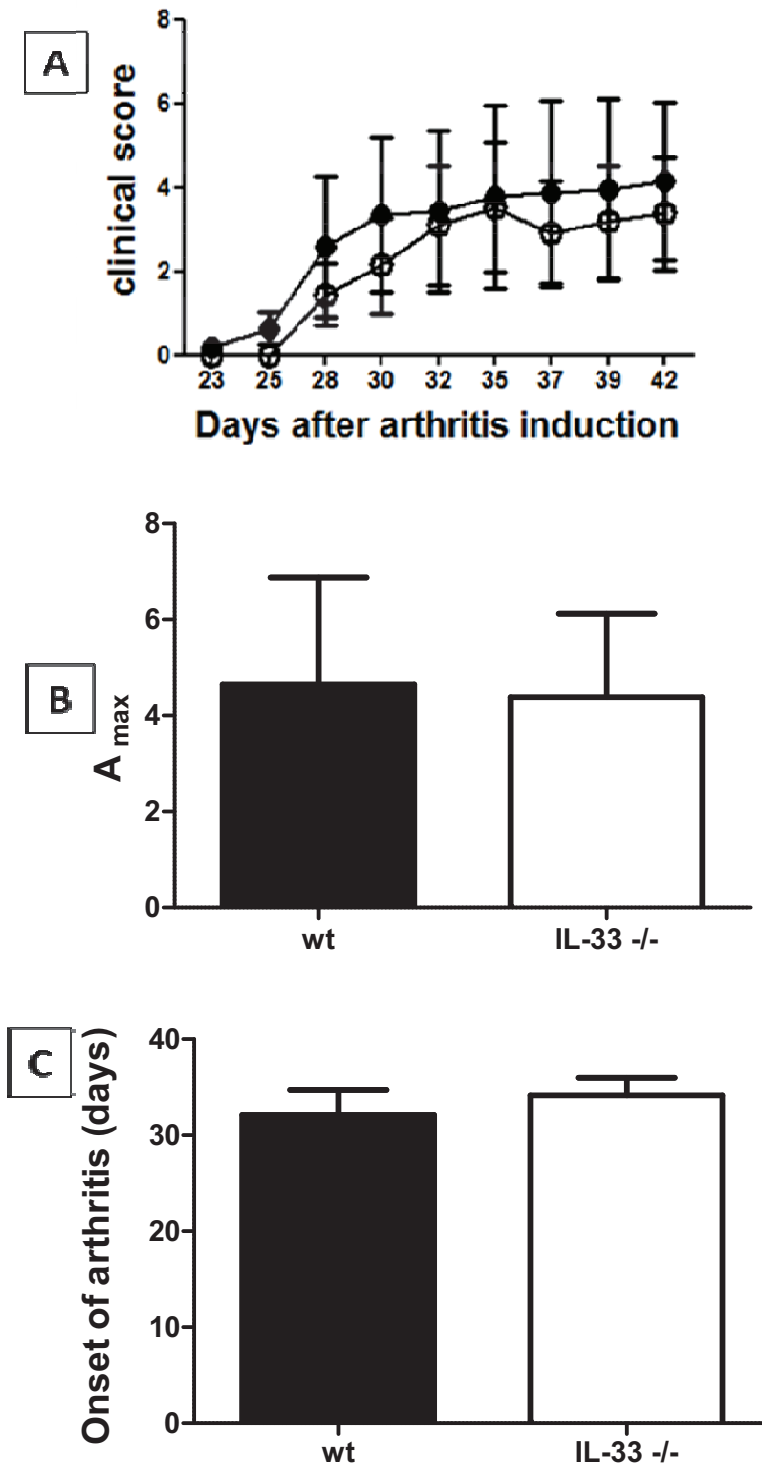


Figure 2

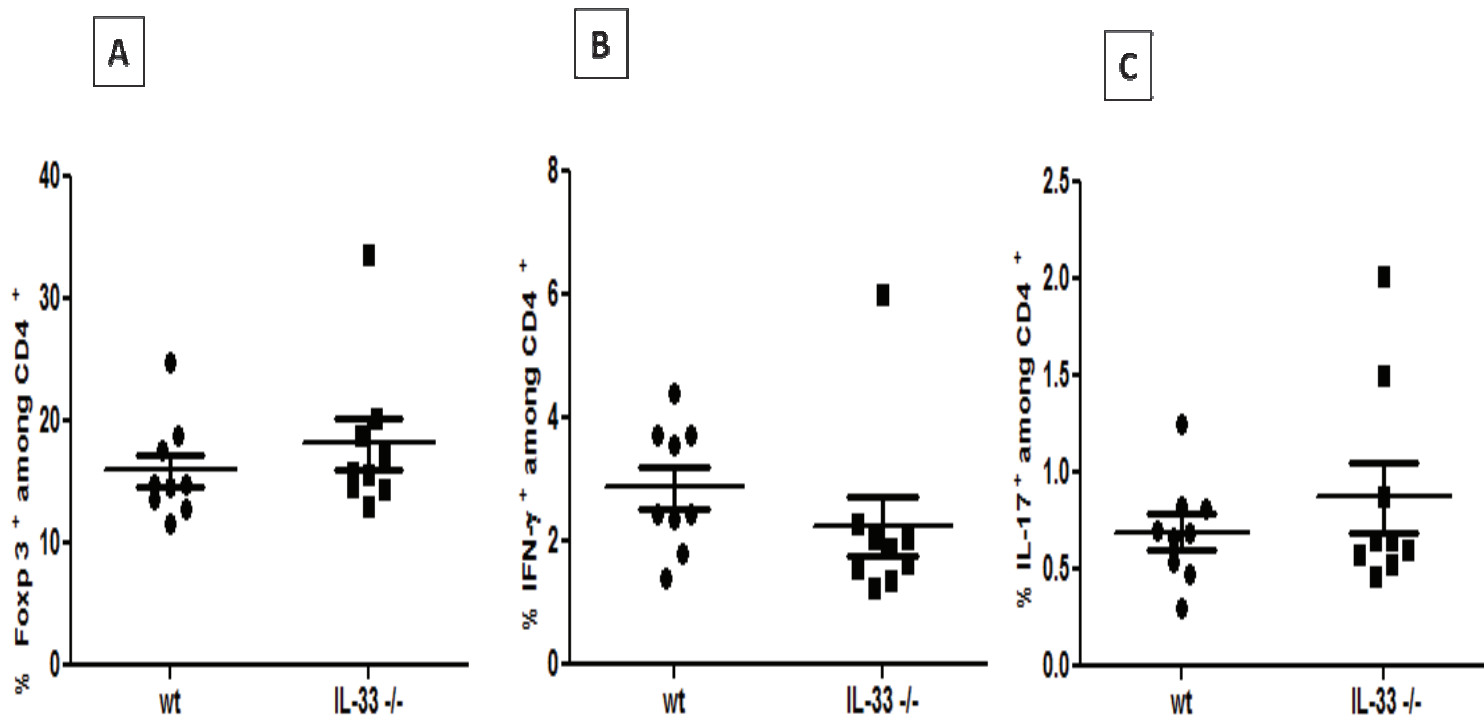
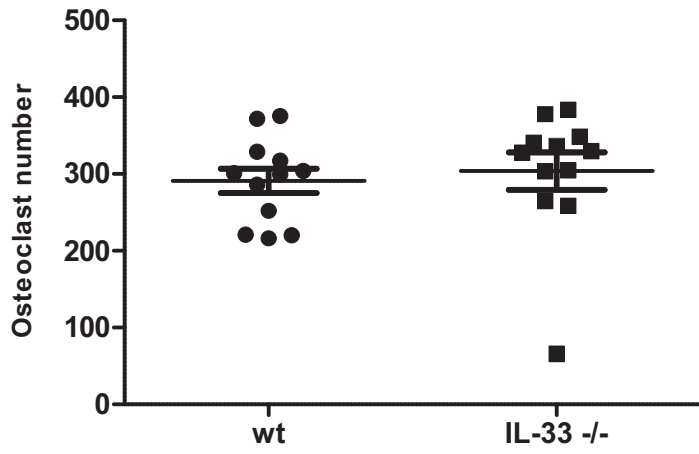
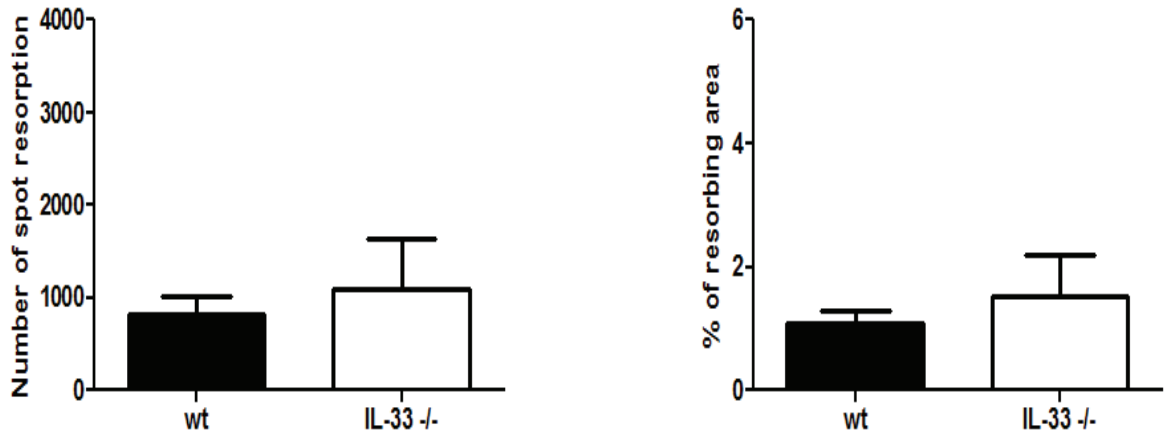


Figure 3

A



B



C

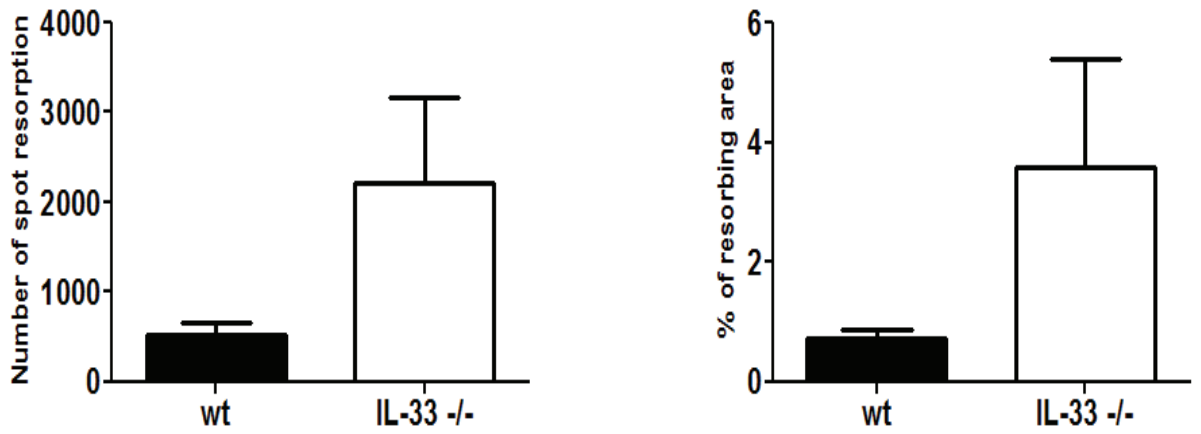


Figure 4

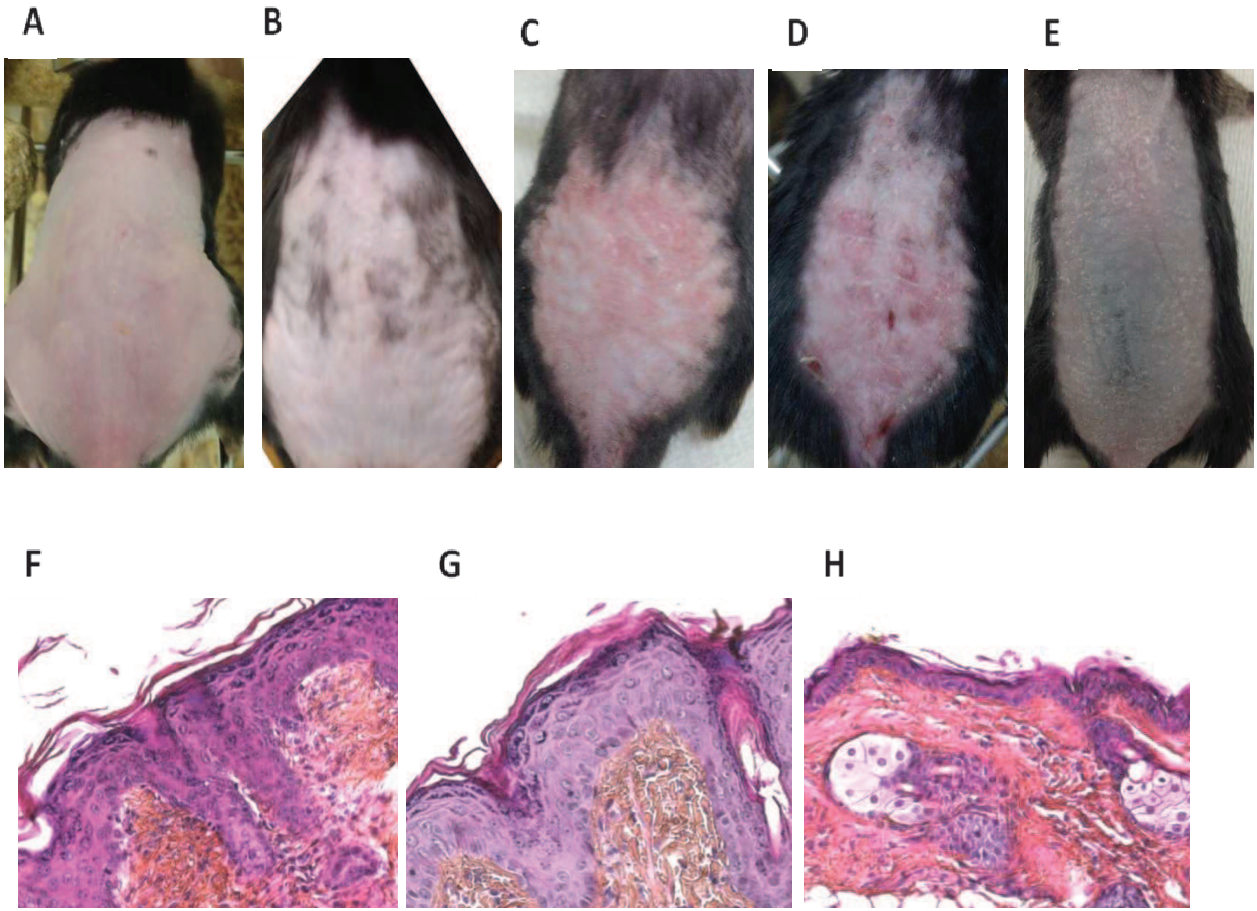


Figure 5

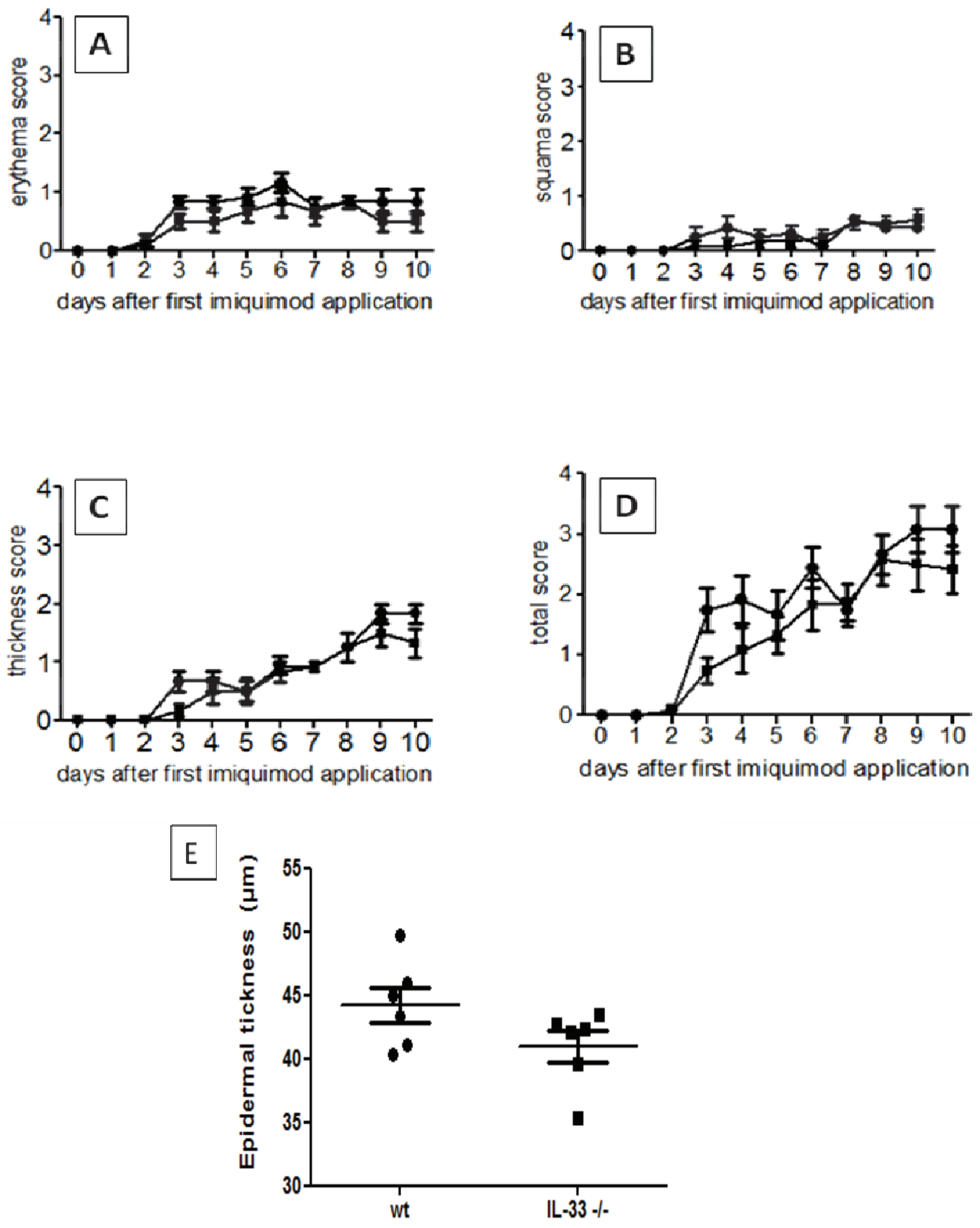


Figure 6

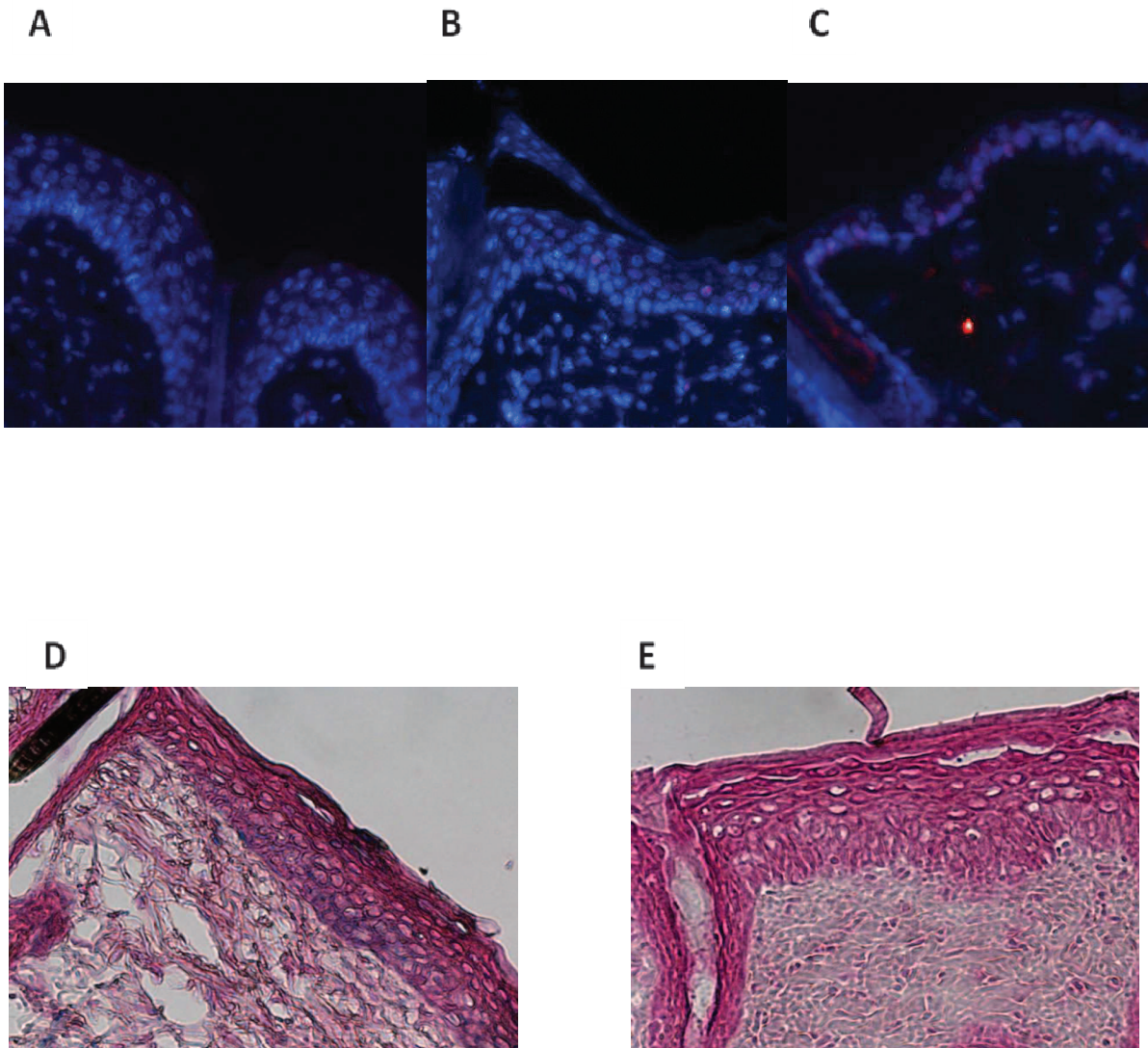


Figure 7

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1. Effet thérapeutique de l'IL-33 dans l'arthrite

L'IL-33 est exprimée dans les cellules endothéliales et les synoviocytes des articulations humaines et murines. L'expression de cette cytokine dans les fibroblastes synoviaux isolés de patients atteints de PR augmente en présence de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , avec ou sans IL-1 β (Xu et al., 2008). Dans le modèle de l'AEC, l'expression d'ARNm de l'IL-33 est augmentée en phase d'initiation de la maladie (Palmer et al., 2009). Ces résultats suggèrent l'implication de l'IL-33 dans l'arthrite.

De même, l'implication du récepteur ST2 dans la PR a été mise en évidence dans plusieurs études. L'expression de son récepteur soluble sST2 est notamment élevée dans le sérum et le liquide synovial des patients atteints de PR. Ces taux, comme ceux de l'IL-33 sont corrélés à ceux des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et l'IL-1 β dans le sérum (Hong et al., 2011).

L'inhibition de la voie ST2/IL-33 chez des souris déficientes en ST2 (Xu et al., 2008) ou par administration d'anticorps neutralisants anti-ST2 ou anti-sST2 (Palmer et al., 2009) atténue l'arthrite dans des modèles expérimentaux de PR (Leung et al., 2004). Ces études suggèrent que l'IL-33 a un rôle pathologique dans l'arthrite.

Avant notre travail (article 1), le rôle direct de l'IL-33 dans l'arthrite avait été étudié par Damo Xu et al. qui avait montré que l'injection d'IL-33 pendant cinq jours consécutifs en phase tardive (de J21 à J25) aggravait la maladie via l'activation des mastocytes (Xu et al., 2008). Cet effet pro-inflammatoire a été confirmé dans un autre modèle, l'arthrite induite par mBSA. Dans ce modèle, l'injection articulaire de l'IL-33 chez les souris immunisées induit directement ou indirectement la migration des neutrophiles dans les articulations. L'effet indirect de l'IL-33 sur les neutrophiles apparaît ici dépendant de l'environnement pro-inflammatoire composé d'IL-1, de CCL3, de CXCL1 et particulièrement de TNF- α dans l'articulation (Verri et al. 2010). De même, une autre étude a récemment montré une inflammation articulaire sévère chez les souris transgéniques pour l'IL-33 (CMV/IL-33). Ce résultat est également confirmé par des analyses histologiques qui révèlent une inflammation et une destruction importantes du cartilage (Talabot-Ayer et al., 2015). Cette étude montre que l'excès d'IL-33 chez les souris transgéniques peut activer et recruter des neutrophiles dans le cartilage, la rate et le sang.

Une étude parue en 2011 a en revanche montré des résultats opposés à ceux de ces dernières études, dans l'arthrite de la souris KBN. Dans ce modèle, l'injection d'IL-33 diminuait les symptômes de

l'arthrite par induction de l'expression du récepteur inhibiteur Fc γ RIIB sur les macrophages (Anthony et al., 2011).

C'est dans ce contexte que nous avons cherché à préciser le rôle de l'IL-33 exogène dans l'AEC en établissant différentes fenêtres de traitements. Nous avons d'abord montré que l'administration d'IL-33 en phase active de la maladie (J21 à J25) n'avait pas d'effet sur la maladie (article 1, Figure S4). En revanche, pour la première fois dans l'AEC, nous avons montré que l'administration d'IL-33 pendant 5 jours consécutifs, de J0 à J4 puis de J21 à J25 après l'induction de l'AEC, inhibait presque totalement le développement des signes cliniques de la maladie. Cette protection s'observe également à l'échelle histologique puisque l'on constate une diminution de la destruction et de l'inflammation articulaire.

Ces résultats rapportent donc pour la première fois un effet protecteur de l'IL-33 dans l'AEC. L'effet thérapeutique de l'IL-33 dans notre étude était associé à sa capacité à induire une réponse immunitaire de type 2, y compris l'expansion des ILC2, des éosinophiles et des cellules Th2, et à une expansion et une activation des Tregs. Il semblerait donc que l'effet de l'IL-33 dépend largement de la fenêtre de traitement réalisé. Ainsi, l'IL-33 en phase précoce de l'AEC semble favoriser la réponse de type 2 et induire également les Tregs d'une manière efficace. En revanche, la présence de cette cytokine en phase tardive semble inefficace pour induire la réponse anti-inflammatoire associée aux réponses de type 2 et des Tregs.

1.1 L'IL-33 induit une réponse de type 2 dans l'AEC

- Sécrétion de cytokines de type Th2

L'IL-33 peut induire une réponse de type 2 en induisant la sécrétion des interleukines -4, -13 et -5. Parmi ces cytokines, le rôle anti-inflammatoire des IL-4 et -13 a été mis en évidence dans des modèles d'arthrite (Cottard et al., 2000, Bessis et al., 1996). Nous avons montré que l'injection d'IL-33 chez les souris augmente la sécrétion d'IgE et des cytokines de type Th2 comme l'IL-4, l'IL-13 et l'IL-5 dans le plasma. En revanche, la sécrétion de deux cytokines pro-inflammatoires, l'IL-6 et l'IL-17, est diminuée après l'injection d'IL-33 chez les souris immunisées avec CII. Cette diminution pourrait être liée à l'absence d'effet de l'IL-33 en phase précoce de l'AEC sur les mastocytes sécréteurs d'IL-6 qui induit la différenciation et le développement des Th17 (Xu et al., 2008).

Nos résultats suggèrent donc que le rôle protecteur de l'IL-33 est lié à sa capacité à induire la sécrétion de cytokines Th2 et à inhiber indirectement la réponse des Th17 dans l'arthrite.

- Induction des cellules Th2

Le ST2L est exprimé préférentiellement par les cellules Th2 en comparaison des cellules Th1. Ces cellules sont définies par le phénotype $CD4^+FoxP3^-ST2L^+$ et peuvent être induites par l'IL-33. Dans ce sens, l'injection d'IL-33 chez les souris EPO^{-/-} dans le modèle d'athérosclérose (Miller et al., 2008) ou dans un modèle de lésions cérébrales ischémiques (Luo et al., 2015), peut activer les cellules Th2 et protéger les souris de l'inflammation.

Nous avons montré que l'administration d'IL-33 induisait une forte augmentation des cellules Th2, $CD4^+Foxp3^-ST2L^+$, dans le sang et la rate des souris immunisées avec du CII. Cette augmentation est liée à une sécrétion importante des cytokines de type 2 comme les IL-4, -5, -13 et -10 dans la rate des souris receveuses d'IL-33 par rapport aux souris traitées par du PBS.

Notre étude révèle donc que l'IL-33 favorise la polarisation des $CD4^+$ vers un profil Th2.

- Induction des ILC2

Les ILC2 sont des cellules sécrétrices des cytokines IL-5, -13 et -9. Le rôle de l'IL-33 dans l'activation des ILC2 sécrétrices d'IL-5 et/ou d'IL-13 a été montré dans différents modèles d'inflammation chronique comme l'inflammation pulmonaire (Wolterink et al., 2012), la fibrose hépatique (Mchedlidze et al., 2013) et l'eczéma (Imai et al., 2013). Cependant aucune étude n'avait auparavant porté sur le rôle de cette population cellulaire dans les maladies auto-immunes.

Dans notre travail après injection d'IL-33 de J0 à J4 et de J21 à J25, nous avons observé une expansion importante des ILC2 de la moelle osseuse et de la rate des souris traitées. Cette expansion était associée à une augmentation de la sécrétion des IL-5 et IL-13. En revanche, chez les souris traitées pendant cinq jours de J21 à J25 par l'IL-33, l'expansion de ces cellules était moins importante (article1, Figure S4F). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse selon laquelle l'administration précoce d'IL-33 est susceptible d'induire efficacement les ILC2 qui favorisent une réponse immunitaire de type 2. En revanche, l'administration tardive d'IL-33 est probablement inefficace pour promouvoir l'induction d'une réponse immunitaire de type 2 fructueuse afin d'inhiber le développement de l'arthrite.

- Induction des éosinophiles

Les éosinophiles sont des cellules qui interviennent dans l'inflammation et qui participent aux réponses immunes de type 2. Ces cellules, sous l'effet de l'IL-33, peuvent aussi induire une réponse type 2 conduisant à l'inflammation comme l'eczéma atopique ou la rhinosinusite (Kato, 2015). Plusieurs études ont montré le rôle direct de l'IL-33 sur les éosinophiles qui sécrètent l'IL-4 et l'IL-13 (Pecaric-Petkovic et al., 2009, Bouffi et al., 2013).

Dans notre travail, l'injection d'IL-33 dans le modèle d'AEC induit une expansion importante des éosinophiles dans le sang. Cette augmentation est associée à une augmentation des taux d'IgE dans les sérums des souris protégées de l'AEC. Dans ce sens, les IgE pourraient interagir avec leur récepteur FcεRI exprimé à la surface des éosinophiles et induire leur dégranulation libérant ainsi des cytokines de type 2 comme l'IL-13 (Liu et al., 2011).

Puisque l'expression de ST2 sur cette population cellulaire est faible, plusieurs études ont montré l'effet indirect de l'IL-33 sur les éosinophiles. Dans ce sens, l'expression de l'IL-5 par des cibles cellulaires de l'IL-33 comme les ILC2, peut recruter les éosinophiles (Price et al., 2010) (Wolterink et al., 2012). Dans notre étude, aucune expérience n'a été réalisée afin de déterminer si l'IL-33 a un rôle direct sur les éosinophiles ou si son effet passe par l'induction des ILC2 sécrétrices d'IL-5.

Par conséquent, l'effet anti-inflammatoire de l'IL-33 dans l'AEC est également associé à l'intervention des éosinophiles activés directement ou indirectement par cette cytokine.

- Induction des macrophages de type2

Les macrophages peuvent être polarisés en 2 phénotypes: les macrophages pro-inflammatoires (M1) ou des macrophages activés alternativement anti-inflammatoire (M2) favorisant les réponses immunitaires de type 2 et la réparation tissulaire. Mariola Kurowska-Stolarska et.al a montré pour la première fois que l'IL-33, en présence d'IL-13, peut polariser les cellules M2 à partir des cellules de moelle osseuse. Dans ce sens, les M2 activés qui sécrètent la chimiokine CCL24 peuvent induire une réponse de type 2 via l'induction des basophiles, des éosinophiles et des mastocytes (Kurowska-Stolarska et al., 2009). Ce mécanisme se retrouve dans la physiopathologie de l'asthme et l'injection précoce d'IL-33 dans la modèle d'EAE réduit la maladie (Jiang et al., 2012). Dans ce dernier modèle, le rôle anti-inflammatoire de l'IL-33 est associé à la polarisation des M2. D'ailleurs, dans cette étude, le transfert de cette population entraînait une protection vis-à-vis de l'EAE.

Le seul travail concernant l'effet de l'IL-33 sur les M2 dans l'arthrite a été publié en 2011, et montrait que cette cytokine favorisait la génération des M2, inhibait la formation des ostéoclastes à partir des précurseurs monocytaires (Schulze et al., 2011).

Dans notre travail, nous n'avons pas étudié l'effet de l'IL-33 sur les M2 dans l'AEC. Cependant, nous proposons l'idée d'une association de cette population avec l'effet anti-inflammatoire de l'IL-33 dans notre modèle.

1.2 Rôle des Tregs dans l'effet thérapeutique de l'IL-33

- Expansion des Tregs traités par IL-33

L'administration d'IL-33 induit la survie d'une allogreffe cardiaque chez les souris. Cet effet protecteur est lié à la capacité de cette cytokine à induire les Tregs par l'augmentation de l'expression de ST2 (Turnquist et al., 2011). Ce rôle thérapeutique de l'IL-33 a été confirmé par d'autres modèles de l'inflammation chronique comme l'hépatite induite par ConA, (Schiering et al., 2014) l'inflammation intestinale (Volarevic et al., 2012) et la colite (Duan et al., 2012).

Puisque la PR est une maladie auto-immune dans laquelle l'altération de la tolérance immunitaire se traduit par un déficit des Tregs et que les Tregs expriment le ST2, nous avons également étudié cette population dans notre modèle.

Nous avons confirmé l'effet inducteur de l'IL-33 sur le ST2 exprimé sur les Tregs *in vitro* et *in vivo*. Dans le même sens que les études précédentes, nous avons observé que l'IL-33 augmentait la fréquence des Tregs dans la rate, les ganglions et le sang des souris protégées ainsi que le nombre total de cette population dans la rate.

Cet effet de l'IL-33 sur les Tregs pourrait être direct ou indirect via l'expansion des CD sécrétrices d'IL-2 (Matta et al, 2014). En depletant des Tregs exprimant CD25 (la chaîne α de récepteur l'IL-2) *in vivo*, nous avons montré que l'IL-33 induit les Tregs CD25⁻ (article1, Figure S2). L'étude *in vitro* aussi montre l'effet inducteur de l'IL-33 sur les Tregs CD25⁻ en absence de la voie signalisation de l'IL-2 (article1, Figure S3).

Par conséquent, nous pensons que dans notre étude l'IL-33 induit l'expansion des Tregs indépendamment de l'IL-2. En outre, cette expansion était plus importante sur les Tregs ST2L⁺ que sur les Tregs ST2L⁻. L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'IL-33 exerce un rôle direct sur les Tregs via son récepteur.

En revanche, l'administration tardive d'IL-33 (de J21 à J25) induit une expansion faible des Tregs ST2L⁺ par rapport à l'injection de cette cytokine lors des phases précoce et tardive (article 1 Figure S4F). Nous pensons qu'un retard de l'administration d'IL-33 au moment où la maladie est établie serait infructueux pour induire efficacement l'expansion des Tregs et inhiber l'AEC.

- Le phénotype des Tregs est modifié par l'IL-33

L'équipe d'Ehrenstein a montré pour la première fois une déficience de l'expression des CTLA-4 sur les Tregs de patients atteints de PR en comparant les patients atteints de PR traités par anti-TNF α avec les sujets sains (Flores-Borja et al., 2008).

Dans les maladies auto-immunes comme la sclérose en plaques, il y a un défaut de l'expression de CD39 sur les Tregs. Dans la sclérose en plaques, l'expression diminuée de CD39 sur les Tregs est corrélée à l'expression de Foxp3 sur les Tregs (Borsellino et al., 2007). Notre équipe a quant elle récemment montré que l'induction de Tregs CD39⁺ chez les souris et les patients atteints de PR était associée à une diminution de l'arthrite après traitement par un anticorps anti- récepteur de l'IL-6 (Thiolat et al., 2014b).

Dans ce contexte, nous nous sommes demandé si l'inhibition de l'AEC par l'IL-33 était associée à l'acquisition d'un profil plus régulateur par les Tregs. Nous avons observé une augmentation de l'expression de CTLA-4 et de CD39 sur les Tregs dans la rate et les ganglions des souris protégées de l'AEC par l'IL-33. En outre, l'intensité de l'expression de CD39 était augmentée sur les Tregs de la rate. L'expression de CD39 était plus élevée sur les Tregs ST2L⁺ que sur les Tregs ST2L⁻ et l'intensité de son expression parmi les Tregs CD39⁺ était corrélée à l'expression de ST2 sur les Tregs. Cela suggérait un effet direct de l'IL-33 sur les Tregs CD39⁺ via son récepteur ST2L. Puisque les deux molécules CTLA-4 et CD39 sont fortement impliquées dans l'activité suppressive des Tregs, nous avons ensuite cherché à savoir si les Tregs des souris protégées étaient plus suppressives?

- L'IL-33 augmente l'activité suppressive des Tregs

Chez les patients atteints de PR, il existe un défaut de capacité suppressive des Tregs pour inhiber la sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α produits par les LT conv ou les monocytes (Ehrenstein et al., 2004).

Plusieurs études suggèrent un rôle important de CTLA-4 dans l'activité suppressive des Tregs. Une forte expression de CTLA-4 sur les Tregs favorise la croissance tumorale (Erfani et al.,

2012). Le blocage de cette protéine inhibe l'activité suppressive des Tregs dans le modèle de colite (Watanabe et al., 2008).

Notre équipe a montré que l'administration d'anticorps anti- TNF- α ou de TNF-Kinoïde (Anticorps polyclonal anti TNF- α) augmentait la fréquence des Tregs et des Tregs CTLA-4⁺ chez des souris transgéniques pour le TNF. Cette augmentation était associée à une amélioration de l'activité suppressive des Tregs par inhibition de la prolifération des LT conv (Biton et al., 2011).

Dans notre travail, l'augmentation de l'expression CTLA-4 parmi des Tregs isolés des ganglions et de la rate des souris protégées de l'AEC par l'IL-33 nous permettait de supposer une augmentation des capacités suppressives de ces Tregs, ce que nous avons au final mis en évidence. Nous avons en effet montré une inhibition importante de la sécrétion d'IFN- γ par les Tconv cultivés en présence de Tregs spléniques de souris traitées par l'IL-33. Dans ce sens, nous pensons qu'il y a une association entre l'augmentation de l'expression de CTLA-4 et l'activité suppressive des Tregs dans notre modèle. En revanche, la capacité des Tregs à inhiber la prolifération des LT conv n'est pas modifiée chez les souris traitées par l'IL-33. Pour confirmer que l'activité suppressive des Tregs de notre étude dépend bien de l'expression de CTLA-4, il faudrait utiliser un anticorps déplétant anti-CTLA-4 (Quattrocchi et al., 2000, Simpson et al., 2013).

Le CD39 est un membre de la famille des enzymes ectonucléosides triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDases). Cette enzyme avec la participation du CD73, est impliquée dans la dégradation de l'ATP extracellulaire et la génération d'adénosine qui exerce un effet anti-inflammatoire et anti-prolifératif sur ses cellules cibles. Nous rappelons que l'ATP extracellulaire constitue un signal de danger ou un adjuvant naturel sécrété lors de dommages cellulaires et de destruction tissulaire. Les Tregs expriment consécutivement CD39 et CD73 à leur surface lorsqu'ils sont activés. L'implication de ces molécules dans le maintien du caractère suppressif des Tregs a été mise en évidence dans différents modèles d'inflammation chronique (Figure 15).

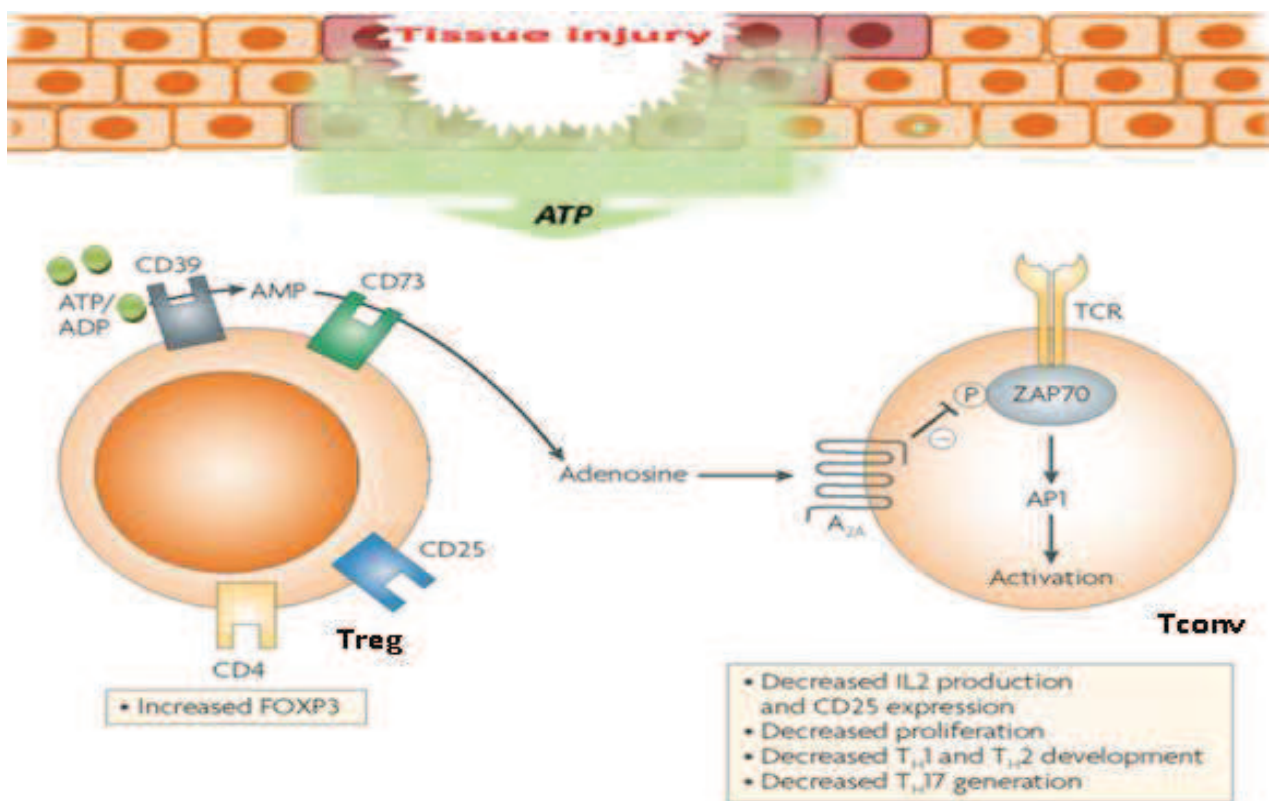


Figure15: CD39 et CD73 sont impliqués dans l'activité suppressive des Treg (Antonioli et al., 2013). Les LT régulateurs produisent de l'adénosine suite à la dégradation séquentielle de l'ATP / ADP via CD39 et CD73. L'adénosine interagit avec les récepteurs A_{2A} sur les LT conv pour diminuer leur activation et prolifération.

Une déficience en CD39 exacerbe la colite induite par DSS chez les souris (Friedman et al., 2009). De même, une réduction de l'expression de CD39 sur les Tregs de patients atteints d'hépatite met en défaut l'activité suppressive de ces cellules pour inhiber la sécrétion d'IL-17 par les Teff (Grant et al., 2014).

Dans l'AEC, le transfert des Tregs CD39⁺ diminue la sévérité de l'arthrite chez les souris (Kochetkova et al., 2011) et le blocage de CD39 chez des souris traités par MTX augmente l'arthrite. D'ailleurs, les patients résistants au MTX ont moins de Tregs exprimant CD39 en comparaison des patients répondeurs au MTX. Ce faible taux d'expression de CD39 est associé à

une réduction de l'activité suppressive des Tregs (Peres et al., 2015). Une autre étude a montré que le traitement par anti-IL-6 (tocilizumab ; TCZ) augmente l'expression de CD39 et augmente l'activité suppressive des Tregs chez les patients atteints de PR, ainsi que dans l'AEC. Dans ce sens, les Tregs CD39⁺ de plusieurs patients sont plus suppressifs que les Tregs CD39⁻ (Thiolat et al., 2014b).

L'ensemble de ces études nous a conduits à émettre l'hypothèse selon laquelle l'IL-33 induirait la génération d'une population de Tregs plus suppressive et capable d'induire des changements métaboliques comme l'hydrolyse de l'ATP qui protègent les souris de l'inflammation articulaire. Suite à l'augmentation des Tregs ST2L⁺ CD39⁺ et de l'intensité de CD39 sur les Tregs de la rate et des ganglions de souris traitées par IL-33, nous avons observé une augmentation, bien que non significative, de la consommation d'ATP par les Tregs isolés de ces souris. Comme nous avons un écart type important dans les pourcentages d'hydrolyse d'ATP chez les souris traitées par du PBS, il serait donc préférable d'augmenter le nombre de souris étudiées.

Enfin, étudier l'expression de CD73, ainsi que la co-expression de CD73 et de CD39 sur les Tregs ST2L⁺ des souris protégées de l'AEC par l'IL-33 pourrait nous aider à comprendre si l'IL-33 induit l'expression d'autres ectonucléases sur les Tregs. Dans ce sens, l'évaluation de la quantité d'AMP et/ou d'adénosine dans le surnageant de co-culture par spectrométrie de masse, nous permettrait de savoir si les Tregs utilisent ce mécanisme perturbation métabolique pour inhiber la sécrétion d'IFN- γ par les Tconv (Bastid et al., 2015). L'utilisation de souris déficientes en CD73 dans notre modèle nous permettrait en outre d'étudier les mécanismes de suppression des Tregs induits par l'IL-33 (Chrobak et al., 2015).

Une étude récente a montré une nouvelle mécanisme suppressive des Tregs exprimant CD39 dans laquelle l'adénosine générée par CD39 des Tregs peut recruter les CD4 via ses récepteurs A2A. Dans ce sens, l'interaction entre les Tregs et les CD4 peut inhiber l'activation des CD4 et sa fonction présentatrice d'Ag qui mène un amortissement dans l'induction de réactions immunitaires. L'évaluation quantitative d'ATP consommé, d'AMP ou d'adénosine dans la co-culture de Tregs avec les CD4 isolés des souris traitées par l'IL-33 ou le groupe PBS et aussi étudier les phénotypes de CD4 pourrait nous aider à savoir si l'activité suppressive des Tregs dans notre étude est associée à ce mécanisme (Ring et al., 2015).

1.3 L'axe IL-33/ST2 comme cible thérapeutique

Nos résultats montrent un effet anti-inflammatoire puissant de l'IL-33 dans l'AEC. Ces résultats vont à l'encontre d'autres études dans lesquelles l'administration d'IL-33 a un effet inverse dans des modèles de PR ou bien dans lesquelles l'administration d'anticorps anti-ST2 ou l'utilisation de souris déficientes en ST2 suggère un rôle pro-arthritique de l'IL-33. L'ensemble de ces constatations nous mènent à penser que l'axe thérapeutique basé sur le système IL-33/ST2 est à manier avec précaution. De plus, des études chez l'homme seront également nécessaires pour déterminer le rôle de l'IL-33 dans la PR. Une étude récente a montré que l'expression de l'IL-33 dans le liquide synovial était significativement plus élevée chez les patients atteints de PR que les patients atteints d'arthrose. Cette expression était corrélée à l'activité de la maladie, la VS, le FR (Tang et al., 2013). Une autre étude a montré que la sécrétion d'IL-33 est plus importante dans le sérum et le liquide synovial des patients atteints de PR que ceux de sujets sains. Dans ce sens, étudier l'expression de ST2L sur différentes populations de leucocytes du sang périphérique et déterminer leur fréquence, notamment pour les Tregs, pourrait nous aider à comprendre le rôle de cette cytokine dans la PR.

2. L'effet de l'IL-33 endogène dans l'inflammation chronique

Ici, nous discutons du rôle de l'IL-33 dans deux modèles de l'inflammation chronique qui sont l'AEC et le psoriasis induit à l'imiquimod.

2.1 L'IL-33 endogène n'est pas cruciale pour le développement de l'inflammation chronique

Comme nous avons déjà mentionné, un certain nombre d'études chez les patients et dans les modèles expérimentaux montrent que l'IL-33 a un rôle pathologique dans l'arthrite, mais notre étude et d'autres suggèrent un rôle thérapeutique majeur de cette cytokine. Le rôle de cette cytokine n'est donc pas clair et notamment son rôle endogène dans l'inflammation chronique n'est pas élucidé. L'équipe de Cem Gabay a montré pour la première fois dans le modèle de l'arthrite induite par le transfert de sérum des souris K/BxN que le développement de l'arthrite est identique chez les souris déficientes en IL-33 et les souris sauvages littermates. En revanche, la sévérité de l'arthrite est diminuée chez les souris déficientes en ST2 en comparaison des souris sauvages et des souris KO IL-33 (Martin et al., 2013). Ce groupe a suggéré que l'absence d'IL-33 pourrait être compensée par d'autres ligands inconnus de ST2L. En revanche, actuellement, aucune molécule n'a été suggérée comme ligand de ST2L.

Plus tard, la même équipe a montré que les souris KO IL-33 développaient une arthrite similaire à celle des souris sauvages dans le modèle d'AEC chez les souris DBA/I et l'arthrite induite par de la BSA (Talabot-Ayer et al., 2014). Chez ces souris les taux des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-1 β et le chimioattractant CxCL-1 n'étaient pas modifiés en absence d'IL-33.

Dans notre travail, nous avons confirmé l'absence d'expression d'IL-33 chez les souris déficientes pour cette cytokine en détectant la protéine exprimée par le gène rapporteur lacZ. L'activité du promoteur de l'IL-33 a été détectée dans la synoviale des souris déficientes en IL-33 avec ou sans l'immunisation de CII.

Conformément aux études précédentes, nous avons observé que les souris C57/BL6 déficientes en l'IL-33 développaient une AEC avec la même sévérité que les souris littermates sauvages.

Nous avons aussi, au cours de notre étude, induit un psoriasis par application d'imiquimod chez les souris déficientes en IL-33. Bien que nous ayons détecté une expression d'IL-33 dans la peau

de ces animaux, ceux-ci développaient un psoriasis de même sévérité que les souris sauvages. Ce résultat va dans le même sens que ceux que nous avons obtenus dans l'AEC, bien qu'il soit au contraire aux études suggérant un rôle pathologique de l'IL-33 dans le psoriasis (Meehansan et al., 2013, Balato et al., 2014). Une expression importante d'IL-33 a été détectée dans la peau des patients atteints de psoriasis, en particulier dans les lésions psoriatiques, en comparaison des sujets sains et de patients atteints d'eczéma (Balato et al., 2012b). En outre, l'expression importante de ST2L sur des cellules endothéliales et les neutrophiles infiltrés dans l'épiderme de la peau psoriatique a été détectée (Meehansan et al., 2013).

Dans notre étude, nous avons observé une faible expression de l'IL-33 dans la peau des souris atteintes de psoriasis, mais pas suffisamment sans doute pour que le développement de la maladie soit modifié.

En conclusion, nous avons montré que l'IL-33 n'était pas nécessaire au développement de deux modèles d'inflammation chronique, l'AEC et le psoriasis induit par de l'IMQ. Un travail récent de l'équipe de Cem Gabay vient encore confirmer cette absence d'effet dans un autre modèle d'inflammation chronique, l'athérosclérose de la souris APoE^{-/-} (Martin et al., 2014).

2.2 L'absence d'IL-33 ne modifie pas les réponses des sous populations de LT

La PR et le psoriasis sont des maladies inflammatoires chroniques caractérisées par une activité accrue des cellules Th1 et Th17. Dans l'arthrite il existe un excès de cytokines comme l'IFN- γ et l'IL17 secrétées par les Th1 et Th17 (Boissier et al., 2008). Une étude récente a montré une augmentation des cellules Th17 dans le sang de patients atteints de PR active alors que la fréquence des Tregs était diminuée (Wang et al. 2011a). Dans ce sens, il y a un déséquilibre entre Tregs et Th17 de la maladie de PR.

De même, une sécrétion importante d'IL-17 a été observée dans la peau des patients atteints de psoriasis. Il existe de plus chez ces patients une corrélation positive entre le ratio Th17/Treg dans la peau et l'activité de la maladie (Zhang et al., 2010).

Une autre étude a mis en évidence une activité suppressive réduite des Tregs isolés de patients atteints de psoriasis (Zhang et al., 2008), et une fréquence diminuée de ces cellules dans le sang périphérique de patients atteints de psoriasis. Cette fréquence augmente après traitement par anti TNF- α (Richetta et al., 2011).

Dans notre travail, nous avons observé que les fréquences et les nombres des populations Treg, Th1 et Th17 n'étaient modifiées dans la rate et les ganglions des souris déficientes en IL-33 par rapport aux souris sauvages, que ce soit dans l'AEC ou dans le psoriasis. En outre, aucune modification au niveau de la balance Treg/Th17 en termes de déficit de sécrétion en IL-33 dans la rate ou les ganglions des souris n'a pas été observée (Données non présentées).

Nous avons remarqué que l'expression de ST2L sur les Tregs n'est pas altérée chez les souris déficientes en IL-33 par rapport aux souris sauvages (Données non présentées). Cela pourrait suggérer un phénomène de compensation de l'absence de l'IL-33 par un autre membre de la famille de l'IL-33 ou l'effet indépendant de l'IL-33 vis-à-vis a ST2L (Martin et al., 2013).

Cette hypothèse pourrait expliquer la raison pour laquelle nous n'avons pas observé de différence sur le plan clinique dans les deux modèles chez les souris KO IL-33 en comparaison des souris sauvages.

2.3 Activité ostéoclastogénique accrue en absence de l'IL-33

La PR est caractérisée par une résorption osseuse et une destruction du cartilage. Nous rappelons que la resorption osseuse est due à l'activité des ostéoclastes, cellules responsables pour la dégradation matrice osseuse. Ces cellules sont d'origine hématopoïétique et se développent par fusion de précurseur de cellules myéloïdes.

Une étude réalisée *in vitro* a mis en évidence une expression d'IL-33 dans les ostéoblastes des sujets sains. Cette expression n'est pas constitutive, mais est principalement inductible par le TNF- α et l'IL-1 β . Par conséquent, il a été conclu que l'IL-33 était impliqué dans l'inflammation osseuse, mais pas dans l'homéostasie osseuse physiologique (Saidi et al., 2011).

En outre, des ostéoblastes isolés de souris transgéniques pour l'IL-33 produisent une matrice osseuse importante *in vitro* et ces animaux ont une diminution du nombre d'ostéoclastes (Keller et al., 2012).

Le rôle de l'IL-33 dans la résorption osseuse n'est cependant pas si clair. Un effet anti-ostéoclastogénique de cette cytokine a en revanche été montré chez les souris déficientes en ST2 qui présentent une densité osseuse diminuée avec une augmentation du nombre d'ostéoclastes. Cet effet a été suggéré par la capacité de l'IL-33 à générer des éosinophiles et des macrophages de type 2 et à diminuer la génération des ostéoclastes à partir des cellules de la moelle osseuse (Schulze et al., 2011). L'administration d'IL-33 chez les souris transgénique hTNF- α développant

une arthrite spontanée, inhibe la destruction osseuse et diminue le nombre des ostéoclastes (Zaiss et al., 2011). D'ailleurs, les ostéoblastes isolés des souris transgéniques pour l'IL-33 produisent une matrice osseuse importante *in vitro*. Dans ce sens, une diminution du nombre des ostéoclastes a été mise en évidence chez ces souris transgéniques (Keller et al., 2012). L'ensemble de ces études montre l'effet inhibiteur de l'IL-33 sur les ostéoclastes et nous a conduits à évaluer pour la première fois l'ostéoclastogénèse chez les souris KO IL-33. La formation des ostéoclastes a été induite en cultivant les cellules moelle osseuse isolés des souris déficientes en IL-33 ou les sauvages en présence de RANKL et MCS-F pendant cinq jours. Ces cellules ont été détectées avec la coloration de TRAP (Tartrate-resistant acid phosphatase) et identifiées comme les cellules TRAP positive. Nous avons montré une ostéoclastogénèse comparable chez les souris déficientes en IL-33 et les souris sauvages.

En revanche la résorption d'une matrice osseuse synthétique par les ostéoclastes générés des cellules moelle osseuse isolées en présence de RANKL et MCS-F pour 8 jours a montré qu'une résorption osseuse accrue chez les souris déficientes en IL-33 par rapport à ceux des souris sauvages. Cette différence n'était cependant pas significative. Nous pensons que l'effet de l'IL-33 sur la résorption osseuse n'est en fait pas suffisant pour modifier le profil clinique de l'AEC. Afin de mieux étudier la résorption osseuse chez les souris déficientes en IL-33, il faudrait mesurer la sécrétion des métalloprotéases comme MMP-9, -10, -12, et -14 dans des cultures d'ostéoclastes chez les souris déficientes en IL-33 et les sauvages. Il se pourrait de plus que l'IL-33 n'ait pas de rôle direct sur les ostéoclastes mais qu'elle exerce son activité anti-ostéoclastogénique via d'autres cellules comme les ostéoblastes (Saidi et al., 2011).

CONCLUSION

Nos objectifs étaient de comprendre le rôle de l'IL-33 dans deux modèles d'inflammation chronique, la polyarthrite rhumatoïde et le psoriasis. En utilisant les modèles expérimentaux, nous nous sommes focalisés sur l'implication de cette cytokine et son mode d'action au cours de l'arthrite expérimentale ou de l'inflammation cutanée de type psoriasis.

Dans ce travail, nous avons pu montrer que l'administration de l'IL-33 inhibe le développement de l'AEC. Cet effet était associé à une réponse immunitaire de type 2 et une expansion des Tregs. Nous avons aussi démontré que les Tregs induits par l'IL-33 acquièrent un phénotype régulateur CTLA-4⁺ et CD39⁺ et une activité suppressive accrue. Ce travail souligne l'importance du développement des thérapies cellulaires basées sur l'IL-33 / ST2.

D'autre part, nous avons démontré que malgré l'expression de l'IL-33 dans les articulations ou la peau de souris développant une AEC ou un psoriasis induit par imiquimod, l'IL-33 endogène n'est pas nécessaire pour le développement de ces deux pathologies. L'absence de cette cytokine n'a pas non plus d'influence sur la transition des LT vers des sous-populations Th1, Th17 ou Tregs dans ces deux modèles. Ces résultats posent la question de l'existence d'un autre ligand de ST2, qui pourrait compenser l'absence de l'IL-33.

Ces travaux apportent de nouvelles données sur le rôle de l'IL-33 dans l'inflammation chronique et mettent en garde contre les thérapies basées sur l'axe IL-33/ST2.

BIBLIOGRAPHIE

- ❖ Adamopoulos, I.E., and Bowman, E.P. (2008). Immune regulation of bone loss by Th17 cells. *Arthritis Res. Ther.* 10, 225.
- ❖ Afshar, M., Martinez, A.D., Gallo, R.L., and Hata, T.R. (2013). Induction and exacerbation of psoriasis with Interferon-alpha therapy for hepatitis C: a review and analysis of 36 cases. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* 27, 771–778.
- ❖ Albanesi, C., Scarponi, C., Pallotta, S., Daniele, R., Bosisio, D., Madonna, S., Fortugno, P., Gonzalvo-Feo, S., Franssen, J.-D., Parmentier, M., et al. (2009). Chemerin expression marks early psoriatic skin lesions and correlates with plasmacytoid dendritic cell recruitment. *J. Exp. Med.* 206, 249–258.
- ❖ Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A.J., Funovits, J., Felson, D.T., Bingham, C.O., Birnbaum, N.S., Burmester, G.R., Bykerk, V.P., Cohen, M.D., et al. (2010). Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 62, 2569–2581.
- ❖ Ali, S., Huber, M., Kollewe, C., Bischoff, S.C., Falk, W., and Martin, M.U. (2007). IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 18660–18665.
- ❖ Ali, S., Mohs, A., Thomas, M., Klare, J., Ross, R., Schmitz, M.L., and Martin, M.U. (2011). The dual function cytokine IL-33 interacts with the transcription factor NF- κ B to dampen NF- κ B-stimulated gene transcription. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 187, 1609–1616.
- ❖ Andre, R., Lerouet, D., Kimber, I., Pinteaux, E., and Rothwell, N.J. (2005). Regulation of expression of the novel IL-1 receptor family members in the mouse brain. *J. Neurochem.* 95, 324–330.
- ❖ Anthony, R.M., Kobayashi, T., Wermeling, F., and Ravetch, J.V. (2011). Intravenous gammaglobulin suppresses inflammation through a novel T(H)2 pathway. *Nature* 475, 110–113.
- ❖ Antonioli Luca, Pál Pacher, E. Sylvester Vizi, and György Haskó. (2013). CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med.* 2013 Jun; 19, 355–367.
- ❖ Bækkevold, E.S., Roussigné, M., Yamanaka, T., Johansen, F.-E., Jahnsen, F.L., Amalric, F., Brandtzaeg, P., Erard, M., Haraldsen, G., and Girard, J.-P. (2003). Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *Am. J. Pathol.* 163, 69–79.
- ❖ Balandraud, N., Meynard, J.B., Auger, I., Sovran, H., Mugnier, B., Reviron, D., Roudier, J., and Roudier, C. (2003). Epstein-Barr virus load in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis: accurate quantification using real-time polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum.* 48, 1223–1228.
- ❖ Balato, A., Balato, N., Megna, M., Schiattarella, M., Lembo, S., and Ayal, F. (2012a). Pathogenesis of Psoriasis: The Role of Pro-Inflammatory Cytokines Produced by Keratinocytes. In *Psoriasis*, J. Soung, ed. (InTech),.

- ❖ Balato, A., Lembo, S., Mattii, M., Schiattarella, M., Marino, R., De Paulis, A., Balato, N., and Ayala, F. (2012b). IL-33 is secreted by psoriatic keratinocytes and induces pro-inflammatory cytokines via keratinocyte and mast cell activation. *Exp. Dermatol.* 21, 892–894.
- ❖ Balato, A., Di Caprio, R., Canta, L., Mattii, M., Lembo, S., Raimondo, A., Schiattarella, M., Balato, N., and Ayala, F. (2014). IL-33 is regulated by TNF- α in normal and psoriatic skin. *Arch. Dermatol. Res.* 306, 299–304.
- ❖ Bang, S.-Y., Lee, K.-H., Cho, S.-K., Lee, H.-S., Lee, K.W., and Bae, S.-C. (2010). Smoking increases rheumatoid arthritis susceptibility in individuals carrying the HLA-DRB1 shared epitope, regardless of rheumatoid factor or anti-cyclic citrullinated peptide antibody status. *Arthritis Rheum.* 62, 369–377.
- ❖ Bartemes, K.R., Iijima, K., Kobayashi, T., Kephart, G.M., McKenzie, A.N., and Kita, H. (2012). IL-33-responsive lineage- CD25+ CD44(hi) lymphoid cells mediate innate type 2 immunity and allergic inflammation in the lungs. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 188, 1503–1513.
- ❖ Bartok, B., and Firestein, G.S. (2010). Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol. Rev.* 233, 233–255.
- ❖ Bastid, J., Regairaz, A., Bonnefoy, N., Déjou, C., Giustiniani, J., Laheurte, C., Cochaud, S., Laprevotte, E., Funck-Brentano, E., Hemon, P., et al. (2015). Inhibition of CD39 Enzymatic Function at the Surface of Tumor Cells Alleviates Their Immunosuppressive Activity. *Cancer Immunol. Res.* 3, 254–265.
- ❖ Bayer, A.L., Lee, J.Y., de la Barrera, A., Surh, C.D., and Malek, T.R. (2008). A function for IL-7R for CD4+CD25+ Foxp3+ T regulatory cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 225–234.
- ❖ Becher, B., and Pantelyushin, S. (2012). Hiding under the skin: Interleukin-17-producing $\gamma\delta$ T cells go under the skin? *Nat. Med.* 18, 1748–1750.
- ❖ Bellatin, M.F., Han, M., Fallena, M., Fan, L., Xia, D., Olsen, N., Branch, V., Karp, D., and Stastny, P. (2012). Production of autoantibodies against citrullinated antigens/peptides by human B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 188, 3542–3550.
- ❖ Bessis, N., Boissier, M.C., Ferrara, P., Blankenstein, T., Fradelizi, D., and Fournier, C. (1996). Attenuation of collagen-induced arthritis in mice by treatment with vector cells engineered to secrete interleukin-13. *Eur J Immunol* 26, 2399–2403.
- ❖ Biton, J., Semerano, L., Delavallee, L., Lemeiter, D., Laborie, M., Grouard-Vogel, G., Boissier, M.C., and Bessis, N. (2011). Interplay between TNF and regulatory T cells in a TNF-driven murine model of arthritis. *J Immunol* 186, 3899–3910.
- ❖ Boissier, M.C., Assier, E., Falgarone, G., and Bessis, N. (2008). Shifting the imbalance from Th1/Th2 to Th17/treg: the changing rheumatoid arthritis paradigm. *Joint Bone Spine* 75, 373–375.

- ❖ Boissier, M.-C., Assier, E., Biton, J., Denys, A., Falgarone, G., and Bessis, N. (2009). Regulatory T cells (Treg) in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 76, 10–14.
- ❖ Bonilla, W.V., Fröhlich, A., Senn, K., Kallert, S., Fernandez, M., Johnson, S., Kreuzfeldt, M., Hegazy, A.N., Schrick, C., Fallon, P.G., et al. (2012). The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral CD8⁺ T cell responses. *Science* 335, 984–989.
- ❖ Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., Höpner, S., Centonze, D., Bernardi, G., Dell’Acqua, M.L., et al. (2007). Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 110, 1225–1232.
- ❖ Bottini, N., and Firestein, G.S. (2013). Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat. Rev. Rheumatol.* 9, 24–33.
- ❖ Bouffi, C., Rochman, M., Zust, C.B., Stucke, E.M., Kartashov, A., Fulkerson, P.C., Barski, A., and Rothenberg, M.E. (2013). IL-33 markedly activates murine eosinophils by an NFκB-dependent mechanism differentially dependent upon an IL-4-driven autoinflammatory loop. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 191.
- ❖ Bourgeois, E., Van, L.P., Samson, M., Diem, S., Barra, A., Roga, S., Gombert, J.-M., Schneider, E., Dy, M., Gourdy, P., et al. (2009). The pro-Th2 cytokine IL-33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN-gamma production. *Eur. J. Immunol.* 39, 1046–1055.
- ❖ Bovenschen, H.J., 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.
- ❖ Brand, D.D., Latham, K.A., and Rosloniec, E.F. (2007). Collagen-induced arthritis. *Nat. Protoc.* 2, 1269–1275.
- ❖ Brennan, F.M., and McInnes, I.B. (2008). Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 118, 3537–3545.
- ❖ Browning, J.L. (2006). B cells move to centre stage: novel opportunities for autoimmune disease treatment. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 564–576.
- ❖ Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paepfer, B., Clark, L.B., Yasayko, S.A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F., and Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* 27, 68–73.
- ❖ Bulek, K., Swaidani, S., Qin, J., Lu, Y., Gulen, M.F., Herjan, T., Min, B., Kastelein, R.A., Aronica, M., Kosz-Vnenchak, M., et al. (2009). The essential role of SIGIRR/TIR8 in regulation of Th2 immune response. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 182, 2601–2609.
- ❖ Burchill, M.A., Yang, J., Vogtenhuber, C., Blazar, B.R., and Farrar, M.A. (2007). IL-2 Receptor β-Dependent STAT5 Activation Is Required for the Development of Foxp3⁺ Regulatory T Cells. *J. Immunol.* 178, 280–290.

- ❖ Byamba, D., Kim, D.Y., Kim, D.-S., Kim, T.-G., Jee, H., Kim, S.H., Park, T.-Y., Yang, S.-H., Lee, S.-K., and Lee, M.-G. (2014). Skin-penetrating methotrexate alleviates imiquimod-induced psoriasiform dermatitis via decreasing IL-17-producing gamma delta T cells. *Exp. Dermatol.* 23, 492–496.
- ❖ Cai, Y., Shen, X., Ding, C., Qi, C., Li, K., Li, X., Jala, V.R., Zhang, H., Wang, T., Zheng, J., et al. (2011). Pivotal role of dermal IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells in skin inflammation. *Immunity* 35, 596–610.
- ❖ Campbell, D.J., and Koch, M.A. (2011). Phenotypical and functional specialization of FOXP3⁺ regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 119–130.
- ❖ Cao, X. (2010). Regulatory T cells and immune tolerance to tumors. *Immunol. Res.* 46, 79–93.
- ❖ Cao, X., Cai, S.F., Fehniger, T.A., Song, J., Collins, L.I., Piwnica-Worms, D.R., and Ley, T.J. (2007). Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 27, 635–646.
- ❖ Carriere, V., Roussel, L., Ortega, N., Lacorre, D.-A., Americh, L., Aguilar, L., Bouche, G., and Girard, J.-P. (2007). IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 282–287.
- ❖ Cayrol, C., and Girard, J.-P. (2009). The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 9021–9026.
- ❖ Cevikbas, F., and Steinhoff, M. (2012). IL-33: a novel danger signal system in atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 132, 1326–1329.
- ❖ Chandra, A., Ray, A., Senapati, S., and Chatterjee, R. (2015). Genetic and epigenetic basis of psoriasis pathogenesis. *Mol. Immunol.* 64, 313–323.
- ❖ Chaudhry, A., Samstein, R.M., Treuting, P., Liang, Y., Pils, M.C., Heinrich, J.-M., Jack, R.S., Wunderlich, F.T., Brünig, J.C., Müller, W., et al. (2011). Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. *Immunity* 34, 566–578.
- ❖ Chen, J., Li, J., Gao, H., Wang, C., Luo, J., Lv, Z., and Li, X. (2012). Comprehensive Evaluation of Different T-Helper Cell Subsets Differentiation and Function in Rheumatoid Arthritis. *BioMed Res. Int.* 2012, e535361.
- ❖ Chen, L., Shen, Z., Wang, G., Fan, P., and Liu, Y. (2008). Dynamic frequency of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells in psoriasis vulgaris. *J. Dermatol. Sci.* 51, 200–203.
- ❖ Choi, S.W., and Reddy, P. (2014). Current and emerging strategies for the prevention of graft-versus-host disease. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 11, 536–547.

- ❖ Choi, Y.-S., Choi, H.-J., Min, J.-K., Pyun, B.-J., Maeng, Y.-S., Park, H., Kim, J., Kim, Y.-M., and Kwon, Y.-G. (2009). Interleukin-33 induces angiogenesis and vascular permeability through ST2/TRAF6-mediated endothelial nitric oxide production. *Blood* 114, 3117–3126.
- ❖ Choy, E.H., Kavanaugh, A.F., and Jones, S.A. (2013). The problem of choice: current biologic agents and future prospects in RA. *Nat. Rev. Rheumatol.* 9, 154–163.
- ❖ Chrobak, P., Charlebois, R., Rejtar, P., Bikai, R.E., Allard, B., and Stagg, J. (2015). CD73 Plays a Protective Role in Collagen-Induced Arthritis. *J. Immunol.* 194, 2487–2492.
- ❖ Chu, C.Q., Field, M., Feldmann, M., and Maini, R.N. (1991). Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 34, 1125–1132.
- ❖ Collison, L.W., Chaturvedi, V., Henderson, A.L., Giacomini, P.R., Guy, C., Bankoti, J., Finkelstein, D., Forbes, K., Workman, C.J., Brown, S.A., et al. (2010). IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat. Immunol.* 11, 1093–1101.
- ❖ Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S., and Vignali, D.A.A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450, 566–569.
- ❖ Cottard, V., Mülleman, D., Bouille, P., Mezzina, M., Boissier, M.C., and Bessis, N. (2000). Adeno-associated virus-mediated delivery of IL-4 prevents collagen-induced arthritis. *Gene Ther* 7, 1930–1939.
- ❖ Da Luz, F.A.C., Oliveira, A.P.L., Borges, D., Brígido, P.C., and Silva, M.J.B. (2014). The physiopathological role of IL-33: new highlights in bone biology and a proposed role in periodontal disease. *Mediators Inflamm.* 2014, 342410.
- ❖ Das, R.P., Jain, A.K., and Ramesh, V. (2009). Current concepts in the pathogenesis of psoriasis. *Indian J. Dermatol.* 54, 7–12.
- ❖ Dayer, J.M. (2003). The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 42 Suppl 2, ii3–ii10.
- ❖ Dayer, J.M., Beutler, B., and Cerami, A. (1985). Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J. Exp. Med.* 162, 2163–2168.
- ❖ Demyanets, S., Konya, V., Kastl, S.P., Kaun, C., Rauscher, S., Niessner, A., Pentz, R., Pfaffenberger, S., Rychli, K., Lemberger, C.E., et al. (2011). Interleukin-33 induces expression of adhesion molecules and inflammatory activation in human endothelial cells and in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 2080–2089.
- ❖ Diaz-Montero, C.M., Salem, M.L., Nishimura, M.I., Garrett-Mayer, E., Cole, D.J., and Montero, A.J. (2009). Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate

with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 58, 49–59.

- ❖ Diveu, C., McGeachy, M.J., and Cua, D.J. (2008). Cytokines that regulate autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 663–668.
- ❖ Drube, S., Heink, S., Walter, S., Löhn, T., Grusser, M., Gerbault, A., Berod, L., Schons, J., Dudeck, A., Freitag, J., et al. (2010). The receptor tyrosine kinase c-Kit controls IL-33 receptor signaling in mast cells. *Blood* 115, 3899–3906.
- ❖ Duan, L., Chen, J., Zhang, H., Yang, H., Zhu, P., Xiong, A., Xia, Q., Zheng, F., Tan, Z., Gong, F., et al. (2012). Interleukin-33 ameliorates experimental colitis through promoting Th2/Foxp3+ regulatory T-cell responses in mice. *Mol. Med. Camb. Mass* 18, 753–761.
- ❖ Edwards, J.C.W., and Cambridge, G. (2006). B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 394–403.
- ❖ Ehrenstein, M.R., Evans, J.G., Singh, A., Moore, S., Warnes, G., Isenberg, D.A., and Mauri, C. (2004). Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med* 200, 277–285.
- ❖ Elliott, M.J., Maini, R.N., Feldmann, M., Kalden, J.R., Antoni, C., Smolen, J.S., Leeb, B., Breedveld, F.C., Macfarlane, J.D., and Bijl, H. (1994). Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet* 344, 1105–1110.
- ❖ Entezami, P., Fox, D.A., Clapham, P.J., and Chung, K.C. (2011). Historical Perspective on the Etiology of Rheumatoid Arthritis. *Hand Clin.* 27, 1–10.
- ❖ Erfani, N., Mehrabadi, S.M., Ghayumi, M.A., Haghshenas, M.R., Mojtahedi, Z., Ghaderi, A., and Amani, D. (2012). Increase of regulatory T cells in metastatic stage and CTLA-4 over expression in lymphocytes of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer Amst. Neth.* 77, 306–311.
- ❖ Ermann, J., Hoffmann, P., Edinger, M., Dutt, S., Blankenberg, F.G., Higgins, J.P., Negrin, R.S., Fathman, C.G., and Strober, S. (2005). Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood* 105, 2220–2226.
- ❖ Ernst, P.B., Garrison, J.C., and Thompson, L.F. (2010). Much Ado about Adenosine: Adenosine Synthesis and Function in Regulatory T Cell Biology. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 185, 1993–1998.
- ❖ Espinassous, Q., Garcia-de-Paco, E., Garcia-Verdugo, I., Synguelakis, M., von Aulock, S., Sallenave, J.-M., McKenzie, A.N.J., and Kanellopoulos, J. (2009). IL-33 enhances lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production from mouse macrophages by regulating lipopolysaccharide receptor complex. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 183, 1446–1455.
- ❖ Van der Fits, L., Mourits, S., Voerman, J.S.A., Kant, M., Boon, L., Laman, J.D., Cornelissen, F., Mus, A.-M., Florencia, E., Prens, E.P., et al. (2009). Imiquimod-induced

psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 5836–5845.

- ❖ Fletcher, J.M., Loneragan, R., Costelloe, L., Kinsella, K., Moran, B., O'Farrelly, C., Tubridy, N., and Mills, K.H.G. (2009). CD39+Foxp3+ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 7602–7610.
- ❖ Flores-Borja, F., Jury, E.C., Mauri, C., and Ehrenstein, M.R. (2008). Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 19396–19401.
- ❖ Fraser, K.J. (1982). Anglo-French contributions to the recognition of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 41, 335–343.
- ❖ Friedman, D.J., Künzli, B.M., A-Rahim, Y.I., Sevigny, J., Berberat, P.O., Enyoji, K., Csizmadia, E., Friess, H., and Robson, S.C. (2009). CD39 deletion exacerbates experimental murine colitis and human polymorphisms increase susceptibility to inflammatory bowel disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 16788–16793.
- ❖ Gao, X., Wang, X., Yang, Q., Zhao, X., Wen, W., Li, G., Lu, J., Qin, W., Qi, Y., Xie, F., et al. (2015). Tumoral expression of IL-33 inhibits tumor growth and modifies the tumor microenvironment through CD8+ T and NK cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 194, 438–445.
- ❖ Gershon, R.K., and Kondo, K. (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18, 723–737.
- ❖ Gierut, A., Perlman, H., and Pope, R.M. (2010). Innate immunity and rheumatoid arthritis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 36, 271–296.
- ❖ Gilliet, M., Cao, W., and Liu, Y.-J. (2008). Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 594–606.
- ❖ Grant, C.R., Liberal, R., Holder, B.S., Cardone, J., Ma, Y., Robson, S.C., Mieli-Vergani, G., Vergani, D., and Longhi, M.S. (2014). Dysfunctional CD39POS regulatory T cells and aberrant control of T-helper type 17 cells in autoimmune hepatitis. *Hepatology* 59, 1007–1015.
- ❖ Green, E.A., Gorelik, L., McGregor, C.M., Tran, E.H., and Flavell, R.A. (2003). CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10878–10883.
- ❖ Gregersen, P.K., Silver, J., and Winchester, R.J. (1987). The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 30, 1205–1213.
- ❖ Grossman, W.J., Verbsky, J.W., Barchet, W., Colonna, M., Atkinson, J.P., and Ley, T.J. (2004). Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 21, 589–601.

- ❖ Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E., and Roncarolo, M.G. (1997). A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737–742.
- ❖ Gudjonsson, J.E., Johnston, A., Dyson, M., Valdimarsson, H., and Elder, J.T. (2007). Mouse Models of Psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 127, 1292–1308.
- ❖ Guo, L., Wei, G., Zhu, J., Liao, W., Leonard, W.J., Zhao, K., and Paul, W. (2009). IL-1 family members and STAT activators induce cytokine production by Th2, Th17, and Th1 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 13463–13468.
- ❖ Ha, H.-L., Wang, H., Pisitkun, P., Kim, J.-C., Tassi, I., Tang, W., Morasso, M.I., Udey, M.C., and Siebenlist, U. (2014). IL-17 drives psoriatic inflammation via distinct, target cell-specific mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E3422–E3431.
- ❖ Haenuki, Y., Matsushita, K., Futatsugi-Yumikura, S., Ishii, K.J., Kawagoe, T., Imoto, Y., Fujieda, S., Yasuda, M., Hisa, Y., Akira, S., et al. (2012). A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 130, 184–194.e11.
- ❖ Han, J.M., Wu, D., Denroche, H.C., Yao, Y., Verchere, C.B., and Levings, M.K. (2015). IL-33 Reverses an Obesity-Induced Deficit in Visceral Adipose Tissue ST2⁺ T Regulatory Cells and Ameliorates Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance. *J. Immunol.* Baltim. Md 1950 194, 4777–4783.
- ❖ Harrison, B., Silman, A., Barrett, E., and Symmons, D. (1998). Low frequency of recent parvovirus infection in a population-based cohort of patients with early inflammatory polyarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 57, 375–377.
- ❖ Hashizume, M., and Mihara, M. (2011). The roles of interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis* 2011, 765624.
- ❖ Haworth, C., Brennan, F.M., Chantry, D., Turner, M., Maini, R.N., and Feldmann, M. (1991). Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid arthritis: regulation by tumor necrosis factor-alpha. *Eur. J. Immunol.* 21, 2575–2579.
- ❖ He, Y., Wong, A.Y., Chan, E.W., Lau, W.C., Man, K.K., Chui, C.S., Worsley, A.J., and Wong, I.C. (2013). Efficacy and safety of tofacitinib in the treatment of rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Musculoskelet. Disord.* 14, 298.
- ❖ Hijnen, D., Knol, E.F., Gent, Y.Y., Giovannone, B., Beijm, S.J.P., Kupper, T.S., Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M., and Clark, R.A. (2013). CD8(+) T cells in the lesional skin of atopic dermatitis and psoriasis patients are an important source of IFN- γ , IL-13, IL-17, and IL-22. *J. Invest. Dermatol.* 133, 973–979.
- ❖ Hoffmann, P., Ermann, J., Edinger, M., Fathman, C.G., and Strober, S. (2002). Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Exp. Med.* 196, 389–399.
- ❖ Hong, Y.S., Moon, S.J., Joo, Y.B., Jeon, C.H., Cho, M.L., Ju, J.H., Oh, H.J., Heo, Y.J., Park, S.H., Kim, H.Y., et al. (2011). Measurement of interleukin-33 (IL-33) and IL-33

receptors (sST2 and ST2L) in patients with rheumatoid arthritis. *J Korean Med Sci* 26, 1132–1139.

- ❖ Houssiau, F.A., Devogelaer, J.P., Van Damme, J., de Deuxchaisnes, C.N., and Van Snick, J. (1988). Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum.* 31, 784–788.
- ❖ Hovhannisyan, Z., Treatman, J., Littman, D.R., and Mayer, L. (2011). Characterization of interleukin-17-producing regulatory T cells in inflamed intestinal mucosa from patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 140, 957–965.
- ❖ Huan, J., Culbertson, N., Spencer, L., Bartholomew, R., Burrows, G.G., Chou, Y.K., Bourdette, D., Ziegler, S.F., Offner, H., and Vandenbark, A.A. (2005). Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. *J. Neurosci. Res.* 81, 45–52.
- ❖ Huang, C.-T., Workman, C.J., Flies, D., Pan, X., Marson, A.L., Zhou, G., Hipkiss, E.L., Ravi, S., Kowalski, J., Levitsky, H.I., et al. (2004). Role of LAG-3 in Regulatory T Cells. *Immunity* 21, 503–513.
- ❖ 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.
- ❖ Hudson, C.A., Christophi, G.P., Gruber, R.C., Wilmore, J.R., Lawrence, D.A., and Massa, P.T. (2008). Induction of IL-33 expression and activity in central nervous system glia. *J. Leukoc. Biol.* 84, 631–643.
- ❖ Hueber, W., Patel, D.D., Dryja, T., Wright, A.M., Koroleva, I., Bruin, G., Antoni, C., Draelos, Z., Gold, M.H., Psoriasis Study Group, et al. (2010). Effects of AIN457, a fully human antibody to interleukin-17A, on psoriasis, rheumatoid arthritis, and uveitis. *Sci. Transl. Med.* 2, 52ra72.
- ❖ Icutani, M., Yanagibashi, T., Ogasawara, M., Tsuneyama, K., Yamamoto, S., Hattori, Y., Kouro, T., Itakura, A., Nagai, Y., Takaki, S., et al. (2012). Identification of innate IL-5-producing cells and their role in lung eosinophil regulation and antitumor immunity. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 188, 703–713.
- ❖ Imai, Y., Yasuda, K., Sakaguchi, Y., Haneda, T., Mizutani, H., Yoshimoto, T., Nakanishi, K., and Yamanishi, K. (2013). Skin-specific expression of IL-33 activates group 2 innate lymphoid cells and elicits atopic dermatitis-like inflammation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 13921–13926.
- ❖ Imboden, J.B. (2009). The Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 4, 417–434.
- ❖ Ivanov, V.N., Zhou, H., Ghandhi, S.A., Karasic, T.B., Yaghoubian, B., Amundson, S.A., and Hei, T.K. (2010). Radiation-induced bystander signaling pathways in human fibroblasts: a role for interleukin-33 in the signal transmission. *Cell. Signal.* 22, 1076–1087.

- ❖ Jadali, Z., and Eslami, M.B. (2014). T cell immune responses in psoriasis. *Iran. J. Allergy Asthma Immunol.* 13, 220–230.
- ❖ Jankowski, M., Kopiński, P., and Goc, A. (2010). Interleukin-27: biological properties and clinical application. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 58, 417–425.
- ❖ Jiang, H.-R., Milovanović, M., Allan, D., Niedbala, W., Besnard, A.-G., Fukada, S.Y., Alves-Filho, J.C., Togbe, D., Goodyear, C.S., Linington, C., et al. (2012). IL-33 attenuates EAE by suppressing IL-17 and IFN- γ production and inducing alternatively activated macrophages. *Eur. J. Immunol.* 42, 1804–1814.
- ❖ Joetham, A., Takada, K., Taube, C., Miyahara, N., Matsubara, S., Koya, T., Rha, Y.-H., Dakhama, A., and Gelfand, E.W. (2007). Naturally Occurring Lung CD4+CD25+ T Cell Regulation of Airway Allergic Responses Depends on IL-10 Induction of TGF- β . *J. Immunol.* 178, 1433–1442.
- ❖ Joosten, L.A., Helsen, M.M., Saxne, T., van De Loo, F.A., Heinegard, D., and van Den Berg, W.B. (1999). IL-1 alpha beta blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF-alpha blockade only ameliorates joint inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 163, 5049–5055.
- ❖ Jovanovic, I., Radosavljevic, G., Mitrovic, M., Juranic, V.L., McKenzie, A.N.J., Arsenijevic, N., Jonjic, S., and Lukic, M.L. (2011). ST2 deletion enhances innate and acquired immunity to murine mammary carcinoma. *Eur. J. Immunol.* 41, 1902–1912.
- ❖ Jovanovic, I.P., Pejnovic, N.N., Radosavljevic, G.D., Pantic, J.M., Milovanovic, M.Z., Arsenijevic, N.N., and Lukic, M.L. (2014). Interleukin-33/ST2 axis promotes breast cancer growth and metastases by facilitating intratumoral accumulation of immunosuppressive and innate lymphoid cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 134, 1669–1682.
- ❖ Kakkar, R., and Lee, R.T. (2008). The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 827–840.
- ❖ Kallioliass, G.D., Zhao, B., Triantafyllopoulou, A., Park-Min, K.-H., and Ivashkiv, L.B. (2010). Interleukin-27 inhibits human osteoclastogenesis by abrogating RANKL-mediated induction of nuclear factor of activated T cells c1 and suppressing proximal RANK signaling. *Arthritis Rheum.* 62, 402–413.
- ❖ Kamekura, R., Kojima, T., Takano, K., Go, M., Sawada, N., and Himi, T. (2012). The role of IL-33 and its receptor ST2 in human nasal epithelium with allergic rhinitis. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 42, 218–228.
- ❖ Kamijo, S., Takeda, H., Tokura, T., Suzuki, M., Inui, K., Hara, M., Matsuda, H., Matsuda, A., Oboki, K., Ohno, T., et al. (2013). IL-33-mediated innate response and adaptive immune cells contribute to maximum responses of protease allergen-induced allergic airway inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 190, 4489–4499.
- ❖ Kang, S., Tanaka, T., and Kishimoto, T. (2015). Therapeutic uses of anti-interleukin-6 receptor antibody. *Int. Immunol.* 27, 21–29.

- ❖ Kapp, A. (1990). Elevated levels of soluble CD8 antigen in sera of patients with psoriasis-- a possible sign of suppressor/cytotoxic T-cell activation. *Arch. Dermatol. Res.* 282, 6–7.
- ❖ Kato, A. (2015). Immunopathology of chronic rhinosinusitis. *Allergol. Int. Off. J. Jpn. Soc. Allergol.* 64, 121–130.
- ❖ 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.
- ❖ Keller, J., Catala-Lehnen, P., Wintges, K., Schulze, J., Bickert, T., Ito, W., Horst, A.K., Amling, M., and Schinke, T. (2012). Transgenic over-expression of interleukin-33 in osteoblasts results in decreased osteoclastogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417, 217–222.
- ❖ Kerr, J.R., Ferguson, W.P., Mcmillan, S.A., Bruce, I.N., and Bell, A.L. (1996). Parvovirus B19 and acute joint swelling in rheumatoid arthritis patients. *Ann. Rheum. Dis.* 55, 648–649.
- ❖ Klareskog, L., Widhe, M., Hermansson, M., and Rönnelid, J. (2008). Antibodies to citrullinated proteins in arthritis: pathology and promise. *Curr. Opin. Rheumatol.* 20, 300–305.
- ❖ Kobayashi, S., Okamoto, H., Iwamoto, T., Toyama, Y., Tomatsu, T., Yamanaka, H., and Momohara, S. (2008). A role for the aryl hydrocarbon receptor and the dioxin TCDD in rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 47, 1317–1322.
- ❖ Kochetkova, I., Thornburg, T., Callis, G., and Pascual, D.W. (2011). Segregated Regulatory CD39⁺ CD4⁺ T Cell Function: TGF- β -Producing FoxP3⁻ and IL-10-Producing FoxP3⁺ Cells Are Interdependent for Protection Against Collagen-Induced Arthritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 187, 4654–4666.
- ❖ Komai-Koma, M., Gilchrist, D.S., McKenzie, A.N.J., Goodyear, C.S., Xu, D., and Liew, F.Y. (2011). IL-33 activates B1 cells and exacerbates contact sensitivity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 2584–2591.
- ❖ Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K., and Iwakura, Y. (2006). IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177, 566–573.
- ❖ Koreth, J., Matsuoka, K., Kim, H.T., McDonough, S.M., Bindra, B., Alyea, E.P., Armand, P., Cutler, C., Ho, V.T., Treister, N.S., et al. (2011). Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N. Engl. J. Med.* 365, 2055–2066.
- ❖ Kotake, S., Sato, K., Kim, K.J., Takahashi, N., Udagawa, N., Nakamura, I., Yamaguchi, A., Kishimoto, T., Suda, T., and Kashiwazaki, S. (1996). Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 11, 88–95.

- ❖ Krueger, G.G., Langley, R.G., Leonardi, C., Yeilding, N., Guzzo, C., Wang, Y., Dooley, L.T., and Lebwohl, M. (2007). A Human Interleukin-12/23 Monoclonal Antibody for the Treatment of Psoriasis. *N. Engl. J. Med.* 356, 580–592.
- ❖ Kryczek, I., Wu, K., Zhao, E., Wei, S., Vatan, L., Szeliga, W., Huang, E., Greenson, J., Chang, A., Roliński, J., et al. (2011). IL-17+ regulatory T cells in the microenvironments of chronic inflammation and cancer. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 4388–4395.
- ❖ Kubach, J., Lutter, P., Bopp, T., Stoll, S., Becker, C., Huter, E., Richter, C., Weingarten, P., Warger, T., Knop, J., et al. (2007). Human CD4+CD25+ regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their anergy and suppressive function. *Blood* 110, 1550–1558.
- ❖ Kuerten, S., Lichtenegger, F.S., Faas, S., Angelov, D.N., Tary-Lehmann, M., and Lehmann, P.V. (2006). MBP-PLP fusion protein-induced EAE in C57BL/6 mice. *J. Neuroimmunol.* 177, 99–111.
- ❖ Kurko, J., Besenyei, T., Laki, J., Glant, T.T., Mikecz, K., and Szekanecz, Z. (2013). Genetics of Rheumatoid Arthritis - A Comprehensive Review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 45, 170–179.
- ❖ Kurowska-Stolarska, M., Kewin, P., Murphy, G., Russo, R.C., Stolarski, B., Garcia, C.C., Komai-Koma, M., Pitman, N., Li, Y., Niedbala, W., et al. (2008). IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 4780–4790.
- ❖ Kurowska-Stolarska, M., Stolarski, B., Kewin, P., Murphy, G., Corrigan, C.J., Ying, S., Pitman, N., Mirchandani, A., Rana, B., van Rooijen, N., et al. (2009). IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 6469–6477.
- ❖ Landré-Beauvais, A.J. (2001). The first description of rheumatoid arthritis. Unabridged text of the doctoral dissertation presented in 1800. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* 68, 130–143.
- ❖ Lee, E., Trepicchio, W.L., Oestreicher, J.L., Pittman, D., Wang, F., Chamian, F., Dhodapkar, M., and Krueger, J.G. (2004). Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris. *J. Exp. Med.* 199, 125–130.
- ❖ Lee, Y.H., Rho, Y.H., Choi, S.J., Ji, J.D., and Song, G.G. (2007). PADI4 polymorphisms and rheumatoid arthritis susceptibility: a meta-analysis. *Rheumatol. Int.* 27, 827–833.
- ❖ Lefrançais, E., Roga, S., Gautier, V., Gonzalez-de-Peredo, A., Monsarrat, B., Girard, J.-P., and Cayrol, C. (2012). IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 1673–1678.
- ❖ Lefrançais, E., Duval, A., Mirey, E., Roga, S., Espinosa, E., Cayrol, C., and Girard, J.-P. (2014). Central domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation of group-2 innate lymphoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 15502–15507.

- ❖ Leung, B.P., Xu, D., Culshaw, S., McInnes, I.B., and Liew, F.Y. (2004). A novel therapy of murine collagen-induced arthritis with soluble T1/ST2. *J Immunol* 173, 145–150.
- ❖ Li, G., Yang, Q., Zhu, Y., Gao, X., Zhang, X., Finn, O.J., and Lu, B. (2012a). IL-33 promotes type 1 cell-mediated immunity and has a potent antitumor function. *J. Immunol.* 188, 46.25.
- ❖ Li, J., Hsu, H.-C., and Mountz, J.D. (2012b). Managing macrophages in rheumatoid arthritis by reform or removal. *Curr. Rheumatol. Rep.* 14, 445–454.
- ❖ Li, M., Li, Y., Liu, X., Gao, X., and Wang, Y. (2012c). IL-33 blockade suppresses the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *J. Neuroimmunol.* 247, 25–31.
- ❖ Li, X., Kim, K.-W., Cho, M.-L., Ju, J.-H., Kang, C.-M., Oh, H.-J., Min, J.-K., Lee, S.-H., Park, S.-H., and Kim, H.-Y. (2010). IL-23 induces receptor activator of NF-kappaB ligand expression in fibroblast-like synoviocytes via STAT3 and NF-kappaB signal pathways. *Immunol. Lett.* 127, 100–107.
- ❖ Liang, B., Workman, C., Lee, J., Chew, C., Dale, B.M., Colonna, L., Flores, M., Li, N., Schweighoffer, E., Greenberg, S., et al. (2008). Regulatory T Cells Inhibit Dendritic Cells by Lymphocyte Activation Gene-3 Engagement of MHC Class II. *J. Immunol.* 180, 5916–5926.
- ❖ Lin, A.M., Rubin, C.J., Khandpur, R., Wang, J.Y., Riblett, M., Yalavarthi, S., Villanueva, E.C., Shah, P., Kaplan, M.J., and Bruce, A.T. (2011). Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 187, 490–500.
- ❖ Lin, X., Chen, M., Liu, Y., Guo, Z., He, X., Brand, D., and Zheng, S.G. (2013). Advances in distinguishing natural from induced Foxp3(+) regulatory T cells. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 6, 116–123.
- ❖ Lina, C., Conghua, W., Nan, L., and Ping, Z. (2011). Combined treatment of etanercept and MTX reverses Th1/Th2, Th17/Treg imbalance in patients with rheumatoid arthritis. *J. Clin. Immunol.* 31, 596–605.
- ❖ Lindley, S., Dayan, C.M., Bishop, A., Roep, B.O., Peakman, M., and Tree, T.I.M. (2005). Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 54, 92–99.
- ❖ Lingel, A., Weiss, T.M., Niebuhr, M., Pan, B., Appleton, B.A., Wiesmann, C., Bazan, J.F., and Fairbrother, W.J. (2009). Structure of IL-33 and its interaction with the ST2 and IL-1RAcP receptors--insight into heterotrimeric IL-1 signaling complexes. *Struct. Lond. Engl.* 1993 17, 1398–1410.
- ❖ Liu, F.-T., Goodarzi, H., and Chen, H.-Y. (2011). IgE, Mast Cells, and Eosinophils in Atopic Dermatitis. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 41, 298–310.

- ❖ Liu, W., Putnam, A.L., Xu-yu, Z., Szot, G.L., Lee, M.R., Zhu, S., Gottlieb, P.A., Kapranov, P., Gingeras, T.R., Groth, B.F. de S., et al. (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J. Exp. Med.* 203, 1701–1711.
- ❖ Liu, X., Li, M., Wu, Y., Zhou, Y., Zeng, L., and Huang, T. (2009). Anti-IL-33 antibody treatment inhibits airway inflammation in a murine model of allergic asthma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 386, 181–185.
- ❖ Lunderius-Andersson, C., Enoksson, M., and Nilsson, G. (2012). Mast Cells Respond to Cell Injury through the Recognition of IL-33. *Front. Immunol.* 3, 82.
- ❖ Lundy, S.K., Sarkar, S., Tesmer, L.A., and Fox, D.A. (2007). Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. T lymphocytes. *Arthritis Res. Ther.* 9, 202.
- ❖ Luo, Y., Zhou, Y., Xiao, W., Liang, Z., Dai, J., Weng, X., and Wu, X. (2015). Interleukin-33 ameliorates ischemic brain injury in experimental stroke through promoting Th2 response and suppressing Th17 response. *Brain Res.* 1597, 86–94.
- ❖ Lüthi, A.U., Cullen, S.P., McNeela, E.A., Duriez, P.J., Afonina, I.S., Sheridan, C., Brumatti, G., Taylor, R.C., Kersse, K., Vandenabeele, P., et al. (2009). Suppression of Interleukin-33 Bioactivity through Proteolysis by Apoptotic Caspases. *Immunity* 31, 84–98.
- ❖ MacGregor, A.J., Snieder, H., Rigby, A.S., Koskenvuo, M., Kaprio, J., Aho, K., and Silman, A.J. (2000). Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum.* 43, 30–37.
- ❖ Makrygiannakis, D., Hermansson, M., Ulfgren, A.-K., Nicholas, A.P., Zendman, A.J.W., Eklund, A., Grunewald, J., Skold, C.M., Klareskog, L., and Catrina, A.I. (2008). Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Ann. Rheum. Dis.* 67, 1488–1492.
- ❖ Marder, W., and Somers, E.C. (2014). Is pregnancy a risk factor for rheumatic autoimmune diseases? *Curr. Opin. Rheumatol.* 26, 321–328.
- ❖ Marie, J.C., Letterio, J.J., Gavin, M., and Rudensky, A.Y. (2005). TGF- β 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 201, 1061–1067.
- ❖ Martin M, and Wesche H. (2002). Summary and comparison of the signaling mechanisms of Toll/interleukin-1 receptor family. *BBA Molecular Cell Research.* 11. 265-280.
- ❖ Martin, P., Talabot-Ayer, D., Seemayer, C.A., Vigne, S., Lamacchia, C., Rodriguez, E., Finckh, A., Smith, D.E., Gabay, C., and Palmer, G. (2013). Disease severity in K/BxN serum transfer-induced arthritis is not affected by IL-33 deficiency. *Arthritis Res. Ther.* 15, R13.
- ❖ Martin, P., Palmer, G., Rodriguez, E., Woldt, E., Mean, I., Talabot-Ayer, D., James, R.W., Smith, D., Kwak, B.R., and Gabay, C. (2014). 60: Atherosclerosis severity is independent of endogenous IL-33 signaling. *Ann Rheum Dis* 2015;74:A51-A52

- ❖ Martire, D., Bonnefont, A.-L., Asnagli, H., Belmonte, N., Jourdin-Boucard, M., Rouquier, S., Mantello, A., Fall, P.B., Foussat, A., Jorgensen, C., et al. (2010). Single injection of antigen-specific regulatory Tr1 lymphocytes protects mice from severe collagen-induced arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 69, A71–A71.
- ❖ Matta BM, Lott JM, Mathews LR, Liu Q, Rosborough BR, Blazar BR, et al. (2014). IL-33 Is an Unconventional Alarmin That Stimulates IL-2 Secretion by Dendritic Cells. 193, 4010-20
- ❖ Matsuyama, Y., Okazaki, H., Hoshino, M., Onishi, S., Kamata, Y., Nagatani, K., Nagashima, T., Iwamoto, M., Yoshio, T., Ohto-Ozaki, H., et al. (2012). Sustained elevation of interleukin-33 in sera and synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis non-responsive to anti-tumor necrosis factor: possible association with persistent IL-1 β signaling and a poor clinical response. *Rheumatol. Int.* 32, 1397–1401.
- ❖ Mattozzi, C., Salvi, M., D'Epiro, S., Giancristoforo, S., Macaluso, L., Luci, C., Lal, K., Calvieri, S., and Richetta, A.G. (2013). Importance of Regulatory T Cells in the Pathogenesis of Psoriasis: Review of the Literature. *Dermatology* 227, 134–145.
- ❖ Maul, J., Loddenkemper, C., Mundt, P., Berg, E., Giese, T., Stallmach, A., Zeitz, M., and Duchmann, R. (2005). Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 128, 1868–1878.
- ❖ Mayuzumi, N., Matsushima, H., and Takashima, A. (2009). IL-33 promotes DC development in BM culture by triggering GM-CSF production. *Eur. J. Immunol.* 39, 3331–3342.
- ❖ Mchedlidze, T., Waldner, M., Zopf, S., Walker, J., Rankin, A.L., Schuchmann, M., Voehringer, D., McKenzie, A.N.J., Neurath, M.F., Pflanz, S., et al. (2013). Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis. *Immunity* 39, 357–371.
- ❖ Meehansan, J., Tsuda, H., Komine, M., Tominaga, S.-I., and Ohtsuki, M. (2012). Regulation of IL-33 expression by IFN- γ and tumor necrosis factor- α in normal human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 132, 2593–2600.
- ❖ Meehansan, J., Komine, M., Tsuda, H., Karakawa, M., Tominaga, S., and Ohtsuki, M. (2013). Expression of IL-33 in the epidermis: The mechanism of induction by IL-17. *J. Dermatol. Sci.* 71, 107–114.
- ❖ Miller, A.M. (2011). Role of IL-33 in inflammation and disease. *J. Inflamm.* 8, 22.
- ❖ Miller, A.M., Xu, D., Asquith, D.L., Denby, L., Li, Y., Sattar, N., Baker, A.H., McInnes, I.B., and Liew, F.Y. (2008). IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J Exp Med* 205, 339–346.
- ❖ Miller, A.M., Asquith, D.L., Hueber, A.J., Anderson, L.A., Holmes, W.M., McKenzie, A.N., Xu, D., Sattar, N., McInnes, I.B., and Liew, F.Y. (2010). Interleukin-33 induces protective effects in adipose tissue inflammation during obesity in mice. *Circ. Res.* 107, 650–658.
- ❖ Mjösberg, J.M., Trifari, S., Crellin, N.K., Peters, C.P., van Drunen, C.M., Piet, B., Fokkens, W.J., Cupedo, T., and Spits, H. (2011). Human IL-25- and IL-33-responsive type

2 innate lymphoid cells are defined by expression of CRTH2 and CD161. *Nat. Immunol.* 12, 1055–1062.

- ❖ Modi, S., Soejima, M., and Levesque, M.C. (2013). The effect of targeted rheumatoid arthritis therapies on anti-citrullinated protein autoantibody levels and B cell responses. *Clin. Exp. Immunol.* 173, 8–17.
- ❖ Monach, P.A., Mathis, D., and Benoist, C. (2008). The K/BxN arthritis model. *Curr. Protoc. Immunol.* Ed. John E Coligan AI Chapter 15, Unit 15.22.
- ❖ Moro, K., Yamada, T., Tanabe, M., Takeuchi, T., Ikawa, T., Kawamoto, H., Furusawa, J., Ohtani, M., Fujii, H., and Koyasu, S. (2010). Innate production of TH2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit⁺Sca-1⁺ lymphoid cells. *Nature* 463, 540–544.
- ❖ Murphy, C.A., Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W., McClanahan, T., Kastelein, R.A., Sedgwick, J.D., and Cua, D.J. (2003). Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* 198, 1951–1957.
- ❖ Nabekura, T., Girard, J.-P., and Lanier, L.L. (2015). IL-33 Receptor ST2 Amplifies the Expansion of NK Cells and Enhances Host Defense during Mouse Cytomegalovirus Infection. *J. Immunol.* 194, 5948–5952.
- ❖ Naganuma, M., Wiznerowicz, E.B., Lappas, C.M., Linden, J., Worthington, M.T., and Ernst, P.B. (2006). Cutting edge: Critical role for A2A adenosine receptors in the T cell-mediated regulation of colitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177, 2765–2769.
- ❖ Nakae, S., Saijo, S., Horai, R., Sudo, K., Mori, S., and Iwakura, Y. (2003). IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 5986–5990.
- ❖ Naldi, L., Chatenoud, L., Linder, D., Belloni Fortina, A., Peserico, A., Virgili, A.R., Bruni, P.L., Ingordo, V., Scocco, G.L., Solaroli, C., et al. (2005). Cigarette Smoking, Body Mass Index, and Stressful Life Events as Risk Factors for Psoriasis: Results from an Italian Case–Control Study. *J. Invest. Dermatol.* 125, 61–67.
- ❖ Nandakumar, K.S., and Holmdahl, R. (2006). Antibody-induced arthritis: disease mechanisms and genes involved at the effector phase of arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 8, 223.
- ❖ Nedoszytko, B., Sokołowska-Wojdyło, M., Ruckemann-Dziurdzińska, K., Roszkiewicz, J., and Nowicki, R.J. (2014). Chemokines and cytokines network in the pathogenesis of the inflammatory skin diseases: atopic dermatitis, psoriasis and skin mastocytosis. *Postępy Dermatol. Alergol.* 31, 84–91.
- ❖ Nestle, F.O., Conrad, C., Tun-Kyi, A., Homey, B., Gombert, M., Boyman, O., Burg, G., Liu, Y.-J., and Gilliet, M. (2005). Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon- α production. *J. Exp. Med.* 202, 135–143.
- ❖ Ngoi, S.M., St Rose, M.-C., Menoret, A.M., Smith, D.E., Tovey, M.G., Adler, A.J., and Vella, A.T. (2012). Presensitizing with a Toll-like receptor 3 ligand impairs CD8 T-cell

- effector differentiation and IL-33 responsiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 10486–10491.
- ❖ Niedbala, W., Wei, X.-Q., Cai, B., Hueber, A.J., Leung, B.P., McInnes, I.B., and Liew, F.Y. (2007). IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur. J. Immunol.* 37, 3021–3029.
 - ❖ Nijenhuis, S., Zendman, A.J.W., Vossenaar, E.R., Pruijn, G.J.M., and vanVenrooij, W.J. (2004). Autoantibodies to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis: clinical performance and biochemical aspects of an RA-specific marker. *Clin. Chim. Acta* 350, 17–34.
 - ❖ Nishikawa, H., and Sakaguchi, S. (2010). Regulatory T cells in tumor immunity. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 127, 759–767.
 - ❖ Nishimoto, N., Sasai, M., Shima, Y., Nakagawa, M., Matsumoto, T., Shirai, T., Kishimoto, T., and Yoshizaki, K. (2000). Improvement in Castleman’s disease by humanized anti-interleukin-6 receptor antibody therapy. *Blood* 95, 56–61.
 - ❖ Niu, X., and Chen, G. (2014). Clinical Biomarkers and Pathogenic-Related Cytokines in Rheumatoid Arthritis. *J. Immunol. Res.* 2014.
 - ❖ Oboki, K., Ohno, T., Kajiwara, N., Arae, K., Morita, H., Ishii, A., Nambu, A., Abe, T., Kiyonari, H., Matsumoto, K., et al. (2010). IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 18581–18586.
 - ❖ Olson, B.M., Sullivan, J.A., and Burlingham, W.J. (2013). Interleukin 35: a key mediator of suppression and the propagation of infectious tolerance. *Front. Immunol.* 4, 315.
 - ❖ Otero, M., and Goldring, M.B. (2007). Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. *Chondrocytes. Arthritis Res. Ther.* 9, 220.
 - ❖ Palmer, G., Talabot-Ayer, D., Lamacchia, C., Toy, D., Seemayer, C.A., Viatte, S., Finckh, A., Smith, D.E., and Gabay, C. (2009). Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis. *Arthritis Rheum.* 60, 738–749.
 - ❖ Palomares, O., Martín-Fontecha, M., Lauener, R., Traidl-Hoffmann, C., Cavkaytar, O., Akdis, M., and Akdis, C.A. (2014). Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF- β . *Genes Immun.* 15, 511–520.
 - ❖ Panayi, G.S., Lanchbury, J.S., and Kingsley, G.H. (1992). The importance of the T cell in initiating and maintaining the chronic synovitis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 35, 729–735.
 - ❖ Parisi, R., Symmons, D.P.M., Griffiths, C.E.M., and Ashcroft, D.M. (2013). Global Epidemiology of Psoriasis: A Systematic Review of Incidence and Prevalence. *J. Invest. Dermatol.* 133, 377–385.
 - ❖ Pastorelli, L., Garg, R.R., Hoang, S.B., Spina, L., Mattioli, B., Scarpa, M., Fiocchi, C., Vecchi, M., and Pizarro, T.T. (2010). Epithelial-derived IL-33 and its receptor ST2 are

dysregulated in ulcerative colitis and in experimental Th1/Th2 driven enteritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 8017–8022.

- ❖ Pecaric-Petkovic, T., Didichenko, S.A., Kaempfer, S., Spiegl, N., and Dahinden, C.A. (2009). Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. *Blood* 113, 1526–1534.
- ❖ Perera, G.K., Di Meglio, P., and Nestle, F.O. (2012). Psoriasis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 7, 385–422.
- ❖ Peres, R.S., Liew, F.Y., Talbot, J., Carregaro, V., Oliveira, R.D., Almeida, S.L., França, R.F.O., Donate, P.B., Pinto, L.G., Ferreira, F.I.S., et al. (2015). Low expression of CD39 on regulatory T cells as a biomarker for resistance to methotrexate therapy in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 2509–2514.
- ❖ Peterson, R.A. (2012). Regulatory T-Cells: Diverse Phenotypes Integral to Immune Homeostasis and Suppression. *Toxicol. Pathol.* 40, 186–204.
- ❖ Pichery, M., Mirey, E., Mercier, P., Lefrancais, E., Dujardin, A., Ortega, N., and Girard, J.-P. (2012). Endogenous IL-33 Is Highly Expressed in Mouse Epithelial Barrier Tissues, Lymphoid Organs, Brain, Embryos, and Inflamed Tissues: In Situ Analysis Using a Novel Il-33–LacZ Gene Trap Reporter Strain. *J. Immunol.* 188, 3488–3495.
- ❖ 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.
- ❖ Pinegin, B., Vorobjeva, N., and Pinegin, V. (2015). Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.*
- ❖ Polumuri, S.K., Jayakar, G.G., Shirey, K.A., Roberts, Z.J., Perkins, D.J., Pitha, P.M., and Vogel, S.N. (2012). Transcriptional Regulation of Murine IL-33 by TLR and Non-TLR Agonists. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 189, 50–60.
- ❖ Pope, R.M., and Shahrara, S. (2013). Possible roles of IL-12-family cytokines in rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 9, 252–256.
- ❖ Préfontaine, D., Lajoie-Kadoch, S., Foley, S., Audusseau, S., Olivenstein, R., Halayko, A.J., Lemièrre, C., Martin, J.G., and Hamid, Q. (2009). Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 183, 5094–5103.
- ❖ Prete, M., Racanelli, V., Digiglio, L., Vacca, A., Dammacco, F., and Perosa, F. (2011). Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis: An update. *Autoimmun. Rev.* 11, 123–131.
- ❖ Price, A.E., Liang, H.-E., Sullivan, B.M., Reinhardt, R.L., Eisley, C.J., Erle, D.J., and Locksley, R.M. (2010). Systemically dispersed innate IL-13–expressing cells in type 2 immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 11489–11494.

- ❖ Pullen, A.M., Marrack, P., and Kappler, J.W. (1988). The T-cell repertoire is heavily influenced by tolerance to polymorphic self-antigens. *Nature* 335, 796–801.
- ❖ Pushparaj, P.N., Li, D., Komai-Koma, M., Guabiraba, R., Alexander, J., McSharry, C., and Xu, D. (2013). Interleukin-33 exacerbates acute colitis via interleukin-4 in mice. *Immunology* 140, 70–77.
- ❖ Quattrocchi, E., Dallman, M.J., and Feldmann, M. (2000). Adenovirus-mediated gene transfer of CTLA-4Ig fusion protein in the suppression of experimental autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum.* 43, 1688–1697.
- ❖ Reparon-Schuijt, C.C., van Esch, W.J., van Kooten, C., Schellekens, G.A., de Jong, B.A., van Venrooij, W.J., Breedveld, F.C., and Verweij, C.L. (2001). Secretion of anti-citrulline-containing peptide antibody by B lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 44, 41–47.
- ❖ Ray, N.B., Nieva, D.R.C., Seftor, E.A., Khalkhali-Ellis, Z., and Naides, S.J. (2001). Induction of an invasive phenotype by human parvovirus B19 in normal human synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 44, 1582–1586.
- ❖ Raychaudhuri, S.K., and Raychaudhuri, S.P. (2010). SCID mouse model of psoriasis: a unique tool for drug development of autoreactive t-cell and th-17 cell-mediated autoimmune diseases. *Indian J. Dermatol.* 55, 157–160.
- ❖ Rezvani, K., Mielke, S., Ahmadzadeh, M., Kilical, Y., Savani, B.N., Zeilah, J., Keyvanfar, K., Montero, A., Hensel, N., Kurlander, R., et al. (2006). High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT. *Blood* 108, 1291–1297.
- ❖ Richetta, A.G., Mattozzi, C., Salvi, M., Giancristoforo, S., D'epiro, S., Milana, B., Carboni, V., Zampetti, M., Calvieri, S., and Morrone, S. (2011). CD4+ CD25+ T-regulatory cells in psoriasis. Correlation between their numbers and biologics-induced clinical improvement. *Eur. J. Dermatol.* EJD 21, 344–348.
- ❖ Rinaudo-Gaujous, M., Adeline Moreau, Vincent Blasco-Baque, Xavier Roblin, Christian Genin, Thierry Thomas, Stéphane Paul and Hubert Marotte (2013). Evaluation Of Porphyromona Gingivalis Serology In Rheumatoid Arthritis and Non-Rheumatoid Inflammatory Disease. *Ann Rheum Dis.* 73, A73
- ❖ Ring, S., Pushkarevskaya, A., Schild, H., Probst, H.C., Jendrossek, V., Wirsdörfer, F., Ledent, C., Robson, S.C., Enk, A.H., and Mahnke, K. (2015). Regulatory T Cell-Derived Adenosine Induces Dendritic Cell Migration through the Epac-Rap1 Pathway. *J. Immunol.* 194, 3735–3744.
- ❖ Roussel, L., Erard, M., Cayrol, C., and Girard, J.-P. (2008). Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A-H2B acidic pocket. *EMBO Rep.* 9, 1006–1012.
- ❖ Roux, C.H., Saraux, A., Le Bihan, E., Fardellone, P., Guggenbuhl, P., Fautrel, B., Masson, C., Chary-Valckenaere, I., Cantagrel, A., Juvin, R., et al. (2007). Rheumatoid arthritis and

- spondyloarthropathies: geographical variations in prevalence in France. *J. Rheumatol.* 34, 117–122.
- ❖ Saidenberg-Kermanac'h, N., Cohen-Solal, M., Bessis, N., De Vernejoul, M.-C., and Boissier, M.-C. (2004). Role for osteoprotegerin in rheumatoid inflammation. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* 71, 9–13.
 - ❖ Saidi, S., Bouri, F., Lencel, P., Duplomb, L., Baud'huin, M., Delplace, S., Leterme, D., Miellot, F., Heymann, D., Hardouin, P., et al. (2011). IL-33 is expressed in human osteoblasts, but has no direct effect on bone remodeling. *Cytokine* 53, 347–354.
 - ❖ Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008). Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell* 133, 775–787.
 - ❖ Salimi, M., Barlow, J.L., Saunders, S.P., Xue, L., Gutowska-Owsiak, D., Wang, X., Huang, L.-C., Johnson, D., Scanlon, S.T., McKenzie, A.N.J., et al. (2013). A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *J. Exp. Med.* 210, 2939–2950.
 - ❖ Sarris, M., Andersen, K.G., Randow, F., Mayr, L., and Betz, A.G. (2008). Neuropilin-1 Expression on Regulatory T Cells Enhances Their Interactions with Dendritic Cells during Antigen Recognition. *Immunity* 28, 402–413.
 - ❖ Sattler, S., Ling, G.-S., Xu, D., Hussaarts, L., Romaine, A., Zhao, H., Fossati-Jimack, L., Malik, T., Cook, H.T., Botto, M., et al. (2014). IL-10-producing regulatory B cells induced by IL-33 (Breg(IL-33)) effectively attenuate mucosal inflammatory responses in the gut. *J. Autoimmun.* 50, 107–122..
 - ❖ Savinko, T., Matikainen, S., Saarialho-Kere, U., Lehto, M., Wang, G., Lehtimäki, S., Karisola, P., Reunala, T., Wolff, H., Lauerma, A., et al. (2012). IL-33 and ST2 in atopic dermatitis: expression profiles and modulation by triggering factors. *J. Invest. Dermatol.* 132, 1392–1400.
 - ❖ Schiering, C., Krausgruber, T., Chomka, A., Fröhlich, A., Adelman, K., Wohlfert, E.A., Pott, J., Griseri, T., Bollrath, J., Hegazy, A.N., et al. (2014). The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. *Nature* 513, 564–568.
 - ❖ Schmidt, A., Oberle, N., and Krammer, P.H. (2012). Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Front. Immunol.* 3, 51.
 - ❖ Schmitt, E.G., and Williams, C.B. (2013). Generation and Function of Induced Regulatory T Cells. *Front. Immunol.* 4.
 - ❖ Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T.K., Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., et al. (2005). IL-33, an Interleukin-1-like Cytokine that Signals via the IL-1 Receptor-Related Protein ST2 and Induces T Helper Type 2-Associated Cytokines. *Immunity* 23, 479–490.
 - ❖ Schneider, M.A., Meingassner, J.G., Lipp, M., Moore, H.D., and Rot, A. (2007). CCR7 is required for the in vivo function of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 204, 735–745.

- ❖ Schulze, J., Bickert, T., Beil, F.T., Zaiss, M.M., Albers, J., Wintges, K., Streichert, T., Klaetschke, K., Keller, J., Hissnauer, T.-N., et al. (2011). Interleukin-33 is expressed in differentiated osteoblasts and blocks osteoclast formation from bone marrow precursor cells. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 26, 704–717.
- ❖ Schulze-Koops, H., and Kalden, J.R. (2001). The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 15, 677–691.
- ❖ Scott, D.L., Wolfe, F., and Huizinga, T.W. (2010). Rheumatoid arthritis. *The Lancet* 376, 1094–1108.
- ❖ Sedhom, M.A.K., Pichery, M., Murdoch, J.R., Foligné, B., Ortega, N., Normand, S., Mertz, K., Sanmugalingam, D., Brault, L., Grandjean, T., et al. (2013). Neutralisation of the interleukin-33/ST2 pathway ameliorates experimental colitis through enhancement of mucosal healing in mice. *Gut* 62, 1714–1723.
- ❖ Sellebjerg, F., Krakauer, M., Khademi, M., Olsson, T., and Sørensen, P.S. (2012). FOXP3, CBLB and ITCH gene expression and cytotoxic T lymphocyte antigen 4 expression on CD4(+) CD25(high) T cells in multiple sclerosis. *Clin. Exp. Immunol.* 170, 149–155.
- ❖ Shevach, E.M. (2009). Mechanisms of Foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated Suppression. *Immunity* 30, 636–645.
- ❖ Shimosato, T., Fujimoto, M., Tohno, M., Sato, T., Tateo, M., Otani, H., and Kitazawa, H. (2010). CpG oligodeoxynucleotides induce strong up-regulation of interleukin 33 via Toll-like receptor 9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 394, 81–86.
- ❖ Simpson, T.R., Li, F., Montalvo-Ortiz, W., Sepulveda, M.A., Bergerhoff, K., Arce, F., Roddie, C., Henry, J.Y., Yagita, H., Wolchok, J.D., et al. (2013). Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J. Exp. Med.* 210, 1695–1710.
- ❖ Smithgall, M.D., Comeau, M.R., Yoon, B.-R.P., Kaufman, D., Armitage, R., and Smith, D.E. (2008). IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *Int. Immunol.* 20, 1019–1030.
- ❖ Sojka, D.K., and Fowell, D.J. (2011). Regulatory T cells inhibit acute IFN- γ synthesis without blocking T-helper cell type 1 (Th1) differentiation via a compartmentalized requirement for IL-10. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 18336–18341.
- ❖ Spits, H., and Di Santo, J.P. (2011). The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat. Immunol.* 12, 21–27.
- ❖ Stamp, L.K., James, M.J., and Cleland, L.G. (2004). Interleukin-17: the missing link between T-cell accumulation and effector cell actions in rheumatoid arthritis? *Immunol. Cell Biol.* 82, 1–9.
- ❖ Stanford, S.M., and Bottini, N. (2014). PTPN22: the archetypal non-HLA autoimmunity gene. *Nat. Rev. Rheumatol.* 10, 602–611.

- ❖ Sugiyama, H., Gyulai, R., Toichi, E., Garaczi, E., Shimada, S., Stevens, S.R., McCormick, T.S., and Cooper, K.D. (2005). Dysfunctional blood and target tissue CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 164–173.
- ❖ Sundnes, O., Pietka, W., Loos, T., Sponheim, J., Rankin, A.L., Pflanz, S., Bertelsen, V., Sitek, J.C., Hol, J., Haraldsen, G., et al. (2015). Epidermal Expression and Regulation of Interleukin-33 during Homeostasis and Inflammation: Strong Species Differences. *J. Invest. Dermatol.* 135, 1771–1780.
- ❖ Suzukawa, M., Iikura, M., Koketsu, R., Nagase, H., Tamura, C., Komiya, A., Nakae, S., Matsushima, K., Ohta, K., Yamamoto, K., et al. (2008). An IL-1 cytokine member, IL-33, induces human basophil activation via its ST2 receptor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 5981–5989.
- ❖ Szanya, V., Ermann, J., Taylor, C., Holness, C., and Fathman, C.G. (2002). The Subpopulation of CD4⁺CD25⁺ Splenocytes That Delays Adoptive Transfer of Diabetes Expresses L-Selectin and High Levels of CCR7. *J. Immunol.* 169, 2461–2465.
- ❖ Tai, X., Cowan, M., Feigenbaum, L., and Singer, A. (2005). CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat. Immunol.* 6, 152–162.
- ❖ Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T.W., and Sakaguchi, S. (2000). Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* 192, 303–310.
- ❖ Takahashi, Y., Murai, C., Shibata, S., Munakata, Y., Ishii, T., Ishii, K., Saitoh, T., Sawai, T., Sugamura, K., and Sasaki, T. (1998). Human parvovirus B19 as a causative agent for rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 8227–8232.
- ❖ Talabot-Ayer, D., Martin, P., Seemayer, C.A., Vigne, S., Lamacchia, C., Finckh, A., Saiji, E., Gabay, C., and Palmer, G. (2014). Immune-mediated experimental arthritis in IL-33 deficient mice. *Cytokine* 69, 68–74.
- ❖ Talabot-Ayer, D., Martin, P., Vesin, C., Seemayer, C.A., Vigne, S., Gabay, C., and Palmer, G. (2015). Severe neutrophil-dominated inflammation and enhanced myelopoiesis in IL-33-overexpressing CMV/IL33 mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 194, 750–760.
- ❖ Tang, S., Huang, H., Hu, F., Zhou, W., Guo, J., Jiang, H., Mu, R., and Li, Z. (2013). Increased IL-33 in Synovial Fluid and Paired Serum Is Associated with Disease Activity and Autoantibodies in Rheumatoid Arthritis. *J. Immunol. Res.* 2013, e985301.
- ❖ Tarbell, K.V., Yamazaki, S., Olson, K., Toy, P., and Steinman, R.M. (2004). CD25⁺ CD4⁺ T Cells, Expanded with Dendritic Cells Presenting a Single Autoantigenic Peptide, Suppress Autoimmune Diabetes. *J. Exp. Med.* 199, 1467–1477.
- ❖ Thiolat, A., Denys, A., Petit, M., Biton, J., Lemeiter, D., Herve, R., Lutowski, D., Boissier, M.-C., and Bessis, N. (2014a). Interleukin-35 gene therapy exacerbates experimental rheumatoid arthritis in mice. *Cytokine* 69, 87–93.

- ❖ Thiolat, A., Semerano, L., Pers, Y.M., Biton, J., Lemeiter, D., Portales, P., Quentin, J., Jorgensen, C., Decker, P., Boissier, M.-C., et al. (2014b). Interleukin-6 receptor blockade enhances CD39⁺ regulatory T cell development in rheumatoid arthritis and in experimental arthritis. *Arthritis Rheumatol.* Hoboken NJ 66, 273–283.
- ❖ Tone, Y., Furuuchi, K., Kojima, Y., Tykocinski, M.L., Greene, M.I., and Tone, M. (2008). Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat. Immunol.* 9, 194–202.
- ❖ Toussirot, É., and Roudier, J. (2007). Relations physiopathologiques polyarthrite rhumatoïde et virus d'Epstein-Barr : état des lieux. *Rev. Rhum.* 74, 814–823.
- ❖ Tsuchiya, T., Ohshima, K., Karube, K., Yamaguchi, T., Suefuji, H., Hamasaki, M., Kawasaki, C., Suzumiya, J., Tomonaga, M., and Kikuchi, M. (2004). Th1, Th2, and activated T-cell marker and clinical prognosis in peripheral T-cell lymphoma, unspecified: comparison with AILD, ALCL, lymphoblastic lymphoma, and ATLL. *Blood* 103, 236–241.
- ❖ Turnquist, H.R., Zhao, Z., Rosborough, B.R., Liu, Q., Castellaneta, A., Isse, K., Wang, Z., Lang, M., Stolz, D.B., Zheng, X.X., et al. (2011). IL-33 expands suppressive CD11b⁺ Gr-1(int) and regulatory T cells, including ST2L⁺ Foxp3⁺ cells, and mediates regulatory T cell-dependent promotion of cardiac allograft survival. *J. Immunol.* Baltim. Md 1950 187, 4598–4610.
- ❖ Vasanthi, P., Nalini, G., and Rajasekhar, G. (2007). Role of tumor necrosis factor-alpha in rheumatoid arthritis: a review. *APLAR J. Rheumatol.* 10, 270–274.
- ❖ Venken, K., Hellings, N., Hensen, K., Rummens, J.-L., Medaer, R., D'hooghe, M.B., Dubois, B., Raus, J., and Stinissen, P. (2006). Secondary progressive in contrast to relapsing-remitting multiple sclerosis patients show a normal CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell function and FOXP3 expression. *J. Neurosci. Res.* 83, 1432–1446.
- ❖ Verri, W.A., Souto, F.O., Vieira, S.M., Almeida, S.C.L., Fukada, S.Y., Xu, D., Alves-Filho, J.C., Cunha, T.M., Guerrero, A.T.G., Mattos-Guimaraes, R.B., et al. (2010). IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy. *Ann. Rheum. Dis.* 69, 1697–1703.
- ❖ Vignali, D.A.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 523–532.
- ❖ Volarevic, V., Mitrovic, M., Milovanovic, M., Zelen, I., Nikolic, I., Mitrovic, S., Pejnovic, N., Arsenijevic, N., and Lukic, M.L. (2012). Protective role of IL-33/ST2 axis in Con A-induced hepatitis. *J Hepatol* 56, 26–33.
- ❖ Wang, W., Shao, S., Jiao, Z., Guo, M., Xu, H., and Wang, S. (2011a). The Th17/Treg imbalance and cytokine environment in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* 32, 887–893.

- ❖ Wang, Y., Liu, X.P., Zhao, Z.B., Chen, J.H., and Yu, C.G. (2011b). Expression of CD4+ forkhead box P3 (FOXP3)+ regulatory T cells in inflammatory bowel disease. *J. Dig. Dis.* 12, 286–294.
- ❖ Watanabe, K., Rao, V.P., Poutahidis, T., Rickman, B.H., Ohtani, M., Xu, S., Rogers, A.B., Ge, Z., Horwitz, B.H., Fujioka, T., et al. (2008). Cytotoxic-T-lymphocyte-associated antigen 4 blockade abrogates protection by regulatory T cells in a mouse model of microbially induced innate immune-driven colitis. *Infect. Immun.* 76, 5834–5842.
- ❖ Weiner, H.L., da Cunha, A.P., Quintana, F., and Wu, H. (2011). Oral tolerance. *Immunol. Rev.* 241, 241–259.
- ❖ Wildin, R.S., Ramsdell, F., Peake, J., Faravelli, F., Casanova, J.L., Buist, N., Levy-Lahad, E., Mazzella, M., Goulet, O., Perroni, L., et al. (2001). X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat. Genet.* 27, 18–20.
- ❖ Williams, R.O., Feldmann, M., and Maini, R.N. (1992). Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 9784–9788.
- ❖ Wilson, J.M., Ross, W.G., Agbai, O.N., Frazier, R., Figler, R.A., Rieger, J., Linden, J., and Ernst, P.B. (2009). The A2B adenosine receptor impairs the maturation and immunogenicity of dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 4616–4623.
- ❖ Wolk, K., Kunz, S., Witte, E., Friedrich, M., Asadullah, K., and Sabat, R. (2004). IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 21, 241–254.
- ❖ Wolk, K., Witte, E., Wallace, E., Döcke, W.-D., Kunz, S., Asadullah, K., Volk, H.-D., Sterry, W., and Sabat, R. (2006). IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur. J. Immunol.* 36, 1309–1323.
- ❖ Wolterink, R.G.J.K., KleinJan, A., van Nimwegen, M., Bergen, I., de Bruijn, M., Levani, Y., and Hendriks, R.W. (2012). Pulmonary innate lymphoid cells are major producers of IL-5 and IL-13 in murine models of allergic asthma. *Eur. J. Immunol.* 42, 1106–1116.
- ❖ Wood, I.S., Wang, B., and Trayhurn, P. (2009). IL-33, a recently identified interleukin-1 gene family member, is expressed in human adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 384, 105–109.
- ❖ Wright, H.L., Moots, R.J., and Edwards, S.W. (2014). The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 10, 593–601.
- ❖ Xu, D., Jiang, H.-R., Kewin, P., Li, Y., Mu, R., Fraser, A.R., Pitman, N., Kurowska-Stolarska, M., McKenzie, A.N.J., McInnes, I.B., et al. (2008). IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 10913–10918.

- ❖ Yan, K.-X., Fang, X., Han, L., Zhang, Z.-H., Kang, K.-F., Zheng, Z.-Z., and Huang, Q. (2010). Foxp3⁺ regulatory T cells and related cytokines differentially expressed in plaque vs. guttate psoriasis vulgaris. *Br. J. Dermatol.* 163, 48–56.
- ❖ Yan, Y., Zhang, G.-X., Gran, B., Fallarino, F., Yu, S., Li, H., Cullimore, M.L., Rostami, A., and Xu, H. (2010). IDO upregulates regulatory T cells via tryptophan catabolite and suppresses encephalitogenic T cell responses in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 5953–5961.
- ❖ Yanagawa, Y., Suzuki, M., Matsumoto, M., and Togashi, H. (2011). Prostaglandin E2 enhances IL-33 production by dendritic cells. *Immunol. Lett.* 141, 55–60.
- ❖ Yasuoka, S., Kawanokuchi, J., Parajuli, B., Jin, S., Doi, Y., Noda, M., Sonobe, Y., Takeuchi, H., Mizuno, T., and Suzumura, A. (2011). Production and functions of IL-33 in the central nervous system. *Brain Res.* 1385, 8–17.
- ❖ Youn, J.-I., Nagaraj, S., Collazo, M., and Gabrilovich, D.I. (2008). Subsets of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor-Bearing Mice. *J. Immunol.* 181, 5791–5802.
- ❖ Yuan, X., and Malek, T.R. (2012). Cellular and molecular determinants for the development of natural and induced regulatory T cells. *Hum. Immunol.* 73, 773–782.
- ❖ Yudoh, K., Matsuno, H., Nakazawa, F., Yonezawa, T., and Kimura, T. (2000). Reduced expression of the regulatory CD4⁺ T cell subset is related to Th1/Th2 balance and disease severity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 43, 617–627.
- ❖ Zaba, L.C., Fuentes-Duculan, J., Eungdamrong, N.J., Abello, M.V., Novitskaya, I., Pierson, K.C., Gonzalez, J., Krueger, J.G., and Lowes, M.A. (2009). Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* 129, 79–88.
- ❖ Zaiss, M.M., Kurowska-Stolarska, M., Bohm, C., Gary, R., Scholtysek, C., Stolarski, B., Reilly, J., Kerr, S., Millar, N.L., Kamradt, T., et al. (2011). IL-33 shifts the balance from osteoclast to alternatively activated macrophage differentiation and protects from TNF-alpha-mediated bone loss. *J Immunol* 186, 6097–6105.
- ❖ Zarek, P.E., Huang, C.-T., Lutz, E.R., Kowalski, J., Horton, M.R., Linden, J., Drake, C.G., and Powell, J.D. (2008). A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood* 111, 251–259.
- ❖ Zdravkovic, N., Shahin, A., Arsenijevic, N., Lukic, M.L., and Mensah-Brown, E.P.K. (2009). Regulatory T cells and ST2 signaling control diabetes induction with multiple low doses of streptozotocin. *Mol. Immunol.* 47, 28–36.
- ❖ Zdravkovic, N., Pavlovic, S., Zdravkovic, V., Pejnovic, N., Arsenijevic, N., and Lukic, M.L. (2013). ST2 gene-deletion reveals a role of Foxp3⁺ regulatory T cells in diabetes modulation in BALB/c mice. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* 161, 118–129.
- ❖ Zhang, K., Li, X., Yin, G., Liu, Y., Niu, X., and Hou, R. (2008). Functional characterization of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells differentiated in vitro from bone

marrow-derived haematopoietic cells of psoriasis patients with a family history of the disorder. *Br. J. Dermatol.* 158, 298–305.

- ❖ Zhang, L., Yang, X.-Q., Cheng, J., Hui, R.-S., and Gao, T.-W. (2010). Increased Th17 cells are accompanied by FoxP3(+) Treg cell accumulation and correlated with psoriasis disease severity. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 135, 108–117.
- ❖ Zhang, L., Lu, R., Zhao, G., Pflugfelder, S.C., and Li, D.-Q. (2011). TLR-mediated induction of pro-allergic cytokine IL-33 in ocular mucosal epithelium. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 1383–1391.
- ❖ Zheng, Y., Danilenko, D.M., Valdez, P., Kasman, I., Eastham-Anderson, J., Wu, J., and Ouyang, W. (2007). Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 445, 648–651.
- ❖ Zou, W. (2006). Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 295–307.

ANNEXE

III ARTICLE n°3

Personality traits modulate responses of CD4+ regulatory and effector T cells to socially induced stress in a wild-type rodent

Marylin Rangassamy*, Sara Khaleghparast Athari*, Raquel Monclús, Marie-Christophe Boissier, Natacha Bessis, Heiko G. Rödel

* Both authors contributed equally to this paper.

Article en cours de rédaction

Au cours de ma thèse, nous avons aussi participé à des travaux visant à étudier les relations entre le stress et le système immunitaire.

Le stress est l'ensemble des réponses d'un organisme soumis à des pressions ou contraintes de la part de son environnement. Ce mécanisme existe sous deux formes, aigüe et chronique. Ce dernier est la réponse du système nerveux aux événements déplaisants d'une période prolongée au cours de laquelle un individu n'a aucun contrôle. Cela inclut une réponse du système endocrinien avec une libération de corticostéroïdes, hormones du stress, par l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA). Dans ce sens, l'exposition à long terme des hormones du stress en cas de stress chronique inhibe le système immunitaire ou le rend moins efficace en termes de résistance aux agents pathogènes. En conséquence, le stress chronique peut jouer un rôle important dans l'apparition de pathologies comme les maladies infectieuses ou les cancers (Glaser et al., 1999).

Les études précédentes ont mis en évidence une relation entre le stress et les réponses immunitaires humorale et cellulaire chez l'homme (Buske-Kirschbaum et al., 2002, Schmid-Ott et al., 2001). Cet effet du stress est lié à la personnalité des individus qui caractérise la façon de réagir au stress. Cependant, les mécanismes exacts reliant la fonction immunitaire et le comportement ou la personnalité individuelle ne sont pas clairs.

Plusieurs études chez les animaux de laboratoire dont les souches sont consanguines montrent une association entre les différences de caractère et l'immunosuppression liée au stress (Sandi et al., 1991, Stefanski and Engler, 1998). En revanche, ces souches sont fortement sélectionnées de façon à ce qu'elles soient plus soumises et moins agressives. Cela réduit donc les variations de personnalité entre les individus par rapport aux animaux sauvages de la même espèce (Koolhaas,

2008). Dans ce cas, l'utilisation de la variation naturelle de la personnalité chez les animaux de type sauvage est nécessaire afin d'obtenir les résultats plus proches de la réalité.

L'objectif de notre travail a été d'étudier l'effet du stress chronique social sur le système immunitaire et sa relation avec la personnalité des individus.

Pour cela, nous avons confronté une souris d'une souche sauvage (*Mus spicilegus*) ayant une forte variation de personnalité (Rangassamy et al., 2015) avec un couple de souris résident de la même souche dans une cage pendant 30 minutes pendant 6 jours consécutifs. Ensuite, nous avons étudié différents paramètres du système immunitaire de la souris confrontée au stress.

Nous avons identifié deux critères de la personnalité tels que la néophobie et l'anxiété chez cette souche de souris. Nous avons observé une diminution du pourcentage des lymphocytes $CD4^+$ et T effecteurs dans la rate des souris plus anxieuses ou plus néophobes soumises à la confrontation sociale par rapport aux souris moins anxieuses ou néophobes. Cette diminution a été liée à une augmentation des Tregs dans la rate et le sang des souris plus anxieuses ou plus néophobes confrontées avec le stress social.

En résumé, nos résultats suggèrent l'effet immunosuppresseur de stress chronique social chez les individus plus anxieux et néophobes et l'importance de différences de personnalité pour établir des réponses physiologiques chez les individus.

RESULTATS

Dependent variables	Treatment	N	Neophobia score		Anxiety score	
			Z	P	Z	P
% CD4 ⁺ in blood	Control	23	-0.76	0.46	-0.46	0.66
	Social confrontation	25	0.87	0.40	1.24	0.23
% CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ effector T cells in blood	Control	23	-1.60	0.12	-0.41	0.69
	Social confrontation	25	0.99	0.33	1.34	0.18
% CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ regulatory T cells in blood	Control	23	-0.30	0.76	-0.65	0.53
	Social confrontation	25	-2.18	0.027	-2.16	0.029
Ratio T _{eff} /T _{reg} among CD4 ⁺ in blood	Control	13	-1.02	0.45	-0.07	0.91
	Social confrontation	15	2.16	0.009	2.21	0.009
% CD8 ⁺ in blood	Control	19	0.15	0.89	-0.29	0.78
	Social confrontation	22	-0.96	0.35	0.79	0.46
% CD19 B cells in blood	Control	21	-0.78	0.45	0.34	0.74
	Social confrontation	23	0.72	0.55	-1.05	0.31
% Neutrophils in blood	Control	11	-0.31	0.79	-1.62	0.092
	Social confrontation	18	0.40	0.96	-1.27	0.22
% Monocytes in blood	Control	11	-0.41	0.80	-1.50	0.11
	Social confrontation	19	0.02	0.99	-1.68	0.090
% CD4 ⁺ among splenocytes	Control	24	0.47	0.65	0.37	0.73
	Social confrontation	25	2.26	0.018	2.32	0.018
% CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ effector T cells among splenocytes	Control	23	0.03	0.98	0.95	0.35
	Social confrontation	24	2.16	0.029	2.65	0.006
% CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ regulatory T cells among splenocytes	Control	23	-0.72	0.47	-0.75	0.46
	Social confrontation	24	-2.45	0.013	-1.88	0.058
Ratio T _{eff} /T _{reg} in splenocytes	Control	15	-0.68	0.53	0.54	0.60
	Social confrontation	14	2.38	0.006	2.22	0.013
% CD8 ⁺ among splenocytes	Control	23	0.29	0.78	-0.46	0.67
	Social confrontation	23	-1.35	0.18	0.17	0.87
% CD19 B cells among splenocytes	Control	24	0.26	0.81	-1.44	0.15
	Social confrontation	25	-0.42	0.43	-0.39	0.70

Table1

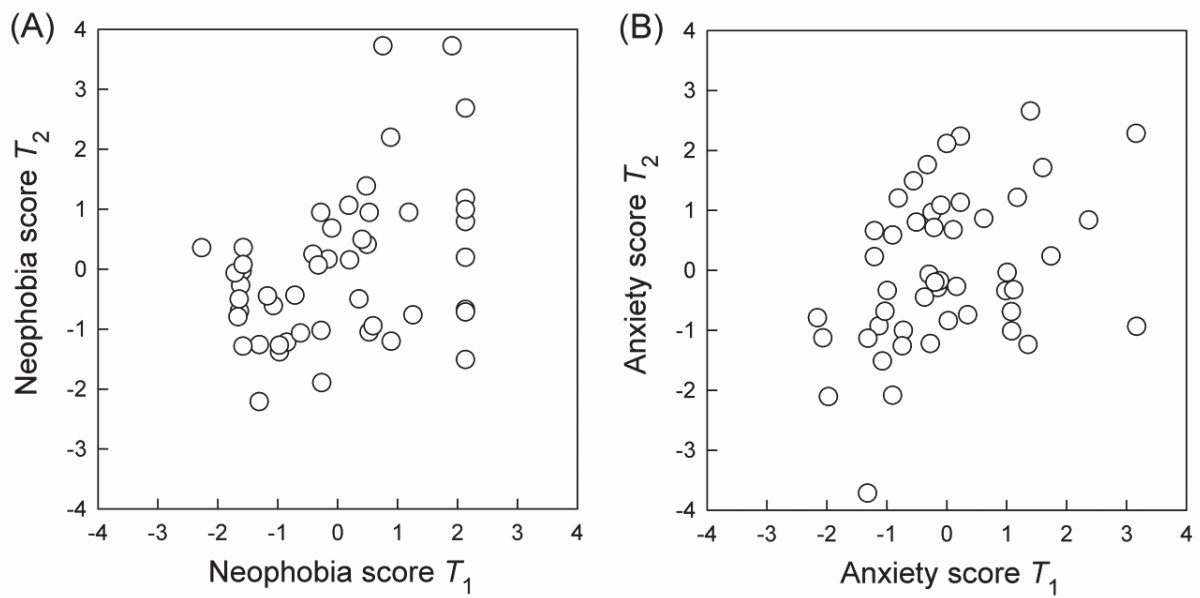


Figure 1

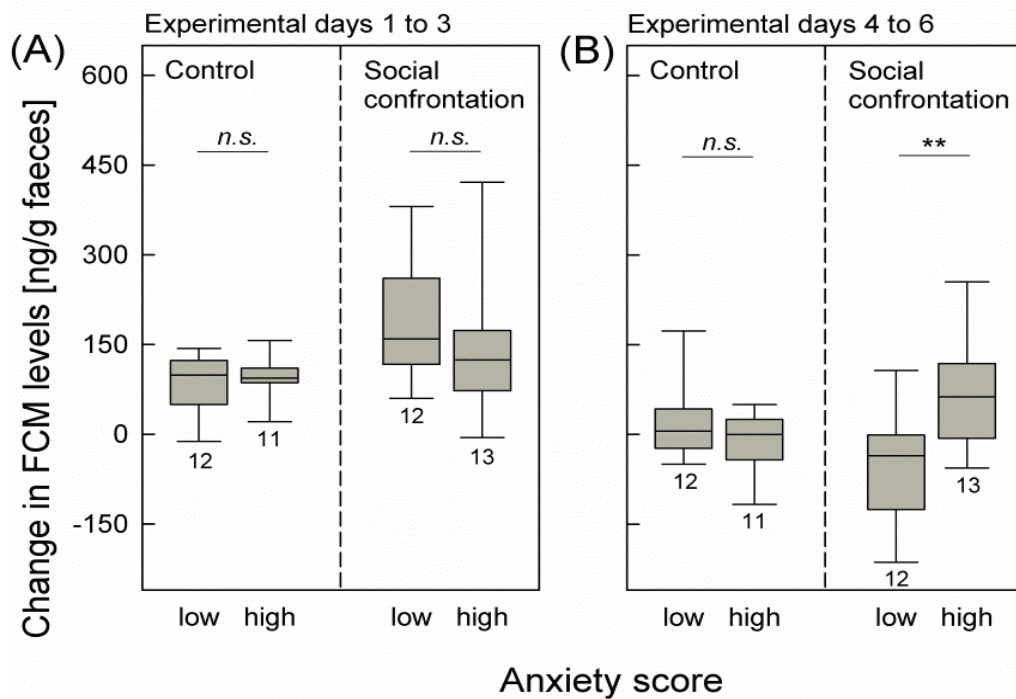


Figure 2

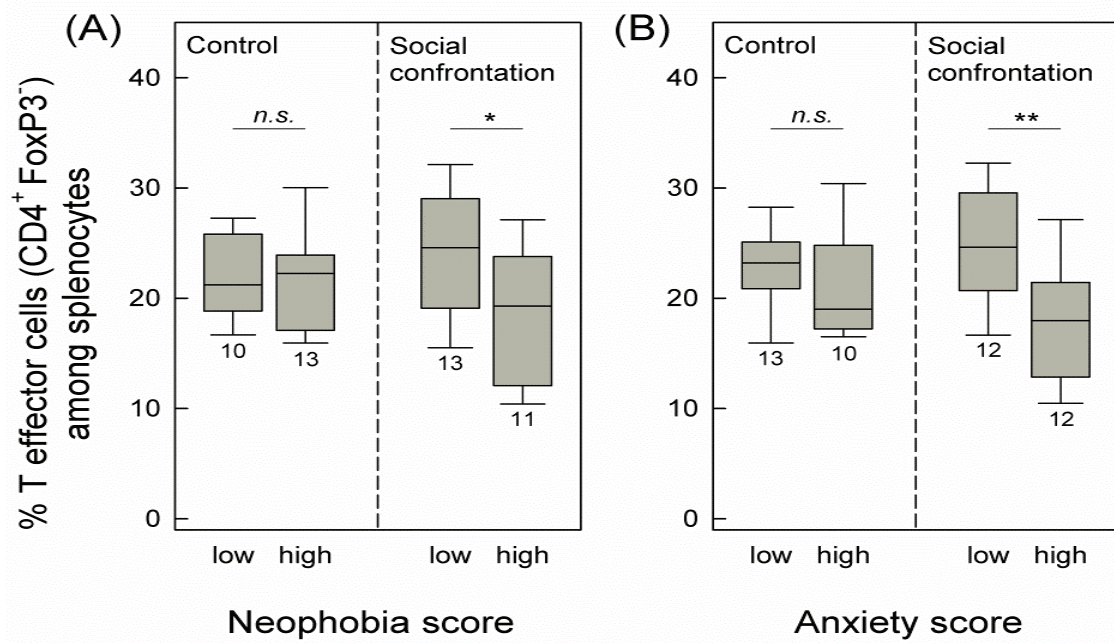


Figure 3

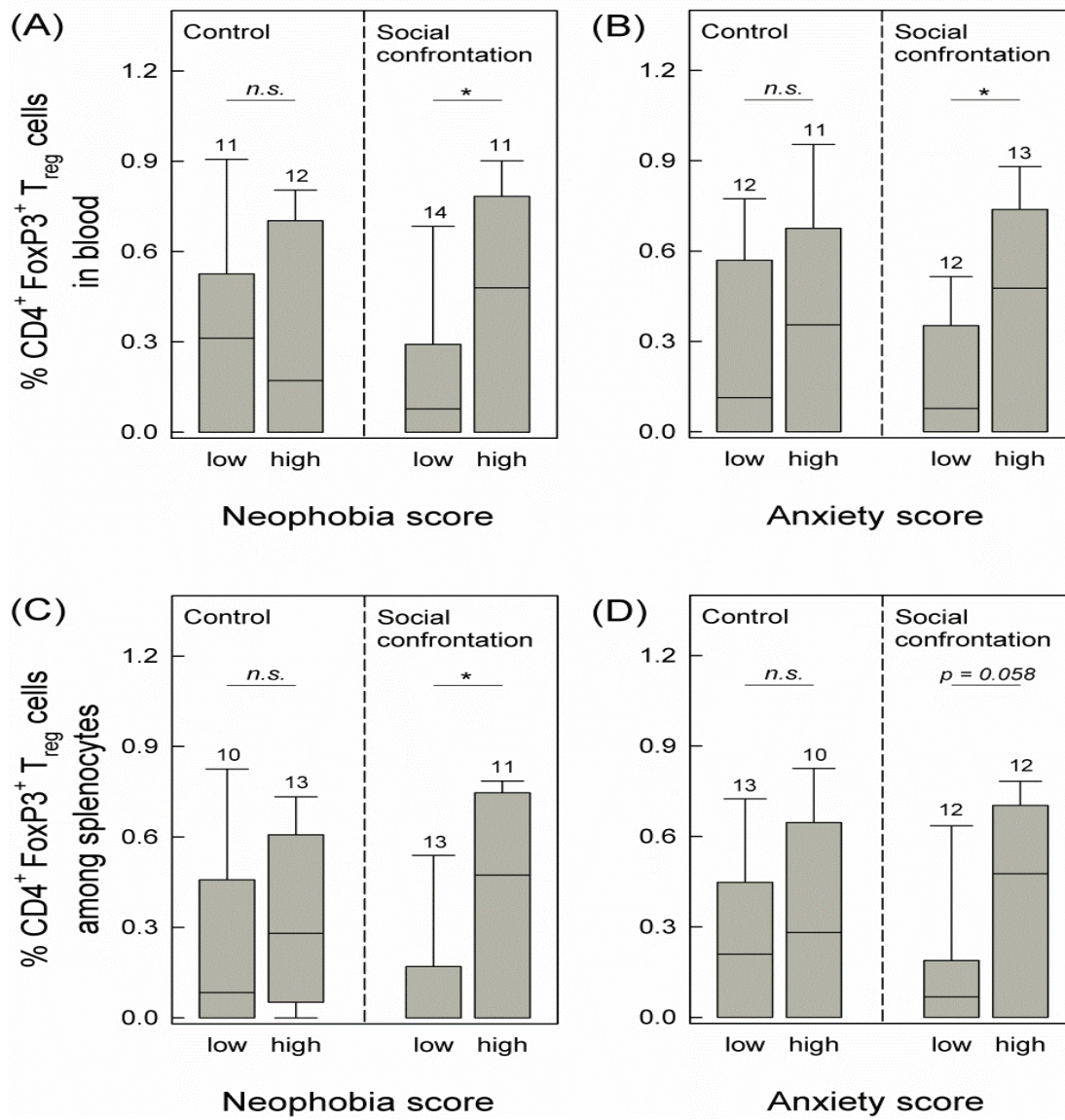


Figure 4

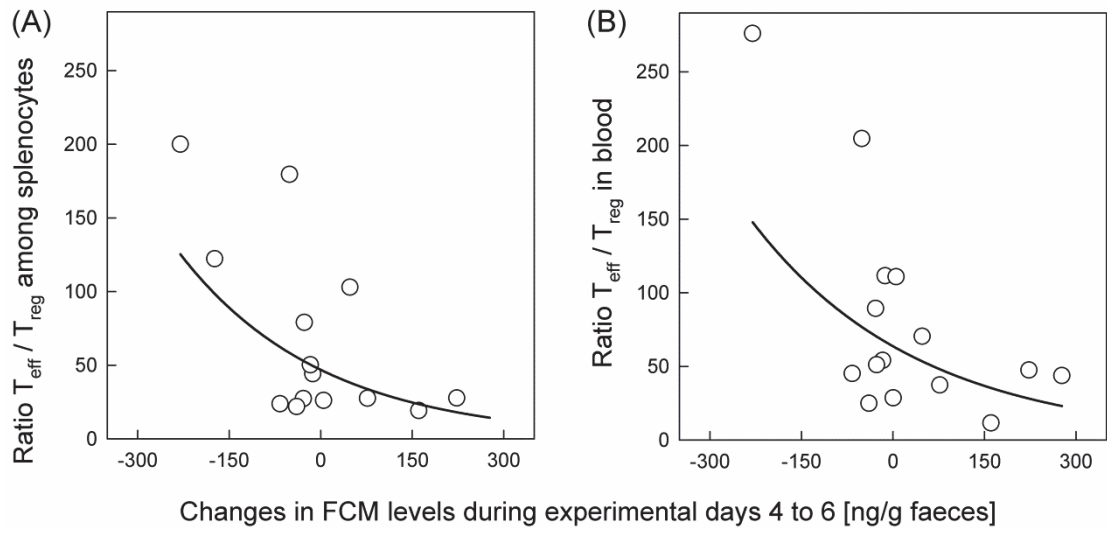


Figure 5

Table and Figure legends

Table 1. Differences in immune parameters between adult males with high and low neophobia and anxiety scores which either belonged to an untreated control group or to an experimental group, where individuals were confronted to resident pairs during 6 consecutive days. Analyses were done using permutation tests using the package coin. *P*-values of all permutation tests performed were based on 1000 iterations. Significant differences are shown highlighted in bold.

Fig. 1. Consistencies across time in (a) neophobia scores (measured by a novel object test) and (b) anxiety scores (measured in an elevated plus maze) of male mound-building mice at two times of testing ((a): T_1 : postnatal day 42, T_2 : day 72; (b) T_1 : day 44, T_2 : day 74). Higher scores indicate more pronounced neophobic or anxiety-related behaviours during the tests, respectively. Both scores were significantly repeatable based on the proportion of phenotypic variation attributed to between-subject variation; see text for details on statistics. We used LMM-based calculations of repeatability with the R package rptR.

Fig. 2. Changes in concentrations of faecal corticosteroid metabolites (5-3,11-diol CM) in animals with high or low anxiety scores in controls and in experimental animals, which were daily confronted to resident pairs. Comparisons were done separately for the (a) early and (b) late period of the experiment. Analyses were done using permutation tests using the package coin. *P*-values of all permutation tests performed were based on 1000 iterations **: $p < 0.05$

Fig. 3. Percentage of $CD4^+ Foxp3^-$ T effector cells among splenocytes in animals with high or low neophobia and anxiety scores in controls and in experimental animals, which were daily confronted to resident pairs. Analyses were done using permutation tests using the package coin. *P*-values of all permutation tests performed were based on 1000 iterations *, **: $p < 0.05$

Fig. 4. Percentage of CD4⁺ FoxP3⁺ regulator T cells among splenocytes and in blood in animals with high or low neophobia and anxiety scores in controls and in experimental animals, which were daily confronted to resident pairs. Analyses were done using permutation tests using the package *coin*. *P*-values of all permutation tests performed were based on 1000 iterations *: $p < 0.05$

Fig. 5. Associations between the changes in FMC concentrations in experimental animals during the late period of the experiment (days 4 to 6) and the ratio between T eff/ Treg cells in spleen and in blood. Higher values indicate that the ratio is shifted towards relatively more Treg cells. Regression lines are based on the back-transformed parameter estimates of a linear regression with 1000 permutations. Both regressions are statistically significant. (Linear regression with permutation test using the package *lmPerm*: $R^2 = 0.370$, $p = 0.020$; Fig. 5A) as well as in blood ($R^2 = 0.315$, $p = 0.029$; Fig. 5B).

DISCUSSION

En sachant que les facteurs sociaux jouent un rôle clé dans les troubles cérébraux chez l'homme, le stress social est largement utilisé dans la recherche biomédicale pour modéliser divers troubles psychiatriques chez les animaux. Dans ce sens, il existe plusieurs versions de stress social chronique pour la recherche de biopsychiatrie.

La confrontation sociale pendant plusieurs jours est un exemple typique utilisé dans la recherche pour induire le stress sociale chronique chez les individus et ensuite identifier de divers symptômes physiologiques et comportementaux, comme l'anxiété, la dépression ou étudier la modification de gènes clés du cerveau ou les déficits immunitaires (Glaser et al., 1999).

Dans ce travail, nous avons identifié deux critères de la personnalité telle que la néophobie (Low/high) et l'angoisse (Low/high) chez une souche sauvage des souris (*Mus spicileges*) qui montrent des indications claires sur les différences de personnalité en fonction de leurs réponses comportementales.

Le stress social dans notre étude a été réalisé chez cette souche via une confrontation avec un couple résidant dans une cage, pendant 30 minutes sur une durée de 6 jours consécutifs.

Il a été démontré que le stress chronique via la confrontation sociale induit un taux important de corticostérone en tant que l'hormone de stress chez les souris (Stefanski and Grüner, 2006) et l'activité de cet hormone peut médier la façon de réagir des animaux au stress (Carere et al., 2010). Par exemple des individus soumis (Von Holst , 1986) , réactives ou passives (Koolhaas et al ., 1999; . Rödel et al , 2006) et plus anxieux (Dhabhar et al , 2012) expérimentent généralement une activation de corticostérone plus élevés.

Nous n'avons observé aucune différence de la sécrétion d'hormone de stress chez les souris avec la confrontation sociale en comparant avec les souris contrôles.

Cependant nous avons détecté un taux élevé de corticostérone à partir du 3^{ème} jour de confrontation sociale dans les fèces des souris dont la personnalité est plus angoissée que les souris moins angoissées.

Plusieurs études ont montré que l'environnement psychosocial peut influencer profondément le système immunitaire. Chez les rats et beaucoup d'autres mammifères, l'immunité cellulaire et humorale ont été sévèrement influencée par les facteurs de stress psychosociaux (Hardy et al , 1990, Von Holst et al, 1998).

Dans ce sens, nous avons étudié l'effet de stress chronique du à la confrontation sociale sur le système immunitaire de différents individus ayant de personnalités variées.

Aucune modification dans les paramètres immunitaires n'a pas été observée chez les souris stressées de notre étude en comparant avec les souris contrôles. Cependant, nous avons observé que le pourcentage des LT CD4⁺ dans la rate des souris plus angoissées ou plus néophobiques soumises à la confrontation sociale était diminué par rapport aux souris moins angoissées ou néophobiques. Ce résultat est dans le même sens que les études précédentes chez les souches sélectionnées des rates (Stefanski, 2000).

Suite à la réduction des CD4⁺ dans la rate, nous avons montré pour la première fois que le pourcentage des cellules Teff, CD4⁺ Foxp3⁻, dans la rate des souris confrontées au stress chronique et ayant un caractère plus angoissé ou néophobique était réduit par rapport aux souris moins angoissées et moins néophobiques.

La corticostérone est une hormone qui joue un rôle d'immuno supresseur et son taux de sécrétion était augmenté chez les groupes des souris stressées qui développent moins de CD4⁺ et Teff.

Nous nous sommes donc demandé si le stress chronique pourrait influencer les cellules immunoregulatrices comme les Tregs.

L'analyse des paramètres immunitaires montraient une augmentation très importante des Tregs dans le sang et la rate des souris plus néophobes et le sang des souris plus angoissées après 6 jours de confrontation sociale. En outre, la fréquence des Tregs parmi des CD4⁺ isolés de la rate des souris plus néophobiques et angoissées a été augmentée (Données non montrées). Suite à cette augmentation, la balance entre Teff/Treg dans le sang et la rate des souris plus néophobes ou plus angoissées est diminuée par rapport des souris moins néophobes ou moins angoissée. Cela suggère que le stress chronique dans notre étude, favorise l'orientation des CD4⁺ vers Treg que Teff (Données non montrées).

Nous avons aussi observé une corrélation négative entre le taux de corticostérone secretée au cours du stress chronique et la balance Teff/Treg. Ceci nous amène à penser que le stress chronique peut influencer le maintien de la tolérance immunitaire et peut supprimer l'inflammation via l'induction de Tregs. Pour valider cette hypothèse, il faudrait réaliser un test fonctionnel afin d'étudier l'activité suppressive des Tregs chez ces souris.

Cependant, à cause du nombre limité de splénocytes et de cellules des ganglions de la souche de souris utilisée dans notre étude, nous n'avons pas pu réaliser les tests fonctionnels des Treg.

En outre, il faudrait étudier différents indicateurs de l'inflammation comme la CRP dans le sérum de ces souris (Low et al, 2013).

Etudier l'impact du stress chronique dans un contexte inflammatoire comme l'autoimmunité, le cancer ou l'infection chez ces souris pourrait également permettre de définir de nouveaux axes thérapeutiques en biopsychiatrie (Zhang et al., 2015, Stefanski et al., 2013). Ceci, contribuerait à un meilleur contrôle des pathologies liées au stress comme la sclérose en plaques et la polyarthrite rhumatoïde.

RÉFÉRENCE

- ❖ Buske-Kirschbaum, A., Gierens, A., Höllig, H., and Hellhammer, D.H. (2002). Stress-induced immunomodulation is altered in patients with atopic dermatitis. *J. Neuroimmunol.* 129, 161–167.
- ❖ Carere, C., Caramaschi, D., Fawcett, T.W., 2010. Covariation between personalities and individual differences in coping with stress: Converging evidence and hypotheses. *Curr. Zool.* 56, 728-740.
- ❖ Dhabhar, F.S., Saul, A.N., Holmes, T.H., Daugherty, C., Neri, E., Tillie, J.M., Kusewitt, D., Oberyszyn, T.M., 2012. High-anxious individuals show increased chronic stress burden, decreased protective immunity, and increased cancer progression in a mouse model of squamous cell carcinoma. *PLOS ONE* 7, e33069.
- ❖ Glaser, R., Rabin, B., Chesney, M., Cohen, S., and Natelson, B. (1999). Stress-induced immunomodulation: implications for infectious diseases? *JAMA* 281, 2268–2270
- ❖ Hardy, CA, Quay J, Livnat S, Ader R (1990). Altered T-lymphocyte response following aggressive encounters in mice. *Physiol Behav*, 47, 1245-51.
- ❖ Koolhaas, J.M. (2008). Coping style and immunity in animals: making sense of individual variation. *Brain. Behav. Immun.* 22, 662–667.
- ❖ Koolhaas, J.M., Korte, S.M., De Boer, S.F., Van Der Vegt, B.J., Van Reenen, C.G., Hopster, H., De Jong, I.C., Ruis, M.A.W., Blokhuis, H.J. (1999). Coping styles in animals: Current status in behavior and stress-physiology. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23, 925-935.
- ❖ Low CA, Matthews KA, Hall M.(2013). Elevated C-reactive protein in adolescents: roles of stress and coping.
- ❖ Rangassamy, M., Dalmas, M., Féron, C., Gouat, P., and Rödel, H.G. (2015). Similarity of personalities speeds up reproduction in pairs of a monogamous rodent. *Anim. Behav.* 103, 7–15.
- ❖ Rödel, H.G., Monclús, R., von Holst, D., 2006. Behavioral styles in European rabbits: Social interactions and responses to experimental stressors. *Physiol. Behav.* 89, 180-188.
- ❖ Sandi, C., Castanon, N., Vitiello, S., Neveu, P.J., and Mormède, P. (1991). Different responsiveness of spleen lymphocytes from two lines of psychogenetically selected rats (Roman high and low avoidance). *J. Neuroimmunol.* 31, 27–33.
- ❖ Schmid-Ott, G., Jaeger, B., Adamek, C., Koch, H., Lamprecht, F., Kapp, A., and Werfel, T. (2001). Levels of circulating CD8(+) T lymphocytes, natural killer cells, and eosinophils increase upon acute psychosocial stress in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107, 171–177.

- ❖ Stefanski, V (2000). Social stress in laboratory rats: hormonal responses and immune cell distribution. *Psychoneuroendocrinology*. 25, 389-406.
- ❖ Stefanski, V., and Engler, H. (1998). Effects of acute and chronic social stress on blood cellular immunity in rats. *Physiol. Behav.* 64, 733-741.
- ❖ Stefanski, V. and Grüner, S. (2006). Gender difference in basal and stress levels of peripheral blood leukocytes in laboratory rats. *Brain Behav Immun.* 20, 369-77
- ❖ Stefanski, V., Hemschemeier, S.K., Schunke, K., Hahnel, A., Wolff, C., and Straub, R.H. (2013). Differential effect of severe and moderate social stress on blood immune and endocrine measures and susceptibility to collagen type II arthritis in male rats. *Brain. Behav. Immun.* 29, 156–165.

- ❖ Von Holst, D. (1986). Psychosocial stress and its pathophysiological effects in tree shrews (*Tupaia belangeri*). In:
- ❖ Von Holst, D.(1998). The concept of stress and its relevance for animal behavior. *Adv. Stud. Behav.* 27, 1-131.

- ❖ Zhang, X., Kelaria, S., Kerstetter, J., and Wang, J. (2015). The functional and prognostic implications of regulatory T cells in colorectal carcinoma. *J. Gastrointest. Oncol.* 6, 307–313.

RESUME

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie inflammatoire chronique d'étiologie inconnue. Les mécanismes physiopathologiques de cette maladie mettent en jeu un réseau cellulaire et cytokinique dont l'étude permet de définir des cibles thérapeutiques potentielles. L'IL-33 est une cytokine impliquée dans plusieurs maladies inflammatoires mais son rôle dans l'inflammation chronique comme la PR reste peu étudié. L'objectif de ce travail a été d'étudier le rôle de l'IL-33 et son mode d'action dans deux modèles expérimentaux d'inflammation chronique, l'arthrite au collagène (AEC) et le psoriasis induit par l'imiquimod (IMQ) chez la souris. Nous avons montré pour la première fois que l'administration d'IL-33 recombinante pendant les phases précoce et tardive de l'AEC, permet d'inhiber presque totalement les signes cliniques de la maladie. Cet effet protecteur passe par le déclenchement d'une réponse immunitaire de type 2 y compris l'expansion des ILC2, des éosinophiles et des cellules Th2. En outre, nous avons démontré que l'administration d'IL-33 dans notre modèle induit l'expansion de lymphocytes T régulateurs ST2L⁺ et une activité suppressive accrue. Dans un second temps, nous avons démontré que malgré l'expression de l'IL-33 dans les articulations ou la peau de souris développant une AEC ou un psoriasis induit par imiquimod, l'IL-33 endogène n'est pas nécessaire pour le développement de ces deux pathologies. En outre, l'absence de cette cytokine ne modifie pas la réponse des lymphocytes T ni dans l'AEC et ni dans le psoriasis. L'ensemble de ces résultats suggère que cette cytokine n'est pas cruciale pour le développement de l'inflammation chronique, et que la mise au point de traitement ciblant l'axe IL-33 / ST2 doit être envisagée avec précautions.

Role of Interleukin -33 in experimental models of chronic inflammation

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease that is associated with several mediators. The physiopathological mechanisms of this disease involve cellular and cytokine networks whose study helps to define potential therapeutic targets. IL-33 is a cytokine involved in many inflammatory diseases although its role in chronic inflammation such as RA remains unclear. The aim of this work is to study the role of IL-33 and its mode of action in two experimental models of chronic inflammation, collagen induced arthritis (CIA) and imiquimod (IMQ) induced psoriasis. First, we showed for that the administration of recombinant IL-33 during the early and late phases of CIA inhibits the clinical signs of the disease in mice C57BL/6. This protective effect is associated with the response type 2 including expansion of ILC2, eosinophils and Th2 cells. Furthermore, we demonstrated that access of IL-33 in our model induced Treg ST2L and promotes the acquisition of regulatory phenotypes of Tregs. These Tregs achieve an important suppressive activity leading inhibition of CIA. Secondly, despite the expression of IL-33 in the joint and skin of mice with CIA and IMQ induced psoriasis, endogenous IL-33 is not necessary for the development of these two chronic inflammation models. In addition, the absence of this cytokine does not alter the T cell response in the CIA or psoriasis. All these results suggest that this cytokine is not crucial for the development of chronic inflammation, but the development based treatment of IL 33 / ST2 axis targeting should be cautiously considered.

Discipline: Biologie

Mots clés : Polyarthrite rhumatoïde, Psoriasis, Interleukine (IL)-33, Lymphocytes T régulateurs, Cellules Th2, Cellules lymphoïde type2.