



HAL
open science

The transgenic *Drosophila* HLA-B27: a new model for the study of spondyloarthritis

Benjamin Grandon

► **To cite this version:**

Benjamin Grandon. The transgenic *Drosophila* HLA-B27: a new model for the study of spondyloarthritis. Biochemistry, Molecular Biology. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. English. NNT : 2018SACLV051 . tel-02317352

HAL Id: tel-02317352

<https://theses.hal.science/tel-02317352v1>

Submitted on 16 Oct 2019

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.

La drosophile transgénique HLA-B27 : un nouveau modèle pour l'étude des spondyloarthrites

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à Université Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines (UVSQ)

École doctorale n°557
Ecole Doctorale Structure et Dynamique des Systèmes Vivants (SDSV)
Spécialité de doctorat: Sciences de la vie et de la Santé

Thèse présentée et soutenue à Versailles, le 15 octobre 2018, par

Benjamin GRANDON

Composition du Jury :

Elisabeth PETIT-TEIXEIRA
Pr., UEVE, GENHOTEL

Présidente

Rik LORIES
Pr., KU LEUVEN, SBERC

Rapporteur

Michèle CROZATIER
Dr., CNRS TOULOUSE, CBI

Rapporteuse

Nathalie DAVOUST-NATAF
Dr., ENS LYON, LBMC

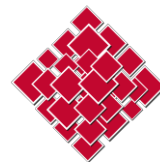
Examinatrice

Maxime BREBAN
Pr., UVSQ, I2C

Directeur de thèse

Sébastien GAUMER
Dr., UVSQ, LGBC

Co-Directeur de thèse



UNIVERSITÉ PARIS - SACLAY
Ecole Doctorale Structure et Dynamique des Systèmes Vivants (SDSV)-ED n°577

THÈSE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du diplôme de Docteur
de l'Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines
Spécialité Génétique et Biologie Cellulaire

Thèse présentée et soutenue par :

Benjamin GRANDON

**La drosophile transgénique HLA-B27 :
un nouveau modèle pour l'étude des spondyloarthrites**

à Versailles,
le 15 octobre 2018

Composition du Jury :

Pr. Rik LORIES Dr. Michèle CROZATIER	KU LEUVEN CNRS TOULOUSE	Rapporteur Rapporteuse
Pr. Elisabeth PETIT-TEIXEIRA Dr. Nathalie DAVOUST-NATAF	UEVE ENS LYON	Examinatrice Examinatrice
Pr. Maxime BREBAN Dr. Sébastien GAUMER	UVSQ UVSQ	Directeur de thèse Co-directeur de thèse

Laboratoire Infection et Inflammation (2I) U1173 INSERM/UVSQ
Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire (LGBC) EA4589 UVSQ/EPHE
UFR des Sciences de la Santé – Simone Veil
2 avenue de la Source de la Bièvre
78180 Montigny-le-Bretonneux

Remerciements

*" La pierre n'a point d'espoir d'être autre chose qu'une pierre.
Mais, de collaborer, elle s'assemble et devient temple"*

Antoine de Saint-Exupéry

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury, Rik Lories, Michèle Crozatier, Elisabeth Petit-Teixeira et Nathalie Davoust-Nataf d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

En premier lieu, je tiens à rendre hommage au Professeur Gilles Chiocchia qui nous a quittés beaucoup trop tôt. Je le remercie de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, et je garderai en mémoire ses nombreux conseils qui m'ont été très précieux pour la réalisation de cette thèse.

Je remercie le Professeur Bernard Mignotte de m'avoir accueilli dans le laboratoire du LGBC. Merci de m'avoir donné l'opportunité de réaliser une quatrième année de thèse en tant que ATER et de m'avoir confié la tâche de représentant des doctorants de l'école doctorale.

Je souhaite adresser mes plus sincères remerciements à mes deux directeurs de thèse, Maxime Breban et Sébastien Gaumer, sans qui cette thèse n'aurait jamais abouti. Je ne compte plus les nombreux conseils et le temps que vous m'avez consacré durant ces quatre ans. J'ai une grande admiration pour vous et je vous suis reconnaissant de m'avoir fait confiance. Votre bonne humeur et votre humour ont été une aide précieuse pour affronter les aléas de la recherche scientifique. Merci Maxime de m'avoir donné l'opportunité de participer à de nombreux congrès durant ma thèse, me permettant ainsi de développer mon sens de la communication. Merci Sébastien pour ton écoute durant la thèse face aux difficultés professionnelles et personnelles que j'ai affrontées.

Je remercie également Isabelle Guenal et Aurore Rincheval pour leur disponibilité et la qualité de leurs conseils. Merci encore pour votre soutien et vos encouragements pour la finalisation de ce mémoire. Votre contribution a été considérable au projet et votre écoute m'a permis d'affronter bien des épreuves durant ma thèse.

Ce projet n'aurait jamais abouti sans l'aide de Nadège Jah, Jean-Marc Corsi, Delphine Roche, et Christine Wintz qui ont travaillé à mes côtés durant toutes ces années pour la réalisation de nombreuses expériences. Merci pour votre soutien, vos conseils et votre travail.

Je désire également remercier et ce particulièrement mon collègue de bureau, Sébastien Szuplewski pour son écoute, sa compréhension et ses précieux conseils sur le projet. Je me souviendrai des nombreuses heures à écouter sa musique, me faire connaître de nouveaux groupes, ainsi que les nombreuses références à des sketches cultes. Merci de m'avoir laissé écouter "Sweet Dreams" de Marilyn Manson, je t'offrirai en contrepartie un album du groupe Oasis.

Je tiens à remercier mes nombreux compagnons thésards avec qui j'ai passé de très bons moments. Je remercie Jessica pour m'avoir appris les rudiments de la dissection, Amandine et Elisabeth pour leurs précieux conseils d'anciennes thésardes, Vincent pour notre victoire durant les doctoriales, Caroline et Sévasti pour les nombreux moments à essayer de nous apprendre le Grec. Je remercie particulièrement Juliette et Marion, qui m'ont toujours accueilli dans leur bureau "des plaintes". Je vous remercie pour ces nombreux moments de rire qui ont été une aide précieuse pour tenir jusqu'à la fin de ce parcours. Merci Jessie pour tes innombrables conseils, ainsi que les nombreux moments à discuter de voyages, de soirées et d'apéros, durant nos "pauses-cigarettes".

Je souhaite aussi remercier tous les autres doctorants, Nesrine, Cassie, Ketia, Quentin, Camille, Violaine, Nicolas et Fanta pour leur joie de vivre et leur convivialité. Je vous souhaite bon courage à tous pour la suite, en espérant que nos chemins se recroiseront.

Je remercie tout les autres membres du LGBC : Flore, Nathalie, Sylvina, et Arnaud, mais également ceux du laboratoire IRIS : Henri-Jean, Christophe, Luiza, et Aude, qui ont participé de loin ou de près à l'avancée du projet.

Mes remerciements s'étendent également à l'équipe du deuxième étage, et plus particulièrement à Marie-Noëlle Dieudonné, qui depuis mon stage de M1 m'a conforté à continuer en thèse. Je remercie aussi Hadia et Fabien pour vos encouragements et nos nombreux fous rires.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers mes amis, Jérôme, Vincata, Julien, Caroline, Alexis, Lucie, Aymen, Amine, Rahime, Burak, Gabriela, Coralie et Jonathan qui m'ont apporté leur soutien moral et intellectuel tout au long de ces années. Notre rencontre sur les bancs de la fac a été pour moi un mémorable souvenir. Je vous en remercie énormément et souhaite que notre amitié puisse perdurer.

Enfin, j'adresse mes plus chaleureux remerciements à ma famille. Je souhaite particulièrement remercier ma fiancée Alba d'avoir toujours été à mes côtés, d'avoir affronté mes sautes d'humeur, de m'avoir encouragé, et d'avoir toujours colorié ma vie quand je voyais tout en noir. Un grand merci à ma mère et à mon père, pour leur amour, leurs conseils ainsi que leur soutien inconditionnel tout au long de ma vie. Je dédie ma thèse à la mémoire de ma tante et mon oncle, qui auraient été fiers de moi. Je dédie enfin cette thèse à mes deux petites nièces Sarah et Maria-Elys, ainsi qu'à mon petit neveu Falco qui représentent une grande source de bonheur à mes yeux.

Merci à tous...

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	1
TABLE DES MATIERES	3
LISTE DES ABREVIATIONS.....	7
TABLE DES FIGURES ET DES TABLEAUX	12
INTRODUCTION	19
I. LA SPONDYLARTHRITE ANKYLOSANTE	19
A. <i>Epidémiologie</i>	19
1) Les spondylarthropathies et la spondylarthrite ankylosante	19
a) Les différents sous-types de spondylarthropathies.....	19
b) Epidémiologie de la spondylarthrite ankylosante	21
2) Les manifestations cliniques.....	21
a) Les manifestations articulaires	21
b) Les manifestations extra-articulaires.....	23
3) Les traitements.....	23
a) Première phase.....	23
b) Deuxième phase	25
c) Troisième phase	25
B. <i>Physiopathologie</i>	25
1) Inflammation et rôle des cellules immunitaires	27
2) Destruction et formation osseuse	27
C. <i>Etiologie</i>	31
1) Les facteurs génétiques.....	31
a) HLA-B27, le principal facteur génétique de prédisposition	31
b) Les autres facteurs génétiques	31
2) Les facteurs environnementaux	35
a) Infections.....	35
b) Microbiote	35
II. LE COMPLEXE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITE : HLA-B	37
A. <i>Structure et fonction du HLA-B27</i>	37
a) Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH)	37
b) Repliement et aprêtement des molécules de classe I	39
B. <i>Les différents sous-types alléliques d'HLA-B27</i>	39
C. <i>Hypothèses sur le rôle du HLA-B27 dans la SpA</i>	41
1) Mécanismes dépendant de l'antigène	41
a) Peptide arthritogène	41
b) Mimétisme moléculaire.....	43
2) Mécanismes indépendant de l'antigène	45
a) Dimères de HLA-B27	45
b) Mauvais repliement et UPR.....	45

c) Exosomes et HLA-B27	47
3) Rôle de la β 2-microglobuline.....	47
III. LES MODELES D'ETUDES DE LA SPONDYLARTHRITE ANKYLOSANTE	47
A. <i>Modèle de la spondylarthrite ankylosante chez le rat</i>	47
B. <i>Modèle de la spondylarthrite ankylosante chez la souris</i>	49
IV. UN NOUVEAU MODELE D'ETUDE : DROSOPHILA MELANOGASTER	51
A. <i>Drosophila melanogaster comme modèle d'étude des pathologies humaines</i>	51
B. <i>Immunité chez Drosophila melanogaster</i>	55
1) La drosophile comme modèle d'étude de l'immunité innée	55
2) Les cellules hématopoïétiques chez Drosophila melanogaster	57
a) Les différentes cellules immunitaires chez la drosophile	57
b) Infection et réponse humorale	57
C. <i>Drosophila melanogaster : un modèle d'étude des mécanismes moléculaires complexes</i>	59
1) Le stress du réticulum endoplasmique et l'UPR	59
2) La mort cellulaire.....	61
3) Conservation des principales voies de signalisation avec les vertébrés	63
V. LA VOIE DE SIGNALISATION BONE MORPHOGENETIC PROTEIN (BMP)	65
A. <i>La voie BMP chez l'Homme</i>	65
1) Le rôle.....	65
2) La découverte.....	65
3) Activation de la voie	65
a) Les ligands	65
b) Les récepteurs	67
c) La signalisation intracellulaire	69
d) Les gènes cibles	71
e) Les régulateurs	71
i. Régulation extracellulaire	71
ii. Régulation des récepteurs	73
iii. Régulation des protéines Smad	75
iv. Régulation nucléaire	75
4) Autre rôle de la signalisation BMP	75
B. <i>La voie BMP chez Drosophila melanogaster</i>	77
1) Structure générale de la cascade de signalisation.....	77
a) Les ligands	77
b) Les récepteurs	79
c) La signalisation intracellulaire	79
d) Le contrôle de la transcription.....	81
e) Les gènes cibles	83
f) Les régulateurs de la signalisation	83
C. <i>Interaction entre les voies de signalisation BMP et TGF-β</i>	85
1) Chez les mammifères	85
2) Chez Drosophila melanogaster	87

VI. LA VOIE BMP DANS LA FORMATION DES VEINES DE L'AILE CHEZ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	89
A. <i>Mise en place des informations de position des veines longitudinales au cours du stade larvaire</i>	91
B. <i>Maintien de la formation des veines longitudinale au stade pupal</i>	91
C. <i>La formation des veines transversales</i>	93
VII. IMPLICATION DE LA SIGNALISATION BMP / TGF-β DANS LA SPA	93
A. <i>Les processus physiologiques de la SpA impliquant la voie BMP/TGF-β</i>	93
1) Système immunitaire	93
2) Système squelettique	95
3) Système intestinal	97
B. <i>La Fibrodysplasie Ossifiante Progressive (FOP)</i>	99
1) ALK2 et prédisposition à la FOP.....	101
2) Similitude clinique entre FOP et SpA.....	103
SITUATION DU SUJET	105
RESULTATS : ARTICLE 1	109
RESULTATS COMPLEMENTAIRES	115
I. EXPRESSION DES DIFFERENTS TRANSGENES AVEC UN PILOTE UBIQUITAIRE	115
II. LA CO-EXPRESSION D' <i>HLA-B*2705</i> ET D' <i>hβ2M</i> EST-ELLE LA SOURCE D'UN STRESS DU RE OU DES MITOCHONDRIES ?	117
A. Le stress du RE et la voie ERAD	117
B. <i>HLA-B*2705, hβ2m</i> et stress mitochondrial	117
III. <i>HLA-B27</i> ET LA VOIE DE SIGNALISATION BMP / TGF- β	119
A. Tests d'interaction génétique.....	119
B. Immunofluorescence	123
C. RT-qPCR des gènes cibles de la voie BMP	125
IV. UN AUTRE ALLELE DE <i>HLA-B</i> : <i>HLA-B*2706</i>	127
V. EXPRESSION DES DIFFERENTS TRANSGENES DANS LES PLASMATOCYTES DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	129
DISCUSSION	133
CONCLUSION	143
ANNEXE I : ARTICLE 2	147
ANNEXE II	149
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	183

Liste des abréviations

Ace	Angiotensin Converting Enzyme
ActR-IA	Activin Receptor-IA
ActR-IIB	Activin Receptor-IIB
Actβ	Activin β
ACV	Anterior Crossvein
ADN	Acide Desoxyribonucléique
AINS	Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens
AJI	Spondylarthrites Juvénile Idiopathique
ALK-2	Activin Receptor-Like Kinase-2
AMH	Anti-muellerian hormone
AMP	Antimicrobial Peptides
Apaf-1	Apoptotic Protease Activation Factor
Aré	Arthrites Réactionnelles
ARN	Acide Ribonucléique
ARNi	ARN Interférant
ARNm	Acide Ribonucléique Messenger
ASAS	Assessment of SpondyloArthritis international Society
ATF4	Activating Transcription Factor 4
ATF6	Activating Transcription Factor 6
Babo	Baboon
Bambi	Bmp And Activin Membrane-Bound Inhibitor Homolog
BIP	Binding Immunoglobulin Protein
BMM	Bone Marrow-Derived Macrophages
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMPR-IA	Bmp Receptor-IA
BMPR-IB	Bmp Receptor-IB
BMPR-II	Bmp Receptor II
BRE	B Recognition Element
Brk	Brinker
Caspases	Cysteiny Aspartate-Specific Proteases
CBP	Creb-Binding Protein
CD28	Cluster Of Differentiation 28
Cdc42	Cell Division Control Protein 42 Homolog
Cer	Cerberus
Chd	Chordine
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation
CHOP	C/Ebp Homologous Protein
CMH	Complexe Majeur D'Histocompatibilité
COP-II	Coatomer II
Crim2	Kielin/Chordin-Like Protein
CRISPR	Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats
Cv	Crossveinless
Cv-2	Crossveinless-2
Cv-c	Crossveinless-c
Cv-d	Crossveinless-d
Dad	Daughters Against Dpp

Dally	Division Abnormally Delayed
Damm	Death Associated Molecule Related To Mch2
Daw	Dawdle
dBruce	Drosophila Bir Repeat Containing Ubiquitin-Conjugating Enzyme
DC	Dendritic Cell
Dcp-1	Drosophila Caspase-1
Decay	Death Executioner Caspase related to Apopain/Yama
DKK-1	Dickkopf-Related Protein 1
DI	Delta
Dlp	Dally-Like Protein
Dpp	Decapentaplegic
Dredd	Death Related Ced-3/Nedd2-like
Drice	Drosophila Ice
Dronc	Drosophila Nedd-2 Like Caspase
Drpr	Draper
EB	Embryoid Body
EBV	Epstein-Barr Virus
EC	Enterocyte Cell
EEC	Enteroendocrine Cell
EGF	Epidermal Growth Factor
EiF2α	Eukaryotic Translation Initiation Factor 2A
En	Engrailed
EOMES	Eomesodermin
ER	Endoplasmic Reticulum
ERAD	Endoplasmic-Reticulum-Associated Protein Degradation
ERAP1	Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1
ERGIC	ER-Golgi Intermediate Compartment
Erk	Extracellular Signal-Regulated Kinase
ERp57	Endoplasmic Reticulum Resident Protein 57
FKBP12	Fkbp-Type Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase
FOP	Fibrodysplasie Ossifiante Progressive
FSTL	Follistatin-like protein
GAG	Glycosaminoglycan
Gbb	Glass Bottom Boat
GC	Goblet Cell
GCN5	Histone Acetylation GCN5
GDF	Growth Differentiation Factor
GLS1	Golgi Localization Sequence 1
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GPR35	G Protein-Coupled Receptor 35
GWAS	Genome-Wide Association Study
Hh	Hedgehog
Hid	Head Involution Defective
HLA-B07	Human Leukocyte Antigen B07
HLA-B27	Human Leukocyte Antigen B27
Hpo	Hippo
HSC	Hematopoietic Stem Cells
HSPG	Heparan-Sulfate Proteoglycan
hβ2m	Human Beta-2-Microglobuline

IAP	Inhibitor Of Apoptosis Protein
Id1	DNA-binding protein inhibitor ID-1
If	Inflated
IFNγ	Interferon gamma
IGAS	International Genetics of Ankylosing Spondylitis
IL-1	Interleukine 1
IL-12B	Interleukine 12B
IL1R2	Interleukin 1 Receptor Type II
IL-1β	Interleukine 1B
IL-22	Interleukine 22
IL-23	Interleukine 23
IL23R	Interleukin 23 Receptor
IL-6	Interleukine 6
IL6R	Interleukin 6 Receptor
Imd	Immune Deficiency
IRE1	Inositol-Requiring Protein-1A
ISC	Intestinal Stem Cell
JAK2	Janus Kinase 2
JNK	C-Jun N-Terminal Kinase
KIR	Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor
LILR	Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor
LMP2	Latent Membrane Protein 2
Ltl	Larval Translucida
Mad	Mothers Against Dpp
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
Mav	Maverick
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
Med	Medea
Mew	Multiple Edematous Wings
MH1	Mad Homology 1
MH2	Mad Homology 2
MICI	Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
MMP	Métalloprotéinases matricielle
Msx2	Homeobox Protein Msx-2
MTOR	Mechanistic Target Of Rapamycin
Myo	Myoglianin
Mys	Myo-Sphéroïde
N	Notch
NasA	Assimilatory Nitrate Reductase catalytic subunit
NEDD4	Neural Precursor Cell Expressed Developmentally Down-Regulated Protein 4
Nej	Nejire
NFAT	Nuclear Factor Of Activated T-Cells
NF-κB	Nuclear Factor-Kappa B
NimC1	Nimrod C1
NimC4	Nimrod C4
NK	Natural Killers
NPEPPS	Puromycin-Sensitive Amino Peptidase
OB	Ostéoblastes
OC	Ostéoclastes

Omb	Optomoter Blind
OMIM	Online Mendelian Inheritance In Man
Osx	Osterix
P300	Histone Acetyltransferase P300
P38	P38 Mitogen-Activated Protein Kinase
PCV	Posterior Crossvein
PD-L1	Programmed Death-Ligand 1
Pent/Magu	Pentagone
PERK	Protein Kinase-Like ER Kinase
PGE2	Prostaglandine E2
pGR	Glucagon Receptor-derived self-peptide
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PLC	Peptide-Loading Complex
PP2A	Protein Phosphatase 2
PPARγ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma
PR	Polyarthrite Rhumatoïde
prx-1	Paired-Related Homeobox 1
Put	Punt
Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
RANK	Receptor Activator of NF- κ B
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
RE	Réticulum Endoplasmique
Rel	Relish
RGM	Repulsive Guidance Molecules
RhBMP-2	Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2
RhoA	Ras Homolog Gene Family, Member A
RhumPso	Rhumatisme Psoriasique
RIC	Rhumatismes Inflammatoires Chroniques
RIDD	Regulated Ire1-Dependent Decay
ROS	Reactive Oxygen Species
Runx2	Runt-Related Transcription Factor 2
Runx2	Runt-Related Transcription Factor 2
RUNX3	Runt-Related Transcription Factor 3
SA	Spondylarthrite Ankylosante
Sax	Saxophone
Scw	Screw
Shn	Schnurri
SIP1	Smad Interacting Protein 1
SMA	Spinal Muscular Atrophy
Smox	Smad On X
Smurf1	Smad Ubiquitination Regulatory Factor 1
Sog	Short Of Gastrulation
Sox9	SRY-Box 9
SpA	Spondylarthrites
Salm	Spalt-Major
Salr	Spalt-Related
Strica	Ser/Thr-Rich Caspase
T CD4+	Lymphocytes T Auxiliaires Cd4+
T CD8+	Lymphocyte T Auxiliaire Cd8+

TAK1	Transforming Growth Factor Beta-Activated Kinase 1
TAP	Transporteur Associé Au Traitement Antigénique
TGFBR-I	Transforming Growth Factor Beta Receptor I
TGF-β	Transforming Growth Factor-B
Th1	Lymphocyte T Helper 1
Th17	Lymphocyte T Helper 17
Th2	Lymphocyte T Helper 2
Th22	Lymphocyte T Helper 22
Tkv	Thickveins
Tld	Tolloid
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α
Treg	Lymphocyte T Régulateur
TrkC	Tropomyosine Receptor Kinase C
Tsg	Twisted Gastrulation
TYK2	Non-Receptor Tyrosine-Protein Kinase
UBE2E3	Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2 E3
UBE2L3	Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2 L3
UPR	Unfolded Protein Response
Ush	U-Shaped
USpA	Formes Indifférenciées de la Spondylarthrite
Vg	Vestigial
VIPR1	Vasoactive Intestinal Polypeptide Receptor 1
Wg	Wingless
Wit	Wishful Thinking
Wnt	Wingless/Int
XBP1	X-Box Binding Protein 1
Zen	Zerknullt
ZMIZ1	Zinc Finger Miz-Type Containing 1

Table des figures et des tableaux

Introduction

Figure 1 : Les différents sous-types de SpA.....	18
Figure 2 : Les principales manifestations cliniques de la SpA	22
Figure 3 : Les stratégies thérapeutiques pour la prise en charge des patients SpA.	24
Figure 4 : Implication des cellules immunitaires dans la physiopathologie de la SpA.	26
Figure 5 : Destruction articulaire et osseuse dans la SpA.	28
Figure 6 : Structure tridimensionnelle de la molécule HLA-B27.	36
Figure 7 : Mécanismes de repliement des CMH-I par le complexe de chargement de peptides.	38
Figure 8 : Répartition des différents sous-types alléliques de HLA-B27 à travers le monde	40
Figure 9 : Résidus polymorphes entre des sous-types associés (HLA-B*2705 et HLA-B*2704), ou non associés à la SpA (HLA-B*2706 et HLA-B*0702).....	42
Figure 10 : Les différentes hypothèses sur le rôle du HLA-B27 dans la pathologie.	44
Figure 11 : Les avantages et les applications du modèle <i>Drosophila melanogaster</i> pour l'étude de gènes impliqués dans des pathologies chez l'Homme.	52
Figure 12 : Les cellules immunitaires et la réponse humorale chez <i>Drosophila melanogaster</i>	56
Figure 13 : Le stress du RE et l'Unfolded Protein Response (UPR).....	58
Figure 14 : La voie intrinsèque de l'apoptose chez <i>Drosophila melanogaster</i> et la voie mitochondriale de l'apoptose chez les mammifères	60
Figure 15 : La voie BMP chez les mammifères	64
Figure 16 : Les principaux composants de la voie de signalisation BMP dans le développement de l'aile chez <i>Drosophila melanogaster</i>	78
Figure 17 : Interaction entre les voies de signalisation BMP et TGF- β	84
Figure 18 : Implication des principales voies de signalisation de la formation des veines de l'aile de la drosophile.....	88
Figure 19 : Formation des veines de l'aile de la drosophile.	92
Figure 20 : ALK2 et la Fibrodysplasie Ossifiante Progressive (FOP).	98

Résultats complémentaires

Figure 21 : Estimation du pourcentage de mort pupale en fonction de l'expression des différents transgènes par le pilote ubiquitaire <i>daughterless</i>	114
Figure 22 : Les protéines HLA-B n'activent pas significativement le senseur PERK de l'UPR.....	116
Figure 23 : Le phénotype associé à la co-expression de <i>HLA-B*2705</i> et <i>hβ2m</i> n'est pas sensible à une perturbation du processus de dégradation des protéines mal conformées.....	116
Figure 24 : La co-expression de <i>HLA-B*2705</i> et <i>hβ2m</i> ne modifie pas le réseau mitochondrial dans le disque imaginal d'aile.....	118
Figure 25 : HLA-B*2705,hβ2m altère le gradient de p-Mad.	122
Figure 26 : HLA-B*2705,hβ2m déséquilibre l'expression de certains gènes cibles, sans modifier l'expression des récepteurs et des ligands de la voie BMP.....	124
Figure 27 : La molécule de CMH non associée à la SpA, HLA-B*2706,hβ2m, induit un phénotype <i>crossveinless</i> dans l'aile de la drosophile	126
Figure 28 : Les allèles HLA-B27 ont une meilleure capacité de repliement que l'allèle <i>HLA-B07</i>	126
Figure 29 : L'expression des allèles associés à la SpA dans les hémocytes diminue la longévité des drosophiles.	128
Tableau 1 : Prévalence de la SpA à travers le monde.	20
Tableau 2 : Les principaux gènes de prédisposition à la SpA découverts par des études GWAS	30
Tableau 3 : Les principales lignées de rats transgéniques pour l'étude de HLA-B27 dans la pathogenèse de la SpA.....	48
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des différentes protéines de la signalisation BMP chez les mammifères et leur équivalent chez <i>Drosophila melanogaster</i>	76
Tableau 5 : Tableau récapitulatif des différentes lignées de drosophiles transgéniques pour les tests d'interaction génétique entre les composants de la signalisation BMP/TGF-β et HLA-B*2705,hβ2m.....	120

Introduction

"Two years work wasted, I have been breeding those flies for all that time and I've got nothing out it..."

Thomas Hunt Morgan

Résultats

Résultats complémentaires

Discussion

Annexes

Références bibliographiques

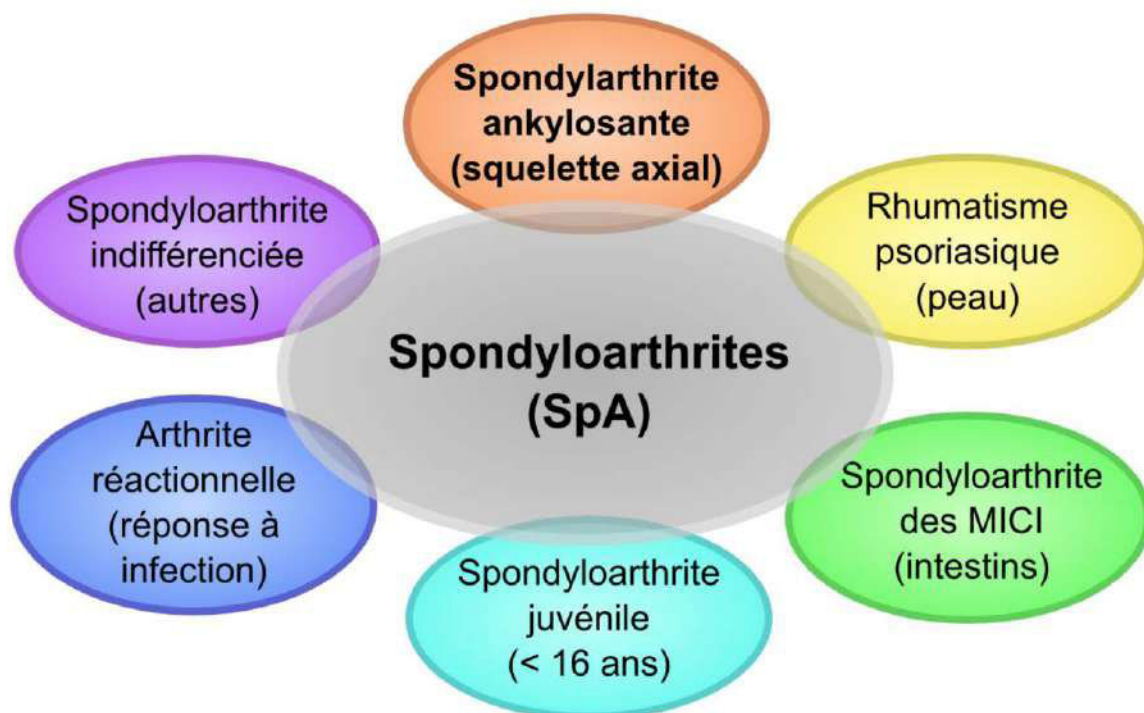


Figure 1 : Les différents sous-types de SpA [1]

On distingue, parmi les spondyloarthrites (SpA), six formes de maladies comprenant la spondylarthrite ankylosante (SA), les rhumatismes psoriasiques (RhumPso), les spondyloarthrites des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), les spondyloarthrites à début juvénile (AJI, *Arthrite Juvenile Idiopathique*), les arthrites réactionnelles (Aré), et les formes indifférenciées de la spondyloarthrite (USpA).

Introduction

I. La spondylarthrite ankylosante

A. Epidémiologie

1) Les spondylarthropathies et la spondylarthrite ankylosante

a) Les différents sous-types de spondylarthropathies

Les rhumatismes inflammatoires chroniques (RIC) forment un groupe de maladies qui se caractérisent par une réaction inflammatoire inappropriée intéressant les articulations et les structures péri-articulaires et qui persiste dans le temps. L'ensemble de ces pathologies se manifestent ainsi par des douleurs, des gonflements et parfois un enraidissement des articulations, aboutissant à une situation d'handicap important [2]. On distingue parmi les RIC, deux formes emblématiques : la polyarthrite rhumatoïde (PR) et les spondyloarthrites (SpA). La PR et les SpA occupent, de par leur fréquence, respectivement le premier et le second rang des RIC. Bien que ces maladies présentent certains aspects similaires, elles se distinguent sur deux critères majeurs. Du point de vue clinique, la PR touche principalement les articulations des membres, tandis que les SpA affectent surtout celles de la colonne vertébrale et du bassin. Sur le plan physiopathologique, la PR se présente comme une maladie auto-immune, associée à la présence d'auto-anticorps, du facteur rhumatoïde et d'anticorps anti-peptide cyclique citrulliné (CCP) qui participent à l'entretien de l'inflammation pathologique, contrairement aux SpA qui se caractérisent par la présence d'un marqueur génétique caractéristique, le Human Leukocyte Antigen (HLA)-B27 [3].

Les SpA regroupent un ensemble de maladies caractérisées par des douleurs chroniques, évoluant par "poussées" et affectant principalement les articulations de la colonne vertébrale et du bassin. Les articulations touchées peuvent évoluer, après plusieurs années, vers une ankylose par ossification. L'évolution de la maladie provoque des dommages structuraux et fonctionnels, altérant considérablement la qualité de vie des patients. On distingue parmi les SpA six formes de maladie, la spondylarthrite ankylosante (SA), le rhumatisme psoriasique (RhPso), les arthrites réactionnelles (Aré), les rhumatismes des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), les spondyloarthrites à début juvénile, et les formes indifférenciées de spondyloarthrite (USpA) **[Figure 1]**. Ces pathologies, qui se différencient principalement de par leur présentation clinique et radiologique, partagent le même terrain de prédisposition génétique, dominé par l'allèle du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I, HLA-B27 [4].

La SA, du fait de sa plus grande prévalence, est la forme emblématique des SpA. Elle se caractérise par deux éléments principaux : premièrement, des manifestations rhumatologiques telles que des douleurs du squelette axial, des articulations périphériques, et/ou des enthèses ; deuxièmement, la coexistence possible de manifestations inflammatoires extra-articulaires, en particulier oculaires, cutanées, et digestives. Une aide au diagnostic peut être apportée par la recherche de l'antigène cellulaire HLA-B27, ainsi que par la recherche d'antécédents familiaux de maladies analogues [5, 6].

Étude	Pays	Année	Prévalence % (IC95%)
Boyer <i>et al.</i> ⁸	Eskimos d'Alaska	1994	2,5
Alexeeva <i>et al.</i> ⁹	Chukotka (minorité russe)	1994	2,5
Braun <i>et al.</i> ¹⁰	Allemagne	1998	1,9
Farooqi <i>et al.</i> ¹¹	Pakistan	1998	0,10
Hukuda <i>et al.</i> ¹²	Japon	2001	0,0095
Bruges-Armas <i>et al.</i> ¹³	Espagne	2002	1,6 (0,8 – 2,7)
Minh Hoa <i>et al.</i> ¹⁴	Viet Nam	2003	0,28
Saraux <i>et al.</i> ²	France	2005	0,3 (0,17 – 0,46)
Trontzas <i>et al.</i> ¹⁵	Grèce	2005	0,49 (0,38 – 0,60)
De Angelis <i>et al.</i> ¹⁶	Italie	2007	1,06 (0,78 – 1,38)
Adomaviciute <i>et al.</i> ¹⁷	Lituanie	2008	0,84 (0,53 – 1,21)
Davatchi <i>et al.</i> ¹⁸	Iran	2008	0,23
Onen <i>et al.</i> ¹⁹	Turquie	2008	1,05 (0,70 – 1,05)
Liao <i>et al.</i> ²⁰	Chine	2009	0,78 (0,62 – 0,95)
Haglund <i>et al.</i> ²¹	Suède	2011	0,45 (0,44 – 0,47)
Reveille <i>et al.</i> ²²	États-Unis	2012	1,4 (1 – 1,9)
Costantino <i>et al.</i> ⁴	France	2013	0,43 (0,26 – 0,70)

IC 95% : intervalle de confiance à 95%

Tableau 1 : Prévalence de la SpA à travers le monde [7].

b) Epidémiologie de la spondylarthrite ankylosante

La SA figure parmi les rhumatismes inflammatoires chroniques les plus fréquents en France et dans le monde, après la polyarthrite rhumatoïde. Sa grande hétérogénéité clinique rend toutefois difficile les études épidémiologiques, que ce soit en terme de prévalence, de sexe ratio ou d'âge de survenue [7, 8].

Le taux de prévalence de la SA varie entre 0,1% et 1,4% dans le monde. En Europe, ce taux oscille entre 0,3 et 3,5%, avec un taux de prévalence de l'ensemble des SpA entre 1 et 2%, [9]. La prévalence de l'ensemble des SpA a récemment été évaluée à 0,43% dans la population française [10]. Des études menées dans différents pays, estiment que l'incidence de la SA est comprise entre 0,5 et 14 pour 100.000 personnes par an. Il est difficile de déterminer avec précision la prévalence et l'incidence de la SA dans le monde. Les variations d'une étude à l'autre peuvent être expliquées par plusieurs facteurs, tels que la sélection des critères de dépistage clinique, la prévalence de l'allèle *HLA-B27*, et la sélection des populations cibles. Par exemple, la population des Indiens Haïda au Canada semble avoir la plus forte prévalence de SA, puisqu'elle est comprise entre 4,5 et 10%. Au contraire, la population aborigène d'Australie, présente une prévalence proche de 0 [9] [Tableau 1].

Il est maintenant admis que les hommes semblent être plus souvent atteints par la SA que les femmes, avec un ratio d'environ 2 hommes pour 1 femme. La SA est une maladie qui s'installe de façon progressive, mais semble toucher principalement les jeunes adultes. Les premiers symptômes apparaissent dans 80% des cas avant l'âge de 30 ans. On estime ainsi que l'âge moyen de survenue de la SA est d'environ 26 ans. Cependant, il existe souvent un délai entre la détection des premiers symptômes et le diagnostic définitif, du fait de la difficulté de diagnostic, ce qui modifie ainsi l'âge moyen de survenue apparent [7, 8].

2) Les manifestations cliniques

Les SpA, dont la SA, se caractérisent par des atteintes inflammatoires du squelette axial et périphérique [Figure 2]. Chez certains patients, des atteintes extra-articulaires, tels qu'une uvéite, un psoriasis, ou encore une inflammation de l'intestin, peuvent également survenir [11–16].

a) Les manifestations articulaires

Parmi les manifestations articulaires, les patients atteints de SpA ont comme caractéristique principale l'inflammation des articulations du squelette axial intéressant la colonne vertébrale, la cage thoracique et le bassin [11]. L'inflammation de la colonne vertébrale peut toucher aussi bien l'insertion des ligaments inter-vertébraux que les apophyses postérieures, entraînant des douleurs exacerbées durant la nuit et provoquant une raideur matinale importante. Au niveau du bassin, l'inflammation touche préférentiellement les articulations sacro-iliaques, situées entre le sacrum et l'os iliaque, ce qui se traduit par des douleurs fessières et des douleurs lombaires basses. L'inflammation des articulations de la cage thoracique engendre des douleurs localisées, renforcées par la toux et les éternuements, gênant la respiration.

A côté des atteintes axiales, une inflammation des articulations du squelette périphérique peut aussi être observée chez certains patients, se présentant sous forme d'enthésite ou d'arthrite. L'enthésite est une inflammation de l'enthèse (zone d'insertion des tendons et ligaments à l'os).

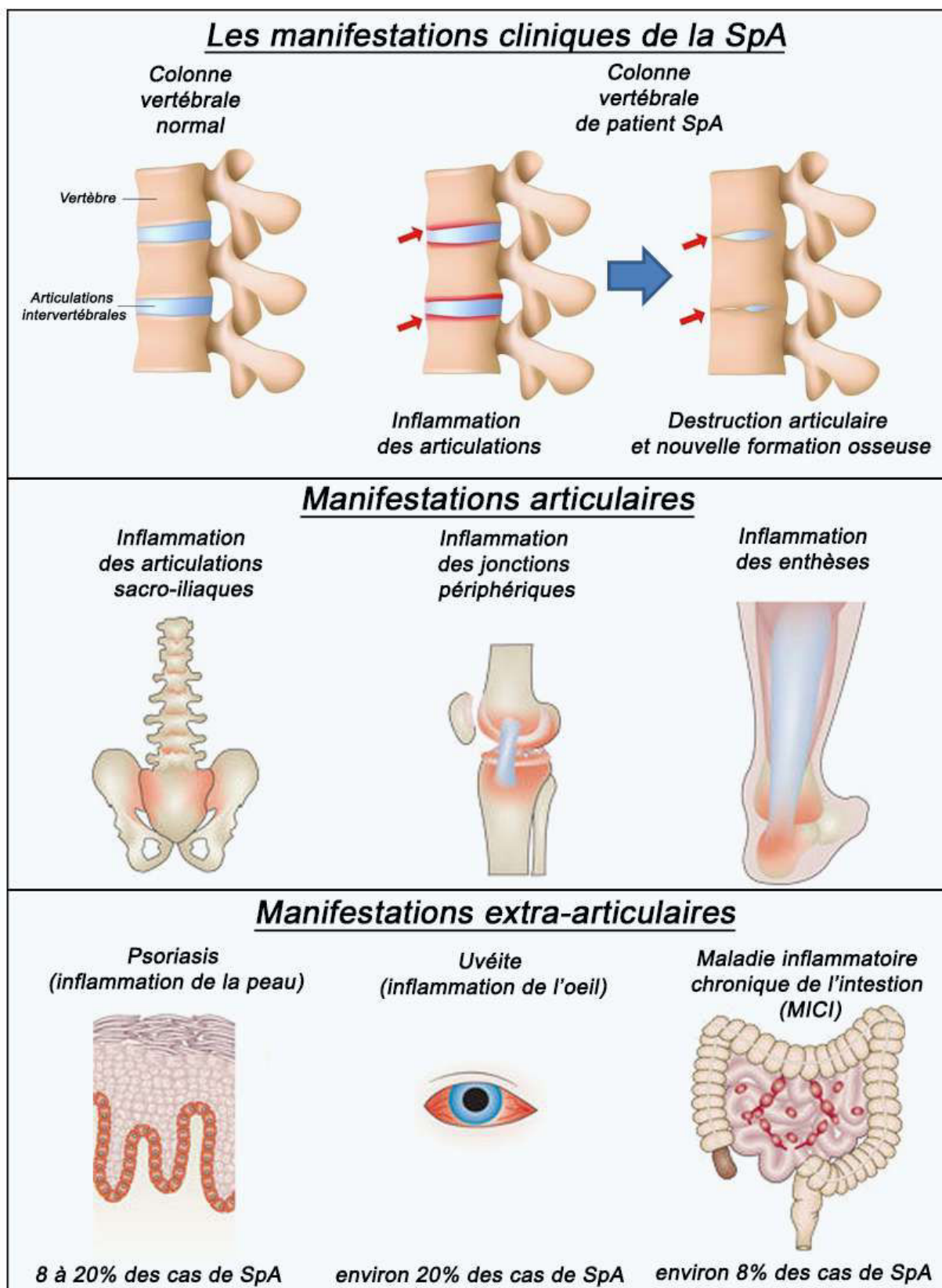


Figure 2 : Les principales manifestations cliniques de la SpA (adapté de Rosenbaum *et al.* [17]).

Les spondyloarthrites se caractérisent par des manifestations articulaires pouvant affecter la colonne vertébrale, les articulations sacro-iliaques, les jonctions périphériques, et les enthèses, ainsi que par des manifestations extra-articulaires, telles que du psoriasis dans 8 à 20% des cas, d'uvéite dans 30 à 50% des cas, et une inflammation chronique de l'intestin dans environ 8% des cas.

Dans la SpA, toutes les enthèses fibro-cartilagineuses sont susceptibles d'être affectées, mais celles des membres inférieurs semblent le plus fréquemment touchées. Les arthrites, elles, sont la conséquence d'une inflammation de la membrane synoviale entourant la cavité articulaire. Les patients atteints de SpA ne développent d'arthrites que de certaines articulations dont la distribution est habituellement asymétrique. Dans certains cas, la survenue d'arthrites de toutes les articulations d'un même doigt ou orteil, réalise une dactylite, qui est très évocatrice du diagnostic de SpA.

Les inflammations du squelette qu'il soit axial ou périphérique peuvent évoluer au cours du temps vers l'ankylose osseuse, qui correspond à l'apparition d'une nouvelle formation osseuse pouvant faire suite à la destruction des articulations. Cette ankylose osseuse peut s'accompagner d'une diminution de l'inflammation et de la douleur. Cependant, elle provoque d'autres conséquences néfastes, comme un enraidissement de la colonne vertébrale (appelée "colonne bambou"), et une restriction des capacités respiratoires pouvant aboutir à une insuffisance respiratoire [12].

b) Les manifestations extra-articulaires

Bien que la SpA se caractérise principalement par des manifestations inflammatoires du squelette, la survenue de manifestations extra-articulaires touchant principalement l'œil, la peau, ou la muqueuse intestinale est observé chez certains patients [11–16].

L'atteinte ophtalmique, appelée uvéite, constitue la manifestation extra-articulaire la plus fréquente. Elle survient chez 30 à 50% des cas de SpA. Elle se caractérise par un œil rouge et douloureux et une baisse de la vue, dus à une inflammation de la chambre antérieure de l'œil (iritis), et du corps ciliaire (cyclite) [18–20]. L'atteinte cutanée ou unguéale, de type psoriasique, survient avec une fréquence variant de 8 à 20% des cas de SpA. Ces lésions psoriasiques sont principalement érythémato-squameuses et se localisent le plus souvent aux faces d'extension des membres, en regard du sacrum, au cuir chevelu, et aux ongles [21, 22]. L'atteinte digestive, observée chez environ 8% des patients SpA, se caractérise par une inflammation de la paroi intestinale provoquant des diarrhées glairo-sanglantes et de violentes douleurs abdominales [23]. Enfin, dans de très rares cas, des atteintes génitales (urétrites aseptiques) et des troubles cardiaques de la conduction auriculo-ventriculaire ou des valves peuvent être observés chez des patients atteints de SpA [11–16].

3) Les traitements

Actuellement, aucun traitement curatif spécifique permettant la guérison de la SpA n'existe. Les stratégies thérapeutiques actuelles sont essentiellement symptomatiques. Ainsi, de nombreuses recherches ont été effectuées au cours des dernières années afin de développer des traitements et molécules permettant de lutter contre la douleur et la prévention de l'ankylose chez les patients. La prise en charge du patient associe la rééducation physique et les traitements médicamenteux. On distingue globalement trois phases de traitements, qui sont établies suivant l'avancée du développement de la maladie [24][Figure 3].

a) Première phase

Les traitements s'adressant aux patients atteints de SpA sont de type médicamenteux et non-médicamenteux. En première intention, le traitement repose sur les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), permettant ainsi de réduire la douleur et la raideur. De façon générale, tous les AINS peuvent avoir une efficacité similaire sur la réduction des symptômes chez le patient atteints de SpA.

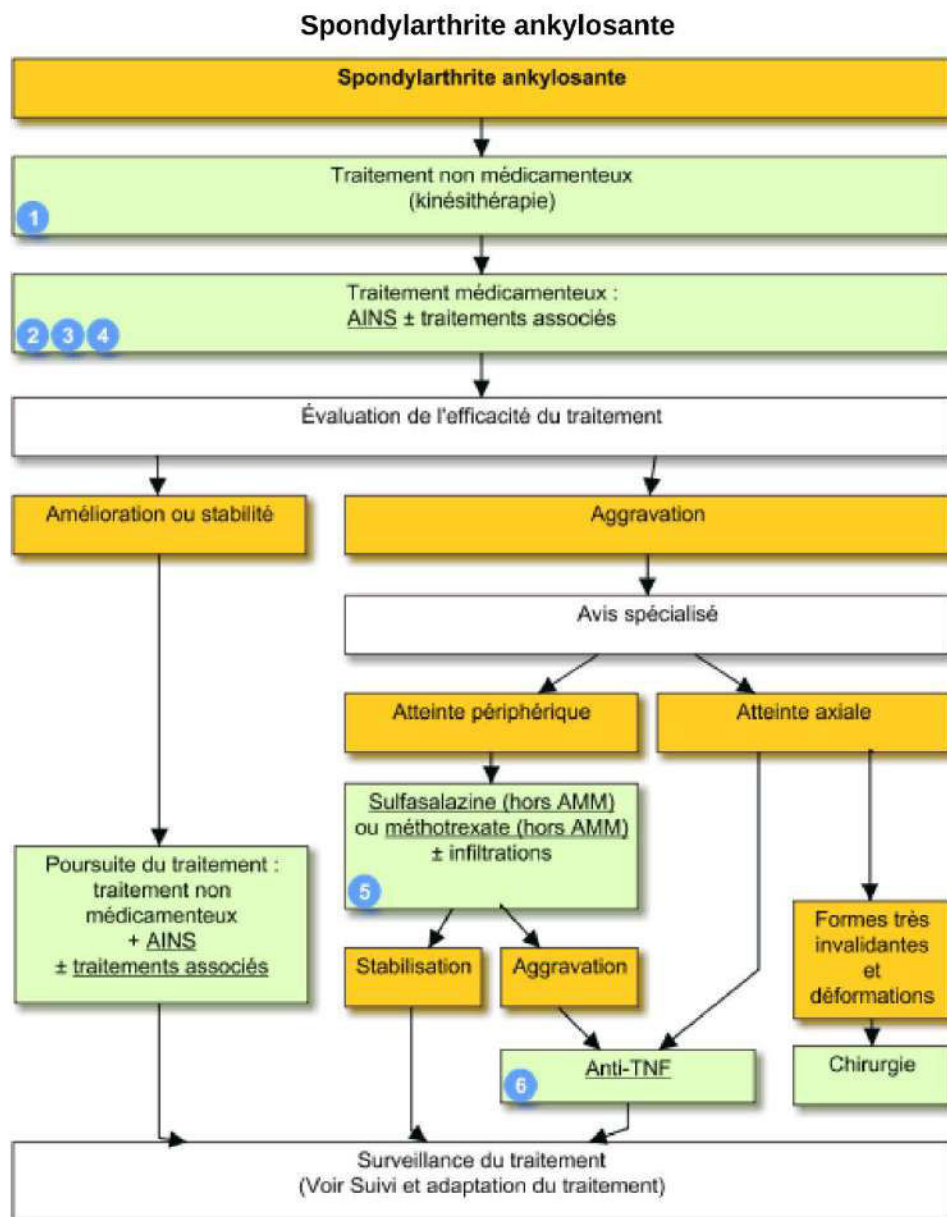


Figure 3 : Les stratégies thérapeutiques pour la prise en charge des patients SpA (d'après la base de données VIDAL Recos : [25]).

1 : Traitement non médicamenteux, 2 : Choix d'un traitement médicamenteux, 3 : Traitement par anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS), 4 : Traitement associés (corticoïdes locaux), 5 : Traitements médicamenteux hors AINS (Sulfasalazine, méthotrexate...), 6 : Prescriptions d'anti-Tumor Necrosis Factor (anti-TNF). AMM : Autorisation de mise sur le marché.

Cependant, le choix et la posologie doivent être adaptés pour limiter les effets secondaires qu'ils pourraient provoquer, telles que les ulcérations gastriques, ou intestinales pouvant aggraver une maladie inflammatoire intestinale. En complément sont ajoutés des traitements non-médicamenteux, pouvant comprendre des séances de kinésithérapie, d'ergothérapie, de podologie, ou des appareillages, afin de soulager la raideur des articulations [26–28].

b) Deuxième phase

Si l'efficacité des AINS permet de stabiliser, voire d'améliorer, les douleurs du patient, le traitement sera poursuivi. Dans le cas contraire, des traitements dits de fond, sont prescrits aux patients. On a parfois recours aux traitements de fond dits conventionnels, couramment utilisés pour la PR, qui sont efficaces pour réduire l'inflammation articulaire dans cette maladie, tels que le méthothrexate, le sulfasalazine ou le léflunomide [29–31]. Bien qu'ils soient parfois également efficaces sur les manifestations périphériques (enthésite, arthrite) des SpA, ces traitements de fond n'ont que peu ou pas d'effet dans les formes axiales, caractéristiques de la maladie.

A l'heure actuelle, les seuls traitements de recours efficaces en cas d'échec des traitements ci-dessus, sont les médicaments biologiques anti-tumor necrosis factor α (anti-TNF- α) [32, 33]. Actuellement, il existe 5 anti-TNF- α sur le marché qui peuvent être utilisés pour traiter la SpA : l'infliximab, l'etanercept, l'adalimumab, le golimumab, et le certolizumab-pegol [34–38]. Leur action est de bloquer le TNF- α , un médiateur pro-inflammatoire, qui est mis en jeu chez les patients SA. Leur efficacité est clairement démontrée sur la réduction des douleurs et de l'inflammation, avec une amélioration très significative chez environ 40% des patients. Leur effet préventif sur la progression structurale de la maladie est probable même si elle est encore controversés. Par ailleurs, d'autres médicaments biologiques, tels que le secukinumab, un anticorps dirigé contre l'IL-17, ont montré une efficacité prouvée sur l'arthrite psoriasique et les formes axiales de la SA [39]. Comme la plupart des médicaments, ces traitements présentent des risques d'effets secondaires, tels qu'une augmentation des risques infectieux, ce qui nécessite un suivi rigoureux des patients lors de l'administration de ces molécules.

En revanche, de récentes études sur l'ustekinumab, un inhibiteur monoclonal de la sous-unité protéique p40 des cytokines humaines IL-12 et IL-23, ne semblent pas montrer une réelle efficacité sur le traitement des formes axiales de la SA [40]. De même, d'autres traitements prescrits dans la PR, tels que l'anakinra (anti-IL-1), le rituximab (anti-CD20) ou le tocilizumab (anti-IL-6), ne se sont pas révélés véritablement efficaces dans la SpA [41–43].

c) Troisième phase

Dans les cas les plus graves d'évolution de la maladie, des opérations chirurgicales sont envisageables pour corriger la destruction de la hanche ou du genou mais aussi, dans de rares cas, pour corriger les déformations de la colonne vertébrale. Les arthroplasties (pose d'une prothèse de la hanche) sont devenues un traitement courant avec une réelle efficacité et peu de risques[24, 26, 27].

B. Physiopathologie

La physiopathologie de la SA n'a pas encore été entièrement élucidée à ce jour. Cependant, plusieurs facteurs favorisant l'apparition de la maladie ont été identifiés. L'ensemble des travaux menés à ce jour suggère une interaction entre des facteurs génétiques et environnementaux, ainsi que le développement d'une réponse immunitaire anormale. La physiopathologie de la SA peut se caractériser par deux points : une inflammation initiale excessive qui aboutit à une érosion osseuse et une phase réparatrice excessive des articulations lésées entraînant une néoformation osseuse, provoquant l'ankylose articulaire [44–46].

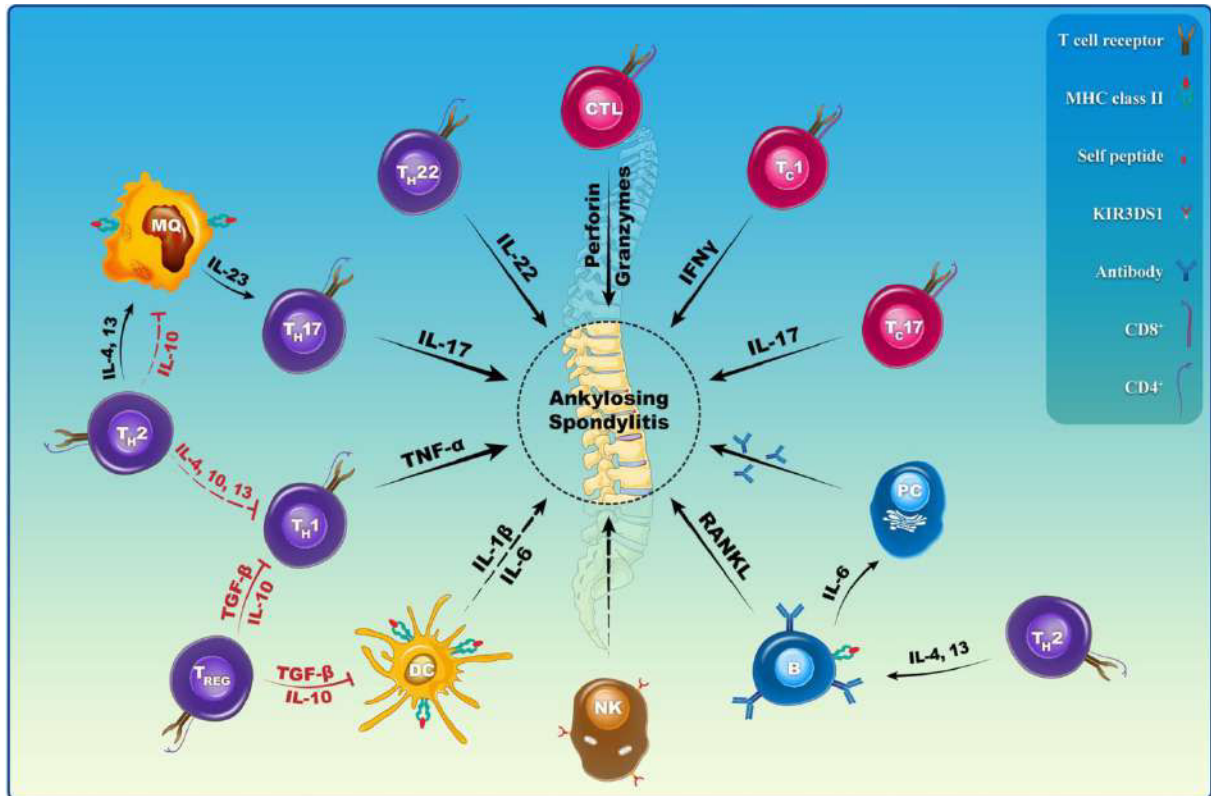


Figure 4 : Implication des cellules immunitaires dans la physiopathologie de la SpA [47]

Implication des différentes cellules de l'immunité innée et adaptative sur l'initiation, la progression et la régulation dans la spondylarthrite ankylosante. MQ : Macrophage, Th1 : Lymphocytes Th1, Th2 : Lymphocytes Th2, Th17 : Lymphocytes Th17, Th22 : Lymphocytes Th22, Treg : Lymphocytes T régulateur, DC : Cellule dendritique, NK : Cellule Natural Killer, B : Lymphocyte B, CTL : Lymphocyte T cytotoxique, Tc1 : Lymphocyte T cytotoxique 1, Tc17 : Lymphocyte T cytotoxique 17, PC : Cellule plasmatique. Plusieurs interleukines pro-inflammatoires sont sécrétées par ces cellules : IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-22, IL-23. RANKL : Receptor Activator Of NF- κ B Ligand, TGF- β : Transforming Growth Factor β , TNF- α : Tumor Necrosis Factor α .

1) Inflammation et rôle des cellules immunitaires

L'une des premières étapes du développement de la SA consiste en une inflammation inappropriée des articulations entraînant douleur et raideur. De nombreuses études démontrent l'importance du système immunitaire dans la pathogenèse de la SA, se caractérisant par un déséquilibre dans la production et l'activation des cellules immunitaires innées et adaptatives et une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires [47, 48] **[Figure 4]**.

Parmi les cellules innées du système immunitaire, le rôle princeps des cellules présentatrices d'antigène et notamment des cellules dendritiques a été proposé dans le processus de déclenchement de la SA. Ces cellules promeuvent l'activation des lymphocytes T helper 17 (Th17) qui induisent l'expression de facteurs pro-inflammatoires tels que l'interleukine 6 (IL-6), l'interleukine 1 β (IL-1 β), l'interleukine 17 (IL-17) et l'interleukine 23 (IL-23) [48]. Les macrophages, qui jouent un rôle essentiel dans l'immunité innée, jouent également un rôle important dans l'inflammation de la membrane synoviale en favorisant la production d'IL-23. Enfin, les cellules natural killers (NK) sont significativement plus fréquentes dans la circulation des patients atteints de SA [49, 50].

En ce qui concerne les cellules du système immunitaire adaptatif, les recherches ont identifié de nombreux sous-types de lymphocytes T comme acteurs clés dans le déclenchement et le contrôle de l'inflammation, tels que les lymphocytes Th1, Th2, Th17 et Th22, les lymphocytes T CD8+ cytotoxique et des lymphocytes T régulateurs (Treg). Les cellules effectrices produisent de nombreux facteurs pro-inflammatoires. Notamment, les Th1 et T CD8+ produisent de l'IFN- γ et du TNF- α , les Th2 produisent l'IL-4, l'IL-10, et l'IL-13, les Th17 sécrètent l'IL-17 et les Th22 produisent l'IL-22 [48]. Ces cytokines pro-inflammatoires induisent à leur tour le recrutement des cellules immunitaires, favorisant la création d'un environnement inflammatoire. Par exemple, le TNF- α est une cytokine qui exerce des effets biologiques pleïotropes sur une grande variété de cellules, pour stimuler l'angiogenèse et la migration transendothéliale des leucocytes.

Bien que de nombreux travaux démontrent l'implication des cellules immunitaires dans le développement de la maladie par la production de multiples facteurs pro-inflammatoires, aucun consensus clair n'existe à ce jour. En effet, du fait que les réponses immunitaires innées et adaptatives sont intimement liées, il est difficile de déterminer quelles sont les populations cellulaires déclencheuses de l'inflammation. Il est important de souligner que l'effet des traitements, la durée de la maladie, les facteurs environnementaux et infectieux, peuvent tous modifier l'activation des cellules immunitaires et la réponse inflammatoire.

2) Destruction et formation osseuse

La SA est caractérisée par un déséquilibre entre résorption osseuse et ostéoformation, en faveur d'une formation osseuse excessive qui peut affecter pratiquement tous les segments du squelette. De nombreuses articulations peuvent être touchées par cette formation osseuse excessive, par exemple, au niveau de la colonne vertébrale, des excroissances osseuses, nommés syndesmophytes, combient les espaces intervertébraux. Des formations osseuses appelées enthésiophytes peuvent également apparaître à l'attache des tendons. Ces manifestations se déroulent généralement en trois phases : une phase initiale d'inflammation et d'érosion, une seconde phase de cicatrisation fibreuse, et une phase tardive d'ossification [51–53].

L'inflammation induite par les cellules immunitaires crée un microenvironnement promouvant la destruction tissulaire [54]. Parmi les cytokines pro-inflammatoires fortement exprimées lors de l'inflammation de la SpA, l'IL-17 est décrite pour favoriser l'activation des chondrocytes, engendrant la production de métalloprotéinases matricielles (MMP) et de monoxyde d'azote, qui sont responsables de la destruction cartilagineuse.

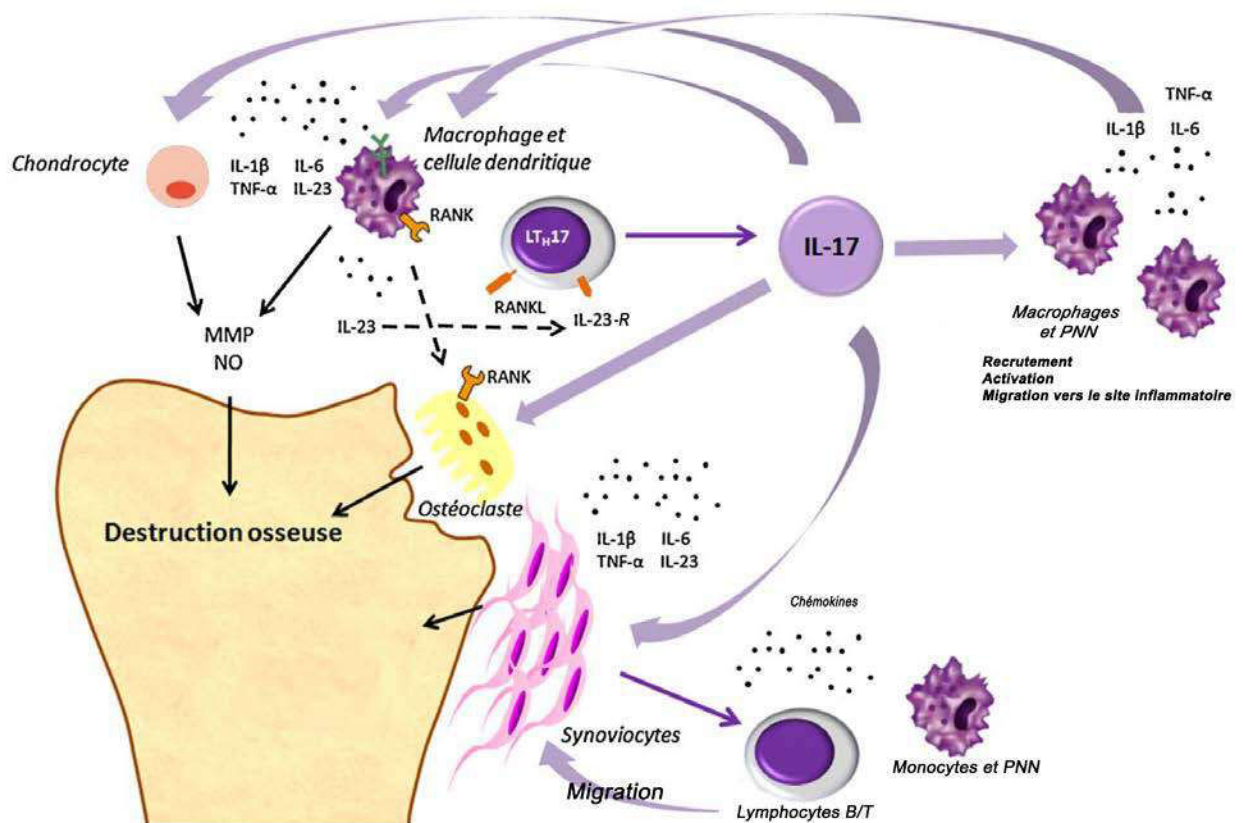


Figure 5 : Destruction articulaire et osseuse dans la SpA [54].

Les Lymphocytes Th17 (Th17) jouent un rôle central dans le processus de destruction osseux, en produisant l'interleukine 17 (IL-17). Cette cytokine pro-inflammatoire peut activer différents types cellulaires, tels que les monocytes, les chondrocytes, les macrophages, les fibroblastes et les ostéoclastes. L'activation de ces cellules conduit à la production de plusieurs autres cytokines pro-inflammatoires, tels que l'IL-1β, le TNF-α, l'IL-6 et l'IL-23, renforçant le recrutement d'autres cellules immunitaires vers le site inflammatoire, tels que les lymphocytes B et T, les monocytes, et les neutrophiles (PNN) ; mais aussi en favorisant le développement et le recrutement des Th17, créant une boucle d'amplification qui conduit à une activation perpétuelle des Th17. L'IL-17 augmente l'expression de la molécule Receptor Activator of NF-κB (RANK) à la surface des précurseurs des ostéoclastes. Les Th17 exprimant à leur surface Receptor Activator Of NF-κB Ligand (RANKL) sont donc capables d'activer directement les ostéoclastes responsables de la résorption osseuse. Par ailleurs, l'activation des chondrocytes et des macrophages conduit à la production de métalloprotéinases (MMP), et de monoxyde d'azote (*Nitric oxide*, NO), responsables de la destruction cartilagineuse.

Les métalloprotéinases jouent un rôle important dans la dégradation de la matrice extracellulaire, et de nombreuses lignées cellulaires produisent des MMP en réponse à différentes cytokines pro-inflammatoires, telles que TNF- α ou l'IL-1. Chez les patients atteints de SA, un taux élevé de MMP-3 est observé dans le tissu cartilagineux, ce qui pourrait engendrer une protéolyse excessive. Par ailleurs, un autre rôle de l'IL-17 est de favoriser l'activation des ostéoclastes en induisant l'expression du Receptor Activator of Nuclear Factor κ B (RANK) à sa surface. Ce dernier peut être activé par les lymphocytes Th17 qui expriment le ligand de RANK (RANKL), ce qui favorise la maturation des ostéoclastes et ainsi l'augmentation de l'ostéoclastogenèse [55] **[Figure 5]**.

Le lien entre inflammation, érosion et formation osseuse excessive a été au cœur de l'attention de nombreux chercheurs au cours de ces dernières années. Différentes hypothèses ont été proposées pour expliquer la relation complexe entre l'inflammation et la néoformation osseuse [56]. Par exemple, l'équipe de Rudwaleit a spéculé sur le caractère fluctuant de l'inflammation dans la SA qui permettrait une réparation tissulaire entre deux phases inflammatoires sous forme de cicatrisation fibreuse [57]. Cependant, ce processus de réparation ne serait pas suffisamment contrôlé, ce qui pourrait aboutir à des dommages persistants et à une production excessive de tissu osseux. Une autre hypothèse suggère que l'inflammation et la formation osseuse pourraient être déclenchées parallèlement à la suite d'un stress mécanique [58]. Dans le cas de la SA, ni l'inflammation, ni la néoformation osseuse ne seraient limitées, ce qui favoriserait le développement des symptômes pathologiques. L'ensemble des mécanismes reliant l'inflammation et la formation osseuse n'a pas encore été entièrement établi. Les biopsies de la colonne vertébrale et des articulations sacro-iliaques étant rares, il est difficile d'obtenir des tissus humains pour une analyse complète du processus. Néanmoins, plusieurs études démontrent que le TNF- α influencerait grandement la synthèse des protéines impliquées dans la formation osseuse, telles que les protéines de la voie des Bone morphogenetic protein (BMP), ou de la signalisation Wingless/Int (Wnt) [59].

Quelques molécules ont été identifiées chez les patients comme pouvant être liées au processus de formation osseuse. Par exemple, la prostaglandine E2 (PGE2), qui joue un rôle dans la stimulation et la différenciation des ostéoblastes, a été trouvée augmentée chez les patients. Le PGE2 induit la synthèse des phosphatases alcalines par les ostéoblastes, ce qui favorise la minéralisation osseuse. D'autre part, la protéine Wnt a aussi été trouvée augmentée chez les patients atteints de SA. Cette protéine induit la formation osseuse, en induisant la transcription de gènes impliqués dans la différenciation ostéoblastique. Par ailleurs, une réduction de la concentration de Dickkopf-related protein 1 (DKK-1), un récepteur antagoniste de la signalisation Wnt pouvant être aussi associé à la formation osseuse, a été rapportée chez ces patients [60].

Enfin, d'autres molécules impliquées dans la voie des BMP, tels que les ligands BMP-2 et BMP-7, ont été trouvés à des taux anormalement élevés dans le sérum de patients atteints de SA. La protéine BMP-2 est associée à la différenciation chondrogénique précoce, tandis que BMP-7 est impliquée dans les stades tardifs de différenciation des chondrocytes. Il est intéressant de noter que l'injection de la protéine Noggin, un antagoniste de la signalisation BMP, réduit l'apparition de néoformation osseuse dans un modèle murin de SA. Ces résultats suggèrent que la voie BMP pourrait jouer un rôle important dans le développement des manifestations de la maladie [60].

En conclusion, de nombreux travaux ont permis d'obtenir une meilleure vision des populations et des processus cellulaires impliqués dans la physiopathologie de la SA. Toutefois, les recherches doivent être poursuivies afin de compléter les précédentes études, dans le but de saisir l'étendue des mécanismes impliqués dans le développement de la maladie, et d'établir de nouveaux traitements thérapeutiques pour les patients.

Relevance to disease pathogenesis	Gene/locus	Encoded protein	Chr. location	Ethnicity	References
Interferon, TNF α /NF κ B activation and signaling	<i>IL-1R1/2^P</i>	Interleukin 1 receptor 2	2q12	European	[5]
	<i>LTBR</i>	Lymphotoxin β -receptor (TNFR superfamily, member 3)	12p13	European	[6]
	<i>UBE2E3</i>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2E3	2q32.1	European	[7]
	<i>PTGER4[*]</i>	Prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)	5p13.1	European	[5,7]
	<i>CARD9</i>	Caspase recruitment-domain family member 9	9q34.3	European	[7]
	<i>TRADD[*]</i>	TNFRSF1A-associated via death domain	16q22	European	[6]
	<i>TNFRSF1A</i>	Tumor-necrosis factor-receptor superfamily member 1A	12p13.2	European	[6,7]
	<i>TBKBP1</i>	TNFR-associated factor family member-associated nuclear factor- κ B-binding kinase 1-binding protein	17q21.32	European	[7]
	<i>TBX21</i>	T-box 21	17q21.32	European	[7]
	<i>TYK2</i>	Tyrosine kinase 2	19p13.2	European	[7]
	Th-17 differentiation and signaling	<i>IL-23R</i>	Interleukin 23 receptor	1p31.3	European
<i>IL-12RB2</i>		Interleukin 12 receptor, β 2	1p31.3-p31.2	European	[7]
<i>IL-6R</i>		Interleukin 6 receptor	1q21	European	[7]
<i>PTGER4[*]</i>		Prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)	5p13.1	European	[5,7]
<i>IL-12B</i>		Interleukin 12B	5q31.1-q33.1	European	[6,7]
<i>IL-27</i>		Interleukin 27	16p11	European	[7]
<i>TYK2</i>		Tyrosine kinase 2	19p13.2	European	[7]
Th-1 differentiation and signaling	<i>TBX21</i>	T-box 21	17q21.32	European	[7]
CD8 ⁺ T-cell differentiation and signaling	<i>RUNX3</i>	Runt-related transcription factor 3	1p36	European	[6,7]
	<i>EOMES[*]</i>	Eomesodermin	3p24.1	European	[7]
	<i>IL-7R[*]</i>	Interleukin 7 receptor	5p13	European	[7]
	<i>ZMIZ1</i>	Zinc finger, MIZ type-containing 1	10q22.3	European	[7]
CD4 ⁺ T-cell differentiation and signaling	<i>BACH2</i>	BTB and CNC homology 1, basic leucine-zipper transcription-factor 2	6q15	European	[7]
	<i>SH2B3</i>	Src homology 2B adaptor protein 3	12q24	European	[7]
	<i>ICOSLG</i>	Inducible T-cell costimulator ligand	21q22.3	European	[7]
Antigen presentation and binding	<i>UBE2E3</i>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2E3	2q32.1	European	[7]
	<i>IL-7R[*]</i>	Interleukin 7 receptor	5p13	European	[7]
	<i>ERAP1</i>	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1	5q15	European	[5-7]
	<i>ERAP2</i>	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 2	5q15	European	[7]
	<i>LNPEP</i>	Leucyl/cystinyl aminopeptidase	5q15	European	[7]
	<i>NPEPPS</i>	Aminopeptidase puromycin-sensitive	17q21	European	[7]
	<i>UBE2L3[*]</i>	Ubiquitin conjugating enzyme E2L3	22q11.21	European	[7]
Macrophage-mediated phagocytosis	<i>FCGR2A</i>	Fc fragment of immunoglobulin G, low-affinity IIa, receptor (CD32)	1q23	European	[7]
Unknown	<i>KIF21B</i>	Kinesin family member 21B	1q32.1	European	[6,7]
	<i>GPR25</i>	G-protein-coupled receptor 25	1q32.1	European	[7]
	<i>HHAT[*]</i>	Hedgehog acyltransferase	1q32	European	[7]
	Unknown	Unknown	2p15	European Han Chinese	[5-8]
	<i>GPR35</i>	G-protein-coupled receptor 35	2q37.3	European	[7]
	<i>NKX2-3</i>	NK2 homeobox 3	10q24.2	European	[7]
	<i>GPR65</i>	G-protein-coupled receptor 65	14q31-q32.1	European	[7]
	<i>GPR37[*]</i>	G protein-coupled receptor 37	7q31	European	[7]
	<i>SULT1A1</i>	Sulfotransferase family cytosolic 1A	16p12.1	European	[7]
	Unknown	Unknown	21q22	European	[5-8]

Tableau 2 : Les principaux gènes de prédisposition à la SpA découverts par des études GWAS [61]

Les gènes "en gras" sont impliqués dans de nombreux processus biologiques et dans de nombreuses voies de signalisation de la pathogenèse de la SpA.

C. Etiologie

1) Les facteurs génétiques

a) HLA-B27, le principal facteur génétique de prédisposition

Les premières hypothèses sur l'hérédité de la SA remontent aux années 1950 et ont depuis permis d'apporter de nombreuses informations pour la compréhension de cette pathologie [62, 63]. L'hypothèse d'une composante génétique fut suggérée devant la fréquence élevée de formes familiales de SA. C'est en 1973 que Caffrey et James ont rapporté pour la première fois la forte association entre la SA et l'antigène HLA-B27 [64]. Cette forte association génétique a été confirmée presque simultanément par l'équipe de Schlosstein et al. [65]. La fréquence de cet allèle est de 90% chez les patients atteints de SA alors qu'elle est inférieure à 10% dans la population caucasienne. La distribution de cet allèle varie toutefois beaucoup d'une population à l'autre. La prévalence de HLA-B27 est plus élevée dans les populations nordiques, comme en Norvège ou au Canada, alors qu'elle est plus faible dans les pays d'Afrique ou en Australie. Selon la zone géographique, les taux de prévalence et d'incidence de la SpA varient d'une façon parallèle à la prévalence du HLA-B27.

L'allèle HLA-B27 rend compte de la plus forte composante génétique de la SA et est un dénominateur génétique commun avec toutes les autres formes de SpA. La prévalence de HLA-B27 varie suivant le sous-type : dans la SA, environ 90% des patients sont porteurs de ce facteur alors que dans l'Aré, le pourcentage varie entre 70 et 76% ; dans les RhPso, ce facteur génétique est présent chez 40 à 70% des patients ; enfin dans les SpA associées aux MICI, il n'est présent que chez 40 à 60% des patients [63].

La recherche de l'allèle *HLA-B27*, qui fait partie des critères de classification de l'*Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS)* constitue un test diagnostique de routine lors d'une suspicion de SpA.

Bien que 90% des patients atteints de SA soient porteurs du HLA-B27, ce facteur génétique ne contribue qu'à hauteur de 20% à 50% de l'héritabilité génétique totale de la SA. Ainsi, on note que 10% à 25% des patients atteints de SpA ne possèdent pas l'allèle *HLA-B27*. D'autre part, seule une minorité de porteurs du HLA-B27, de l'ordre de 5%, développent une SpA : la présence de l'allèle *HLA-B27* n'implique donc pas forcément la survenue de la maladie. Ces données indiquent que d'autres facteurs génétiques et environnementaux doivent être responsables de la pathologie [66, 67].

b) Les autres facteurs génétiques

HLA-B27 constitue le facteur de prédisposition génétique principal de la SpA, mais ne rend compte que d'environ 30% de l'héritabilité de la maladie. Comme décrit précédemment, la SpA est une maladie polygénique [68, 69]. Les études de liaison et/ou d'association génétique portant sur différentes cohortes de patients atteints de SpA ont permis d'identifier d'autres facteurs génétiques associés à la maladie [67]. Les principaux gènes découverts peuvent être regroupés en quatre catégories fonctionnelles [61, 69][**Tableau 2**] :

- Les gènes associés à la présentation du peptide

La première étude d'association génétique pangénomique a démontré l'association de la SA à un gène impliqué dans la voie de présentation du peptide par le CMH de classe I, le gène *Endoplasmic réticulum aminopeptidase 1* (ERAP1), ce qui a été confirmé par de nombreuses autres études [70]. Par la suite, l'association à deux autres aminopeptidases du RE : ERAP2 et *l'aminopeptidase puromycin-sensible* (NPEPPS) ont été démontrées [71].

Toutes ces aminopeptidases, qui se situent dans le RE, sont impliquées dans le chargement des peptides sur les molécules du CMH de classe I, dont HLA-B27 fait partie. D'autres gènes, tels que l'*Ubiquitin-conjugating enzyme E2 E3 (UBE2E3)* et l'*Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3 (UBE2L3)*, qui codent pour des enzymes d'activation de l'ubiquitine, ont été découverts, comme associés à la SA [68]. L'ubiquitinylation est un processus consistant à accrocher l'ubiquitine à des protéines, pour permettre, par exemple, leur dégradation *via* le protéasome. Les peptides issus de cette dégradation sont pris en charge, dans le RE par les aminopeptidases permettant d'assurer leur chargement sur les molécules du CMH. Ces gènes se sont par ailleurs révélés être associés à d'autres maladies inflammatoires, ce qui suggère leur implication dans plusieurs processus pathogéniques[72, 73].

- Les gènes de la voie de l'IL-23

Un autre gène de susceptibilité à la SA, dont l'association a été démontrée par de nombreuses études, est celui du récepteur à l'interleukine 23 (IL23R) [74]. D'autres gènes de cette voie ont par la suite été associés à la SA. Parmi ceux-ci, on notera les gènes *IL23*, *Non-receptor tyrosine-protein kinase (TYK2)* et *Janus kinase 2 (JAK2)*. Il est d'ailleurs intéressant de voir que la sur-expression d'*IL23* est suffisante pour provoquer des manifestations de SpA dans un modèle souris. En outre, l'IL-23 s'est révélé surexprimé dans l'intestin des patients atteints de SA. Cette voie d'activation est impliquée dans la différenciation des lymphocytes T auxiliaires CD4+ (T CD4+) en lymphocytes Th17, qui sont impliqués dans la SpA et le psoriasis. Par conséquent, cette voie pourrait jouer un rôle primordial dans la SA et d'autres pathologies inflammatoires.

- Les gènes de différenciation et d'activation lymphocytaire

De nombreux autres gènes impliqués dans le développement et l'activation des cellules lymphocytaires ont été associés à la SA [68]. On peut citer des gènes de la famille de l'IL-1 et de l'IL-6 dont le rôle a bien été décrit dans la réponse inflammatoire. De plus, des études d'association pangénomique (GWAS) ont révélé une association entre le gène du récepteur de l'IL-6 (*IL6R*) et la SA. Parmi les gènes impliqués dans le développement des cellules lymphocytaires, on peut citer *Runt-related transcription factor 3 (RUNX3)*, *Eomesodermin (EOMES)*, *Zinc Finger MIZ-Type Containing 1 (ZMIZ1)*, *Interleukin 1 receptor type II (IL1R2)* ou bien *IL12B*, qui sont des déterminants majeurs de la différenciation et de l'activation des cellules immunitaires. L'ensemble de ces données suggère que ce processus est primordial dans la pathogenèse de la SA.

- Les gènes de récepteurs couplés aux protéines G

Les analyses menées par le consortium *International Genetics of Ankylosing Spondylitis (IGAS)*, ont permis l'identification de nombreux gènes associés à la SA, dont certains ont été décrits précédemment [68]. Parmi les autres, on notera 3 gènes codant pour des récepteurs couplés aux protéines G : *G protein-coupled receptor 35 (GPR35)*, *GPR37* et *GPR65*. Les protéines codées par ces gènes sont impliquées dans divers processus biologiques. A titre d'exemple, GPR65 joue un rôle important dans l'apoptose des thymocytes, ce qui suggère une importance de cette protéine dans les processus de développement des lymphocytes T dans le thymus, pouvant ainsi influencer le déclenchement de la maladie. Quant à GPR35, il est exprimé dans les cellules immunitaires et le tissu gastro-intestinal, qui sont des tissus cibles impliqués dans le développement de la SA. Cependant, encore peu d'études ont concerné ces protéines, et leur lien concret avec la pathologie reste largement inexpliqué.

En conclusion, bien que de nombreux facteurs génétiques autres qu'*HLA-B27* aient été identifiés par les analyses à haut débit, la part génétique de l'ensemble de ces gènes ne permet pas d'expliquer plus de 4,3% de l'héritabilité [67]. Ainsi il reste de nombreux autres facteurs génétiques encore inconnus, mais probablement aussi des facteurs environnementaux, impliqués dans le développement de la pathologie.

2) Les facteurs environnementaux

Les données actuelles suggèrent que le développement de la SA repose sur une interaction entre facteurs génétiques et environnementaux. Parmi ces derniers, l'implication d'agents infectieux pathogènes et le rôle du microbiote intestinal ont été évoqués dans le déclenchement de la SA [75].

a) Infections

De nombreuses études, dans le contexte particulier de l'ARé, se sont intéressées à l'implication des bactéries dans la physiopathologie des SpA, comme agents déclencheurs de la maladie. Parmi ces bactéries, une association a été décrite entre la SA et une surreprésentation dans les selles de la bactérie Gram - *Klebsiella pneumoniae*, il y a plusieurs décennies [75]. Cette dernière est souvent présente dans la flore intestinale habituelle, mais pourrait, selon certains auteurs, se comporter comme un agent pathogène opportuniste dans le cas de la SpA. En faveur de cette hypothèse, des taux élevés d'anticorps dirigés contre cette bactérie ont été rapportés dans le serum des patients atteints de SpA par rapport à des sujets sains ou atteints d'autres pathologies. Cependant, des études indépendantes, n'ont pas confirmé l'augmentation de cette bactérie chez les patients atteints de SpA, remettant en cause le rôle pathogène de ce micro-organisme [76] .

Partant de l'observation initiale, plusieurs études se sont attachées à comprendre un effet causal possible de cette bactérie dans le développement de la SpA. L'une des observations les plus prometteuse a été rapportée par Ebringer *et al.* en 1976, démontrant une réactivité croisée entre des protéines de *K. pneumoniae* et la molécule HLA-B27, conduisant à l'hypothèse que le HLA-B27, de part sa conformation, pourrait mimer des antigènes bactériens, tels que ceux de *K. pneumoniae*, favorisant une réponse immunitaire croisée pathogène [77]. Par la suite, Geczy *et al.* ont mis en évidence que des antisérums dirigés contre certains isolats de *K. pneumoniae* favorisaient la lyse des lymphocytes de patients atteints de SA et porteurs du HLA-B27, et non pas de ceux des patients HLA-B27 négatif [78]. Ces données renforcent l'idée d'un lien pathologique possible entre la présence de l'antigène HLA-B27 et de *K. pneumoniae* et la survenue d'une SA. Toutefois, ces résultats suggérant l'implication particulière de la bactérie *K. pneumoniae* dans le déclenchement de la SpA n'ont pas été confirmés depuis leur description initiale. Cependant de nombreuses questions demeurent, et des recherches plus approfondies doivent être menées pour mieux comprendre l'implication des des bactéries dans la physiopathologie de la SpA [79, 80].

b) Microbiote

Des études plus récentes ont montré une modification du microbiote intestinal, ou dysbiose, chez les patients atteints de SpA. Le microbiote correspond à l'ensemble des micro-organismes, bactéries, champignons et virus, présents dans un environnement spécifique, appelé microbiome. Le microbiote intestinal joue un rôle essentiel pour la physiologie de notre système digestif et renforce les défenses immunitaires, notamment en participant au rôle de barrière face à des agents pathogènes. Des altérations du microbiote intestinal sont décrites dans de nombreuses pathologies chroniques comme l'obésité, les maladies du foie, mais aussi les maladies rhumatismales inflammatoires [81–83].

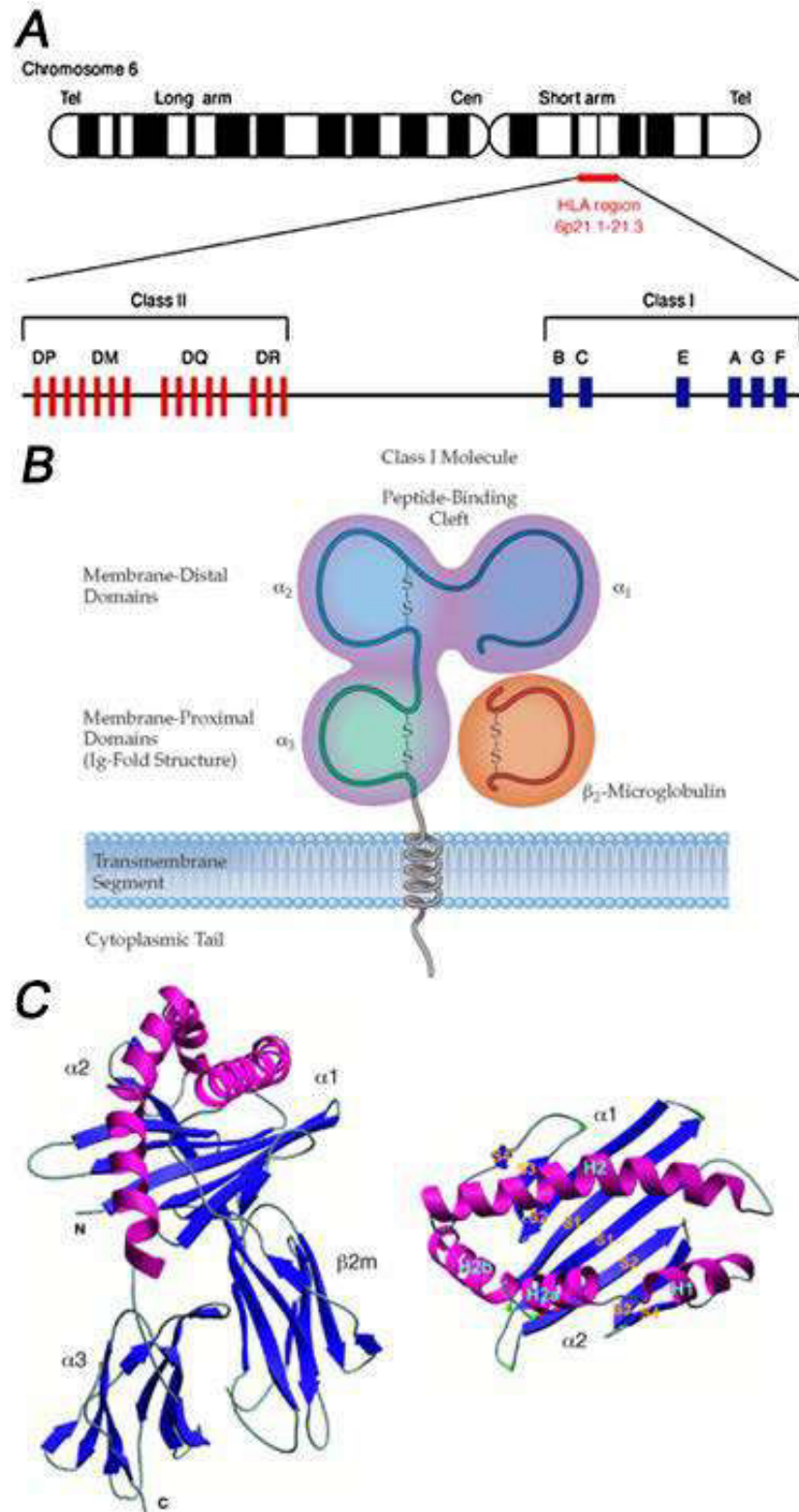


Figure 6 : Structure tridimensionnelle de la molécule HLA-B27 (adapté de Moalic *et al.* et Janeway *et al.* [84,85]).

(A) Le système des antigènes des leucocytes humains (HLA) est situé sur le bras court du chromosome 6 chez l'Homme. Il se compose de 6 locus : le HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DQ, et HLA-DP. (B) HLA-B27 est un CMH de classe I qui se compose d'une chaîne lourde : HLA-B27 (violet) comportant 3 domaines, notés α_1 , α_2 et α_3 , et d'une chaîne légère invariante : la β_2 -microglobuline (orange). Les domaines α_1 et α_2 forment le site de liaison du peptide, tandis que le domaine α_3 , hydrophobe, constitue le site d'ancrage à la membrane plasmique. La β_2m s'associe à la chaîne lourde au niveau des domaines α_2 et α_3 . (C) Structure tridimensionnelle du HLA-B27 selon une vue de côté (à gauche) ou d'une vue de dessus (à droite). Les hélices α constituant le site de liaison du peptides sont représentés en violet. Les feuillets β des protéines HLA-B27 et β_2m sont représentés en bleu.

Dans le cas de la SpA, des perturbations du microbiote intestinal a été particulièrement soupçonnées car une inflammation intestinale infra-clinique est détectable chez deux tiers des patients et une véritable MICI chez près de 10% d'entre eux. Qui plus est, plusieurs éléments suggèrent que l'apparition de la SpA pourrait être influencée par le microbiote intestinal. En effet, au cours de la phase active de la maladie, les patients atteints de SpA ont un taux élevé d'IgA, ainsi que des signes de rupture de la barrière intestinale [86, 87]. Une telle perturbation de la barrière du tractus gastro-intestinal est susceptible d'entraîner une altération du microbiote intestinal pouvant favoriser l'entrée de bactéries dans la couche sous-épithéliale et induire une inflammation intestinale. Le séquençage des gènes codant les ARN 16S bactériens sur des biopsies intestinales de patients atteints de la SA, ont mis en évidence une augmentation de la représentation de cinq familles bactériennes (*Lachnospiraceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae*, *Porphyromonadaceae* et *Bacteroidaceae*) et une diminution de la quantité de bactéries de la famille *Ruminococcaceae* et *Rikenellaceae* [88, 89]. Des études plus récentes ont mis en évidence une augmentation spécifique de *Ruminococcus gnavus* dans les selles de patients SpA, comparé à des témoins sains et à des patients atteint de PR [90]. Des perturbations du microbiote intestinal pourraient induire une inflammation du tissu intestinal en favorisant le recrutement des cellules immunitaires et l'activation de la réponse inflammatoire. D'une part, l'augmentation du recrutement des macrophages et des DCs favorise l'activation des cellules T naïves dans les tissus lymphoïdes associés à l'intestin [91]. D'autre part, l'activation de ces cellules immunitaires, induit la production de l'IL-23 qui, comme décrit précédemment, paraît augmentée dans la muqueuse intestinale des patients SpA [92, 93].

En conclusion, l'étiologie de la SA repose sur une combinaison d'un terrain génétique, avec un rôle prédominant du HLA-B27, et de déclencheurs environnementaux, tels qu'une infection et/ou une perturbation du microbiote intestinal. De nombreux travaux doivent encore être mis en œuvre pour mieux comprendre la physiopathologie de la SpA.

II. Le complexe majeur d'histocompatibilité : HLA-B

Le système des antigènes de leucocyte humains (HLA), se compose de 6 locus situé sur le bras court du chromosome 6, comprenant *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-DR*, *HLA-DQ*, et *HLA-DP*. Ces locus sont très polymorphes et de ce fait de nombreux allèles ont été identifiés. Les gènes présent sur ces locus codent pour des molécules de surface cellulaire spécialisées dans la présentation des peptides antigéniques aux récepteurs des lymphocytes T.

A. Structure et fonction du HLA-B27

a) Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH)

Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) joue un rôle central dans l'immunité adaptative chez les vertébrés [94] **[Figure 6]**. Il a pour fonction de présenter différents peptides à la surface cellulaire pour leur reconnaissance par les cellules du système immunitaire. On distingue deux classes de CMH, appelées CMH de classe I (CMH-I), codé par les gènes *HLA-A*, *-B*, *-C* et CMH de classe II (CMH-II), codé par les gènes *HLA-DR*, *-DP* et *-DQ*. La séquence de ces gènes est hautement polymorphe, permettant ainsi de présenter un répertoire extrêmement diversifié de peptides. On différencie ces deux classes de CMH par leur structure, les molécules du CMH-II se composent de deux chaînes lourdes, appelées α et β , tandis que les CMH-I se caractérisent par une seule chaîne lourde α , associée par liaison non-covalente à une chaîne légère invariante, la beta-2-microglobuline (β 2m). La chaîne lourde du CMH-I comporte trois domaines, notés α 1, α 2 et α 3.

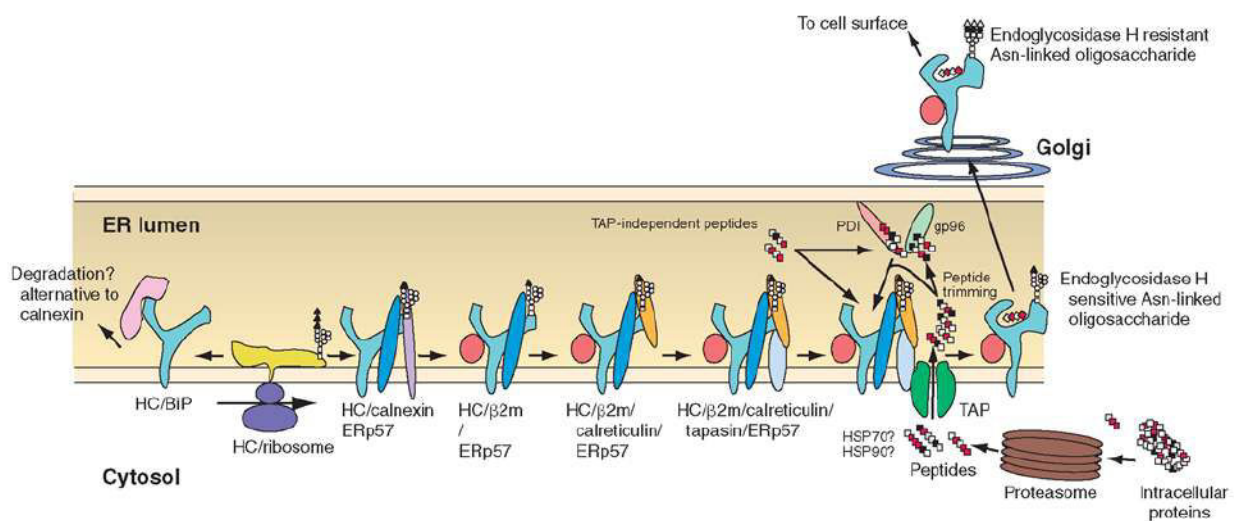


Figure 7 : Mécanismes de repliement des CMH de classe I par le complexe de chargement de peptides [95].

Le processus de repliement des CMH prend lieu dans le réticulum endoplasmique. Ce processus se déroule en trois temps : une étape de repliement des CMH par les protéines chaperonnes, l'importation des peptides dans le RE, et le chargement du peptide. L'ensemble de ce procédé est réalisé par le complexe de chargement de peptides (PLC), qui se compose de six protéines : le transporteur associé au traitement antigénique (TAP), la protéine *endoplasmic reticulum resident protein 57* (ERp57) (appelé aussi GRP58), la calnexine, la calréticuline, la protéine ERAP1 et la tapasine.

Les deux premiers domaines forment le site de liaison du peptide (appelé aussi "poche"), tandis que le domaine $\alpha 3$, hydrophobe, constitue le site d'ancrage à la membrane plasmique. La $\beta 2m$ s'associe à la chaîne lourde au niveau des domaines $\alpha 2$ et $\alpha 3$.

Les molécules du CMH-II, qui sont surtout présentes à la surface des cellules présentatrices d'antigènes, telles que les cellules dendritiques ou les macrophages, seront reconnues par les lymphocytes T-CD4+, impliquées dans la coordination et la régulation de la réponse immunitaire effectrice. Les molécules du CMH-I sont présentées à la surface de toutes les cellules nucléées, pour être reconnues par les lymphocytes T-CD8+. Ces dernières possèdent des fonctions cytotoxiques ou régulatrices de l'inflammation. Ainsi, si le peptide présenté par le CMH est reconnu comme faisant partir du "soi", l'activation des cellules T CD8+ conduit à la tolérance, tandis que si le peptide est reconnu comme "non-soi", une réponse immunitaire est activée.

b) Repliement et aprêtement des molécules de classe I

La bonne conformation des molécules du CMH, ainsi que le bon appariement du peptide antigénique à son site de liaison sont des étapes déterminantes avant leur présentation à la surface cellulaire [Figure 7]. De ce fait, les molécules du CMH-I doivent d'abord être chargées avec des peptides immunodominants de haute affinité, avant d'être exportées vers la membrane [96, 97]. Ce processus se déroule en trois temps. Dans un premier temps, les transcrits codant les chaînes lourdes du CMH de classe I sont exportés du noyau vers le RE pour être traduits. Le répertoire des chaînes α du CMH-I étant fortement polymorphe, chaque individu en possède plusieurs allèles (habituellement deux par locus) codant donc pour plusieurs variants dans chaque cellule, permettant ainsi la présentation d'un grand nombre de peptides différents. Parallèlement, la $\beta 2m$ est synthétisée au niveau du RE. Les chaînes lourde et légère du CMH-I sont prises en charge par différentes protéines chaperonnes, telles que la calnexine et la calréticuline, pour faciliter et contrôler leur repliement, aboutissant à un hétérodimère protéique stable pour sa fixation au peptide [98, 99].

Parallèlement, des fragments peptidiques, issus de la dégradation des protéines cytoplasmiques par le protéasome, sont transportés dans le RE par le biais des protéines TAP-1 et TAP-2 [100]. Ce transporteur hétérodimérique fait passer activement les fragments peptidiques du cytosol vers la lumière du RE, par le biais d'une hydrolyse de l'ATP. Par la suite, ces fragments sont clivés en peptides de 9 à 10 acides-aminés par l'aminopeptidase ERAP1 [101]. Ce clivage joue un rôle majeur dans le processus de traitement des peptides des CMH-I. En effet, les molécules du CMH-I ne peuvent lier que des peptides de cette taille.

Dans un dernier temps, les différents peptides clivés par l'enzyme ERAP1 sont chargés sur les hétérodimères protéiques du CMH-I. Cette étape est réalisée principalement par deux molécules. La tapasine, qui favorise l'interaction des molécules de classe I avec les protéines TAP, facilitant ainsi le chargement des peptides, et la protéine ERP57 permettant la stabilisation finale du complexe CMH-I/peptide, en recrutant les chaperones : calnexine et calréticuline [102].

Finalement, le complexe CMH-I/peptide est exporté du RE vers l'appareil de Golgi, via les vésicules *coat protein complex II* (COP-II), puis vers la membrane plasmique où il interagit avec les lymphocytes T-CD8+ du système immunitaire [103].

B. Les différents sous-types alléliques d'HLA-B27

Le locus *HLA-B* comporte de nombreux allèles, dont *HLA-B27* qui est présent chez 90% des patients atteints de SA [104]. Le *HLA-B27* correspond en fait un nombre important de variants alléliques. Le sous-type *HLA-B*2705* est le plus répandu, présent chez 90% des patients d'origine caucasienne porteurs du *HLA-B27*.

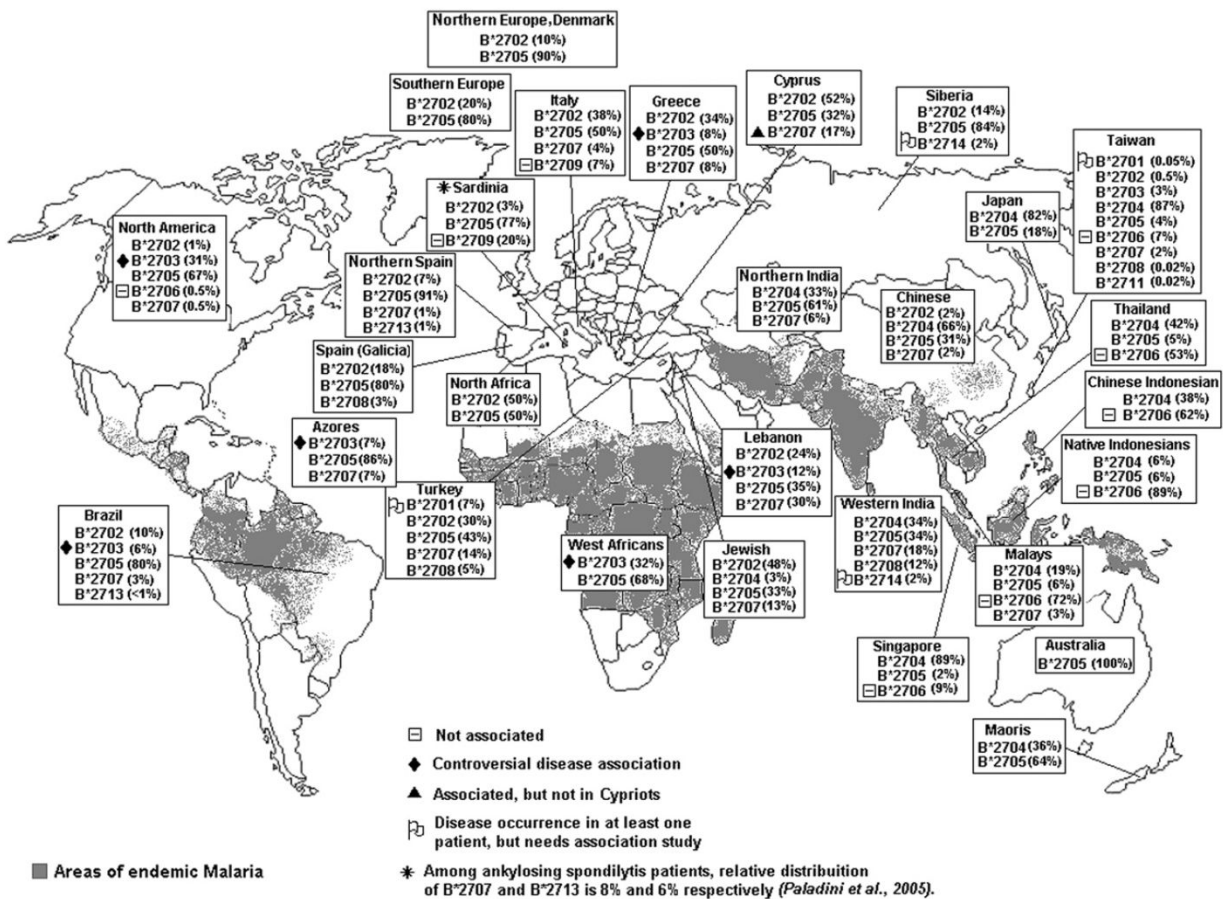


Figure 8 : Répartition des différents sous-types alléliques de HLA-B*27 à travers le monde [104]

Plus de 167 sous-types alléliques du HLA-B*27 ont été identifiés à travers le monde. Ces allèles sont pour la plupart associés à la SpA, à l'exception de HLA-B*2706 et HLA-B*2709 qui sont décrits comme non-associés. L'association du sous-type allélique HLA-B*2703 reste encore controversé. De plus, certains sous-types alléliques, tels que HLA-B*2701, HLA-B*2714 ont une fréquence très faible, ce qui rend difficile l'estimation de l'association à la SpA. Les différences géographiques et ethniques dans la répartition de l'antigène HLA-B*27 suggèrent l'existence d'un gradient décroissant Nord-Sud pour ce qui est de la prévalence et de l'incidence de la maladie.

Plus de 100 autres sous-types alléliques, dérivant tous de l'allèle ancestral *HLA-B*2705*, ont été découverts à travers le monde [Figure 8]. Ces sous-types diffèrent uniquement par quelques acides aminés du *HLA-B*2705* et sont apparus à la suite de conversion génique ou de mutations ponctuelles [105, 106].

Parmi tous les sous-types d'*HLA-B27* identifiés, l'existence ou non d'une association à la SpA a été caractérisée pour 16 d'entre eux, correspondants aux plus répandus, tels que les *HLA-B*2702* et *HLA-B*2704* présents respectivement dans les populations méditerranéennes et les chinoises, qui sont les plus fortement associés à la maladie. Bien que la majorité de ces sous-types d'*HLA-B27* aient été retrouvés comme associés à la SpA, certains d'entre eux ne le sont pas ou moins. Il s'agit d'*HLA-B*2706* et *HLA-B*2709* présents respectivement dans les populations du Sud-est Asiatique et en Sardaigne. Toutefois, un commentaire doit être faite vis-à-vis de ces deux derniers sous-types alléliques. Leur effet peut être considéré comme "neutre", puisqu'ils ne prédisposent pas à la SpA, mais ne s'opposent pas non plus à sa survenue. En effet, si des individus possédant l'un de ces sous-types alléliques "neutres", héritent d'un autre sous-type associé, ils peuvent développer la maladie, de même, s'ils héritent d'un allèle d'un autre gène prédisposant à la maladie (comme par exemple certains allèles d'*ERAP1*) [107].

La plupart des autres sous-types du *HLA-B27* découverts à ce jour, sont trop rares pour permettre d'en étudier réellement l'association à la maladie. Il est à noter que certains de ces sous-types "rares" ne diffèrent de l'allèle *HLA-B*2705* que par des mutations silencieuses (ne provoquant pas de changement d'acide aminé) ou bien par des mutations dans les régions introniques.

Au cours de ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressé aux sous-types *HLA-B*2705* et *HLA-B*2704* pour les allèles associées à la SpA et aux *HLA-B*2706* et *HLA-B*0702* pour les allèles non associés. Le sous-type *HLA-B*2704* ne diffère du *HLA-B*2705* que par deux acides aminés situés en position 77 (Asp>Ser) et 152 (Val>Glu). *HLA-B*2706*, lui, diffère du *HLA-B*2704* par deux acides aminés en position 114 (His>Asp) et 116 (Asp>Tyr). Enfin, le sous-type *HLA-B*0702* est classiquement utilisé comme témoin du *HLA-B27* en raison de sa grande fréquence dans la population, de son absence d'association à la SpA et de sa structure tridimensionnelle très similaire à celle de *HLA-B27* [108] [Figure 9].

C. Hypothèses sur le rôle du HLA-B27 dans la SpA

Plusieurs théories ont été avancées, au cours des années, pour expliquer le rôle du *HLA-B27* dans la pathogenèse de la SA. Les principales hypothèses peuvent se distinguer selon deux types de mécanismes : le premier dépend de l'antigène, et le second en est indépendant. Une dernière dernière théorie implique le rôle de la chaîne légère β_2m [109] [Figure 10].

1) Mécanismes dépendant de l'antigène

a) Peptide arthritogène

L'une des hypothèses majeures du rôle du *HLA-B27* reposerait sur sa capacité à présenter à la surface cellulaire certains peptides aux cellules du système immunitaire d'une façon pathogène. Ces peptides antigéniques seraient spécifiques de l'articulation, ce qui aurait pour conséquence de déclencher une inflammation des articulations. Cette hypothèse est dite du « peptide arthritogène » [110]. Plusieurs peptides, issus notamment de bactéries des genres *Yersinia* et *Chlamydia*, ont été identifiés dans les articulations de patients atteints d'arthrite réactionnelle. D'autres molécules, telles que des protéines cartilagineuses comme le collagène de type II, ont été identifiées comme peptides antigéniques ayant la capacité de stimuler les lymphocytes T de patients atteints de SA.

aa	9	45	59	63	67	69	70	71	74	77	80	81	82	83	97	113	114	116	131	152	156	163
B*2705	His	Glu	Tyr	Glu	Cys	Ala	Lys	Ala	Asp	Asp	Thr	Leu	Leu	Arg	Asn	Tyr	His	Asp	Ser	Val	Leu	Glu
B*2704	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ser	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Glu	-
B*2706	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ser	-	-	-	-	-	-	Asp	Tyr	-	Glu	-	-
B*0702	Tyr	-	-	Asn	Tyr	-	Gln	-	-	Ser	Asn	-	Arg	Gly	Ser	His	Asp	Tyr	Arg	Glu	Arg	-

Figure 9 : Résidus polymorphes entre des sous-types associés (HLA-B*2705 et HLA-B*2704), ou non associés à la SpA (HLA-B*2706 et HLA-B*0702) (adapté de Breban *et al.* [111]).

Le sous-type HLA-B*2704 diffère du HLA-B*2705 par deux acides aminés situés en position 77 (Asp>Ser) et 152 (Val>Glu). HLA-B*2706 diffère du HLA-B*2704 par deux acides aminés en position 114 (His>Asp) et 116 (Asp>Tyr). HLA-B*0702, un sous-type non associés à la SpA, dont la structure tridimensionnelle est proche du HLA-B*2705, ne diffère du HLA-B*2705 que de 15 acides aminés.

De manière intéressante, l'étude des différences d'affinité des variants du HLA-B27 pour certains peptides a permis de mettre en évidence un peptide de huit acides aminés issu du récepteur de type 1 du peptide intestinal vaso-actif, noté VIPR1, qui peut être reconnu par HLA-B*2705 (associé) et non par le HLA-B*2709 (non associé) [112]. Cette différence peut s'expliquer par des conformations tridimensionnelles distinctes du produit de ces deux allèles.

La longueur des peptides antigéniques est essentielle pour leur liaison stable aux molécules du CMH-I. L'une des hypothèses suggère que HLA-B27 aurait la capacité de se lier à des peptides aberrants, c'est à dire ayant une longueur supérieure à 10 acides aminés. En effet, des peptides d'une longueur de 33 acides aminés pourraient se lier à HLA-B27 [113]. Ces peptides peuvent être hautement immunogènes et induire une réponse immunitaire excessive par les lymphocytes T.

Cette dernière hypothèse est d'autant plus séduisante que certains variants du gène ERAP1 sont davantage présents chez les patients atteints de SA. Comme décrit précédemment, ERAP1 joue un rôle majeur dans le clivage des peptides aboutissant à une longueur appropriée à leur liaison au CMH-I. Or, si le chargement peptidique par le PLC est supprimé ou perturbé, le nombre de peptides pouvant se lier au HLA-B27 ou à d'autres molécules du CMH pourrait augmenter, permettant la liaison de peptides de plus faible affinité au CMH [114].

D'autres études soutiennent cette hypothèse en montrant que HLA-B27 est moins dépendant de la tapasine, que d'autres variants du HLA-B, suggérant qu'il pourrait passer outre le PLC pour présenter un peptide à la surface cellulaire.

Pour finir un certain nombre de données indiquent que le HLA-B27 pourrait présenter des peptides antigéniques de façon aberrante, pouvant stimuler une réaction immunitaire inappropriée. Cependant, il n'y a encore aucune preuve concluante que l'un de ces peptides favoriserait le développement de la SA.

b) Mimétisme moléculaire

Une seconde hypothèse spécifique de l'antigène, suggère que le HLA-B27 pourrait également présenter des peptides du «soi», qui seraient reconnus comme des antigènes étrangers par les cellules du système immunitaire. Cette hypothèse est appelée mimétisme moléculaire [115, 116]. En effet, il existe des homologies séquentielles entre certains peptides du «soi» et des antigènes bactériens. C'est le cas du peptide VIPR1 précédemment décrit, qui lorsqu'il est présenté par HLA-B27, adopterait une conformation qui comporterait une homologie structurale avec le peptide *Latent Membrane Protein 2* (LMP2), issu du virus *Epstein-Barr Virus* (EBV). Ainsi, le peptide VIPR1 reconnu normalement comme une protéine du «soi» par les lymphocytes T, déclencherait une réponse immunitaire inappropriée lorsque celui-ci sera présenté par HLA-B27 [117]. De même, un autre peptide du soi, provenant du récepteur du glucagon (pGR) possède des homologies avec le peptide LMP2, mais aussi avec l'*Assimilatory nitrate reductase catalytic subunit* (nasA) de *Klebsiella pneumoniae*, lorsque celui-ci est présenté par HLA-B27. Des auteurs ont observé que ce peptide pGR pouvait se lier au produit des allèles associés à la SpA, tels que HLA-B*2705, HLA-B*2704, et HLA-B*2702, et non pas aux sous-types non associés à la SpA, tels que HLA-B*2706 et HLA-B*2709 [118].

En conclusion, bien que ces peptides semblent bien être présentés par des sous-types associés à la SA, aucune preuve réelle de leur rôle dans l'activation du système immunitaire et le développement de la SA n'a été apportée. Des études plus approfondies doivent encore être menées pour comprendre le lien entre la présentation antigénique anormale par le HLA-B27 et les éléments déclencheurs de la SA.

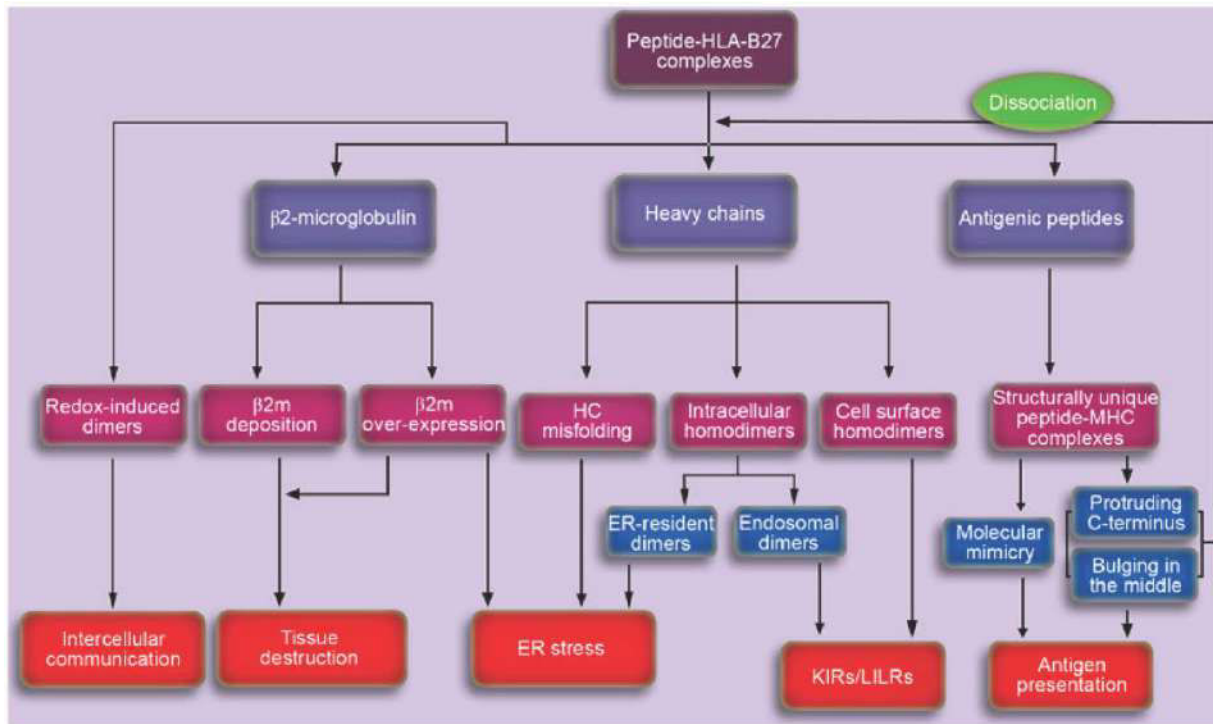


Figure 10 : Les différentes hypothèses sur le rôle du HLA-B27 dans la pathologie [109].

Représentation schématique illustrant les différentes hypothèses du rôle du HLA-B27 dans la pathogenèse de la SpA. (De gauche à droite) La dissociation de la $\beta 2m$ du complexe peut engendrer une accumulation de cette molécule dans la synovie pouvant induire la synthèse et la sécrétion de protéines impliquées dans la destruction des tissus. L'accumulation de chaînes lourdes HLA-B27 mal repliées peut conduire à l'induction d'un stress du RE. La formation d'homodimères HLA-B27 peut conduire soit à un stress du RE, soit à l'activation des récepteurs KIRs/LILRs des lymphocytes T. Enfin, la présentation d'un peptide "aberrant", c'est-à-dire qui n'est pas présenté en condition non pathogénique, ou "arthritogène" aux cellules T-CD8+, peut conduire à une activation de la réponse immunitaire.

2) Mécanismes indépendant de l'antigène

Plusieurs autres hypothèses font quant-à elles appel à des mécanismes indépendants de l'antigène, qui seraient davantage liées à des particularités de la structure moléculaire du HLA-B27 [119, 120].

a) Dimères de HLA-B27

Une hypothèse émise en 1995 par Khare *et al.* se base sur l'observation selon laquelle les chaînes lourdes d'HLA-B27 peuvent former des homodimères, indépendamment de la β_2m [121]. Ces travaux montraient qu'une souris dépourvue de β_2m , transgénique pour le *HLA-B27* développait des manifestations articulaires pouvant conduire à l'ankylose, suggérant le seul effet de la chaîne lourde d'HLA-B27. En 1999, Allen *et al.* ont démontré l'existence d'homodimères HLA-B27, reliés entre eux par un pont disulfure formé entre deux Cys⁶⁷, résidu située dans le domaine extracellulaire $\alpha 1$ [122]. De plus, ces formes homodimériques auraient la capacité d'être exprimées à la surface cellulaire, et potentiellement d'y présenter des peptides aberrants aux cellules du système immunitaire. Ces résultats ont été confirmés par l'observation de ces homodimères à la surface de leucocytes de patients HLA-B27 et dans le modèle du rat HLA-B27 [123]. De récentes études ont montré que ces homodimères HLA-B27 pouvaient interagir spécifiquement avec les récepteurs de type *Killer cell immunoglobulin-like Receptor* (KIR), ainsi qu'avec des récepteurs de type *Leukocyte immunoglobulin-like Receptor* (LILR) [124, 125]. Ces interactions ont pour conséquence de favoriser la prolifération des cellules pro-inflammatoires Th17, et de protéger les cellules NK de l'apoptose. Cette caractéristique inhabituelle de HLA-B27 pourrait ainsi conduire à une réponse immunitaire excessive.

b) Mauvais repliement et UPR

Une autre hypothèse se base sur une accumulation potentielle de formes mal repliées de chaîne lourde dans le réticulum endoplasmique, pouvant engendrer un stress du RE [126]. Ce postulat s'appuie sur les travaux de Mear *et al.*, de 1999, qui ont observé, dans un modèle cellulaire exprimant *HLA-B27*, un repliement plus lent de sa chaîne lourde dans le RE, en comparaison avec d'autres molécules du HLA [127]. Le stress du RE active les senseurs de la voie *Unfolded Protein Response* (UPR), pour favoriser la dégradation des molécules mal repliées par la voie de dégradation associée au RE, *Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation* (ERAD). Des travaux menés par l'équipe de Turner, ont mis en évidence que l'activation par l'interféron- γ (IFN γ) de macrophages dérivés de la moelle osseuse (*Bone marrow-derived macrophages* ou BMM) de rat HLA-B27, induisait une augmentation de l'expression des marqueurs du stress du RE, tels que la protéine chaperonne *Binding Immunoglobulin Protein* (BIP), la protéine *C/EBP homologous protein* (CHOP), et le facteur *X-box binding protein 1* (XBP1) [128]. Pour s'assurer que cet effet était spécifique du HLA-B27, des expériences équivalentes ont été réalisées avec les BMM de rat HLA-B7, mais aucune activation du stress du RE ne fut détectée. Plusieurs études ont révélé une convergence entre les voies de signalisation de l'UPR et la réponse inflammatoire. L'UPR est décrite pour induire l'activation du facteur de transcription *Nuclear Factor-kappa B* (NF- κ B) et la réponse inflammatoire, ce qui a pour conséquence une synthèse accrue de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- α , l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-23 [129]. L'instabilité protéique qui caractériserait HLA-B27 aurait donc pour conséquence d'induire une UPR et ainsi de déclencher une réponse inflammatoire.

c) Exosomes et HLA-B27

L'étude des exosomes dans la SA a ouvert une nouvelle hypothèse sur le rôle potentiel du HLA-B27 dans la pathologie [130]. Les exosomes sont de petites vésicules de 30 à 90 nm qui sont formées par bourgeonnement intraluminal de la membrane des endosomes tardifs, appelés corps multivesiculaires. Ces endosomes ont de multiples rôles : ils servent de structure de tri. Ils peuvent fusionner avec les lysosomes pour aboutir à la dégradation de leur contenu, bourgeonner dans le cytosol pour permettre le recyclage de composants de la membrane plasmique *via* un transport vésiculaire ou bien fusionner avec la membrane plasmique pour être libérés dans le milieu extracellulaire. Ces vésicules peuvent circuler dans le sang, et agir ainsi à distance sur d'autres cellules. Plusieurs types cellulaires ont la capacité à former des exosomes, y compris les cellules du système immunitaire, telles que les lymphocytes ou les cellules dendritiques. Les exosomes servent ainsi de véhicule de transport pour de nombreux composants cellulaires, tels que des molécules de reconnaissance du système immunitaire. Les CMH-I sont souvent présents dans les exosomes [131]. De récentes études, sur une lignée de lymphocytes B d'un patient atteint de SpA et porteur du HLA-B27 immortalisés par le virus Epstein-barr (EBV), ont mis en évidence la présence d'exosomes contenant des hétérodimères HLA-B27/ β 2m, mais surtout une grande quantité d'homodimères d'HLA-B27 [132]. Ces structures pourraient conférer de nouveaux rôles immunomodulateurs et agir sur de nombreux types cellulaires pour favoriser l'inflammation. Des travaux plus approfondis sur l'action de ces exosomes riches en homodimères d'HLA-B27 doivent être menés pour comprendre leur implication dans la physiopathologie de la SA.

3) Rôle de la β 2-microglobuline

L'expression à la surface cellulaire d'homodimères d'HLA-B27 indépendamment de la chaîne légère, suppose que la chaîne lourde a la capacité de se dissocier de la β 2m [133]. Cette dernière molécule peut alors s'accumuler et interagir avec d'autres composants, comme le collagène, pour former des plaques amyloïdes. De nombreuses études démontrent que les dépôts amyloïdes peuvent rester piégés dans le tissu synovial et favoriser l'inflammation de ce tissu. Dans le cas de la SA, cette hypothèse, faisant intervenir le caractère pathogène de dépôts de β 2m, a été suggérée du fait du rôle important de la quantité de β 2m dans l'induction des manifestations chez le rat transgénique HLA-B27/ β 2m [134]. Cependant, peu d'études suggèrent un rôle avéré de ces dépôts dans le développement des symptômes de la SA.

III. Les modèles d'études de la spondylarthrite ankylosante

Les modèles animaux ont largement contribué à la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la SA, comprenant le modèle du rat HLA-B27/ β 2m et celui de souris HLA-B27/ β 2m [135–137].

A. Modèle de la spondylarthrite ankylosante chez le rat

Le premier modèle animal permettant l'étude de la SA a été établi en 1990 par Taurog *et al.*, avec des lignées de rats transgéniques pour le *HLA-B27* et la *β 2m* humaine [138]. L'expression de ces transgènes induit une spondylarthrite "spontanée" avec des manifestations similaires à celles observées chez les patients, telles qu'une inflammation intestinale dans la plupart des cas et des arthrites périphériques à une fréquence moindre [139].

Lignée	Transgène	Hémi / Homo	Fond Génétique	Nb de Copies HLA-B27	Nb de Copies hβ2m	Developpement de la maladie
33-3	HLA-B27 / hβ2m	Hémi	F344	55	28	oui
21-4H	HLA-B27 / hβ2m	Hémi	Lewis	120	90	oui
21-L	HLA-B27 / hβ2m	Hémi	Lewis	12	12	non
21-3	HLA-B27 / hβ2m	Hémi	Lewis	20	15	non
21-3	HLA-B27 / hβ2m	Homo	Lewis	40	30	oui
283-2	hβ2m	Hémi	Lewis	0	35	non
21-3 x 283-2	HLA-B27 / hβ2m	Hémi	Lewis	20	50	oui
F344 120-4	HLA-B07 / hβ2m	Hémi	F344	52	26	non
120-4	HLA-B07 / hβ2m	Hémi	Lewis	52	10	non

Tableau 3 : Les principales lignées de rats transgéniques pour l'étude de HLA-B27 dans la pathogenèse de la SpA (d'après la thèse de Quentin Jauhault [140]).

"Hémi" : hémizygote ; "Homo" : homozygote. Différentes lignées de rats transgéniques HLA-B27 / hβ2m (bleu foncé). 21-3 x 283-2 : croisement des lignées transgéniques 21-3 exprimant 20 copies de HLA-B27 et 15 copies de hβ2m avec la lignées transgéniques 283-2 exprimant 35 copies de hβ2m (bleu clair). Lignée de rats transgéniques contrôle exprimant HLA-B07 / hβ2m (vert).

Plusieurs lignées de rat ont été établies qui diffèrent selon plusieurs critères : le fond génétique, le nombre de copies de *HLA-B27* et de $\beta 2m$, lui-même dépendant de l'homozygotie ou de l'hémizygotie de ces allèles [Tableau 3]. Le nombre de copies des transgènes codant *HLA-B27* et $\beta 2m$ intégrées dans le génome du rat, est essentiel dans le modèle pour induire le développement de la maladie. Un faible nombre de copies d'*HLA-B27* ne permet pas le développement de la maladie, comme c'est le cas pour les lignées de rats transgéniques 21-4L et 21-3, comprenant respectivement 12 et 20 copies de *HLA-B27* et 12 et 15 copies de $\beta 2m$. De même la quantité de $\beta 2m$ humaine semble être déterminante pour le développement de la maladie, puisque les rats de la lignée 21-3, indemnes de pathologie (20 copies de *HLA-B27*/15 de $\beta 2m$) développent la maladie en cas d'augmentation du nombre de copies de $\beta 2m$ par croisement avec la lignée transgénique 283-2 qui n'exprime que la $\beta 2m$ (35 copies) sans changement de la quantité de copies de *HLA-B27*. Le développement des manifestations inflammatoires semble spécifique de *HLA-B27*. En effet, des lignées de rats transgéniques témoin, exprimant *HLA-B*0702* et la $\beta 2m$, ayant un grand nombre de copies de ces deux transgènes (52 copies de *HLA-B7* et 26 de $\beta 2m$), ne développent aucun phénotype. Cet allèle est couramment utilisé comme témoin négatif dans l'étude de la pathologie, permettant de montrer que la forte expression d'un autre allèle *HLA-B* n'est pas suffisante pour développer une SpA chez le rat.

Ce modèle rat a permis de développer de nombreuses hypothèses sur l'étiologie de la SpA, notamment sur le rôle du *HLA-B27*, l'identification des cellules immunitaires impliquées dans la pathologie, et le rôle du microbiote dans l'induction des manifestations [141–144].

La capacité de *HLA-B27* à provoquer une SpA chez la plupart des rats transgéniques provenant des mêmes lignées a permis des avancées importantes pour la compréhension de la maladie. Il est cependant important de rappeler que chez l'Homme, seuls 5 à 10% des individus *HLA-B27* positif développeront une SpA, suggérant l'implication d'autres facteurs génétiques et environnementaux. Il se pourrait donc que la forte expression de *HLA-B27* dans le modèle rat, élimine le besoin d'autres facteurs de prédisposition et favorise le phénotype hautement pénétrant. De ce fait, il serait intéressant d'étudier, dans le modèle rat, l'effet de modifications génétiques mimant d'autres allèles de susceptibilité à la SpA, dans un contexte de faible nombre de copies d'*HLA-B27*, afin de tester si ces allèles favorisent le développement de la maladie en interaction avec *HLA-B27*.

D'autre part, il est important de souligner que les modèles animaux reproduisent rarement toutes les caractéristiques de la SpA. Par exemple, il existe certaines différences entre la SpA développée chez le rat et la maladie humaine, telle que la survenue d'une orchite (inflammation testiculaire) chez le rat, qui n'a été que rarement décrite chez les patients atteints de SpA. Au contraire, l'inflammation axiale observée chez la plupart des patients SpA, est plus rare dans les modèles animaux. Ainsi ces modèles ne sont pas "l'équivalent" de la SpA humaine, mais permettent de mieux comprendre certains aspects biologiques de la maladie.

B. Modèle de la spondylarthrite ankylosante chez la souris

Un autre modèle animal de la SpA a été établi chez la souris par l'équipe de Khare en 1995, en introduisant un transgène codant *HLA-B27* chez des souris déficientes pour la $\beta 2m$ endogène [145]. Ces souris développent des arthrites des pattes postérieures, ainsi que des atteintes cutanées dans certains cas. Il a été observé que l'apparition de ces symptômes étaient sensible à l'environnement, puisque le transfert de ces souris dans un environnement exempt de germes prévient le développement de la maladie. Par ailleurs, les auteurs ont constaté que les molécules *HLA-B27* ne semblaient pas être exprimées à la surface cellulaire en l'absence de stimulation, contrairement à ce qui peut être observé dans les lignées cellulaires de patients atteints de SpA. En outre, ce modèle se semblait pas induire d'activation des lymphocytes T CD8+, suggérant que la reconnaissance classique des lymphocytes T avec *HLA-B27* ne semblait pas nécessaire pour la pathogenèse de la SA.

Toutefois, des travaux menés par l'équipe de Colbert semblent indiquer que selon le fond génétique du modèle murin, la seule déficience en $\beta 2m$ pourrait induire le développement des arthrites, indépendamment du HLA-B27. Ces résultats suggèrent que la déficience en $\beta 2m$ dans le modèle souris pourrait entraîner une perturbation de l'assemblage des CMH-I, imitant les arthropathies associées à HLA-B27 [146]

La souris ANKENT (ANKylonsing ENThesopathy) est un modèle murin qui développe spontanément une enthésopathie ankylosante des articulations de la cheville et du tarse [147]. L'apparition de ces symptômes ne semble concerner que les souris mâle et les raisons de la pathogénicité restent encore incertaines. De manière similaire au modèle murin de l'équipe de Khare, le développement des symptômes dépend de la flore bactérienne. D'autre part, la présence de l'allèle HLA-B27 dans le modèle ANKENT induit une augmentation de la fréquence des enthésites et de l'ankylose. Néanmoins, la déficience de la $\beta 2m$ endogène dans ce modèle, ne semblent pas aggraver le phénotype, et exercerait au contraire un rôle protecteur sur le développement des manifestations [148].

Enfin, un dernier modèle plus couramment utilisé est celui de la souris DBA / 1 vieillissantes qui développe spontanément dans 50 à 100% des cas, une arthrite asymétrique au niveau des chevilles et des orteils vers l'âge de 26 semaines. Des études moléculaires sur ce modèle ont permis de mettre en évidence une augmentation de la signalisation BMP au niveau de ces arthrites, jouant un rôle important dans la phase de différenciation chondrogénique précoce et dans la progression de l'ankylose, de manière similaire au développement osseux hétérotopiques de la SpA [149].

D'autres modèles de souris transgéniques ont permis des avancées majeures dans la compréhension de certains aspects de la physiopathologie de la SpA. Par exemple, les souris surexprimant le gène *TNFA* qui code pour le TNF- α ont permis de mieux comprendre certains mécanismes physiologiques impliquant ce facteur dans les SpA [150, 151]. En outre, le modèle de souris déficientes en IL-17, le modèle murin B10.RIII dans lequel a été injecté l'ADN codant pour IL-23, et le modèle de souris SKG (muté pour le gène ZAP-70) ont également permis de grandes avancées dans la compréhension du rôle de l'axe IL-23-IL-17 dans la SpA [152–155].

IV. Un nouveau modèle d'étude : *Drosophila melanogaster*

A. *Drosophila melanogaster* comme modèle d'étude des pathologies humaines

Depuis de nombreuses années, *Drosophila melanogaster* est utilisée comme un puissant modèle génétique pour l'étude de presque tous les processus biologiques essentiels et fondamentaux [156]. Récompensés par six prix Nobel, les travaux sur cet organisme ont permis de grandes avancées dans le domaine de la biologie et de la médecine. Plus particulièrement, l'étude de ce modèle animal a permis de progresser dans la compréhension de multiples processus cellulaires et moléculaires de nombreuses pathologies humaines. En effet, bien que l'Homme et la mouche diffèrent grandement en terme de caractéristiques morphologiques et cellulaires, de nombreux mécanismes moléculaires et cellulaires qui régissent le développement de ces organismes, sont conservés. Ceci est particulièrement dû à l'aspect ancestral de ces mécanismes et de très nombreux gènes qui les contrôlent [157–161].

L'étude des pathologies humaines dans le modèle drosophile a fait l'objet d'un important engouement depuis une quinzaine d'années [162]. Par exemple, l'analyse systématique de 929 gènes impliqués dans des pathologies humaines et référencés dans la base de données *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM), a mis en évidence la présence de 714 gènes conservés dans le modèle *Drosophila melanogaster*, soit plus de 77% des gènes impliqués dans des maladies humaines monogéniques qui seraient conservés chez la drosophile, et qui pourraient potentiellement faire l'objet d'une étude [163].

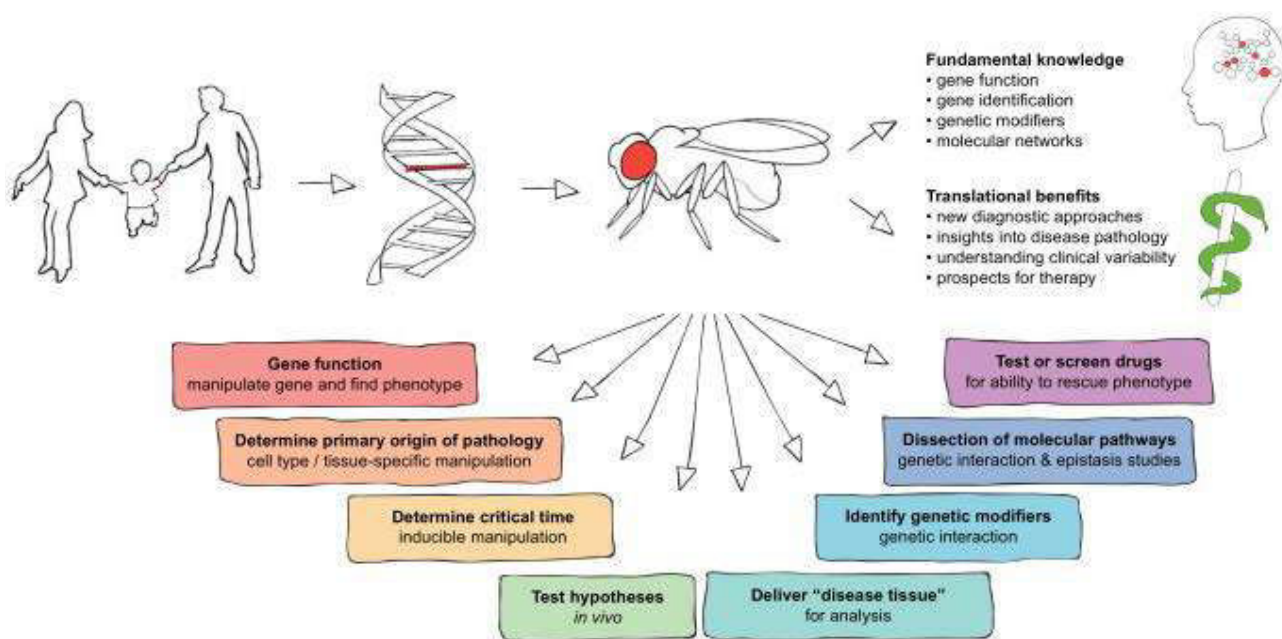


Figure 11 : Les avantages et les applications du modèle *Drosophila melanogaster* pour l'étude de gènes impliqués dans des pathologies chez l'Homme [168].

De nombreuses approches expérimentales dans le modèle drosophile permettent d'étudier le rôle d'un gène d'intérêt impliqué dans une pathologie humaine. Les outils génétiques de la drosophile permettent notamment de dépléter ou de surexprimer un gène à la recherche d'un éventuel phénotype. Les tests d'interactions génétiques permettent d'identifier les relations fonctionnelles avec des voies de signalisation. Le système UAS-GAL4 permet de diriger spécifiquement l'expression d'un gène d'intérêt dans un territoire donné et à un moment donné. Enfin, le modèle drosophile peut être utilisé pour le dépistage d'éventuelle drogue pour la recherche de nouvelle molécule thérapeutique.

Au cours des 100 dernières années, la recherche sur la drosophile a été particulièrement utile pour l'analyse des mécanismes moléculaires sous-jacents aux phénomènes liés [164] :

- à la neurodégénération, telle que la maladie de Huntington, la maladie d'Alzheimer, et de la maladie de Parkinson [165–167]
- au cancer comme le cancer colorectal, le carcinome épidermoïde, ou la maladie de von Hippel-Lindau (VHL) [169–171]
- aux troubles du métabolisme tels que le diabète, la galactosémie, ou le syndrome de Barth [172–174].
- mais aussi à de nombreuses autres pathologies comme les cardiomyopathies, les maladies liées au stress du RE, au Syndrome du X fragile, ou à la dystrophie musculaire [175–178]

L'un des avantages majeurs du modèle drosophile pour l'étude des gènes impliqués dans des pathologies humaines, est son véritable éventail de techniques de modification du génome et l'utilisation de puissants outils d'imagerie. Ce modèle possède aussi de nombreux autres atouts, tels qu'une facilité d'élevage, un coût relativement faible, un cycle de vie court, un matériel génétique simple et la disposition de nombreux mutants, *acide ribonucléique* (ARN) interférant, et rapporteurs de nombreux gènes [Figure 11].

Globalement, trois stratégies principales pour étudier les gènes impliqués dans des maladies humaines dans le modèle drosophile, ont été développées: la génétique inverse, la génétique classique et une stratégie récemment établie nommée *diagnostic strategy* [179].

Dans l'approche de génétique inverse, des mutations sont créées dans des gènes homologues à ceux de gènes humains pour étudier leurs phénotypes *in vivo* et ainsi mieux caractériser la fonction d'un gène. Il y a principalement trois façons de réduire ou d'abolir l'expression d'un gène :

- soit par des perturbations génétiques ciblées, par le biais de la technique *Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR), afin de réaliser une perte de fonction partielle ou totale du gène, ou bien en insérant une mutation ponctuelle spécifique retrouvée fréquemment chez les patients [180].
- soit par mutagenèse médiée notamment par l'insertion ou l'excision d'éléments transposables existants, afin d'interrompre ou modifier la fonction d'un gène (par exemple : clones mutant)[181].
- soit par des techniques d'extinction du gène, via l'utilisation d'ARN interférant (ARNi), en empêchant la traduction de l'ARN du gène d'intérêt [182].

L'approche de génétique classique consiste à réaliser des mutations au hasard dans le génome, par le biais d'éléments chimiques, physiques ou d'éléments transposables, afin de cribler les drosophiles pour un phénotype particulier. C'est une stratégie sans *a priori* qui peut aider à identifier des mutations non caractérisées dans des gènes dont l'association au développement de maladies est connu, mais aussi dans des gènes qui n'ont pas encore été liés à une pathologie. La génétique classique peut donc être un puissant moteur d'identification de gènes impliqués dans une maladie et permettre de démêler des phénomènes biologiques.

Enfin, grâce à l'approche de *diagnostic strategy*, *Drosophila* peut être utilisée pour évaluer les propriétés pathogéniques de certains variants rares qui sont liés à des maladies humaines, par l'insertion directe de gènes humains associés à une pathologie. Dans le cas où un homologue du gène est présent chez la drosophile, celui-ci est éliminé par mutagenèse dirigée, et une insertion de la copie humaine est insérée sous le contrôle d'une séquence UAS. L'objectif étant de pouvoir observer les conséquences de l'expression du gène d'intérêt, sur les processus physiologiques et biologiques de la drosophile, et d'utiliser ce modèle comme un "tube à essai", afin de mieux caractériser les mécanismes moléculaires et cellulaires pouvant être perturbés.

En conclusion, l'utilité de la drosophile en tant qu'organisme modèle pour l'étude des maladies génétiques humaines, est maintenant bien admise. De nombreux gènes humains ont des homologues chez la drosophile qui présentent des fonctions moléculaires très similaires.

L'avancée des technologies d'analyse, de séquençage, et d'imagerie pour le modèle *Drosophila* permet une analyse fine et précise de l'activité de nombreux gènes liés à des pathologies. Cependant, il existe des disparités physiologiques entre la drosophile et l'Homme, c'est pour cela qu'il est important de mutualiser l'ensemble des recherches liées à d'autres modèles plus proches de l'Homme, pour obtenir le maximum d'informations.

B. Immunité chez *Drosophila melanogaster*

1) La drosophile comme modèle d'étude de l'immunité innée

Dans la nature, les drosophiles se nourrissent de fruits mûrs ou en décomposition et vivent dans un environnement enrichi en microorganismes, ce qui fait qu'elles sont constamment exposées au risque d'infections. Leur immunité repose principalement sur un système inné, lié à un processus humoral et cellulaire qui sera développé dans la suite de cette thèse. L'immunité innée est commune à tous les métazoaires et constitue la première ligne de défense face à de nombreuses infections. Parmi les processus physiologiques conservés entre l'Homme et la Drosophile, de nombreux gènes impliqués dans le système immunitaire inné de *Drosophila* ont des homologues chez les mammifères [183].

A la différence de l'Homme, la drosophile ne possède pas d'immunité adaptative, comme la production d'anticorps et l'intervention des lymphocytes B et T. Cependant, des travaux réalisés par Boman *et al.*, et repris plus tard par Pham *et al.*, ont permis d'observer une meilleure réponse immunitaire à la suite d'une seconde infection par une bactérie, laissant supposer la mise en place d'une pseudo-réponse adaptative dans le modèle drosophile [184, 185]. Ces résultats restent néanmoins encore incertains.

La Drosophile possède un système primitif de circulation avec seulement trois types de cellules immunitaires, appelés collectivement hémocytes [186, 187]. A la différence des mammifères, la drosophile n'a pas de réseau vasculaire pour séparer les cellules sanguines des autres tissus et organes, mais possède un système ouvert. Son cœur permet le mouvement d'un liquide circulatoire, l'hémolymphe, dans lequel baignent les hémocytes pour interagir avec l'ensemble des tissus. Ces hémocytes jouent un rôle essentiel dans l'immunité innée, mais aussi dans d'autres processus comme le modelage des tissus au cours de l'embryogenèse et de la morphogenèse. Au stade embryonnaire, deux types d'hémocytes sont produits, appelés plasmotocytes et cellules à cristaux. Une seconde phase de l'hématopoïèse se produit durant le stade larvaire, dans un organe appelé glande lymphatique contenant les progéniteurs hématopoïétiques pour trois types d'hémocytes : les plasmotocytes, les cellules à cristaux, et les lamellocytes. Ces dernières ne sont produites qu'en réponse à un problème immunitaire spécifique, tels que le parasitisme par les guêpes. A la fin du stade pupal, la glande lymphatique disparaît, et les hémocytes produits persistent tout au long de la vie de la mouche, à l'exception des lamellocytes agissant uniquement durant le stade larvaire. Le corps gras de la drosophile joue aussi un rôle important dans la réponse immunitaire, et plus particulièrement dans la réponse humorale, qui est liée à la production de peptides antimicrobiens (*antimicrobial peptides* ou AMP) impliqués dans l'élimination des pathogènes. De part la découverte de nombreux gènes impliqués dans l'immunité et de sa relative simplicité, la drosophile a contribué au renouvellement de l'intérêt pour l'étude de l'immunité innée. Ce modèle a permis la compréhension de nombreux mécanismes moléculaires qui sont retrouvés conservés chez les vertébrés.

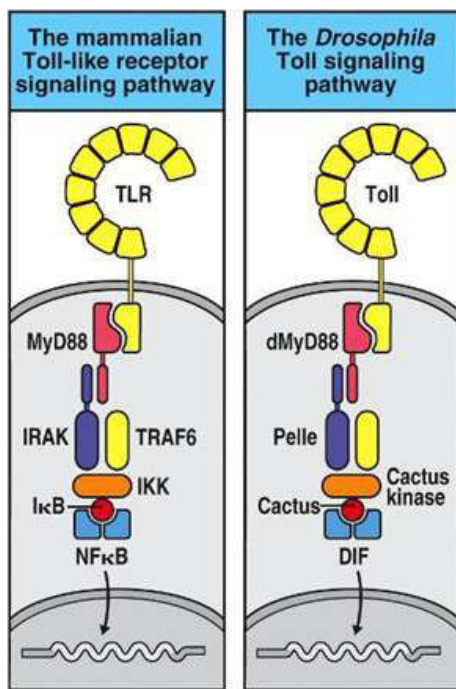
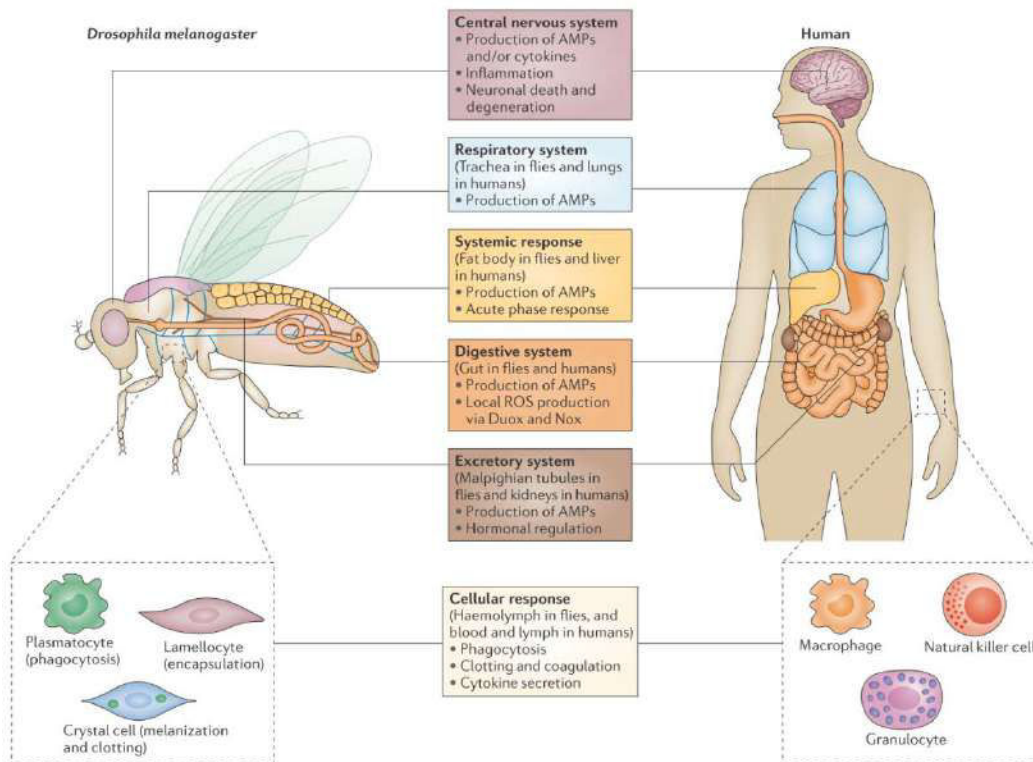


Figure 15-4 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

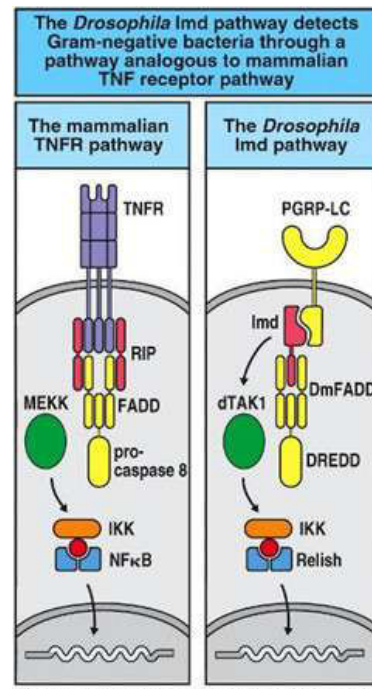


Figure 15-5 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Figure 12 : Les cellules immunitaires et la réponse humorale chez *Drosophila melanogaster* [183]

La majorité des organes de *Drosophila melanogaster* sont analogues à ceux des vertébrés. Plusieurs de ces organes contribuent à la défense immunitaire innée. Cependant, à la différence de l'Homme, la drosophile possède un système circulatoire ouvert, appelé hémolymphe dans lequel circulent les cellules du système immunitaire. La drosophile possède plusieurs types de cellules circulantes appelées hémocytes, comprenant les plasmatocytes, les cellules à cristaux, et les lamellocytes. Les plasmatocytes, qui représentent la grande majorité des cellules immunitaires, ressemblent aux macrophages humains et phagocytent les pathogènes de petites tailles. Les cellules à cristaux activent la mélanisation pour générer des ROS contre les pathogènes. Les lamellocytes sont produits face à une infection par de grands pathogènes pour leur encapsulation.

Pour contrer une infection chez la drosophile, une réponse humorale permet la sécrétion de peptides antimicrobiens (AMP) dans l'hémolymphe. Le corps gras représente la plus grande source de production d'AMP, mais de nombreux autres organes, tels que le système nerveux central, le système respiratoire, le système digestif, et le système excréteur peuvent produire des AMP. Les gènes qui codent ces AMP sont régulés par deux voies de signalisation : la voie Toll qui est activée principalement face à une infection par des champignons ou des bactéries Gram+, et la voie IMD qui est activée principalement face à une infection par les bactéries Gram-. Selon que la voie Toll (équivalente à la voie des TLR chez les mammifères) ou IMD (équivalente à la voie TNFR des mammifères) est activée, un facteur de transcription, respectivement DIF ou Relish (équivalents à NF-κB des mammifères), provoque la synthèse d'AMP spécifiques du type d'infection.

2) Les cellules hématopoïétiques chez *Drosophila melanogaster*

a) Les différentes cellules immunitaires chez la drosophile

Durant le stade embryonnaire et le stade larvaire, la glande lymphatique va produire à partir de cellules souches appelées pro-hémocytes trois populations cellulaires qui se différencient par leur morphologie et leurs fonctions, à savoir les plasmatoctes, les cellules à cristaux, et les lamellocytes [188–190][**Figure 12**]. Ces trois types d'hémocytes auront pour fonction de répondre à diverses infections ou d'éliminer les débris de cellules apoptotiques.

- Les plasmatoctes :

La majorité des hémocytes en circulation dans l'hémolymphe sont des plasmatoctes. Elles représentent plus de 95% des cellules immunitaires de la drosophile. Elles agissent de manière similaire aux macrophages des mammifères, en englobant et dégradant les cellules apoptotiques et les différents pathogènes. La détection de ces derniers est réalisée grâce à la présence de différents récepteurs présents à la surface cellulaire des plasmatoctes, tels que Croquemort (homologue de CD36), Nimrod C1 (NimC1), Nimrod C4 (NimC4), Eater et Draper (Drpr), reconnaissant des molécules aux motifs structuraux invariants et permettant leur internalisation et leur dégradation.

- les cellules à cristaux

Les cellules à cristaux sont plus grandes que les plasmatoctes et ne représentent qu'environ 5% des hémocytes. Elles ne possèdent pas de réel équivalent chez l'Homme. Elles ont été nommées ainsi du fait de la présence d'inclusions cristallines dans leur cytoplasme. Ces inclusions contiennent de grandes quantités de composants impliqués dans le processus de mélanisation. Ce phénomène est particulièrement actif sur les sites de blessures pour favoriser la cicatrisation. La mélanisation joue aussi un rôle dans le processus d'encapsulation des pathogènes, permettant de piéger la bactérie et d'induire sa destruction par la synthèse d'espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species* ou ROS).

- Les lamellocytes

Les lamellocytes sont les plus grandes cellules immunitaires, et représentent moins de 1% des cellules immunitaires de la drosophile. Elles sont d'aspect plat. Elles ne possèdent aucune équivalence chez l'Homme, et jouent un rôle spécifique dans l'encapsulation par mélanisation de grands pathogènes, qu'il est impossible de phagocyter, tels que les œufs d'hyménoptères parasites.

b) Infection et réponse humorale

En réaction à une infection, une réponse humorale est mise en place au niveau du corps gras de la drosophile afin de contrer l'infection. Cette réponse s'établit selon trois points : l'activation de cascades protéolytiques pour induire un processus de mélanisation permettant la cicatrisation de la lésion ; un processus d'encapsulation des éléments étrangers de grande taille par la mélanine ; le recrutement des cellules immunitaires pour favoriser la phagocytose des éléments étrangers. De plus, cette réponse humorale s'accompagne aussi de la production d'AMP, sécrétés dans l'hémolymphe, pour induire la destruction des pathogènes que ce soit des bactéries ou des champignons [191].

Sept classes principales d'AMP ont été identifiés chez la drosophile. Ils sont structurellement similaires à leurs homologues humains. De petite taille (5kDa), ils agissent principalement en perforant la membrane des bactéries. Ces AMP diffèrent par leur spectre d'activité, selon que leur expression est induite par une infection de type fongique, par des bactéries à Gram positif, ou à Gram négatif. L'action combinée de l'ensemble des AMP contribuerait à l'élimination d'un large spectre d'infections.

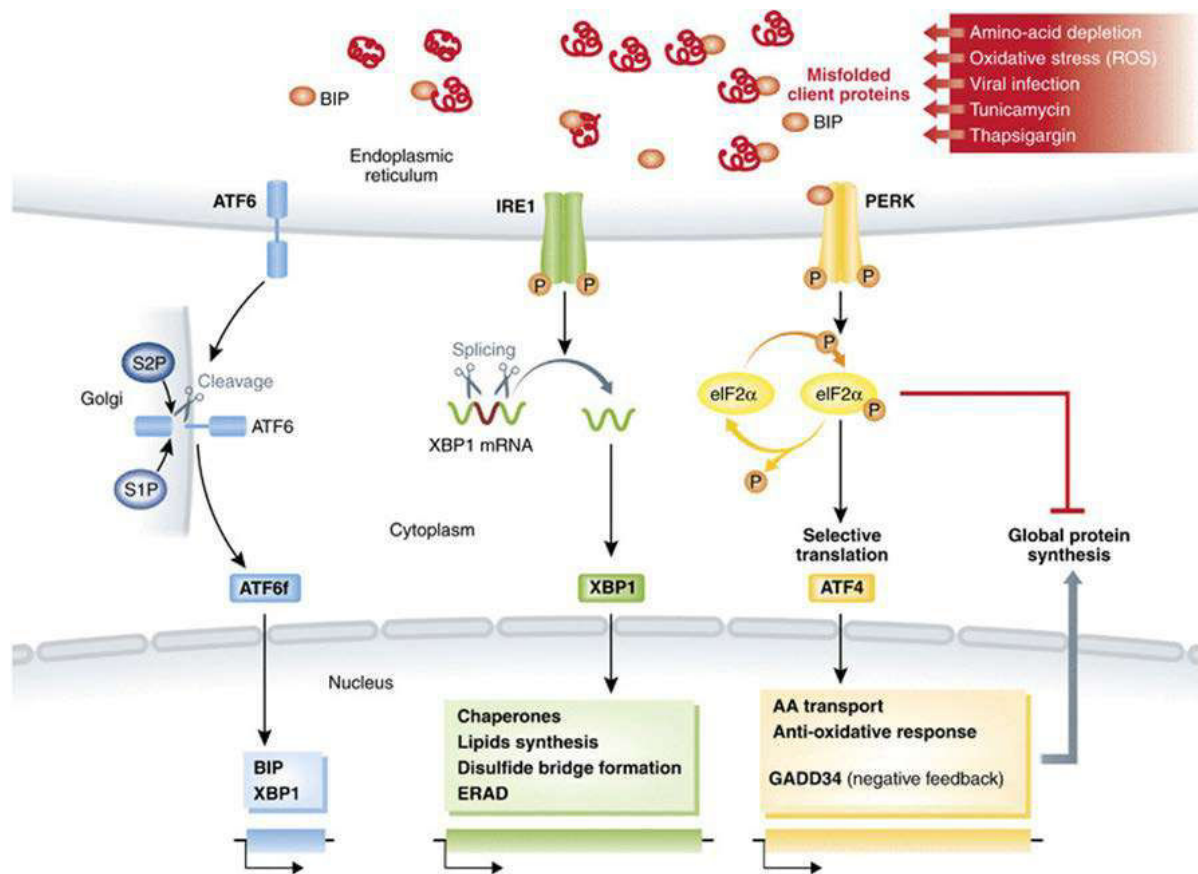


Figure 13 : Le stress du RE et l'Unfolded Protein Response (UPR) [189].

La perturbation de l'homéostasie calcique ou protéique peut induire une accumulation de protéines mal conformées et engendrer un stress du RE. La protéine chaperonne BIP va se lier aux protéines mal conformées, permettant ainsi l'activation de l'UPR via l'activation de trois protéines transmembranaires : ATF6, IRE1 et PERK. Ces senseurs induisent et coordonnent des réponses spécifiques à travers la régulation des facteurs de transcription ATF6f, XBP1 et ATF4 qui reconnaissent des séquences consensus promotrices particulières et assurent l'activation transcriptionnelle de leur gènes cibles. La réponse initiale de l'UPR tente de rétablir le fonctionnement normal en réduisant la synthèse globale des protéines (notamment par la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α), en favorisant la dégradation des protéines mal conformées (ERAD) et en augmentant la production de protéines chaperones (BIP). Cependant, si ce stress ne peut être contrôlé, ces mêmes senseurs vont activer des voies pro-inflammatoires, et induire la mort par apoptose des cellules.

L'expression de ces AMP par le corps gras est médiée par deux voies principales de signalisation, nommées voie Toll et voie *immune deficiency* (Imd) [192, 193]. La première est très similaire à la voie des Toll-like-Receptors des mammifères. La seconde possède de fortes similitudes avec la voie TNF- α : le facteur de transcription *relish* qui est contrôlé par cette voie est l'homologue de NF- κ B. Des analyses génétiques portant sur la réponse aux infections ont permis de démontrer que la voie Toll représentait la réponse principale aux infections par les champignons et les bactéries à Gram-positif. A contrario, la voie Imd active la réponse aux infections par des bactéries à Gram-négatif. Ainsi, suivant la voie activée, Toll ou Imd, la production d'AMP spécifiques permettra de contrer spécifiquement l'infection.

C. *Drosophila melanogaster* : un modèle d'étude des mécanismes moléculaires complexes

1) Le stress du réticulum endoplasmique et l'UPR

Au cours des dernières années, *Drosophila* a été activement employée pour étudier le RE et sa réponse au stress par l'activation de la réponse UPR [194] [Figure 13]. Cette dernière joue un rôle fondamental dans l'adaptation au stress cellulaire en tentant de rétablir une homéostasie du RE. De nombreuses pathologies ont été associées de manière plus ou moins convaincante à un stress du RE, tels que le diabète de type I, les cancers, des maladies auto-immunes, mais aussi l'athérosclérose et la SA [195–199].

Le RE est un organite intracellulaire central impliqué dans de nombreux rôles, tels que le repliement des protéines, le contrôle de l'homéostasie calcique, et la synthèse lipidique [194]. La perturbation de l'un de ces processus induit une accumulation de protéines mal-conformées, déclenchant un stress du RE. Pour répondre à ce stress, la cellule a mis en place un système de contrôle appelé UPR, dont l'objectif est de restaurer une homéostasie protéique. L'UPR est principalement activée par trois senseurs conservés au cours de l'évolution : l'*inositol-requiring protein-1 α* (IRE1), la *protein kinase RNA-like ER kinase* (PERK), et l'*activating transcription factor 6* (ATF6). Dans les conditions physiologiques, les trois senseurs sont liés à la protéine chaperonne (BIP), qui les maintient inactifs. Lors d'un stress du RE, les protéines mal conformées s'accumulent dans la lumière du RE, se lient à la protéine BIP qui agit pour favoriser le bon repliement de ces protéines, entrant ainsi en compétition avec les senseurs de l'UPR, eux-mêmes libérés de leur association à la protéine BIP, ce qui les active et induit une cascade de transduction, pour réguler et atténuer l'accumulation des protéines mal conformées. Plusieurs niveaux d'action sont impliqués pour contrer ce stress, comme une augmentation de l'expression des gènes codant des chaperonnes du RE, une réduction générale de la traduction, et une induction de l'expression de gènes impliqués dans la destruction cytosolique de protéines du RE mal conformées, par le processus ERAD [200].

- L'activation du senseur IRE1 par oligomérisation et autophosphorylation déclenche son activité endoribonucléasique. Ce senseur permet alors la synthèse de la protéine XBP-1s, par un épissage cytosolique de l'ARNm d'XBP-1. XBP-1s est un facteur de transcription régulant différents gènes cibles impliqués dans le repliement des peptides, le système ERAD, la biogenèse des lipides et la synthèse protéique générale. En parallèle, IRE1 dégrade les ARNm présents à la membrane du RE, ce qui contribue à réduire la synthèse protéique et la quantité de protéines importées dans le RE. Ce processus est appelé Regulated IRE1-dependent Decay (RIDD).
- L'activation du senseur PERK se fait par dimérisation et autotransphosphorylation. Elle fait apparaître sa fonction kinase. PERK phosphoryle alors l'*Eukaryotic translation initiation factor 2A* (eIF2 α), un facteur d'initiation de la traduction, ce qui réduit le niveau global de la traduction dans la cellule. Certains transcrits codant des protéines impliquées dans le stress font exception et sont davantage traduits tels que les transcrits du facteur de transcription *Activating transcription factor 4* (ATF4), qui active plusieurs gènes cibles, notamment impliqués dans la réponse au stress oxydant.

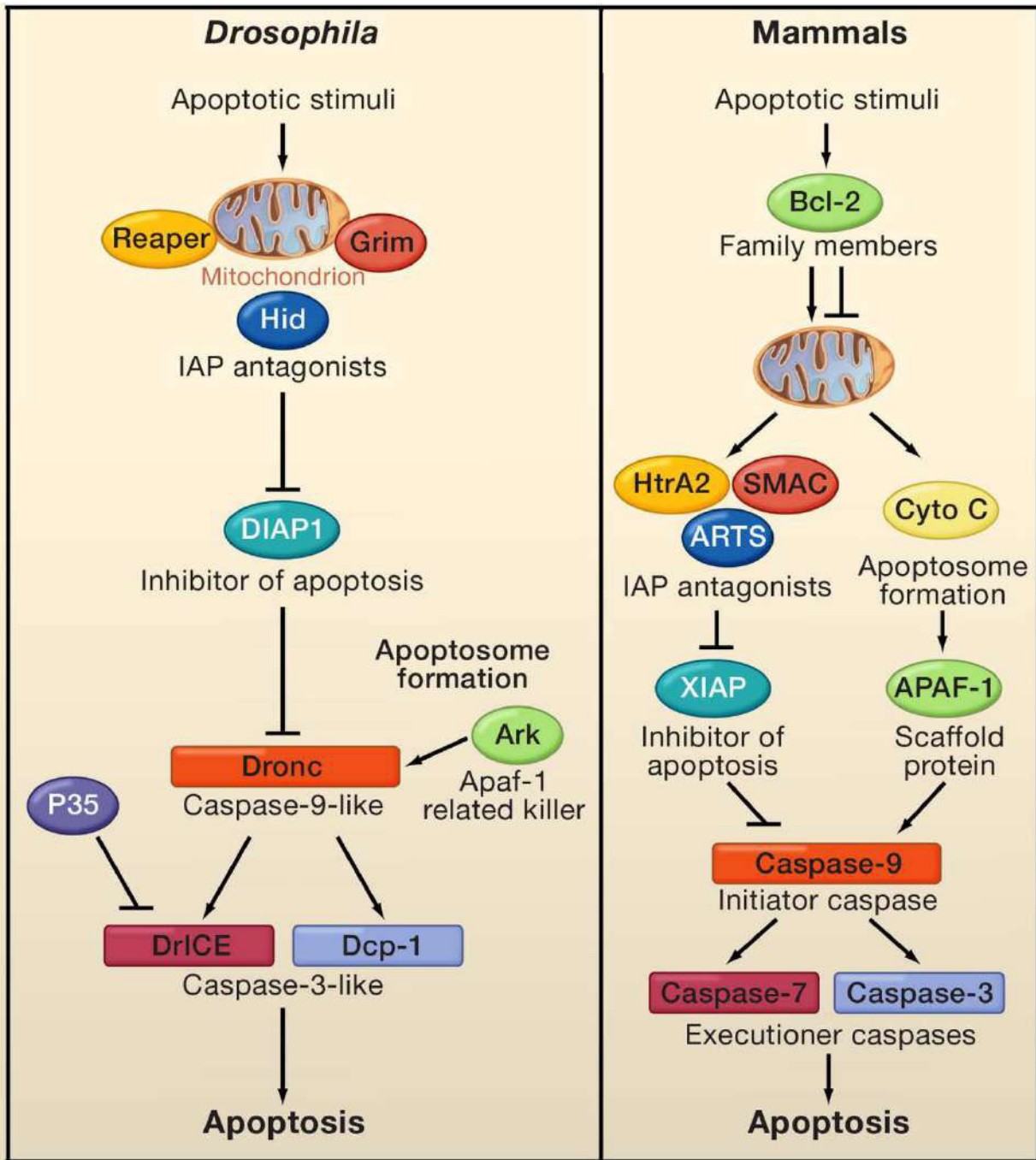


Figure 14 : La voie intrinsèque de l'apoptose chez *Drosophila melanogaster* et la voie mitochondriale de l'apoptose chez les mammifères [201].

Les protéines impliquées dans la voie intrinsèque de l'apoptose sont conservées au cours de l'évolution. Cependant, le processus conduisant à l'activation des caspases est différent entre la drosophile et les mammifères. Chez *Drosophila melanogaster*, de nombreuses voies de signalisation peuvent induire l'activation des protéines pro-apoptotiques Reaper, Hid et Grim. Ces protéines ont pour rôle de diminuer la quantité de l'inhibiteur DIAP1, libérant de ce fait la caspase initiatrice Dronc. Le clivage des caspases effectrices DrICE et DCP-1, par la protéine Dronc, conduit au processus de mort par apoptose. Chez les mammifères, les mitochondries jouent un rôle majeur dans le déclenchement des mécanismes apoptotiques. La perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie survient lorsque des protéines de la famille Bcl-2 (Bax et Bak) sont activées par un signal pro-apoptotique. Ceci a pour conséquence deux actions : la diminution de la quantité des protéines inhibitrices IAP par les protéines pro-apoptotiques SMAC, HtrA2 et ARTS, ainsi que la libération du cytochrome c dans le cytosol, aboutissant à la formation de l'apoptosome par les molécules APAF-1. Ce complexe conduit à l'activation des caspases initiatrices (Caspase-9), puis le clivage des caspases effectrices (Caspase-7 et Caspase-3), aboutissant au déclenchement du processus de mort par apoptose.

- Enfin, en condition de stress, le senseur ATF6, de part la présence de ces domaines *Golgi localization sequences 1 et 2* (GLS1 et 2), va être relocalisé vers l'appareil de Golgi. Dans ce compartiment, ATF6 subit une série de clivages séquentiels, ce qui permet la libération cytosolique du fragment N-terminal d'ATF6, qui agit comme facteur de transcription impliqué dans la régulation de gènes codants des chaperonnes tels que BIP, des composants du système ERAD, ou encore XBP-1.

L'activation des différentes branches de l'UPR a pour objectif de réduire la quantité de protéines mal-conformées et d'accroître les capacités de repliement, permettant de diminuer le stress. Cependant, si les différents mécanismes induits par l'UPR ne parviennent pas à atténuer le stress du RE, les senseurs de l'UPR ont la capacité d'induire une réponse inflammatoire et l'apoptose afin d'éliminer les cellules endommagées [202].

2) La mort cellulaire

Le modèle drosophile a également contribué à la compréhension des mécanismes de régulation de la mort cellulaire [201, 203, 204] **[Figure 14]**. Dans cette partie, nous nous consacrerons brièvement à la mort cellulaire par apoptose, qui se caractérise par une condensation nucléaire et cytoplasmique, associée à une fragmentation cellulaire. Cette mort cellulaire est nécessaire au cours du développement et également chez l'adulte afin de maintenir une homéostasie tissulaire. Les principaux effecteurs de l'activation de l'apoptose sont les *cysteinyl aspartate-specific proteases* (Caspases) qui sont hautement conservées au cours de l'évolution. Il en existe 18 chez l'Homme, et seulement 7 chez la drosophile. Elles se répartissent en deux catégories : les caspases initiatrices, telles que *Drosophila Nedd-2-like caspase* (Dronc), *Death-related ced-3* (Dredd), et *Ser/Thr-rich caspase* (Strica); et les caspases effectrices comme *Drosophila ICE* (Drice), *Death-associated-1* (Dcp-1), *Death executioner caspase related to Apopain/Yama* (Decay), et *Death-associated molecule related to Mch2* (Damm).

Dans les conditions physiologiques, les caspases initiatrices sont maintenues inactives par une interaction directe avec des protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) comprenant Diap-1, Diap-2, *Drosophila BIR repeat containing ubiquitin-conjugating enzyme* (dBruce) et Deterin chez la drosophile. Lors d'un stimulus apoptotique, différentes voies de signalisation convergent pour activer des protéines pro-apoptotiques nommées Reaper, *Head involution defective* (Hid) et Grim dont certaines se relocalisent à la mitochondrie. Ces protéines vont interagir physiquement avec les protéines IAP, libérant ainsi les caspases initiatrices. Ces dernières vont former un complexe protéique avec la protéine *Apoptotic protease activation factor* (Apaf-1), appelé apoptosome, pour stimuler l'activation des caspases effectrices par clivage, permettant l'initiation du processus de mort cellulaire.

Chez les mammifères, la voie mitochondriale du processus de mort cellulaire par apoptose est très similaire à celle de la drosophile. Cependant, la différence majeure réside dans le rôle des mitochondries et le relargage du cytochrome c dans le cytoplasme, dont l'implication semble être moins essentielle chez la drosophile. En effet, le cytochrome c agit comme un facteur essentiel pour la formation de l'apoptosome chez les mammifères. Lors d'un signal apoptotique, les protéines pro-apoptotiques de la famille « BH3-only » activent les protéines Bax et Bak à la membrane des mitochondries, ce qui provoque la libération du cytochrome c dans le cytosol, permettant la formation de l'apoptosome. Le relargage des protéines mitochondriales Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 vers le cytosol, favorise également le processus d'apoptose en inhibant les protéines IAP. L'ensemble de ce processus active les caspases effectrices et induit la mort cellulaire.

Finalement, la mort cellulaire par apoptose est essentielle pour l'élimination des cellules tout au long de la vie de l'organisme, notamment lorsqu'elles sont endommagées ou néfastes. Cette mort peut être déclenchée en réponse à différents stress comme des dommages de l'acide désoxyribonucléique (ADN), une infection virale, un stress du RE, ou bien à une forte inflammation [205–207]. Une mort cellulaire en excès est décrite dans de nombreuses pathologies, comme dans le cas de la SA, où il a été observé une apoptose importante des chondrocytes, qui pourrait participer à une dégénérescence du cartilage [208].

3) Conservation des principales voies de signalisation avec les vertébrés

Un des enjeux majeurs en biologie est la compréhension du fonctionnement de la cellule et des nombreux processus qui s'y déroulent via de multiples voies de signalisation. En effet, les cellules intègrent de multiples signaux provenant soit de son propre système, soit de cellules voisines, soit de manière systémique, activant de nombreuses voies de signalisation. Il est maintenant bien admis que les voies de signalisation sont fortement interconnectées, pouvant être inhibées, renforcées, ou complétées, suivant la nature des stimuli. Les cellules génèrent ainsi des réponses extrêmement diverses, ce qui est essentiel pour un fonctionnement adéquat. L'ensemble des interactions entre ces voies biologiques est appelé interactome [209, 210].

Bien que la nature des signaux cellulaires et des voies de signalisation soit relativement bien caractérisée, l'acquisition d'une vision intégrative de la signalisation constitue un véritable défi. En effet chez l'Homme, de part la complexité du génome, des nombreux rétrocontrôles de voies de signalisation, et des multiples signaux reçus par la cellule, la compréhension complète du dialogue intracellulaire reste très complexe. Le séquençage complet du génome de *Drosophila melanogaster* a permis d'identifier de nombreux gènes codant pour des composants de voies de signalisation [162]. Par exemple, les principales voies de signalisation connues chez l'Homme et impliquées dans de nombreux processus cellulaires, telles que les voies Wnt, Notch (N), Hedgehog (Hh), Hippo (Hpo), Epidermal Growth Factor (EGF), JAK, TNF, les voies Mitogen-activated protein kinase (MAPK) ou encore la voie *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β), sont retrouvées dans le modèle drosophile [211]. L'un des avantages du modèle drosophile est que la plupart des mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent des processus biologiques communs aux métazoaires sont fortement conservés mais avec une plus grande simplicité génique chez la drosophile. Ainsi, de part la simplicité de son génome, de l'importante collection de mutants disponibles et des nombreux outils génétiques, la drosophile semble être un modèle idéal pour comprendre cette vision intégrative de la signalisation cellulaire. De récentes études dans ce modèle animal, ont permis d'établir une cartographie des voies de signalisation et des différentes interactions entre les voies de signalisation qui interviennent au sein d'une cellule sous l'effet de divers stimuli. Leurs résultats démontrent bien la complexité qui est mise en place au niveau cellulaire, en constatant que suivant les différentes combinaisons de ligands et de récepteurs présents, la réponse transcriptionnelle qui en découle est extrêmement variable.

L'étude de l'ensemble des réponses cellulaires face à divers stimuli est essentielle pour une compréhension globale des mécanismes cellulaires. Dans le cas de nombreuses pathologies, la complexité des mécanismes cellulaires constitue une véritable difficulté pour la mise en place d'un traitement approprié. Ainsi, la connaissance des interactions entre les voies de signalisation est essentielle pour comprendre les processus cellulaires impliqués dans diverses pathologies et les mécanismes de résistance aux médicaments. Les études menées dans le modèle drosophile semblent être appropriées pour révéler les mécanismes cellulaires et les interactions entre les voies mises en place au cœur de la cellule.

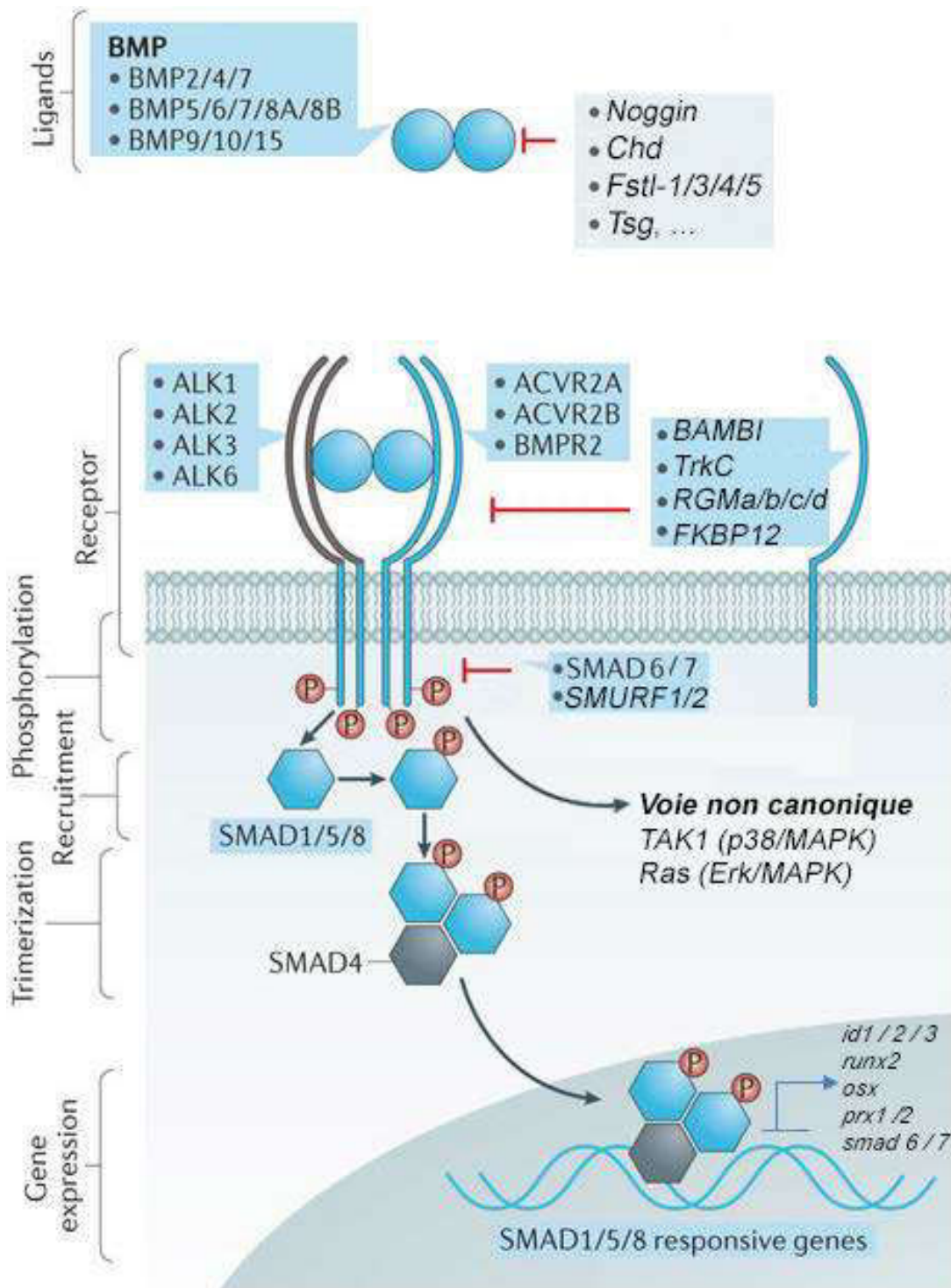


Figure 15 : La voie BMP chez les mammifères (adapté de Salazar et al. [212])

La voie de signalisation canonique BMP est initié par la liaison de différents homo-ou hétérodimères de ligands BMP (BMP2/4/7, BMP 5/6/7/8A/8B, ou BMP9/10/15) sur un complexe tétrahétérodimérique de récepteurs. Ce complexe est composé de deux récepteurs de type I (ALK1, ALK2, ALK3 ou ALK6), et de deux récepteurs de type II (ACVR2A, ACVR2B ou BMPR2). L'accès des ligands aux récepteurs est dépendant de nombreuses protéines extracellulaire contrôlant sa disponibilité (Noggin, Chd, Tsg,...). Au niveau de la membrane plasmique, des protéines membranaires, agissant comme des pseudorécepteurs régulent la disponibilité des récepteurs (Bambi, TrkC). La liaison ligands-récepteurs aboutit à la phosphorylation des facteurs de transcriptions Smad1/5/8 pour former un complexe trimérique composé de deux molécules P-Smad et de son cofacteur Smad4 pour la translocation vers le noyau et la régulation de différents gènes cibles (*id1/2/3*, *runx2*, *osx*, *prx1/2*, et *smad6/7*). Les Smad inhibiteurs, Smad6 et Smad7, régule la phosphorylation des Smad effectrices : soit en bloquant la liaison récepteurs-Smad1/5/8, soit en recrutant l'ubiquitine ligase Smurf pour leur dégradation vers le protéasome. Une voie non canonique de la signalisation BMP conduit à l'activation de la voie MAPK, par les protéines TAK1 ou Ras.

V. La voie de signalisation *Bone Morphogenetic Protein* (BMP)

A. La voie BMP chez l'Homme

1) Le rôle

Les protéines morphogénétiques osseuses (BMP) sont un groupe de molécules de signalisation appartenant à la superfamille du TGF- β . Ces protéines furent initialement découvertes devant leur forte capacité à induire la formation osseuse, mais elles jouent aussi un rôle important dans une multitude de processus durant le développement embryonnaire et l'homéostasie tissulaire chez l'adulte. Ainsi, au delà de l'ostéogenèse, ces protéines présentent la capacité de réguler la morphogenèse, la différenciation et la prolifération cellulaire, ainsi que l'apoptose d'une grande variété de types cellulaires [213, 214].

2) La découverte

Les BMP ont été découvertes à l'origine par leur capacité à induire une formation osseuse ectopique. C'est en 1965 qu'Urist *et al.* observèrent l'induction de cartilage et de tissus osseux dans le muscle squelettique, après implantation d'une matrice osseuse déminéralisée par traitement à l'acide chlorhydrique. Ce phénomène a alors été attribué à une substance supposée présente dans la matrice osseuse : la BMP [215]. Ces résultats furent confirmés en 1972 par Reddi et Huggins lors d'une injection de matrice osseuse dans le tissu sous-cutané [216]. L'ensemble de leurs résultats suggérait l'existence de molécules ayant la capacité de restaurer les propriétés morphogénétiques osseuses afin de différencier les cellules environnantes en tissu osseux. En 1988, Wozney et ses collègues ont, par le biais d'expériences de clonage moléculaire ont pu identifier non pas une seule molécule mais une famille de protéines ostéogéniques présentant une forte similitude de séquences [217]. Ainsi, au début des années 90, plus d'une douzaine de BMP furent identifiées chez les vertébrés. Aujourd'hui, c'est environ une vingtaine de protéines de cette famille qui sont connues [218]. Les différents partenaires protéiques de la voie de signalisation BMP ont par la suite été identifiés par le biais d'études *in vitro* et *in vivo* [Figure 15].

3) Activation de la voie

a) Les ligands

Les ligands de la voie BMP constituent aujourd'hui une famille de plus d'une douzaine de molécules pouvant être réparties en 4 groupes suivant leur homologie de séquences : les BMP-2/4 ; les BMP-5/6/7/8 ; les BMP-9/10 et les BMP-12/13/14 [212, 219, 220]. Elles diffèrent par certaines caractéristiques relatives à leur structure, leur synthèse et leurs effets mais toutes possèdent la capacité d'induire la formation osseuse. La plupart des BMP sont exprimés dans divers tissus, cependant certains membres ne sont retrouvés que dans des tissus spécifiques. Par exemple, les BMP-3, -4, -5 et -6 sont fortement présentes dans le poumon, alors que BMP-7 est abondamment synthétisée dans le rein. BMP-3 est abondamment sécrétée par les ostéoblastes et les ostéocytes, tandis que BMP-9 est produite par les hépatocytes et circule dans le plasma. Cependant, le rôle précis de chaque ligand BMP n'est pas encore totalement élucidé.

De manière similaire aux autres membres de la super-famille du TGF- β , les BMP sont synthétisées sous forme d'un pré-pro-peptide constitué de 3 domaines : une séquence «signal» hydrophobe, qui dirige leur synthèse vers la voie de sécrétion, une pro-région qui permet le repliement de la protéine avant que celle-ci ne soit sécrétée, et un domaine actif.

Dans le RE, le peptide signal du pré-pro-peptide est clivé puis libéré dans le cytosol. Les différents pro-peptides vont rester libres ou se dimériser avec un autre polypeptide via des ponts disulfures dans la lumière du RE. Les BMP peuvent ainsi former des homodimères, ou bien des hétérodimères avec d'autres BMP. Une enzyme protéolytique va par la suite, activer ces dimères par clivage de la pro-région, libérant ainsi le domaine actif pouvant être sécrété dans le milieu extracellulaire.

b) Les récepteurs

Les BMP, comme d'autres membres de la superfamille du TGF- β , peuvent activer deux types de récepteurs transmembranaires de type sérine-thréonine kinase. Il existe actuellement 6 récepteurs capables de se lier aux BMP. Ces récepteurs peuvent être subdivisés en deux classes fonctionnelles [221, 222] :

- les récepteurs de type I : il existe sept récepteurs de type I des ligands de la superfamille du TGF- β , mais seuls trois ont la capacité à lier les BMP. Leurs gènes sont nommés *activin receptor type IA*, *ActR1a* (synonymes : *ACVR1*, *ACVRL2*, *ACVRLK2*) codant pour l'Activin Receptor-Like Kinase-2 (ALK-2), le *BMP receptor type Ia*, *BMPR1A* (synonymes : *ALK-3*, *ACVRLK3*) codant le BMP Receptor-IA (BMPR-IA) et le *BMP receptor type Ib*, *BMPR1B* (synonymes : *ALK-6*) codant le BMP Receptor type-1B (BMPR-1B). Les deux derniers récepteurs ne se lient exclusivement qu'aux BMP, tandis que le récepteur ALK-2 peut se lier aux BMP mais aussi à certains ligands de type activine. BMPR-IA et BMPR-1B sont structurellement très similaires l'un à l'autre et se différencient d'ALK-2. Les gènes *ActR1a* et *BMPR1A* sont largement exprimés dans divers types de cellules. En revanche, le gène *BMPR1B* est exprimé d'une manière plus restreinte. Par ailleurs, il existe un autre récepteur, ALK-1 (codé par le gène *ACVRL1*, synonymes : *ACVRLK1*), dont la structure est très similaire à celle d'ALK-2, mais dont l'expression est limitée aux cellules endothéliales et à quelques autres types cellulaires.
- Les récepteurs de type II : Il existe trois récepteurs de type II pour les BMP chez les mammifères : le récepteur BMP de type II (*BMP Receptor II* ou BMPR-II), le récepteur d'activine de type IIA (*Activin Receptor-IIA* ou ActR-IIA) et le récepteur d'activine de type IIB (*Activin Receptor-IIB* ou ActR-IIB). BMPR-II est spécifique des ligands BMP, tandis que ActR-IIA et ActR-IIB peuvent se lier aussi à d'autres membres de la superfamille du TGF- β (activines et myostatines). ActR-IIA et ActR-IIB présentent une forte similitude de structure l'un à l'autre, avec une homologie de 64% et se différencient de BMPR-II. Ces récepteurs de type II sont présents dans la plupart des types cellulaires et semblent se lier à la plupart des ligands BMP.

A la surface de la cellule, ces récepteurs peuvent être présents sous forme de complexes hétéro ou homodimériques. Ainsi en fonction du type de récepteur que la cellule expose à sa surface et le type d'association entre ces mêmes récepteurs, les conséquences de leur activation seront différentes. L'affinité des BMP dépend principalement des récepteurs de type I. Par exemple, les BMP-2 et BMP-4 se lient préférentiellement à BMPR-IA et à BMPR-1B alors que BMP-6 et BMP-7 se fixent fortement à ActR-IA et faiblement à BMPR-1B.

En l'absence de stimulation par leurs ligands, les homodimères et hétérodimères de récepteurs sont très peu exprimés à la surface des cellules mais la fixation d'un ligand augmente l'oligomérisation de ces récepteurs, ce qui a pour conséquence de modifier leur conformation et d'induire leur activation.

Les récepteurs des BMP sont composés de trois parties distinctes : un court domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire qui contient la région sérine/thréonine active. Les domaines extracellulaires des récepteurs des deux types possèdent de nombreuses cystéines qui sont essentielles à la bonne formation de leur structure tridimensionnelle.

Le domaine intracellulaire des récepteurs de type I est constitué d'une zone très riche en glycines et en sérines (domaine GS) située en N-terminal dans le domaine sérine thréonine kinase. Une fois le ligand fixé à son récepteur de type I, le domaine GS de ce dernier est phosphorylé par un récepteur de type II. C'est une étape cruciale de la transduction du signal par les récepteurs sérine-thréonine kinase.

Lors de l'activation du signal BMP, deux scénarios sont possibles :

- Un hétéro- ou homo-dimère de BMP lié au préalable à des récepteurs de haute affinité (BMPR-1A ou BMPR1B) recrute des récepteurs de type II pour former un complexe hétéro-oligomérique.
- Un hétéro- ou homo-dimère de BMP se lie à un complexe hétéro-oligomérique préformé, constitué de récepteurs de type I et II.

Les récepteurs kinases de type I activés phosphorylent ensuite leurs substrats en aval dans le cytosol, qui sont des protéines Smad par homologie aux deux protéines Mad et Sma, qui sont respectivement présentes chez la drosophile et le nématode.

c) La signalisation intracellulaire

Au total, huit protéines Smad (Smad-1 à Smad-8) ont été identifiées chez les mammifères. Ces protéines peuvent être séparées en trois catégories fonctionnelles [223] :

- Les Smad effectrices (R-Smad) composées des Smad-1, -5 et -8, qui sont activées par les récepteurs. Leur structure est très similaire et leurs différences fonctionnelles ne sont pas connues.
- Le cofacteur Smad (Co-Smad) nommé Smad-4, qui interagit avec les Smad effectrices.
- Les Smad régulateurs (I-Smad) comprenant Smad-6 et -7 qui inhibent le signal des membres de la famille TGF- β en empêchant l'activation des R-Smad [224].

Les Smad ont des régions C- et N-terminales très conservées appelées Mad homology 1 et 2 (MH1 et MH2). Le domaine MH2 est présent dans toutes les Smad alors que le domaine MH1 est présent uniquement dans les R-Smad et les Co-Smad. La région MH2 est impliquée dans l'interaction avec les récepteurs, et l'oligomérisation des Smad. La région MH1 est responsable de la translocation au noyau. Enfin, la région centrale contient plusieurs sites de phosphorylation et une séquence de reconnaissance PPAY pour l'ubiquitine ligase E3, permettant leur dégradation par le protéasome. Les R-Smad possèdent à leur extrémité C-terminale une séquence SSXS (sérine-sérine-X-sérine), qui correspond au site de phosphorylation par les récepteurs de type I. Les protéines R-Smad, phosphorylées et activées, forment des complexes avec Smad-4 et se déplacent vers le noyau. Les Smad ne possèdent que peu de sites de liaison avec l'ADN, ce qui ne leur permet pas d'interagir directement avec l'ADN. Des protéines sont donc nécessaires pour créer et stabiliser des liens entre les Smad et l'ADN, permettant ainsi leur action.

Par ailleurs, les récepteurs BMP peuvent activer également des voies de signalisation indépendantes des Smad, telles que les voies MAPK (*c-Jun N-terminal kinases* (JNK), p38) , *phosphoinositol-3-kinase* (PI3K)/Akt et de petites GTPases (*Ras homolog gene family* (Rho), *Ras-related C3 botulinum toxin substrate* (Rac), et *Cell division control protein 42 homolog* (Cdc42). Ces voies coopèrent avec les voies Smad pour réguler diverses réponses cellulaires [225].

d) Les gènes cibles

La cartographie génomique des sites de liaison des protéines Smad à l'aide d'approches d'immunoprécipitation de la chromatine (*Chromatin ImmunoPrecipitation* en anglais, ChIP), a permis de révéler les principaux gènes cibles activés par les protéines Smad [226]. D'autre part, des expériences de Chip-seq ont révélé une séquence centrale appelée élément de reconnaissance *B* (BRE) sur laquelle se fixent préférentiellement les R-Smad pour la transcription de leurs gènes cibles.

La plupart des gènes cibles induits par la signalisation BMP, codent des facteurs de transcription impliqués notamment dans la croissance, la différenciation et la sénescence cellulaire. Parmi ces gènes, les *DNA-binding protein inhibitor 1, 2 et 3* (Id1, Id2 et Id3) sont induits dès la première heure d'activation des BMP, dans divers types de cellules de mammifères.

Dans les cellules mésenchymateuses précoces, ce sont des gènes impliqués dans la différenciation ostéoblastique qui sont contrôlés transcriptionnellement par les Smad, tels que *Runt-related transcription factor 2* (runx2), *osterix* (osx), *paired-related homeobox 1 and 2* (prx-1, -2).

D'autre part, la signalisation BMP peut réguler à la hausse l'expression de certains de ses inhibiteurs, tels que Smad-6 et -7 ou *BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog* (*Bambi*), créant une boucle de rétroaction négative qui limite l'activité des BMPs.

e) Les régulateurs

i. Régulation extracellulaire

La signalisation BMP est régulée à plusieurs niveaux depuis le milieu extracellulaire jusqu'au noyau. Il existe un certain nombre de protéines extracellulaires qui régulent les protéines de la superfamille du TGF- β en formant des complexes avec eux. Certains bloquent la liaison aux récepteurs, inhibant ainsi la signalisation intracellulaire en aval, tandis que d'autres la favorise. Les principaux antagonistes sont décrits ci-dessous [227–229].

Noggin est la première et la mieux décrite des protéines antagonistes des BMP [230]. C'est une glycoprotéine homodimérique, qui possède une très forte affinité pour BMP-7 mais peut également interagir avec BMP-2 et -4. Cette protéine est impliquée dans de nombreux processus biologiques, tels que la formation osseuse, le développement de l'hypophyse, du cœur, de la prostate, du thymus, et de la parathyroïde. Pour exemple, la délétion homozygote du gène *noggin* chez la souris est létale au stade périnatal, avec des altération majeures de la fermeture du tube neural, des malformations des membres, et une perturbation du développement des somites. Toutes ces anomalies peuvent être attribuées à une perturbation de l'activité des BMP dans les tissus affectés.

La Chordine (Chd), découverte pour son importance dans la structuration dorso-ventrale de l'embryon de Xénope, est une protéine extracellulaire caractérisée par quatre répétitions riches en cystéine [231]. Cette protéine est considérée comme un des membres d'une famille de protéines structurellement similaires, comprenant les chordin-like-1 et -2, crossveinless 2 (Cv-2), brolin, brolin-like et *Kielin/chordin-like protein* (Crim2). Ces domaines riches en cystéine sont importants pour médier la liaison aux BMP. La Chordine, à la différence de la protéine Noggin, est décrite pour se lier préférentiellement aux ligands BMP-2 et BMP-4 avec une très forte affinité par rapport à BMP-7, empêchant leur fixation aux récepteurs.

L'antagoniste follistatine (FSTL) est une glycoprotéine sécrétée à multidomaine qui se lie préférentiellement aux activines, mais elle régule aussi BMP-4 [232].

Il existe quatre protéines de type follistatine (FSTL-1 /-3 /-4 /-5) décrites à ce jour, dont l'expression dépend du tissu. FSTL-1 agit comme un antagoniste de haute affinité pour BMP-4 dans la régulation du développement squelettique. FSTL-3 agit comme un antagoniste de l'activine dans le développement testiculaire. Enfin, FSTL-4 et -5 ne semblent pas avoir de réel effet antagoniste de la superfamille des TGF- β .

La protéine Twisted Gastrulation (TSG) est une glycoprotéine sécrétée qui agit dans de nombreux tissus embryonnaires [233]. Son rôle varie selon le contexte extracellulaire et révèle une dualité de fonctions, en antagonisant ou en favorisant l'activité des ligands BMP. Par exemple, des études démontrent que TSG coopère avec la chordine en favorisant son activité antagoniste. Cependant, d'autres études prouvent que la TSG favorise la dégradation de la chordine par la métalloprotéase Tolloid.

De nombreux autres antagonistes, tels que Cerberus (Cer), Coco, Dan, Gremlin -1 et -2, Sclerostin, et Wise, sont décrits pour antagoniser les ligands BMP et TGF- β [234–239]. Leur action est spécifique de certaines espèces animales et de certains tissus, ou de certains stades du développement.

ii. Régulation des récepteurs

La signalisation BMP peut être modulée au niveau des récepteurs de diverses manières :

(i) Des pseudorécepteurs se comportent comme des récepteurs compétitifs qui peuvent fixer les récepteurs des BMP et moduler leur activité. Parmi ces pseudorécepteurs, Bambi possède une conformation très proche de celle des récepteurs de type I, mais il ne possède pas de domaine intracellulaire. Bambi inhibe la signalisation induite par le ligand en empêchant la formation des complexes récepteur de type I/type II [240]. L'expression de *bambi* est induite par les voies BMP et TGF- β . Un autre exemple est le récepteur *Tropomyosine Receptor kinase C* (TrkC), ayant la capacité de se lier à BMPR-II, modifiant ainsi les interactions avec les récepteurs de type I [241].

(ii) La découverte d'une famille de molécules appelées *Repulsive Guidance Molecules* (RGM) qui agissent comme des co-récepteurs de BMP indique un nouveau moyen de réguler la voie. Ces RGM sont des protéines associées à la membrane et liées au glycosylphosphatidylinositol (GPI). Il existe quatre RGM chez les vertébrés, nommées RGMa, RGMb (ou DRAGON), RGMc et RGMd. Leur rôle n'est pas encore totalement décrit, mais elles semblent interagir spécifiquement avec les récepteurs BMP et/ou les ligands afin de favoriser le recrutement des récepteurs de type II qui ne seraient normalement pas utilisés par une BMP particulière, dans le but d'intensifier le signal [242].

(iii) La protéine de type immunophiline *FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase* (FKBP12), dont l'implication dans l'inhibition de la voie de la rapamycine *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) a bien été caractérisée, interagit physiquement avec le récepteur de type 1 ALK2, bloquant ainsi la phosphorylation des R-Smad [243].

(iv) Enfin, les récepteurs BMP peuvent être régulés négativement par les I-Smad (Smad-6 et Smad-7) à deux niveaux. Ils se fixent sur les récepteurs du type I, bloquant ainsi l'accès aux R-Smad et leur phosphorylation. De plus, Smad-7 facilite l'interaction entre *Smad ubiquitination regulatory factor 2* (Smurf2) et l'*Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3* (UBE2L3) [244]. Smurf1 et Smurf2, agissent en concomitance avec les I-Smad et ubiquitinylent les récepteurs de type I pour provoquer leur dégradation via le protéasome. La sérine-thréonine kinase Salt-inducible kinase (SIK) coopère avec le complexe Smad-7/Smurf2 pour faciliter la dégradation des récepteurs BMP. Son expression est induite par la signalisation TGF- β et BMP, créant ainsi une boucle de rétrocontrôle négatif [245].

iii. Régulation des protéines Smad

Les R-Smad sont essentiellement régulées par les I-Smad au niveau cytoplasmique et nucléaire [224]. Smad-6 interagit avec Smad-1 activée et inhibe la signalisation BMP en interférant avec la formation d'un complexe entre Smad-1 et Smad-4.

De plus, l'association de Smurf1 avec I-Smad peut entraîner une association indirecte de Smurf1 avec Smad-1 ou Smad-5, conduisant à une ubiquitinylation et à leur dégradation.

De même, Smad-7 peut inhiber la signalisation du TGF- β en ciblant Smad-2/-3. Smad-7 forme un complexe hétéromérique avec Smad-2/-3 activé et interfère avec la formation du complexe Smad-2/-3-Smad-4. Il recrute également la ligase E3 de type HECT *neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4* (NEDD4) au complexe hétéromérique Smad-2/-3-Smad-7 et facilite l'ubiquitylation et la dégradation de Smad-2/-3 phosphorylée

Comme décrit précédemment, les R-Smad possèdent entre leur région MH1 et MH2, un motif PPAY reconnu par le complexe ubiquitine ligase, favorisant ainsi leur dégradation via le protéasome.

iv. Régulation nucléaire

Il existe divers co-activateurs transcriptionnels tels que l'*Histone acetyltransferase p300* (p300), *CREB-binding protein* (CBP), Runx2 et *histone acetyltransferase GCN5* (GCN5), ainsi que divers co-répresseurs tels que c-Ski, SnoN, Tob ou *Smad interacting protein 1* (SIP1), qui se lient aux complexes R-Smad/Co-Smad, permettant l'activation ou la répression de la transcription des gènes cibles de la voie. De plus, les I-Smad sont aussi retrouvées dans le noyau, et peuvent y jouer un rôle de modulateur des R-Smad, en bloquant leur fixation à l'ADN, ou bien en induisant leur dégradation *via* le protéasome.

4) Autre rôle de la signalisation BMP

La voie BMP est décrite pour induire la signalisation Smad, comme présentée précédemment. Cependant, il existe une autre branche de signalisation de la voie BMP, appelée voie *indépendante des Smad* ou voie *non-canonique*, qui active d'autres voies de signalisation comme les voies MAPK, la voie des GTPases de type Rho, ou bien l'activation de PP2A, qui sont décrites brièvement ci-dessous [225].

En effet, les récepteurs des BMP peuvent activer des composants de la voie MAPK, soit par le biais de la protéine *Transforming growth factor beta-activated kinase 1* (TAK1) pour induire la signalisation *P38 mitogen-activated protein kinase* (p38), ou bien par la protéine Ras, pour activer la signalisation *Extracellular signal-regulated kinases* (Erk). Néanmoins, ces mécanismes d'activation et leurs conséquences biologiques restent encore mal caractérisés.

Les BMP peuvent également signaler à travers la protéine phosphatase 2 (PP2A) impliquée dans de nombreux processus cellulaires, en activant notamment des proto-oncogènes comme c-Raf, ou Akt1.

Enfin, la signalisation BMP pourrait activer des GTPases de type Rho, tels que Rho, Rac et Cdc42, et ainsi moduler l'organisation du cytosquelette de la cellule. Ce processus est important, par exemple, pour la formation de lamellipodes, pour laquelle une intense activité BMP est observée.

Finalement, il est important de retenir que la signalisation BMP, outre son activité Smad, peut agir sur de nombreuses voies et ainsi contrôler de nombreux processus cellulaires comme l'apoptose, la migration, la différenciation et la survie cellulaire.

Protéines	Mammifères	<i>Drosophila melanogaster</i>
Ligands	BMP2/4/7	Dpp
	BMP6/7/8	Gbb
	BMP5	Scw
	BMP 9/10	∅
	BMP 12/13/14	∅
Protéines régulatrices	BMP1 / TLL1	Tld
	BMPER	Cv-2
	Chd	Sog
	Nog	
	DLC1	Cv-c
	FSLT	Fs
	Smurf1/2	Smurf
	Tsg	Cv
Tsg		
Rc Type I	ActR-IA (synonyme : ALK1/ALK2)	Sax
	BMPR-IA (synonyme : ALK3)	Tkv
	BMPR-IB (synonyme : ALK6)	
Rc Type II	ActR-IIA	Put
	ActR-IIB	
	BMPR-II	Wit
R-Smad	Smad1/5/8	Mad
	Smad2/3	Smox
Co-Smad	Smad4	Medea
I-Smad	Smad6	Dad
	Smad7	

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des différentes protéines de la signalisation BMP chez les mammifères et leur équivalent chez *Drosophila melanogaster*

B. La voie BMP chez *Drosophila melanogaster*

La signalisation TGF- β / BMP est une voie de communication fortement conservée chez les métazoaires [246]. Le génome de la drosophile code un ensemble important de gènes impliqués dans la signalisation TGF- β / BMP. Néanmoins, il code pour moins de ligands, de récepteurs et de protéines Smad que les génomes de mammifères [Tableau 4].

Cette moindre redondance génique facilite l'étude et la compréhension des mécanismes moléculaires de cette signalisation, permettant ainsi de caractériser l'ensemble des détails de la régulation du signal plus facilement que chez les mammifères, dont les voies de signalisation sont plus complexes.

1) Structure générale de la cascade de signalisation

Après plusieurs décennies de recherche, la signalisation BMP de la drosophile, sa structuration, et sa régulation sont maintenant relativement bien connus. L'importance de cette voie dans le développement de *Drosophila melanogaster* est bien décrite. Ainsi, la perte de la signalisation induit des altérations majeures durant l'embryogenèse et plus tard dans la formation, la croissance et la structuration des disques imaginaux. La structure générale de la signalisation BMP de la drosophile est très similaire à celle des vertébrés. Un ligand homo- ou hétéro-dimérique interagit avec un complexe de récepteurs membranaires, activant les effecteurs Smad intracellulaires, qui après translocation dans le noyau, régulent la transcription de gènes cibles [247] [Figure 16]. Néanmoins, la compréhension de la complexité et des subtilités de cette signalisation reste imparfaite.

a) Les ligands

On recense au total sept ligands de la superfamille TGF- β chez la drosophile, mais seulement trois sont spécifiques de la voie BMP. Ils sont nommés *decapentaplegic* (*dpp*), *glass bottom boat* (*gbb*), et *screw* (*scw*) [248–250]. De manière similaire à ce qui est observé chez les vertébrés, les ligands BMP peuvent former des homodimères ou des hétérodimères. Des hétérodimères entre Dpp et les deux autres BMP, Scw et Gbb, ont été identifiés et auraient des fonctions spécifiques distinctes des homodimères.

Dpp est l'homologue des BMP-2 et -4 chez les vertébrés. Son rôle a été particulièrement bien décrit, car il agit comme un morphogène au cours de tous les stades de la vie de l'animal, allant de la structuration de l'embryon au maintien des cellules souches intestinales adultes. C'est pour son rôle biologique important que Dpp a été largement étudié dans le modèle drosophile. Le locus *dpp* s'étend sur près de 55kb et pas moins de 60 mutations l'affectant ont été caractérisées moléculairement.

Gbb est l'homologue des BMP-5, -6, -7 et -8 chez les vertébrés. A l'origine, Gbb a reçu son nom en raison de la transparence des larves de troisième stade lorsque ce gène est muté. Ce phénomène est également observé suite à de longues périodes de privation en nutriments et il a pu être observé que l'absence de ce gène induisait une perturbation de la formation de l'intestin moyen et du corps gras.

Scw ne possède pas de réel homologue chez les vertébrés et semble être présent uniquement chez les diptères supérieurs. Cependant, il semble être moléculairement plus proche des BMP-5, -6, -7 et -8 que des BMP-2 et -4. Son action est essentiellement restreinte au stade embryonnaire, où l'existence de dimères Scw/Dpp fut observée. Cet hétérodimère participe à l'établissement de l'amnioséreuse extraembryonnaire et de l'ectoderme dorsal chez l'embryon.

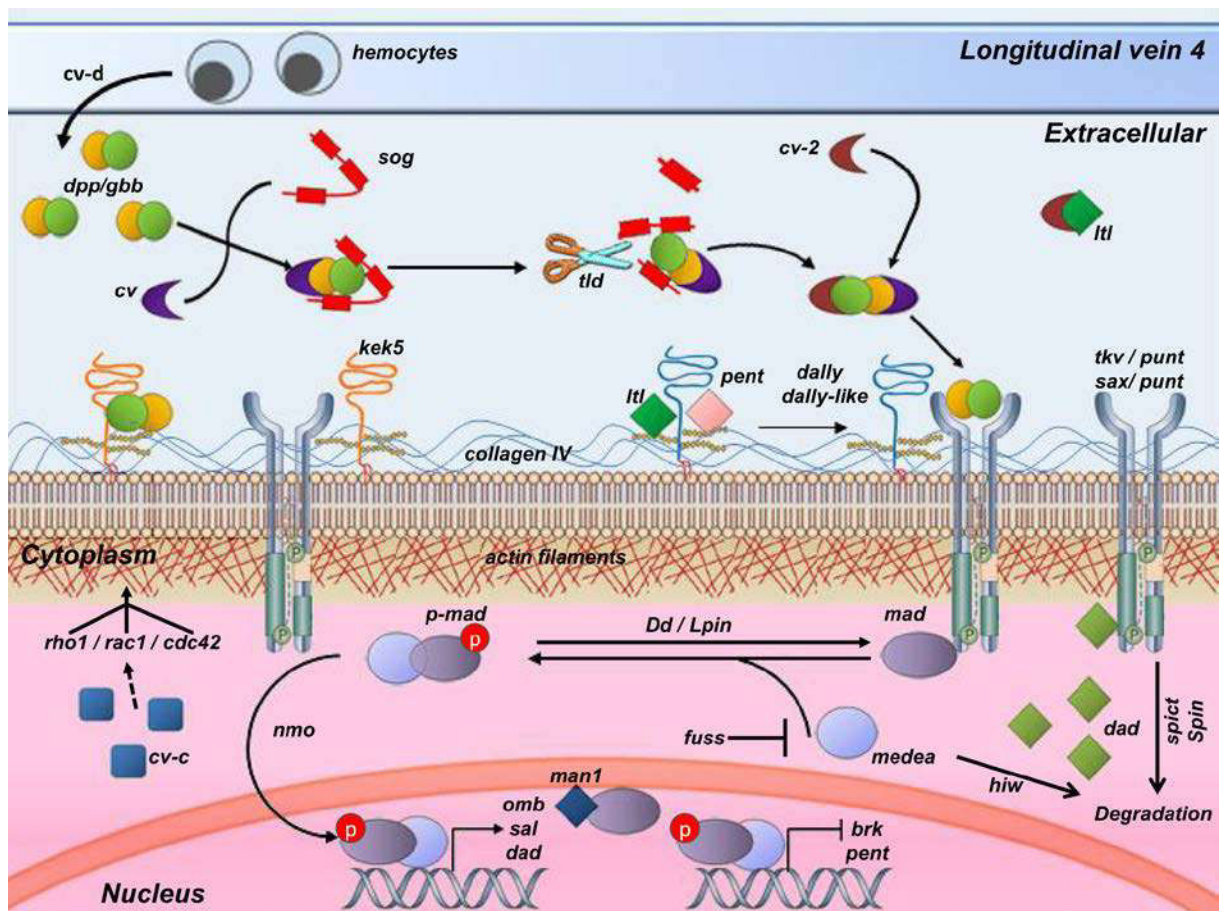


Figure 16 : Les principaux composants de la voie de signalisation BMP dans le développement de l'aile chez *Drosophila melanogaster*

Chez *Drosophila melanogaster*, un homo ou hétérodimère de ligands BMP (Dpp/Dpp, Dpp/Gbb ou Gbb/Gbb) se lie à des complexes tétramériques de récepteurs à la surface de la membrane cellulaire, qui sont constitués de paires d' homo- ou hétérodimères de récepteurs de type I (Tkv/Tkv, Tkv/Sax ou Sax/Sax) et d'un dimère de récepteurs de type II (Punt et Wit). L'activation de ce complexe de récepteurs conduit à la phosphorylation du facteur de transcription Mad qui permet sa translocation vers le noyau, grâce à son co-facteur Medea. Ce complexe P-Mad / Medea active (*omb, sal, dad*), ou réprime (*brk, pent*) différents gènes cibles de la voie BMP dans l'aile. Comme chez les mammifères, plusieurs protéines régulent cette signalisation. Au niveau extracellulaire, les protéines Sog, Tld, Cv et Cv-2 contrôlent la disponibilité des ligands. Au niveau de la membrane plasmique, des protéines transmembranaires (Kek5, Dally, et Dally-like), contrôlent et facilitent la liaison des BMP à leurs récepteurs. Les protéines Ltl et Pent régulent l'activité de ces protéines transmembranaires. Au niveau intracellulaire, la phosphatase Dd/Lpin régule la phosphorylation de Mad. Le gène *nemo* (*nmo*) code pour une kinase qui interagit avec les protéines Mad pour réguler son entrée dans le noyau. Les protéines Hiw, et Spict/Spin sont impliquées dans la dégradation par le protéasome de Medea et des récepteurs BMP respectivement. La protéine Man1 présente sur la membrane nucléaire régule la disponibilité des Mad dans le noyau. La GTPase Cv-c régule le réseau de cytosquelette d'actine en activant plusieurs petites protéines G de la famille Ras, telles que Rho1, Rac1 et Cdc42. Enfin, la lipoprotéine Cv-d est sécrétée par les hémocytes des veines longitudinales et interagit avec les composants de la voie BMP, mais son rôle reste encore peu clair.

b) Les récepteurs

A la différence des vertébrés, il n'existe au total que cinq récepteurs de la voie TGF- β chez la drosophile [247]. Trois d'entre eux correspondent à des récepteurs de type I. Il s'agit de Thickveins (Tkv), Saxophone (Sax), et Baboon (Babo). Les deux récepteurs de type II sont Punt (Put) et *Wishful thinking* (Wit). Comme leurs homologues humains, ces récepteurs se regroupent en complexe tétramérique comprenant un homo- ou hétérodimère de récepteurs de type I et un homodimère de récepteurs de type II.

Ainsi, lorsque le complexe récepteur fixe des ligands, les récepteurs de type II phosphorylent les récepteurs de type I pour activer la transmission du signal en aval. Le récepteur de type I Tkv est l'homologue des récepteurs BMPR-IA et BMPR-IB, tandis que Sax est l'homologue de ActR-IA chez les vertébrés. A la différence de Tkv et Sax, qui peuvent médier la signalisation BMP, Babo est spécifique de la voie Activin/TGF- β . Son homologue chez les mammifères est le récepteur TGFBR-I ou ALK-5. Des mutations des gènes codant ces protéines conduisent indépendamment à la létalité embryonnaire. La surexpression du gène codant Tkv peut sauver des mutants de Sax, tandis, que la surexpression du gène codant Sax ne permet pas de sauver des mutant Tkv. Ces résultats suggèrent que Tkv est le récepteur dominant pour la signalisation BMP. Sax agirait quant à lui comme un modulateur de la signalisation.

Une découverte importante concernant les deux récepteurs BMP de type I est que les dimères de ligands et les complexes de récepteurs sont importants pour moduler la force de signalisation BMP, que ce soit dans l'embryon ou le disque de l'aile. En effet, la signalisation BMP est modulée suivant la conformation du complexe récepteur formé. Sax et Tkv peuvent former des homodimères et des hétérodimères. Ainsi, trois formes différentes de complexes de récepteurs de BMP peuvent potentiellement se former : Sax-Sax ; Tkv-Tkv et Tkv-Sax. Les deux derniers dimères peuvent induire la signalisation BMP avec un effet plus fort pour l'hétérodimère. Au contraire, l'homodimère Sax-Sax semble séquestrer le ligand sans aucune signalisation BMP associée, confortant l'idée que Sax serait un modulateur de la signalisation [249]. L'ensemble de ces résultats illustre un rôle des récepteurs de type I en tant que déterminants de spécificité pour la signalisation BMP.

c) La signalisation intracellulaire

Chez *Drosophila melanogaster*, une seule protéine de chacun des types de Smad (R-Smad, Co-Smad, et I-Smad) a été identifiée dans la voie de signalisation BMP [247]. Le R-Smad appelé *Mothers against dpp* (Mad), à l'image de ceux des vertébrés, s'active par phosphorylation des récepteurs de type I pour agir comme facteur de transcription dans le noyau. Mad fut identifié en 1995 par Raftery *et al.*, en démontrant que des mutants de ce gène se comportaient comme des *enhancers* maternels dominants du phénotype de ventralisation d'allèles mutants de *dpp* [250]. Des expériences de relation épistatique ont permis de placer la protéine Mad en aval du ligand et des récepteurs. De manière comparable aux vertébrés, Mad est divisée en trois domaines : les deux domaines d'homologie MH1 et MH2 séparés par le domaine de liaison riche en proline.

L'unique Co-Smad identifiée chez la drosophile et découverte au cours du même crible génétique que Mad, est appelée *Medea* (Med) [251]. Sa structure est comparable à la protéine Mad, à l'exception de l'absence du motif SSXS de Mad, ce qui ne permet pas la phosphorylation de Med par les récepteurs de la voie. L'étude de Smad-4, son orthologue chez les vertébrés, a permis d'établir le rôle de médiateur de ces protéines dans la transduction du signal. Med se fixe à Mad pour sa translocation au noyau.

A l'image de la protéine Smad-4, Med peut également se complexer avec le R-Smad de la voie TGF- β , l'homologue de Smad-2 appelé dSmad-2. Med agit ainsi comme un médiateur, aussi bien de la signalisation BMP, que de la signalisation TGF- β /Activine.

L'I-Smad de drosophile est *Daughters against dpp* (Dad), l'homologue de Smad-7 chez les vertébrés [252]. Sa structure est différente des autres membres de la famille Smad, puisqu'elle ne possède pas de domaine d'homologie MH1, mais uniquement le domaine MH2, lui permettant de s'oligomériser avec les récepteurs de type I, Mad et Med. Le rôle des I-Smad a été particulièrement étudié chez les mammifères.

Comme ses homologues, Dad inhibe la signalisation BMP par différents mécanismes : en se fixant aux récepteurs ce qui bloque leur liaison avec les R-Smad, ou en se fixant directement aux autres Smad, pour bloquer leur phosphorylation, ou leur internalisation dans le noyau. Dad est transcriptionnellement régulée par la voie BMP, lui permettant d'agir dans une boucle de rétroaction négative afin de réguler le signal.

d) Le contrôle de la transcription

De manière identique aux vertébrés, le complexe Mad-Med est transloqué dans le noyau pour activer la transcription de ses gènes cibles. Plusieurs co-activateurs et co-répresseurs se liant à ce complexe, ont été identifiés pour moduler l'expression des cibles.

Le premier cofacteur identifié comme partenaire des R-Smad est la protéine *Schnurri* (Shn) [253]. Ce facteur de transcription se lie à l'ADN grâce à plusieurs domaines à doigt de zinc. Shn est localisée dans le noyau et interagit avec le complexe Mad-Medea en réponse à un signal BMP. Plusieurs analyses génétiques et phénotypiques ont mis en évidence que Shn était essentielle pour la signalisation BMP au cours de nombreux stades de développement et dans divers tissus et agirait ainsi comme un co-activateur de la signalisation BMP. Au niveau moléculaire, Shn utilise deux modes pour réguler les gènes cibles de Dpp : Shn peut directement activer un petit sous-ensemble de gènes sensibles à Dpp, mais son rôle principal consiste à exercer la majeure partie de son effet grâce à la levée de l'inhibition exercée par le répresseur *Brinker* (Brk) [254].

Brk agit comme un répresseur transcriptionnel de la signalisation BMP. Il se compose d'homéodomaines et de motifs spécifiques présents dans de nombreux répresseurs de la transcription. Il se lie aux mêmes séquences consensus (GGCGC/TT/C) que celles reconnues par Mad. Ainsi, Brk et Mad sont en compétition pour l'occupation de leurs sites de fixation.

Parmi les co-activateurs transcriptionnels, *Nejire* (Nej), homologue de CBP, interagit avec le complexe Mad-Med pour favoriser la fixation à l'ADN et la transcription de ses gènes cibles [255]. Cette protéine a été identifiée car les mutants l'affectant phénotypent l'absence de Dpp ou de Mad au niveau de l'intestin moyen, des veines de l'aile et de la mise en place de la polarité dorso-ventrale de l'embryon. Nej, comme CBP, agit dans la co-activation de nombreuses voies de signalisation. Ainsi, l'aptitude de CBP à se lier à de multiples facteurs de transcription activés a conduit à la proposition selon laquelle CBP intégrerait les entrées positives et négatives de différentes voies de signalisation, permettant une régulation fine de la transcription des différents gènes cibles.

e) Les gènes cibles

Les gènes cibles de la voie BMP peuvent différer suivant le stade de développement et le tissu, mais sont essentiels à la mise en place des différents domaines de structuration du tissu adulte. Par exemple, les gènes *zerknüllt (zen)*, *angiotensin converting enzyme (race)* et *u-shaped (ush)* sont impliqués dans le patterning de l'axe dorso-ventral au cours de l'embryogenèse. Durant le développement des disques imaginaux de l'aile, ce sont les gènes *optomotor blind (omb)*, *spalt related (salr)*, *spalt-major (salm)*, *vestigial (vg)*, qui sont transcrits et impliqués dans la structuration des futures régions de l'aile adulte [256, 257]. De manière similaire aux vertébrés, le gène *dad* est lui aussi une cible de la voie BMP, permettant un rétrocontrôle négatif de la voie [232].

f) Les régulateurs de la signalisation

Comme nous l'avons vu précédemment, la signalisation BMP peut être régulée au niveau transcriptionnel, mais il existe d'autres molécules au niveau extracellulaire et membranaire, pouvant réguler cette signalisation en inhibant ou en facilitant la fixation des ligands sur les récepteurs. De même, au niveau cytosolique, des protéines agissent comme régulateur de l'activité des Smad et des récepteurs de type I. Chez *Drosophila Melanogaster*, comme chez les vertébrés, la distribution graduelle des BMP dépend de l'action d'au moins trois modulateurs extracellulaires conservés, *Short gastrulation (Sog)*, *Twisted gastrulation (Tsg)* et *Tolloid (Tld)*.

Le gène *sog* code une grande protéine sécrétée composée de quatre domaines riches en cystéine hautement conservés. Ces derniers sont nécessaires pour son activité biologique qui consiste en la séquestration des ligands BMP, bloquant ainsi la signalisation. Sa structure et son rôle sont similaires à la protéine Chordin chez les vertébrés [258].

Tsg est une protéine extracellulaire, dont le rôle et la structure sont très similaires à Sog. Les données récentes ne permettent pas encore d'élucider totalement son rôle, mais des données suggèrent qu'elle agirait soit comme un inhibiteur de la signalisation BMP en séquestrant les ligands, soit en promouvant le signal en agissant comme protéine d'échafaudage pour le clivage par les protéases de la famille Tld. Biochimiquement, Tsg se lie à la fois aux ligands BMP et à Sog et forme ainsi un complexe tripartite, renforçant l'idée d'un effet inhibiteur. [259].

La protéine Tld est une métalloprotéinase, qui possède une structure très similaire à celle de BMP-1. Cette protéine a pour fonction d'activer la réponse BMP en clivant Sog et Tsg, libérant le ligand dans la matrice extracellulaire et favorisant sa fixation aux récepteurs. Des découvertes récentes démontrent que Tld pourrait avoir une autre action sur la signalisation BMP en clivant des intégrines qui sont à leur tour impliquées dans la signalisation BMP. En effet, au niveau membranaire, plusieurs intégrines régulent les voies de signalisation en facilitant la fixation des ligands sur leur récepteur. Chez la drosophile, on recense trois types d'intégrines codées par les gènes *myo-sphéroïde (mys)* correspondant à la sous-unité β PS, et deux intégrines α codées par les gènes *multiple edematous wing (mew)* et *inflated (if)*. Les molécules d'intégrine fonctionnelles sont composées d'une sous-unité β combinée à l'une des sous-unités α . Ce dimère fixe les ligands BMP pour réguler leur l'activité ou leur diffusion. Des études montrent aussi que les intégrines peuvent réguler la distribution de la protéine Sog, en se fixant à celle-ci, permettant une régulation fine de la diffusion des ligands BMP dans la matrice extracellulaire [260].

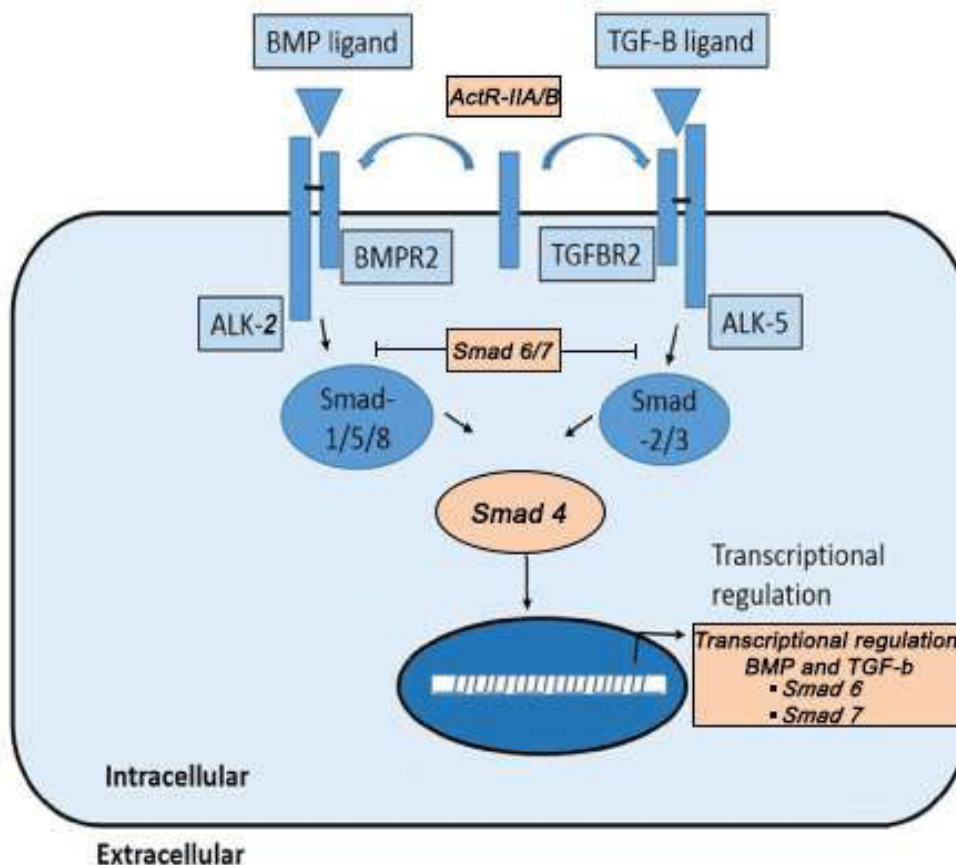


Figure 17 : Interaction entre les voies de signalisation BMP et TGF-β (adapté de Fan *et al.* [261]).

Les BMP se fixent sur un complexe récepteur dont la spécificité de liaison dépend du récepteur de type I. La voie BMP induit l'activation des Smad effectrices Smad1, 5 et 8, conduisant à la transcription des différents gènes cibles de la voie BMP. Les ligands de la voie TGF-β se lient à un autre complexe récepteur pour induire la phosphorylation de Smad2 et 3 et conduire à l'activation de gènes cibles spécifiques de la voie TGF-β. Bien que ces deux voies semblent indépendantes, elles partagent plusieurs facteurs. Le récepteur de type II, ActR-IIA et ActR-IIB peut se lier aux récepteurs de type I aussi bien de la voie BMP que de la voie TGF-β. Le cofacteur Smad4 interagit aussi bien avec les Smad1, 5 et 8 que les Smad2 et 3. Enfin, *Smad6* et *Smad7* sont deux cibles transcriptionnelles contrôlées aussi bien par la voie BMP que par la voie TGF-β.

Ces dernières années, il a été découvert, au niveau de la membrane cellulaire, des protéoglycanes riches en héparane sulfate (*Heparan-Sulfate Proteoglycan* en anglais, HSPG), tels que *Division abnormally delayed* (Dally) ou *dally-like* (Dlp) qui sont impliqués dans la régulation de la signalisation BMP. Les HSPG sont des molécules de la matrice extracellulaire composées d'un noyau protéique auquel sont attachées des chaînes de *glycosaminoglycan* (GAG) liées à une ancre glycosyl phosphatidylinositol (GPI). Dally et Dlp facilitent la distribution des ligands BMP, de manière similaire aux intégrines, en favorisant la présentation des ligands aux différents récepteurs [262, 263]. Ces HSPG peuvent elles-mêmes être contrôlées par la signalisation BMP et par l'expression de deux protéines extracellulaires sécrétées, codées par *pentagone* (*pent*), et *larval translucida* (*ltl*). Pent interagit physiquement avec Dally, et favorise sa dégradation, agissant comme un rétrocontrôle négatif de la signalisation BMP [264]. La protéine Ltl interagit aussi avec Dally et agirait négativement sur le signal BMP, mais son mode d'action ne semble pas encore bien défini [265].

Au niveau cytosolique, la protéine I-Smad, Dad, peut interagir directement avec Mad, empêchant la fixation du cofacteur Med, et ainsi l'importation du facteur de transcription dans le noyau. Dad peut également servir de protéine adaptatrice pour permettre à la protéine dSmurf, qui code l'orthologue de Smurf1 et Smurf2, de favoriser la dégradation des protéines Mad et Med [266].

C. Interaction entre les voies de signalisation BMP et TGF- β

1) Chez les mammifères

Les BMP appartiennent à un large groupe de molécules de signalisation désignées sous le terme de superfamille du TGF- β , qui comprend de nombreux autres membres tels que les activines, les TGF- β , les inhibines, les facteurs de croissance et de différenciation *Growth Differentiation Factor* (GDF), et l'hormone anti-Müllerienne (AMH) [267]. Les familles de l'activine, du TGF- β et des BMP sont les plus anciennes, et elles sont représentées chez tous les métazoaires. Ces protéines structurellement apparentées sont impliquées dans divers processus fondamentaux à de nombreux tissus et tout au long du développement. La signalisation des TGF- β /Activines/Inhibines est fondamentalement la même que celle de la voie BMP. Les ligands peuvent former des homodimères ou des hétérodimères qui se fixent sur deux types de récepteurs sérine/thréonine kinase de type I et de type II pour activer les facteurs de transcription en aval. La vision générale de la signalisation de la superfamille du TGF- β se distingue en deux branches : les protéines BMP et GDF, qui transmettent un signal via Smad-1, -5 et -8, et les protéines de la sous famille TGF- β , comprenant TGF- β , activines et inhibines, qui induisent un signal via Smad-2 et -3.

Bien que ces deux branches de signalisation diffèrent pour leur rôle fonctionnel dans le développement des vertébrés, elles partagent des protéines communes [268–271] [Figure 17]. Parmi celle-ci, le cofacteur Smad-4 possède la capacité de se fixer aussi bien aux Smad-1, -5 et -8 qu'aux Smad-2 et -3. La protéine Smad-4 occupe ainsi une position centrale dans les voies de signalisation en aval de tous les ligands TGF- β , permettant l'importation des R-Smad dans le noyau. D'autre part, les deux récepteurs de type II peuvent médier la signalisation aussi bien de la voie BMP/GDF, que de la voie TGF- β /Activines/Inhibines. Par exemple, le récepteur de type II, BMPR-II, peut se complexer soit avec le récepteur BMP de type I, tels que BMPR-IA pour induire l'activation de Smad-1,-5 et -8, soit avec des récepteurs TGF- β de type I, tel que TGFBR-I, pour induire la signalisation *via* Smad-2 et -3. De même les récepteurs de type II, ActRIIA/B qui se lient principalement aux récepteurs de type I de la voie TGF- β /Activine/Inhibine, peut aussi se lier au récepteur BMP de type I, ActR-IA pour induire la signalisation *via* les Smad-1, -5 et -8. Cette différence d'affinité des récepteurs de type II avec le récepteur de type I est dépendante du ligand fixé [270]. Enfin, il existe deux protéines I-Smad, Smad-6 et Smad-7 qui ont pour rôle d'inhiber la signalisation en se fixant aux récepteurs de type I ou bien en se fixant directement avec les R-Smad.

L'action de ces I-Smad peut aussi bien bloquer la signalisation BMP/GDF, que la signalisation TGF- β /Activine/Inhibine. D'ailleurs, l'expression de ces I-Smad est régulée par les deux branches de signalisation [271].

L'existence de ces différentes protéines partagées entre la signalisation BMP/GDF et la signalisation TGF- β /Activine/Inhibine peut avoir des répercussions sur la régulation de leur signalisation. Quelques études mentionnent cette interaction entre les deux branches de signalisation, démontrant ainsi qu'une régulation fine de ces voies s'établit dans la cellule. En effet, le partage de composants communs entre les deux branches de signalisation, tels que Smad-4, pourrait provoquer une compétition si sa quantité est limitante, et ainsi réduire la signalisation d'une des deux voies. Cependant aucune preuve évidente de cette compétition n'a été démontré à ce jour. Cette hypothèse est étayée par des études menées par l'équipe de Holien qui ont mis en évidence que l'activation de la signalisation Activine provoquait une inhibition de la signalisation BMP par compétition avec les récepteurs de type II ActRIIA/B [272].

Le ligand activine A se lie préférentiellement à ces récepteurs de type II pour induire la signalisation Smad-2/-3. Or, le récepteur de type I de la signalisation BMP, ActR-IA (ALK2) utilise aussi ce récepteur de type II pour induire la signalisation Smad-1/-5/-8. De manière cohérente avec ce résultat, ActRIIA/B présentent une meilleure affinité pour les récepteurs de type I de la voie Activine que pour ALK2, ce qui conduirait à la réduction du signal BMP.

De plus, d'autres études sur le développement des membres d'embryon de poulet ont mis en évidence que la signalisation TGF- β pouvait moduler la signalisation BMP par l'expression de gènes inhibiteurs spécifiques, tels que Smad-6 et Bambi pour bloquer le signal BMP [273]. Enfin, une étude menée par Grönroos *et al.* ont démontré que le TGF- β pouvait inhiber la transcription de certains gènes cibles de la signalisation BMP par le biais de l'activation de la voie ALK5/Smad-3 [274].

L'ensemble de ces études montre bien l'importance de la signalisation TGF- β et de son dialogue avec la voie BMP. Une régulation de l'équilibre entre ces deux branches de signalisation est essentielle pour la bonne coordination des processus cellulaires au cours du développement [275, 276].

2) Chez *Drosophila melanogaster*

De manière similaire à la voie BMP, la signalisation de la sous-famille TGF- β chez la drosophile est plus simple que celle des vertébrés. On distingue quatre types de ligands comprenant *Activin β* (Act β), *Dawdle* (Daw), *Maverick* (Mav) et *Myoglianin* (Myo), un récepteur de type I appelé Baboon (Babo), et un R-Smad, homologue de Smad-2, appelé Smad on X (Smox). Comme pour les mammifères, les voies BMP et TGF- β partagent deux protéines en commun : le récepteur de type II Punt, et le cofacteur, homologue de Smad-4, appelé Med [246, 277].

La principale différence entre les branches BMP et TGF- β réside dans le fait qu'elles induisent différentes réponses transcriptionnelles dans les cellules cibles, dues à la phosphorylation de R-Smad distincts. Par exemple, au cours du développement des disques imaginaux de la drosophile, la voie BMP est essentielle pour la structuration du disque et la différenciation des cellules, tandis que la voie TGF- β est associée principalement à la croissance des disques. Cette différence peut être observée durant le développement du disque imaginal d'aile, pendant lequel des mutants de gènes de la signalisation TGF- β induisent une réduction de la taille de l'aile, sans modifier la structure générale ni la différenciation des veines de l'aile adulte. Au contraire, des mutants de la signalisation BMP sont décrits comme induisant une perturbation de la formation des veines.

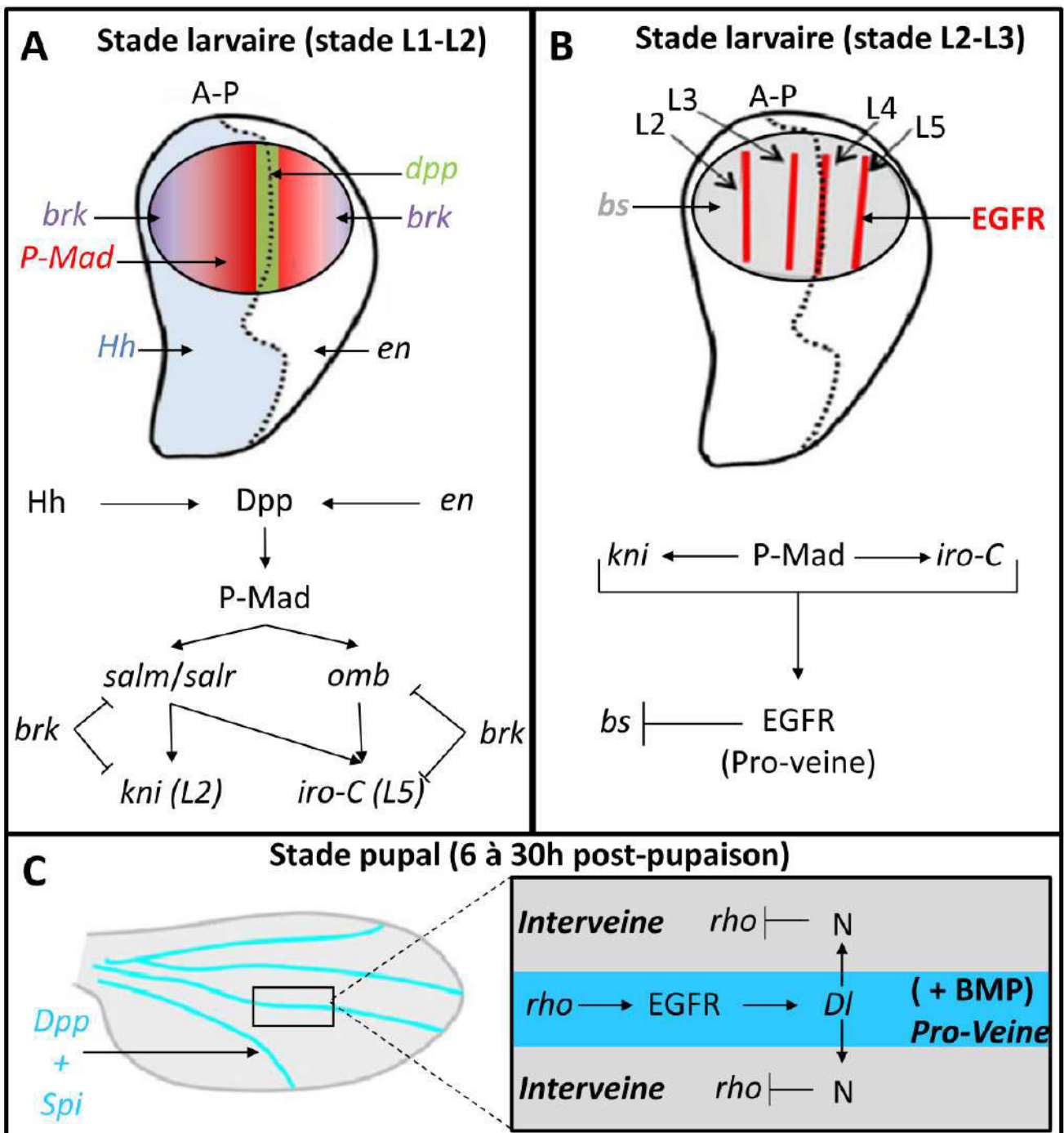


Figure 18 : Implication des principales voies de signalisation de la formation des veines de l'aile de la drosophile

A : La synthèse de Hedgehog (Hh) (en bleu) dans le domaine antérieur et la synthèse engrailed (en) (en blanc) dans le domaine postérieur du disque imaginal d'aile permet l'établissement du gradient *Dpp* le long de l'axe antéro-postérieur (en vert). Le gradient de *Dpp* qui est sécrété par les cellules de la frontière antéro-postérieure induit l'activation par phosphorylation du facteur Mad (en rouge), aboutissant à l'expression de ses gènes cibles *salm/salr* et *omb*. Le gène *brinker* (en violet), qui code un répresseur transcriptionnel, participe à l'intégration du gradient d'activité *Dpp* au niveau nucléaire permettant la délimitation de l'expression des gènes cibles de la voie BMP dans le disque. Les fonctions de *Salm*, *Salr* et *Omb* sont notamment, la régulation de l'expression des gènes codant *Knirps* (*kni*) et *Iroquois-C* (*iro-C*), permettant respectivement la délimitation des pro-veines L2 en antérieur et L5 en postérieur.

B : L'établissement de la signalisation BMP dans le disque imaginal d'aile, aboutit à l'activation spécifique de la signalisation EGFR dans les cellules des pro-veines. La signalisation EGFR est suffisante pour réprimer l'expression de *blistered* (*bs*) (en gris) dans les cellules des espaces interveines.

C : Au cours du stade pupal, les ligands de la signalisation EGFR et BMP, respectivement *Spitz* (*Spi*) et *Dpp*, maintiennent la différenciation des cellules de veines (en bleu). L'un des gènes cibles de la signalisation EGFR code le ligand *Delta* (*DI*), permettant l'activation de la signalisation Notch (N) dans les cellules des espaces interveines (en gris). L'activation de la voie Notch induit une répression transcriptionnelle de la protéase rhomboid (*rho*), qui est impliquée dans l'activation de la signalisation EGFR, délimitant ainsi les cellules interveines

Comme décrit chez les mammifères, les voies BMP et TGF- β partagent un corécepteur et un effecteur nucléaire en commun, ce qui pourrait avoir pour conséquence d'interférer avec l'une ou l'autre des deux voies au cours du développement. Des travaux réalisés par Hevia et de Celis ont montré que la voie TGF- β pourrait perturber la signalisation BMP. En effet, la sur-activation de la signalisation TGF- β induite par une forme constitutivement active du récepteur de type I, Babo, conduisait à une diminution de la phosphorylation de Mad [279]. Cependant, cet effet est observable uniquement si le Smad effecteur Smox, le Smad effecteur de la signalisation TGF- β , est présent. En effet, l'induction d'une forme constitutivement active de Babo, en contexte de déplétion de Smox, conduit à une augmentation de la signalisation BMP. Enfin, cette perturbation du gradient p-Mad, par la voie TGF- β n'est observable que dans un contexte de sur-activation, puisque l'expression d'une forme sauvage de Babo, tout comme sa perte de fonction, n'affecte pas le gradient phospho-Mad.

L'ensemble de ces résultats suggère que la signalisation TGF- β pourrait être impliquée dans la régulation de l'activation spatiale de Mad. Néanmoins, il est encore difficile de comprendre l'ensemble des mécanismes reliant les voies TGF- β et BMP. Les interactions entre les signalisations TGF- β et BMP sont complexes et dépendent fortement du contexte, c'est pour cela que des travaux complémentaires doivent être menés afin de mieux comprendre les mécanismes reliant ces deux voies.

VI. La voie BMP dans la formation des veines de l'aile chez *Drosophila melanogaster*

Un des modèles les plus largement étudiés pour caractériser la signalisation BMP dans le modèle *Drosophila melanogaster* est le tissu alaire [280]. Cette signalisation est primordiale pour spécifier les informations de position dès le stade larvaire dans le disque imaginal d'aile et pour la différenciation des futures veines de l'aile adulte, au cours du stade pupal [281, 282]. Les disques imaginaires d'aile de drosophile sont un modèle idéal permettant d'étudier au niveau cellulaire et moléculaire les principaux gènes et mécanisme de la voie BMP. De plus, les ailes de la drosophile constituent un excellent système pour l'analyse génétique de l'interaction des différentes voies de signalisation entre elles. De nombreux mutants de gènes ont ainsi été identifiés par les défauts qu'ils provoquaient dans le développement des veines de l'aile. Etant donné que de nombreux composants de la signalisation BMP sont conservés au cours de l'évolution, l'observation dans le modèle alaire de la drosophile devrait faire la lumière sur la façon dont celle-ci est modulée chez les vertébrés.

L'aile adulte de drosophile est une structure ectodermique formée de deux feuillets épithéliaux apposés. Elle se compose de cinq veines longitudinales (L1 à L5) et de deux veines transversales entre L3-L4 et L4-L5, appelées respectivement veine transversale antérieure (ACV) et veine transversale postérieure (PCV). Ces structures sont impliquées dans la rigidité de l'aile, le passage des vaisseaux de la trachée et des vaisseaux sensoriels, ainsi que dans la circulation des cellules hématopoïétiques.

La mise en place et le maintien de la formation des veines sont dictés par un important dialogue entre plusieurs voies de signalisation, telles que la voie Hh, la voie EGF, la voie wingless (Wg), la voie N, et la voie des BMP.

L'implication de la signalisation BMP dans le développement alaire peut se diviser en trois parties : la mise en place des informations de position (prepatternning) des veines longitudinales au cours du stade larvaire, le maintien de la structure des veines longitudinales au cours du stade pupal et la mise en place des veines transversales (CVs) [Figure 18].

A. Mise en place des informations de position des veines longitudinales au cours du stade larvaire

La formation des nervures de l'aile adulte commence dès le stade larvaire au niveau des disques imaginaux d'ailes. Ces derniers sont séparés dès le début de leurs développement en deux compartiments postérieur et antérieur, spécifiés respectivement par les facteurs *Engrailed* et *Hh* [283].

Le signal *Hh* va fournir des informations de position au niveau de cellules adjacentes à la frontière antéro-postérieure, permettant l'expression du gène *dpp* [284]. Au contraire, le compartiment postérieur, par le biais du facteur *Engrailed*, va bloquer l'expression du signal *Dpp*. Ainsi, un gradient *Dpp* va se former sur une fine bande de cellules orientée selon l'axe antéro-postérieur. Le ligand *Dpp* va diffuser dans la matrice extracellulaire selon un gradient de distribution et agir comme un morphogène à longue distance. Ce gradient fournit des informations de position nécessaires à la mise en place des veines longitudinales.

Le deuxième ligand BMP, *Gbb*, est exprimé uniformément dans la poche de l'aile. Ainsi, les dimères *Dpp/Gbb* vont se former majoritairement à la frontière antéro-postérieure et plus faiblement dans les régions les plus antérieures ou les plus postérieures du disque. La formation de cet hétérodimère *Dpp/Gbb* est favorable à la phosphorylation du facteur *Mad*. Le gradient de p-MAD est ainsi réparti de part et d'autre de la bande *Dpp* et diminue aux extrémités antérieure et postérieure du disque. La signalisation BMP est ainsi activée selon ce gradient p-Mad, le long de l'axe antéro-postérieur, pour induire et maintenir l'expression de gènes cibles tels que *spalt* (*salmon/salr*) et *omb*. Ces derniers codent des facteurs de transcription qui sont nécessaires à la mise en place des veines longitudinales L2 et L5.

Parallèlement à la mise en place du gradient BMP, la signalisation EGF va spécifier les cellules pro-veines, ou bien des cellules pro-interveines. L'initiation du développement des pro-veines longitudinales repose en grande partie sur cette signalisation, qui provoque la phosphorylation de la protéine kinase *Erk*. L'activation de cette signalisation est nécessaire et suffisante pour induire l'expression de marqueurs spécifiques de la veine.

Conjointement, la signalisation *Notch* va être activée dans les cellules pro-interveines. Pour cela, la signalisation EGF des cellules pro-veines, va induire l'expression du ligand *Delta* (*DI*), qui aura pour conséquence d'activer la signalisation *Notch* dans les cellules voisines aux cellules pro-veines. L'activation de *Notch* dans ces cellules, réprime l'activation du signal EGF, favorisant la différenciation en cellules pro-interveines. La concomitance de ces trois voies de signalisation est ainsi indispensable à la mise en place et la spécification des veines de l'aile adulte.

B. Maintien de la formation des veines longitudinale au stade pupal

L'étape suivante de la formation des veines se produit au cours du stade pupal. Après éversion du disque imaginal d'aile, les cellules pro-interveines de l'épithélium dorsal et ventral vont s'apposer les unes aux autres. Au contraire, les cellules pro-veines activeront l'expression de gènes codant des Rho-GTPases pour inhiber l'expression d'intégrines, bloquant de ce fait la superposition des cellules de la veine, et créant ainsi un espace ouvert [285]. L'aspect critique de cette étape est l'activation de l'expression de *Dpp* dans chaque primordium veineux, car la signalisation médiée par *Dpp* est nécessaire et suffisante à la différenciation veineuse. Ainsi, le devenir de la veine est maintenu par l'activité de la voie de signalisation *Dpp* qui agit épistatiquement sur la signalisation de l'EGF, tandis que la signalisation *Notch* réprime la formation veineuse dans le tissu interveine. La signalisation BMP est maintenue uniquement le long des veines longitudinales, pour définir leur largeur et longueur finales. La mobilité des ligands BMP dans les veines longitudinales est limitée par un mécanisme de rétention actif des récepteurs .

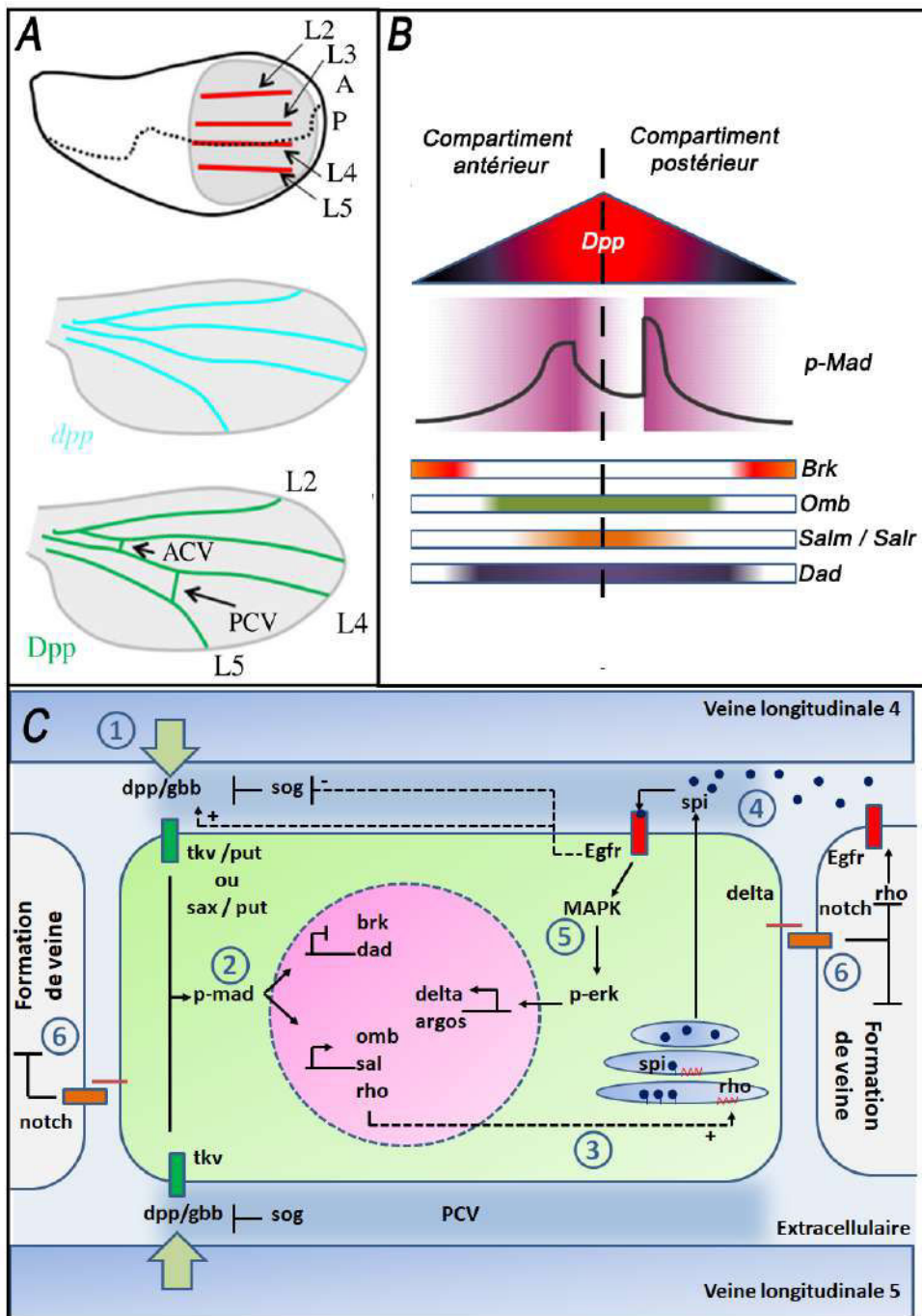


Figure 19 : Formation des veines de l'aile de la drosophile (adapté de Shimmi *et al.* [278]).

A : En haut, représentation schématique du développement des veines au niveau du disque imaginal d'aile de troisième stade larvaire. Les positions des futures veines longitudinales (L2-L5) sont représentées en rouge. La poche du disque imaginal d'aile, représentée en gris, correspond à la surface de la future aile adulte. A-P : frontière antéro-postérieure. Au milieu, représentation schématique des veines longitudinales de l'aile au stade pupaire. Dès les premières heures du stade pupaire, l'ARNm *dpp* (en bleu) est retrouvé spécifiquement dans les veines longitudinales. En bas, 18h à 30h post-pupaison, la distribution du ligand Dpp est détectée dans toutes les veines de l'aile, y compris les veines transversales. ACV: veine transversale antérieure PCV : veine transversale postérieure.

B : Dans le disque imaginal d'aile de troisième stade larvaire, *dpp* est exprimé le long de l'axe A-P. Un gradient morphogénétique se forme, conduisant à un gradient d'activité de Dpp, visualisé par la phosphorylation de Mad. Ce facteur de transcription aboutit à l'expression de différents gènes cibles, tels que *omb*, *spalm*, *spalr* et *dad*. Le gène *brinker*, qui code un répresseur transcriptionnel, participe à l'intégration du gradient d'activité Dpp au niveau nucléaire permettant la délimitation de l'expression des gènes cibles de la voie BMP dans le disque.

C : La formation des veines transversales au stade pupaire est initiée par la synthèse des ligands Dpp et Gbb par les veines longitudinales (1). La fixation du ligand sur les récepteurs Tkv et Sax induit la phosphorylation du facteur Mad dans les futures cellules des veines transversales (2). L'activation de la signalisation BMP dans les futures cellules ACV et PCV conduit à l'expression du gène *rhomboid* (*rho*) codant pour une protéase de la signalisation EGF (3). Cette protéine a pour fonction de cliver le ligand Spi (3). Cette protéine sécrétée active les cellules de la veine pour maintenir leur devenir (4). La signalisation EGF dans les cellules pro-veines induit l'expression du gène *delta*, qui code le ligand de la voie Notch (5). La liaison du ligand Delta sur les récepteurs des cellules interveines réprime l'expression de Rho et bloque ainsi l'initiation de la formation des veines dans les cellules voisines (6).

C. La formation des veines transversales

La formation des veines transversales antérieure et postérieure (ACV et PCV) diffère de la formation des veines longitudinales. En effet, la formation de ACV et PCV apparaît bien plus tard au cours du stade pupal, soit 18 à 30h post-pupaison [286]. Les premiers marqueurs observés dans les CVs sont l'apparition d'un signal BMP et la suppression de l'expression des signaux pro-interveines, dans un domaine bien restreint [287]. Il est intéressant de constater que ce signal BMP dépend d'une signalisation à longue distance par le relargage des ligands Dpp/Gbb, par les veines longitudinales. Des protéines extracellulaires, telles que Cv, Cv-2, Sog, Tld, et Tsg sont nécessaires à cette signalisation à longue distance pour faciliter la bonne diffusion des ligands Dpp/Gbb vers les cellules CVs [278, 288] **[Figure 19]**.

Par ailleurs, d'autres molécules sont impliquées dans la formation des CVs. Par exemple, les hémocytes présents dans les veines longitudinales, sécrètent une lipoprotéine de type vitellogénine, appelée Crossveinless-d (cv-d) ce qui est important pour la modulation des lipides pour favoriser la formation des CVs [289]. De même, la protéine Crossveinless-c (cv-c) a été identifiée par son contrôle de l'activité des Rho-GTPase dans les cellules primordiales de la PCV afin de moduler leur cytosquelette d'actine, et favoriser la formation de la structure finale de la PCV [290]. Enfin, l'implication des HSPG, telles que Dally, et Dally-like, à la surface cellulaire, semble être aussi indispensable pour une bonne régulation du mouvement des ligands Dpp et Gbb que pour leur fixation à leurs récepteurs [263].

L'ensemble de ces données indique que la formation des CVs est médiée par un processus très finement coordonné par le biais de nombreuses protéines permettant le contrôle du relargage des ligands Dpp et Gbb par les cellules longitudinales. Ainsi, la perte des veines transversales dans le modèle alaire, reflète une perturbation de la signalisation BMP [291].

VII. Implication de la signalisation BMP / TGF- β dans la SpA

A. Les processus physiologiques de la SpA impliquant la voie BMP/TGF- β

1) Systeme immunitaire

Bien que les BMP aient été décrites comme des facteurs de croissance et de différenciation des cellules ostéogéniques, elles sont maintenant considérées comme des polypeptides multifonctionnels impliqués dans de nombreux processus cellulaires et notamment dans le système immunitaire [292]. Les effets des BMP ont été rapportés dans de nombreux types de cellules immunitaires, aussi bien dans les cellules lymphoïdes, telles que les lymphocytes B et T, que dans les cellules myéloïdes, comme les érythrocytes, les granulocytes, les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. Il serait difficile de présenter l'ensemble des recherches menées sur le sujet. Dans cette partie, je présenterai une liste non exhaustive des différentes implications des composants de la voie BMP dans la mise en place, et la régulation du système immunitaire.

Le rôle des BMP est décrit dès le début de l'hématopoïèse, et plus particulièrement dans les cellules souches hématopoïétiques (*Hematopoietic stem cells* en anglais, HSC). En effet, des concentrations élevées du ligand BMP-4 permettent le maintien de la prolifération et l'activité de repopulation des HSC. En effet, des souris dépourvues de BMP-4 meurent *in utero* avec des défauts de formation des îlots sanguins, démontrant bien son implication dans le devenir des HSC. Au contraire, il a été observé que la signalisation TGF- β jouait un rôle inhibiteur sur l'expansion des HSC, démontrant un rôle distinct des voies BMP et TGF- β .

L'action des BMP s'exerce sur la plupart des cellules lymphoïdes, tels que les lymphocytes B et T :

- Sur les lymphocytes B, BMP-6 s'oppose à l'expansion des cellules B et induit la mort cellulaire de cellules B mémoire. De plus, le TGF- β est bien connu pour être un puissant inhibiteur de la croissance cellulaire des lymphocytes B [293].
- Sur les lymphocytes T, des expériences *in vitro* et *in vivo* ont mis en évidence que la voie BMP était essentielle pour l'activation et l'homéostasie des lymphocytes T naïfs. De plus, la stimulation par le TCR des lymphocytes T induit l'expression de BMP. Des études ont par ailleurs mis en évidence que BMP-4 régulait négativement les premiers événements de la différenciation des cellules T naïves, tout en favorisant le développement des cellules NK [294].

Les BMP sont aussi décrites pour agir sur la plupart des types cellulaires myéloïdes, mais nous nous concentrerons sur les monocytes/macrophages et les DCs.

- Pour ce qui est des monocytes, quelques études montrent qu'ils expriment des composants de la signalisation BMP qui semblent impliqués dans le déclenchement des réponses chimiotactiques favorisant le recrutement des monocytes [295].
- Le traitement des macrophages par la BMP-6 inhibe leur prolifération, tout en stimulant la production de facteurs pro-inflammatoires, tels que le TNF- α , l'IL-1, l'IL6 et la protéine chimiotactique monocyttaire 1 (*monocyte chemoattractant protein 1*, en anglais, MCP-1) [296].
- Enfin, concernant les DCs, des études ont mis en évidence que la signalisation BMP favorisait la maturation des DCs, en particulier par le biais du ligand BMP-4, et l'activation du facteur de transcription Runx2. Ce dernier favorise l'expression de molécules co-stimulatrices comme *Cluster of Differentiation 23* (CD23), mais aussi les protéines *Programmed death-ligand 1/2* (PD-L1 et PD-L2). De plus, la signalisation BMP agirait sur la viabilité des DC en augmentant le rapport Bcl-2/Bax [297]

1) Systeme squelettique

Le remodelage osseux se produit tout au long de la vie et implique la coordination entre la résorption osseuse et la nouvelle formation osseuse [298, 299]. De manière simplifiée, les ostéoblastes sont responsables de la génération de la matrice extracellulaire, qui favorise la formation osseuse, tandis que les ostéoclastes sont responsables de la résorption osseuse, grâce à la sécrétion d'enzymes digérant la matrice extracellulaire.

Les BMP jouent un rôle important dans le développement et la physiologie du squelette. En effet, l'inactivation des récepteurs BMP chez la souris, induit des anomalies du développement squelettique [213]. Les BMP sont des régulateurs cruciaux de l'homéostasie osseuse, car elles coordonnent la différenciation et l'activité des ostéoblastes (OB) et des ostéoclastes (OC), qui sont les principaux types cellulaires impliqués dans le remodelage osseux.

La voie BMP favorise l'ostéoblastogenèse, car cette signalisation induit la transcription de nombreux facteurs de différenciation ostéoblastique, tels que *runx2*, *osterix*, *homeobox protein msx-2* (*msx2*), *SRY-Box 9* (*sox9*) et *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (*PPAR γ*). D'autre part, la cascade de signalisation BMP indépendante des Smad, permet la régulation des gènes *cox-2* et *ap-1*, ce qui favorise la formation osseuse. Cependant, même si de manière générale la signalisation BMP favorise la formation osseuse par l'activité des OB, l'ensemble des mécanismes n'est pas totalement compris.

Par exemple, l'altération génétique de BMP-2 et/ ou -4 dans un modèle murin, ne perturbe pas la différenciation chondrogénique, mais semble altérer l'ostéogenèse [300]. De plus, la déplétion du récepteur ALK-3 dans les OB a conduit à une augmentation de la masse osseuse chez la souris [301]. Ces résultats suggèrent que de nombreux mécanismes de régulation et de compensation entrent en jeu pour moduler la différenciation des OB.

Contrairement à ce qui est observé pour l'ostéoblastogenèse, les voies de signalisation et les facteurs cellulaires impliqués dans l'ostéoclastogenèse, sont principalement activés par des signaux inflammatoires, tels que le facteur nucléaire des cellules T activées *Nuclear factor of activated T-cells* (NFAT), ou bien le facteur nucléaire NF- κ B. En effet, lorsque ce dernier est déplété, on observe une altération de l'ostéoclastogenèse [302].

Le rôle des BMP sur les OCs, lui, n'est pas très bien caractérisé. La signalisation BMP semble exercer un effet indirect en potentialisant l'activité des OCs. Des études démontrent que certaines BMP peuvent favoriser la résorption osseuse. Par exemple, l'injection des BMP-2/-7 recombinantes humaines dans l'os métaphysaire de primate engendre une augmentation du nombre d'OCs et entraîne une résorption osseuse [303]. De même, BMP-3 et BMP-13 inhibent la formation osseuse [304]. Des données suggèrent aussi que BMP-9 protège les OCs vis-à-vis de l'apoptose [305]. A l'opposé de ces résultats, la déplétion de BMPR-1A dans les OCs conduit à une augmentation de la formation osseuse ostéoblastique dans un modèle murin [306].

L'ensemble des données montre bien un rôle essentiel des BMP dans le remodelage osseux, en favorisant l'activité, la survie ou la différenciation des OBs et des OCs. De plus, l'angiogenèse est un processus très important pour le remodelage osseux, car les vaisseaux sanguins constituent la principale source de cytokines et de facteurs de croissance qui régulent l'activité des OBs et des OCs [307]. La présence des cellules immunitaires au niveau des sites de formation osseuse semble être importante pour le remodelage osseux, car des altérations du système immunitaire peuvent être reliées à des anomalies de l'homéostasie osseuse (comme dans la SA).

3) Système intestinal

Le tractus gastro-intestinal constitue la plus grande interface entre environnements interne et externe et comprend différents organes tels que l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, et le colon. La signalisation BMP est nécessaire à la formation complète du tractus gastro-intestinal dès les premiers stades du développement [308, 309]. Par exemple, au début du développement de l'œsophage, la signalisation BMP doit être inhibée pour induire la stratification épithéliale et être activée plus tard pour induire la différenciation des cellules suprabasales. Au niveau de l'intestin, la signalisation BMP permet l'excroissance des villosités intestinales à partir des cellules mésenchymateuses.

L'un des tissus les plus particulièrement étudiés pour l'implication de la signalisation BMP est l'épithélium intestinal des vertébrés. Ce dernier subit un renouvellement cellulaire continu tout au long de la vie adulte, et est hautement organisé, à la fois spatialement et temporellement. L'intestin se compose de nombreuses villosités et de cryptes qui sont impliquées dans le processus d'absorption des nutriments. Plusieurs populations cellulaires sont identifiables : dans les cryptes, on distingue les cellules souches intestinales (ISC) et les cellules progénitrices (EB) dont elles descendent ; tandis qu'au niveau des villosités se situent des cellules différenciées comprenant les entérocytes (EC), les cellules entéroendocrines (EEC), et les cellules en gobelet (GC) [310].

Les protéines BMP jouent un rôle complexe et fondamental dans l'intestin et des mutations dans plusieurs gènes de la voie de signalisation BMP ont été identifiées dans les cancers gastro-intestinaux humains [311].

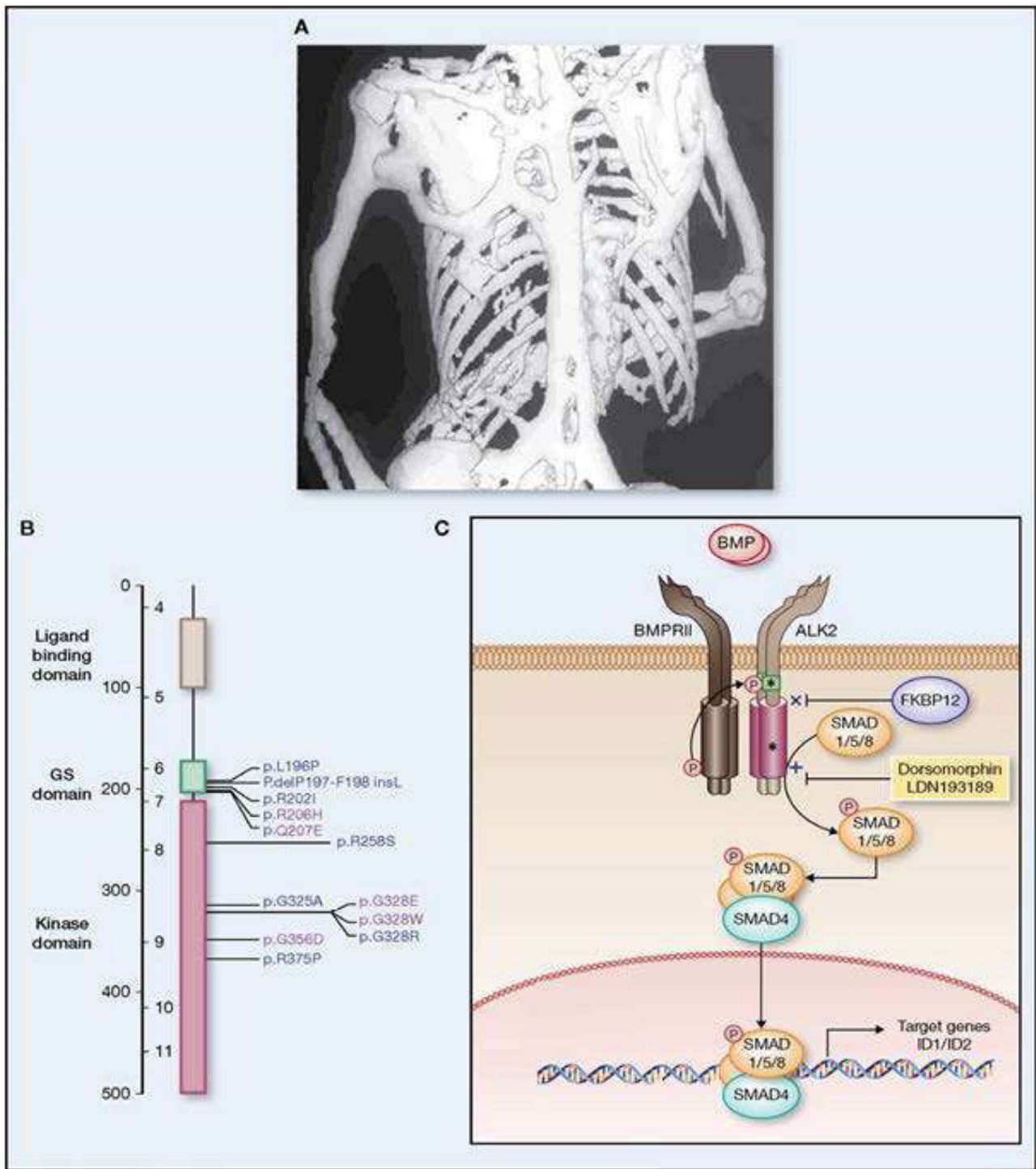


Figure 20 : ALK2 et la Fibrodisplasie Ossifiante Progressive (FOP) (adapté de Taylor *et al.* [312]).

A : Radiographie dorsoventrale gauche d'un patient atteint de FOP, montrant une formation osseuse hétérotopique étendue. La FOP est une maladie génétique autosomique dominante caractérisée par une ossification hétérotopique du tissu conjonctif mou.

B : La FOP est associée à une mutation dans le gène *ACVR1* codant le récepteur de type I ALK2 (ActR-IA) de la voie BMP. Ce sont des mutations gain de fonction d'*ACVR1*, entraînant l'activation inappropriée de la signalisation BMP via la phosphorylation Smad1/5/8, qui déclenchent la formation osseuse dans la FOP. La structure protéique d'ALK2 met en évidence 3 régions : le domaine de liaison aux ligands, le domaine riche en glycine et sérine (GS domain) et un domaine kinase. Les principales mutations associées à ce jour à la FOP touchent le domaine GS et le domaine kinase de la protéine.

C : Modèle simplifié de la signalisation BMP montrant les conséquences des mutations du gène *ACVR1*. Les mutations touchant le domaine GS bloquent l'interaction avec le régulateur négatif FKBP12, et favorisent le recrutement des protéines Smad1, 5 et 8. Les mutations touchant le domaine kinase conduisent à une forme constitutivement active du récepteur ALK2, augmentant la phosphorylation de Smad1, 5 et 8, ainsi que la transcription des différents gènes cibles de la différenciation osseuse, tels que *ID1/ID2*. La Dorsomorphine et la molécule LDN193189 visent à bloquer cette suractivation de la voie dans un but thérapeutique.

De nombreuses études ont démontré que l'inhibition de la signalisation BMP dans la muqueuse gastro-intestinale, provoque de profondes aberrations dans les mécanismes qui contrôlent la prolifération, la maturation et la différenciation de plusieurs lignées de cellules épithéliales intestinales.

L'utilisation de souris et de drosophiles transgéniques a notamment permis de faire la lumière sur les fonctions et les mécanismes de la signalisation BMP dans l'homéostasie épithéliale intestinale. La signalisation BMP inhibe la prolifération des ISCs, en antagonisant la voie Wnt, mais aussi en agissant sur le progression du cycle cellulaire en stabilisant l'inhibiteur p21. La signalisation BMP empêche ainsi la sur-prolifération des ISC.

Cependant, des études récentes menées dans le modèle drosophile montrent que la régulation des ISC par la voie BMP est complexe. Les collaborateurs Tian et Jiang ont constaté qu'en réponse à une blessure ou une infection, le nombre d'ISC augmentait chez la drosophile et que leur morphologie était modifiée, ce qui est dû à la production de deux ligands BMP (Dpp et Gbb) afin de favoriser l'auto-renouvellement du tissu [313]. D'autre part, l'activation de la signalisation BMP dans les EC, réduit la production de ces mêmes ligands, afin de réinitialiser le nombre d'ISC à l'état basal. Ces résultats suggèrent que la signalisation BMP exerce deux fonctions opposées : en favorisant l'auto-renouvellement des ISC pour répondre à une infection, et par un rétrocontrôle négatif de ces mêmes ISC, une fois l'infection contrôlée. Ainsi, la signalisation BMP contrôle la régénération du tissu intestinal, en régulant la production des ISCs. Ces résultats restent cependant à être confirmés chez les mammifères.

La signalisation BMP agit également sur la différenciation des EBs en cellules différenciées (EEC ou EC). En effet, la déplétion du récepteur BMPR-1A dans l'épithélium intestinal de souris entraîne une différenciation inefficace. Le modèle drosophile démontre des résultats similaires, car la surexpression de la signalisation BMP favorise la différenciation des EBs en ECs. Ces résultats montrent que la signalisation BMP est importante pour une bonne différenciation des cellules intestinales.

Plusieurs questions sont encore en suspens quant au rôle de la signalisation BMP sur l'homéostasie tissulaire intestinale, tels que de savoir par quels types cellulaires sont produits les ligands BMP. Le rôle des cellules immunitaires a été suggéré par certaines études. En effet, une souris knock-out pour *Smad-4* dans les lymphocytes développe des tumeurs épithéliales dans le tractus gastro-intestinal [314]. Des études chez la drosophile, ont également montré qu'à la suite d'une infection, les hémocytes (similaires aux macrophages humains) sécrétaient le ligand Dpp au niveau des ISCs [315, 316]. Néanmoins, ces résultats font encore l'objet de nombreuses controverses, et des recherches plus approfondies doivent être menées pour mieux comprendre le rôle de la signalisation BMP dans la régulation de l'homéostasie tissulaire intestinale.

B. La Fibrodysplasie Ossifiante Progressive (FOP)

La fibrodysplasie ossifiante progressive (FOP) est une maladie génétique rare, dont la fréquence est de l'ordre d'un cas sur 2 millions, caractérisée par des malformations congénitales du squelette et du tissu conjonctif, qui évoluent rapidement vers l'apparition d'ossifications hétérotopiques. L'âge moyen d'apparition de l'ossification ectopiques est de 5 ans, et l'espérance de vie médiane d'environ 40 ans. Deux principales caractéristiques cliniques définissent la FOP : une malformation du gros orteil et/ou des pouces, appelée microdactylie, et des gonflements douloureux des tissus conjonctifs diffus, évoluant progressivement en tissu osseux [Figure 20]. Le traitement est principalement axé sur la prévention, le soutien psychologique des patients, et l'utilisation de médicaments anti-inflammatoires pour contrôler les symptômes des poussées de formation osseuse. Les interventions chirurgicales sont contre-productives, car elles provoquent une poussée d'ossification hétérotopique.

Le pronostic de la FOP est mauvais, et pour la plupart des patients l'utilisation d'un fauteuil roulant est nécessaire à la fin de la deuxième décennie de la vie, le décès étant généralement dû à des complications cardio-pulmonaires [317, 318].

1) ALK2 et prédisposition à la FOP

Le phénotype de la FOP se caractérise par une dérégulation profonde de la voie de signalisation BMP. Des analyses génétiques ont mis en évidence son association à des mutations situées dans le gène Activin A receptor type I (*ACVR1*), codant pour ALK2, un récepteur de type I de la famille des BMP [319]. Désormais, en cas de suspicion clinique de FOP, un test génétique est réalisé à la recherche de mutations d'*ACVR1*. La plupart des patients atteints possèdent une mutation faux-sens R206H à l'état hétérozygote, qui affecte le domaine d'activation du récepteur ALK2. Ce domaine d'activation, commun à tous les récepteurs de type I, est essentiel à la liaison et à la phosphorylation des protéines R-Smad. Cette mutation a pour conséquence de déstabiliser le domaine d'activation du récepteur, induisant ainsi une hyperactivation de la signalisation BMP. Trois hypothèses peuvent expliquer cette augmentation de la signalisation :

- La mutation R206H rendrait le récepteur constitutivement actif, ce qui aurait pour conséquence de recruter et d'activer les R-Smad indépendamment de la fixation d'un ligand au récepteur BMP, entraînant une signalisation spontanée.
- La mutation R206H bloquerait la fixation d'inhibiteur(s), tel(s) que l'immunophiline FKBP12 qui se fixe au domaine d'activation pour bloquer la signalisation BMP, ce qui perturberait la régulation et augmenterait la signalisation BMP [320].
- La mutation R206H pourrait provoquer l'accumulation des récepteurs BMP de type I à la membrane cellulaire, et favoriserait ainsi la signalisation BMP. En effet, la protéine FKBP12 peut également recruter le complexe ubiquitine ligase Smad-7/Smurf1 pour réguler l'abondance du récepteur à la membrane. Il est intéressant de noter qu'une telle augmentation de récepteurs ALK2 à la membrane est observée dans les cellules de patients atteints de FOP.

Un petit nombre de patients atteints de FOP peuvent présenter des mutations atypiques conduisant à des symptômes plus ou moins sévères de la maladie. Il a été postulé que ces mutations d'*ACVR1* entraînaient un dérèglement de l'oligomérisation d'ALK2, de son internalisation, de sa dégradation et/ou de l'activation de la signalisation en aval. Afin de mieux caractériser chaque mutation du d'*ACVR1* décrite chez les patients FOP, des modèles animaux ont été générés en laboratoire, tels qu'un modèle chez la souris et un modèle chez la drosophile. Ces études ont permis de mieux caractériser les mécanismes moléculaires mis en jeu, afin d'établir de nouvelles thérapies [321].

Dans la plupart des cas, les mutations de la FOP sont spontanées, bien qu'une transmission autosomique dominante avec une expressivité ou une pénétrance variables, ait été rapportée dans certaines familles. Une étude menée sur trois paires de jumeaux monozygotes ayant une FOP a révélé des malformations congénitales de l'orteil identique, mais des ossifications hétérotopiques différentes. Ces résultats suggèrent que les facteurs génétiques influencent le phénotype de la maladie durant le développement prénatal, mais que des facteurs environnementaux, peuvent fortement influencer la progression et la sévérité des symptômes d'ossification hétérotopique. Ainsi, en fonction des antécédents de vie et de l'exposition à certains facteurs environnement, les symptômes de la FOP diffèrent selon les patients.

2) Similitude clinique entre FOP et SpA

Du fait de la similitude de certaines caractéristiques anatomo-cliniques entre la FOP et la SA, telles que l'inflammation des tissus conjonctifs, l'importance des douleurs diffuses et l'apparition d'ossifications hétérotopiques, certains patients atteints de FOP ont été pris à tort pour des SA [322, 323]. C'est le cas d'un patient qui avait des antécédents de douleurs dorsales et des raideurs articulaires, sans antécédent de diarrhée ou de psoriasis [324, 325]. Le patient ne présentait aucun symptôme au niveau des mains ou des pieds. Son examen mettait en évidence une posture voutée, des articulations sacro-iliaques érodées, des marges corticales irrégulières et des articulations thoraco-lombaires fusionnées. L'allèle HLA-B27 n'avait pas été détecté, mais les caractéristiques correspondaient à celles d'une SA. Un traitement à base d'anti-inflammatoires a été préconisé, mais sans effet notable, voire une aggravation, puisque l'année suivante, le patient développait des polyarthralgies. Un nouvel examen fut entrepris, et, sur la base des résultats radiographiques montrant des ossification hétérotopiques, les symptômes furent rattachés à une FOP que le séquençage de son ADN confirma en révélant une mutation du gène *ACVR1*.

Ces résultats démontrent que la FOP peut simuler les signes cliniques d'une SA. Ceci est important car cela met en évidence les difficultés de diagnostic associé à la FOP au stade précoce du développement de la maladie. Les signes sont généralement moins marqués, en particulier lorsque les anomalies caractéristiques des orteils sont absentes.

Situation du sujet

Mes travaux de thèse se sont axés sur trois projets distincts. Mon projet initial devait porter sur une étude génomique sur une cohorte de patients atteints de SA pour la recherche de nouveaux gènes de prédisposition à cette maladie et l'étude de leurs homologues chez la drosophile. L'avancée du projet ne permettant pas de progresser dans le cadre contraint d'une thèse, j'ai pu aborder d'autres problématiques au cours et après ma première année de thèse. Néanmoins, des expériences supplémentaires sont en cours de réalisation pour ce projet. Elles devraient permettre de constituer un article scientifique dans le futur. Mes travaux et les données sur lesquels ils s'appuient sont présentés en annexe 2.

L'annexe 1 présente pour sa part un autre projet indépendant, orienté sur l'étude du stress du RE dans le modèle drosophile. Ces travaux se sont déroulés durant ma première année de thèse et m'ont permis de me familiariser avec le modèle drosophile. Ils vont mener à une publication dont je serai second auteur.

Suite à la réorientation de mon projet de thèse, la majorité de mes travaux a porté sur la création d'un nouveau modèle animal pour l'étude du HLA-B27 : la drosophile transgénique. Ces résultats présentés dans la première partie de cette thèse vont mener à une publication dont je serai premier auteur.

I. Misregulation of the BMP pathway in *Drosophila* sheds light on the pathogenicity of HLA-B27 molecule in spondyloarthritis (Résultats principaux)

Comme nous l'avons vu précédemment, les SpA sont des maladies hautement héréditaires avec un rapport de risque (*i.e.* λ_s) aux alentours de 40. Le facteur de prédisposition le plus important provient de l'allèle HLA-B27, appartenant au complexe majeur d'histocompatibilité ; il est présent chez près de 90% des patients d'origine caucasienne. Il représente plus de 20% de la part génétique d'héritabilité de la SpA. Néanmoins, 45 ans après sa découverte, l'association entre l'allèle HLA-B27 et la SpA reste toujours inexpliquée. Plusieurs hypothèses ont été proposées sur les mécanismes moléculaires pouvant relier la présence de cet allèle à l'apparition des manifestations de la SpA. Certaines de ces hypothèses suggèrent l'existence d'un mécanisme dépendant de la présentation de l'antigène, tel qu'un peptide "arthritogène", et d'autres portent sur un mécanisme indépendant de l'antigène, tel que l'accumulation de formes mal repliées de HLA-B27 pouvant conduire à un stress du RE. Aucune n'a pu être démontrée et toutes font face à des éléments expérimentaux qui semblent les invalider, ne permettant pas d'expliquer le lien entre HLA-B27 et la SA. On peut poser l'hypothèse que la difficulté à identifier le rôle pathogène précis du HLA-B27 pourrait être due aux fonctions propres des molécules du CMH dans l'immunité, pouvant masquer d'autres rôles pathogènes de cette molécule. De ce fait, il paraissait intéressant d'utiliser des approches encore inexplorées, afin de mieux concevoir le rôle moléculaire de HLA-B27 dans la pathologie dans un cadre permettant de s'affranchir des fonctions de présentation de l'antigène. Notre approche a consisté en la production d'un nouveau modèle d'étude du HLA-B27, afin d'explorer davantage le rôle pathogène de cet allèle chez la drosophile.

La drosophile est un puissant modèle génétique qui a permis des avancées considérables dans la compréhension du rôle de nombreux gènes humains, ainsi que dans la description des processus cellulaires et moléculaires de nombreuses pathologies humaines. L'un des avantages de ce modèle est qu'il ne possède pas d'immunité adaptative, permettant ainsi de révéler un effet de l'allèle HLA-B27 jusqu'alors méconnu, indépendamment de ses fonctions dans l'immunité. Par conséquent, nous avons produit des lignées de drosophiles transgéniques pour plusieurs allèles HLA-B, associés (B*2705, B*2704) ou non (B*0702) à la SpA, ainsi que pour la chaîne invariante β_2m , qui se complexe avec les protéines HLA-B lors de leur repliement dans la cellule. L'objectif de ce projet était d'identifier des processus cellulaires et moléculaires pouvant être affectés par l'expression de ces différents transgènes, et ainsi de mettre en évidence de nouveaux mécanismes potentiels expliquant le rôle pathogène de la protéine HLA-B27 dans la physiopathologie des SpA.

II. The endoplasmic reticulum unfolded protein response varies depending on the affected region of the tissue but independently from the source of stress (Annexe 1)

Le RE joue un rôle majeur dans de nombreuses fonctions physiologiques, telles que la synthèse protéique et lipidique, l'homéostasie calcique, et la régulation des activités mitochondriales. Une perturbation de l'une de ces fonctions peut conduire à une accumulation de protéines mal-conformées, perturbant l'homéostasie cellulaire et déclenchant un stress du RE. Une réponse adaptative appelée UPR est alors mise en place par l'activation de mécanismes permettant de rétablir l'équilibre cellulaire. Mon équipe d'accueil a mis en évidence que l'induction d'un stress du RE dans une région spécifique du disque imaginal d'aile, le domaine *vestigial*, par différentes sources de stress, conduit à une réponse physiologique spécifique induite par la voie PERK/ATF4. Récemment, les travaux de Zhang *et al*, ont mis en évidence que l'induction d'une nouvelle source de stress dans une autre région du disque imaginal d'aile, le domaine *engrailed*, conduisait à l'activation d'un stress du RE, mais présentant une réponse cellulaire différente. De ce fait, nous avons émis deux hypothèses : soit l'activation de cette réponse cellulaire dépend de la nature du stress, soit cette réponse cellulaire dépend de la position des cellules stressées dans le tissu. L'objectif de ce projet a été de déterminer si les voies de signalisation induites lors d'un stress du RE dépendent de l'environnement/identité cellulaire, ou bien de la source de stress en elle-même. J'ai notamment participé à ces travaux au travers des figures 1, 3c et de données qui n'apparaissent pas dans le manuscrit.

III. Analyse par séquençage ciblé du nouveau locus de susceptibilité à la spondylarthrite ankylosante en 13q13 (Annexe 2)

Bien qu'HLA-B27 rende compte de la plus grande part de la susceptibilité génétique à la SpA découverte jusqu'à présent, de nombreux autres facteurs génétiques ont été récemment identifiés comme pouvant être associés à la maladie. Ainsi, plus de 20 locus de susceptibilité ont été identifiés grâce à des approches de type GWAS. Cependant, l'ensemble de ces facteurs de susceptibilité ne représente encore qu'une faible portion de la susceptibilité génétique à la SpA, suggérant que d'autres facteurs restent encore à découvrir. Il a été suggéré qu'une part importante de "l'hérédité manquante" dans les maladies complexes pourrait être due aux effets de variants rares qui sont difficilement détectables par les approches GWAS. Mon équipe d'accueil, a ainsi entrepris des études familiales sur une cohorte de patients atteints de SpA, afin d'identifier des variants rares dans de nouveaux gènes de susceptibilité à la SpA pouvant expliquer l'hérédité manquante. Une analyse de liaison non paramétrique sur une cohorte familiale de SpA a permis de mettre en évidence une liaison significative dans la région 13q13. Un séquençage ciblé de cette région a été réalisé, afin d'identifier des variants rares dans certains gènes de cette région, pouvant être impliqués dans la physiopathologie des SpA. Cette annexe présente les travaux que j'ai réalisés sur ce projet à la suite du séquençage ciblé de la région 13q13, en collaboration avec le Pr. Henri-Jean Garchon.

Introduction

"L'homme animé par l'esprit scientifique désire sans doute savoir, mais c'est aussitôt pour mieux interroger"

Résultats

Gaston Bachelard

Résultats complémentaires

Discussion

Annexes

Références bibliographiques

Résultats : Article 1

En-tête : HLA-B27 interacts with and misregulates the BMP pathway *in vivo*

La spondylarthrite (SpA) est une maladie inflammatoire chronique rhumatismale qui se caractérise par de fortes inflammations aux niveaux des articulations pouvant évoluer vers l'ankylose, mais aussi par l'apparition de manifestations extra-articulaires, telles que un psoriasis, une uvéite, ou une inflammation intestinale. La SpA possède une forte composante génétique dominée par l'antigène HLA-B27 du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I. Découverte en 1973, par l'équipe de Caffrey et James, cette molécule a fait l'objet de plusieurs hypothèses dans la physiopathologie de la SpA. Du fait de son rôle dans l'initiation et la propagation des réponses immunitaires, l'une de ces hypothèses repose sur l'idée que la molécule HLA-B27 aurait la capacité de présenter des peptides anormaux à la surface cellulaire favorisant la réponse immunitaire. D'autres travaux indiquent que la molécule HLA-B27 aurait un repliement plus lent que les autres molécules du CMH, pouvant engendrer une accumulation de forme mal-repliées dans le réticulum endoplasmique et induire un stress du RE. Néanmoins, aucune de ces hypothèses n'a pu être encore confirmée, et les liens moléculaires entre HLA-B27 et la physiopathologie de la maladie sont encore largement inconnus.

Afin de mieux caractériser le rôle de cette molécule, nous nous proposons de l'étudier dans le modèle *Drosophila melanogaster*, qui est largement utilisé pour la compréhension des mécanismes moléculaires complexes de nombreux gènes impliqués dans des pathologies sévères chez l'Homme. Pour cela, nous avons établi des lignées de drosophiles transgéniques avec des allèles associées à la SpA, le HLA-B*2705, et le HLA-B*2704, ou avec un allèle non associé, le HLA-B*0702, qui sera utilisé comme témoin. En outre, des lignées transgéniques avec la chaîne invariante $\beta 2m$ ont été produites, pour conduire à la formation du complexe présentateur d'antigène avec les protéines HLA-B.

L'expression de ces transgènes dans le tissu d'aile et d'œil de la drosophile a induit un phénotype spécifique avec les formes associées à la SpA (mais pas avec la forme non associée), qui se caractérise par une perte des veines transversales de l'aile, et une réduction de la taille de l'œil. Nous avons observé que ces phénotypes n'étaient associés ni à de la mort cellulaire, ni à un stress du RE. Des tests d'interaction génétique avec des candidats correspondant aux voies de signalisation impliquées dans le développement de l'œil et de l'aile, ont montré une modulation sélective de la signalisation par la voie Bone Morphogenetic Protein (BMP) lorsque le HLA-B*2705 est exprimé avec la $\beta 2m$. Par ailleurs, nous avons observé que HLA-B27 a fait preuve d'une meilleure capacité de repliement à la surface cellulaire en présence de $\beta 2m$ que HLA-B*0702, chez la drosophile, pourtant dépourvue de la machinerie de chargement peptidique du CMH de classe I. Finalement, nos résultats ont mis en évidence une interaction avec le récepteur de type I de la voie BMP, saxophone, pouvant expliquer la perturbation de la signalisation et l'induction des différents phénotypes.

En conclusion, nos résultats indiquent que HLA-B27 pourrait favoriser l'apparition des SpA en interagissant avec le récepteur saxophone, ce qui perturberait la signalisation BMP. Ces résultats inattendus peuvent cependant être reliés aux observations trouvées chez l'Homme. Par exemple, l'homologue du récepteur saxophone, appelé ALK2, est décrit pour être impliqué dans une autre pathologie : la Fibrodysplasie ossifiante progressive, qui présente des symptômes très similaires à une SpA avancée.

Des études plus approfondies doivent être menées pour mieux comprendre les processus physiologiques pouvant être perturbés par l'expression de ces formes associées à la SpA. De ce fait, il serait intéressant d'observer l'effet de l'expression de nos différents transgènes dans les cellules immunitaires de la drosophile, afin de se rapprocher le plus possible de la physiopathologie de la SpA.

Misregulation of BMP/TGF β sheds light on the pathogenicity of HLA-B27 in spondyloarthritis

Author names and affiliations

Benjamin Grandon ^{1,2,3}, Aurore Rincheval-Arnold ¹, Nadège Jah ^{2,3}, Jean-Marc Corsi ¹, Luiza M. Araujo ^{2,3}, Simon Glatigny ^{2,3}, Erwann Prévost ¹, Delphine Roche ¹, Gilles Chiocchia ^{2,3}, Isabelle Guénel ^{1*}, Sébastien Gaumer ^{1*}, Maxime Breban ^{2,3,4*}

¹ Université Paris-Saclay, UVSQ, PSL Research University, EPHE, Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire, Montigny-le-Bretonneux, France;

² UMR1173 Inserm, UVSQ-Université Paris-Saclay, Versailles, France;

³ INFLAMEX, Laboratoire d'Excellence, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France;

⁴ Ambroise-Paré Hospital, Rheumatology department, AP-HP, Boulogne-Billancourt, France.

*These authors contributed equally to this work.

Summary

The class I major histocompatibility complex allele encoding the human leucocyte antigen (HLA)-B27 is the main genetic factor predisposing to ankylosing spondylitis (AS) and related spondyloarthritis (SpA), a group of osteo-articular disorders combining inflammation with ossification¹. Until now, hypotheses to explain such striking association discovered 46 years ago have speculated either on the presentation of particular peptides to CD8⁺ T cells or on aberrant behaviors of the HLA-B27 molecule independent of its antigen-presenting function, including slow folding and homodimerization². Here we show that HLA-B27 pathogenicity could be explained by a misregulation of the transforming growth factor β (TGF β)/bone morphogenetic protein (BMP) signaling pathway resulting from specific antagonistic interaction with BMP type I receptor (BMPRI). We found that *Drosophila* transgenic for SpA-associated HLA-B*27:04 or HLA-B*27:05 -but not for the SpA-non-associated HLA-B*07:02 allele- developed a crossveinless phenotype in the presence of human β 2-microglobulin (h β 2m) that allows expression of well-folded HLA-B molecules at the cell surface. This phenotype was due to a disturbance of BMP signaling by HLA-B27/h β 2m, which repressed Saxophone (Sax) BMPRI function, resulting in increased phosphorylated Mothers against dpp (Mad, a *Drosophila* receptor-mediated Smad), and expression of its target genes. Consistently, HLA-B27/h β 2m well-folded conformers co-localized with Sax in *Drosophila* cells, and with the Sax mammalian ortholog ALK2 on immune cells from SpA patients. As predicted, given that Sax orthologs ALK1 and ALK2 are known to exert antagonistic function on TGF β /BMP signaling³⁻⁶, we found heightened p-Smad in response to TGF β and/or Activin A in immune cells from SpA patients. Altogether, our results indicate that the pathogenic role of HLA-B27 in SpA may result from a TGF β /BMP signaling misregulation at the crosstalk between inflammation and ossification.

Text

We used *Drosophila* to investigate the mechanism by which expression of *HLA-B27/hβ2m* may deregulate cellular functions unrelated to antigen-specific immune response. Transgenic flies, carrying SpA-associated *HLA-B*27:04* or *HLA-B*27:05* alleles in combination with *hβ2m* developed abnormal phenotypes. The adult fly wing contains five longitudinal veins (L1 to L5, L1 being the most anterior) spanning the length of the wing and the anterior (ACV) and posterior (PCV) crossveins that connect L3 to L4 and L4 to L5, respectively (**Fig. 1a**). Neither expression of single transgenes (**Fig. 1b, c, e, g**), nor expression of *HLA-B*07:02* with *hβ2m* induced any phenotype in the adult fly (**Fig. 1d**). However, expression of *HLA-B*27:04* or *HLA-B*27:05* with *hβ2m* induced a loss of ACV and PCV, when driven in the wing by *nubbin-GAL4* or *en-GAL4* (**Fig. 1f, h, and Extended Data Fig. 1d**). Moreover, expression of *HLA-B27* alleles with *hβ2m* but not of single transgenes nor of *HLA-B*07:02* with *hβ2m* caused a significant reduction of the eye size, when driven by the eye-specific driver *ey-GAL4* (**Fig. 1i-l**). We focused further studies on the crossveinless phenotype that was fully penetrant, in contrast to the eye phenotype.

Efficient class I major histocompatibility complex (MHC-I) folding in the endoplasmic reticulum (ER) depends on the peptide-loading complex ⁷, which lacks some components in *Drosophila*. Thus, *HLA-B*27:05/hβ2m* expression in such organism could lead to ER stress and unfolded protein response (UPR), a mechanism that has been proposed to mediate *HLA-B27* pathogenicity ^{1,2}. However, ER stress and apoptosis markers revealed no effect of *HLA-B*27:05/hβ2m* expression. Additionally, reducing putative ER stress or apoptosis did not modify the crossveinless phenotype, ruling out a role of ER stress or apoptosis in the *HLA-B*27:05/hβ2m*-induced phenotype (**Extended Data Fig. 2**).

Another hypothesis that may explain the crossveinless wings relies on development misregulation of the Notch, epidermal growth factor (EGF) or BMP pathways ⁸. We could exclude an effect of *HLA-B*27:05/hβ2m* on Notch and EGF signaling (**Extended Data Fig. 3**). The crossveinless wing phenotype induced by expression of *HLA-B*27:05/hβ2m* in *Drosophila*

phenocopies mutations of genes involved in BMP signaling^{9,10}. During wing development, the BMP pathway induces the presages of wing veins position^{9,11,12}. BMP signaling requires the formation of hetero- or homodimer composed of the Decapentaplegic (Dpp) and/or Glass bottom boat (Gbb) ligands (**Extended Data Fig. 4a**). Dimeric ligand binds to a heterotetramer composed of a hetero- or homodimer of BMPR1s (*i.e.* Thickveins (Tkv) and Sax) and a hetero- or homodimer of the BMP type II receptors (BMPR2, *i.e.* Punt and Wishful thinking). Activated receptors phosphorylate the transcription factor Mad that associates with Medea for its import into the nucleus, where it induces transcription of *optomotor-blind (omb)*, *spalt-major (spalm)*, and *daughters against dpp (dad)*^{11,12}.

Depletion of Dpp or expression of an inactive mutant of *gbb* in the wing, resulted in a reduction of wing size and/or an alteration of venation which were worse in the presence of HLA-B*27:05/h β 2m, demonstrating interaction between HLA-B*27:05/h β 2m and the BMP pathway (**Extended Data Fig. 5a-d**). Overexpression of *gbb* or *dpp* induces the formation of a blistered wing (**Fig. 2a, c**). Interestingly, co-expression of HLA-B*27:05/h β 2m suppressed the *gbb* overexpression phenotype and reciprocally both ACV and PCV were restored in this context (**Fig. 2b**). In contrast, co-expression of *HLA-B*27:05/h β 2m* did not modify the phenotype induced by *dpp* overexpression (**Fig. 2d**). Additionally, *HLA-B*27:05/h β 2m* had no significant effect on a constitutively active form of Mad (Mad.CA)-induced phenotype (**Extended Data Fig. 5e, f**). Those results indicate that HLA-B27/h β 2m may interact upstream of the transcription factor Mad and potentially with BMP receptors.

Since Gbb preferentially binds to Sax and Dpp to Tkv, we further investigated the interaction between HLA-B*27:05/h β 2m and Sax^{8,13}. Overexpression of a constitutively active form of *Sax* (*Sax.CA*) alters the formation of wings, which was suppressed by HLA-B*27:05/h β 2m, confirming that HLA-B*27:05/h β 2m genetically repressed *Sax* activity (**Fig. 2e, f**). Consistently, HLA-B*27:05/h β 2m had no effect on wing vein defects induced by a negative dominant mutant of *Sax* (*Sax.AI*) (**Fig. 2g, h**). Loss of function of *Sax* is known to widen the phosphorylated Mad (p-Mad) gradient, which results in an increase of its target genes expression¹⁴. Similarly, HLA-B*27:05/h β 2m induced a widening of p-Mad gradient in wing imaginal discs, similar to the effect of

Sax.ΔI, and the transcript levels of *dad* and *omb* were increased (**Fig. 2i-n**). Altogether, those results supported an antagonistic interaction between HLA-B*27:05/hβ2m and Sax. Moreover, the small-eye phenotype may result from similar BMP signaling alterations since Sax loss of function is known to reduce eye size¹⁵. The alternative hypothesis that HLA-B*27:05/hβ2m increased Tkv activity was excluded, as genetic interaction between HLA-B*27:05/hβ2m and a constitutively active form of Tkv (Tkv.CA) decreased the phosphorylation of Mad and attenuated the Tkv.CA phenotype in adult wings (**Extended Data Fig. 6a-e**). Sax can either promote BMP signaling by forming a heterodimer with Tkv or as a homodimer it may limit the availability of Gbb and thus antagonise signaling (**Extended Data Fig. 4a**)¹⁴. Suppression of Tkv.CA-induced phenotype by HLA-B*27:05/hβ2m is readily explained by HLA-B*27:05/hβ2m reducing Sax availability and the formation of Tkv-Sax heterodimers, thereby dampening BMP signaling (**Extended Data Fig. 4b**).

HLA-B27 and HLA-B7 were previously observed at the surface of transfected *Drosophila* cells in a well-folded conformation and hβ2m-dependent manner¹⁶. Consistently, well-folded HLA-B*27:05 or HLA-B*07:02 were detected by immunostaining performed on wing imaginal discs using w6/32 and ME1, only when hβ2m was present (**Extended Data Fig. 7a-h and 8a-d**), indicating that hβ2m is essential to the HLA-B complex formation, as in mammals. Interestingly, HLA-B*27:05/hβ2m resulted in a more intense staining than HLA-B*07:02/hβ2m (**Extended Data Fig. 7a-h**), albeit the amount of hβ2m in wing discs was similar between both conditions (**Extended Data Fig. 8e-g**). Using flow cytometry on non-permeabilized cells from wing imaginal discs, we also detected a greater amount of well-folded HLA-B*27:05/hβ2m than HLA-B*07:02/hβ2m on the cell surface (**Extended Data Fig. 7i, j**). Those results show that HLA-B*27:05 had a better folding capacity than HLA-B*07:02 when combined with hβ2m in the *Drosophila* context.

We next investigated whether HLA-B*27:05/hβ2m and Sax could interact physically using proximity ligation assay (PLA). Unlike the irrelevant human HA-tagged membrane protein hPen2-HA (**Fig. 3a, c**), constitutively active HA-tagged Sax was indeed revealed in very close proximity (*i.e.* less than 40 nm) to HLA-B*27:05/hβ2m in the *Drosophila* wing imaginal disc, (**Fig. 3b, d**). Moreover, the human Sax ortholog ALK2 -shown to behave alike Sax when expressed in *Drosophila*

wing¹⁷ and HLA-B27 were also found in close vicinity at the surface of lymphoblastoid B cell lines from AS patients in a specific manner, since ALK2 neither co-localized with CD45, nor with other HLA-B allotypes (**Fig. 3e-k**).

In mammals, Sax BMPR1 orthologs ALK1/ALK2 form hetero-tetrameric complexes with other BMPR1s and BMPR2s that may signal in response to osteogenic BMPs via Smad1/5/8 or to Activins and TGF β , via Smad2/3¹⁸. Similar to Sax, they may play either a positive or a negative role in signaling, depending on the ligand and BMPR2 partners. To exert its negative role, ALK2 can inhibit BMP-induced signaling, by recruiting BMPR2s into non-competent complexes⁴. Furthermore, Activin A may recruit ALK2 into inactive complexes with BMPR2s that inhibit both Smad2/3-mediated Activin signaling and Smad1/5/8-mediated BMP signaling³. Remarkably, loss of the inhibitory effect of ALK2 on BMP signaling in response to Activin A, due to mutations in *ACVRI* gene, leads to fibrodysplasia ossificans progressiva, a rare genetic disorder characterized by heterotopic ossification of tendons and ligaments that may appear similar to AS^{19,20}. The BMP pathway was also previously found to be misregulated in SpA. For instance, *Smad7* was up-regulated as its *Drosophila* ortholog *dad* in our model²¹, whereas p-Smad1/5/8 was detected in bony outgrowth of SpA patients, which is consistent with the p-Mad gradient widening seen in our model²². To determine if HLA-B27 expression would disturb TGF β /BMP signaling in SpA, we examined phosphorylation of Smad2/3 in T lymphocytes from SpA patients (**Fig. 4**). We observed increased phosphorylation of Smad2/3 after exposure to TGF β superfamily ligands (*i.e.* Activin A or TGF β) consistent with a repression of the antagonistic activity of ALK2 by HLA-B27, similar to its effect on Sax in *Drosophila*.

Based on our findings, we propose a mechanism for HLA-B27 implication in SpA, whereby HLA-B27/h β 2m antagonizing inhibitory ALK2 would potentiate TGF β /BMP signaling. Such a shift towards Smad2/3-mediated signaling in a context of inflammatory stimulus could contribute to the T-helper 17 differentiation bias²³ that is a feature of SpA^{24,25}. Complementarily, release of the brake normally held on BMP-mediated ossification by ALK2 could account for increased ossification, which is another hallmark of SpA²⁶.

Methods

Drosophila lines. *Drosophila* were cultured using standard corn-agar medium. Crosses were performed at 25°C. Various GAL4 drivers were used to induce transgenes expression: *nub-GAL4*, *en-GAL4*, and *ey-GAL4*²⁷⁻²⁹. Stocks obtained from the Bloomington Drosophila Stock Center (NIH P40OD018537) were used in this study: *UAS-Rh1^{G69D}* (Bl#64123)³⁰; *UAS-xbp1::EGFP* reporter (Bl#67735); *UAS-BiP* (Bl#20668); *UAS-p35* (Bl#6298); *UAS-gbb.GFP* (Bl#63058); *UAS-dpp.S* (Bl#1486); *UAS-dpp-RNAi* (Bl#25782); *UAS-gbb.R126A.R325A.K334N* (Bl#63059); *UAS-tkv.CA* (Bl#36537); *UAS-hPEN2.HA* (Bl#65759); *bs-GAL4* (Bl#6354). *UAS-mad.SDVD* (Mad.CA) and *shv^{3KPN}-GAL4* was generously provided by J.F. De Celis^{8,13}. *UAS-saxΔI* and *UAS-sax.Q263D.HA* (sax.CA-HA) were generously provided by S.J. Newfeld³¹. A *w¹¹¹⁸* stock was used as control strain.

Transgenic lines constructs. Flies carrying the cDNA of either *HLA-B*27:04*, *HLA-B*27:05*, *HLA-B*07:02*, or *hβ2m*, under control of UAS regulatory sequences that can be bound by the yeast GAL4 transcription factor to direct tissue expression were generated by *P*-element transgenesis³². Human cDNAs containing the full-length coding region have been previously described³³. They were ligated in the pUASg-attB vector (Gateway® Technology). The resulting plasmids were purified with Qiagen tips and sent for injection into *w¹¹¹⁸* embryos (BestGene Inc, California, USA). *UAS-HLA-B*07:02*, *UAS-HLA-B*27:05*, and *UAS-HLA-B*27:04* transgenes were all inserted as single copy in the same predefined site (68A4 of chromosome 3) allowing to control for the non-specific consequence of the insertion, when comparing different HLA-B transgenes. *UAS-hβ2m* was inserted in 89E11 of chromosome 3. At least two independent transgenic lines were studied for each single or recombined transgene. Effective expression of the transgenes was observed at the transcription and protein levels by real-time quantitative PCR (RT-q-PCR) and Western blot, respectively (**Extended Data Fig. 1a-c**).

RNA extraction and RT-qPCR. Forty wing imaginal discs were dissected in the RNA XS NucleoSpin kit's lysis buffer (Macherey-Nagel, Düren, Germany) on ice for each genotype to extract total RNAs. RNA concentration was determined by NanoDrop 1000 (ThermoScientific, Wilmington,

USA). Reverse transcription was performed using 500 ng of mRNA following the protocol of M-MLV Reverse Transcriptase (ThermoScientific, Wilmington, USA). RT-qPCR was performed using the CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System. Reaction mix preparation is composed of iTaq™ Universal SYBR®Green Supermix (BIORAD, Hercules, USA) and 11 ng of cDNA as described in Biorad reaction mix preparation protocol. Three independent RT-qPCR experiments were performed and data were normalized against *uba2* mRNA levels. Forward and reverse primer sequences (Invitrogen, Life Technologies) used in RT-qPCR were respectively:

HLA-B27: 5' GTGGGTCACGTGTGTCTTTG ; 5' ATTACATCGCCCTGAACGGA

HLA-B7: 5' ACAAGGCTCAGGCACAGACT ; 5' GATGTAATCCTTGCCGTCGT

dad: 5' TGATCGACGGAAGCGATCTG ; 5' CTGGACGTGCTGACTGGAAT

omb: 5' TCTGGGCAGCGCCTATACTA ; 5' TTCTCCCACAGGTCTTTGCC

rho: 5' GGTTCACCTGGGCTTCAAT ; 5' GCCATGTAGATCACGCCGAT

kek1: 5' GCAGTTCATCCGTGCGAATC ; 5' CGATTTCGCCGATCTTGCAG

sty: 5' CGGTCATCGACTATGCCTCC ; 5' GGATTATCCACGCAGGGTGT

aos: 5' TCGCCGGACTATAATGACGC ; 5' TGAATGTGGTTGCAGGCTCT

uba2: 5' AGTCGTAGTAGATGCCGCACAG ; 5' TTCGGTTCATCCTCCTTGTCTT

Immunostaining and microscopy. Wing discs of third-instar larvae were dissected and immunostained as described in ³⁴. The following primary antibodies (Abs) were used: rabbit anti-Death caspase-1 (Dcp-1 Asp216, Cell Signaling, Danvers, MA, USA, 1:50) ³⁵; rabbit anti-p-Smad1/5 to detect p-Mad (S463/465, Cell Signaling, Danvers, MA, USA, 1:100) ³⁶; rabbit anti-GFP (A-11122, ThermoFisher Scientific, MA, USA, 1:500); rabbit anti-HA tag (Y-11, Santa Cruz, Dallas Texas, USA, 1:500); HC-10, a mouse IgG2a monoclonal Ab (mAb) recognizing unfolded HLA-B heavy chains ³⁷; ME1, a mouse IgG1 mAb that is specific for properly folded HLA-B27, HLA-B7 and HLA-B22 proteins ³⁸; w6/32, a mouse IgG2a mAb uniformly recognizing a monomorphic

determinant of all folded HLA-A, -B and -C proteins (ab22432, Abcam)³⁹ and BBM1 a mouse anti-h β 2m IgG2b mAb⁴⁰. Secondary Abs conjugated to Alexa Fluor 488, 568 or 647 were purchased from Molecular Probes (Eugen, OR, USA 1:400). Discs were mounted in Citifluor (Biovalley, Marne-La-Vallée, France). Images were captured using a Leica SPE confocal laser-scanning microscope (Leica, Wetzlar, Germany). Images were stacked and mean intensity was quantified with the ImageJ software.

Eye size measurement. Two- to 3-day-old adult flies were immobilized by freezing at -80°C and mounted on a Petri dish before being imaged at 3.2X magnification using a LEICA MZFLIII microscope and an Olympus DP20 Digital Color Camera (Olympus, Hamburg, Germany). Eyes area was measured with the ImageJ pixel area function.

Imaginal disc cell preparation for flow cytometry. Thirty wing discs were dissected in phosphate-buffered saline (PBS) and transferred to siliconized tubes for trypsination during 1.5 hours at 25°C (90% Trypsin in PBS, Thermofisher). Transgene expressing cells were also expressing GFP. Dissociated cells were left 2.5 hours in Schneider medium at 25°C and incubated with the primary antibody diluted in PBS + BSA 0.1% for 30 min at room temperature (RT). Cells were then rinsed and incubated with the secondary antibody and propidium iodide (PI) for 30 min at RT. PI- and GFP+ cells were characterized with a FACSCanto II system (FORTESSA, BD Biosciences) and analyzed thanks to the Flowjo software (Tree Star).

Proximity ligation assay (PLA). PLA was performed using the Duolink In Situ Red Starter Kit Mouse/Rabbit (Sigma-Aldrich), following the manufacturer's protocol. For *Drosophila* experiments, twenty wing imaginal discs for each genotype were dissected in PBS, fixed in 3.7% formaldehyde for 20 min at room temperature and permeabilized in PBT 0.3%. Primary anti-HA (rabbit, Y11 Santa Cruz), and w6/32 Abs were used overnight at 4°C. For B-LCLs experiments, anti-ALK2 (Sigma-Aldrich, 1:100), anti-CD45 (mouse, 2B11 + PD7/26, Dako, California, USA, 1:100), ME1 and w6/32 Abs were used for this experiment^{43,44}. Ten random 40x images per condition were acquired using the DAPI (blue nuclei) and Cy5 (red PLA signals) filters. Z-stack confocal images were

collected and maximum intensity projections were generated by ImageJ. Automatic counting of the PLA dots using the "Find Maxima" function in ImageJ software were performed.

Human cells: Lymphoblastoid B cell lines (B-LCLs) *10151* (HLA-A*02, *31; B*27:05, *15; C*02, *03), *6370* (HLA-A*02, *68; B*27:05, *44; C*02, *07), and *13617* (HLA-A*02, *03; B*27:05, *18; C*02, *07) were established from AS patients and have been previously described^{45,46}. B-LCLs *9435* (HLA-A*02, *03; B*07, *44; C*05, *07), *9953* (HLA-A*03, *30; B*07, *49; C*06, *07), and *6908* (HLA-A*02, *11; B*22, *44; C*03, *05) were established from EBV-transformed lymphocytes from healthy controls according to standard protocol, and grown at 37°C in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from HLA-B27+ SpA patients and HLA-B27 negative healthy controls, having signed informed consent, by Ficoll (GE Healthcare) density gradient centrifugation. CD14⁺ cells were first removed from PBMC by positive magnetic selection, using anti-CD14 microbeads and AutoMacs Pro Separator (Miltenyi Biotec). The characteristics of SpA and controls are shown in **Extended Data Table 1**. This study was approved by institutional ethic committee of Ile-de-France XI (Saint-Germain-en-Laye France).

Analysis of Smad2/3 phosphorylation by flow cytometry. PBMC (10⁶ cells/tube in PBS) from SpA patient or healthy control were stimulated with recombinant human (rh) TGFβ (10 ng/mL; R&D Systems) or rhActivin A (20 ng/mL; R&D Systems) or not for 30 minutes at 37°C. After staining with anti-CD3 mAb (clone-UCHT1; BD Biosciences) and fixation during 20 minutes at 37°C with cytoFix Buffer (BD Biosciences), cells were permeabilized with perm buffer and stained with anti-p-Smad2 (pS465/pS467) and p-Smad3 (pS423/pS425) PhosFlow Ab according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences) and analyzed using a LSRIII Fortessa flow cytometer (BD Biosciences). Results were expressed as staining index calculated as the ratio between samples and fluorescence-minus-one (FMO) staining control.

Western-blotting. Forty wing discs of third-instar larvae were dissected in PBS and crushed in 400µl of lysis buffer [Tris-HCl pH 8.2, 1M; NaCl 25mM; Nonidet P40 1% (NP40), protease

inhibitor (complete Mini EDTA free, Roche, Boulogne-Billancourt, France)]. Total extract was completed by Laemmli 4X, DTT 0.5M and heated to 95°C for 5 minutes. Three independent samples of total protein were analyzed by Western blot following a standard protocol, using rabbit anti-GRP78 (BiP) (ab21685, abcam)⁴³, HC-10, BBM1 and mouse anti-Lamin C (LC28.26, DSHB, Iowa, USA)⁴⁴ and peroxidase-conjugated goat anti-mouse Ig or rabbit Ig (Dakocytomation, Carpinteria, CA) for 1.5 hours. CD14⁺ PBMC cells (1-2 × 10⁶ cells) were lysed in lysis buffer [Tris-HCl pH 7.5 20mM; NaCl 20mM; Triton 100X 1%, EDTA 10mM, protease inhibitor (complete Mini EDTA free, Roche), phosphatase inhibitor (PhosSTOP, Roche, 04906837001), Na3VO4 [1mM]. 2 µg of proteins were separated in 4-12% gradient gel and transferred on a PVDF membrane. Blot was revealed following a standard protocol using rabbit anti-p-Smad2 (Cell Signaling #3108), rabbit anti-Smad2/3 (Cell Signaling #8685) and rabbit anti-Actin (Sigma #A2066)

Statistical analysis. Quantitative data are shown as the mean ± SEM. Unpaired Student's t-test was used for comparisons between two groups, unless otherwise stated. ANOVA was used for comparison of more than 2 groups, followed by unpaired Student's t-test after Bonferonni correction. Wilcoxon matched-pairs test was used for comparison of matched groups. *p* values inferior to 0.05 were considered significant. The effect size was measured by Cohen's *d*.

Data availability. The authors declare that the main data supporting the findings of this study are available within the article and its Supplementary Information files.

References

1. Taurog, J. D., Chhabra, A. & Colbert, R. A. Ankylosing Spondylitis and Axial Spondyloarthritis. *N. Engl. J. Med.* **375**, 1303 (2016).
2. Bowness, P. HLA-B27. *Annu. Rev. Immunol.* **33**, 29–48 (2015).
3. Renlund, N., O'Neill, F. H., Zhang, L., Sidis, Y. & Teixeira, J. Activin receptor-like kinase-2 inhibits activin signaling by blocking the binding of activin to its type II receptor. *J. Endocrinol.* **195**, 95–103 (2007).
4. Hildebrand, L., Stange, K., Deichsel, A., Gossen, M. & Seemann, P. The Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP) mutation p.R206H in ACVR1 confers an altered ligand response. *Cellular Signal.* **29**, 23–30 (2017).
5. Oh, S. P. *et al.* Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 2626–2631 (2000).
6. Goumans, M. J. *et al.* Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling. *Mol. Cell* **12**, 817–828 (2003).
7. Blees, A. *et al.* Structure of the human MHC-I peptide-loading complex. *Nature* (2017).
8. Sotillos, S. & De Celis, J. F. Interactions between the Notch, EGFR, and decapentaplegic signaling pathways regulate vein differentiation during *Drosophila* pupal wing development. *Dev. Dyn.* **232**, 738–752 (2005).
9. Ralston, A. & Blair, S. S. Long-range Dpp signaling is regulated to restrict BMP signaling to a crossvein competent zone. *Dev. Biol.* **280**, 187–200 (2005).
10. Matsuda, S., Yoshiyama, N., Künnapu-Vulli, J., Hatakeyama, M. & Shimmi, O. Dpp/BMP transport mechanism is required for wing venation in the sawfly *Athalia rosae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **43**, 466–473 (2013).
11. Crozatier, M., Glise, B. & Vincent, A. Patterns in evolution: veins of the *Drosophila* wing. *Trends Genet.* **20**, 498–505 (2004).
12. Raftery, L. A. & Umulis, D. M. Regulation of BMP activity and range in *Drosophila* wing development. *Curr. Opin. Cell Biol.* **24**, 158–165 (2012).
13. Haerry, T. E. The interaction between two TGF-beta type I receptors plays important roles in ligand binding, SMAD activation, and gradient formation. *Mech. Dev.* **127**, 358–370 (2010).
14. Bangi, E. Dual function of the *Drosophila* Alk1/Alk2 ortholog Saxophone shapes the Bmp activity gradient in the wing imaginal disc. *Development* **133**, 3295–3303 (2006).
15. Horsfield, J., Penton, A., Secombe, J., Hoffman, F. M. & Richardson, H. decapentaplegic is required for arrest in G1 phase during *Drosophila* eye development. *Development* **125**, 5069–5078 (1998).
16. Jackson, M. R., Song, E. S., Yang, Y. & Peterson, P. A. Empty and peptide-containing conformers of class I major histocompatibility complex molecules expressed in *Drosophila*

- melanogaster cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 12117–12121 (1992).
17. Le, V. Q. & Wharton, K. A. Hyperactive BMP signaling induced by ALK2^{R206H} requires type II receptor function in a *Drosophila* model for classic fibrodysplasia ossificans progressiva: Fop Signaling Requires Type II Receptor Function. *Dev. Dyn.* **241**, 200–214 (2012).
 18. Yadin, D., Knaus, P. & Mueller, T. D. Structural insights into BMP receptors: Specificity, activation and inhibition. *Cytokine Growth Factor Rev.* **27**, 13–34 (2016).
 19. Bridges, A. J., Hsu, K. C., Singh, A., Churchill, R. & Miles, J. Fibrodysplasia (myositis) ossificans progressiva. *Semin. Arthritis Rheum.* **24**, 155–164 (1994).
 20. Hatsell, S. J. *et al.* ACVR1R206H receptor mutation causes fibrodysplasia ossificans progressiva by imparting responsiveness to activin. *Sci. Transl. Med.* **7**, 303ra137 (2015).
 21. Lee, Y. H. & Song, G. G. Meta-analysis of differentially expressed genes in ankylosing spondylitis. *Genet. Mol. Res.* **14**, 5161–5170 (2015).
 22. Lories, R. J. U., Derese, I. & Luyten, F. P. Modulation of bone morphogenetic protein signaling inhibits the onset and progression of ankylosing enthesitis. *J. Clin. Invest.* **115**, 1571–1579 (2005).
 23. Zhang, S. The role of transforming growth factor β in T helper 17 differentiation. *Immunology* **155**, 24–35 (2018).
 24. Glatigny, S. *et al.* Proinflammatory Th17 cells are expanded and induced by dendritic cells in spondylarthritis-prone HLA-B27-transgenic rats. *Arthritis Rheum.* **64**, 110–120 (2012).
 25. Smith, J. A. & Colbert, R. A. Review: The interleukin-23/interleukin-17 axis in spondyloarthritis pathogenesis: Th17 and beyond. *Arthritis Rheum.* **66**, 231–241 (2014).
 26. Bennett, A. N. *et al.* Severity of baseline magnetic resonance imaging-evident sacroiliitis and HLA-B27 status in early inflammatory back pain predict radiographically evident ankylosing spondylitis at eight years. *Arthritis Rheum.* **58**, 3413–3418 (2008).
 27. Kambadur, R. *et al.* Regulation of POU genes by castor and hunchback establishes layered compartments in the *Drosophila* CNS. *Genes Dev.* **12**, 246–260 (1998).
 28. Johnson, R. L., Grenier, J. K. & Scott, M. P. patched overexpression alters wing disc size and pattern: transcriptional and post-transcriptional effects on hedgehog targets. *Development* **121**, 4161–4170 (1995).
 29. Hazelett, D. J., Bourouis, M., Walldorf, U. & Treisman, J. E. decapentaplegic and wingless are regulated by eyes absent and eyegone and interact to direct the pattern of retinal differentiation in the eye disc. *Development* **125**, 3741–3751 (1998).
 30. Ryoo, H. D., Domingos, P. M., Kang, M.-J. & Steller, H. Unfolded protein response in a *Drosophila* model for retinal degeneration. *EMBO J.* **26**, 242–252 (2007).
 31. Haerry, T. E., Khalsa, O., O'Connor, M. B. & Wharton, K. A. Synergistic signaling by two BMP ligands through the SAX and TKV receptors controls wing growth and patterning in

Drosophila. Development **125**, 3977–3987 (1998).

32. Brand, A. H. & Perrimon, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401–415 (1993).
33. Jeanty, C. *et al.* HLA-B27 subtype oligomerization and intracellular accumulation patterns correlate with predisposition to spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol.* **66**, 2113–2123 (2014).
34. Demay, Y., Perochon, J., Szuplewski, S., Mignotte, B. & Gaumer, S. The PERK pathway independently triggers apoptosis and a Rac1/Slpr/JNK/Dilp8 signaling favoring tissue homeostasis in a chronic ER stress *Drosophila* model. *Cell Death Dis.* **5**, e1452 (2014).
35. Florentin, A. & Arama, E. Caspase levels and execution efficiencies determine the apoptotic potential of the cell. *J. Cell Biol.* **196**, 513–527 (2012).
36. Wong, J. T. *et al.* DIP1 modulates stem cell homeostasis in *Drosophila* through regulation of *sisR-1*. *Nat. Commun.* **8**, 759 (2017).
37. Stam, N. J., Spits, H. & Ploegh, H. L. Monoclonal antibodies raised against denatured HLA-B locus heavy chains permit biochemical characterization of certain HLA-C locus products. *J. Immunol.* **137**, 2299–2306 (1986).
38. Ellis, S. A., Taylor, C. & McMichael, A. Recognition of HLA-B27 and related antigen by a monoclonal antibody. *Hum. Immunol.* **5**, 49–59 (1982).
39. Barnstable, C. J. *et al.* Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. *Cell* **14**, 9–20 (1978).
40. Brodsky, F. M. & Parham, P. Monomorphic anti-HLA-A,B,C monoclonal antibodies detecting molecular subunits and combinatorial determinants. *J. Immunol.* **128**, 129–135 (1982).
41. Hall, E. T. & Verheyen, E. M. Ras-activated *Dsor1* promotes Wnt signaling in *Drosophila* development. *J. Cell. Sci.* **128**, 4499–4511 (2015).
42. Bellucci, A., Fiorentini, C., Zaltieri, M., Missale, C. & Spano, P. The ‘in situ’ proximity ligation assay to probe protein-protein interactions in intact tissues. *Methods Mol. Biol.* **1174**, 397–405 (2014).
43. Sanchez-Martinez, A. *et al.* Parkinson disease-linked GBA mutation effects reversed by molecular chaperones in human cell and fly models. *Sci. Rep.* **6**, 31380 (2016).
44. Schulze, S. R. *et al.* Molecular genetic analysis of the nested *Drosophila melanogaster* lamin C gene. *Genetics* **171**, 185–196 (2005).
45. Costantino, F. *et al.* ERAP1 gene expression is influenced by non-synonymous polymorphisms associated with predisposition to spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol.* **67**, 1525–1534 (2015).
46. Martín-Esteban, A., Guasp, P., Barnea, E., Admon, A. & López de Castro, J. A. Functional interaction of the ankylosing spondylitis-associated endoplasmic eeticulum aminopeptidase 2 with the HLA-B*27 peptidome in human cells: ERAP-2 and the HLA-B*27 peptidome. *Arthritis*

Rheumatol. **68**, 2466–2475 (2016).

47. Rudwaleit, M. et al. The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. *Ann. Rheum. Dis.* **68**, 777–783 (2009).
48. van der Linden, S., Valkenburg, H. A. & Cats, A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum.* **27**, 361–368 (1984).
49. Garrett, S. et al. A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J. Rheumatol.* **21**, 2286–2291 (1994).

End notes

Supplementary Information is available in the online version of the paper.

Acknowledgements We thank Bernard Mignotte for suggestions on the manuscript. This work was supported by a grant from Société Française de Rhumatologie (SFR). We thank the genomics and CYMAGES imaging facilities of the Simone Veil faculty of Health (University of Versailles Saint-Quentin and Paris-Saclay) for its logistic and technical support.

Author Contributions B.G., A.R., and N.J., designed and performed all *Drosophila* experiments and analysed the data. J.M.C., E.P. and D.R. performed PLA and Western blot on human cells. L.M.A. and S.G. designed and performed human cells experiments. B.G., A.R., I.G., S.G. and M.B. wrote the manuscript with input from the co-authors. G.C., I.G, S.G. and M.B. supervised the research and contributed to experimental design.

Author Information The authors declare no competing financial interests. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.B. (maxime.breban@aphp.fr).

Figure legends

Fig. 1 Specific crossveinless and small-eye phenotypes in *Drosophila* co-expressing AS-associated *HLA-B27* with *hβ2m*. (a-h) *nub-GAL4* was used to drive transgenes expression in the wing. Scale bar: 200 μm. Wild-type (WT) adult wing (a) and wings of flies expressing *hβ2m* alone (*nub-GAL4/+; UAS-hβ2m/+*) (b), non-AS-associated *HLA-B*07:02* (*nub-GAL4/+; UAS-HLA-B*07:02/+* and *nub-GAL4/+; UAS-HLA-B*07:02,UAS-hβ2m/+*) (c, d), AS-associated *HLA-B*27:04* (*nub-GAL4/+; UAS-HLA-B*27:04/+* and *nub-GAL4/+; UAS-HLA-B*27:04,UAS-hβ2m/+*) (e, f), AS-associated *HLA-B*27:05* (*nub-GAL4/+; UAS-HLA-B*27:05/+* and *nub-GAL4/+; UAS-HLA-B*27:05,UAS-hβ2m/+*) (g,

h) alone (e, g) or together with *hβ2m* (f, h). Co-expression of *HLA-B*27:04* (f) or *HLA-B*27:05* (h) with *hβ2m* transgenes resulted in the complete or partial disappearance of both crossveins (arrows). (i-k) *ey-GAL4* was used to drive transgenes expression in the eye. Scale bar: 200 μm. Eye aspect of an *ey-GAL4/+* control (i). Eye co-expressing *HLA-B*07:02* (j) or *HLA-B*27:05* (k) with *hβ2m*, the latest showing a reduced size. (l) Quantification of male *Drosophila* eye size (20 eyes per genotype; ****: $p < 10^{-4}$, NS: not significant vs. WT; *B*27:04/hβ2m*: Cohen's $d=2.43$; *B*27:05/hβ2m*: Cohen's $d=3.07$).

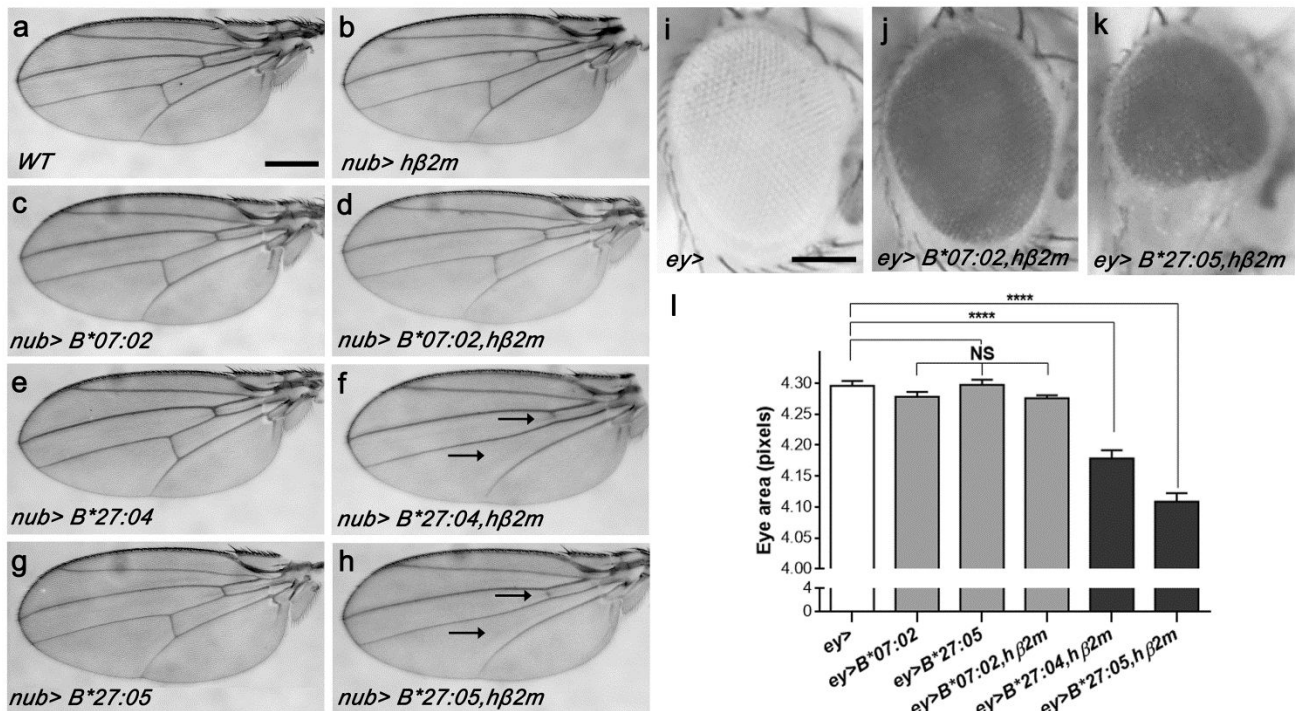


Fig. 2 HLA-B*27:05/h β 2m expression misregulates BMP signaling. (a) Overexpression of *gbb* results in a blistered and pigmented adult wing (*nub-GAL4/+; UAS-gbb/+*). Scale bar: 200 μ m. (b) Genetic interaction between HLA-B*27:05/h β 2m and *gbb* overexpression results in suppression of *gbb*- and HLA-B*27:05/h β 2m-induced phenotypes (*nub-GAL4/+; UAS-gbb/UAS-HLA-B*27:05,UAS-h β 2m*). (c) Overexpression of *dpp* phenocopies *gbb* overexpression (*nub-GAL4/+; UAS-dpp/+*). (d) Genetic interaction with HLA-B*27:05/h β 2m, does not reverse Dpp-induced phenotype (*nub-GAL4/+; UAS-dpp/UAS-HLA-B*27:05,UAS-h β 2m*). (e) A constitutively active form of Sax provokes minor vein defects and blisters (*nub-GAL4/+; UAS-sax.CA/+*). (f) Genetic interaction with HLA-B*27:05/h β 2m partially suppresses this phenotype (*nub-GAL4/+; UAS-sax.CA/UAS-HLA-B*27:05,UAS-h β 2m*). (g) Expression of a Sax depleted of its kinase domain results in a narrowed

adult wing with defects in the formation of L2 and L5 veins (*nub-GAL4/+; UAS-sax Δ I/+*). (h) Genetic interaction with HLA-B*27:05/h β 2m does not modify the Sax Δ I-induced phenotype (*nub-GAL4/+; UAS-sax Δ I/UAS-HLA-B*27:05,UAS-h β 2m*). (i-k) Projections from confocal stacks of third-instar larval wing imaginal discs stained with an anti-p-Mad antibody of (i) wild-type, (j) *nub-GAL4/+; UAS-sax Δ I* and (k) *nub-GAL4/+; UAS-HLA-B*27:05,UAS-h β 2m/+* discs. Scale bar: 200 μ m. (l) Quantification of p-Mad staining reported to imaginal discs width in the foregoing genotypes (30 discs for WT, 14 for *UAS-sax Δ I*, and 21 for HLA-B*27:05/h β 2m; ***: $p < 0.001$ and *: $p < 0.05$; *UAS-sax Δ I*, Cohen's $d = 0.73$ and *HLA-B*27:05/h β 2m*, Cohen's $d = 1.1$). (m-n) Quantification of *dad* and *omb* transcripts expression (three independent experiments; ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$ and *: $p < 0.05$; *dad*: Cohen's $d = 8.17$ and *omb*: Cohen's $d = 1.94$).

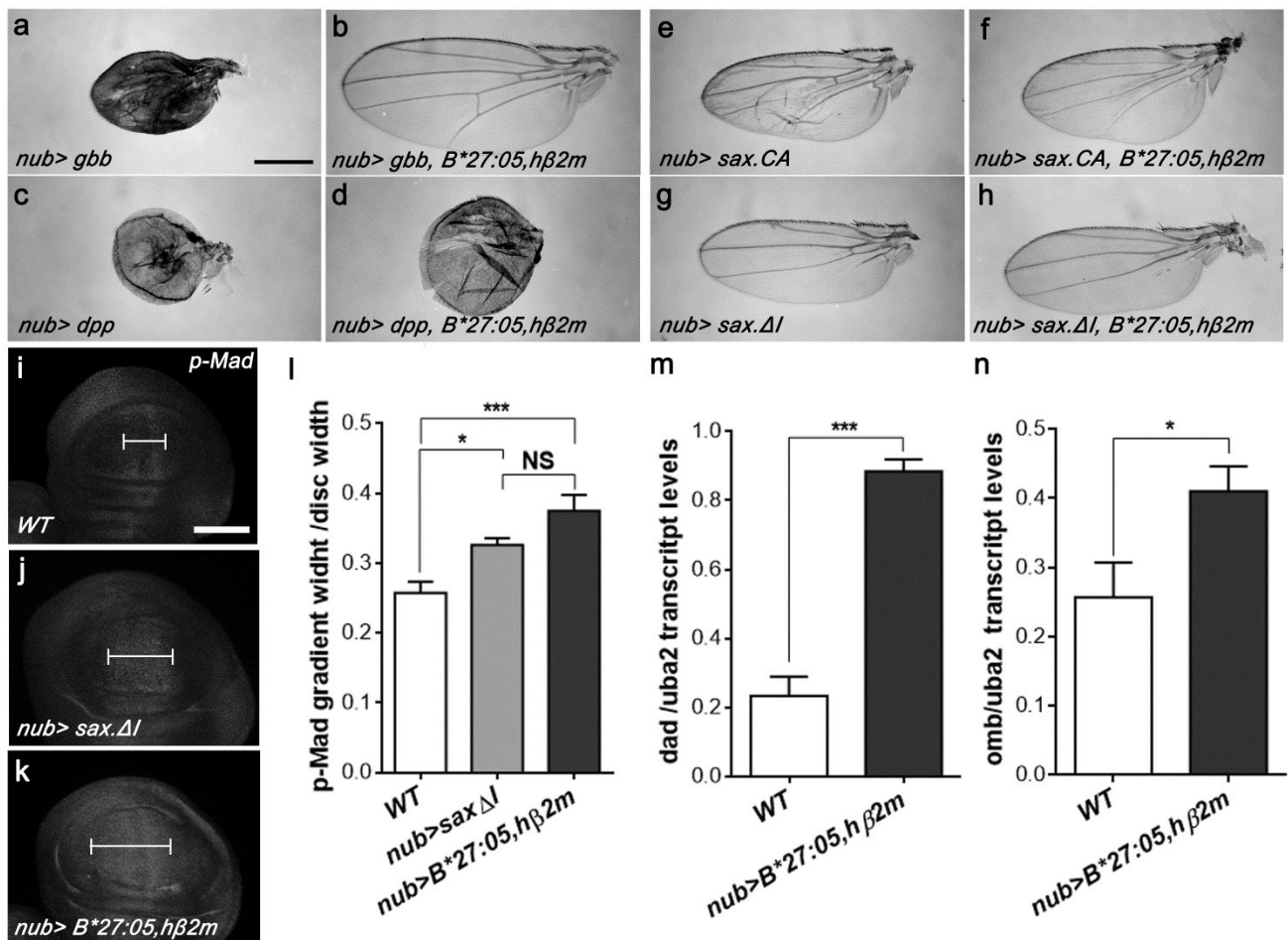


Fig. 3 HLA-B27 interacts with Sax and ALK2. (a-d) PLA performed with w6/32 and anti-HA Abs on the wing pouch cells expressing (a, c) HLA-B*27:05/h β 2m and HA-tagged-hPen2 (negative control) or (b, d) HLA-B*27:05/h β 2m and HA-tagged Sax.CA with nub-GAL4 driver. (e-h) PLA conducted in B-LCL 10151 from an HLA-B*27:05/B*15 AS patient with w6/32 and either anti-CD45 (negative control) (e, g) or anti-ALK2 Abs (f, h). c, d, g and h are zoomed in details of boxed areas from a, b, e and f, respectively. (i-j) PLA conducted on B-LCLs 9435 from an HLA-B*7/B*44 healthy

control (i) or 6370 from an HLA-B*27:05/B*44 AS patient (j) with ME1 and anti-ALK2 antibodies. (k) Average number of PLA staining dots/cell showing an interaction between ALK2 and HLA-A/B/C (ALK2-w6/32) or HLA-B*27/B*7/B*22 (ALK2-ME1) in B-LCLs from 3 controls and 3 AS patients. No signal was detected with ALK2, ME1 or w6/32 antibodies alone. Ten random 40x images per condition were acquired using the DAPI (grey nuclei) and Cy5 (white PLA signals) filters. ****: $p < 0.001$ (two-way ANOVA with Bonferroni's multiple-comparisons test).

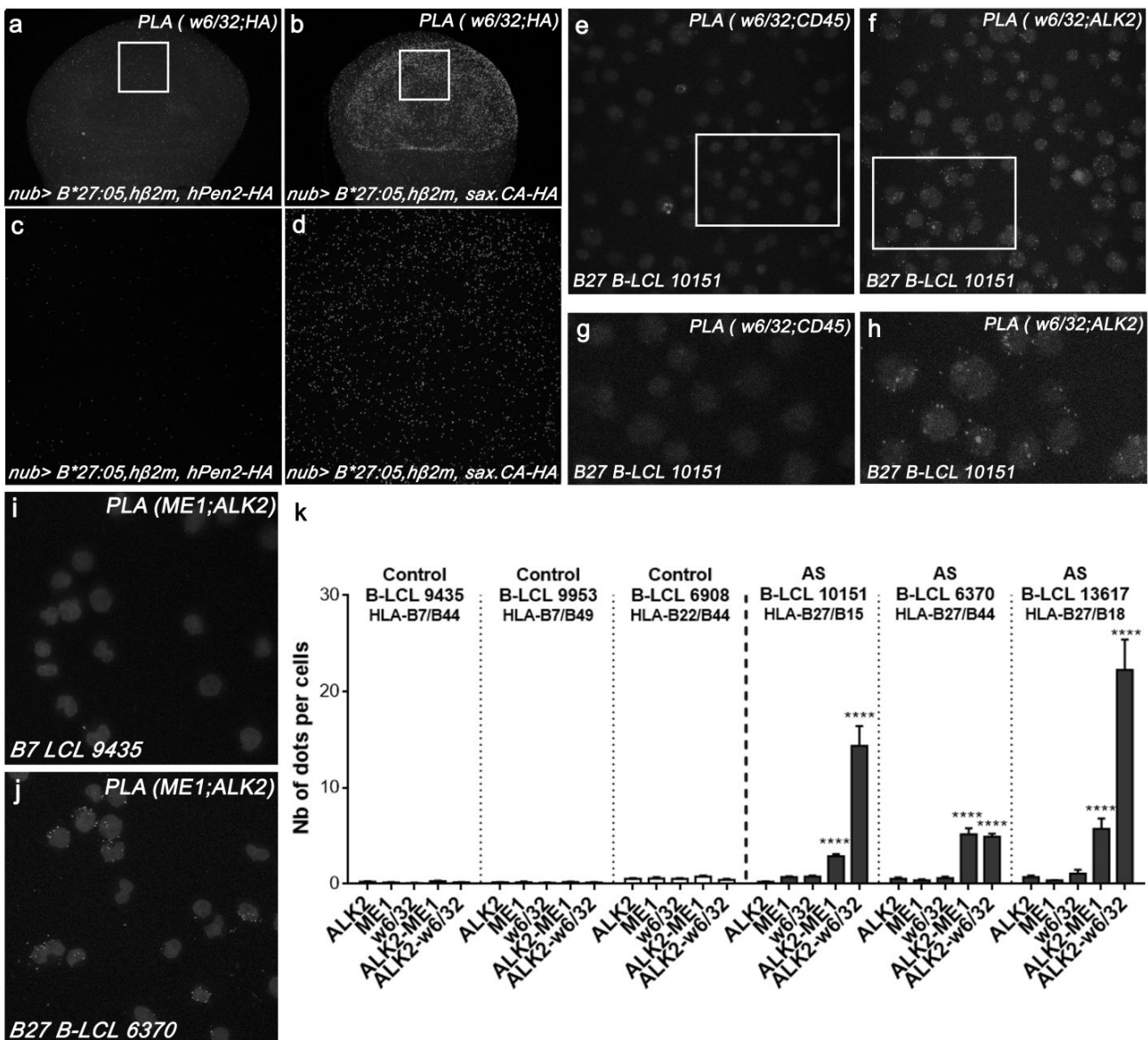
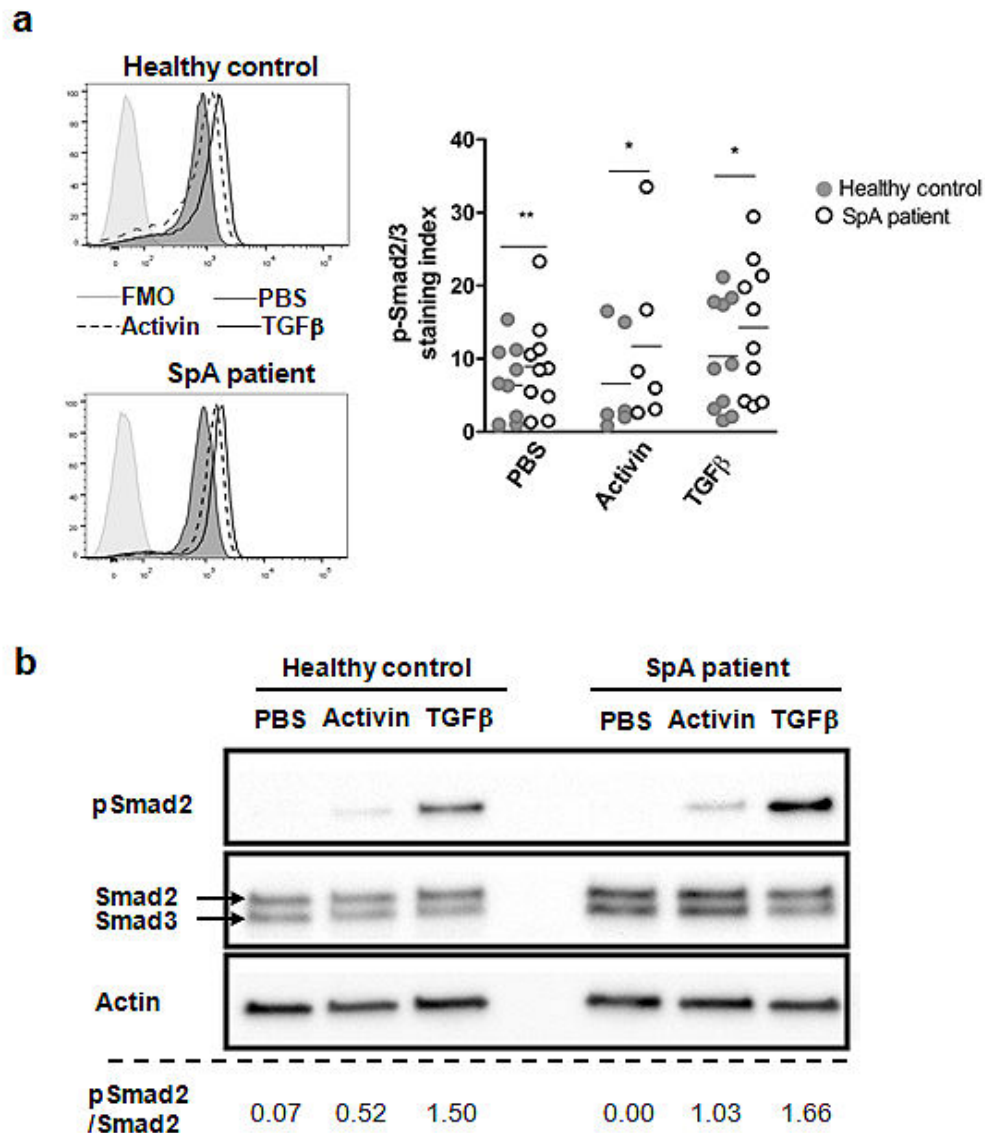


Fig. 4 p-Smad2/3 is increased in immune cells from HLA-B27+ SpA patients in response to Activin A or TGF β . (a) Intracellular p-Smad2/3 was quantified in T cells from paired HLA-B27+ SpA patients and HLA-B27 negative healthy controls, after exposure to PBS, Activin A or TGF β . Left: representative expression histograms. Right: scatter graph of staining index calculated as the ratio between samples and FMO. Horizontal bars show the

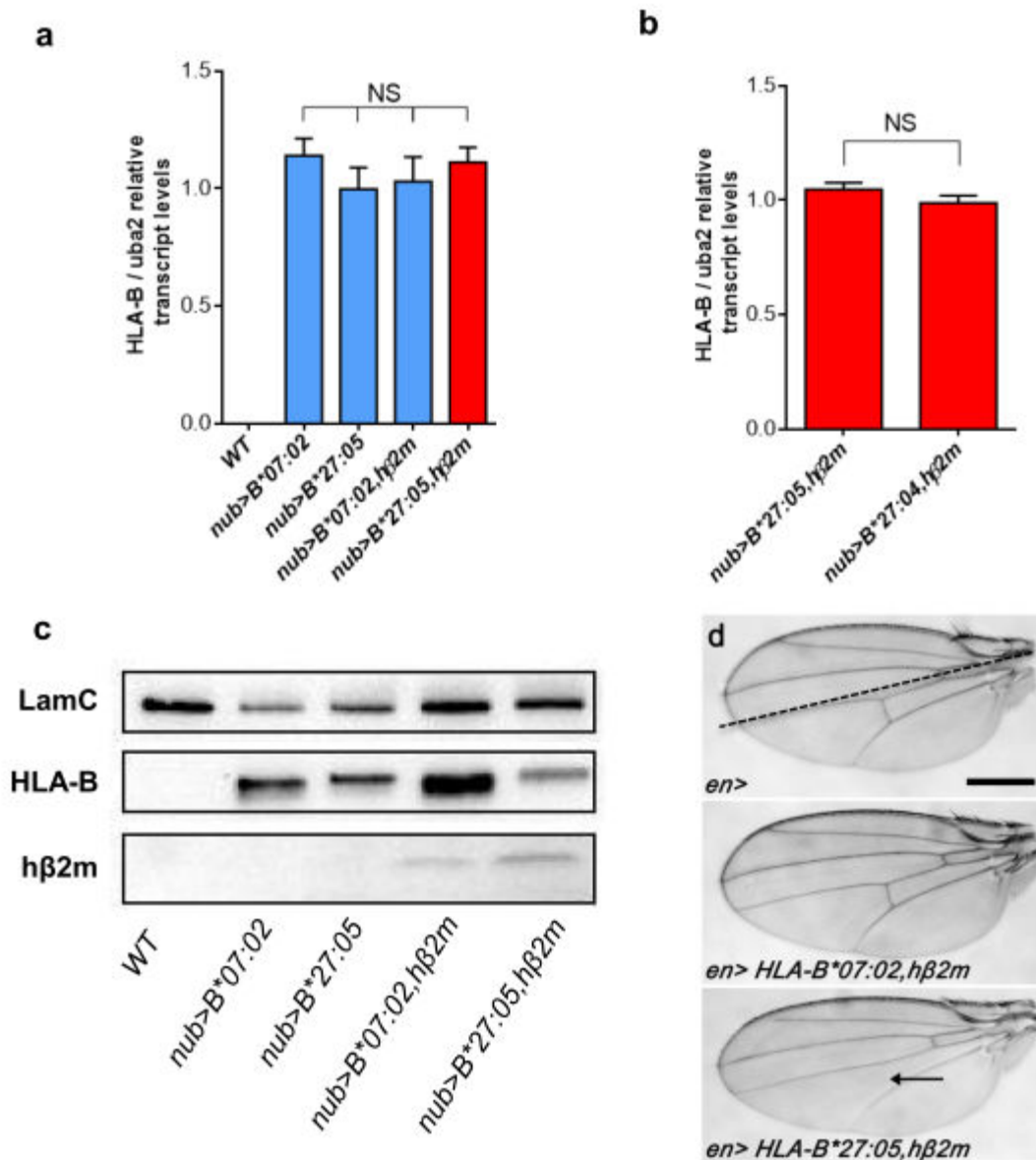
mean values (6-10 independent experiments; *P \leq 0.05, **P = 0.005). (b) Western blot showing p-Smad2, Smad2 and Smad3 in CD14- PBMC from HLA-B27 negative control and HLA-B27+ SpA. Values beneath the blots indicate the relative intensity of p-Smad2/Smad2 bands (representative of 3 independent experiments).



Extended Data

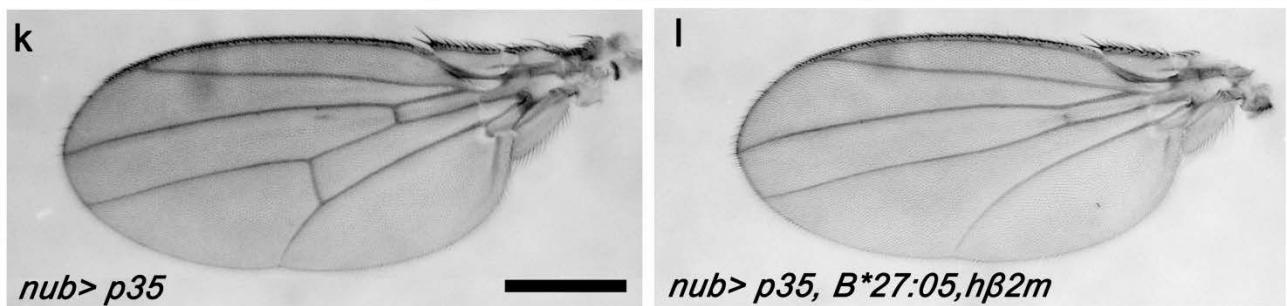
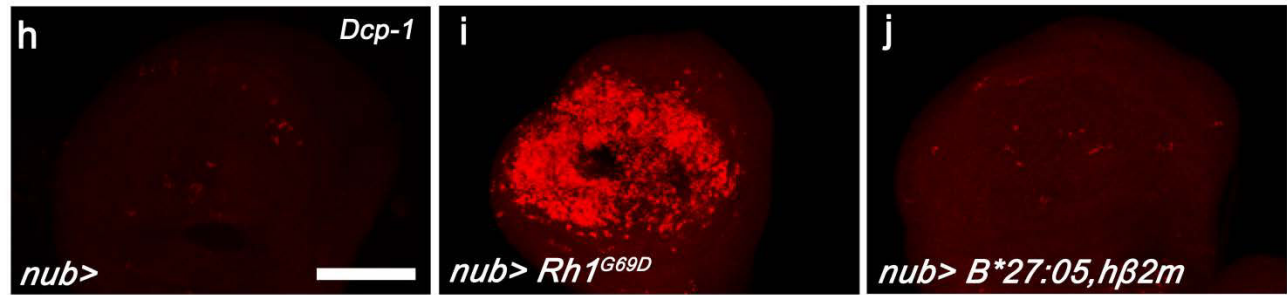
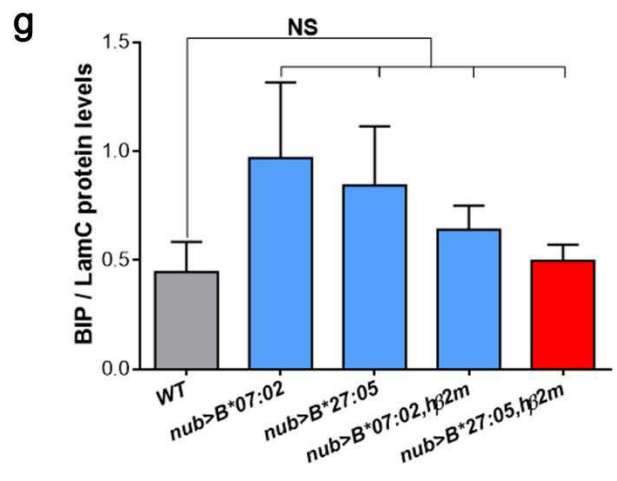
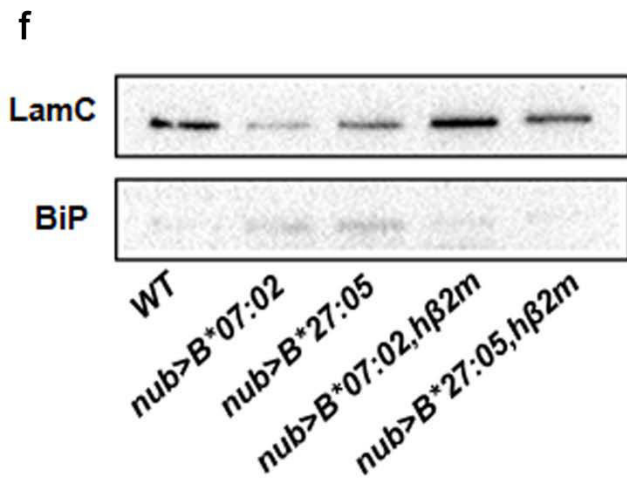
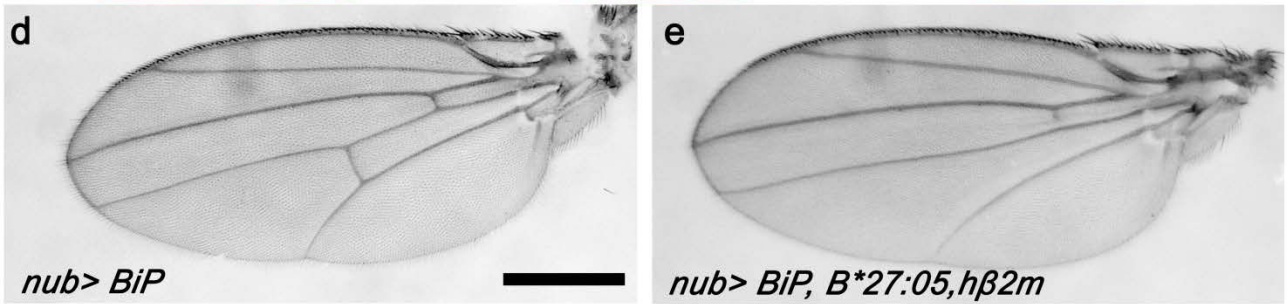
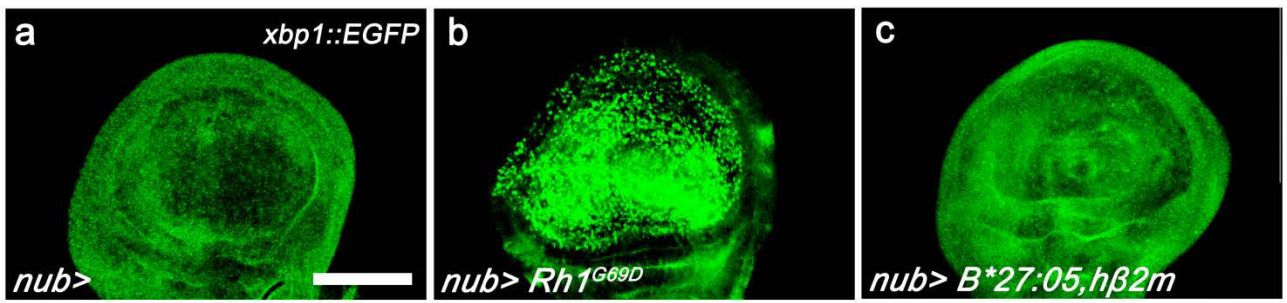
Extended Data Fig. 1 Expression of *HLA-B* transgenes. (a, b) Levels of *HLA-B* transcripts driven by *nub-GAL4* in the wing imaginal disc for different genotypes, relative to *uba2* transcript levels. Graphs show the mean \pm SEM of three independent experiments. NS: not significantly different (one-way ANOVA (a) and Student's t-test (b)). Red bars indicate flies expressing both an AS-associated *HLA-B* allele and *h β 2m*. (c) Western-blot showing the *HLA-B**07:02 and *HLA-B**27:05 heavy chains at 44-45 kDa (HC-10 antibody) and the *h β 2m* light

chain at 12 kDa (BBM1 antibody) in transgenic third instar imaginal wing discs. Lamin-C (LamC) was used as a loading control. (d) *en-GAL4* was used to drive transgenes expression in the posterior compartment of *Drosophila* wing tissue. Scale bar: 200 μ m. The antero-posterior frontier is indicated by a dotted line. Co-expression of *HLA-B**07:02 and *h β 2m* was associated with normal wing aspect. Co-expression of *HLA-B**27:05 and *h β 2m* resulted in posterior crossveinless phenotype (arrow).



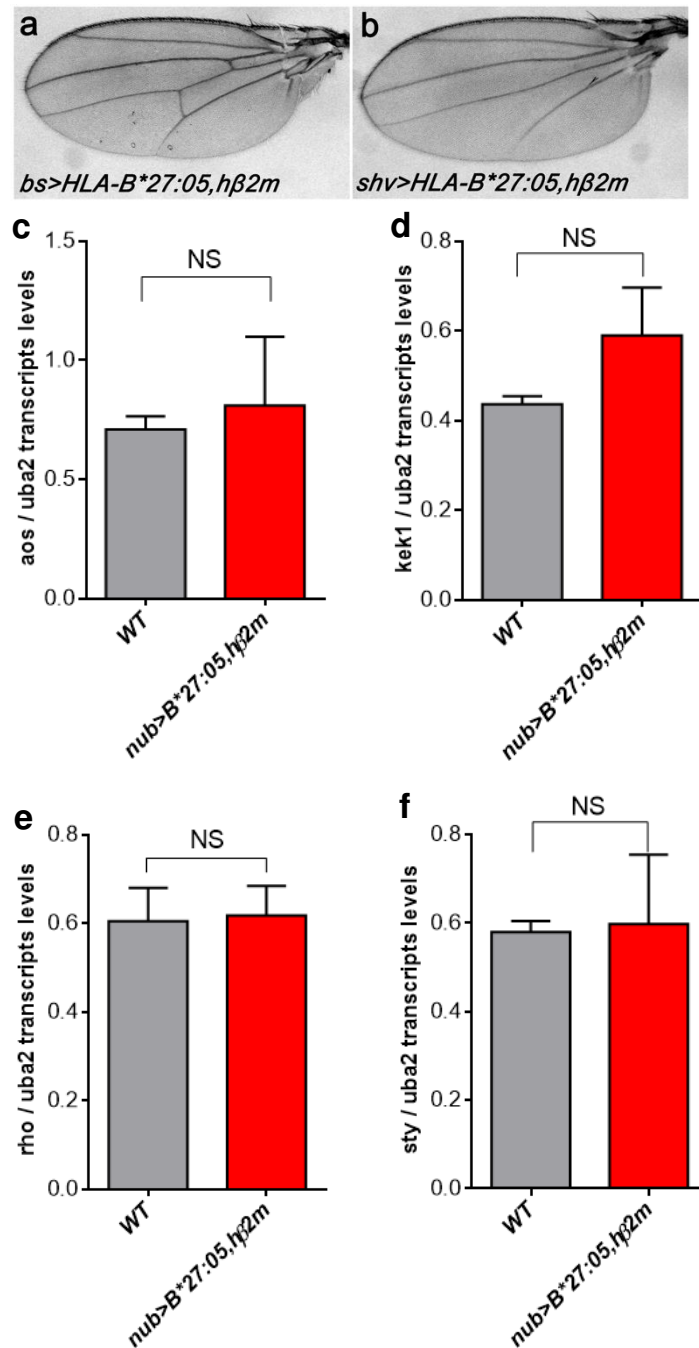
Extended Data Fig. 2 The HLA-B27-induced crossveinless wing phenotype is neither associated with ER stress nor with cell death. (a-c) Projection from confocal stacks of third-instar larval wing imaginal discs carrying an *xbp1::EGFP* reporter transgene to detect ER-stress-induced UPR activation. Scale bar: 200 μ m. (a) No staining was observed with the negative control (*nub-GAL4/+; xbp1::EGFP/+*). (b) Co-expression of a *rhodopsin-1* mutant gene encoding an aggregation-prone protein was used as a positive control for UPR induction evidenced by dotted staining (*nub-GAL4/+; xbp1::EGFP/UAS-Rh-1^{G69D}*). (c) No staining was observed when *HLA-B*27:05* was co-expressed with *h β 2m* (*nub-GAL4/+; xbp1::EGFP/UAS-HLA-B*27:05,UAS-h β 2m*). (d-e) Overexpression of the ER chaperone *Binding immunoglobulin protein (BiP)*, aka *Hsc70-3* in *Drosophila* does not suppress the *HLA-B*27:05/h β 2m*-induced crossveinless phenotype (*nub-GAL4/UAS-BiP* and *nub-GAL4/UAS-BiP; UAS-HLA-B*27:05,UAS-h β 2m/+*).

(f) Detection of BiP in the wing imaginal disc by Western-blot as an ER stress marker. Lamin C (LamC) was used as a loading control. (g) Quantification of BiP relative to LamC levels in the wing imaginal discs. Each bar represents the mean \pm SEM of three independent experiments. NS: no significant difference (one way ANOVA). The red bar indicates flies expressing both AS-associated *HLA-B27* allele and *h β 2m*. (h-j) Cell death was detected in third-instar larval wing imaginal discs by immunostaining with anti-activated Death caspase-1 (Dcp-1; red). Scale bar: 200 μ m. Genotypes are: (h) *nub-GAL4/+* (negative control); (i) *nub-GAL4/+; UAS-Rh-1^{G69D}/+* (positive control); (j) *nub-GAL4/+; UAS-HLA-B*27:05,UAS-h β 2m/+*. (k-l) The anti-apoptotic baculovirus p35 protein does not suppress the *HLA-B*27:05/h β 2m*-induced crossveinless phenotype in adult fly wings. Scale bar: 200 μ m. Genotypes are: (k) *nub-GAL4/UAS-p35* and (l) *nub-GAL4/UAS-p35; UAS-HLA-B*27:05,UAS-h β 2m/+*.



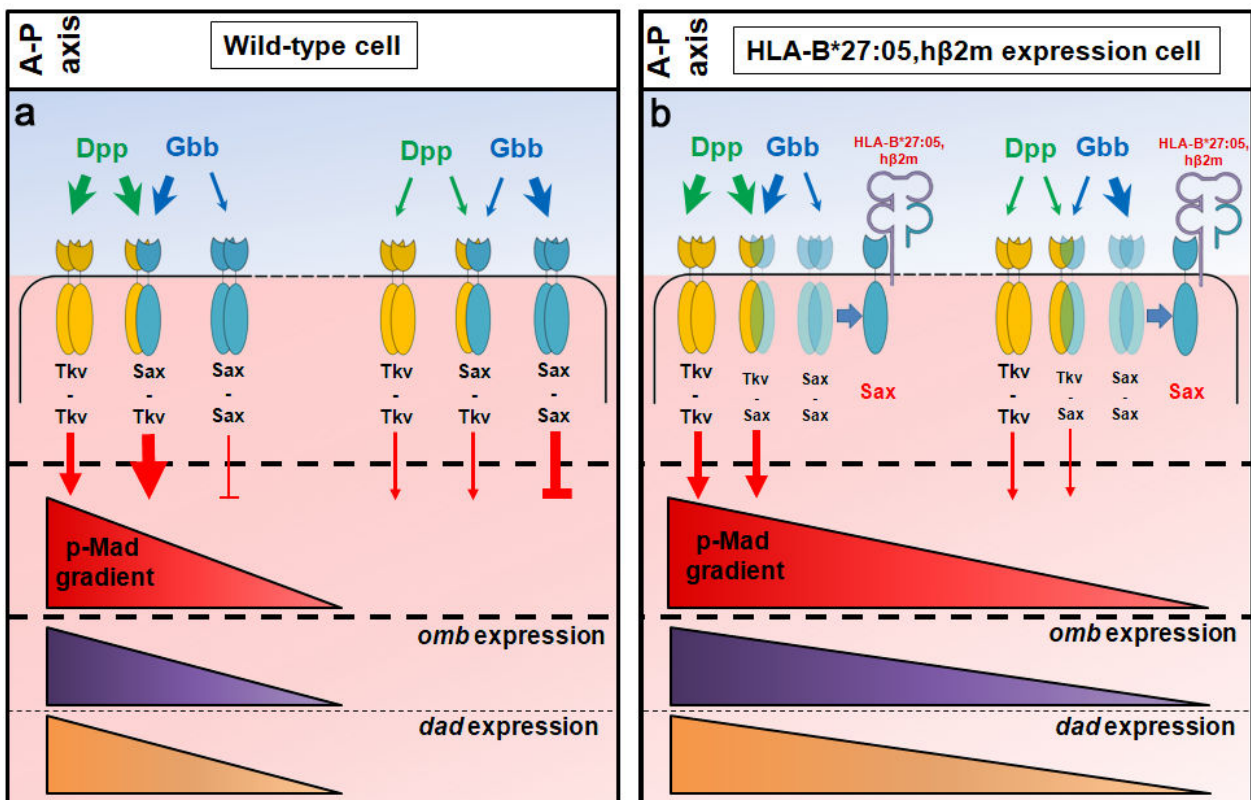
Extended Data Fig. 3 HLA-B27:05/h β 2m-wing-phenotype is not associated with alteration of Notch or EGF signaling. (a) *bs-GAL4*-driven *HLA-B*27:05,h β 2m* expression in wing intervein cells where Notch signaling is activated and required to prevent ectopic vein formation, does not lead to any wing phenotype. (b) *shv^{3kpm}*-*GAL4*-driven *HLA-B*27:05,h β 2m* expression in wing vein cells resulted

in the disappearance of both ACV and PCV. (c-f) Relative quantification of *aos kek1*, *rho* and *sty* EGF-target genes transcripts from wing imaginal discs of *nub-GAL4/+* (grey) or *nub-GAL4/+; UAS-HLA-B*27:05,UAS-h β 2m/+* (red) genotype. Graphs show the mean \pm SEM of three independent experiments. NS: no significant difference by unpaired t-test (Student's t-test).



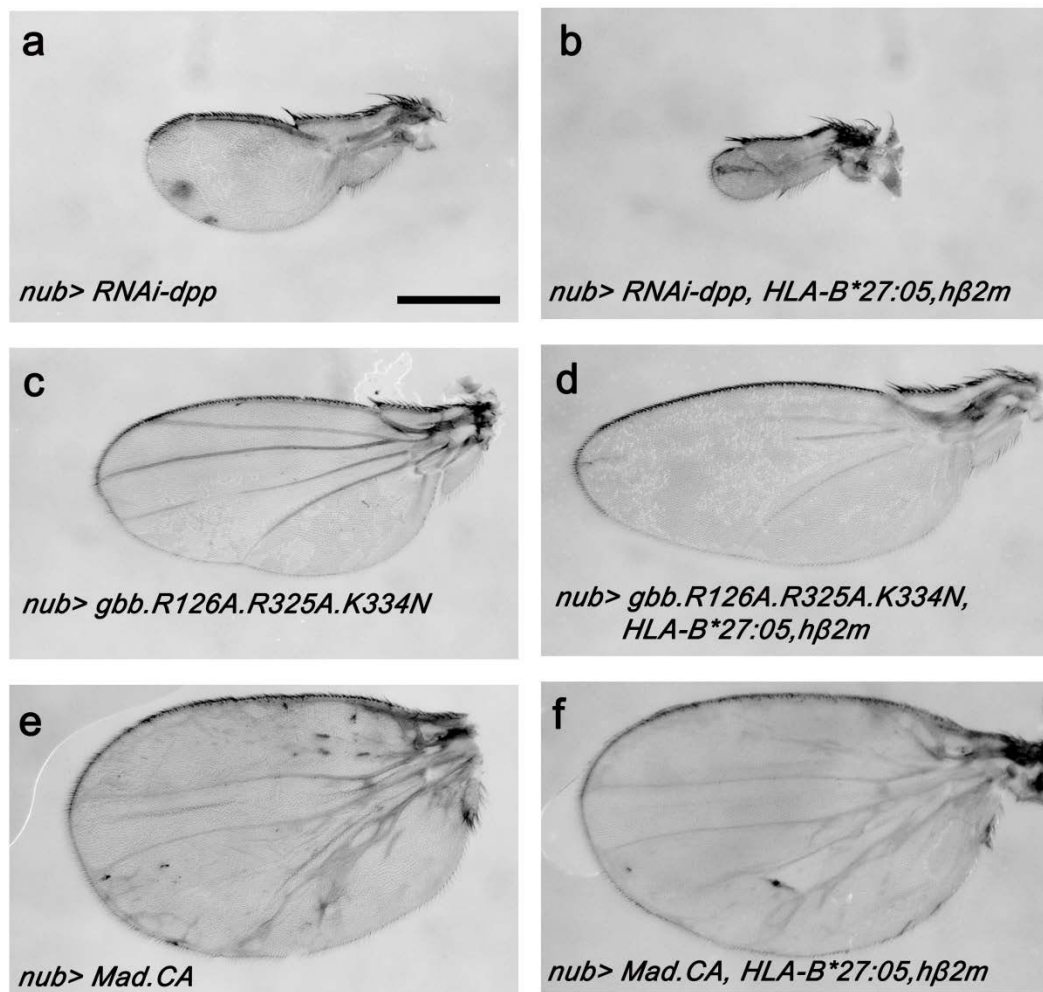
Extended Data Fig. 4 Proposed model of interaction between HLA-B*27:05/h β 2m and the BMP pathway. Representation of *Drosophila* BMP signaling pathway (a) in wild type cells and (b) in HLA-B*27:05/h β 2m-expressing cells of wing imaginal discs. Three different forms of BMP type I receptor dimers exist: Tkv-Tkv and Sax-Sax homodimers, and Tkv-Sax heterodimers. Gbb (blue) and Dpp (green) ligands of the BMP pathway show distinct binding preferences. Thicker arrows indicate preponderant signaling because of ligand and receptor availability as well as affinity differences. Cells close to the antero-posterior frontier (A-P axis) are on the left, cells on the right represent cells distant from the frontier. (a) The Tkv-Sax heterodimeric receptor is the main complex that

mediates BMP signaling. Tkv-Tkv homodimers also activate BMP signaling but weaker. Sax-Sax homodimers do not activate BMP signaling but limit the range of Gbb diffusion toward the A-P axis, restricting p-Mad gradient from the A-P frontier. *omb* (purple) and *dad* (orange) are target genes of BMP signaling. (b) Ectopic HLA-B*27:05/h β 2m in the wing pouch induces a widening of p-Mad gradient, resulting in an increase of *omb* and *dad* expressing cells. HLA-B*27:05/h β 2m is shown to interact with Sax, which may reduce Sax-Sax homodimer and Tkv-Sax heterodimer formation (pale blue Sax). Sax receptor sequestration by HLA-B*27:05/h β 2m would result in an expansion of the Gbb gradient, disrupting BMP signaling.



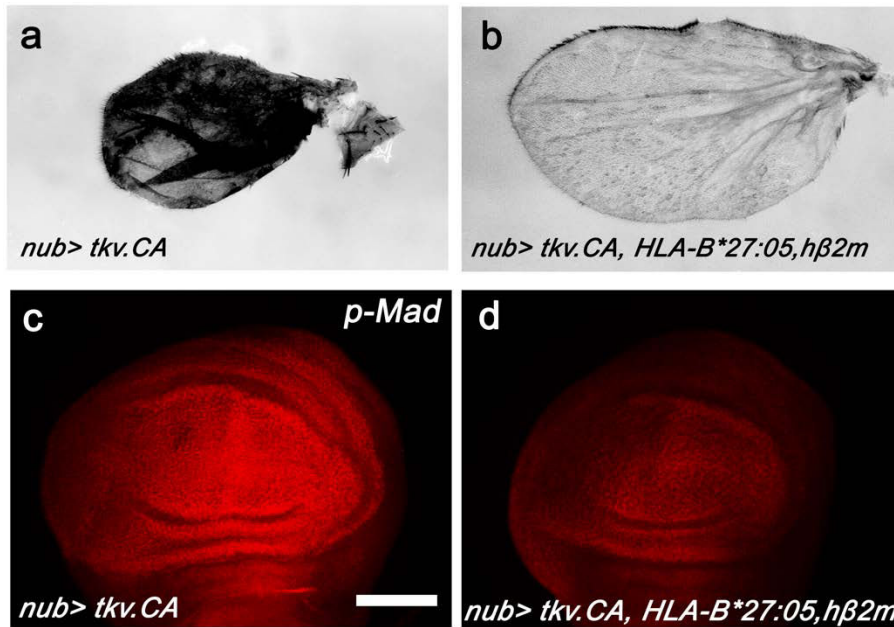
Extended Data Fig. 5 HLA-B27:05/h β 2m affects BMP signaling in *Drosophila* wing. (a) Depletion of Dpp results in a reduction of wing size and the absence of wing venation (*nub/+; UAS-RNAi-dpp/+*). Scale bar: 200 μ m. (b) Genetic interaction with HLA-B*27:05/h β 2m worsens Dpp-depletion phenotype (*nub/+; UAS-RNAi-dpp/UAS-HLA-B*27:05,UAS-h β 2m*). (c) Overexpression of a loss-of-function mutant targeting the cleavage site of *gbb* induces a crossveinless phenotype and a partial loss of

posterior longitudinal veins (*nub/+; UAS-gbb.R126A.R325A.K334N/+*). (d) Genetic interaction with HLA-B*27:05/h β 2m further deletes the longitudinal wing veins (*nub/+; UAS-gbb.R126A.R325A.K334N/UAS-HLA-B*27:05,UAS-h β 2m*). (e) Overexpression of a constitutively active form of Mad induces extravein formation (*nub/+; UAS-Mad.CA/+*). (f) HLA-B*27:05/h β 2m does not significantly modify the extravein phenotype (*nub/+; UAS-Mad.CA/UAS-HLA-B*27:05,UAS-h β 2m*).

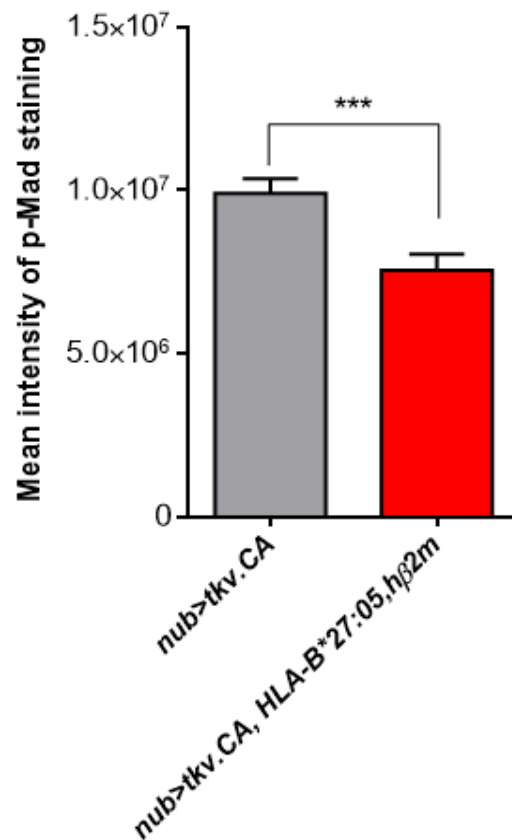


Extended Data Fig. 6 HLA-B*27:05/h β 2m suppresses phenotypes induced by a constitutively active Tkv receptor. (a) Overexpression of a constitutively active form of Tkv results in a blistered and pigmented adult wing (*nub/+; UAS-tkv.CA/+*). (b) Genetic interaction with HLA-B*27:05/h β 2m attenuates the *tkv.CA* phenotype (*nub/+; UAS-*

*tkv.CA/UAS-HLA-B*27:05,UAS-h β 2m*). (c-d) Immunostaining with anti-p-Mad in wing imaginal discs of the foregoing genotypes. Scale bar: 200 μ m. (e) Quantification of p-Mad intensity in the previous genotypes. The graph represents mean \pm SEM (n=43 and n=42 wings discs, respectively). ***: p<0.001, Student's t-test.

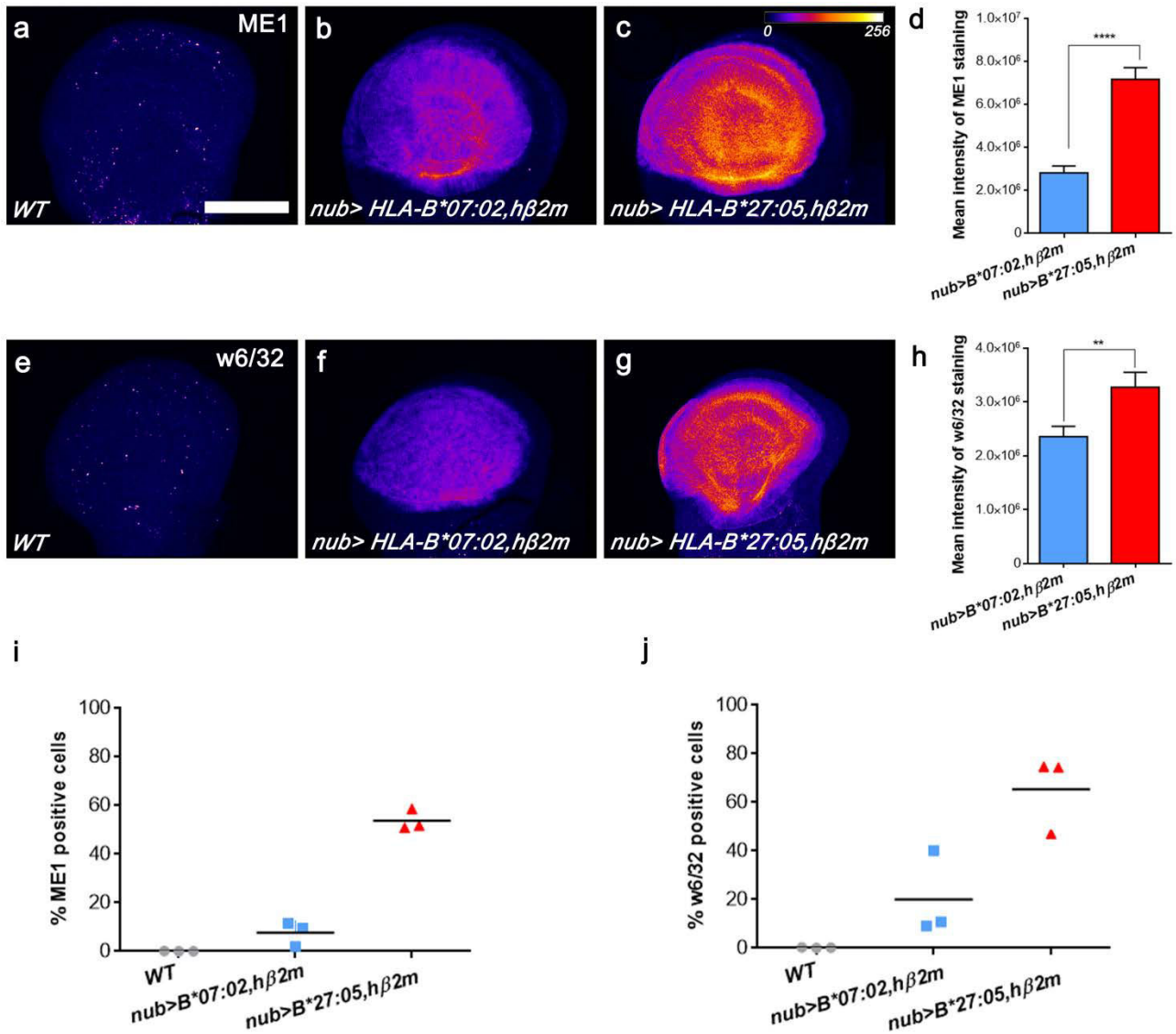


e



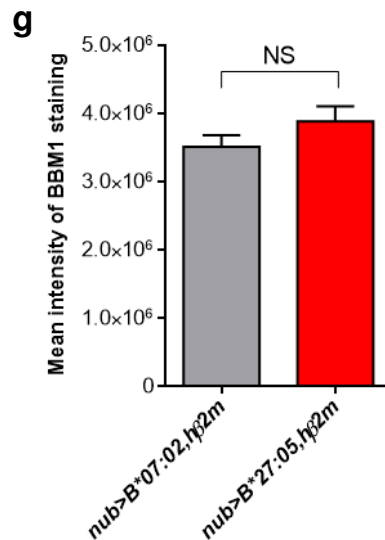
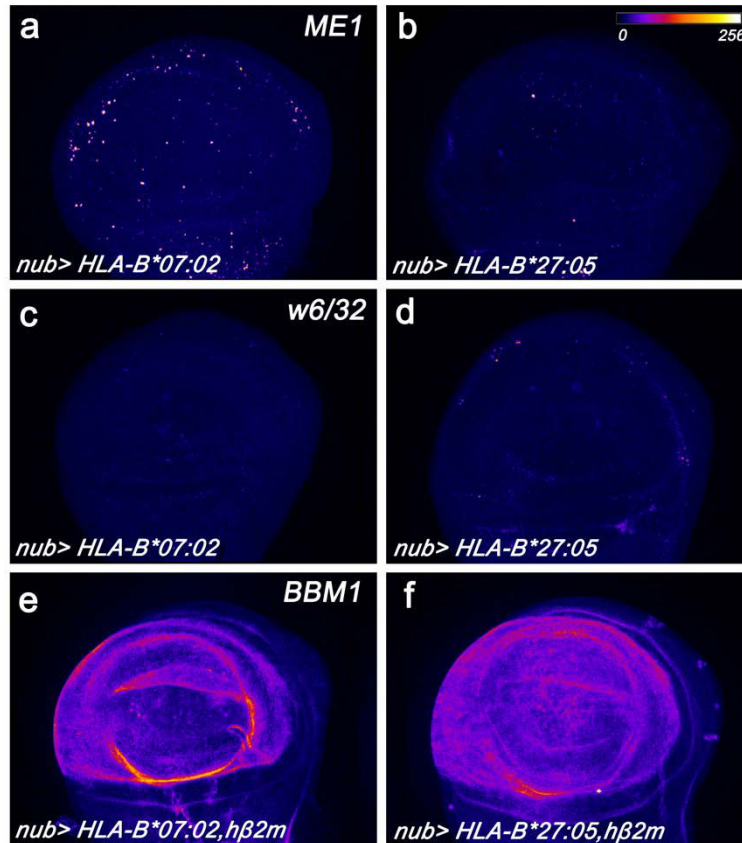
Extended Data Fig. 7 HLA-B*27:05 better folds and localizes to the plasma membrane than HLA-B*07:02. (a-c, e-g) Projections from confocal stacks of third-instar larval wing imaginal discs immunostained with ME1 (a-c) or w6/32 (e-g) anti-HLA-B mAbs recognizing well-folded HLA-Bs in (a, e) wild-type (WT) condition, (b, f) *nub-GAL4/+; UAS-HLA-B*07:02,UAS-hβ2m/+*, and (c, g) *nub-GAL4/+; UAS-HLA-B*27:05,UAS-hβ2m/+* genotypes. Fire LUT was used to indicate staining

intensity. Scale bar: 200 μm (d, h) Mean fluorescence intensity of ME1 or w6/32 immunostaining. Error bars represent the SEM (n=30 for HLA-B*07:02/hβ2m and n=35 for HLA-B*27:05/hβ2m). ***: p<0.001, **: p<0.01 (Student's t-test) (ME1: Cohen's d=1.61 and w6/32: Cohen's d=0.82). (i-j) Percentages of wing imaginal disc cells with well-folded HLA-B, detected with (i) ME1 or (j) w6/32, on their surface by FACS (n=3).



Extended Data Fig. 8 HLA-B does not properly fold in the absence of h β 2m in *Drosophila* and h β 2m levels are not affected by the HLA-B type. Projections from confocal stacks of third-instar larval wing imaginal discs. Immunostaining with (a-b) ME1 or (c-d) w6/32 anti-HLA-B mAbs recognizing well-folded HLA-Bs in (a, c) *nub/+; UAS-B*07:02/+* and (b, d) *nub/+; UAS-B*27:05/+* genotypes. (e-f) Immunostaining with the BBM1

anti-h β 2m antibody in (e) *nub/+; UAS-B*07:02, UAS-h β 2m/+* and in (f) *nub/+; UAS-B*27:05, UAS-h β 2m/+* genotypes. Fire LUT was used to indicate staining intensity. (g) Mean fluorescence intensity of BBM1 immunostaining. Error bars represent the SEM (n=26 for HLA-B*07:02/h β 2m and n=22 for HLA-B*27:05/h β 2m) (Student's t-test). NS: no significant difference.



Extended Data Table 1. Characteristics of SpA patients and healthy controls included in the p-Smad2/3 analysis by flow cytometry.

	SpA (N = 10)	Control (N = 10)
Age in years (mean \pm SD)	52 \pm 2.7	52 \pm 4
Gender (Men/Women)	5/5	6/4
HLA-B27+ (%)	100	0
Disease duration in years (mean \pm SD)	52 \pm 2.7	N/A
SpA phenotype*		
AS (n)	8	0
Non-radiographic axial SpA (n)	2	0
BASDAI (mean \pm SD)	2.96 \pm 2.1	N/A
Treatment		
NSAID (n)	4	0
Anti-TNF (n)	3	0
None (n)	4	10

* All the SpA patients fulfilled the Assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria for axial SpA ⁴⁷; AS patients also fulfilled the modified New York classification criteria ⁴⁸; non-radiographic axial SpA patients had no definite radiographic sacro-iliitis on antero-posterior pelvic radiograph.

BASDAI: Bath AS Disease Activity Index ⁴⁹; NSAID: non-steroidal anti-inflammatory drug

Introduction

Résultats

"We can do genetics. We can do experiments on fruit flies. We can do experiments on yeast. It's not so easy to do experiments on humans. So, in fact, it helps us, to interpret our own genetic code, to have the genetic code of the other species."

Craig Venter

Résultats complémentaires

Discussion

Annexes

Références bibliographiques

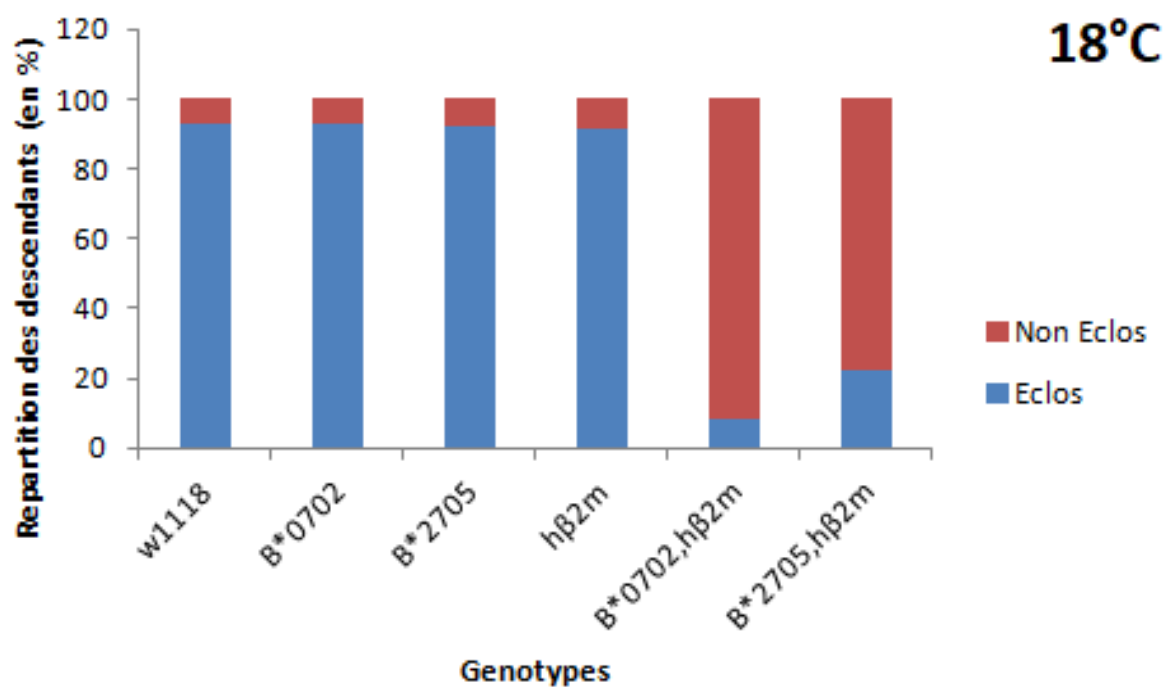
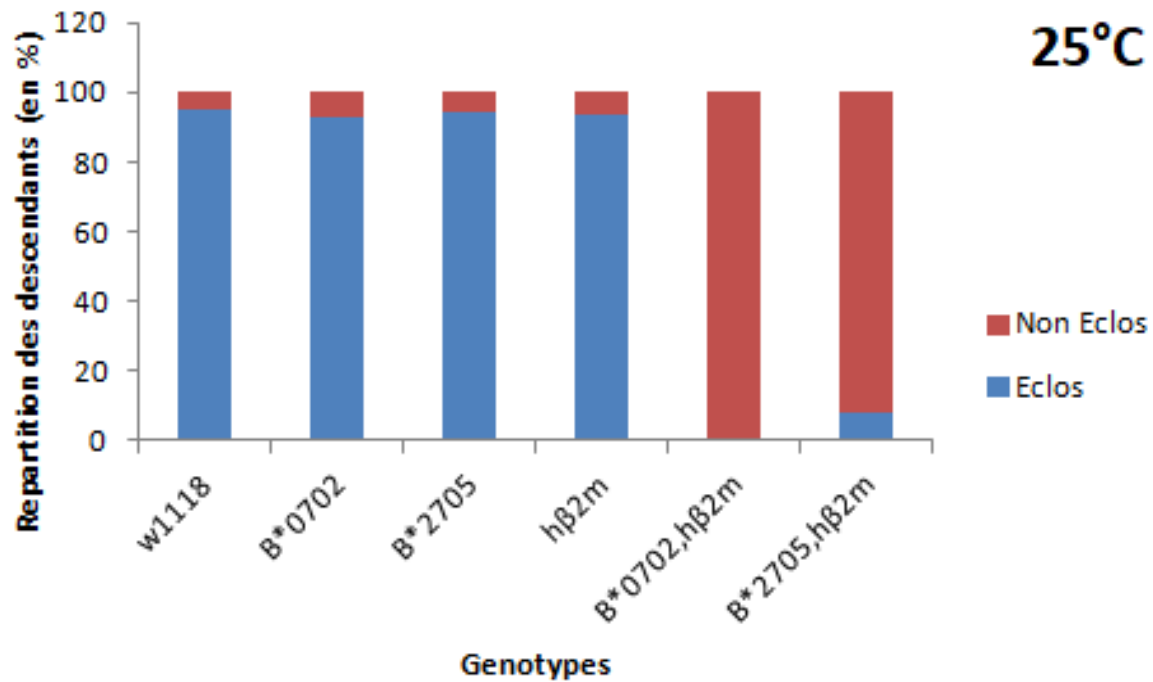


Figure 21 : Estimation du pourcentage de mort pupale en fonction de l'expression des différents transgènes par le pilote ubiquitaire *daughterless*.

Pour chaque génotype, dix mouches femelles exprimant le pilote *da-Gal4* ont été croisées avec 5 mouches mâles. Un comptage des pupes formées dans chaque tube, et des pupes écloses a été réalisé. Deux expériences indépendantes ont été effectuées pour chaque génotype. L'expérience a été menée à 25°C (en haut) et à 18°C (en bas).

Résultats complémentaires

I. Expression des différents transgènes avec un pilote ubiquitaire

Dans l'objectif de mieux caractériser l'effet de l'expression des transgènes HLA-B dans le modèle drosophile, l'une des premières expériences a consisté à la recherche d'un phénotype spécifique et caractérisable. Pour cela, nous avons exprimé nos différents transgènes dans l'ensemble des cellules de la drosophile par le biais d'un pilote Gal4 ubiquitaire, *daughterless (da)*. Nos premières observations furent que l'expression des transgènes *HLA-B*0702*, *HLA-B*2705*, ou *hβ2m* ne provoquait pas de phénotype visible. Cependant, la co-expression des transgènes *HLA-B*0702* et *hβ2m* ou *HLA-B*2705* et *hβ2m* provoquait une forte létalité. Une différence notable était que la co-expression du transgène non-associé à la SpA *HLA-B*0702* avec *hβ2m* présentait une létalité plus précoce comparée à la co-expression du transgène associé à la SpA *HLA-B*2705* avec *hβ2m*. En effet, l'expression de *HLA-B*0702* en présence de *hβ2m*, conduit à une létalité larvaire, tandis que l'expression de *HLA-B*2705* en présence de *hβ2m*, entraîne une létalité pupale [Figure 21]. Ces résultats furent confirmés en testant plusieurs lignées transgéniques indépendantes.

Dans l'objectif d'obtenir des descendants viables jusqu'au stade adulte et observer des phénotypes plus facilement caractérisables, nous avons tiré avantage de la sensibilité à la température du système d'expression UAS-Gal4. La réduction à 18°C de la température d'élevage, réduisant l'expression des transgènes, a permis d'obtenir quelques descendants [Figure 21]. De manière intéressante, la co-expression de *HLA-B*0702* et *hβ2m* n'entraînait aucun phénotype visible chez l'adulte, tandis que la co-expression de *HLA-B*2705* et *hβ2m* provoquait une perte des veines transversales antérieures et postérieures de l'aile. Afin de pallier cette létalité et de confirmer ces résultats, j'ai placé les différents transgènes sous contrôle d'autres pilotes spécifiques de l'aile, tels que *engrailed-Gal4* et *nubbin-Gal4*. Le même phénotype de perte des veines transversales est observé dans le domaine d'expression de ces pilotes sans létalité remarquable.

Ces résultats indiquent que la synthèse ubiquitaire de la forme non-associée à la SpA, *HLA-B*0702*,*hβ2m*, provoque un phénotype généralement considéré comme plus fort (une létalité plus précoce) que la forme non-associée à la SpA, *HLA-B*2705*,*hβ2m*. Ces résultats suggèrent que *HLA-B*0702* associé à *hβ2m* pourrait perturber le développement de la drosophile. Plusieurs hypothèses peuvent ainsi être émises. Par exemple, il a été observé que *HLA-B*2705*,*hβ2m* se replie mieux que *HLA-B*0702*,*hβ2m* dans le tissu d'aile. On peut supposer que dans certains tissus, l'accumulation de forme mal-repliée de *HLA-B*0702*, pourrait engendrer un stress du RE, provoquant une perturbation de l'homéostasie tissulaire. Néanmoins, nos résultats dans l'aile ne semblent pas en accord avec cette hypothèse. Il est également possible que *HLA-B*0702* interagisse spécifiquement avec certaines protéines cellulaires, ce qui provoquerait la mort au stade larvaire.

Des expériences plus poussées doivent être menées pour mieux comprendre l'effet de l'expression de ce transgène dans le modèle drosophile.

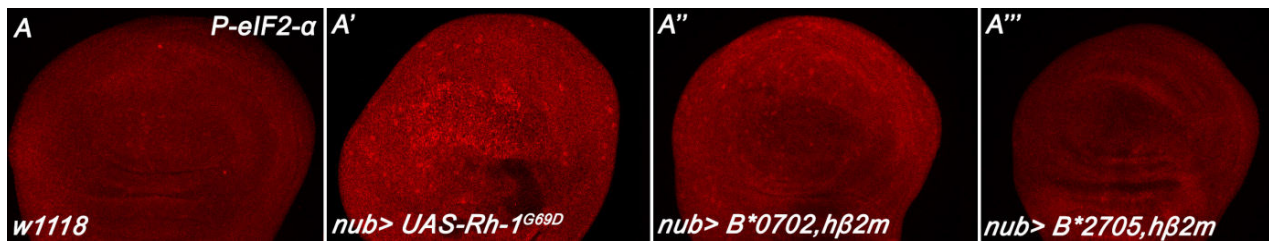


Figure 22 : Les protéines HLA-B n'activent pas significativement le senseur PERK de l'UPR.

Détection de la phosphorylation de eIF2- α par immunofluorescence sur les disques imaginaux d'aile de larves de troisième stade. (A) Contrôle négatif : souche contrôle de fond génétique Canton S w^{1118} . (A') Contrôle positif $nub-Gal4/+ ; UAS-Rh-1^{G69D}/+$. (A'') $nub-Gal4/+ ; UAS-B*0702, UAS-h\beta 2m/+$. (A''') $nub-Gal4/+ ; UAS-B*2705, UAS-h\beta 2m/+$.

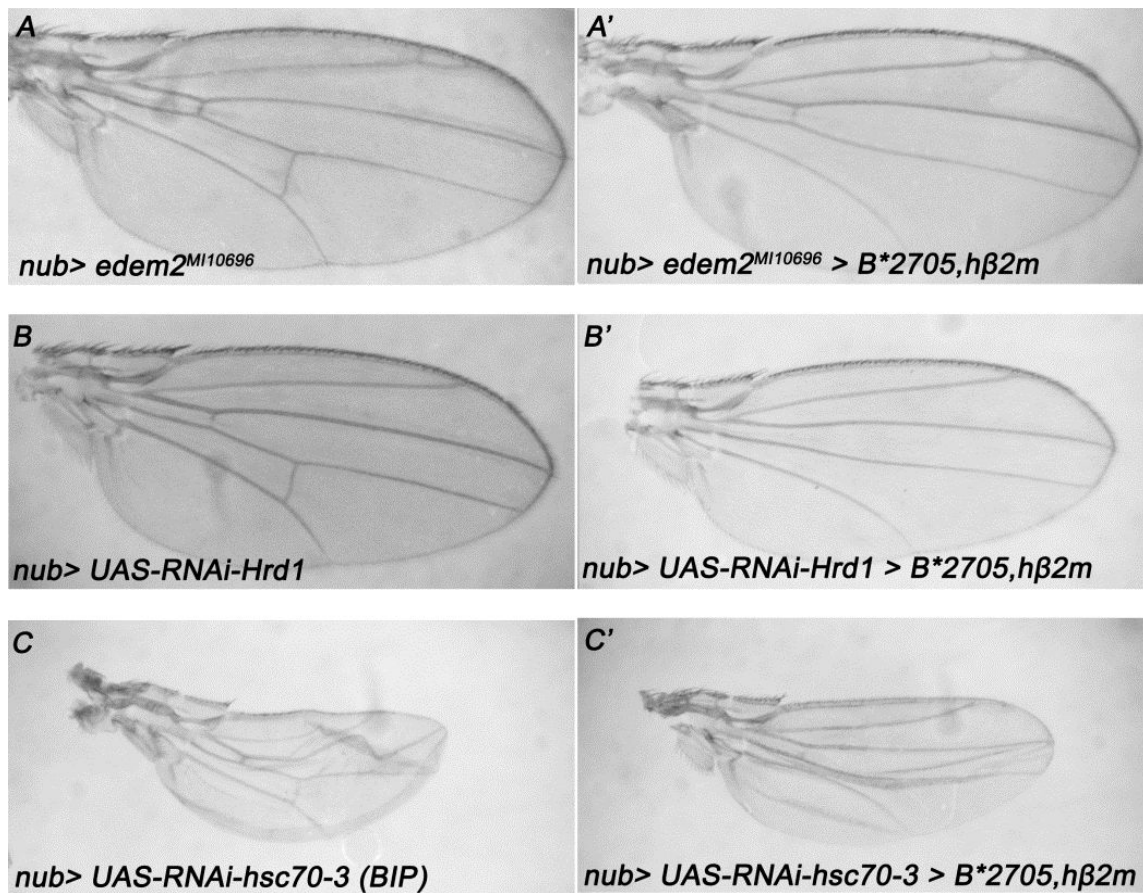


Figure 23 : Le phénotype associé à la co-expression de HLA-B*2705 et hβ2m n'est pas sensible à une perturbation du processus de dégradation des protéines mal conformées.

Test d'interaction génétique entre HLA-B*2705, hβ2m et les composants de l'ERAD et BiP. (A) $nub-Gal4/+ ; edem2^{MI10696}/+$. (A') $nub-Gal4/+ ; edem2^{MI10696} / UAS-B*2705, UAS-h\beta 2m$. (B) $nub-Gal4/+ ; UAS-RNAi-hrd1/+$. (B') $nub-Gal4/+ ; UAS-RNAi-hrd1 / UAS-B*2705, UAS-h\beta 2m$. (C) $nub-Gal4/+ ; UAS-RNAi-hsc70-3/+$. (C') $nub-Gal4/+ ; UAS-RNAi-hsc70-3 / UAS-B*2705, UAS-h\beta 2m$.

II. La co-expression d'HLA-B*2705 et d'hβ2m est-elle la source d'un stress du RE ou des mitochondries ?

A. Le stress du RE et la voie ERAD

Comme décrit dans notre article [326], nous avons pu observer que le phénotype *crossveinless* observé lors de la co-expression de *HLA-B*2705* et *hβ2m* dans le tissu d'aile, n'était pas dû à un stress du RE ; l'expression de nos transgènes n'induit pas l'activation de la branche IRE1 de l'UPR, normalement détectée par le biais du rapporteur *Xbp1::EGFP*. D'autres expériences, présentées ci-dessous, confirment que l'UPR n'est pas activée suite à l'expression des transgènes. Nous avons testé l'activation d'un autre senseur de l'UPR : PERK. Lors d'un stress du RE, PERK phosphoryle le facteur d'initiation de la traduction eIF2-α, afin de réduire la traduction générale dans la cellule. Nous avons observé par immunofluorescence que l'expression de nos différents transgènes ne semble pas conduire à une augmentation de la phosphorylation de eIF2-α. Par comparaison, la synthèse ectopique de la Rhodopsine1^{G69D} dans le disque imaginal d'aile, qui sert ici de témoin positif, permet d'observer une forte phosphorylation de eIF2-α **[Figure 22]**.

Par ailleurs, nous avons réalisé des tests d'interaction génétique afin de savoir si un stress du RE pouvait moduler le phénotype *crossveinless*. Parmi les processus clés de la voie UPR, nous nous sommes penchés sur la voie ERAD, qui a pour rôle de dégrader les protéines mal conformées du RE dans le cytosol. L'ERAD fait appel à un complexe multi-protéique, dont les principaux acteurs sont la protéine *ER degradation enhancing alpha-mannosidase-like 2* (Edem2) et la E3 ubiquitine ligase *HMG-CoA Reductase Degradation 1 Homolog* (Hrd1). La déplétion de ces deux facteurs en contexte de co-expression d'*HLA-B*2705* et *hβ2m*, ne semble pas aggraver le phénotype **[Figure 23]**, confirmant ainsi que le phénotype *crossveinless* n'est pas associé à une accumulation de protéines mal-conformées.

Enfin, la déplétion de la chaperonne BiP (Hsc70-3 chez *Drosophila melanogaster*) a été réalisée. BiP est l'une des chaperonnes les plus abondantes du RE. Elle joue un rôle majeur dans le repliement des protéines et le déclenchement de l'UPR. Nous avons observé l'effet d'un ARN interférant dirigé contre les transcrits codant BiP, en contexte de co-expression de *HLA-B*2705* et *hβ2m*. La diminution de la quantité de BiP n'aggrave pas le phénotype dû à la co-expression de *HLA-B*2705* et *hβ2m* **[Figure 22]**.

L'ensemble de ces résultats confirme que le phénotype *crossveinless* induit par la co-expression de *HLA-B*2705* et *hβ2m* n'est pas dû à une accumulation de protéines mal-conformées et à l'induction d'un stress du RE dans le modèle drosophile.

B. HLA-B*2705,hβ2m et stress mitochondrial

Compte tenu du fait que le stress du RE peut engendrer un stress mitochondrial, nous avons voulu tester si la co-expression de *HLA-B*2705* et *hβ2m* induisait une perturbation du réseau mitochondrial. Pour cela, nous avons réalisé des expériences d'immunofluorescence en utilisant un marqueur mitochondrial : mito-GFP **[Figure 24]**. La co-expression de *HLA-B*2705* et *hβ2m* ne semble pas perturber le réseau mitochondrial, renforçant l'idée que le phénotype *crossveinless* n'est associé ni à un stress du RE, ni à un stress mitochondrial.

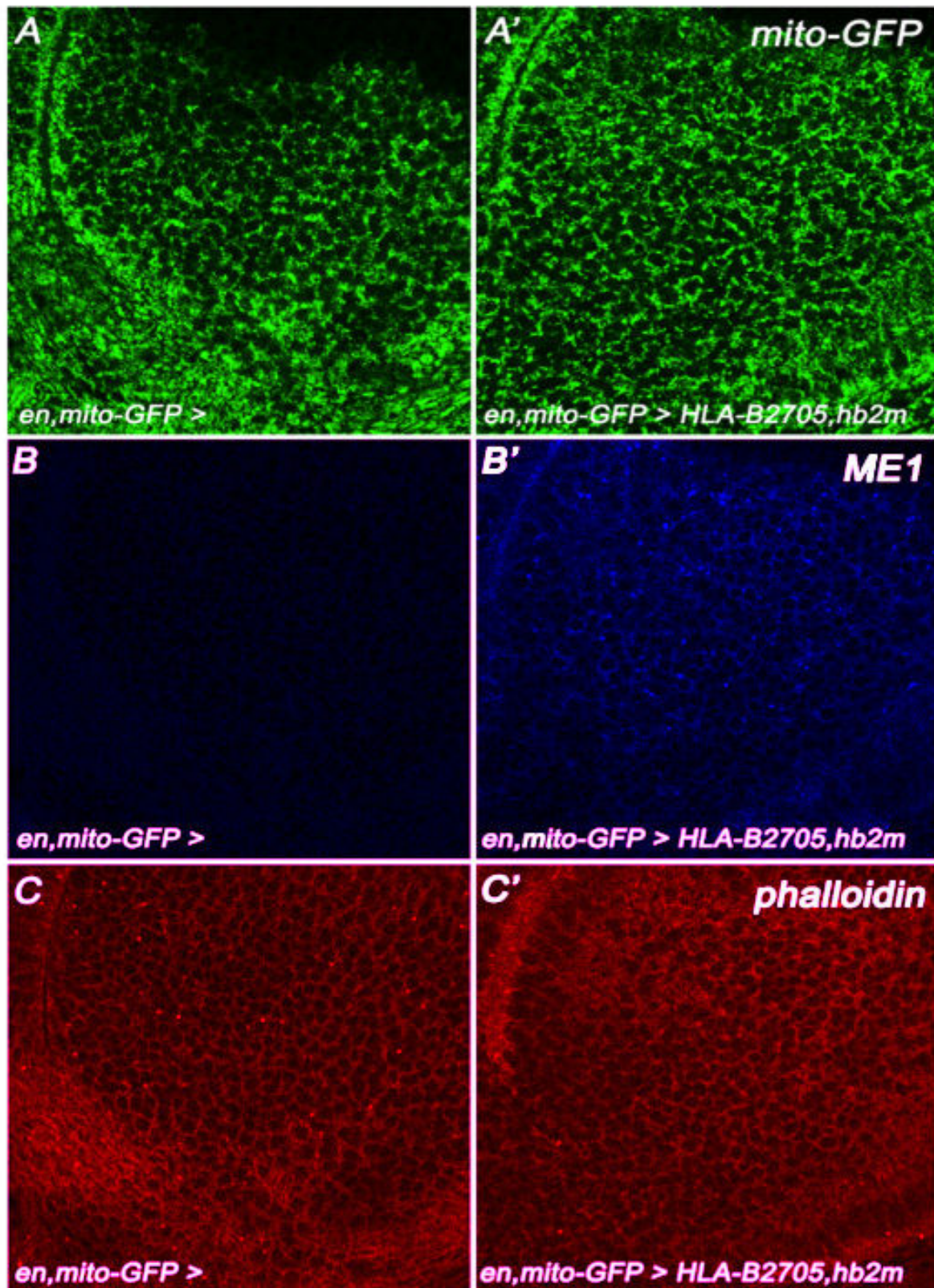


Figure 24 : La co-expression de *HLA-B*2705* et *hb2m* ne modifie pas le réseau mitochondrial dans le disque imaginal d'aile.

Visualisation du réseau mitochondrial avec un rapporteur mito-GFP par immunofluorescence sur les disques imaginaux d'ailes (A et A'). Immunomarquage avec un anticorps ME1 ciblant les complexes bien conformés de HLA-B*2705/h β 2m (B et B'). Immunomarquage de la membrane cellulaire avec un anticorps ciblant la phalloïdine (C et C'). Génotypes : *en-Gal4, UAS-mito-GFP* (A, B et C), et *en-Gal4,UAS-mito-GFP ; UAS-HLA-B*2705,UAS-hb2m* (A', B 'et C').

III. HLA-B27 et la voie de signalisation BMP / TGF- β

A. Tests d'interaction génétique

Comme nous l'avons décrit dans notre article [326], le phénotype *crossveinless* engendré par la co-expression de *HLA-B*2705* et *h β 2m* serait dû à une perturbation de la signalisation BMP. Des tests d'interaction génétique avec différents composants de la signalisation BMP qui n'apparaissent pas dans la publication ont été réalisés. Ces résultats sont présentés dans le [Tableau 5].

De manière cohérente avec les résultats publiés, la co-expression du *HLA-B*2705* et *h β 2m* régule négativement la signalisation BMP. En effet, la déplétion des ligands Dpp et Gbb conduit à un phénotype aggravé lorsque l'on co-exprime *HLA-B*2705, h β 2m*. A l'opposé, la surexpression des gènes codant ces mêmes ligands ou d'un troisième ligand, Scw, conduit à un phénotype qui est supprimé en contexte *HLA-B*2705, h β 2m*.

Nos données suggèrent que *HLA-B*2705, h β 2m* pourrait agir en amont ou au niveau des récepteurs, puisque la surexpression de *Mad (UAS-Mad)* ou d'une forme constitutivement active *Mad.CA* ne réduit pas le phénotype d'absence des veines transversales induit par *HLA-B*2705* et *h β 2m*. En outre, la déplétion de *Mad* conduit à un phénotype aggravé lorsque l'on co-exprime notre transgène, démontrant ainsi que l'effet de *HLA-B*2705, h β 2m* passe bien par la signalisation *Mad*, et non par une voie en aval. De plus, la perturbation des protéines situés en aval des récepteurs ne semble pas affecter le phénotype induit par *HLA-B*2705, h β 2m* et réciproquement, *HLA-B*2705, h β 2m* n'affecte pas le phénotype induit par ces dérégulations des acteurs intracellulaires de la voie BMP. Ces résultats soutiennent la conclusion tirée de l'absence d'interaction de *HLA-B*2705, h β 2m* avec la surexpression de *mad*. En particulier, la déplétion des répresseurs *Spict* et *Brk* montre que leur gène n'interagit pas génétiquement avec *HLA-B*2705, h β 2m*.

La synthèse d'une forme constitutivement active des récepteurs *Tkv* ou *Sax*, qui est donc active indépendamment du ligand, mène à un phénotype qui est réduit lors d'une co-expression de *HLA-B*2705* et *h β 2m*. Cibler les transcrits codant le récepteur de type II *Punt* entraîne également un phénotype qui est aggravé en contexte *HLA-B*2705, h β 2m*. Enfin, la déplétion de certains régulateurs extracellulaires (*Ltl*, *Dlp* et *Dally*) permet de supprimer le phénotype induit par la co-expression de *HLA-B*2705* et *h β 2m*. Ces résultats suggèrent que *HLA-B*2705, h β 2m* pourrait influencer sur la signalisation BMP en amont ou au niveau des récepteurs.

Bien que la plupart de nos résultats montrent que *HLA-B*2705, h β 2m* réprime la signalisation BMP, certains tests d'interaction génétique présentent des résultats qui semblent en désaccord avec cette conclusion. Par exemple, la co-expression du *HLA-B*2705, h β 2m* en contexte de surexpression du récepteur *Tkv* conduit à une aggravation du phénotype. Du fait que les récepteurs *Tkv* et *Sax* peuvent former des homodimères ou des hétérodimères, un déséquilibre de la formation de ces complexes peut engendrer des phénotypes différents. Les complexes *Tkv-Tkv* et *Tkv-Sax* peuvent induire la signalisation BMP, tandis que les homodimères *Sax-Sax* possèdent une fonction antagoniste. Si *HLA-B*2705, h β 2m* perturbe la fonction de *Sax*, la surexpression de *Tkv* favorise la formation d'homodimères *Tkv-Tkv*, mais ne peut plus être régulé par *Sax*, conduisant à un phénotype d'aggravation.

De même, des tests d'interaction génétique ont été réalisés avec trois ARNi ciblant les transcrits codant le récepteur *Tkv*. Deux de ces ARNi conduisent à un phénotype similaire, se traduisant par une perte des veines transversales et longitudinales. La co-expression avec *HLA-B*2705, h β 2m* conduit à un phénotype d'aggravation. Au contraire, le troisième ARNi conduit à un phénotype inverse se traduisant par la formation d'extra-veines. La co-expression de *HLA-B*2705* et *h β 2m* réduit ce phénotype.

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des différentes lignées de drosophiles transgéniques pour les tests d'interaction génétique entre les composants de la signalisation BMP/TGF- β et HLA-B*2705,h β 2m.

Les différentes lignées transgéniques testées ont été classées selon la fonction du produit du gène dans la cascade de signalisation BMP ou TGF- β . Le génotype et le numéro de la lignée au Bloomington *Drosophila* Stock Center (BL#) sont mentionnés dans les colonnes 2 et 3 respectivement. Les génotypes en vert permettent l'expression de transgènes codant une forme active de la protéine ciblée. Les génotypes en rouge correspondent à des pertes de fonction ou des ARNi ciblant les transcrits des gènes. Les génotypes en bleu indiquent la présence d'un transgène permettant la synthèse d'une forme constitutivement active. L'observation d'un phénotype dans l'aile suite à l'expression des transgènes par le pilote nub-Gal4 ou en contexte hétérozygote mutant est noté « Oui ». L'absence de phénotype est noté « Non ». L'effet de HLA-B*2705,h β 2m sur le phénotype des différentes lignées transgéniques testées est symbolisé par [-] pour les suppressions [+] pour les aggravations. L'absence d'effet est symbolisée par « neutre ». N.C. (non considéré) indique que l'effet de HLA-B*2705,h β 2m n'a pas pu être testé. L'effet des mutations et transgènes sur le phénotype *crossveinless* induit par l'expression du HLA-B*2705,h β 2m est indiqué dans la dernière colonne. "?" indique que la suppression ou l'aggravation du phénotype ne peut être déterminée.

Gènes	Mutation / ARNi	Stock	Phénotype en présence de nub-Gal4	Effet de HLA-B*2705, hβ2m sur le phénotype	Effet sur [HLA-B*2705, hβ2m]
Ligands					
<i>dpp</i>	P{w[+mC]=UAS-dpp.GFP.T}3	BL#53716	Oui	[-]	?
	P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRIP.JF01371}	BL#25782	Oui	[+] / aggravation	
	P{w[+mC]=UAS-dpp.S}42B.4	BL#1486	Oui	neutre	?
<i>gbb</i>	P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRIP.HMS01243}	BL#34898	Oui	[+] / aggravation	
	P{w[+mC]=gbb-GFP.R}11.1	BL#63055	Oui	[-]	réduction
	P{w[+mC]=UASp-gbb.GFP}33.1	BL#63058	Oui	[-]	réduction
	P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRIP.HMS01243}	BL#34898	Oui	[+] / aggravation	
	P{UAS-gbb.R126A.R325A.K334N}86b	BL#63059	Oui	[+] / aggravation	
<i>scw</i>	P{w[+mC]=UAS-scw.R}1	BL#63061	Oui	[-]	réduction
	P{w[+mC]=UAS-scw.R}51	BL#63060	Oui	[-]	réduction
Régulateurs extracellulaires					
<i>cv</i>	P{EP}cv ^{EP1349}	BL#11237	Non	N.C.	neutre
	cv ¹	BL#4182	Non	N.C.	neutre
<i>cv-2</i>	cv-2 ¹	BL#6302	Non	N.C.	neutre
	P{TRIP.HMS01656}	BL#37514	Non	N.C.	neutre
<i>cv-c</i>	cv-c ¹	BL#472	Non	N.C.	neutre
	P{UAS-cv-c-dsRNA}4.1	BL#6443	Oui	neutre	neutre
	P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRIP.HMS05366}	BL#64030	Non	N.C.	neutre
<i>cv-d</i>	P{UAS-cv-d.R}29.1	BL#63068	Non	N.C.	neutre
	P{UAS-cv-d.V5}3	BL#42668	Non	N.C.	neutre
	cv-d ¹	BL#474	Non	N.C.	neutre
<i>dally</i>	P{TRIP.HMJ30279}	BL#63711	Non	N.C.	neutre
	P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRIP.JF03175}	BL#28747	Non	N.C.	réduction
	P{w[+mC]=UAS-dally.J}SJ1	BL#5397	Oui	neutre	neutre
<i>dip</i>	P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRIP.HMS00875}	BL#34089	Non	N.C.	réduction
	P{w[+mC]=UAS-dip.WT}3	BL#9160	Non	N.C.	neutre
<i>kek5</i>	P{TriP.HMS01996}attP40	BL#40830	Non	N.C.	neutre
	Mi{MIC}kek5MI12217	BL#57896	Non	N.C.	neutre
<i>Itl</i>	P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRIP.HMS0205}	BL#29527	Non	N.C.	neutre
	P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRIP.HMS02873}	BL#44577	Oui	[-]	réduction
<i>sog</i>	sog ^{S6}	BL#2497	Non	N.C.	neutre
	sog ^{U2}	BL#5394	Non	N.C.	neutre
Récepteurs					
<i>tkv</i>	P{w[+mC]=UAS-tkv.CA}3	BL#36537	Oui	[-]	?
	P{UAS-tkv-EGFP.D}	BL#51653	Oui	[+] / aggravation	
	tkv ¹	BL#427	Non	N.C.	neutre
	P{TRIP.JF01485}	BL#31040	Oui	[+] / aggravation	
	P{TRIP.GLV21018}	BL#35653	Oui	[+] / aggravation	
<i>sax</i>	P{TRIP.HMS02298}	BL#41906	Oui	[-]	neutre
	P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRIP.HMS04520}	BL#57319	Oui	[+] / aggravation	
	sax ⁵	BL#8785	Non	N.C.	neutre
	UAS-saxΔI	S. Newfeld	Oui	neutre	neutre
	UAS-sax.CA-HA	S. Newfeld	Oui	[-]	neutre
<i>put</i>	P{TRIP.JF03431}	BL#36131	Non	N.C.	neutre
	P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRIP.HMS01944}	BL#39025	Oui	[+] / aggravation	
	P{TRIP.JF02664}	BL#27514	Oui	[+] / aggravation	
<i>mad</i>	P{TRIP.GL00069}	BL#35195	Oui	[+] / aggravation	
	P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRIP.JF01263}	BL#31315	Oui	[+] / aggravation	
	P{w[+mC]=lacW}Mad[k00237]	BL#10474	Non	N.C.	neutre
<i>med</i>	P{UAS-MAD.CA}	DeCelis	Oui	neutre	neutre
	P{UAS-Mad.FLAG}2	BL#44256	Oui	neutre	neutre
	PBac{Med-GFP.FLAG}VK00037	BL#42278	Non	N.C.	neutre
<i>shn</i>	P{TRIP.JF02218}	BL#31928	Oui	neutre	neutre
	Mi{MIC}MI06677	BL#43691	Non	N.C.	neutre
Régulateurs intracellulaires					
<i>dad</i>	P{EPgy2}Dad ^{EY00775}	BL#15314	Non	N.C.	neutre
	P{TRIP.JF02133}	BL#26235	Oui	[-]	réduction
	P{EP}Dad ^{EP3196} e	BL#17097	Non	N.C.	neutre
	PBac{Dad-GFP.FLAG}VK00037	BL#42669	Non	N.C.	neutre
	P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRIP.HMS01102}	BL#33759	Oui	[-]	réduction
<i>spict</i>	P{[lacW]Dad ^{ΔE4} }	BL#10305	Non	N.C.	neutre
	P{TRIP.HMS01164}	BL#34686	Non	N.C.	neutre
<i>brk</i>	P{TRIP.GLC01402}	BL#44438	Oui	neutre	neutre
	P{EP}spict ^{EP2202}	BL#17033	Non	N.C.	neutre
	P{TRIP.HMS01647}	BL#37505	Oui	neutre	neutre
<i>babo</i>	P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRIP.HMC03345}	BL#51789	Oui	neutre	neutre
	PBac{brk-GFP.FPTB}VK00033	BL#38629	Non	N.C.	neutre
La voie de signalisation TGF-β					
<i>smox</i>	P{TRIP.GL00702}	BL#41585	Non	N.C.	réduction
	P{UAS-babo.Q302D}3	BL#64293	Oui	[+] / aggravation	
<i>smox</i>	P{TRIP.JF02320}	BL#26756	Oui	[-]	réduction

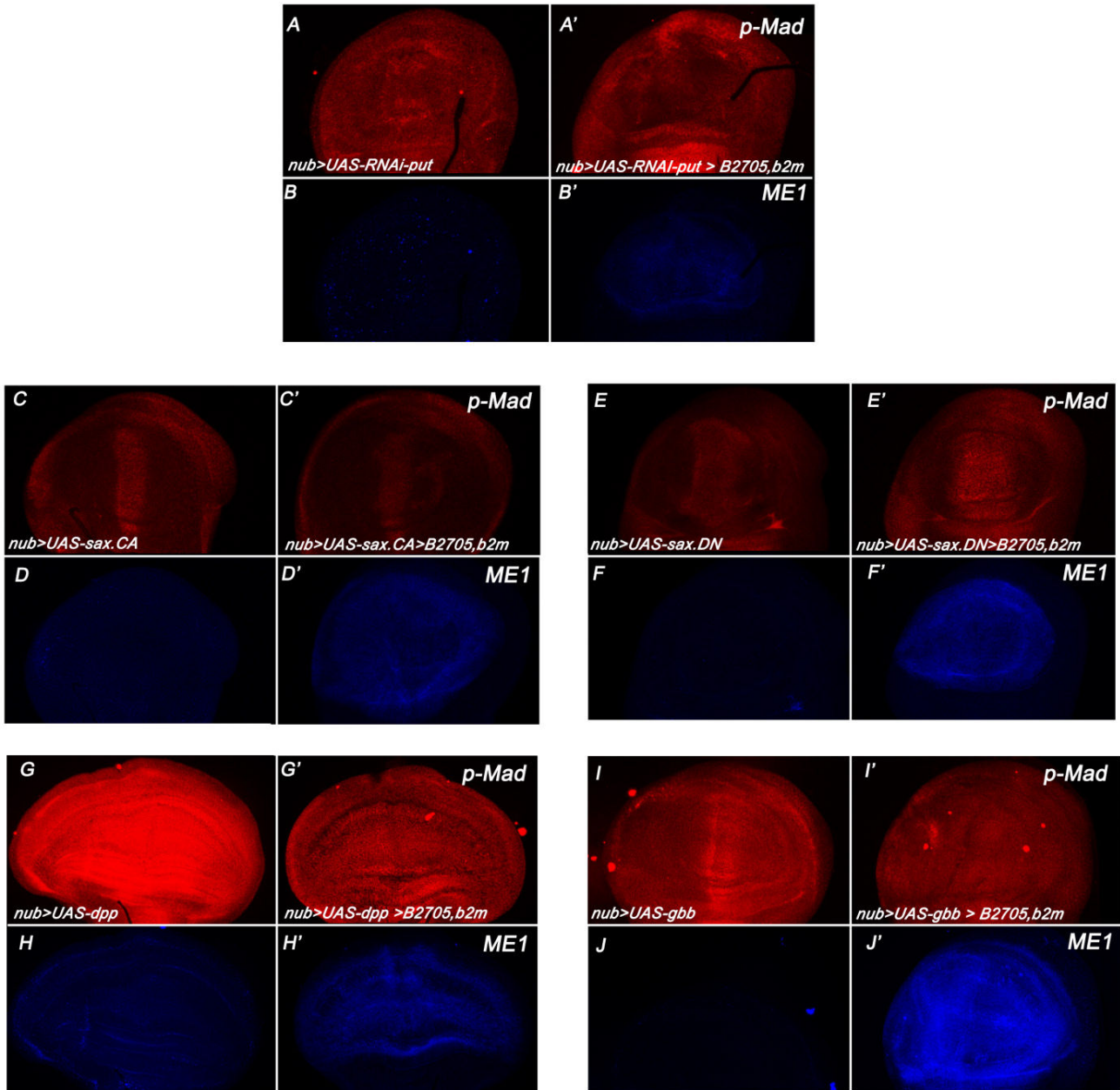


Figure 25 : HLA-B*2705,hβ2m altère le gradient de p-Mad.

Immunomarquage avec un anticorps anti-P-Mad (rouge) et un anticorps ME1 (bleu) sur des disques imaginaux de troisième stade larvaire. Génotypes : (A et B) *nub-Gal4/+ ; UAS-RNAi-put*. (A' et B') *nub-Gal4/+ ; UAS-RNAi-put / UAS-HLA-B*2705,UAS-hβ2m*. (C et D) *nub-Gal4/+ ; UAS-sax.CA*. (C' et D') *nub-Gal4/+ ; UAS-sax.CA / UAS-HLA-B*2705,UAS-hβ2m*. (E et F) *nub-Gal4/+ ; UAS-sax.DN*. (E' et F') *nub-Gal4/+ ; UAS-sax.DN / UAS-HLA-B*2705,UAS-hβ2m*. (G et H) *nub-Gal4/+ ; UAS-dpp*. (G' et H') *nub-Gal4/+ ; UAS-dpp / UAS-HLA-B*2705,UAS-hβ2m*. (I et J) *nub-Gal4/+ ; UAS-gbb*. (I' et J') *nub-Gal4/+ ; UAS-gbb / UAS-HLA-B*2705,UAS-hβ2m*.

Ces résultats confirment l'idée qu'un équilibre des niveaux de Sax et de Tkv dans les cellules des disques imaginaux d'ailes est crucial pour une signalisation appropriée et, par conséquent, pour la structuration de l'aile adulte. Ainsi suivant l'ARNi testé, nous aurons des phénotypes différents.

Il est important de noter que parmi les différentes lignées transgéniques testées, certains ne présentaient aucun phénotype visible et ne permettaient pas d'observer d'interaction génétique avec HLA-B*2705,h β 2m. Ces résultats peuvent s'expliquer pour plusieurs raisons :

- les ARNi peuvent avoir une efficacité variable. De ce fait, certains peuvent s'avérer être très efficaces et induire l'apparition d'un phénotype, tandis que d'autres auront un effet plus modeste.
- Les mutations testées (cv^1 , $cv-2^1$, tkv^1 ...) pour nos tests d'interaction génétiques sont à l'état hétérozygote. Dans l'hypothèse que ces mutations conduisent à une perte de fonction totale, l'expression de nos gènes d'intérêts ne serait réduite, en théorie, que de 50%. De ce fait, cette réduction peut ne pas être suffisante pour induire un phénotype visible. Par conséquent, si nous souhaitons conclure sur l'existence ou non de ces interactions génétiques de manière plus certaine, nous pourrions étudier l'effet de l'expression du HLA-B*2705,h β 2m dans un contexte homozygote mutant de nos gènes d'intérêts.

Par ailleurs, des tests d'interaction génétique avec les gènes *babo* et *smox*, indiquent que HLA-B*2705,h β 2m pourrait également interagir avec la voie de signalisation TGF- β . Ces premiers résultats sont pertinents du fait de l'implication de cette voie dans le processus d'inflammation. Des expériences complémentaires doivent être menées pour déterminer le lien entre HLA-B*2705,h β 2m et la signalisation TGF- β .

Bien que nos résultats tendent vers le même sens, à savoir que l'expression du HLA-B*2705,h β 2m diminue la signalisation BMP, ces données montrent la difficulté qui réside dans l'interprétation de ces tests d'interaction génétique.

B. Immunofluorescence

Afin de confirmer que la co-expression de *HLA-B*2705* et *h β 2m* perturbe la signalisation BMP, des expériences d'immunofluorescence ont été réalisées pour visualiser la phosphorylation du facteur de transcription Mad dans les disques imaginaux d'ailes. Comme mentionné dans l'article [326], la co-expression de HLA-B*2705 et h β 2m induit un élargissement du gradient de p-Mad. D'autres expériences ont été réalisées pour observer la perturbation de ce gradient en contexte de surexpression ou de déplétion des composants de la signalisation BMP. Les résultats sont présentés en [Figure 25].

Les récepteurs de type II sont essentiels pour induire la phosphorylation du gradient Mad et l'activation de la signalisation BMP. La déplétion du récepteur de type II, Put, induit une réduction du gradient p-Mad [Figure 25A et 25B]. La co-expression avec HLA-B*2705,h β 2m, diminue plus fortement encore ce gradient, conduisant à une absence totale de marquage détectable dans le domaine d'expression [Figure 25A' et 25B']. Ces données confirment que HLA-B*2705,h β 2m induit une perturbation de la signalisation BMP.

L'expression d'une forme constitutivement active du récepteur de type I Sax, induit une augmentation de la phosphorylation p-Mad le long de l'axe antéro-postérieur [Figure 25C et 25D]. HLA-B*2705,h β 2m semble réduire la quantité de p-Mad le long de cet axe [Figure 25C' et 25D']. Ces résultats semblent cohérent puisque HLA-B*2705,h β 2m pourrait interagir avec le récepteur Sax, diminuant de ce fait la signalisation. Cependant, ces résultats n'ont été produits qu'une seule fois et doivent être confirmés.

Une forme dominante négative du récepteur sax (*Sax Δ I*) induit un élargissement du gradient de p-Mad qui ne semble pas être modifiée en contexte HLA-B*2705,h β 2m [Figure 25E à 25F'].

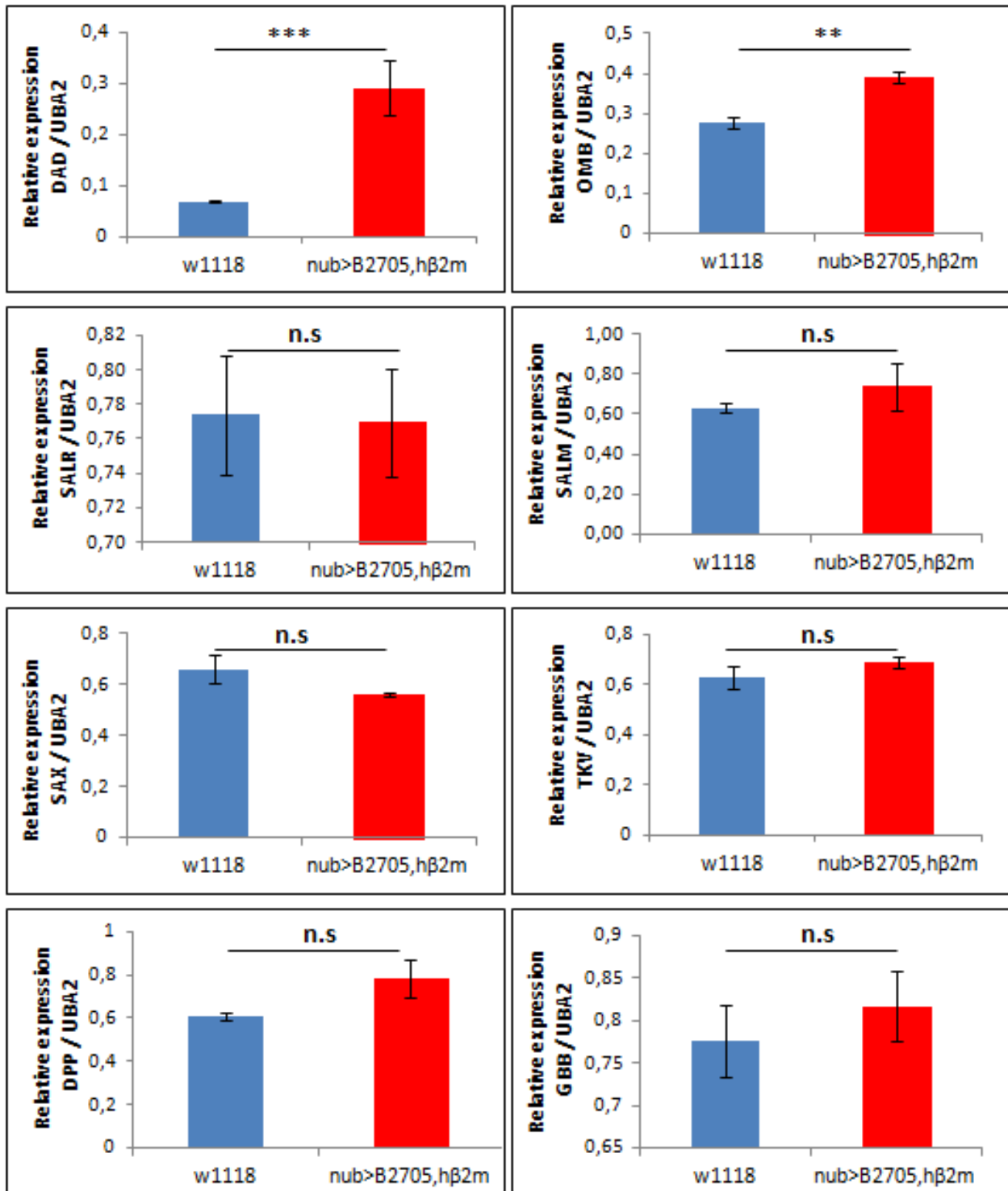


Figure 26 : HLA-B*2705,hβ2m déséquilibre l'expression de certains gènes cibles, sans modifier l'expression des récepteurs et des ligands de la voie BMP.

Niveau de transcrits relatif de gènes cibles de la voie BMP (*daughter against dpp (dad)*, *optomor-blind (omb)*, *spalt-related (salr)* et *spalt-major (salm)*), de gènes codant des récepteurs de la voie BMP (*thickveins (tkv)* et *saxophone (sax)*) et de ligands (*decapentaplegic (dpp)* et *glass bottom boat (gbb)*) en fonction du niveau des transcrits du gène de ménage *uba2*. Les barres d'erreur représentent les SEM de trois expériences indépendantes. n.s : non significatif. ** : $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

Si HLA-B*2705,h β 2m bloque bien la fonction du récepteur Sax, la forme dominante négative de ce récepteur a le même effet. Les effets de HLA-B*2705,h β 2m et Sax Δ I seraient donc redondants. Ces résultats sont cohérents avec les phénotypes d'ailes observés, où la co-expression du HLA-B*2705,h β 2m ne modifie pas le phénotype du mutant Sax Δ I.

La synthèse dans la poche du disque imaginal d'aile du ligand Dpp induit une phosphorylation excessive de p-Mad dans ce domaine [Figure 25G à 25H]. HLA-B*2705,h β 2m diminue la phosphorylation de Mad [Figure 25G' à 25H']. Dpp se fixe préférentiellement aux complexes de récepteur Tkv-Tkv et Tkv-Sax pour induire la phosphorylation de Mad. L'homodimère Tkv-Tkv serait moins efficace que l'hétérodimère Tkv-Sax. Si HLA-B*2705,h β 2m bloque la fonction du récepteur Sax, le ligand Dpp se fixerait uniquement au complexe Tkv-Tkv, ce qui réduirait, comme observé, une réduction de la phosphorylation de Mad.

Enfin, la surexpression de *gbb*, ne semble pas perturber le gradient p-Mad [Figure 25I et 25J]. On observe que HLA-B*2705,h β 2m induit une diminution de ce gradient [Figure 25I' et 25J']. Gbb se fixe préférentiellement aux complexes récepteurs Sax-Sax et Tkv-Sax. Ce ligand n'est pas essentiel à l'activation de la phosphorylation de p-Mad. Il joue un rôle régulateur dans la signalisation. Si HLA-B*2705,h β 2m réduit la fonction du récepteur Sax, le ligand Gbb ne pourra plus interagir avec les hétérodimères Tkv-Sax, diminuant la signalisation BMP.

Ces résultats soutiennent l'idée que l'expression du HLA-B*2705,h β 2m perturbe la signalisation BMP et probablement en interagissant avec Sax. Néanmoins, il est difficile de comprendre et d'interpréter tous les effets que l'expression de ce transgène peut avoir sur la signalisation BMP.

C. RT-qPCR des gènes cibles de la voie BMP

Afin de valider l'interaction entre la voie BMP et HLA-B27, nous avons cherché à savoir si HLA-B*2705,h β 2m pouvait perturber l'expression de gènes cibles de la voie BMP. Pour cela nous avons testé l'expression de quatre gènes cibles : *daughter against dpp (dad)*, *optomotor-blind (omb)*, *spalt-major (spalm)* et *spalt-related (salr)*.

D'autre part, nous avons voulu observer si l'expression des composants clefs de la signalisation (Dpp, Gbb, Tkv et Sax) était modifiée par HLA-B*2705,h β 2m [Figure 26].

HLA-B*2705,h β 2m induit une augmentation significative des niveaux de transcrits des gènes cibles *dad* et *omb*. Aucun effet n'est observée pour les transcrits de *Salm* et *Salr*. Il est néanmoins possible que l'augmentation du nombre d'expériences permette de montrer une augmentation des taux de transcrits de *Salr* en contexte HLA-B*2705,h β 2m. Ces résultats suggèrent que HLA-B*2705,h β 2m induit une augmentation de certains gènes cibles de la signalisation BMP, renforçant ainsi l'idée d'une interaction avec un ou plusieurs composants de cette voie.

Bien que ces résultats peuvent sembler surprenant au regard de nos données de test d'interaction génétiques, cette augmentation de l'expression des gènes cibles de la signalisation BMP peut être expliquée par l'expansion du gradient p-Mad observé lors de l'expression du HLA-B*2705,h β 2m dans le disque imaginal d'aile.

Par ailleurs, les taux des transcrits des composants clefs de la signalisation BMP, que ce soit des ligands ou récepteurs, ne semblent pas être modifiés par HLA-B*2705,h β 2m, suggérant que la perturbation de la signalisation BMP ne s'effectue pas au travers d'une régulation transcriptionnelle de ces gènes

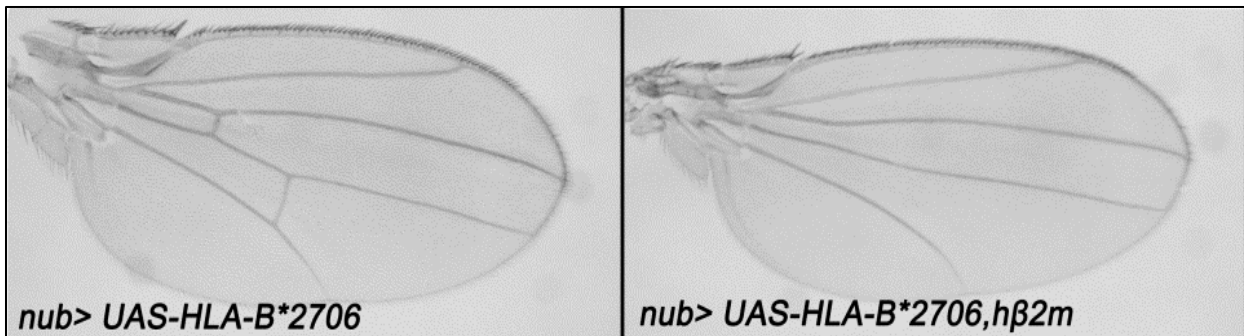


Figure 27 : La molécule de CMH non associée à la SpA, HLA-B*2706,hβ2m, induit un phénotype crossveinless dans l'aile de la drosophile

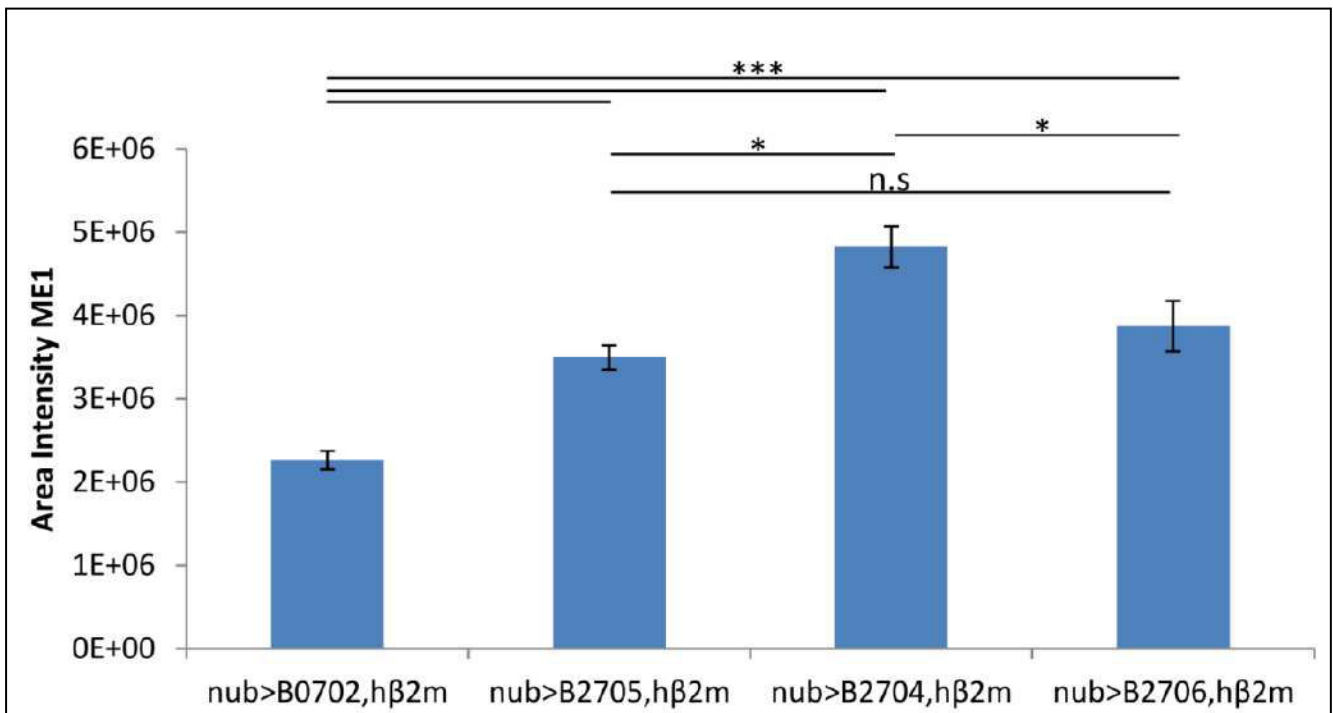


Figure 28 : Les allèles *HLA-B27* ont une meilleure capacité de repliement que l'allèle *HLA-B07*.

Quantification de l'intensité de marquage ME1 qui révèle les formes bien repliées au niveau de la poche des disques imaginaux d'ailes en fonction du génotype. n.s : non significatif. * : $p < 0,05$. *** : $p < 0,001$. Genotypes (de gauche à droite) : *nub-Gal4 ; HLA-B*0702,hβ2m* (non associé à la SA) ; *nub-Gal4 ; HLA-B*2705,hβ2m* (associé à la SA). *nub-Gal4 ; HLA-B*2704,hβ2m* (associé à la SA) et *nub-Gal4 ; HLA-B*2706,hβ2m* (non associé à la SA)

IV. Un autre allèle de HLA-B : HLA-B*2706

Il existe plusieurs allèles *HLA-B27* répartis dans le monde. Certains sont associés à la SpA comme *HLA-B*2705* et *HLA-B*2704*, tandis que d'autres, comme *HLA-B*2706* et *HLA-B*2709* sont décrits comme ne l'étant pas. Afin de déterminer si ce phénotype spécifique de *HLA-B*2705* et *HLA-B*2704* peut être associé ou non à la maladie, nous avons établi une lignée de drosophiles transgéniques pour lesquelles l'allèle *HLA-B*2706* est sous le contrôle d'une séquence *UAS*. Comme précédemment, nous avons croisé cette lignée avec un pilote spécifique de l'aile : *nubbin-GAL4*. En absence de *hβ2m*, *HLA-B*2706* ne semble pas induire de phénotype (de manière similaire à *HLA-B*2705* et *HLA-B*2704*). A l'opposé, *HLA-B*2706* associé à *hβ2m* induit un phénotype *crossveinless* [Figure 27]. Ces résultats suggèrent que ce phénotype pourrait être spécifique des allèles *HLA-B27* et non des autres allèles *HLA-B* (comme *HLA-B07*).

Comme décrit dans notre article [326], nous avons pu mettre en évidence, une augmentation significative de quantité de HLA bien repliées avec les formes associées à la maladie (*HLA-B*2705,hβ2m* et *HLA-B*2704,hβ2m*), comparées à la forme non associée (*HLA-B*0702,hβ2m*). Afin de confirmer cette observation, nous avons déterminé la quantité de *HLA-B*2706,hβ2m* bien replié, par immunofluorescence avec un anticorps spécifique des formes bien replié (ME1). Une quantification de l'intensité du marquage sur des disques imaginaux de chaque génotype a été établie, et représentée en [Figure 28].

Nous pouvons observer que *HLA-B27* (*HLA-B*2705,hβ2m*, *HLA-B*2704,hβ2m* et *HLA-B*2706,hβ2m*) est significativement en plus grande quantité bien replié que le *HLA-B* non associé (*HLA-B*0702,hβ2m*). Il est intéressant de voir que *HLA-B*2704,hβ2m* est bien replié en quantité significativement plus élevée que *HLA-B*2705,hβ2m* et *HLA-B*2706,hβ2m*.

L'ensemble de ces résultats suggère que les protéines *HLA-B27* ont une meilleure capacité de repliement que *HLA-B07*. On peut poser l'hypothèse que le phénotype *crossveinless* pourrait être attribué à la quantité de protéines bien conformées présentes. Un résultat qui vient étayer cette hypothèse est que l'augmentation de l'expression du *HLA-B*0702,hβ2m* par l'ajout de deux copies du transgène sous le contrôle du pilote *nubbin-Gal4* induit dans certains cas un phénotype *crossveinless*. Néanmoins, des expériences supplémentaires, avec d'autres allèles du *HLA-B*, doivent être réalisées pour confirmer cette hypothèse.

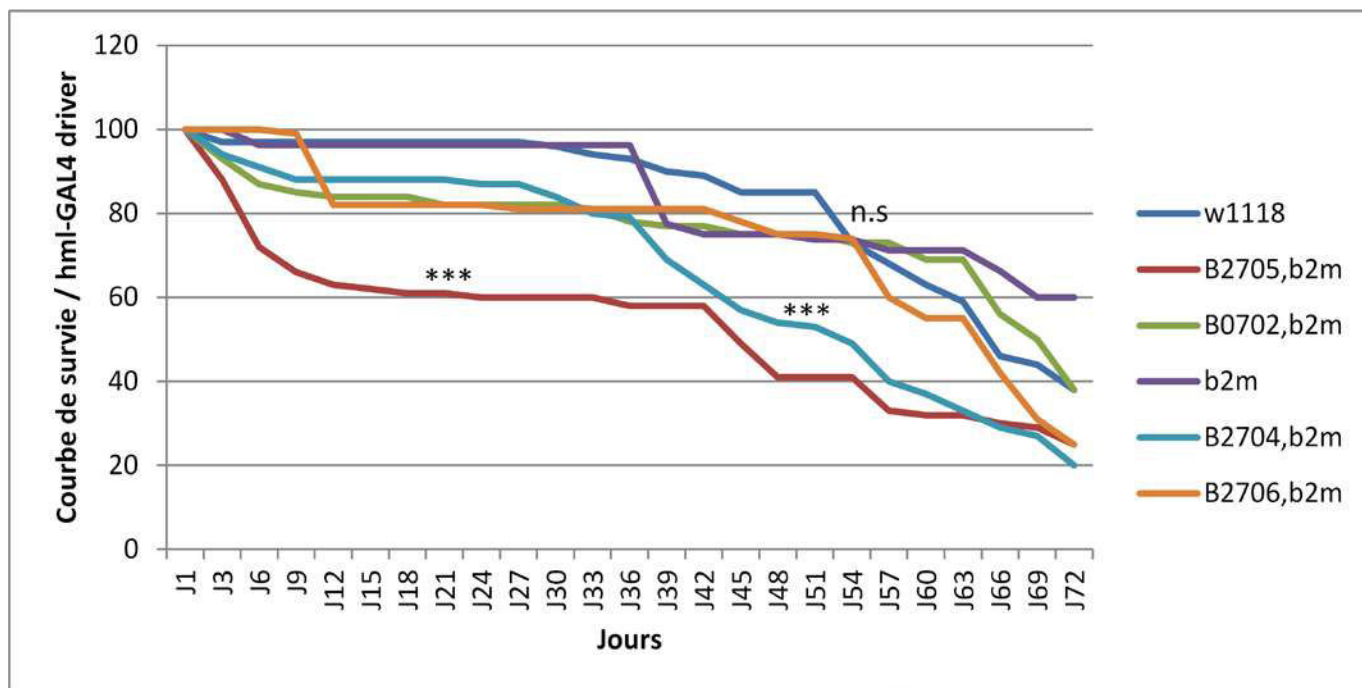


Figure 29 : L'expression des allèles associés à la SpA dans les hémocytes diminue la longévité des drosophiles.

Courbe de survie des drosophiles femelles exprimant les différents transgènes sous le contrôle d'un pilote spécifique des hémocytes : *hemolectin-GAL4* (*hml-GAL4*). Une centaine de drosophiles ont été réparties dans cinq tubes différents (soit 20 mouches par tubes) et élevées sur un milieu standard à 25°C. Un repiquage et une évaluation de la létalité a été réalisée tous les trois jours. *** : test de Log-rank (Mantel-Cox) significatif à $p < 0,0001$. n.s : non significatif.

V. Expression des différents transgènes dans les plasmatoctes de *Drosophila melanogaster*

L'une des caractéristiques majeures de la physiopathologie de la SpA chez les patients, repose sur l'implication des cellules immunitaires. Parmi celles-ci, il est bien décrit que les cellules présentatrices d'antigène jouent un rôle essentiel dans le développement des symptômes. De ce fait, il est intéressant et pertinent d'étudier l'expression de nos différents transgènes dans les cellules immunitaires de la drosophile. Le type cellulaire majoritaire de ce système immunitaire est le plasmatoctes, qui présente une très forte similarité avec le macrophage humain. Afin d'observer un potentiel phénotype, nous avons exprimé nos différents transgènes dans ces plasmatoctes par le biais du pilote *hemolectin-Gal4* (*hml-Gal4*). Nos premières observations ont mis en évidence que l'expression de nos transgènes, n'entraînait pas de phénotype visible chez la drosophile adulte. Nous avons donc étudié l'espérance de vie des drosophiles, afin de déterminer si l'expression de nos transgènes pouvait favoriser la létalité au cours du temps. Pour cela, nous avons suivi la viabilité d'une centaine de mouches mâles et femelles pour chaque génotype. Un comptage des drosophiles mortes a été réalisé tous les trois jours. Un graphique représentatif des résultats est présenté en [Figure 29].

Les résultats ont mis en évidence, que seules les formes associées à la pathologie (HLA-B*2705,h β 2m et HLA-B*2704,h β 2m) réduisaient significativement l'espérance de vie. Deux expériences supplémentaires ont été réalisées pour comparer HLA-B*2705,h β 2m et HLA-B*0702,h β 2m. Des résultats similaires mettaient en évidence que l'expression de la forme associée mourrait plus rapidement que la forme non associée.

Ces expériences démontrent que la synthèse dans les plasmatoctes de drosophile des formes de CMH-I associées à la pathologie engendre une létalité plus précoce. Des expériences supplémentaires devraient être menées pour comprendre les mécanismes associés à ce nouveau phénotype.

Introduction

"La raison pour laquelle les mouches peuvent voler et nous pas, c'est tout simplement qu'elles ont une foi parfaite, car avoir la foi, c'est avoir des ailes"

Résultats

James Matthew Barrie

Résultats complémentaires

Discussion

Annexes

Références bibliographiques

Discussion

Les spondyloarthrites, dont la spondylarthrite ankylosante, sont des maladies rhumatologiques multifactorielles avec une importante composante génétique dominée par l'allèle *HLA-B27*. Découverte en 1973 par Caffrey et James, plusieurs études ont été entreprises pour comprendre le rôle moléculaire de cet allèle dans la SpA [64]. Cependant, aucune des hypothèses émises n'a pu être véritablement validée. Afin de mieux caractériser l'effet du *HLA-B27* au niveau cellulaire, nous avons étudié ses effets dans un modèle génétique communément utilisé pour la compréhension des mécanismes moléculaires complexes : la drosophile.

Nous avons établi plusieurs lignées de drosophiles transgéniques synthétisant des protéines humaines HLA-B associées à la SpA (*HLA-B*2705* et *HLA-B*2704*) ou non-associées à la SpA (*HLA-B*0702*), ainsi que la chaîne invariante du CMH de classe I : la bêta-2-microglobuline ($\beta 2m$). L'expression des différents transgènes dans le modèle drosophile a permis d'observer un phénotype dans le tissu d'aile et le tissu d'œil, spécifiquement lors de l'expression des formes associées à la SpA en présence de $\beta 2m$. Nous avons observé que ces phénotypes n'étaient associés ni à un stress du RE, ni à de la mort cellulaire, mais à la perturbation d'une voie de signalisation impliquée dans le développement de l'aile et l'œil : la voie Bone Morphogenetic Protein (BMP).

Les spondyloarthrites et la signalisation BMP

Nos résultats ont mis en évidence une interaction entre le complexe *HLA-B27*/ $\beta 2m$ et le récepteur de type I Saxophone de la signalisation BMP. Une interaction similaire entre *HLA-B27*/ $\beta 2m$ et *ALK2* (homologue de saxophone) a également été observée dans les lymphocytes B de patients atteints de SA transformés par EBV. L'implication d'*ALK2* dans la physiopathologie de la SpA n'a encore jamais été mise en évidence. Cependant, comme décrit en introduction, la signalisation BMP est impliquée dans de nombreux processus clé de la physiopathologie de la SpA, tels que les mécanismes de l'inflammation, du développement immunitaire, l'homéostasie intestinale, et la formation osseuse.

Malgré l'absence de donnée dans la littérature sur le lien entre *ALK2* et la SpA, plusieurs éléments ainsi que des résultats complémentaires de notre unité renforcent l'idée de la participation de ce récepteur dans le développement des symptômes de la SpA. Quelques publications relatent notamment l'implication de cette voie de signalisation dans la SpA. Cependant, l'un des obstacles majeurs des études cliniques chez les patients, est la disponibilité limitée des échantillons biologiques. Ainsi, les tissus de patients provenant de la colonne vertébrale ou des articulations sacro-iliaques étant difficiles à obtenir, la plupart des données proviennent d'études sur des modèles animaux ou bien sur le sérum de patients. Les paragraphes qui suivent décrivent donc ces résultats qui semblent lier SpA et voie BMP.

L'étude d'un modèle souris DBA/1 développant spontanément une arthrite, et plus particulièrement des enthésites, a mis en évidence des effets de la signalisation BMP sur l'initiation et la progression de l'arthrite. Les résultats montrent deux points principaux :

- une immunohistochimie de l'enthésite de ces souris présentant une forte accumulation des ligands BMP-2, -6 et -7, une augmentation de la phosphorylation du facteur Smad-1, -5, ainsi qu'une augmentation de l'expression de certains gènes cibles tels que *PCNA* et *sox9* impliqués dans la formation osseuse;
- la répression de la signalisation BMP par transfection du gène inhibiteur de la signalisation BMP, *noggin*, diminue la progression de l'arthrite; et de manière intéressante, des biopsies enthésiales de patients atteints de spondylarthrite, présentaient des structures morphologiques similaires à l'enthésite du modèle souris, s'accompagnant d'une augmentation de la phosphorylation du facteur Smad-1, -5 [149].

Des études menées sur le modèle rat HLA-B27/h β 2m (lignée 33-3) ont permis d'observer que l'activation de Smad-1, -5 ou -8 contribuait à la prolifération des chondrocytes et à l'ankylose [327]. Un traitement anti-TNF (traitement de troisième intention pour les patients) dans ce modèle de rats transgéniques, provoque une diminution des arthrites et de l'inflammation intestinale, mais n'inhibe pas l'activation du facteur Smad-1, -5 ou -8, lorsque le traitement est donné tardivement [328]. Ces résultats démontrent qu'un traitement précoce avec de l'anti-TNF peut empêcher l'activation de la signalisation BMP dans le modèle « rat transgénique ».

Les niveaux sériques de ligands de la voie BMP pourraient varier chez les patients. Une étude menée sur le sérum d'une cohorte de 28 patients atteints de SA a démontré une augmentation de la quantité du ligand BMP-7, ainsi que des marqueurs de la formation osseuse [329]. Ces résultats furent confirmés par une autre étude, sur une cohorte plus importante de 40 patients atteints de SA, démontrant une augmentation des niveaux de BMP-2 et BMP-7 dans le sérum [330]. Par ailleurs, une augmentation significative des taux sériques de BMP-2 et BMP-7 a été observée chez des patients atteints de SA et présentant une fusion vertébrale, en comparaison avec des patients atteints de SA sans fusion vertébrale [331]. De plus, le niveau des ligands BMP-2 et BMP-6 est augmenté dans la synovie arthritique de patients atteints de SA, et est fortement régulé par les cytokines pro-inflammatoires [332].

Par ailleurs, une étude d'association génétique sur une cohorte de 417 patients SA coréens a identifié deux SNPs dans le gène *BMP-6* qui sont significativement associés à la sévérité radiologique des patients atteints de SA, ce qui souligne le lien entre la voie BMP et la SA [333]. Cependant, certains travaux ne révèlent pas de différence significative du niveau de BMP-7 dans le sérum d'une cohorte de patients SA [334].

La plupart des travaux mentionnés ci-dessus relatent une augmentation du niveau protéique des ligands BMP ou une activation du facteur Smad-1, -5 ou -8 au cours des différentes étapes de l'ossification. Cependant, l'implication exacte de la signalisation BMP dans la physiopathologie de la SA et les récepteurs impliqués restent encore inconnus. Les rares données mentionnant les récepteurs des BMP sont issues d'études GWAS sur une cohorte de 1537 patients atteints de SA, mettant en évidence la présence de certains polymorphismes dans les gènes *BMPRII* et *BMPRI* comme étant associés à la SA [335]. A ma connaissance, une seule étude met en évidence un lien potentiel entre le facteur de prédisposition HLA-B27 et les récepteurs BMP. Des travaux de biochimie à grande échelle, menée par Halevi *et al.* sur le peptidome présenté par HLA-B*2705 de cellules de cartilages et de cellules HeLa, ont permis d'identifier un peptide de 11 acides aminés (FRETEIYQTVL) correspondant à un fragment d'un récepteur BMP, *BMPRI* [336].

Des études menées dans notre équipe qui ne sont pas encore publiées, ont montré des variations significatives des messagers codant deux récepteurs de BMP dans les cellules dendritiques des patients SA : une diminution du niveau de transcrits de *BMPRI1B* et *BMPRI2*. De plus, le niveau des transcrits du gène *Smad-7*, gène cible de la signalisation BMP, est également retrouvé augmenté dans les cellules dendritiques de rats transgéniques HLA-B27, comparativement aux cellules exprimant l'allèle *HLA-B07*. De manière similaire, nous avons observé que la synthèse de HLA*B2705,h β 2m dans le modèle drosophile induit une augmentation de l'expression du gène *dad*, homologue du gène *Smad-7* des mammifères. De même, une méta-analyse réalisée par Lee et Song sur des données GWAS de gènes différentiellement exprimés chez les patients SA, ont mis en évidence une augmentation significative de l'expression du gène *Smad-7* [337].

L'ensemble de ces données renforce l'idée d'une implication de la voie BMP dans la physiopathologie de la SpA. Des résultats supplémentaires sont attendus au laboratoire pour confirmer si cette implication est spécifique du récepteur ALK2 dans les cellules de patients SA.

Les spondyloarthrites et la fibrodysplasie ossifiante progressive

Une signalisation aberrante de la voie BMP peut être associée à des maladies provoquant des défauts au niveau squelettique [212]. Parmi ces pathologies, la fibrodysplasie ossifiante progressive (FOP) est un trouble autosomique dominant rare caractérisé par une malformation congénitale du gros orteil, et par une formation osseuse hétérotopique dans les muscles et les tissus conjonctifs. Cette formation osseuse hétérotopique chez les patients FOP peut être divisée en deux phases : une inflammation et une destruction des tissus conjonctifs (phase 1) et une nouvelle formation osseuse (phase 2). Cette maladie est associée dans la majorité des cas, à une mutation dans le gène *acvr1* codant un récepteur BMP de type I, ALK2 [319]. Cette mutation mime une forme constitutivement active du récepteur, engendrant une augmentation excessive de la signalisation BMP.

De récentes études ont démontré que la signalisation activine, de la superfamille des TGF- β , est un facteur important pour l'initiation à la formation de l'ossification hétérotopique dans la FOP [338]. Certains événements, comme un traumatisme physique ou une infection virale peut entraîner une réponse inflammatoire induisant la production d'activine A. Ce ligand est produit par de nombreuses cellules du système immunitaire et est impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques telles que l'inflammation et l'homéostasie osseuse, en stimulant l'ostéoclastogenèse et en inhibant la formation d'ostéoblastes [339]. En condition physiologique, l'activine A antagonise la signalisation BMP en bloquant la signalisation BMP pour potentialiser la signalisation TGF- β via le récepteur ALK4, en se fixant préférentiellement aux récepteurs de type II ACVR2A/ACVR2B [272]. Dans le cas de la FOP, il est suggéré que la mutation R206H dans le gène codant ALK2 favorise la liaison avec le ligand activine A pour l'utiliser dans un but inverse : activer la signalisation et favoriser la formation osseuse.

Mes travaux ont permis de mettre en évidence une interaction entre le complexe HLA-B*2705,h β 2m et le récepteur saxophone, homologue de ce même récepteur ALK2 chez l'Homme. Comme décrit en introduction, il est intéressant de noter que les symptômes de la FOP peuvent être similaires à une SpA avancée, pouvant parfois conduire à un mauvais diagnostic. Ces résultats renforcent l'idée de l'implication de ce récepteur dans la SpA.

Sur la base de nos résultats, nous pouvons supposer que la séquestration du récepteur ALK2 par HLA-B*2705,h β 2m pourrait potentialiser la signalisation activine A par le récepteur ALK4, lors d'un stimuli inflammatoire. De ce fait, il serait intéressant d'étudier le rôle de l'activine A dans la physiopathologie de la SpA, et d'observer si l'ajout ou la diminution de ce facteur peut moduler l'activation des voies Smad. La drosophile est un modèle idéal pour tester cette hypothèse, puisqu'il existe que trois types de ligands TGF- β : Daw, Myo, et Act β et un seul récepteur TGF- β appelé Baboon. Certains tests d'interaction génétique ont déjà pu mettre en évidence une interaction génétique entre HLA-B*2705,h β 2m et certains composants de la signalisation TGF- β , renforçant l'idée d'un lien potentiel avec cette voie de signalisation [Tableau 5]. Nous pourrions notamment observer si l'expression du HLA-B*2705,h β 2m peut moduler la signalisation TGF- β en favorisant l'activation de Smox, homologue de Smad 2/3 chez l'Homme.

Repliement des HLA-B dans le modèle drosophile

Mes travaux ont par ailleurs, mis en évidence que le complexe HLA-B*2705,h β 2m possède une meilleure capacité de repliement à la membrane cellulaire comparée au complexe HLA-B*0702,h β 2m. *Drosophila melanogaster* ne possède pas de système immunitaire adaptatif, et aucun homologue des gènes du CMH n'y a été identifié. A ma connaissance, un seul article décrit l'étude de l'expression de CMH de classe I humains dans le modèle drosophile [340]. Les travaux menés par Jackson *et al.* ont mis en évidence que les CMH de classe I humains, HLA-B27 et HLA-B07, dans les cellules de drosophile Schneider 2 (S2) en présence de la β 2m ont la capacité de se replier et d'être importées à la membrane plasmique, indépendamment du complexe de chargement de peptide (PLC).

Ces travaux ont souligné que la stabilisation et l'importation vers la membrane plasmique des chaînes lourdes du CMH dépend de la chaîne invariante $\beta 2m$. Cependant, ces résultats n'indiquaient pas si le complexe HLA-B27/ $\beta 2m$ était plus présent au niveau de la membrane cellulaire que le complexe HLA-B07/ $\beta 2m$. De plus, les auteurs supposent que ces complexes auraient la capacité d'être présentés à la surface cellulaire indépendamment du peptide, mais aucune donnée démontre que des peptides présents chez *Drosophila* pourraient se fixer sur ces complexes de CMH de classe I, indépendamment du PLC, avant d'être importés vers la membrane cellulaire.

De ce fait, une hypothèse pouvant expliquer cette meilleure capacité de repliement du HLA-B*2705,h $\beta 2m$ repose sur l'idée que ce complexe pourrait se lier à un peptide de la drosophile, ce qui favoriserait sa stabilisation et son exportation vers la membrane. En effet, les travaux de Jackson *et al.* démontrent que l'ajout d'un peptide (peptide du virus de la stomatite vésiculaire) dans les cellules S2 exprimant HLA-B27/ $\beta 2m$ ou HLA-B07/ $\beta 2m$, stabiliserait la conformation de ces complexes.

Comme décrits en introduction, de nombreux peptides aberrants semblent pouvoir se lier au complexe HLA-B*2705,h $\beta 2m$ du fait de sa conformation particulière. Il ne serait donc pas incohérent que certains peptides de la drosophile se fixent à ce complexe, renforçant sa stabilisation et son importation vers la membrane cellulaire.

Il serait par conséquent, intéressant de pouvoir étudier le peptidome du complexe HLA-B*2705,h $\beta 2m$ dans le modèle drosophile. En comparaison, des lignées de drosophiles transgéniques avec d'autres allèles de *HLA-B* pourraient être utilisés pour étudier la différence de peptidome existant entre les formes associées à la SpA et les formes non-associées : l'objectif étant d'identifier des molécules spécifiques pouvant expliquer la différence de quantité de formes bien repliées à la membrane cellulaire entre les formes associées ou non. Un résultat supplémentaire appuie cette hypothèse, puisque nous avons observé, par immunofluorescence que HLA-B*2704,h $\beta 2m$ (forme associée à la SA) semble présenter une meilleure capacité de repliement que HLA-B*2706,h $\beta 2m$ (forme non-associée à la SA) dans le modèle drosophile [Figure 28]. Ces résultats semblent d'autant plus importants que ces deux allèles ne diffèrent que par deux acides aminés au niveau de la poche d'insertion du peptide.

Rôle du HLA-B27 sur le système immunitaire dans les spondyloarthrites

Le développement de la SpA est fortement lié à des anomalies du système immunitaire inné, impliquant diverses populations cellulaires, tels que les macrophages (MQ), les cellules dendritiques (DC), ou les cellules natural killer (NK). Les DC, qui semblent être les principales cellules impliquées dans la maladie, participent à l'activation des lymphocytes Th17, et à la production d'interleukines pro-inflammatoires, telles que les IL-23, IL-1 β ou IL-6. Les macrophages ont un rôle clé dans la SA en favorisant l'inflammation de la membrane synoviale et de l'intestin. Elles sont principalement impliquées dans la production des cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-23. Les cellules NK ont une fonction défensive notamment contre les cellules infectées et les bactéries intracellulaires. Dans le sérum des patients atteints de SA, ces cellules sont retrouvées en plus grand nombre. L'ensemble de ces cellules pourrait agir à plusieurs niveaux dans la physiopathologie de la SA, tels qu'au niveau de la barrière intestinale ou des articulations.

Les cellules dendritiques et les macrophages sont les principales cellules présentatrices d'antigène (CPA). Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité sont au cœur de ce processus, en présentant divers peptides aux lymphocytes T. HLA-B27 appartient au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, et participe, de ce fait, à la réponse immunitaire. La particularité structurale de la molécule du HLA-B27 a permis d'émettre plusieurs hypothèses sur les mécanismes anormaux d'induction de la réponse immunitaire. Au total quatre mécanismes du rôle pathogénique de HLA-B27 ont été proposés :

- HLA-B27 pourrait présenter des peptides aberrants aux cellules T cytotoxiques et ainsi activer une réponse immunitaire inflammatoire.
- La formation d'homodimère de chaînes lourdes HLA-B27 pourrait entraîner l'activation directe des cellules NK et des lymphocytes T par l'intermédiaire des protéines KIR.
- Le repliement plus lent du HLA-B27 dans le réticulum endoplasmique pourrait conduire à l'activation de l'UPR et augmenter la production de cytokines pro-inflammatoires.
- HLA-B27 pourrait présenter divers peptides dérivés de bactéries (mimétisme moléculaire) au niveau de la barrière intestinale, conduisant à l'activation d'une réponse immunitaire anormale qui ciblerait les bactéries de la flore intestinale, et contribuerait à une modulation pathologique du microbiome intestinal.

Bien que de nombreux travaux aient permis d'indiquer le rôle primordial de ces cellules de l'immunité innée dans le développement de la SA, la complexité de ce système rend son étude particulièrement difficile chez l'Homme. Cette complexité rend, de ce fait, complexe la compréhension du rôle pathogénique de HLA-B27.

La drosophile présente un système immunitaire inné plus simple que chez les mammifères, avec l'implication de trois types cellulaires. Les plasmatoctes représentent la majorité de ces cellules, et sont très similaires aux macrophages humains. Il pourrait ainsi être judicieux d'étudier l'effet de l'expression de nos différents transgènes dans ces cellules par le biais de pilotes spécifiques. Des résultats préliminaires ont mis en évidence que la synthèse des formes associées à la SpA, HLA-B*2704,h β 2m ou HLA-B*2705,h β 2m dans ces plasmatoctes conduit à une réduction de l'espérance de vie des drosophiles, comparativement à l'expression des transgènes synthétisant les formes non associées à la SpA HLA-B*0702,h β 2m et HLA-B*2706,h β 2m. On peut ainsi poser l'hypothèse que l'expression de ces transgènes pourrait induire une perturbation soit du nombre de ces cellules, soit de l'homéostasie intestinale (fortement dépendante de ces plasmatoctes), ou bien une réponse anormale face à une infection. Des recherches plus approfondies doivent être menées pour comprendre ce phénotype de réduction d'espérance de vie.

Par ailleurs, des études mettent en évidence l'implication potentielle des récepteurs Toll-like (TLR) dans la pathogenèse des spondylarthrites [341]. Ces récepteurs, présents notamment sur les CPA, tels que les macrophages ou les cellules dendritiques, interviennent au cours des mécanismes de l'immunité innée en reconnaissant des motifs moléculaires spécifiques de pathogènes pour induire l'activation du facteur de transcription NF κ B, et induire l'expression de gènes cibles codant notamment des cytokines ou des facteurs pro-apoptotiques.

L'implication des TLR dans la SA n'est pas encore totalement claire. Des études sur une cohorte de patients SA ont identifié une association modeste avec des polymorphismes dans le gène codant le récepteur TLR4 [342]. Certains de ces polymorphismes peuvent conduire à une diminution de la réponse aux pathogènes bactériens, tandis que d'autres peuvent conduire à une réponse exagérée à l'infection. D'autres études ont montré une augmentation importante du niveau de TLR4 dans les cellules mononucléées sanguines périphériques (PBMC) de patients atteints de SA par rapport aux témoins [343]. De plus, un niveau élevé de TLR2 et TLR4 a été retrouvé dans la synovie des patients atteints de SpA [344]. Enfin, des niveaux accrus de protéines TLR1, 2 et 9 ont été rapportés dans des monocytes de patients SA qui ne prenaient pas de traitement anti-TNF [345]. L'augmentation du niveau de ces récepteurs de la voie Toll entraîne l'activation du facteur NF κ B, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires chez les patients atteints de SA. Des études plus approfondies restent à établir pour mieux comprendre le rôle causal des TLR dans la SA.

La drosophile présente un avantage considérable pour l'étude de la voie Toll. En effet, cette voie a été découverte et est très bien conservée dans ce modèle [193]. De nombreux composants sont retrouvés en commun avec ceux des mammifères, tels que les récepteurs Toll ou le facteur de transcription NFκB (protéine Dif chez la drosophile). Afin d'identifier un lien potentiel entre HLA-B27 et cette voie de signalisation Toll, il serait intéressant de réaliser des tests d'interaction génétique avec les différents composants de cette voie. Les résultats pourront par la suite être mis en parallèle avec les DC ou les MQ de patients atteints de SA.

HLA-B27 et maladies inflammatoires de l'intestin

Les manifestations cliniques de la spondylarthrite ankylosante chevauchent celles de maladies inflammatoires de l'intestin. En effet, les patients atteints d'une maladie inflammatoire de l'intestin peuvent développer une sacro-iléite, une arthrite périphérique, ou une uvéite, qui sont toutes des manifestations potentielles de la spondylarthrite ankylosante. Inversement, les patients atteints de spondylarthrite ankylosante ou d'arthrite réactionnelle ont souvent une maladie inflammatoire de l'intestin, bien qu'elle puisse être cliniquement occulte. La spondylarthrite ankylosante est associée, dans 5 à 10% des cas à des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, appelées MICI, telles que la maladie de Crohn. Toutefois, on observe une inflammation intestinale subclinique révélée par l'iléocoloscopie, dans environ 25 à 49% des patients atteints de SA. De plus, des lésions microscopiques sur des biopsies intestinales de patients atteints de SA sont observées dans plus de 50% des cas. L'ensemble de ces résultats, suggère que l'inflammation intestinale pourrait être un événement majeur dans la pathogenèse de la SA [346]. D'autre part, une augmentation de la perméabilité intestinale a été observée chez les patients atteints de SA, favorisant l'interaction entre les bactéries intestinales et le système immunitaire [86].

Le meilleur modèle animal illustrant le lien entre l'inflammation intestinale et l'inflammation articulaire est le rat transgénique HLA-B27/hβ2m (lignée Lewis 21-4 et 33-3), qui développe spontanément une maladie inflammatoire « multi-organes » analogue aux troubles humains liés à HLA-B27 [139]. Les rats transgéniques HLA-B27/hβ2m, qui développent normalement une colite, des lésions cutanées et une arthropathie, restent généralement en bonne santé dans un environnement exempt de germes, démontrant l'importance et l'implication du microbiote dans la physiopathologie de la SA. Un certain nombre de publications ont noté une relation entre les spondylarthropathies et la flore bactérienne, dont les liens les plus forts sont la capacité des souches de *Chlamydia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* ou *Campylobacter* de déclencher une arthrite réactionnelle [347]. De même, des études démontrent une dysbiose importante de la bactérie *Klebsiella* dans la physiopathologie de la SA [78]. De ce fait, il est maintenant généralement admis que la flore intestinale joue un rôle causal dans la spondylarthrite ankylosante. Néanmoins, bien que de nombreuses études relatent le lien entre SA, inflammation intestinale et perturbation du microbiote intestinal, on connaît encore peu de chose sur l'implication d'HLA-B27 dans le développement des symptômes intestinaux de la SpA.

En tant que gène qui code une protéine présentant des antigènes pour induire une réponse immunitaire et qui régule la sélection des cellules T dans le thymus, l'hypothèse d'un rôle du HLA B27 sur la flore microbienne humaine normale, est envisageable. De récentes études de l'effet de HLA-B27 sur le microbiote intestinal dans le modèle « rat », ont mis en évidence une dérégulation de plusieurs voies immunitaires et une modification de la composition microbienne [348]. Cependant, les effets de HLA-B27 étaient très influencés par le fond génétique des rats étudiés. Les données actuelles ont mis en évidence que la séquence protéique de HLA-B27 présentait une similitude avec des protéines dérivées de bactéries Gram négatif [349].

Ainsi, des anticorps monoclonaux dirigés contre HLA-B27 peuvent réagir de manière croisée avec certaines protéines issues de bactéries Gram négatif. D'autres études ont mis en évidence que, dans des monocytes, la réplication de *Salmonella* était augmentée si HLA-B27 était présente [350].

Drosophila s'est avérée être un système modèle génétique idéal pour disséquer la structure et le fonctionnement du tractus gastro-intestinal. Le système digestif de la drosophile présente de nombreuses similitudes avec celui de l'Homme, que ce soit au niveau de sa structure, de sa régulation, ou de son fonctionnement. La création de lignées de drosophiles transgéniques pour *HLA-B27* permet d'induire l'expression spécifique de cet allèle dans les cellules composant le tractus gastro-intestinal. Notre modèle pourrait donc servir pour aborder la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la physiopathologie intestinale des patients SA.

Il serait intéressant de pouvoir étudier l'effet de HLA-B*2705,h β 2m dans les différentes cellules qui composent l'intestin, telles que les cellules souches intestinales, les entéroblastes, ou les entérocytes, par le biais de pilotes spécifiques. Plusieurs aspects pourraient être observés comme la perméabilité intestinale, l'induction d'un stress du RE, ou bien une augmentation de la production de peptides antimicrobiens. En collaboration avec le Laboratoire de physiopathologie et diagnostic des infections microbiennes (EPIM), nous pourrions examiner le microbiote intestinal de la drosophile, en contexte HLA-B*2705,h β 2m ou HLA-B*0702,h β 2m, afin de déterminer si les différents allèles d'*HLA-B* affectent le microbiote intestinal. La caractérisation de ces différentes bactéries pourra être mise en parallèle avec les résultats observés chez les patients SA.

Le système immunitaire joue un rôle crucial dans l'homéostasie intestinale, lui permettant d'établir un équilibre entre les bactéries et les cellules épithéliales de l'intestin [351]. Une dérégulation de cette homéostasie pourrait expliquer la perméabilité intestinale et l'induction de l'inflammation. Par conséquent, nous pourrions déterminer l'effet de l'expression de nos différents transgènes dans les hémocytes (équivalent aux macrophages) de *Drosophila melanogaster* sur l'homéostasie intestinale et la composition du microbiote intestinal.

La voie BMP joue un rôle essentiel dans la croissance, la morphogenèse et le contrôle de l'homéostasie intestinale. De récentes études sur le tractus intestinal de la drosophile ont démontré que lors d'une lésion tissulaire ou d'une infection, les hémocytes sont recrutés dans l'intestin et sécrètent le ligand Dpp pour induire la prolifération des cellules souches intestinales, en activant le récepteur de type I Saxophone [315]. Mes résultats montrent une interaction entre HLA-B*2705,h β 2m et le récepteur saxophone. L'hypothèse que nous pouvons émettre, est que la perturbation de la signalisation BMP dans les cellules souches de l'intestin pourrait engendrer un déséquilibre de l'homéostasie intestinale, favorisant l'inflammation dans ce tissu.

Les limites du modèle drosophile pour l'étude des spondyloarthrites

La drosophile est un puissant modèle génétique ayant permis d'importantes avancées pour la compréhension de nombreuses pathologies humaines, comme l'illustrent nos résultats. Malgré ses avantages et comme tout modèle expérimental, cet organisme a des limites dans la modélisation des pathologies humaines. L'un des aspects les plus évidents en est la différence anatomique entre la drosophile et l'Homme. En conséquence, plusieurs tissus, organes et types cellulaires des mammifères n'ont pas d'équivalence chez la drosophile. De plus, les processus cellulaires et moléculaires ont une complexité génétique supérieure chez les mammifères ; les gènes de drosophile conservés chez l'Homme ont le plus souvent plusieurs orthologues humains. Enfin, la drosophile ne permet de modéliser et d'étudier que des mécanismes ancestraux communs aux insectes et mammifères. Par exemple, d'importants facteurs pathogènes spécifiques aux vertébrés peuvent être méconnus par l'étude des modèles invertébrés.

Ces trois limites s'appliquent à notre étude. En effet, la drosophile ne possède pas de tissus osseux alors que celui-ci paraît impliqué dans la SA. On notera cependant que c'est le cas aussi de la Fibrosyplasie Ossifiante Progressive dont le modèle d'étude développé dans la drosophile est apparu extrapolable au patient. De la même façon, le système immunitaire adaptatif est absent du modèle drosophile, or il est établi que ce système joue un rôle important dans la physiopathologie de la SA, avec notamment l'implication des lymphocytes T. Concernant la signalisation BMP, celle des mammifères est bien plus complexe que celle des invertébrés, avec notamment l'implication de nombreux régulateurs de cette signalisation. Par exemple, il n'existe que deux récepteurs de type I de la voie BMP chez la drosophile : Sax et Tkv, alors qu'il existe quatre récepteurs BMP de la famille Activin-receptor-like kinase chez les mammifères, complexifiant et élargissant la réponse cellulaire. Enfin, il est essentiel de garder à l'esprit que les différences entre les mammifères et les invertébrés représentent des inconvénients potentiels pour la modélisation des maladies humaines. Premièrement, bien qu'environ 60% des gènes impliqués dans des pathologies humaines aient des orthologues chez la drosophile, il existe une part non négligeable du patrimoine génétique qui n'est pas conservé entre les insectes et mammifères, alors même qu'elle peut avoir une implication notamment dans les maladies génétiques complexes, tels que la SA. On notera toutefois que c'est le cas des gènes du CMH et que malgré cela des effets fonctionnels de ces gènes ont pu être révélées chez la drosophile transgénique. Deuxièmement, les rôles et signalisations croisées de la voie BMP peuvent ne pas être conservées. Troisièmement, la moindre complexité du génome de la drosophile implique que des gènes non-essentiels chez les mammifères peuvent l'être ou conduire à des phénotypes pléiotropes chez la drosophile, ce qui peut les rendre plus difficiles à étudier.

Néanmoins, la drosophile, mais aussi l'ensemble des modèles expérimentaux « simples », présentent des atouts importants et peuvent donc être utilisée comme première étape pour décortiquer des mécanismes moléculaires et l'implication de certains gènes dans les pathologies humaines. Les travaux menés sur ces modèles ont ainsi permis d'identifier des processus clés pouvant être autrement difficilement accessibles de part la grande complexité du système humain.

Perspectives

Mes travaux montrent l'intérêt de la drosophile pour la compréhension des mécanismes à la base de la physiopathologie de la SA. Il nous paraît important de mettre à profit les avantages de ce modèle. Plusieurs perspectives de ce projet pourront être développées :

- Bien que le système immunitaire adaptatif joue un rôle important dans la physiopathologie des SpA, il est maintenant bien décrit que les cellules du système immunitaire inné, notamment d'origine myéoïde, telles que les macrophages ou cellules dendritiques, sont impliquées dans le développement de la maladie. La drosophile présente un équivalent de ces cellules phagocytaires mononuclées, le plasmatoctyte, qui présente des fonctions très similaires à celles des mammifères. De manière intéressante, nous avons montré que l'expression des sous-types de HLA-B27 associées à la SpA ciblée dans les plasmatoctytes de drosophile provoquait une réduction de l'espérance de vie des mouches **[Figure 28]**. Plusieurs causes hypothétiques peuvent être proposées pour expliquer ce phénotype. Même si nous avons écarté le rôle du stress du RE dans le phénotype *crossveinless*, nous ne pouvons exclure qu'HLA-B27 induise un stress du RE qui ait un impact sur les plasmatoctytes. Alternativement, HLA-B27 pourrait favoriser la mort des plasmatoctytes, perturber leur différenciation ou leur fonction.

- Les cellules immunitaires jouent un rôle majeur dans le contrôle de l'homéostasie intestinale lors d'une infection. Les plasmatoctytes sont notamment impliqués dans le maintien de la prolifération des cellules souches intestinales [315]. Le phénotype de réduction de l'espérance de vie des mouches induit par les formes d'HLA-B27 associées à la SA dans les plasmatoctytes, pourrait être lié à une perturbation de cette homéostasie intestinale. De ce fait, il nous paraît important d'étudier l'impact de l'expression des transgènes HLA-B sur la prolifération, la mort cellulaire, la différenciation des différents types cellulaires qui composent le tissu intestinal. Ces données sont d'autant plus importantes qu'une perturbation de l'homéostasie intestinale associée à une perméabilité intestinale accrue a été décrite les patients atteints de SpA [86].

- L'effet de HLA-B27 dans l'intestin, que ce soit par son expression dans les plasmatoctytes ou dans d'autres cellules de l'intestin, pourrait affecter le microbiote ou les interactions avec le microbiote. De récentes études mettent en évidence un rôle important du microbiote dans la physiopathologie de la SA [78]. Il serait intéressant d'étudier la perturbation du microbiote intestinal de la drosophile, lors de l'expression des différents transgènes HLA-B, afin d'identifier les mécanismes moléculaires pouvant être reliés au déséquilibre de l'homéostasie microbienne.

- Que nous nous intéressions à l'intestin ou au système immunitaire, le rôle de l'interaction mise en évidence entre HLA-B27 et la voie BMP devra être approfondie. Plus largement, la signalisation BMP interagit de manière très étroite avec la signalisation TGF- β , puisqu'elles partagent certains récepteurs et ligands, que ce soit chez la drosophile ou chez les mammifères. L'importance potentielle de la signalisation TGF- β est soulignée par son rôle majeur dans le processus d'inflammation, qui est une caractéristique majeure de la SA. De ce fait, il paraît important d'étudier cette voie de signalisation dans un contexte d'expression des transgènes HLA-B et de pouvoir identifier un éventuel déséquilibre de signalisation, puis de rechercher des mécanismes similaires chez les patients atteints de SA.

- L'ensemble des résultats obtenus avec le modèle drosophile devront être confirmé dans d'autres systèmes expérimentaux, tels que le modèle du rat transgénique HLA-B27 ou les cellules/tissus de patients atteints de SpA. L'ensemble de ces travaux permettront d'ouvrir de nouvelles pistes pour la compréhension du rôle pathogène du HLA-B27 et notamment de son implication dans l'inflammation, l'homéostasie intestinale et dans la perturbation du microbiote qui paraissent des facteurs clés de la physiopathologie des SpA.

Conclusion

Quarante cinq ans après la découverte du lien entre HLA-B27 et la SpA, les mécanismes moléculaires sous-jacents restent encore inconnus. En conséquence, il est temps de changer notre façon de penser et d'utiliser des approches encore inexplorées.

En raison de la complexité du système biologique que représente l'Homme, et de la difficulté d'obtention de tissus provenant de la colonne vertébrale ou des articulations de patients atteints de SpA, il est important de développer et d'utiliser des modèles animaux et cellulaires pour mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires liés à une pathologie.

Les nombreux avantages de la drosophile en font un modèle idéal pour la compréhension de certains mécanismes moléculaires impliqués dans des pathologies humaines. L'utilisation de *Drosophila melanogaster* a permis de mettre en évidence un nouveau rôle potentiel de HLA-B27 dans la pathogenèse des spondyloarthrites. La perturbation de la signalisation BMP par cette molécule du CMH-I, présente une nouvelle vision des mécanismes moléculaires retrouvés dans la physiopathologie des SpA. L'implication de cette voie de signalisation BMP corrèle fortement avec plusieurs données de la littérature de la SpA. Des altérations génétiques du gène codant ALK2 sont couramment retrouvées dans la FOP, dont les manifestations cliniques s'apparentent à celles d'une SA avancée, bien que son développement soit différent. Des études plus approfondies doivent être menées pour mieux caractériser le rôle de cette voie de signalisation dans la pathogenèse de la SpA.

Nos résultats démontrent la pertinence qu'il peut y avoir à l'utilisation des modèles animaux pour la recherche de nouveaux indices pour la compréhension des maladies multifactorielles complexes. Cependant chaque modèle possède des avantages et des inconvénients. Il est donc important d'obtenir une vision globale de ces travaux et de les relier entre eux pour comprendre toute l'étendue de la physiopathologie des maladies humaines.

Bien que HLA-B27 soit le facteur de prédisposition génétique majeur des SpA, il ne résume pas, à lui seul, toute l'étendue de la pathologie. Des patients atteints de SpA ne présentent pas forcément cet allèle, et inversement, la plupart des patients présentant l'allèle *HLA-B27* ne développeront pas la maladie. Les facteurs environnementaux et les autres facteurs génétiques découverts à ce jour renforcent la complexité de cette maladie. De ce fait, il reste de nombreuses questions à explorer pour mieux comprendre l'ampleur de cette maladie, afin d'établir par la suite, de nouveaux traitements et de futures thérapies pour ces patients.

Introduction

"Although finding fruit flies in your wine or beer can be a bit annoying, I hope people will pause to admire the tenacity of these clever little creatures. They are really just hungry animals looking for something to eat, and have no intention of ruining your happy hour."

Michael Dickinson

Résultats

Résultats complémentaires

Discussion

Annexes

Références bibliographiques

Annexe I : Article 2

En tête : PERK/ATF4 dependent-ER stress response is regionalized in wing imaginal discs of *Drosophila*

Le RE joue un rôle majeur dans de nombreuses fonctions physiologiques, telles que la synthèse protéique et lipidique, l'homéostasie calcique, et la régulation des activités mitochondriales. Une perturbation de l'une de ces fonctions peut conduire à une accumulation de protéines mal-conformées, perturbant l'homéostasie cellulaire et déclenchant un stress du RE. Une réponse adaptative appelée UPR est alors mise en place pour rétablir l'équilibre cellulaire, par l'activation de trois senseurs canoniques appelés PERK, IRE1, et ATF6, permettant notamment l'expression de gènes codant des protéines chaperonnes, ou bien favorisant la dégradation des protéines mal-conformées par l'activation de la voie ERAD. Dans le cas où ce stress reste non résolu, ces mêmes senseurs conduisent à l'activation de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire et la mort cellulaire. L'accumulation de protéines mal-conformées peut donc être toxique pour les cellules pouvant générer de nombreuses maladies métaboliques et dégénératives. *Drosophila melanogaster* est un puissant modèle génétique permettant l'étude des mécanismes liés au stress du RE. Les principaux senseurs de l'UPR y sont conservés, ce qui pourrait permettre une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires liés au stress du RE et la recherche de nouveaux traitements médicamenteux. Mon équipe d'accueil a développé un nouveau modèle de stress chronique, reposant soit sur l'expression ectopique d'une forme mutante de la rhodopsine (Rh^{G169D}), soit par la surexpression du gène codant la préséniline (*Psn*) dans le disque imaginal d'aile de la drosophile. L'induction de ce stress dans le domaine *vestigial* du disque imaginal d'aile, conduit à deux réponses physiologiques indépendantes mais contrôlées par la voie PERK/ATF4. D'une part, l'activation de l'apoptose dépendante des caspases est provoquée par la répression transcriptionnelle de *death-associated inhibitor of apoptosis 1 (diap1)*. D'autre part, l'induction d'un retard de développement médié par la voie *Slpr/JNK/Dilp8* pour la compensation de la mort des cellules stressées. Récemment, les travaux de Zhang *et al.*, ont mis en évidence que la déplétion du gène *dDad1*, codant une enzyme impliquée dans la N-glycosylation, conduisait à l'induction d'un stress du RE et à la mort cellulaire dans le disque imaginal d'aile. L'induction de ce stress dans le domaine *engrailed* du disque imaginal d'aile entraînait également l'activation de l'apoptose par la voie PERK/ATF4 mais de façon dépendante de la voie *Mekk1/Wallenda/JNK*. Par conséquent, selon le stress induit dans le disque imaginal d'aile de drosophile, la réponse induite par PERK/ATF4 semble être différente. Nous avons émis deux hypothèses : soit l'activation de cette réponse cellulaire est dépendante de la nature du stress, soit cette réponse cellulaire est dépendante de la position des cellules stressées dans le tissu.

Pour répondre à cette question, nous avons utilisé le système UAS-GAL4 qui nous permet de synthétiser Rh^{G169D} ou *Psn*, soit dans les cellules du domaine *vestigial*, soit dans les cellules du domaine *engrailed*.

Nous avons observé que l'expression de nos transgènes induisait un stress du RE dépendant de la voie PERK/ATF4. La synthèse de Rh^{G169D} et de *Psn* dans le domaine *vestigial* conduit à l'apoptose indépendamment de la voie JNK. Au contraire, l'expression de ces transgènes dans le domaine *engrailed*, conduit à une apoptose dépendant de la voie *Mekk1/Wallenda/JNK*, similairement à la déplétion de *dDad1*. Nos résultats démontrent que la signalisation pour l'activation de l'apoptose par l'UPR ne dépend pas de l'origine du stress, mais dépend de la position des cellules dans le tissu de l'aile de la drosophile.

The endoplasmic reticulum unfolded protein response varies depending on the affected region of the tissue but independently from the source of stress

Author names and affiliations

Jessica Perochon^{1,2}, Benjamin Grandon¹, Delphine Roche¹, Christine Wintz¹, Yohan Demay¹, Jean-Marc Corsi¹, Bernard Mignotte¹, Sébastien Szuplewski^{1,*}, Sébastien Gaumer^{1,*}

¹ Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire, EA4589, UVSQ/Université Paris-Saclay, EPHE/PSL Research University, Montigny-le-Bretonneux, France

² Wolfson Wohl Cancer Research Centre, Institute of Cancer Sciences, University of Glasgow, Garscube Estate, Switchback Road, G61 1QH Glasgow, United Kingdom.

*Corresponding authors. Address: Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire, EA4589, UVSQ/Université Paris-Saclay, EPHE/PSL Research University, 2 rue de la source de la Bièvre, 78180 Montigny-le-Bx, France.

Phone: +33 1 70 42 94 55

Fax: +33 1 70 42 94 15

E-mail address: sebastien.szuplewski@uvsq.fr (S. Szuplewski) or sebastien.gaumer@uvsq.fr (S. Gaumer, Orcid # 0000-0002-2720-771X)

Abstract Accumulation of unfolded proteins and calcium dyshomeostasis induce endoplasmic reticulum (ER) stress, which can be resolved by the Unfolded Protein Response (UPR). We have previously reported that activation of the PERK/ATF4 branch of the UPR, by overexpressing *Presenilin* in part of *Drosophila* wing imaginal discs, induces both a caspase-dependent apoptosis and a *Slpr/JNK/Dilp8*-dependent developmental delay that allows compensation of cell death in the tissue. Recently, *dDad1* depletion in *Drosophila* in *engrailed*-expressing cells of wing imaginal discs was also reported to activate the PERK/ATF4 branch but induced *Mekk1/JNK*-dependent apoptosis. Here, we assessed whether the stressed cell location in the wing imaginal disc could explain these differences in response to chronic ER stress or whether the stress source could be responsible for the signaling discrepancy. To address this question, we overexpressed a Rhodopsin-1 mutant prone to aggregate either in *vestigial* or *engrailed* expressing cells. We observed similar responses to the *Presenilin* overexpression in the *vestigial* domain and to the *dDad1* depletion in the *engrailed* domain. Therefore, the consequences of a PERK/ATF4 branch activation depend on the position of the cell in the *Drosophila* wing imaginal disc, suggesting interactions of PERK signaling with developmental pathways involved in the determination or maintenance of wing domains.

Keywords UPR, PERK, apoptosis, homeostasis, wing imaginal disc

Introduction

The endoplasmic reticulum (ER) is the first site of the eukaryotic secretory pathway. After or during their synthesis, proteins that will transit this pathway are translocated into the ER where they are folded and glycosylated. Failure in these processes results in the accumulation of misfolded and aggregating proteins that tend to become toxic to the cell, leading to devastating pathologies including diabetes, atherosclerosis, neurodegenerative and renal diseases (Wang and Kaufman 2012). An adaptive response, known as the Unfolded Protein Response (UPR), normally prevents such accumulation by resolving the stress or eliminating the cell (Bravo et al. 2013). In mammals, three major signaling pathways, referred as “UPR arms”, activate the transcription of genes involved in the ER stress response. They are named according to their upstream ER transmembrane sensor *i.e.* IRE1 (Inositol Requiring Enzyme 1), PERK (double-stranded RNA-activated Protein kinase (PKR)-like ER Kinase) or ATF6 (Activating Transcription Factor 6). *Drosophila* orthologs of these sensors have been linked to the UPR (Kim et al. 2015; Ryoo 2015).

The first *in vivo* characterization of the UPR to a strong chronic ER stress in *Drosophila* described the answer to a *Rhodospin-1^{G69D}* (*Rh-1^{G69D}*) mutant-encoded protein (Ryoo et al. 2007). This misfolded and aggregation-prone light detecting protein leads to a retinal degeneration, which mimicks Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa (ADRP). Overexpression of a transgene carrying this mutant allele during cell differentiation in larval eye imaginal discs induces an apoptosis, which seems UPR-independent but triggered by a Cdk5-Mekk1-JNK signaling (Kang et al. 2012).

We have previously reported a different mode of apoptosis induction in a chronic ER stress provoked by overexpression of a Presenilin encoding transgene in a subpopulation of *vestigial*-expressing cells of larval wing imaginal discs (Demay et al. 2014). Presenilins are eight to nine-pass transmembrane proteins described to function as the catalytic subunit of the γ -secretase complex. They are also known for their role in Ca^{2+} homeostasis in mammalian cells (Stutzmann et al. 2007; Rybalchenko et al. 2008; Cheung et al. 2008; Hayrapetyan et al. 2008) as well as in *Drosophila* ((Michno et al. 2009), our unpublished results). *Psn* overexpression in wing imaginal discs activates the PERK/ATF4 branch of the UPR, resulting in the transcriptional repression of *diap1* (*Drosophila inhibitor of apoptosis 1*), and thus in a caspase-dependent apoptosis. Independently from cell death regulation, PERK/ATF4 also induced a Rac1/Slipper (Slpr)/JNK/*Drosophila* insulin-like peptide 8 (Dilp8) pathway in the dying cells (Demay et al. 2014). Dilp8 delayed the general development, increasing the period of cell proliferation in the wing disc, thereby favoring tissue homeostasis (Colombani et al. 2012; Garelli et al. 2012).

The discrepancy in the role of JNK signaling between these models suggests that response to ER stress could vary depending on the ER stress type, the cell status (proliferating vs. differentiated) or the tissue type (wing vs. eye imaginal disc). A recent report implies an additional hypothesis, which is the position of the stressed cells in a tissue. Indeed, impinging on N-glycosylation by depletion of a subunit of the oligosaccharyltransferase encoded by *defender against apoptotic cell death 1* in *engrailed*-expressing cells of wing imaginal discs provokes a chronic ER stress, leading to the activation of the PERK/ATF4 branch of the UPR, which in turn induces a Mekk1 /JNK-dependent apoptosis (Zhang et al. 2016).

In this study, we tested whether the position of the stressed cells in a tissue -such as the wing imaginal disc- could explain the difference in UPR signaling. We used the *UAS-GAL4* system to drive a *UAS-Rh-1^{G69D}* transgene either by *vg-GAL4* or *en-GAL4*, the two drivers used in the previous contrasted studies. As expected, we observed ER stress and activation of the PERK/ATF4 branch of the UPR. As predicted by the hypothesis, PERK/ATF4 triggered different responses according to the location of the cells. Therefore, responses to PERK/ATF4 activation do not seem to depend on the origin of ER stress but depends on the cell location in the *Drosophila* wing imaginal disc.

Methods

Drosophila crosses and strains

Flies were raised on standard corn-agar medium at 25°C. Transgene expression was performed using the UAS-GAL-4 system. Wing imaginal disc expression was driven in the dorso-ventral boundary by *vg-Gal4* or in the posterior domain by *en-GAL4e16-E*. *Drosophila* strains could carry the *dilp8*^{M100727} protein-trap-generating mutation (Bl#33079), *UAS-xbp1::EGFP* (Souid et al. 2007) or *TRE-red-2L* (Chatterjee and Bohmann 2012) reporter genes.

A new *UAS-Rh-1*^{G69D} insertion has been generated by a classical remobilization of the *P* element described in (Colley et al. 1995). It has been selected for its ability to provoke a fully penetrant notched-wing phenotype when driven by *vg-GAL4*.

Stocks obtained from the Bloomington *Drosophila* Stock Center (NIH P40OD018537) were used in this study: *UAS-att4-RNAi* (Bl#25985) from the Transgenic RNAi Project (TRIP). The *UAS-slpr-RNAi* (ID 106449), *UAS-Cdk5-RNAi* (ID 104491), *UAS-Mekk1-RNAi* (ID 110339), *UAS-hep-RNAi* (ID 109277) and *UAS-bsk-RNAi* (ID 104569) strains were obtained from the Vienna *Drosophila* RNAi Center (VDRC, Vienna, Austria). The efficiency of RNAi transgenes targeting *att4*, *lre1*, *slpr*, *hep* and *bsk* mRNAs was previously verified (Demay et al. 2014). Genetic background control strains were selected according to the different transgenic lines we used. The *y,w[1118];P{attP,y[+], w[3]}* (ID 60100) line was used as a control for the KK library hosted by the VDRC, and *P{CaryP}attP2* (Bl#25710) for the TRIP V20 library. Canton S flies were used as a reference for the other strains.

Immunostaining, TUNEL assay and microscopy

Immunostaining, TUNEL assay, microscopy and image processing were realized as described in (Demay et al. 2014). The following primary antibody was used: rabbit anti-Dcp-1 (Asp216, Cell Signaling, Danvers, MA, USA, 1:50). Transverse sections were computationally generated after reslicing confocal stacks using ImageJ.

RNA extraction and RT-qPCR

RNA extraction and RT-qPCR were performed as previously described (Demay et al. 2014).

Quantifications

Stainings were quantified using Image J. The mean intensity of the imaginal disc area without staining was subtracted to the total imaginal disc mean intensity. The difference was then divided by the mean intensity of the imaginal disc area without staining to normalize data. ANOVA statistical analysis was done when data followed a normal distribution. Otherwise, a Mann-Whitney U test was performed.

Results

***Rh-1^{G69D}* expression in the dorso-ventral boundary cells induces a similar response to Presenilin overexpression**

We chose to overexpress *Rh-1^{G69D}* as a source of ER stress for two reasons. Firstly, this stressor was previously validated when its expression in the *Drosophila* eye imaginal disc was shown to display a strong chronic ER stress (Ryoo et al. 2007). Secondly, potential *Rh-1^{G69D}*-induced ER stress in the wing disc should only be due to the accumulation of misfolded Rh-1 since the Rh-1-encoding gene is not expressed in wing imaginal discs. Therefore, it is most unlikely that ectopic aggregate-prone Rh-1 has any function in this tissue.

As expected, *Rh-1^{G69D}* expression driven by *vg-GAL4* activated the IRE1 arm of the UPR, as reported by the *xbp1::EGFP* reporter (Online Resource 1), and induced apoptosis, as assayed by immunostaining with an anti-cleaved Dcp-1 caspase antibody (Fig. 1). Apoptosis is induced by the PERK/ATF4 arm of the UPR in both the *Psn*-induced ER stress model (Demay et al. 2014) and after *dDad1* depletion (Zhang et al. 2016). We thus tested whether apoptosis induction is similar when *UAS-Rh-1^{G69D}* is driven by *vg-GAL4*. Expression of *perk-RNAi* or *atf4-RNAi* significantly diminished anti-cleaved Dcp-1 immunostaining in this new ER wing imaginal disc cell stress model (Fig. 1), confirming the prevalence of the PERK/ATF4 pathway in the induction of apoptosis after ER stress in the wing imaginal disc.

The PERK/ATF4 arm of the UPR activates the JNK signaling pathway in both chronic ER stress models in wing imaginal discs (*i.e.* *Psn* overexpression and *dDad1* loss of function) (Demay et al. 2014; Zhang et al. 2016). On the opposite, JNK activation by *Rh-1^{G69D}* expression seems independent of the UPR in the eye imaginal disc (Kang et al. 2012). We thus tested whether this observation could be recapitulated by *vg-GAL4*-driven *Rh-1^{G69D}* expression. Activated AP1 -the downstream transcription factor of the JNK pathway- was observed in wing imaginal stressed cells, as reported by a *TRE::RFP* transgene (Chatterjee and Bohmann 2012)- (Fig. 1). We assessed whether this activation depended on the PERK/ATF4 branch. *RNAi*-mediated depletion of PERK and ATF4 significantly reduced JNK activation in cells expressing *Rh-1^{G69D}* (Fig. 1), showing that independently from the stress source, ER stress at the dorso-ventral boundary triggers a PERK/ATF4/JNK signaling. *Rh-1^{G69D}*-induced apoptosis has been reported to be mediated by a Cdk5/Mekk1/JNK pathway in eye imaginal discs (Kang et al. 2012). Similarly, ER stress-induced apoptosis due to *dDad1* depletion in the posterior part of the wing imaginal disc depends on the JNK pathway (Zhang et al. 2016). By contrast, we have previously shown that ER stress-induced cell death is JNK-independent in response to *Psn* overexpression in the dorso-ventral boundary of the wing disc (Demay et al. 2014). Therefore, we tested whether *Rh-1^{G69D}* expression-induced apoptosis depended on the JNK pathway in this domain of wing imaginal discs. The JNK Bsk and JNKK Hep were depleted by specific *RNAi*s in the presence of *Rh-1^{G69D}*. Reduction of transcript levels of *bsk* or *hep* did not modify cleaved Dcp-1 immunodetection (Fig. 2). These results suggest that the apoptosis activation mode by the UPR does not depend on the source of stress but on the tissue and even more on the localization in the tissue, here the *vg-GAL4* expression domain in the wing imaginal disc.

We have previously reported that *Psn* overexpression driven by *vg-GAL4* activates a JNK pathway involving the Rac1 small GTPase and the MAP3K Slpr to up-regulate *dilp8* expression (Demay et al. 2014). We thus wondered whether this JNK pathway plays a similar role in wing imaginal disc cells expressing *Rh-1^{G69D}*. Indeed, *Rh-1^{G69D}* induced *dilp8* expression and the depletion of Bsk or Slpr significantly reduced this induction, whereas Mekk1 depletion had no effect, (Fig. 3A) as monitored with a *dilp8::EGFP* reporter gene (Garelli et al. 2012) and quantitative RT-qPCR (Fig. 3B). Similarly, depletion of Rac1 significantly reduced *dilp8* transcripts levels (Fig. 3C). These results indicate that the previously described *Psn* overexpression-induced JNK pathway is also

induced by a *vg-GAL4*-driven *Rh-1^{G69D}* expression. Altogether, our data support the hypothesis that the role of the JNK signaling pathway in the ER stress UPR depends on the stressed cells location but not on the source of the stress.

Rh-1^{G69D} expression in posterior cells induces a similar response to dDad1 depletion

According to the stressed cell location hypothesis, *Rh-1^{G69D}* expression driven by *en-GAL4* in the posterior compartment of the wing imaginal disc should induce a similar response to dDad1 depletion in this domain, *i.e.*: an activation of PERK/ATF4 pathway which in turn induces a Mekk1/JNK pathway-dependent apoptosis (Zhang et al. 2016).

As expected, *Rh-1^{G69D}* expression driven by *en-GAL4* activated the JNK signaling pathway, as reported by a *TRE::RFP* transgene, and induced apoptosis, as assayed by anti-cleaved Dcp-1 immunostaining (Fig. 4). Moreover, both responses depended on the PERK/ATF4 branch of the UPR. Indeed, *RNAi*-mediated depletion of PERK or ATF4 significantly reduced JNK activation and apoptosis induction in cells expressing *Rh-1^{G69D}*, confirming that PERK/ATF4 branch activates JNK signaling in wing imaginal disc. JNK Bsk and JNKKK Mekk1 were depleted by using previously validated *RNAis* directed against the transcripts encoding these proteins (Demay et al. 2014; Zhang et al. 2016). We observed a significant decrease of cleaved Dcp-1 immunodetection in these conditions (Fig. 5), showing that apoptosis is induced by a Mekk1/JNK pathway.

Altogether, these results validate the hypothesis that the position of stressed cells in the wing imaginal disc determines the role and the nature of the JNK signaling pathway activated by the most prevalent arm of the UPR in this tissue, *i.e.* the PERK/ATF4 pathway.

Discussion

In the present study, by using the ectopic expression of *Rh-1^{G69D}* as a unique stressor, we generalize the previous observations made in the wing imaginal disc on the responses to chronic ER stress induced by *vg-GAL4*-driven *Psn*-overexpression (Demay et al. 2014) and *en-GAL4*-driven dDad1 depletion (Zhang et al. 2016). Contrarily to what was observed in eye imaginal discs (Kang et al. 2012), *Rh-1^{G69D}* expression either in the dorso-ventral boundary or the posterior cells of wing imaginal discs induces a PERK/ATF4-dependent apoptosis, suggesting that this sensor is the prevalent arm of the UPR in *Drosophila* wing imaginal discs which face chronic ER stress. Moreover, these data show that the same stressor induces different pathways in different tissues (eye vs wing imaginal disc), pointing out the tissue-specificity of ER stress responses (Fig. 6).

We have previously reported that the notched-wing phenotype induced by *vg-GAL4* driven *Psn* overexpression is due to the imbalance between ER stress-induced cell death and an extended period of proliferation allowed by a *Dilp8*-dependent developmental delay (Demay et al. 2014). Ectopic expression driven by *vg-GAL4* of *Rh-1^{G69D}* confirmed these results, and in particular, that *dilp8* expression is induced by a Rac1/SIpr/JNK pathway. Interestingly, this pathway differs from the signaling described for a neoplastic growth of the wing imaginal disc (Andersen et al. 2015). Indeed, depletion of *Avalanche/Syntaxin 7* activates a *Grindelwald/Traf2/Tak1/JNK* pathway, which induces *dilp8* expression. This discrepancy could result from either a difference in the type of stress (polarity loss/neoplastic growth vs chronic ER stress) or the region of the disc (wing pouch vs dorso-ventral boundary). Further studies should help to discriminate between these hypotheses.

A recent study pointed out that the transcriptional response to pharmacologically-induced ER stress differed from the response to luminal load by unfolded proteins in mammalian cells (Bergmann et al. 2018). Our results and the literature indicate that different sources of ER stress (aggregate prone proteins, calcium misregulation, inhibition of N-glycosylation) trigger the same PERK-ATF4 pathway when affecting the same tissue domain. This apparent discrepancy may be explained by a lack of specificity of chemical drugs that trigger ER stress.

In the present study, we report that the role of the JNK pathway that is activated by PERK/ATF4 differs according to the position of the cell in the wing imaginal disc. Indeed, expression of *Rh-1^{G69D}* induces a JNK-dependent apoptosis in posterior cells, whereas cell death is JNK-independent at the dorso-ventral boundary. Interestingly, cells at this frontier support an increase in mechanical tension at the level of their adherens junctions (Aliee et al. 2012; Michel et al. 2016) and Rac1 seems necessary to recruit the actin at the adherens junctions (Eaton et al. 1995). One may wonder whether the activation of a Rac1/JNK pathway at the dorso-ventral boundary is related with the strength of cell bonds at this location of the wing imaginal disc and thus potentially contributing to the specific functional role of these cells throughout the development of the wing tissue.

The results of this study push further the concept of tissue-specificity of ER stress responses to the regions of a same tissue, here the wing imaginal disc. Our study illustrates the importance to be careful when generalizing ER stress responses between cell types. This should be taken into account when targeting UPR branches to treat diseases.

Acknowledgements

Confocal image acquisition and analysis were performed at the CYMAGES imaging facility. We acknowledge D. Bohmann, B. Mollereau, the Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC, Vienna, Austria) and Drosophila Bloomington Stock Center (Bloomington, IN, USA) for providing fly stocks and the Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa, IA, USA) for providing monoclonal antibodies.

References

- Aliee M, Röper J-C, Landsberg KP, et al (2012) Physical mechanisms shaping the Drosophila dorsoventral compartment boundary. *Curr Biol* 22:967–976. doi: 10.1016/j.cub.2012.03.070
- Andersen DS, Colombani J, Palmerini V, et al (2015) The Drosophila TNF receptor Grindelwald couples loss of cell polarity and neoplastic growth. *Nature* 522:482–486. doi: 10.1038/nature14298
- Bergmann TJ, Fregno I, Fumagalli F, et al (2018) Chemical stresses fail to mimic the unfolded protein response resulting from luminal load with unfolded polypeptides. *J Biol Chem* 293:5600–5612. doi: 10.1074/jbc.RA117.001484
- Bravo R, Parra V, Gatica D, et al (2013) Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. *Int Rev Cell Mol Biol* 301:215–290. doi: 10.1016/B978-0-12-407704-1.00005-1
- Chatterjee N, Bohmann D (2012) A versatile PhiC31 based reporter system for measuring AP-1 and Nrf2 signaling in Drosophila and in tissue culture. *PLoS One* 7:e34063. doi: 10.1371/journal.pone.0034063
- Cheung K-H, Shineman D, Müller M, et al (2008) Mechanism of Ca²⁺ disruption in Alzheimer's disease by presenilin regulation of InsP3 receptor channel gating. *Neuron* 58:871–883. doi: 10.1016/j.neuron.2008.04.015
- Colley NJ, Cassill JA, Baker EK, Zuker CS (1995) Defective intracellular transport is the molecular basis of rhodopsin-dependent dominant retinal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3070–3074
- Colombani J, Andersen DS, Léopold P (2012) Secreted peptide Dilp8 coordinates Drosophila tissue growth with developmental timing. *Science* 336:582–585. doi: 10.1126/science.1216689
- Demay Y, Perochon J, Szuplewski S, et al (2014) The PERK pathway independently triggers apoptosis and a Rac1/Slpr/JNK/Dilp8 signaling favoring tissue homeostasis in a chronic ER stress Drosophila model. *Cell Death Dis* 5:e1452. doi: 10.1038/cddis.2014.403
- Eaton S, Auvinen P, Luo L, et al (1995) CDC42 and Rac1 control different actin-dependent processes in the Drosophila wing disc epithelium. *J Cell Biol* 131:151–164
- Garelli A, Gontijo AM, Miguela V, et al (2012) Imaginal discs secrete insulin-like peptide 8 to mediate plasticity of growth and maturation. *Science* 336:579–582. doi: 10.1126/science.1216735
- Hayrapetyan V, Rybalchenko V, Rybalchenko N, Koulen P (2008) The N-terminus of presenilin-2 increases single channel activity of brain ryanodine receptors through direct protein-protein interaction. *Cell Calcium* 44:507–518. doi: 10.1016/j.ceca.2008.03.004
- Kang M-J, Chung J, Ryoo HD (2012) CDK5 and MEKK1 mediate pro-apoptotic signalling following endoplasmic reticulum stress in an autosomal dominant retinitis pigmentosa model. *Nat Cell Biol* 14:409–415. doi: 10.1038/ncb2447
- Kim A-Y, Seo JB, Kim W-T, et al (2015) The pathogenic human Torsin A in Drosophila activates the unfolded protein response and increases susceptibility to oxidative stress. *BMC Genomics* 16:338. doi: 10.1186/s12864-015-1518-0
- Michel M, Aliee M, Rudolf K, et al (2016) The Selector Gene apterous and Notch Are Required to Locally Increase Mechanical Cell Bond Tension at the Drosophila Dorsoventral Compartment Boundary. *PLoS ONE* 11:e0161668. doi: 10.1371/journal.pone.0161668
- Michno K, Knight D, Campusano JM, et al (2009) Intracellular calcium deficits in Drosophila cholinergic neurons

expressing wild type or FAD-mutant presenilin. PLoS ONE 4:e6904. doi: 10.1371/journal.pone.0006904

Rybalchenko V, Hwang S-Y, Rybalchenko N, Koulen P (2008) The cytosolic N-terminus of presenilin-1 potentiates mouse ryanodine receptor single channel activity. *Int J Biochem Cell Biol* 40:84–97. doi: 10.1016/j.biocel.2007.06.023

Ryoo HD (2015) *Drosophila* as a model for unfolded protein response research. *BMB Rep* 48:445–453

Ryoo HD, Domingos PM, Kang M-J, Steller H (2007) Unfolded protein response in a *Drosophila* model for retinal degeneration. *EMBO J* 26:242–252. doi: 10.1038/sj.emboj.7601477

Soud S, Lepesant J-A, Yanicostas C (2007) The *xbp-1* gene is essential for development in *Drosophila*. *Dev Genes Evol* 217:159–167. doi: 10.1007/s00427-006-0124-1

Stutzmann GE, Smith I, Caccamo A, et al (2007) Enhanced ryanodine-mediated calcium release in mutant PS1-expressing Alzheimer's mouse models. *Ann N Y Acad Sci* 1097:265–277. doi: 10.1196/annals.1379.025

Wang S, Kaufman RJ (2012) The impact of the unfolded protein response on human disease. *J Cell Biol* 197:857–867. doi: 10.1083/jcb.201110131

Zhang Y, Cui C, Lai Z-C (2016) The defender against apoptotic cell death 1 gene is required for tissue growth and efficient N-glycosylation in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 420:186–195. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.09.021

Figure 1: *Rh-1^{G69D}* expression at the wing disc dorso-ventral boundary induces both cell death and JNK pathway activation in a PERK/ATF4-dependent manner.

(A) Projections from confocal stacks of male third-instar larval wing imaginal discs immunostained with an anti-activated Dcp-1 antibody (top) and expressing the TRE reporter of JNK signaling (bottom). From left to right, genotypes are: *vg-Gal4/TRE-red-2L* (Ctrl), *vg-GAL4/TRE-red-2L; UAS-Rh1^{G69D}/+* (*Rh1^{G69D}*), *vg-GAL4/TRE-red-2L; UAS-Rh1^{G69D}/UAS-Atf4-RNAi* (*Rh1^{G69D}, Atf4^{RI}*), *vg-GAL4/TRE-red-2L; UAS-Rh1^{G69D}/UAS-Perk-RNAi* (*Rh1^{G69D}, Perk^{RI}*). (B) Quantification of apoptosis and JNK reporter stainings on wing discs of the previous genotypes. Error bars indicate S.E.M.. Statistical difference with the control is indicated by * if $p < 5\%$ or *** if $p < 10^{-3}$ (Mann-Whitney U test).

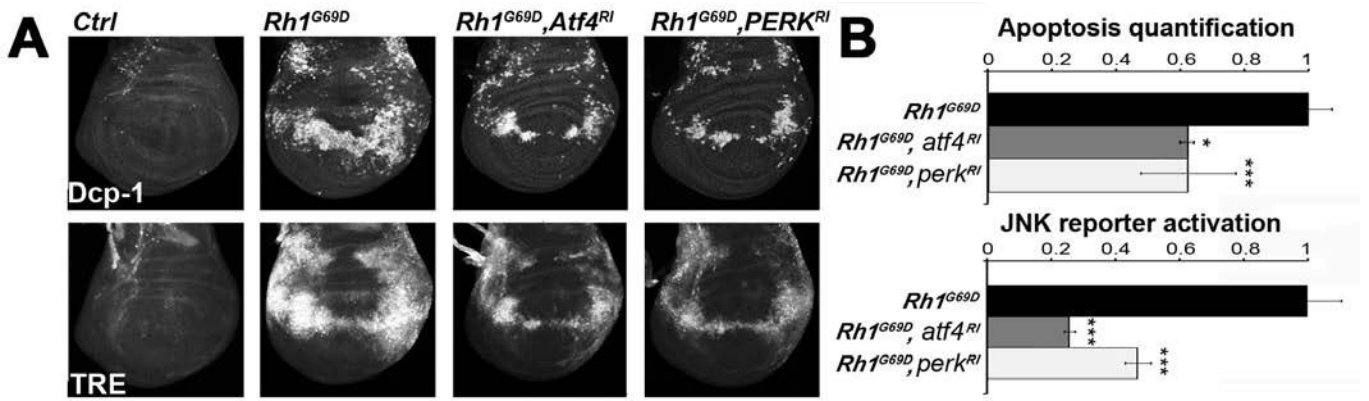


Figure 2: *Rh-1^{G69D}* expression-induced apoptosis in the wing disc dorso-ventral boundary is JNK-independent.

(A) Projections from confocal stacks of male third-instar larval wing imaginal discs immunostained with an anti-activated Dcp-1 antibody. From left to right, genotypes of control discs on the top row are *vg-GAL4/+*, *vg-GAL4/UAS-bsk-RNAi* and *vg-GAL4/UAS-hep-RNAi*. From left to right, wing imaginal discs expressing ectopically *Rh1^{G69D}* (bottom row) display the following genotypes: *vg-GAL4/+; UAS-Rh1^{G69D}/+*, *vg-GAL4/UAS-bsk-RNAi; UAS-Rh1^{G69D}/+* and *vg-GAL4/UAS-hep-RNAi; UAS-Rh1^{G69D}/+*. (B) Quantification of apoptosis stainings on wing discs for the previously described genotypes allowing *Rh-1^{G69D}* ectopic expression. Error bars indicate S.E.M.. The Mann-Whitney U test revealed no statistical difference.

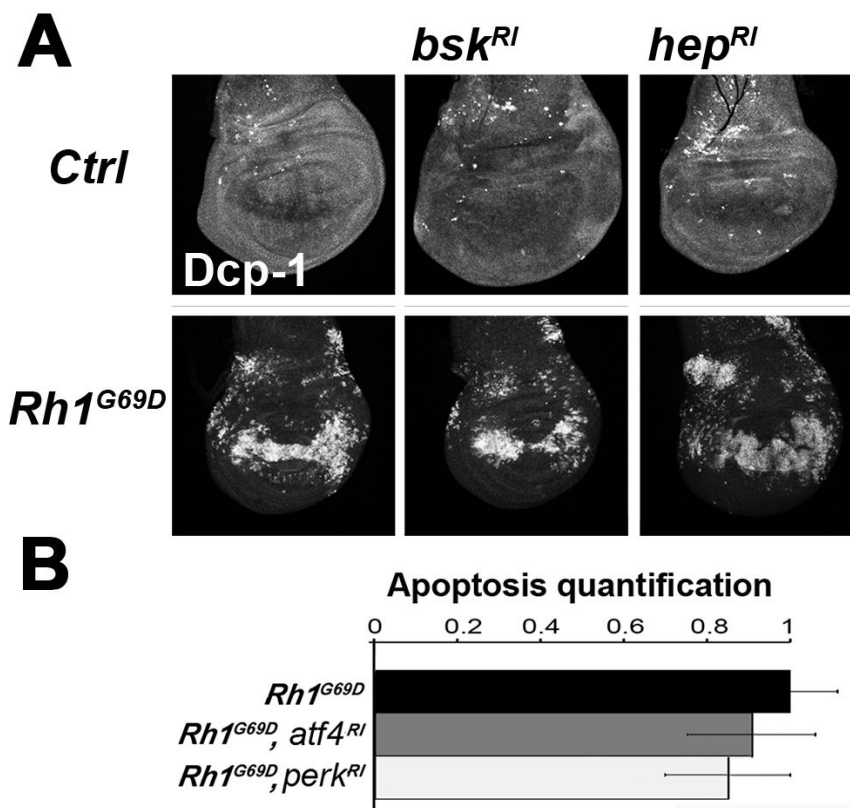


Figure 3: *Dilp8* expression in wing imaginal disc cells expressing *Rh-1^{G69D}* depends on the Rac1/Slpr/JNK pathway.

(A) Fluorescence intensity of GFP using a fire lookup table (Image J) reflecting the expression of a *dilp8::EGFP* reporter transgene in projections from confocal stacks of male third-instar larval wing imaginal discs. (Top row) From left to right, control genotypes are: *vg-GAL4/+; dilp8^{M100727}/+*, *vg-GAL4/UAS-Mekk1-RNAi; dilp8^{M100727}/+*, *vg-GAL4/UAS-slpr-RNAi; dilp8^{M100727}/+* and *vg-GAL4/UAS-bsk-RNAi; dilp8^{M100727}/+*. (Bottom row) From left to right, *Rh-1^{G69D}* expressing wing disc genotypes are: *vg-GAL4/+; dilp8^{M100727}/UAS-Rh1^{G69D}*, *vg-GAL4/UAS-Mekk1-RNAi; dilp8^{M100727}/UAS-Rh1^{G69D}*, *vg-GAL4/UAS-slpr-RNAi; dilp8^{M100727}/UAS-Rh1^{G69D}* and *vg-GAL4/UAS-bsk-RNAi; dilp8^{M100727}/UAS-Rh1^{G69D}*. (B) Quantification of Dilp8::EGFP was performed for the previously described genotypes allowing *Rh-1^{G69D}* ectopic expression. Error bars represent the S.E.M.. The asterisks indicate significant differences between the indicated genotype and its control ($p < 10^{-3}$, Mann-Whitney U test). (C) Dilp8 RNA levels measured by quantitative reverse PCR. Data represent mean \pm S.E.M. of three independent experiments. RNA was extracted from control (*vg-GAL4/+*, open bar), from ER stressed (*vg-GAL4/+; UAS-Rh1^{G69D}/+*, black bar) or from Rac1-depleted ER-stressed (*vg-GAL4 / UAS-rac1-RNAi; UAS-Rh1^{G69D}/+*, grey bar) wing imaginal discs. ** indicates a significant difference with the control ($p < 1\%$, Student's t-test).

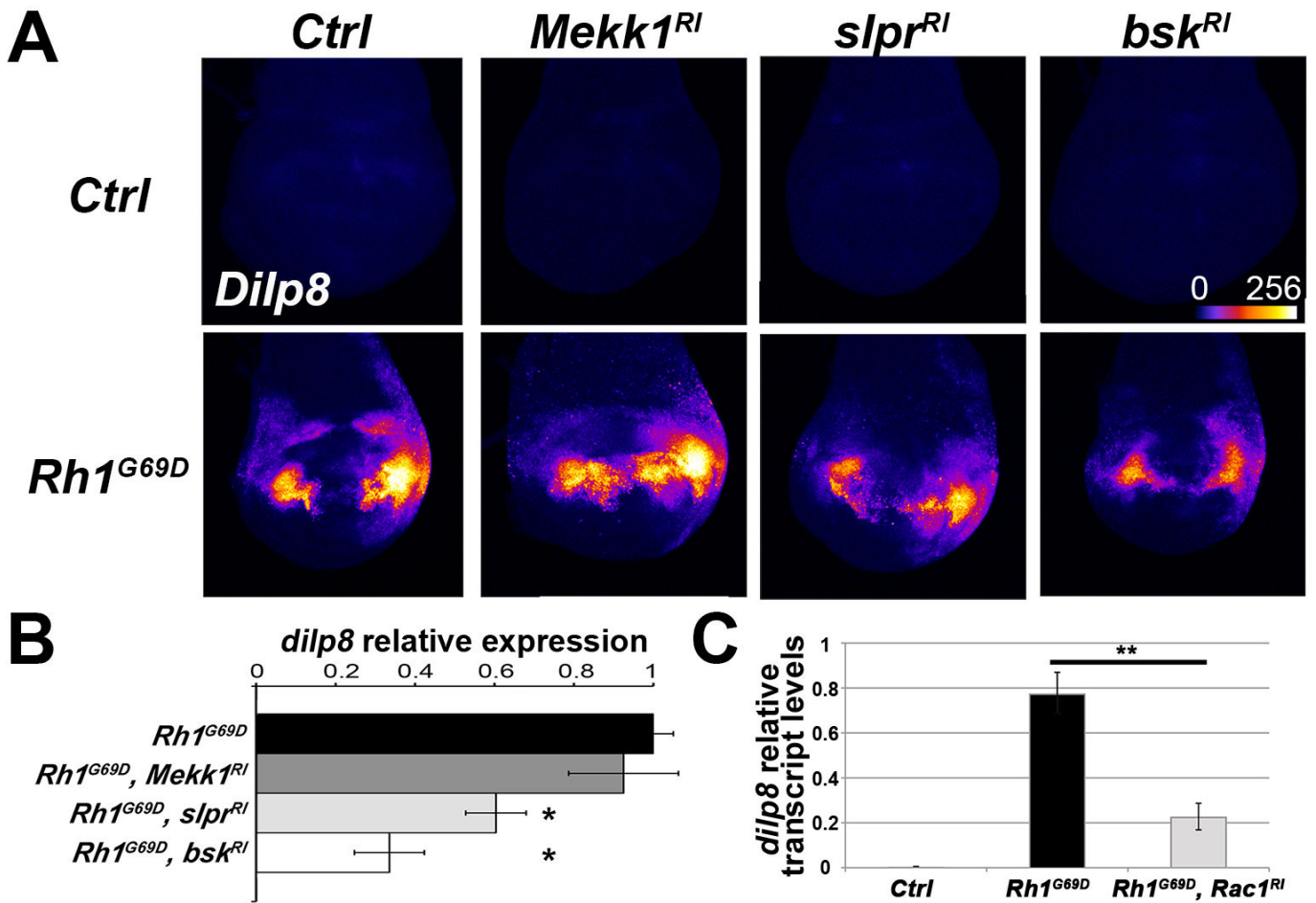


Figure 4: *Rh-1^{G69D}* expression in the wing posterior compartment activates both JNK signaling and apoptosis in a PERK/ATF4-dependent manner.

(A) Projections from confocal stacks of male third-instar larval wing imaginal discs expressing the TRE reporter of JNK signaling (top) and immunostained with an anti-activated Dcp-1 antibody (bottom). From left to right, genotypes are: *en-GAL4/TRE-red-2L; UAS-Rh1^{G69D}/+* (*Rh1^{G69D}*), *en-GAL4/TRE-red-2L; UAS-Rh1^{G69D}/UAS-Atf4-RNAi* (*Rh1^{G69D}, Atf4^{RI}*), *en-GAL4/TRE-red-2L; UAS-Rh1^{G69D}/UAS-Perk-RNAi* (*Rh1^{G69D}, Perk^{RI}*). (B) Quantification of apoptosis (top) and JNK reporter (bottom) stainings on wing discs of the previous genotypes. Error bars indicate S.E.M.. Statistical difference with the control is indicated by * if $p < 5\%$ or *** if $p < 10^{-3}$ (Mann-Whitney U test).

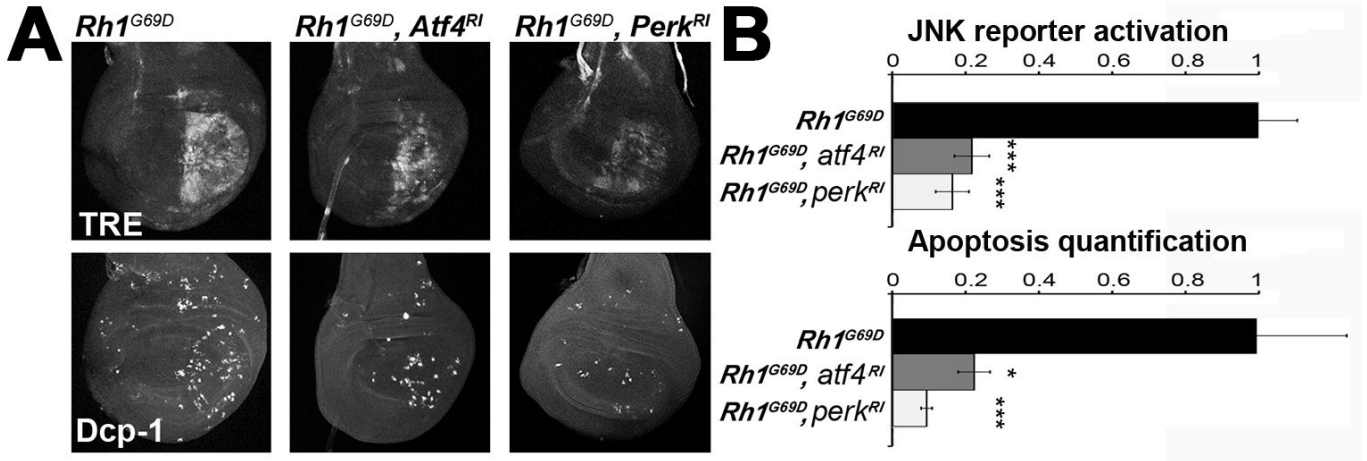


Figure 5: *Rh-1^{G69D}* expression in the wing posterior compartment induces a Mekk1/JNK-dependent apoptosis.

(A) Projections from confocal stacks of male third-instar larval wing imaginal discs immunostained with an anti-activated Dcp-1 antibody. From left to right, genotypes of wing imaginal discs expressing ectopically *Rh1^{G69D}* are: *en-GAL4/+; UAS-Rh1^{G69D}/+*, *en-GAL4/UAS-bsk-RNAi; UAS-Rh1^{G69D}/+* and *en-GAL4/UAS-Mekk1-RNAi; UAS-Rh1^{G69D}/+*. (B) Quantification of apoptosis stainings on wing discs of the previous genotypes. Error bars indicate S.E.M.. Statistical difference with the control is indicated by *** ($p < 10^{-3}$, Mann-Whitney U test).

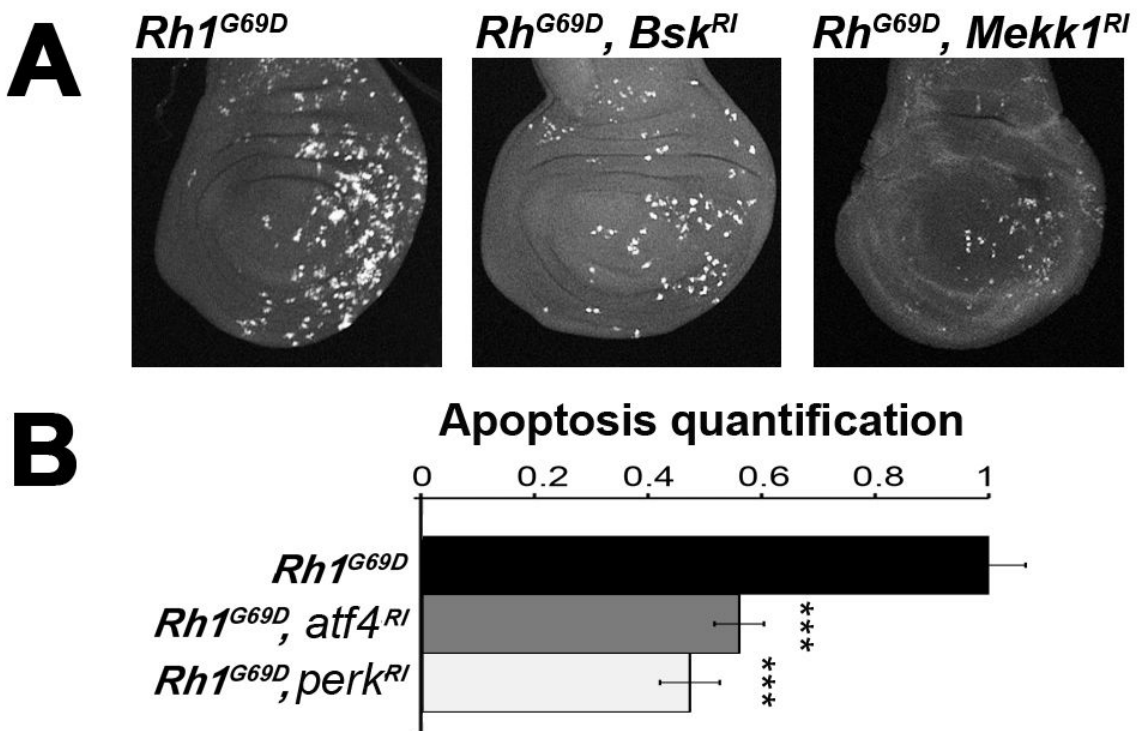
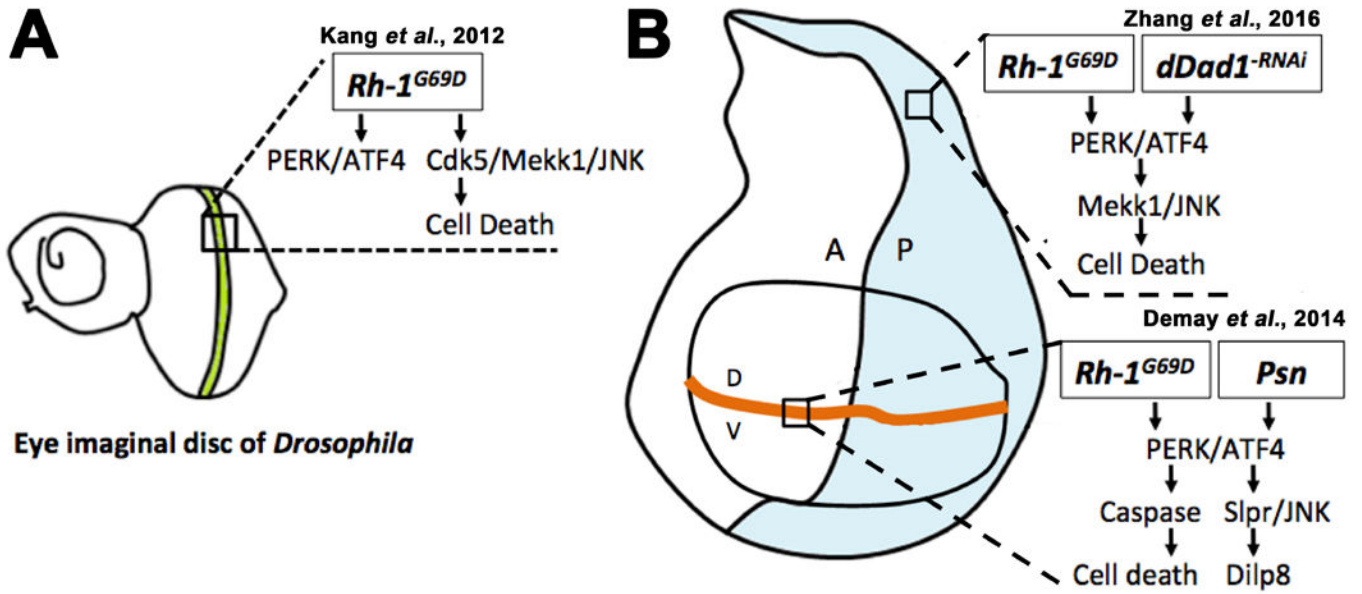


Figure 6: Proposed model of ER stress pathways in *Drosophila*.

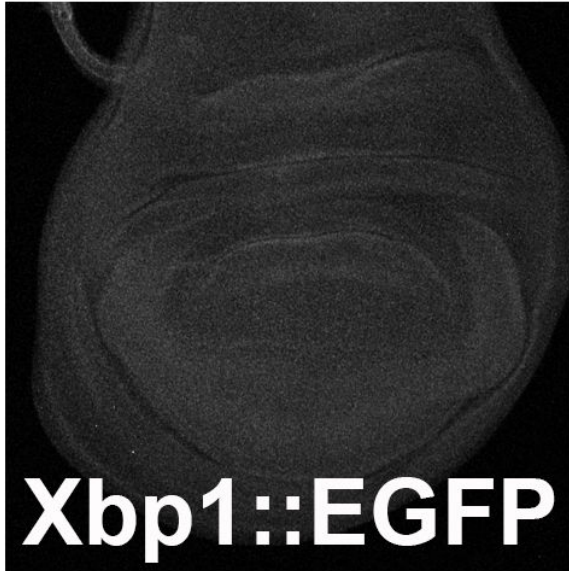
Mutated aggregation prone Rh1 induces different pathways depending on the tissue location. As in the eye (A), ectopic Rh1^{G69D} triggers a JNK-dependent cell death in the posterior compartment (blue domain) but not on the antero-posterior frontier (orange line) of the wing disc (B). Both mutant Rh1^{G69D} and depletion of dDad1, which is essential to N-glycosylation, induce the same unfolded protein response to ER stress in the posterior compartment of wing discs. On the dorso-ventral frontier, mutant Rh1^{G69D} activates a different unfolded protein response to ER stress, which is identical to the signaling induced by overexpressing the calcium-regulating *Psn*. Our data together with the literature strongly suggest that the ER stress source is not crucial to specify the cell response, while cell location is.



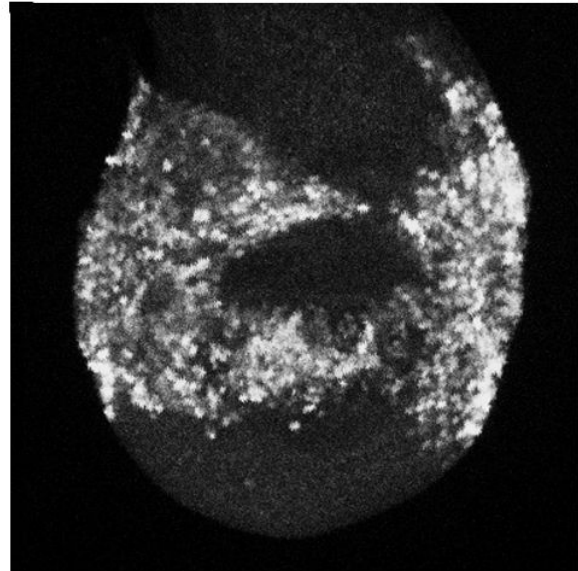
Online Resource 1: *Rh-1^{G69D}* expression at the wing disc dorso-ventral boundary triggers ER stress.

Projections from confocal stacks of male third-instar larval wing imaginal discs. Discs expressing an *Xbp1::EGFP* reporter gene, detected by anti-GFP immunostaining of the following genotypes *vg-Gal4/+; Xbp1::GFP/+ (Ctrl)* and *vg-GAL4/+; UAS-Rh1^{G69D}/Xbp1::GFP (Rh1^{G69D})*.

Ctrl



Rh1^{G69D}



Annexe II

En tête : Analyse par séquençage ciblé du nouveau locus de susceptibilité à la spondylarthrite ankylosante en 13q13

La spondylarthrite ankylosante (SpA) est un trouble inflammatoire chronique rhumatismal. Sa prévalence est de 0,42% en France, ce qui la place au deuxième rang des maladies inflammatoires chroniques, après la polyarthrite rhumatoïde. Elle se caractérise par des manifestations articulaires, telles que des lombalgies inflammatoires, une atteinte des enthèses et des articulations périphériques, ainsi que des manifestations extra-articulaires comme le psoriasis, l'uvéïte, et des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI).

L'étiologie de la SpA est multifactorielle, mais repose en grande partie sur l'association avec l'antigène HLA-B27. D'autres gènes ont été reconnus, associés au risque de SpA, par le biais d'analyses d'association et de liaison génétique. Néanmoins, l'ensemble de ces facteurs n'explique qu'une faible proportion de l'héritabilité de la maladie, et il reste encore de nombreux facteurs de susceptibilité à découvrir.

Une étude de liaison non paramétrique sur une cohorte familiale de patients atteints de SpA, menée au sein de notre laboratoire, a permis l'identification du locus 13q13 comme étant significativement associé à la pathologie.

Au vue de ces résultats, un séquençage ciblé de cette région chez les individus appartenant aux familles les plus liées, a été réalisé dans le but de rechercher des variants génétiques rares. Cette étude, dont les résultats sont présentés ici, met en évidence le gène *FREM2*, comme un nouveau facteur génétique potentiel d'association à la SpA. C'est la première fois que ce gène est mentionné dans cette pathologie, et à cet égard, il est encore difficile de déterminer un lien possible avec la pathologie

Une validation de ces nouveaux variants d'intérêts est actuellement en cours sur une plus grande cohorte de patients. D'autre part, des analyses plus approfondies des données de séquençage doivent être réalisées pour rechercher de nouveaux variants d'intérêts, pouvant avoir un rôle potentiel dans cette association, dans les régions intergéniques.

Introduction

I. Les facteurs génétiques de la spondylarthrite ankylosante

A. SpA et agrégation familiale

L'une des premières étapes pour l'étude génétique d'une maladie complexe repose sur la mise en évidence d'une agrégation familiale de la maladie. Pour démontrer l'existence d'une prédisposition familiale à une maladie, on étudie la prévalence de la maladie chez les différents membres de la famille. On détermine ainsi un risque relatif "familial" appelé *siblings* (noté : λ), qui correspond au rapport de la prévalence de la maladie chez les apparentés des personnes atteintes (parents, frères, sœurs ou enfants), avec celle d'apparentés du premier degré de témoins sains ou, par approximation, à celle de la population générale. Si cette valeur λ est égale à 1, aucune agrégation familiale n'est observée pour cette maladie. Au contraire, l'existence d'un risque familial augmenté ou diminué, se caractérise par des valeurs de risque relatif supérieures ($\lambda > 1$) ou inférieures à 1 ($\lambda < 1$), respectivement. [1].

Ce risque relatif "familial" peut être déterminé pour différents degrés de parenté (deuxième degré : oncles, tantes, neveux, grands-parents ou troisième degré : cousins germains).

L'étude de jumeaux monozygotes et dizygotes peut permettre de conforter l'existence d'une hérédité d'origine génétique pour une maladie ayant un caractère familial avéré. On peut ainsi déterminer le poids respectif des facteurs environnementaux et génétiques dans l'agrégation familiale. Pour cela, le taux de concordance est déterminé par le rapport entre le nombre de paires de jumeaux présentant deux individus atteints (jumeaux concordants) et le nombre de paires de jumeaux ne présentant qu'un seul individu atteint (jumeaux discordants). Ainsi, l'amplitude de différence des taux de concordances entre les jumeaux monozygotes et dizygotes, est le reflet du poids des facteurs génétiques.

Dans le cas de la SA, on observe clairement l'existence d'une agrégation familiale. Des données de méta-analyse ont permis d'estimer un indice λ de 40 pour les apparentés de premier degré, et une concordance entre les jumeaux monozygote supérieure à 50%, confortant l'implication des facteurs génétiques [2-6].

B. SpA et HLA-B27

C'est en 1973, que Caffrey et James ont identifié le premier facteur génétique de susceptibilité à la SpA [7]. Ces résultats ont été confirmés par la suite par Schlosstein *et al.* et Brewerton *et al.* [8-9]. Ces différentes études ont mis en évidence une forte association avec la présence de l'antigène HLA-B27 et le risque de SA, avec une prévalence supérieure à 90% des porteurs du HLA-B27 au cours de cette maladie [10]. Cette association a été confirmée par la suite dans de multiples études menées sur différentes cohortes du monde entier [11-14].

Le taux de concordance chez les jumeaux dizygotes concordants pour le HLA-B27 n'est toutefois que de 23%, alors qu'il est de 63% chez les jumeaux monozygotes, ce qui supporte en outre la contribution d'autres gènes que ceux du complexe majeur d'histocompatibilité [15].

Cependant, même si plus de 70% des patients atteints de SpA possèdent le HLA-B27, seulement 5% des porteurs de cet allèle seront touchés par la maladie. De plus, des patients, n'ayant pas l'antigène HLA-B27, développent la maladie, ce qui conforte l'existence de facteurs génétiques supplémentaires susceptibles d'influencer la prédisposition à cette pathologie [16].

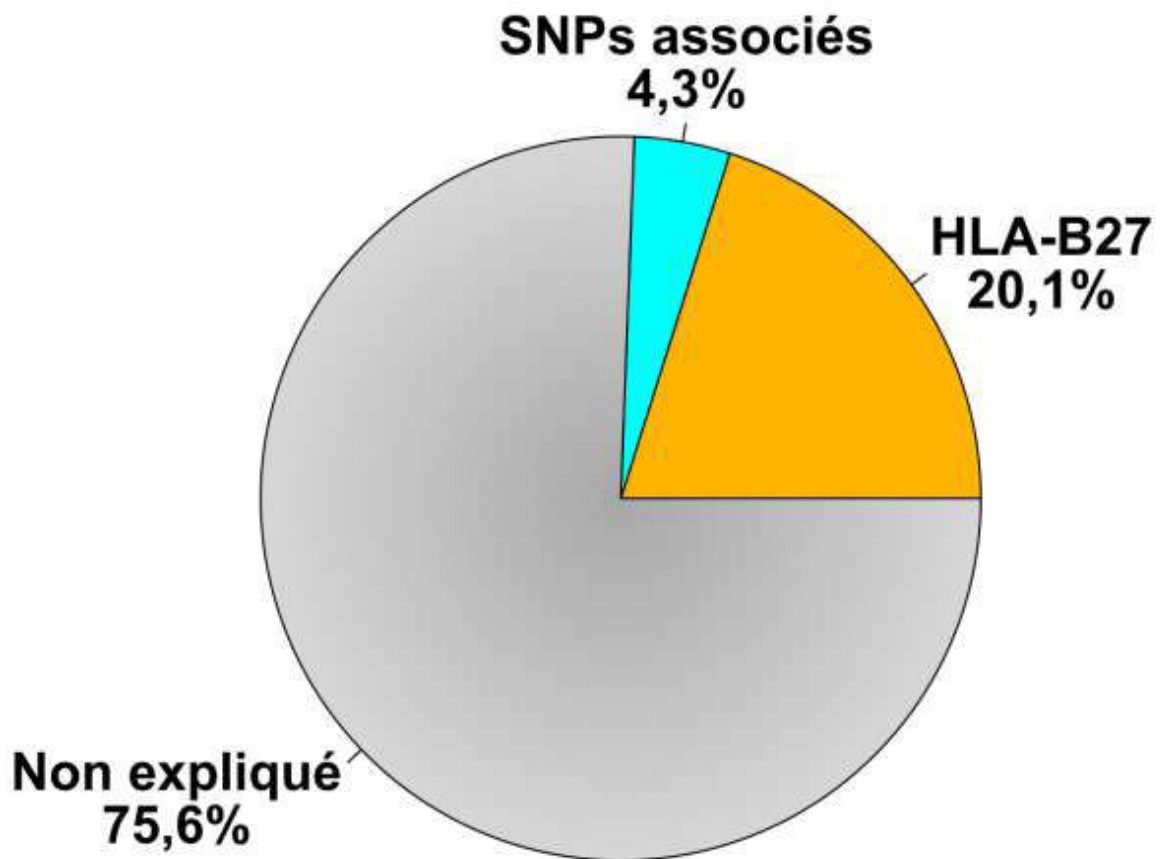


Figure 1 : Représentation de la part l'héritabilité génétique actuellement expliquée par les études d'association de la SpA

Le HLA-B27 représente la plus grande partie de l'association génétique connue de la spondylarthrite ankylosante. Les 13 autres gènes de susceptibilité identifiés en dehors de ce locus ne représentent à ce jour qu'une très faible fraction de la prédisposition à la maladie. La majorité de l'héritabilité reste encore inexpliquée [33].

C. Les autres facteurs génétiques du CMH

Les récentes études d'associations portant sur la SA ont permis de mettre en évidence d'autres allèles du complexe majeur d'histocompatibilité, en dehors du HLA-B27 [17].

Parmi les allèles du CMH-I, HLA-B60 et HLA-B*1403 semblent être clairement associés à la maladie [18-20]. D'autres études, portant sur des effectifs relativement modestes, ont montré une association avec les allèles HLA-B39, HLA-B40 et HLA-B52, mais ces résultats sont controversés [21-23].

Enfin, le HLA-A*0201 présente une association significative avec la SA, indépendamment du HLA-B27. Cependant, la présence de cette allèle conférerait un risque relatif relativement faible, avec des Odds Ratio de 1,21% chez les sujets HLA-B27 positif et de 1,36% chez les sujets HLA-B27 négatif [24]. Il n'existe à ce jour que peu d'études ayant porté sur le CMH-II. Certaines ont rapporté une association significative entre le HLA-DPA1 et le HLA-DPB1 et la SA, avec un risque relatif de 1,56. Néanmoins, l'interprétation de ces résultats reste toutefois délicate, du fait d'un trop faible effectif (137 patients), et de l'influence importante de l'allèle HLA-B27 dans l'analyse de ces données [17].

II. Les méthodes d'étude des facteurs génétiques prédisposant à la spondylarthrite ankylosante, en dehors du CMH

Comme il a été décrit précédemment, bien que l'allèle HLA-B27 soit présent chez une majorité de patients, moins de 5% des sujets HLA-B27 positifs développeront cette maladie. *A contrario*, des patients qui ne possèdent pas l'allèle HLA-B27 (notés HLA-B27 négatif) développent cependant cette maladie.

Ainsi, des données issues du consortium international sur la génétique de la SA ayant répertorié le plus important jeu de données génétiques en rapport avec la SA ont conclu que le HLA-B27 n'expliquerait que 20,1% de l'héritabilité génétique de la maladie [Figure 1].

L'ensemble de ces éléments tend à prouver qu'une grande part de l'héritabilité de cette maladie reste encore inconnue et suggère donc l'existence d'autres facteurs génétiques pouvant être associés à la SA [25]. C'est pour cela que différentes méthodes d'analyse à haut débit ont été mises en place pour la recherche de nouveaux gènes de susceptibilité, qu'il s'agisse d'études de liaison ou d'études d'associations [26].

A. Les études d'association

Les méthodes les plus couramment utilisées pour la recherche de marqueurs de susceptibilité à une maladie, sont les études d'association génétique [27]. Leur principe consiste à comparer la distribution des allèles ou des génotypes de marqueurs génétiques entre des groupes d'individus malades et témoins provenant d'une population de sujets non apparentés.

Avant l'apparition des nouvelles technologies de séquençage à haut débit, le principe des études d'association se basait sur l'approche dite "gène candidat". Dans le cas de la SpA, cette méthode a permis l'identification de certains gènes de susceptibilité. Toutefois, la plupart des résultats n'ont pas pu être répliqués de façon indépendante, remettant en question la fiabilité de telles associations.

Aujourd'hui, grâce à l'avancée des nouvelles technologies, le séquençage de l'ADN a prodigieusement évolué, ce qui a permis de réaliser des études d'associations génétiques sur le génome entier et portant sur de grands effectifs (GWAS : genome-wide association study). Il est important de noter, que ces analyses d'association ont néanmoins jusqu'à récemment présenté comme limite une l'analyse de *Single nucleotide polymorphism* (SNP) communs.

En effet, la détection des variants rares n'est habituellement pas couverte par ces techniques, en raison de leur faible fréquence dans la population générale [28].

Dans le cas de la SA, plusieurs études d'associations ont été réalisées afin de découvrir de nouveaux facteurs de susceptibilité génétique à la SpA en dehors du CMH [29-33]. Avant l'apparition des nouvelles technologies de séquençage, certains "gènes candidats" ont été identifiés comme pouvant être associés à la SpA. Cependant, l'incapacité de répliquer ces résultats de manière indépendante, ne permet pas d'assurer la fiabilité de leur conclusion. A partir de 2007, plusieurs études de type GWAS ont été menées dans le cas de la SA et ont abouti à des résultats plus convaincants. Les différents facteurs de susceptibilité à la SA, seront présentés dans les paragraphes suivants.

B. Les études de liaisons

Une autre méthode de recherche des facteurs génétiques de susceptibilité passe par l'étude d'individus apparentés, qui permet de révéler les corrélations significatives entre la ségrégation de marqueurs génétiques et celle de la maladie étudiée. Le but de l'analyse de liaison génétique est donc de localiser sur le génome les régions contenant des gènes de susceptibilité à la maladie, *via* le principe de co-ségrégation des allèles de marqueurs polymorphes avec le locus responsable de la maladie. Cette méthode se base donc, sur l'examen de la co-transmission d'une génération à l'autre, du phénotype et des marqueurs génétiques. La co-ségrégation de la maladie avec un haplotype particulier permet de définir une région liée au phénotype observé. Ensuite, cette région peut être séquencée ou annotée pour déterminer de façon plus précise quel est le variant génétique de susceptibilité [34].

Trois études de liaison génétique ont permis de mettre en évidence des régions chromosomiques significativement liées à la SpA [35-37]. La plus forte des liaisons détectées par ces analyses était la région du CMH. Néanmoins, cinq autres locus ont été identifiés, situés respectivement dans les régions 1p, 2q, 9q, 10q et 19q. Par ailleurs, le Groupe Français d'Etude Génétique de la SpA (GFEGS) a confirmé l'un de ces locus précédemment identifiés, en ciblant plus précisément sa localisation dans la région 9q31-34 [37].

C. Meta-analyses

La méta-analyse est une étude quantitative, basée sur des études de recherche antérieures, qui a pour objectif d'avoir une estimation plus précise de l'effet d'un facteur de risque d'une maladie, ou bien de l'effet d'un traitement. Les avantages de cette analyse sont de consolider des données de recherche sur un plus grand échantillon et dans différents groupes ethniques.

Dans le cas des SpA, deux méta-analyses ont été effectuées, se basant sur les trois études de liaisons précédemment décrites [38-39]. Ces méta-analyses différaient l'une de l'autre par leurs méthodes ; l'une se basant sur les analyses statistiques des précédentes études, et l'autre se basant sur les données brutes de génotypage. Leurs résultats ont permis de confirmer la liaison dans des régions précédemment décrites, à savoir les régions 9q et 10q, mais aussi la découverte de nouveaux locus de liaison, tels que des loci situés en 6q, 16q, 17p, 19p. Ces données soulignent bien l'intérêt potentiel des méta-analyses pour la recherche de nouveaux facteurs ou loci de susceptibilité à une maladie.

III. La recherche de nouveaux variants rares : Analyse de liaison non paramétrique d'une cohorte familiale

A. Une nouvelle analyse de liaison génétique

Dans le but de rechercher de nouvelles régions pouvant être associées à la SpA, notre équipe a réalisé une nouvelle analyse de liaison à l'échelle du génome entier. Pour cela, un ensemble de 143 familles multiplex (plusieurs membres de la famille sont atteints par la maladie), d'origine caucasienne, se composant de 914 sujets, dont 462 atteints de la SpA ont été recrutés [40].

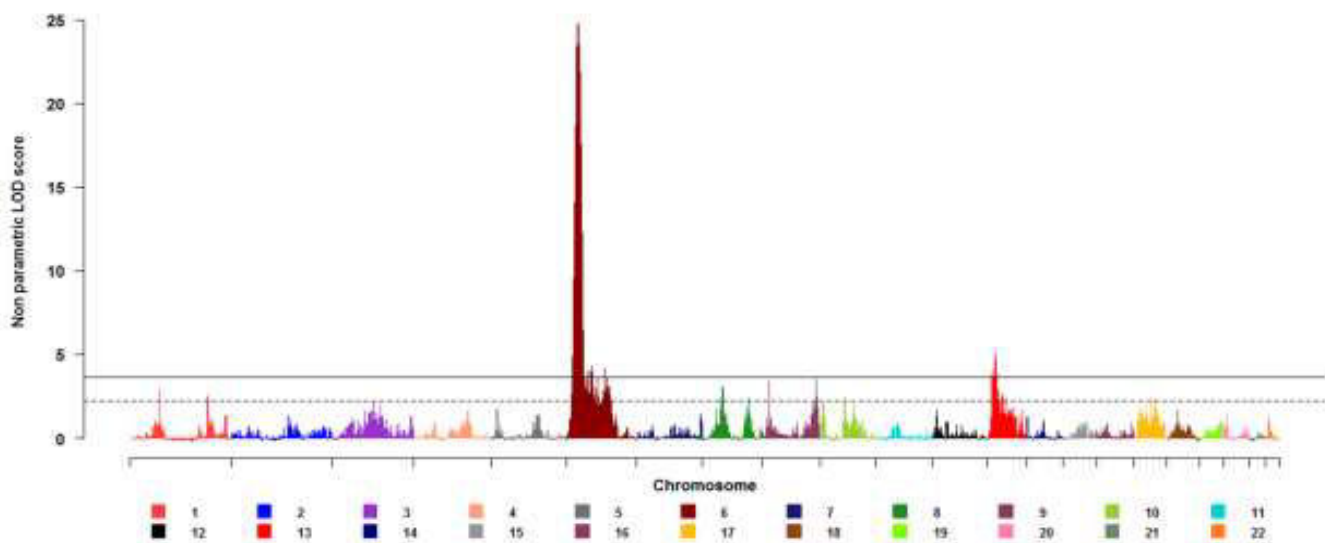


Figure 2 : Analyse de liaison non paramétrique à l'échelle du génome d'une cohorte familiale de patients atteints de SpA

L'axe x indique la position des marqueurs sur le génome. Chaque chromosome est représenté avec une couleur distincte. L'axe des ordonnées représente les LOD scores issus de l'analyse de liaison. La ligne pleine représente le seuil de significativité, tandis que la ligne en pointillés correspond au seuil de suggestivité. De manière attendue, le locus sur le chromosome 6p, correspondant à la région du CMH, est le plus significatif. Un nouveau locus situé en 13q13 dépasse le seuil de significativité. Quatre loci, situés au niveau des chromosomes 1, 7, 8, et 9, dépassent le seuil de suggestivité. Ces loci ont été précédemment décrits dans l'étude de l'IGAS.

A partir de l'ADN génomique de chaque sujet, un génotypage sur une puce Affymetrix 250k, suivi d'un contrôle qualité ont été réalisés. A partir de ces données, une analyse de liaison pour l'ensemble des chromosomes, ainsi qu'une reconstruction des haplotypes a été effectuée.

La SA est une maladie complexe et de ce fait, il y a une méconnaissance du modèle de transmission génétique de cette maladie (maladie autosomique ou lié ou chromosome X ; allèles dominants ou récessifs). Ainsi, l'estimation du mode héréditaire de transmission de la maladie est forcément imprécis. Par conséquent, une analyse de liaison paramétrique de cette maladie conduirait généralement à des erreurs de détection (faux négatifs ou faux positifs).

L'analyse de liaison non paramétrique est une méthode d'analyse de liaison "indépendante du modèle". Son but est de montrer que la transmission d'un segment chromosomique n'est pas compatible avec une ségrégation aléatoire, mais qu'au contraire, les patients héritent d'un même segment chromosomique parental plus souvent que ne le voudrait le hasard [41]. Pour ces raisons, c'est cette méthode qui a été réalisée, car elle ne tient pas en compte du mode héréditaire de transmission de la maladie pour la recherche de nouvelles régions de susceptibilités.

B. Identification de la région 13q13

L'analyse de l'ensemble de ces données a permis de mettre en évidence deux régions comme étant significativement liées à la SpA [**Figure 2**]. Les seuils de score de liaison (LOD score) considérés comme étant significatifs ou bien suggestifs étaient $> 3,65$ et $> 2,2$, respectivement.

La première région identifiée se situe sur le chromosome 6, correspondant au CMH, avec un LOD score maximum de 24,77. Ces résultats n'étaient pas incohérents, puisque plus de 92% des patients inclus dans cette étude étaient porteurs de l'allèle HLA-B27.

La seconde région, en dehors du CMH, qui a été trouvée comme étant significativement liée, se situe au niveau du locus 13q13, avec un LOD score maximum de 5,03.

De plus, 8 autres régions ayant des LOD scores suggestifs ont pu être identifiées, dont le locus SPA2 précédemment décrit [42-43]. Malgré le fait que ces nouvelles régions n'atteignaient pas le score de significativité et si l'on considère que le seuil de suggestivité correspond au risque statistique d'obtenir un seul faux-positif du fait du hasard, il est normal d'envisager ces régions comme étant potentiellement liées à la SpA, et pouvant ainsi faire l'objet de prochaines études.

Ces résultats sont les premiers à mettre en évidence une liaison significative entre le locus 13q13 et la SpA, renforçant l'intérêt de la réalisation d'études de liaison dans les maladies complexes.

Afin de cibler plus précisément la région d'intérêt pour la suite des études, les données issues des événements de recombinaison méiotique chez les patients appartenant aux familles les plus liées à la région (soit un total de 43 familles), a permis de restreindre la région 13q13 à un intervalle situé entre 38,753 Mb et 40,040 Mb, soit environ 1,3 Mb.

A l'aide des données de reconstruction des haplotypes, les SNP contenu dans cet intervalle et ségrégant avec la maladie, ont été testés pour leur association à la SpA dans les 43 familles les plus liées. Seul le SNP rs1945502, situé dans la région intergénique en amont du gène *FREM2*, était significatif. Ce variant a été détecté dans 22 familles sur les 43 les plus liées à la région 13q13.

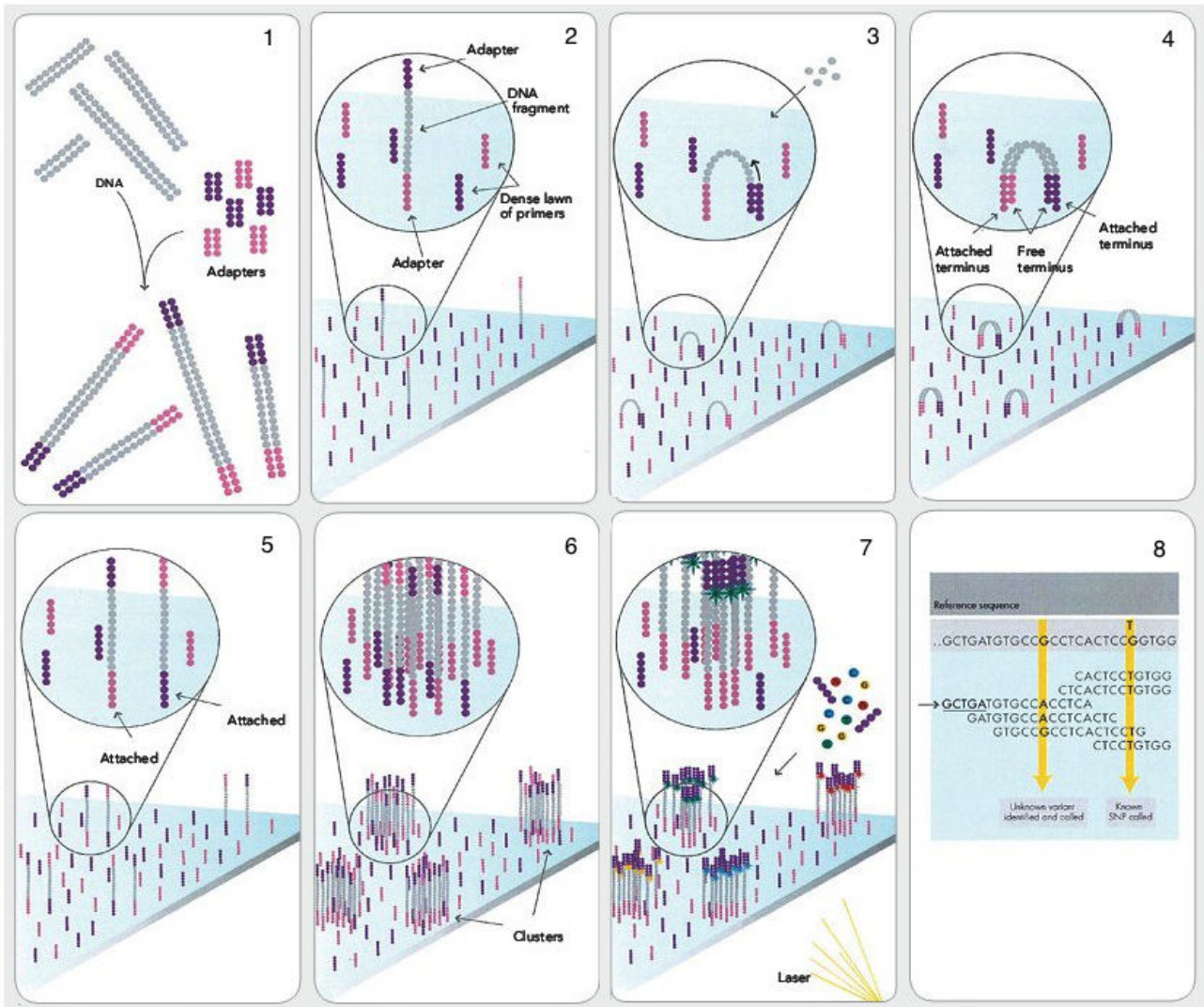


Figure 3: Principe du séquençage à haut débit à l'aide de terminateurs réversibles (Système Illumina)

Des adaptateurs sont ajoutés aux extrémités libres de l'ADN fragmenté (1), l'une des extrémités de l'ADN dénaturé est fixée sur un oligonucléotide complémentaire lui-même fixé sur une lame (2). On procède à une réaction de polymérisation dite en pont (Bridge PCR) avec un autre oligonucléotide anti-sens proche de l'extrémité libre de l'adaptateur pour former deux séquences complémentaires du même fragment d'ADN (3-5). Après plusieurs cycles, le fragment d'ADN initialement déposé forme un groupe de plusieurs millions de brins (6). L'incorporation de bases fluorescentes dans ces « clusters », permet la lecture de la séquence (7). Un alignement des différentes séquences est réalisé à l'aide de logiciels de bioinformatique (8) (<http://www.illumina.com>).

Résultats

I. Le séquençage ciblé de la région 13q13

C'est à l'issue de ces résultats publiés par l'équipe, que mon travail a débuté. Afin d'approfondir cette étude, un séquençage profond de la région 13q13 a été réalisé à partir de l'ADN de patients appartenant à des familles liées à cet intervalle.

A. Cohorte

Comme décrit précédemment, la cohorte se compose des 22 familles les plus liées à la région, soit un total de 71 individus constitués de 50 patients et 21 témoins. L'ensemble des patients étaient HLA-B27 positif, à l'exception d'une famille (#273) dont les patients étaient tous HLA-B27 négatifs. Aucune corrélation avec la sévérité de la maladie n'a été détectée chez les patients liés à cette région. La plupart des familles se composaient de 2 patients et d'1 témoin, à l'exception de 6 familles composées chacune de 3 patients et d'1 témoin. Toutes les personnes ont été recrutées par le Groupe Français d'Etude des Spondylarthropathies (GFEGS). Cette étude a été approuvée par les comités éthiques locaux de l'Hôpital Cochin (Paris), et de l'Hôpital Ambroise Paré (Boulogne Billancourt). Les sujets ont signé, après information, un formulaire de consentement avant leur participation au projet. Une évaluation complète des caractéristiques cliniques a été effectuée pour chaque volontaire participant.

B. Séquençage ciblé

Un séquençage profond ciblant la région 13q13 a été réalisé à partir de l'ADN de chaque individu sur une plate-forme Illumina NextSeq 500 [44]. Le principe de cette technique est le suivant :

- Après vérification de la qualité de nos différents échantillons, l'ADN est fragmenté par une réaction enzymatique issue du kit RapidCapture, puis purifié sur un système de billes magnétiques couplées à la streptavidine, afin d'obtenir des fragments d'environ 150 à 300 paires de bases. Les extrémités de chaque fragment sont réparées à l'aide d'une ADN polymérase, afin d'obtenir des extrémités franches, permettant la ligation d'adaptateurs universels à chaque extrémité. Ces adaptateurs se composent d'une séquence permettant leur identification et leur fixation sur une lame de verre chargée d'adaptateurs complémentaires aux adaptateurs des fragments (la flowcell). Après amplification, une dernière analyse est réalisée afin de vérifier la bonne longueur des fragments après ligation des adaptateurs.
- Les différents fragments d'ADN obtenus sont hybridés avec des sondes d'ADN spécifiques de la région 13q13, conçues à partir du génome de référence "human genome 19". Ainsi, seuls les fragments d'ADN d'intérêt sont capturés. Après élution des fragments hybridés, une étape d'amplification et de purification est réalisée.
- Chaque échantillon est déposé sur une flowcell. Après fixation des fragments, la flowcell est déposée dans le système Illumina pour un séquençage. Il se déroule en trois étapes **[Figure 3]**:

- premièrement, les fragments sont amplifiés par une réaction de polymérisation dite en pont ou "solid-phase-bridge" (les fragments forment un pont reconnu par une ADN polymérase et permettant d'initier l'amplification), par ajout de nucléotides non marqués, pour la formation de plusieurs copies d'un même fragment amplifié appelé "cluster".

- deuxièmement, après amplification, les « solid-phase-bridge » sont dénaturés laissant un adaptateur ancré sur la matrice, permettant d'initier l'étape de séquençage grâce à l'ajout d'une polymérase et de nucléotides marqués. Après excitation du marqueur du fluorochrome, une capture du photon émis est transmise à un système informatique, permettant de visualiser l'enchaînement de chacune des bases.

- troisièmement, une seconde lecture des fragments est réalisée par un système "paired-end", qui, par un processus de retournement chimique, inverse le sens des fragments pour une lecture inverse. Cette technique permet d'effectuer une double lecture, afin de réduire les marges d'erreurs.

C. Analyse bioinformatique des données

Après récupération de l'ensemble des résultats provenant du séquenceur Illumina, les données sont analysées par le système "Genome Analysis Toolkit" (GATK) [45]. Ces analyses se composent de trois étapes:

- Un prétraitement des données : dans une première phase, les données sont converties et compressées sous un format FastQ [46]. A partir du logiciel Cutadapt, les séquences correspondant aux adaptateurs sont éliminées [47]. Un contrôle qualité est réalisé par la suite par le logiciel Trimmomatic afin de mesurer la qualité et la quantité de lecture des séquences (profondeur de l'ordre de 100X) [48]. Les séquences sont ensuite alignées sur un génome de référence "human genome 19" : hg19.
- Un traitement des données : cette étape, réalisée par le logiciel PICARD, élimine les doublons de PCR issus de l'étape de séquençage, ce qui aurait pour conséquence de sureprésenter un allèle [49]. Un nouveau réalignement des séquences est alors établi, suivi d'un calibrage de chaque paire de bases par le logiciel BaseRecalibrator [50].
- Découverte des variants : à la suite de ces différentes étapes, l'ensemble des variants sont annotés par le biais de différents logiciels décrits dans le paragraphe suivant. Il en résulte un tableau présentant l'ensemble des variants pour tous les échantillons.

D. Découverte des variants

1) Logiciel

Les résultats obtenus présentent l'ensemble des variants prédits par le séquençage pour chaque échantillon. Ainsi sont représentés l'ensemble des SNP, mais aussi les petites délétions et insertions (indel) (moins de 20pb).

L'annotation des variants est une étape cruciale dans l'analyse des données de séquençage. Dans notre cas l'annotation a été réalisée à l'aide de 3 logiciels différents : Annotvar, SnpEff et Variant Effect Predictor (VEP) [51-53].

Ces logiciels ont pour but d'attribuer des informations fonctionnelles pour chaque variant issu du séquençage à partir d'une base de données de référence, telle que ENSEMBL, REFSEQ, UCSC, ou bien ENCODE pour les régions non codantes du génome. Les informations répertoriées pour chaque variant portent sur sa position dans le génome (chromosome, gènes affectés...), son emplacement (exon, intron, UTR, intergénique...), sa nature (SNP, indel...), sa conséquence (changement d'acide aminé, région de fixation de facteur de transcription,...), sa fréquence dans la population générale (à partir de bases de données de référence : 1000Genomes, NHLBI-ESP), avec des informations plus précises sur les mutations déjà connues comme associées à une pathologie (bases de données CLINVAR, Cosmic...).

Ces trois outils sont couramment utilisés pour l'annotation des variants. Cependant, ils diffèrent d'une application à une autre pour l'annotation des variants complexes [54]. L'une des principales difficultés réside dans le choix de la bonne base de données à utiliser. Par exemple, la base de données ENSEMBL présente un taux de cartographie du génome plus complet que REFSEQ ou UCSC. Cette différence réside essentiellement dans l'annotation des divers types d'ARN. De plus, certaines bases de données présentent les différents isoformes d'un gène, ce qui peut avoir pour conséquence plusieurs annotations plausibles d'un même variant. Enfin, il existe une véritable complexité d'interprétation pour l'annotation des pseudogènes, dont le niveau d'information disponible est encore très faible.

Quelques études ont été menées sur la comparaison des différents logiciels ou bien des différentes bases de données entre elles. Les résultats ont mis en évidence que l'annotation des variants reste difficile avec les outils actuels : les différents choix sur la façon d'analyser, de classer et de hiérarchiser les annotations pour un même variant conduisent à des résultats différents.

La différence d'annotation entre les logiciels est toutefois moins importante que celle entre bases de données. On observe ainsi une concordance d'environ 64% entre les outils ANNOVAR et VEP, mais une concordance de seulement 44% entre les bases de données ENSEMBL et REFSEQ. L'ampleur de ces différences montre bien l'attention particulière qui doit être accordée lors du choix d'un logiciel.

Il était donc important dans notre cas de pouvoir tester différents outils d'annotation, et de bases de données, pour mieux caractériser les variants d'intérêts pour la suite de notre étude.

2) *Filtration*

Les mutations et les polymorphismes sont deux types de variations génétiques. Les mutations sont des altérations peu fréquentes de la séquence normale de l'ADN qui ont des répercussions fonctionnelles délétères. Les polymorphismes sont des variations de la séquence d'ADN fréquentes au sein de la population, qui ont des effets fonctionnels mineurs ou nuls. Généralement, pour qu'un variant génétique ne soit pas considéré comme un polymorphisme, sa fréquence de l'allèle mineur dans la population doit être comprise entre 1% et 5% [55].

Pour information, à la sortie du séquenceur, nous avons obtenu un total de 7747 variants, tous échantillons confondus. Une étape de filtration a donc été entreprise afin d'extraire les variants d'intérêts. Pour cela, les variants ont été filtrés sur un seuil de fréquence de l'allèle mineur (MAF) inférieur à 5% dans la base de données 1000Genomes, afin d'éliminer les principaux polymorphismes existant dans la population générale, et de faire ressortir les variants rares [56].

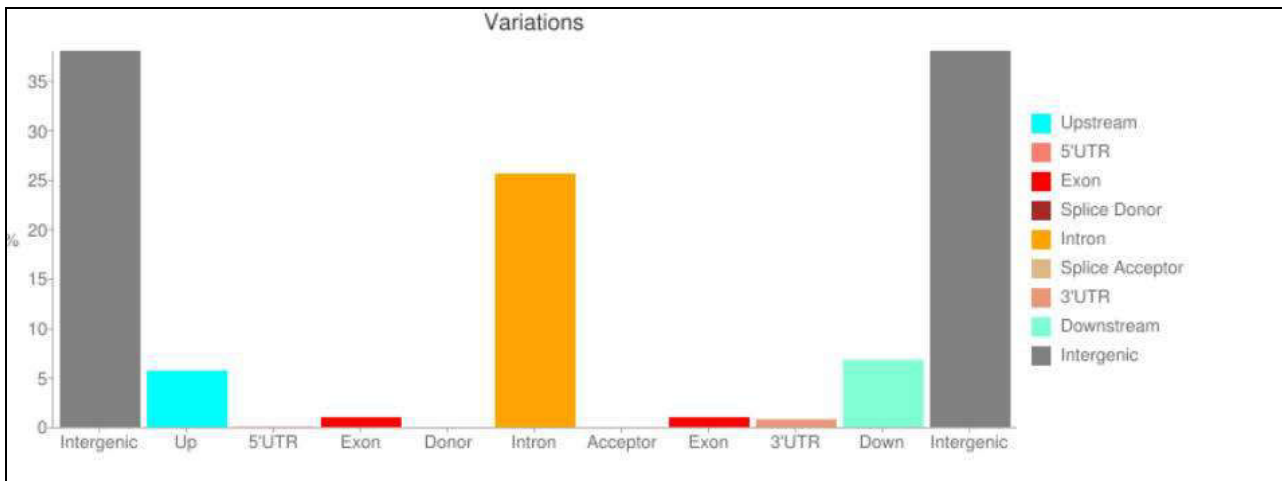


Figure 4: Répartition de l'ensemble des variants issue du séquençage de la région 13q13

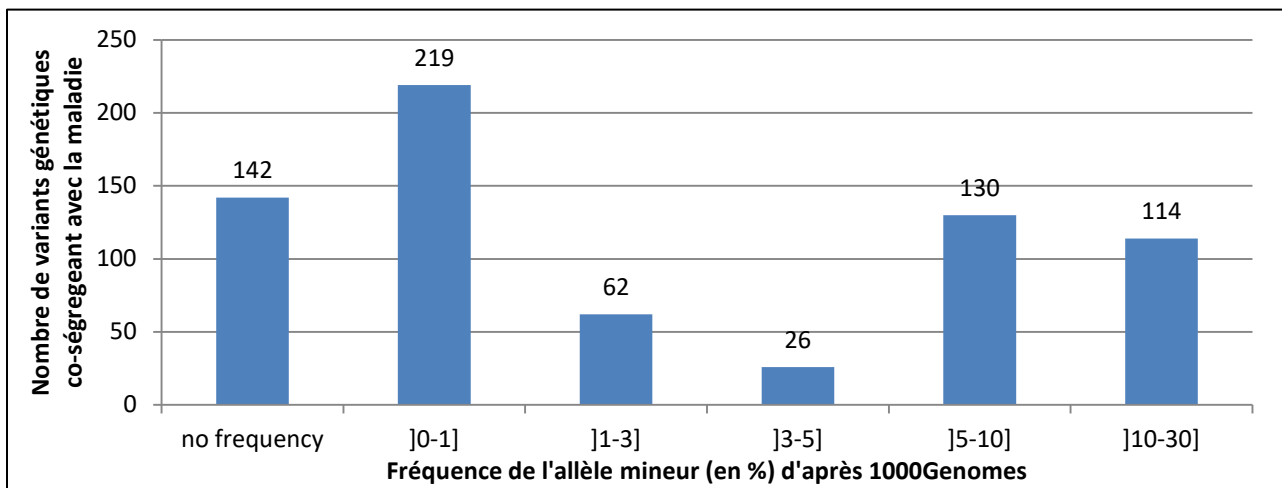


Figure 5 : Répartition des variants co-ségrégant avec la maladie en fonction de la fréquence de leur allèle mineur dans la population générale (d'après 1000Genomes).

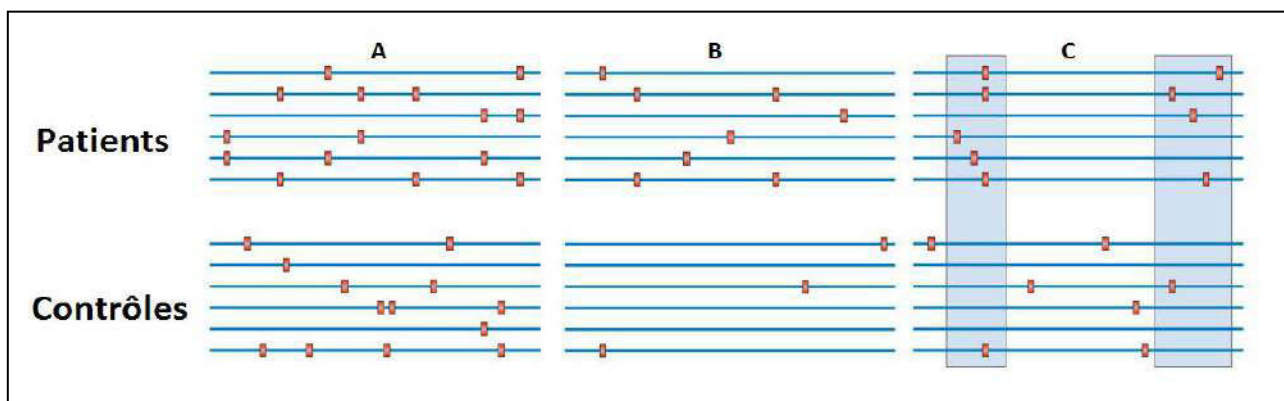


Figure 6 : Représentation des trois modèles d'analyses de la répartition des variants pour la recherche de variants causaux [28]

Les lignes bleues indiquent les régions génomiques. Les boîtes rouges indiquent les différents variants.

A) Les patients partagent plus de variants en commun que les témoins

B) La fréquence des variants rares fonctionnels est plus important chez les patients que chez les témoins.

C) La fréquence des variants est plus importante dans des régions génomiques spécifiques chez les patients que chez les témoins.

3) Les gènes de la région 13q13

La région 13q13, qui s'étend sur 1,3 Mb, contient 6 gènes (*UFM1*, *FREM2*, *STOML3*, *PROSER1*, *NHLRC3*, *LHFP*), dont les rôles ont été plus ou moins décrits. La protéine UFM1 (Ubiquitin-fold modifier 1) est un nouveau membre de la famille des ubiquitines, dont le rôle est encore largement inconnu [57]. *FREM2* (*FRAS1-related extracellular matrix protein 2*) code une protéine membranaire impliquée dans l'intégrité de l'épithélium [58]. *STOML3* (Stomatin-like protein 3) est un régulateur endogène de la sensibilité des canaux ioniques mécano-sensibles dans les neurones sensoriels et les sensations tactiles [59]. La protéine LHFP (Lipoma HMGIC fusion partner) est un partenaire de la protéine HMGIC, exprimée dans les tumeurs mésoenchymateuses et pouvant agir sur la régulation de la prolifération cellulaire [60]. Le rôle des protéines *PROSER1* (Proline and serine-rich protein 1) et *NHLRC3* (NHL repeat-containing protein 3) n'a jamais été décrit.

En dehors des gènes codant une protéine, on observe la présence de gènes codant un miRNA (*AL590007.1*), deux LncRNA (*LINC00437*, *LINC00366*) et de quatre pseudogènes (*PLA2G12AP2*, *ANKRD26P2*, *NXT1P1*, et *PRDX3P3*), mais aucune donnée n'est répertoriée sur leur rôle.

II. Analyse des variants de la région 13q13

A la sortie du séquenceur, nous avons obtenu un total de 7747 variants correspondant à 5962 SNP, 960 délétions, et 825 insertions. La couverture moyenne de l'ensemble des échantillons est de 341,72 "reads", avec une moyenne de "mapping quality" de 0,03%. La majorité des variants identifiés se situent dans les régions intergéniques (70,3% des variants). Un quart des variants se situent dans les régions introniques des gènes (25% des variants). Les variants affectant les régions exoniques, 5'UTR et 3'UTR, représentent seulement 1,8% des variants. Ces résultats sont présentés dans la **[Figure 4]**.

Notre projet a consisté à rechercher des variants rares qui co-ségrègent avec la maladie. Pour cela, nous avons d'abord sélectionné les variants présents uniquement chez les différents patients de toutes les familles confondues et absents de l'ensemble des témoins. Cette filtration a permis de réduire considérablement le nombre de variants d'intérêts, en passant de 7747 variants à 693 variants.

La fréquence des 693 variants associés à la maladie est représentée dans la **[Figure 5]**. Nous avons pu observer qu'une grande partie de ces variants n'étaient pas répertoriés dans la base de données 1000 Genomes. En regardant de plus près, il apparaît qu'une grande majorité des variants avaient une fréquence inférieure à 5%, et correspondraient potentiellement à des variants rares.

Dans notre étude, nous nous sommes concentrés sur ces variants rares, avec une fréquence inférieure à 5%, réduisant ainsi nos variants d'intérêts à 449 (variants avec une fréquence non répertoriée inclus).

Plusieurs modèles d'analyses pour l'étude de la répartition des variants rares, ont été créés pour tenter d'élucider leur effet fonctionnel [28]. Une présentation de ces modèles est illustrée dans la **[Figure 6]**.

Selon le modèle A, un variant causal serait plus fréquent chez les individus atteints que chez les témoins. Nous avons donc recherché tous les variants communs chez les patients et qui sont absents chez l'ensemble des témoins de chaque famille.

Position chrom.	Familles affectées	Variant	Position génique (Annovar)	Gènes affectés
38700840	248-247	C > T	intron	LINC00571
38731222	181-242	C > T	Intergénique	LINC00571-UFM1
38747257	181-242	G > GA	Intergénique	LINC00571-UFM1
38869559	248-267	T > C	Intergénique	LINC00571-UFM1
39137541	248-267	A > G	Intergénique	LINC00437-LINC00366
39235997	182-204	A > G	Intergénique	PRDX3P3-FREM2
39263422	248-267	C > T	Mutation silencieuse	FREM2
39265558	248-267	T > A	Mutation silencieuse	FREM2
39267274	248-267	C > T	intron	FREM2
39373634	95-222	TTAAAAC > T	intron	FREM2
39463359	55-248	T > C	aval	FREM2
39475608	181-242	T > C	amont	PLA2G12AP2
39490628	55-248	G > A	Intergénique	PLA2G12AP2-ANKRD26P2
39553330	273-222	A > T	Intron	STOML3
39563079	175-75	T > G	Intron	STOML3
39592564	55-248	C > A	Intron	PROSER1
39613127	55-248	C > G	amont	PROSER1
39679617	175-75	A > T	Intergénique	NHLRC3-NXT1P1
39695983	175-55	A > T	Intergénique	NHLRC3-NXT1P1
39699628	55-248	G > T	Intergénique	NHLRC3-NXT1P1
39700738	175-55	C > T	Intergénique	NHLRC3-NXT1P1
39719175	55-248	G > T	Intergénique	NHLRC3-NXT1P1
39724359	55-248	G > A	Intergénique	NHLRC3-NXT1P1
39744652	104-273	G > A	amont	NXT1P1
39809539	147-182-267	G > A	Intergénique	NXT1P1-LHFP
39814560	175-75	G > A	Intergénique	NXT1P1-LHFP
39903447	175-75	G > A	Intergénique	NXT1P1-LHFP
39909606	175-75	C > T	Intergénique	NXT1P1-LHFP
39951346	175-75	C > G	Intron	LHFP
40023354	48-242	C > T	Intron	LHFP

Tableau 2 : Liste des variants associés à la maladie communs entre plusieurs familles.

Un total de 30 variants communs aux patients de plusieurs familles et absent de tous les individus témoins ont été identifiés. Tous ces variants se situent sous un seuil de fréquence de l'allèle mineur inférieur à 5%.

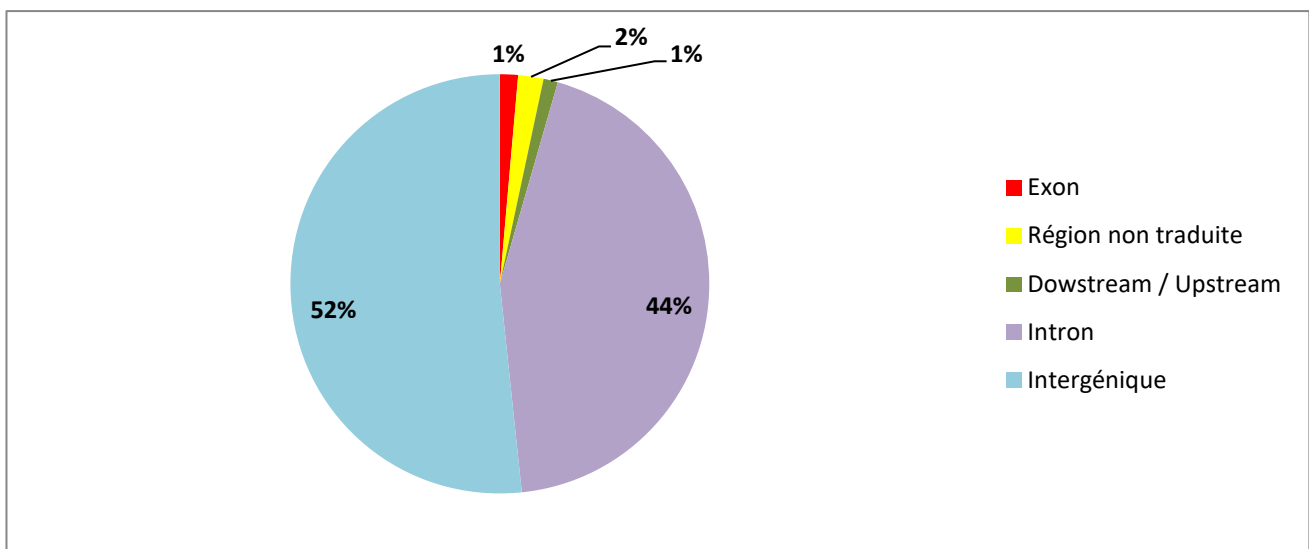


Figure 7 : Nature des variants co-ségrégant avec la maladie sous un seuil de fréquence de l'allèle mineur inférieur à 5%

Selon le modèle B, les variants agiraient en synergie pour contribuer à un phénotype; les individus atteints auraient donc plus de chances de partager des variants fonctionnels que les individus témoins, chez qui les variants sont distribués de façon aléatoire. Dans ce modèle, nous nous sommes intéressés à la nature des variants co-ségrégant avec la maladie afin d'en isoler les variants fonctionnels rares qui nous semblaient les plus pertinents.

Selon le modèle C, les individus atteints seraient porteurs d'un plus grand nombre de variants rares que les individus témoins dans certaines régions génomiques précises. Dans notre cas, nous avons étudié la répartition de l'ensemble des variants associés à la maladie dans la région 13q13, afin de rechercher une région génomique possédant un plus grand nombre de variants.

Les données acquises jusqu'à maintenant sur les variants rares ne permettent pas de favoriser l'un de ces modèles. Ainsi, l'analyse des trois modèles étudiés est-elle présentée ci-dessous.

A. Les variants en commun

Dans un premier temps, c'est le modèle A qui a été expérimenté pour la recherche des variants rares potentiellement causaux. Pour cela, nous avons cherché des variants partagés par tous les patients de plusieurs familles et absents de l'ensemble des témoins de chaque famille. Un total de 30 variants partagés entre tous les patients de différentes familles a été observé. L'ensemble des résultats est présenté dans le **[Tableau 2]**. La première observation que l'on puisse faire de ces résultats est que ces variants n'étaient partagés qu'entre deux familles (soit environ 10% des patients), à l'exception d'un variant (39809539) qui était partagé par 3 familles (environ 12% des patients). Il est intéressant de noter que la plupart de ces variants se situent dans des régions intergéniques (environ 50% des variants). Les autres variants détectés se situent dans des régions UTR ou introniques des gènes (environ 35% des variants). Deux variants (39263422 et 392655558) nous ont particulièrement interpellés, car ils se situent dans une région exonique du gène *FREM2*. Cependant, ils n'ont été retrouvés en commun que chez les patients de deux familles (#248 et #267) et sont décrits comme étant des mutations silencieuses (n'affectant pas la séquence d'acides aminés).

B. Nature des variants

Nous nous sommes intéressés par la suite à la localisation génique des 449 variants rares associés à la maladie. Nous avons voulu voir la répartition de ces variants selon deux seuils de fréquence : inférieur à 10% ou inférieur à 5% (selon la base de données 1000Genomes). Les résultats présentés indiquent que la plupart de ces variants rares se situent dans des régions intergéniques (entre 55% et 52%). La seconde majorité de variants rares se situe dans les régions introniques de gènes (entre 41% et 44%). Ce n'est seulement qu'une petite minorité des variants rares restants qui a été identifiée dans les régions exoniques ou dans des régions géniques non traduites (3'UTR et 5'UTR) **[Figure 7]**.

Les quelques variants exoniques se situaient dans le gène *FREM2*, à l'exception d'un variant situé dans le gène *PROSER1*. Ces variants rares, retrouvés l'un dans la famille #F204 et l'autre dans la famille #F29, étaient décrits comme des mutations silencieuses, et ne semblaient donc pas modifier la séquence de la protéine.

Cependant, le variant rs201714905 nous a particulièrement interpellé. Retrouvé dans la famille #F75, il est situé dans la région exonique du gène *FREM2*, et est décrit comme une mutation faux sens, qui a pour conséquence de remplacer une arginine [Arg] par une histidine [His] en position 2489.

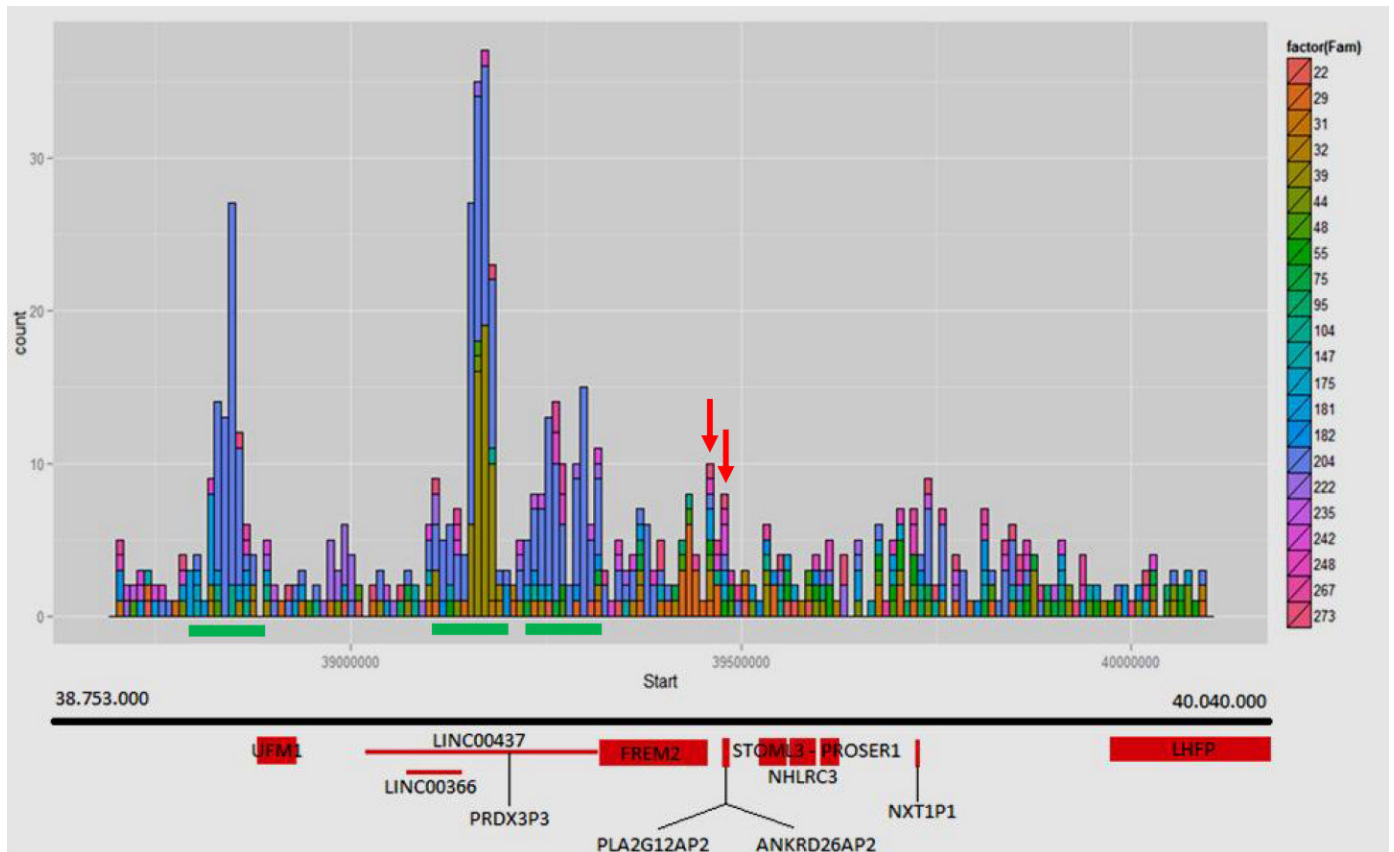


Figure 8 : Répartitions de la densité de l'ensemble des variants associés à la SpA dans la région 13q13

L'axe des abscisses représente la région 13q13 s'étendant de la position 38.753.000 pb à 40.040.000 pb. L'axe des ordonnées indique la fréquence de variants associés à la maladie indépendamment de leur MAF. Chaque rectangle indique la présence d'un variant sur une fenêtre de 10.000 paires de bases. Les couleurs présentent les différentes familles et sont indiquées dans la légende de droite. Les trois traits verts indiquent les régions génomiques avec une grande fréquence de variants, avec une fréquence maximale de 27, 37, et 15 variants respectivement. Les flèches rouges correspondent aux régions génomiques où le nombre de variants affectant plusieurs familles est plus important. Elles sont situés en aval du gène *FREM2*, et présentent 15 variants dans 7 familles, et 8 variants dans 7 familles respectivement.

Nous avons voulu, par le biais de logiciels de prédiction, tels que Polyphen, SIFT ou MutationTaster, déterminer si la modification de l'acide aminé était susceptible d'influencer la fonction de la protéine codée [61-63]. Ce variant d'intérêt est décrit comme étant toléré par SIFT et bénin avec le site Polyphen. Au contraire, le site MutationTaster décrit ce variant comme dommageable pour la fonction de la protéine.

Chaque logiciel de prédiction utilise un algorithme unique pour prédire si un variant est délétère pour une protéine. Le logiciel MutationTaster comprend des fonctionnalités uniques, comparé au autre logiciel, telles que l'analyse du site de mutation (modification des propriétés physicochimiques), de la longueur de la protéine, et de la caractérisation de la protéine (structure 3D), permettant ainsi de donner un score de prédiction plus fiable. Cependant, il est important de valider ces prédictions par l'utilisation d'autres logiciels, tels que LRT, SiPhy, ou FATHMM.

Ce variant pourrait être intéressant, et il est important d'approfondir son analyse, en le recherchant chez d'autres patients. Par ailleurs, comme il a été mentionné, la majorité des variants se situent dans les régions intergéniques ou bien introniques. Les conséquences fonctionnelles sur les protéines sont difficiles à déterminer, mais peuvent être très importantes pour la régulation et la stabilisation des transcrits de ces gènes.

C. Répartitions des variants

Dans un dernier temps, nous nous sommes intéressés à la répartition des variants associés à la maladie sur la région 13q13, afin de déterminer une région génomique où la fréquence des variants d'intérêt serait plus grande. Ces régions, avec une forte concentration de mutations, sont appelées "point chauds" ou "hot spots" et peuvent avoir des conséquences sur la structure ou la fonction de la séquence d'ADN, et ainsi avoir pour effet de réduire l'accessibilité pour la transcription de certains gènes.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à tous les variants, indépendamment de leur fréquence dans la population. Ainsi, la façon dont les 693 variants associés à la maladie sont répartis sur la région du chromosome 13q13 est présentée dans la **[Figure 8]**.

L'une des premières observations que nous avons pu faire est que le nombre de variants associés à la maladie était faiblement variable entre les familles. Il était en moyenne de 19 variants par famille. La famille #F204 est une exception avec un nombre de 215 variants associés à la maladie. L'observation est d'ailleurs visible dans la **[Figure 8]**, où la représentation des variants de la famille #F204 (en bleu) correspond à la majorité des variants du graphique. De plus, il est intéressant de noter, que la plupart des variants de la famille #F204 sont partagés avec la famille #F39. Il y a deux façons d'observer les résultats présentés dans ce graphique :

- La première consiste à rechercher les régions génomiques ayant la plus grande fréquence de variants. On distingue ici trois régions représentées par un trait vert, dont une est située en amont du gène *UFM1*, et les deux autres en amont du gène *FREM2*. Pour exemple, nous pouvons compter, au plus haut point, un nombre de 37 variants associés sur seulement 10.000 paires de bases. Cependant, il est important de souligner que ces variants ne sont partagés que par deux familles (#F204 et #F39) et que la fréquence de l'allèle mineur est comprise entre 30%-10%, selon la base 1000Genomes.

- La seconde méthode consiste à chercher des variants partagés par plusieurs familles mais localisés dans une région restreinte du génome. Dans notre cas, nous avons pu identifier 3 régions. La plus importante de ces régions comprend 10 variants issus de 8 familles réparties sur 10.000 paires de bases. La suivante comprend 8 variants issus de 7 familles. Il est notable de remarquer que la plupart de ces variants touchent la région 3'UTR ou l'aval du gène *FREM2* et que la fréquence de l'allèle mineur ne dépasse pas les 2%.

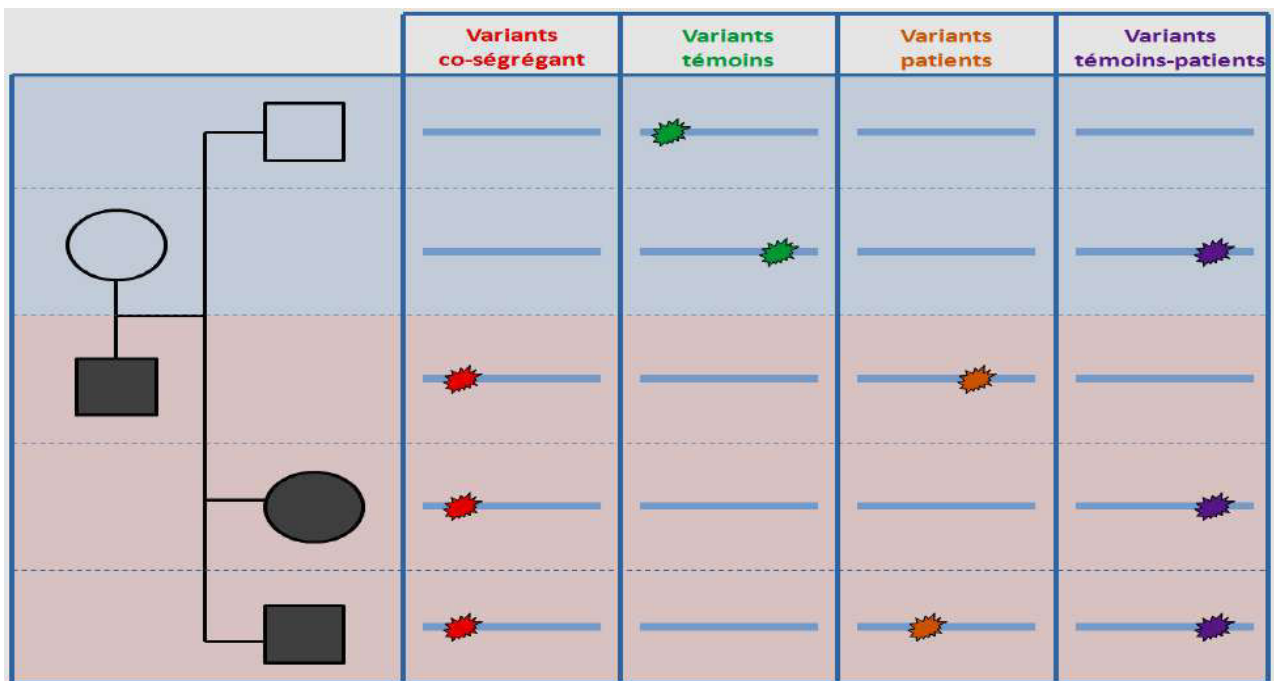


Figure 9 : Représentation des différents variants issue de l'analyse du séquençage de la région 13q13

L'analyse est réalisée sur une cohorte familiale de sujets atteints ou non de SA. Les symboles carrés et ronds sur l'arbre généalogique correspondent aux hommes et femmes respectivement. Les symboles pleins et vides indiquent les individus atteints de SpA et témoins, respectivement. Les 4 types de variants sont représentés graphiquement. La présence et la position des différents variants sont figurées par une étoile.

Nous avons voulu par la suite comparer la répartition des variants associés à la maladie (décrit précédemment) avec l'ensemble des autres variants issus du séquençage, que nous appellerons "variants témoins". Ces derniers correspondent soit à des variants présents uniquement chez les témoins, soit à des variants présents en commun chez les témoins et les patients, soit à des variants présents uniquement chez un patient d'une famille (et non chez les deux patients), qui ont été exclus de la sélection des variants associés à la maladie **[Figure 9]**.

Cette comparaison de répartition entre variants associés et "variants témoins" a permis de mettre en évidence les trois régions précédemment décrites **[Figure 10]**. Nous pouvons observer que ces régions possèdent un grand nombre de variants associés à la maladie qui dépasse largement le seuil déterminé par les "variants témoins", renforçant l'intérêt de poursuivre l'étude de ces variants. Au contraire, les variants partagés par plusieurs familles ne semblent pas dépasser le seuil déterminé par les "variants témoins" dont le nombre semble être plus important dans cette région.

D. FREM2 un candidat potentiel ?

L'analyse du séquençage ciblé de la région 13q13 a mené à la découverte de nombreux résultats prometteurs, qu'il nous reste cependant à approfondir. La recherche des variants rares associés à la SA par les trois méthodes d'analyses, semble présenter des similitudes en ce qui concerne le gène *FREM2* **[Figure 11]**.

L'analyse des variants en commun par la **première** méthode a mis en évidence la présence de deux variants dans la région exonique du gène *FREM2*, qui sont partagés par les familles #F248 et #F267. En dépit du fait que ces variants sont des mutations silencieuses, la fréquence de l'allèle mineur est proche de 1%, ce qui correspond à des variants rares.

En raison de la dégénérescence du code génétique, les mutations silencieuses qui se produisent dans les régions codantes des gènes ne modifient pas la composition d'acides aminés des protéines codées. Cependant, plusieurs arguments suggèrent que ces mutations pourraient avoir des conséquences fonctionnelles, comme un épissage aberrant ou une déstabilisation de la structure de l'ARNm. Ces effets auraient pour conséquences de produire des protéines immatures, ou bien de réduire leur quantité et d'être ainsi à l'origine de certaines pathologies [64].

L'analyse de la nature des variants associés à la maladie par la **seconde** méthode nous a conforté dans cette idée. En effet, deux variants des régions exoniques, concernaient le gène *FREM2*. L'un de ces variants correspondait à une mutation silencieuse avec une fréquence de l'allèle mineur proche de 2%. L'autre variant est décrit comme une mutation faux-sens, dont l'effet sur la protéine reste encore à déterminer. Il est aussi intéressant de voir que la plupart des variants rares (fréquence de l'allèle mineur inférieur à 5%) se concentrent autour du gène *FREM2*.

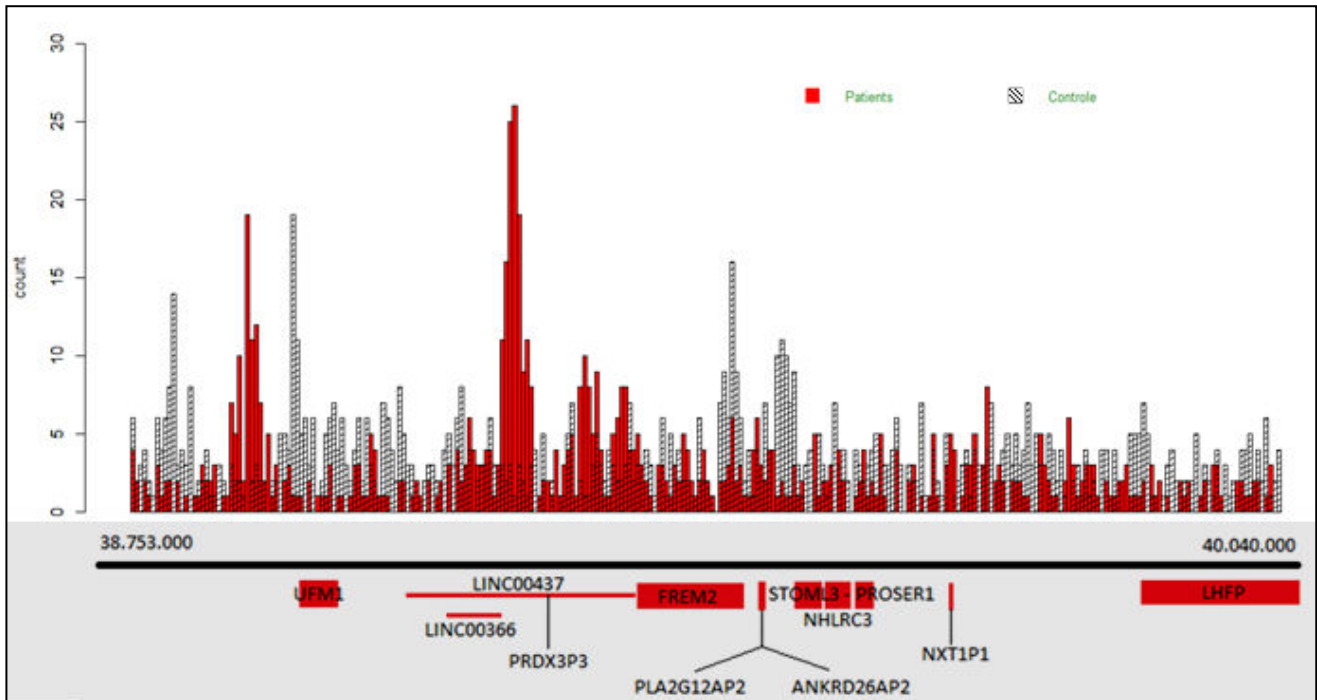


Figure 10 : Comparaison de la répartition des variants associés à la maladie à celle des autres variants issus du séquençage.

L'axe des abscisses représente la région 13q13 en paires de bases (pb). L'axe des ordonnées indique la fréquence des variants toutes familles confondues. L'échelle correspond à 1 variant / 8.000 pb. Les variants associés à la maladie (indépendant de la MAF) sont représentés en rouge, tandis que les autres variants sont représentés en noir.

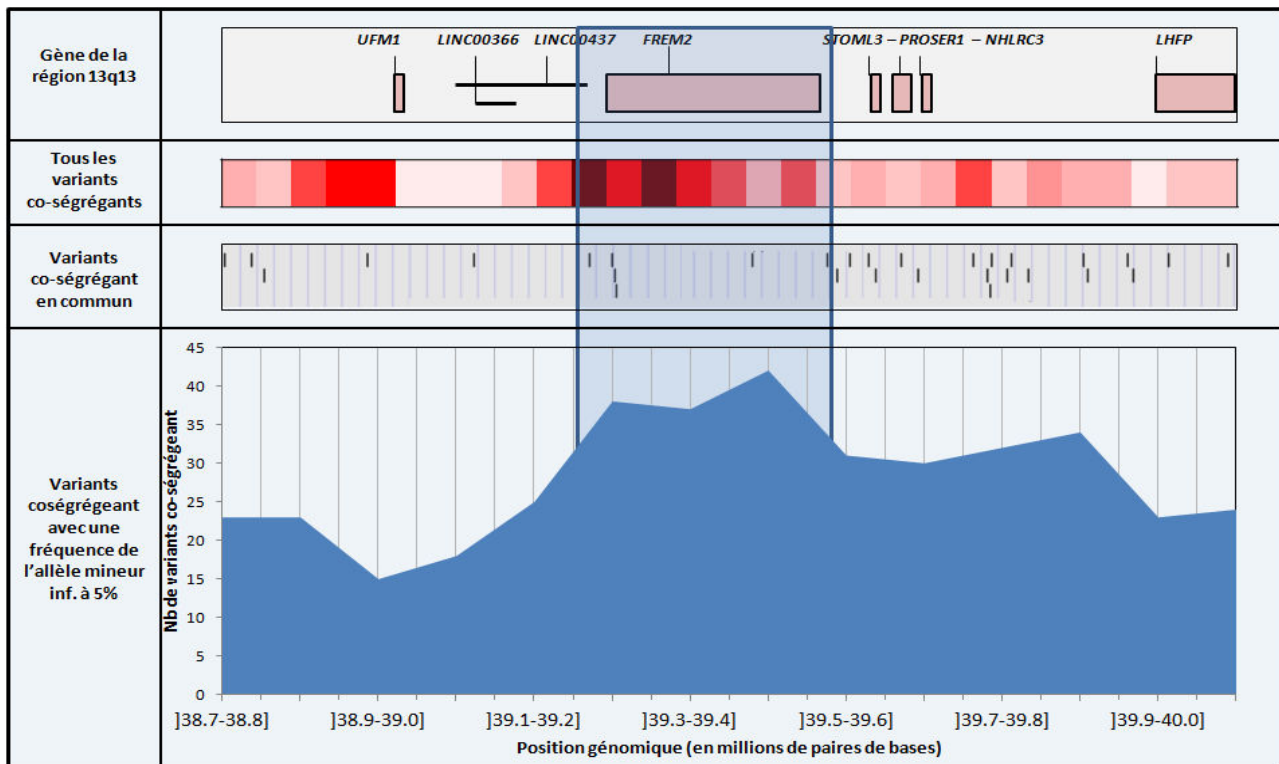


Figure 11 : Bilan schématique de l'analyse des variants

Les différents gènes de la région 13q13 sont indiqués dans la première ligne. La fréquence des variants associés à la maladie, indépendamment de leur MAF, est indiquée dans la seconde ligne. Le dégradé de couleur correspond à la fréquence des variants, allant du plus clair (inférieur à 10 variants) au plus foncé (supérieur à 50 variants). Les variants associés à la pathologie dans plusieurs familles sont indiqués par un trait noir dans la troisième ligne. La dernière ligne présente la répartition des variants rares (MAF>5%) associés à la maladie. L'encadré bleu indique la région où la fréquence des variants est la plus intense.

La **dernière** analyse de la répartition de l'ensemble des variants associés à la maladie a révélé de nouvelles informations.

En premier lieu, nous avons pu observer qu'une majorité des variants associés au sein des familles #F204 et #F39 se répartissaient dans une région située en amont du gène *FREM2*. Cette accumulation de variants pourrait potentiellement correspondre à un "hotspots" de mutations qui aurait comme conséquence des perturbations pour la fixation de la machinerie de transcription du gène *FREM2*, ayant pour répercussion une diminution de son expression.

D'autre part, une seconde région située en aval du gène *FREM2*, présentait un nombre important de variants touchant la région 3'UTR de ce gène, et cela pour 4 familles.

Enfin, l'étude approfondie de ces variants, a permis de découvrir une mutation faux-sens, touchant les patients des familles #F248 et #F267, dans l'exon 4 du gène *FREM2*. Cette mutation en position 1840 de la protéine, modifie une arginine, par un tryptophane, soit un composé chargé positivement par un composé aromatique, ce qui pourrait provoquer un encombrement stérique et perturber la conformation tridimensionnelle de la protéine. Cette mutation se situe dans un domaine "Calx-beta", qui permet la stabilisation de la protéine par liaison avec une molécule de calcium. L'analyse de l'effet de ce variant par des logiciels de prédiction (Polyphen, LRT, MutationTaster), le présente comme dommageable pour la fonction de la protéine. Bien que la fréquence de l'allèle mineur de ce variant soit estimée à 14% dans la population générale, il est important d'approfondir l'analyse de ce variant, ainsi que de le rechercher chez d'autres patients atteint par la spondylarthrite ankylosante.

L'ensemble de ces données nous encourage à poursuivre l'étude du gène *FREM2*, comme un nouveau gène de susceptibilité dans la pathogenèse de la SA.

.

Discussion

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à la recherche de variants rares dans une nouvelle région de liaison à la SpA. Découverte par une analyse non paramétrique sur une cohorte familiale de patients atteints de SpA, la région 13q13 a été étudiée par séquençage ciblé. L'analyse approfondie des différents variants a permis de faire ressortir le gène *FREM2* comme un nouveau gène potentiellement associé à la SpA.

La recherche des variants rares a mis en évidence des polymorphismes dans les régions exoniques du gène *FREM2*. La première analyse a fait ressortir deux variants en communs présents chez les patients de deux familles différentes. La seconde analyse a mis en évidence deux autres variants touchant chacun les patients d'une famille. La troisième analyse a révélé la présence d'un variant touchant une autre famille, présent dans la région exonique et pouvant avoir un effet potentiellement délétère sur la protéine. De manière globale, un ensemble de 12 patients sur les 50 étudiés (soit 24% des patients) possédaient un variant dans la région exonique du gène *FREM2* qui était absent des témoins sains de chaque famille. Enfin, l'analyse de la répartition des variants rares dans la région 13q13 a révélé un nombre important de variants en amont et dix variants présents dans la région 3'UTR de *FREM2* chez les patients de huit familles différentes. Ces variants pourraient avoir un effet potentiel sur des régions régulatrices de ce gène comme la stabilité du transcrit, notamment en affectant la fixation de miARN.

L'ensemble de ces résultats est prometteur, car c'est la première fois que le gène *FREM2* est mentionné dans cette pathologie.

Cependant, il est important de souligner que la région 13q13 présente d'autres gènes dont les fonctions sont encore peu décrites, tels que des pseudogènes, des miARN, ou bien des LncARN. Nos analyses montrent que de nombreux variants rares sont à proximité de ces gènes et pseudogènes, pouvant avoir des conséquences sur leur transcription. Cependant, il est difficile de poursuivre l'étude de ces variants, car il n'existe que très peu de données sur ces régions. De nombreuses études ont mis en évidence des effets néfastes de la dérégulation des ARN non codant dans de nombreuses pathologies, et il n'est pas incohérent de penser que des effets similaires soient retrouvés dans la SpA. De même, les gènes *STOML3* et *PROSER1*, dont les fonctions n'ont pas encore été décrites, pourraient avoir un rôle dans la pathologie de la SpA.

D'autre part, le gène *UFM1* est un candidat potentiellement intéressant comme nouveau facteur de susceptibilité de la SA. *UFM1* code une nouvelle protéine Ubiquitine-like (Ubl) qui a été récemment décrite comme ayant d'importantes fonctions dans la différenciation érythroïde, la croissance, et le développement cellulaire [65]. *UFM1* pourrait également être impliquée dans certaines conditions pathologiques, telles que la tumorigenèse, les maladies cardiaques ou le diabète [66-68]. Les études de Li *et al.* semblent indiquer que *UFM1* est impliqué dans le stress du RE, ainsi que dans la différenciation des macrophages dans l'athérosclérose [69-72]. De récentes études ont mis en évidence un rôle anti-inflammatoire de cette protéine en inhibant la voie LPS/TLR-4/NF- κ B [73-74].

Dans le cas de la SA, plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour un rôle d'*UFM1*. Ce gène pourrait être régulé négativement et avoir pour conséquence d'augmenter la réponse inflammatoire en suractivant la voie LPS/TLR-4/NF- κ B. De manière intéressante, *UFM1* est une cible transcriptionnelle de la voie *IRE1-XBP1* de l'UPR. On peut ainsi supposer qu'une régulation positive ou négative de ce gène, perturberait la réponse au stress du RE en augmentant la réponse inflammatoire.

Dans notre étude, il est intéressant d'observer qu'un grand nombre de variants associés à la maladie sont situés en amont du gène *UFM1*, ce qui pourrait perturber la région régulatrice ou promotrice de ce gène [Figure 8].

L'ensemble des résultats présentés dans cette étude sont prometteurs, mais doivent encore être confirmés par de nouvelles approches, ce qui constituera les perspectives de ce projet.

A court terme, de nouvelles analyses bioinformatiques sont prévues. Un nouvel alignement des données de séquençage sur le nouveau génome de référence "hg38" a été réalisé. Les résultats diffèrent peu de l'analyse précédente, en ce qui concerne les régions exoniques, mais donnent des informations plus précises pour les variants intergéniques. Il sera intéressant d'étudier par la suite les conséquences de ces différents variants intergéniques par des logiciels de prédiction, pour détecter des polymorphismes pouvant affecter des régions régulatrices ou des régions de fixation de facteur de transcription.

Des analyses sur les variations du nombre de copies (CNV) sont également en cours, afin de déterminer la présence de polymorphismes de duplication de gènes dans cette région chez certains patients. Pour exemple, une étude de Nagaishi et *al*, a mis en évidence une amplification de la région 13q13, et plus particulièrement des gènes *STOML3*, *FREM2*, et *LHFP* dans des gliosarcomes, ayant pour conséquence une perturbation de la différenciation mésenchymateuse [75].

Enfin, pour approfondir nos recherches, les données de séquençages sont comparées aux données haplotypiques de chaque famille. Les résultats nous permettront d'observer si nos variants d'intérêts co-ségrègent avec l'haplotype lié à la maladie pour chaque famille.

A moyen terme, l'objectif est de rechercher ces variants d'intérêts chez les patients d'autres familles mais aussi de détecter d'autres variants. La réalisation d'un nouveau séquençage sur une nouvelle cohorte de patients est donc en cours de réalisation. D'autre part, des expériences de "High Resolution Melt" (HRM), qui ont pour but de détecter des polymorphismes génétiques par l'analyse des courbes de fusion sont en cours de réalisation sur l'ADN des patients. Ces résultats nous permettront de confirmer les variants d'intérêts issus du séquençage, mais aussi de déterminer l'état hétérozygote ou homozygote de ces polymorphismes.

A plus long terme, nous envisageons d'étudier l'expression des gènes de la région 13q13, dans cette même cohorte de patients, dans le but de rechercher une expression différentielle des gènes. Ces résultats pourront par la suite être reliés aux données de séquençage.

L'aspect causal des polymorphismes des gènes d'intérêts dans la pathogenèse de la SpA pourrait être testé par le biais de lignées cellulaires. La méthode CRISPR/Cas9, permettra de créer les mutations identifiées, et d'observer les conséquences qu'elles pourraient avoir. L'objectif principal de ce projet est d'identifier, dans la région 13q13, des variants rares qui co-ségrègent avec la maladie et peuvent avoir des conséquences sur l'expression de certains gènes. A l'issue de ces analyses, le candidat le plus prometteur est le gène *FREM2*.

La littérature décrit l'implication de ce gène dans le syndrome de Fraser, qui se caractérise par des anomalies urinaires et des malformations de nombreux tissus (oreille, palais, paroi inter-narinaire et langue). Le gène *FREM2*, pour *FRAS1-related extracellular matrix 2*, code la protéine *FREM2* qui forme un complexe avec les protéines *FRAS1* et *FREM1* et joue un rôle critique dans l'interaction épithéliale-mésenchymateuse. Des mutations de ce gène dans un modèle souris diminuent la prolifération cellulaire mésenchymateuse et induisent des anomalies de développement dans de nombreux organes, ce qui est caractéristique du syndrome de Fraser [76]. Cependant, les mécanismes moléculaires reliant ces gènes et la pathologie sont encore très peu connus [77-78].

Dans le cas de la SA, il est encore difficile de relier l'effet d'une dérégulation du gène *FREM2* avec la pathologie. On peut néanmoins supposer qu'une perturbation de la formation des cellules mésenchymateuses, pourrait avoir des conséquences sur la diapédèse des cellules du système immunitaire, ayant pour conséquence d'induire une forte inflammation, caractéristique de la SA.

Bibliographie

1. **Wickramaratne P, Hodge S.** Estimation of sibling recurrence-risk ratio under single ascertainment in two-child families. *Am J Hum Genet.* 2001 Mar;68(3):807–12
2. **Höhler T, Hug R, Schneider PM, Krummenauer F, Gripenberg-Lerche C, Granfors K, et al.** Ankylosing spondylitis in monozygotic twins: studies on immunological parameters. *Ann Rheum Dis.* 1999 Jul;58(7):435–40.
3. **Järvinen P.** Occurrence of ankylosing spondylitis in a nationwide series of twins. *Arthritis Rheum.* 1995 Mar;38(3):381–3.
4. **Brown MA, Kennedy LG, MacGregor AJ, Darke C, Duncan E, Shatford JL, et al.** Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins: the role of genes, HLA, and the environment. *Arthritis Rheum.* 1997 Oct;40(10):1823–8.
5. **Pedersen OB, Svendsen AJ, Ejstrup L, Skytthe A, Harris JR, Junker P.** Ankylosing spondylitis in Danish and Norwegian twins: occurrence and the relative importance of genetic vs. environmental effectors in disease causation. *Scand J Rheumatol.* 2008 Apr;37(2):120–6.
6. **Dernis E, Said-Nahal R, D'Agostino M-A, Aegerter P, Dougados M, Breban M.** Recurrence of spondylarthropathy among first-degree relatives of patients: a systematic cross-sectional study. *Ann Rheum Dis.* 2009 Apr;68(4):502–7.
7. **Caffrey MF, James DC.** Human lymphocyte antigen association in ankylosing spondylitis. *Nature.* 1973 Mar 9;242(5393):121.
8. **Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, Caffrey M, James DC, Sturrock RD.** Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet.* 1973 Apr 28;1(7809):904–7.
9. **Schlosstein L, Terasaki PI, Bluestone R, Pearson CM.** High association of an HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis. *N Engl J Med.* 1973 Apr 5;288(14):704–6.
10. **Kopplin LJ, Mount G, Suhler EB.** Review for Disease of the Year: Epidemiology of HLA-B27 Associated Ocular Disorders. *Ocul Immunol Inflamm.* 2016 Aug;24(4):470–5.
11. **Dean LE, Jones GT, MacDonald AG, Downham C, Sturrock RD, Macfarlane GJ.** Global prevalence of ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford).* 2014 Apr;53(4):650–7.
12. **Stolwijk C, Boonen A, van Tubergen A, Reveille JD.** Epidemiology of spondyloarthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2012 Aug;38(3):441–76.
13. **López-Larrea C, Sujirachato K, Mehra NK, Chiewsilp P, Isarangkura D, Kanga U, et al.** HLA-B27 subtypes in Asian patients with ankylosing spondylitis. Evidence for new associations. *Tissue Antigens.* 1995 Mar;45(3):169–76.
14. **Paladini F, Taccari E, Fiorillo MT, Cauli A, Passiu G, Mathieu A, et al.** Distribution of HLA-B27 subtypes in Sardinia and continental Italy and their association with spondylarthropathies. *Arthritis Rheum.* 2005 Oct;52(10):3319–21.
15. **Costantino F, Talpin A, Said-Nahal R, Goldberg M, Henny J, Chiocchia G, et al.** Prevalence of spondyloarthritis in reference to HLA-B27 in the French population: results of the GAZEL cohort. *Ann Rheum Dis.* 2015 Apr;74(4):689–93.

16. **Breban M, Miceli-Richard C, Zinovieva E, Monnet D, Said-Nahal R.** The genetics of spondyloarthropathies. *Joint Bone Spine*. 2006 Jul;73(4):355–62.
17. **R Said-Nahal, C Miceli-Richard, C Gautreau, R Tamouza, N Borot, R Porcher, D Charron, M Dougados, M Breban** The role of HLA genes in familial spondyloarthropathy: a comprehensive study of 70 multiplex families *Ann Rheum Dis* 2002;61:201–206
18. **Wei JC-C, Sung-Ching HW, Hsu Y-W, Wen Y-F, Wang W-C, Wong R-H, et al.** Interaction between HLA-B60 and HLA-B27 as a Better Predictor of Ankylosing Spondylitis in a Taiwanese Population. *PLoS ONE*. 2015;10(10):e0137189.
19. **Díaz-Peña R, Blanco-Gelaz MA, Njobvu P, López-Vazquez A, Suárez-Alvarez B, López-Larrea C.** Influence of HLA-B*5703 and HLA-B*1403 on susceptibility to spondyloarthropathies in the Zambian population. *J Rheumatol*. 2008 Nov;35(11):2236–40.
20. **van Gaalen FA, Verduijn W, Roelen DL, Böhringer S, Huizinga TWJ, van der Heijde DM, et al.** Epistasis between two HLA antigens defines a subset of individuals at a very high risk for ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 2013 Jun;72(6):974–8.
21. **Cortes A, Pulit SL, Leo PJ, Pointon JJ, Robinson PC, Weisman MH, et al.** Major histocompatibility complex associations of ankylosing spondylitis are complex and involve further epistasis with ERAP1. *Nat Commun*. 2015 May 21;6:7146.
22. **Chen W-F, Chang T-Y, Chu C-C, Lin C-L, Lee Y-J.** A new HLA-B*39 allele, HLA-B*39:01:15, discovered in a Taiwanese rheumatoid arthritis patient. *Tissue Antigens*. 2015 Oct;86(4):300–1.
23. **Origuchi T, Fukui S, Umeda M, Nishino A, Nakashima Y, Koga T, et al.** The Severity of Takayasu Arteritis Is Associated with the HLA-B52 Allele in Japanese Patients. *Tohoku J Exp Med*. 2016;239(1):67–72.
24. **Khan MA, Kushner I, Braun WE.** Association of HLA-A2 with uveitis in HLA-B27 positive patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*. 1981 Apr;8(2):295–8.
25. **Reveille JD.** Major histocompatibility genes and ankylosing spondylitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2006 Jun;20(3):601–9.
26. **Laval SH, Timms A, Edwards S, Bradbury L, Brophy S, Milicic A, et al.** Whole-genome screening in ankylosing spondylitis: evidence of non-MHC genetic-susceptibility loci. *Am J Hum Genet*. 2001 Apr;68(4):918–26.
27. **Lewis CM, Knight J.** Introduction to genetic association studies. *Cold Spring Harb Protoc*. 2012 Mar 1;2012(3):297–306.
28. **Bansal V, Libiger O, Torkamani A, Schork NJ.** Statistical analysis strategies for association studies involving rare variants. *Nat Rev Genet*. 2010 Nov;11(11):773–85.
29. **Wellcome Trust Case Control Consortium, Australo-Anglo-American Spondylitis Consortium (TASC), Burton PR, Clayton DG, Cardon LR, Craddock N, et al.** Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat Genet*. 2007 Nov;39(11):1329–37.
30. **Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC), Reveille JD, Sims A-M, Danoy P, Evans DM, Leo P, et al.** Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci. *Nat Genet*. 2010 Feb;42(2):123–7.

31. **Evans DM, Spencer CCA, Pointon JJ, Su Z, Harvey D, Kochan G, et al.** Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. *Nat Genet.* 2011 Jul 10;43(8):761–7.
32. **Lin Z, Bei J-X, Shen M, Li Q, Liao Z, Zhang Y, et al.** A genome-wide association study in Han Chinese identifies new susceptibility loci for ankylosing spondylitis. *Nat Genet.* 2011 Dec 4;44(1):73–7.
33. **International Genetics of Ankylosing Spondylitis Consortium (IGAS), Cortes A, Hadler J, Pointon JP, Robinson PC, Karaderi T, et al.** Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nat Genet.* 2013 Jul;45(7):730–8.
34. **Ott J, Wang J, Leal SM.** Genetic linkage analysis in the age of whole-genome sequencing. *Nat Rev Genet.* 2015 May;16(5):275–84.
35. **Brown MA, Pile KD, Kennedy LG, Campbell D, Andrew L, March R, et al.** A genome-wide screen for susceptibility loci in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 1998 Apr;41(4):588–95.
36. **Zhang G, Luo J, Bruckel J, Weisman MA, Schumacher HR, Khan MA, et al.** Genetic studies in familial ankylosing spondylitis susceptibility. *Arthritis Rheum.* 2004 Jul;50(7):2246–54.
37. **Miceli-Richard C, Zouali H, Said-Nahal R, Lesage S, Merlin F, De Toma C, et al.** Significant linkage to spondyloarthropathy on 9q31-34. *Hum Mol Genet.* 2004 Aug 1;13(15):1641–8.
38. **Lee YH, Rho YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG.** Ankylosing spondylitis susceptibility loci defined by genome-search meta-analysis. *J Hum Genet.* 2005;50(9):453–9.
39. **Carter KW, Pluzhnikov A, Timms AE, Miceli-Richard C, Bourgain C, Wordsworth BP, et al.** Combined analysis of three whole genome linkage scans for Ankylosing Spondylitis. *Rheumatology (Oxford).* 2007 May;46(5):763–71.
40. **Costantino F, Chaplais E, Leturcq T, Said-Nahal R, Leboime A, Zinovieva E, et al.** Whole-genome single nucleotide polymorphism-based linkage analysis in spondyloarthritis multiplex families reveals a new susceptibility locus in 13q13. *Ann Rheum Dis.* 2016 Jul;75(7):1380–5.
41. **Campion D.** Dissection génétique des maladies à hérédité complexe. *médecine/sciences.* 2001 Nov 15;17:1139–48.
42. **Reveille JD, Brown MA.** Epidemiology of ankylosing spondylitis: IGAS 2009. *J Rheumatol.* 2010 Dec;37(12):2624–5.
43. **Zinovieva, E. et al.** Systematic candidate gene investigations in the SPA2 locus (9q32) show an association between TNFSF8 and susceptibility to spondylarthritis. *Arthritis Rheum.* 63, 1853–1859 (2011)
44. **Hodkinson BP, Grice EA.** Next-Generation Sequencing: A Review of Technologies and Tools for Wound Microbiome Research. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2015 Jan 1;4(1):50–8.
45. <https://www.broadinstitute.org/gatk/>.
46. **Cock PJA, Fields CJ, Goto N, Heuer ML, Rice PM.** The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. *Nucleic Acids Res.* 2010 Apr;38(6):1767–71.
47. **Martin M.** Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal.* 2011 May 2;17(1):10.

48. **Bolger AM, Lohse M, Usadel B.** Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014 Aug 1;30(15):2114–20.
49. <https://broadinstitute.github.io/picard/>.
50. <https://software.broadinstitute.org/gatk/documentation/article.php?id=44>.
51. **Wang K, Li M, Hakonarson H.** ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2010 Sep;38(16):e164.
52. **Cingolani P, Platts A, Wang LL, Coon M, Nguyen T, Wang L, et al.** A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)*. 2012 Jun;6(2):80–92.
53. **McLaren W, Gil L, Hunt SE, Riat HS, Ritchie GRS, Thormann A, et al.** The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biology* [Internet]. 2016 Dec [cited 2017 May 11];17(1).
54. <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-016-0974-4>
55. <http://blog.goldenhelix.com/goldenadmin/the-state-of-variant-annotation-a-comparison-of-annovar-snpEff-and-vep/>.
56. **Gorlov IP, Gorlova OY, Sunyaev SR, Spitz MR, Amos CI.** Shifting paradigm of association studies: value of rare single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet*. 2008 Jan;82(1):100–12. 1000 Genomes Project Consortium, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015 Oct 1;526(7571):68–74.
57. **Komatsu M, Chiba T, Tatsumi K, Iemura S, Tanida I, Okazaki N, et al.** A novel protein-conjugating system for Ufm1, a ubiquitin-fold modifier. *EMBO J*. 2004 May 5;23(9):1977–86.
58. **Timmer JR, Mak TW, Manova K, Anderson KV, Niswander L.** Tissue morphogenesis and vascular stability require the Frem2 protein, product of the mouse myelencephalic blebs gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005 Aug 16;102(33):11746–50.
59. **Wetzel C, Pifferi S, Picci C, Gök C, Hoffmann D, Bali KK, et al.** Small-molecule inhibition of STOML3 oligomerization reverses pathological mechanical hypersensitivity. *Nat Neurosci*. 2017 Feb;20(2):209–18.
60. **Petit MM, Schoenmakers EF, Huysmans C, Geurts JM, Mandahl N, Van de Ven WJ.** LHFP, a novel translocation partner gene of HMGIC in a lipoma, is a member of a new family of LHFP-like genes. *Genomics*. 1999 May 1;57(3):438–41.
61. **Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al.** A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods*. 2010 Apr;7(4):248–9.
62. **Sim N-L, Kumar P, Hu J, Henikoff S, Schneider G, Ng PC.** SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res*. 2012 Jul;40(Web Server issue):W452–7.
63. **Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C.** Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nature Reviews Genetics*. 2011 Aug 31;12(10):683–91.
64. **Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D.** MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*. 2014 Apr;11(4):361–2.
65. **Daniel J, Liebau E.** The ufm1 cascade. *Cells*. 2014 Jun 11;3(2):627–38.

66. **Shiwaku H, Yoshimura N, Tamura T, Sone M, Ogishima S, Watase K, et al.** Suppression of the novel ER protein Maxer by mutant ataxin-1 in Bergman glia contributes to non-cell autonomous toxicity. *The EMBO Journal*. 2010 Jul 21;29(14):2446–60.
67. **Yoo HM, Kang SH, Kim JY, Lee JE, Seong MW, Lee SW, et al.** Modification of ASC1 by UFM1 Is Crucial for ER α Transactivation and Breast Cancer Development. *Molecular Cell*. 2014 Oct;56(2):261–74.
68. **Hee Kim C, Nam H-S, Hee Lee E, Hun Han S, Jung Cho H, Jin Chung H, et al.** Overexpression of a novel regulator of p120 catenin, NLBP, promotes lung adenocarcinoma proliferation. *Cell Cycle*. 2013 Aug;12(15):2443–53.
69. **Lemaire K, Moura RF, Granvik M, Igoillo-Esteve M, Hohmeier HE, Hendrickx N, et al.** Ubiquitin Fold Modifier 1 (UFM1) and Its Target UFBP1 Protect Pancreatic Beta Cells from ER Stress Induced Apoptosis. Meurs EF, editor. *PLoS ONE*. 2011 Apr 6;6(4):e18517.
70. **Hu X, Pang Q, Shen Q, Liu H, He J, Wang J, et al.** Ubiquitin-fold modifier 1 inhibits apoptosis by suppressing the endoplasmic reticulum stress response in Raw264.7 cells. *Int J Mol Med*. 2014 Jun;33(6):1539–46.
71. **Oh J, Riek AE, Weng S, Petty M, Kim D, Colonna M, et al.** Endoplasmic Reticulum Stress Controls M2 Macrophage Differentiation and Foam Cell Formation. *Journal of Biological Chemistry*. 2012 Apr 6;287(15):11629–41.
72. **Tabas I.** The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in the Progression of Atherosclerosis. *Circulation Research*. 2010 Oct 1;107(7):839–50.
73. **Pang Q, Xiong J, Hu X-L, He J-P, Liu H-F, Zhang G-Y, et al.** UFM1 Protects Macrophages from oxLDL-Induced Foam Cell Formation Through a Liver X Receptor α Dependent Pathway. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 2015;22(11):1124–40.
74. **Li Y-Y, Zhang G-Y, He J-P, Zhang D-D, Kong X-X, Yuan H-M, et al.** Ufm1 inhibits LPS-induced endothelial cell inflammatory responses through the NF- κ B signaling pathway. *Int J Mol Med*. 2017 May;39(5):1119–26.
75. **Nagaishi M, Kim Y-H, Mittelbronn M, Giangaspero F, Paulus W, Brokinkel B, et al.** Amplification of the STOML3, FREM2, and LHFP genes is associated with mesenchymal differentiation in gliosarcoma. *Am J Pathol*. 2012 May;180(5):1816–23.
76. **Takahashi T, Friedmacher F, Zimmer J, Puri P.** Mesenchymal expression of the FRAS1/FREM2 gene unit is decreased in the developing fetal diaphragm of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *Pediatric Surgery International*. 2016 Feb;32(2):135–40.
77. **Saleem AA, Siddiqui SN.** Fraser Syndrome. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2015 Oct;25 Suppl 2:S124–6.
78. **Lloreda-Garcia JM, González-Rodríguez JD, Leante-Castellanos JL.** [Fraser syndrome caused by a new mutation in the FREM2 gene]. *An Pediatr (Barc)*. 2015 Mar;82(3):207–8.

Introduction

"Whaddaya think? A fly. Am I becoming a hundred-and-eighty-five-pound fly? No, I'm becoming something that never existed before. I'm becoming... Brundlefly. Don't you think that's worth a Nobel Prize or two?"

Résultats

The Fly, David Cronenberg

Résultats complémentaires

Discussion

Annexes

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Chaplais E** (2015) Une approche de modélisation de biologie des systèmes sur la spondylarthrite. Thèse, UVSQ
2. **McAllister K, Goodson N, Warburton L, Rogers G** (2017) Spondyloarthritis: diagnosis and management: summary of NICE guidance. *BMJ* j839
3. **Garrett S, Jenkinson T, Kennedy LG, Whitelock H, Gaisford P, Calin A** (1994) A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J Rheumatol* 21:2286–2291
4. **Sieper J, van der Heijde D, Landewe R, et al** (2009) New criteria for inflammatory back pain in patients with chronic back pain: a real patient exercise by experts from the Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS). *Ann Rheum Dis* 68:784–788
5. **Chua-Aguilera CJ, Möller B, Yawalkar N** (2017) Skin Manifestations of Rheumatoid Arthritis, Juvenile Idiopathic Arthritis, and Spondyloarthritis. *Clin Rev Allergy Immunol* 53:371–393
6. **Feijó Azevedo V, Grachinski Buiar P** (2013) Concomitância de artrite reumatoide e espondilite anquilosante em um único paciente: importância dos novos critérios de classificação. *Rev Bras Reumatol* 53:115–119
7. **Stolwijk C, Boonen A, van Tubergen A, Reveille JD** (2012) Epidemiology of spondyloarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 38:441–476
8. **Bakland G, Nossent HC** (2013) Epidemiology of spondyloarthritis: a review. *Curr Rheumatol Rep* 15:351
9. **Dean LE, Jones GT, MacDonald AG, Downham C, Sturrock RD, Macfarlane GJ** (2014) Global prevalence of ankylosing spondylitis. *Rheumatol Oxf Engl* 53:650–657
10. **Costantino F, Talpin A, Said-Nahal R, Goldberg M, Henny J, Chiocchia G, Garchon H-J, Zins M, Breban M** (2015) Prevalence of spondyloarthritis in reference to HLA-B27 in the French population: results of the GAZEL cohort. *Ann Rheum Dis* 74:689–693
11. **Raychaudhuri SP, Deodhar A** (2014) The classification and diagnostic criteria of ankylosing spondylitis. *J Autoimmun* 48-49:128–133
12. **Taurog JD, Chhabra A, Colbert RA** (2016) Ankylosing Spondylitis and Axial Spondyloarthritis. *N Engl J Med* 374:2563–2574
13. **Appel H, Sieper J** (2008) Spondyloarthritis at the crossroads of imaging, pathology, and structural damage in the era of biologics. *Curr Rheumatol Rep* 10:356–363
14. **Terenzi R, Monti S, Tesei G, Carli L** (2018) One year in review 2017: spondyloarthritis. *Clin Exp Rheumatol* 36:1–14
15. **Uckun A, Sezer I** (2017) Ankylosing Spondylitis and Balance. *Eurasian J Med* 49:207–210
16. **Wenker KJ, Quint JM** (2018) Ankylosing Spondylitis. *StatPearls* 15:
17. **Rosenbaum JT, Rosenzweig HL** (2012) The eyes have it: uveitis in patients with spondyloarthritis: Spondyloarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 8:249–250
18. **Wakefield D, Yates W, Amjadi S, McCluskey P** (2016) HLA-B27 Anterior Uveitis: Immunology and Immunopathology. *Ocul Immunol Inflamm* 24:450–459
19. **Cantini F, Nannini C, Cassarà E, Kaloudi O, Niccoli L** (2015) Uveitis in Spondyloarthritis: An Overview. *J Rheumatol Suppl* 93:27–29
20. **Selmi C** (2014) Diagnosis and classification of autoimmune uveitis. *Autoimmun Rev* 13:591–594

21. **Benedek TG** (2013) Psoriasis and psoriatic arthropathy, historical aspects: part I. *J Clin Rheumatol Pract Rep Rheum Musculoskelet Dis* 19:193–198
22. **Machado P, Landewé R, Braun J, Baraliakos X, Hermann K-GA, Hsu B, Baker D, van der Heijde D** (2013) Ankylosing spondylitis patients with and without psoriasis do not differ in disease phenotype. *Ann Rheum Dis* 72:1104–1107
23. **Jacques P, Van Praet L, Carron P, Van den Bosch F, Elewaut D** (2012) Pathophysiology and role of the gastrointestinal system in spondyloarthritides. *Rheum Dis Clin North Am* 38:569–582
24. **Dubash S, McGonagle D, Marzo-Ortega H** (2018) New advances in the understanding and treatment of axial spondyloarthritis: from chance to choice. *Ther Adv Chronic Dis* 9:77–87
25. **Vidal Recos Spondylarthrite ankylosante** :
http://urml-paysdelaloire.org/lls4rR5LPeWqai/uploads/2017/05/RI_REco-Vidal-Spond.ankylosante.pdf.
26. **Sari İ, Öztürk MA, Akkoç N** (2015) Treatment of ankylosing spondylitis. *Turk J Med Sci* 45:416–430
27. **Palazzi C, D'Angelo S, Gilio M, Leccese P, Padula A, Olivieri I** (2015) Pharmacological therapy of spondyloarthritis. *Expert Opin Pharmacother* 16:1495–1504
28. https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_900658/fr/ald-n-27-spondylarthrite-grave.
29. **Chen J, Veras MMS, Liu C, Lin J** (2013) Methotrexate for ankylosing spondylitis. *Cochrane Database Syst Rev* CD004524
30. **Chen J, Lin S, Liu C** (2014) Sulfasalazine for ankylosing spondylitis. *Cochrane Database Syst Rev* CD004800
31. **van Denderen JC, van der Paardt M, Nurmohamed MT, de Ryck YMMA, Dijkmans B a. C, van der Horst-Bruinsma IE** (2005) Double blind, randomised, placebo controlled study of leflunomide in the treatment of active ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 64:1761–1764
32. **Corbett M, Soares M, Jhuti G, et al** (2016) Tumour necrosis factor- α inhibitors for ankylosing spondylitis and non-radiographic axial spondyloarthritis: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess Winch Engl* 20:1–334, v–vi
33. **Benucci M, Damiani A, Bandinelli F, Grossi V, Infantino M, Manfredi M, Gobbi FL, Sarzi-Puttini P, Atzeni F** (2018) Ankylosing Spondylitis Treatment after First Anti-TNF Drug Failure. *Isr Med Assoc J IMAJ* 20:119–122
34. **Elalouf O, Elkayam O** (2015) Long-term safety and efficacy of infliximab for the treatment of ankylosing spondylitis. *Ther Clin Risk Manag* 11:1719–1726
35. **Guillot X, Prati C, Sondag M, Wendling D** (2017) Etanercept for treating axial spondyloarthritis. *Expert Opin Biol Ther* 17:1173–1181
36. **Mounach A, El Maghraoui A** (2014) Efficacy and safety of adalimumab in ankylosing spondylitis. *Open Access Rheumatol Res Rev* 6:83–90
37. **Frampton JE** (2017) Golimumab: A Review in Inflammatory Arthritis. *BioDrugs Clin Immunother Biopharm Gene Ther* 31:263–274
38. **Desmarais J, Beier S, Deodhar A** (2016) Certolizumab pegol for treating axial spondyloarthritis. *Expert Opin Biol Ther* 16:1059–1064
39. **Garcia-Montoya L, Marzo-Ortega H** (2018) The role of secukinumab in the treatment of psoriatic arthritis and ankylosing spondylitis. *Ther Adv Musculoskelet* 10:169-180
40. **Deodhar A, et al.** (2018) Three Multicenter Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Studies Evaluating the Efficacy and Safety of Ustekinumab in Axial Spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol* doi : 10.1002/art.40728

41. **Tan AL, Marzo-Ortega H, O'Connor P, Fraser A, Emery P, McGonagle D** (2004) Efficacy of anakinra in active ankylosing spondylitis: a clinical and magnetic resonance imaging study. *Ann Rheum Dis* 63:1041–1045
42. **Dundar U, Çevik H, Demirdal US, Toktas H** (2014) Use of rituximab to treat a patient with coexistence of rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis: 18 months follow-up. *Int J Rheum Dis*. doi: 10.1111/1756-185X.12303
43. **Ugurlu S, Hacıoglu A, Adibnia Y, Hamuryudan V, Ozdogan H** (2017) Tocilizumab in the treatment of twelve cases with aa amyloidosis secondary to familial mediterranean fever. *Orphanet J Rare Dis* 12:105
44. **de Koning A, Schoones JW, van der Heijde D, van Gaalen FA** (2018) Pathophysiology of axial spondyloarthritis: Consensus and controversies. *Eur J Clin Invest* 48:e12913
45. **Lories RJU, Schett G** (2012) Pathophysiology of new bone formation and ankylosis in spondyloarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 38:555–567
46. **Ranganathan V, Gracey E, Brown MA, Inman RD, Haroon N** (2017) Pathogenesis of ankylosing spondylitis — recent advances and future directions. *Nat Rev Rheumatol* 13:359–367
47. **Rezaieanesh A, Abdolmaleki M, Abdolmohammadi K, Aghaei H, Pakdel FD, Fatahi Y, Soleimanifar N, Zavvar M, Nicknam MH** (2018) Immune cells involved in the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother* 100:198–204
48. **Hreggvidsdottir HS, Noordenbos T, Baeten DL** (2014) Inflammatory pathways in spondyloarthritis. *Mol Immunol* 57:28–37
49. **Paine A, Ritchlin CT** (2016) Targeting the interleukin-23/17 axis in axial spondyloarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 28:359–367
50. **Yago T, Nanke Y, Kawamoto M, Kobashigawa T, Yamanaka H, Kotake S** (2017) IL-23 and Th17 Disease in Inflammatory Arthritis. *J Clin Med*. doi: 10.3390/jcm6090081
51. **Briot K, Roux C** (2015) Inflammation, bone loss and fracture risk in spondyloarthritis. *RMD Open* 1:e000052
52. **Lories RJ, Haroon N** (2014) Bone formation in axial spondyloarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 28:765–777
53. **Neerinckx B, Lories R** (2017) Mechanisms, impact and prevention of pathological bone regeneration in spondyloarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 29:287–292
54. **Samson M, Lakomy D, Audia S, Bonnotte B** (2011) Les lymphocytes TH17 : différenciation, phénotype, fonctions, et implications en pathologie et thérapeutique humaine. *Rev Médecine Interne* 32:292–301
55. **Okamoto K** (2017) [Regulation of bone by IL-17-producing T cells]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 40:361–366
56. **Mori G, D'Amelio P, Faccio R, Brunetti G** (2013) The Interplay between the Bone and the Immune System. *Clin Dev Immunol* 2013:1–16
57. **Sieper J, Appel H, Braun J, Rudwaleit M** (2008) Critical appraisal of assessment of structural damage in ankylosing spondylitis: Implications for treatment outcomes. *Arthritis Rheum* 58:649–656
58. **Jacques P, McGonagle D** (2014) The role of mechanical stress in the pathogenesis of spondyloarthritis and how to combat it. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 28:703–710
59. **Xie W, Zhou L, Li S, Hui T, Chen D** (2016) Wnt/ β -catenin signaling plays a key role in the development of spondyloarthritis. *Ann N Y Acad Sci* 1364:25–31
60. **Liao H-T, Lin Y-F, Tsai C-Y, Chou T-C** (2018) Bone morphogenetic proteins and Dickkopf-1 in ankylosing spondylitis. *Scand J Rheumatol* 47:56–61

61. **O’Rielly DD, Uddin M, Rahman P** (2016) Ankylosing spondylitis: beyond genome-wide association studies. *Curr Opin Rheumatol* 28:337–345
62. **Hanson A, Brown MA** (2017) Genetics and the Causes of Ankylosing Spondylitis. *Rheum Dis Clin N Am* 43:401–414
63. **Robinson PC, Brown MA** (2014) Genetics of ankylosing spondylitis. *Mol Immunol* 57:2–11
64. **Caffrey MF, James DC** (1973) Human lymphocyte antigen association in ankylosing spondylitis. *Nature* 242:121
65. **Schlosstein L, Terasaki PI, Bluestone R, Pearson CM** (1973) High association of an HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis. *N Engl J Med* 288:704–706
66. **Bowness P** (2015) HLA-B27. *Annu Rev Immunol* 33:29–48
67. **Akkoç N, Yarkan H, Kenar G, Khan MA** (2017) Ankylosing Spondylitis: HLA-B*27-Positive Versus HLA-B*27-Negative Disease. *Curr Rheumatol Rep* 19:26
68. **International Genetics of Ankylosing Spondylitis Consortium (IGAS), Cortes A, Hadler J, et al** (2013) Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nat Genet* 45:730–738
69. **Li Z, Brown MA** (2017) Progress of genome-wide association studies of ankylosing spondylitis. *Clin Transl Immunol* 6:e163
70. **Keidel S, Chen L, Pointon J, Wordsworth P** (2013) ERAP1 and ankylosing spondylitis. *Curr Opin Immunol* 25:97–102
71. **Agrawal N, Brown MA** (2014) Genetic associations and functional characterization of M1 aminopeptidases and immune-mediated diseases. *Genes Immun* 15:521–527
72. **Fu B, Li S, Wang L, Berman MA, Dorf ME** (2014) The ubiquitin conjugating enzyme UBE2L3 regulates TNF α -induced linear ubiquitination. *Cell Res* 24:376–379
73. **Wang S, Adrianto I, Wiley GB, et al** (2012) A functional haplotype of UBE2L3 confers risk for systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 13:380–387
74. **Sherlock JP, Buckley CD, Cua DJ** (2014) The critical role of interleukin-23 in spondyloarthritis. *Mol Immunol* 57:38–43
75. **Ebringer A** (1989) The relationship between Klebsiella infection and ankylosing spondylitis. *Baillières Clin Rheumatol* 3:321–338
76. **Kijlstra A, Luyendijk L, van der Gaag R, van Kregten E, Linssen A, Willers JM** (1986) IgG and IgA immune response against klebsiella in HLA-B27-associated anterior uveitis. *Br J Ophthalmol* 70:85–88
77. **Ebringer RW, Cawdell DR, Cowling P, Ebringer A** (1978) Sequential studies in ankylosing spondylitis. Association of Klebsiella pneumoniae with active disease. *Ann Rheum Dis* 37:146–151
78. **Geczy AF, Seager K, Bashir HV, de Vere-Tyndall A, Edmonds J** (1980) The role of Klebsiella in the pathogenesis of ankylosing spondylitis. II Evidence for a specific B27-associated marker on the lymphocytes of patients with ankylosing spondylitis. *J Clin Lab Immunol* 3:23–28
79. **Zhang L, Zhang Y-J, Chen J, Huang X-L, Fang G-S, Yang L-J, Duan Y, Wang J** (2018) The association of HLA-B27 and Klebsiella pneumoniae in ankylosing spondylitis: A systematic review. *Microb Pathog* 117:49–54
80. **Rashid T, Ebringer A, Wilson C** (2016) The Link Between Klebsiella and Ankylosing Spondylitis in Worldwide Geographical Locations. *Curr Rheumatol Rev* 12:223–231
81. **Stoll ML** (2015) Gut microbes, immunity, and spondyloarthritis. *Clin Immunol* 159:134–142

82. **Yang L, Wang L, Wang X, Xian CJ, Lu H** (2016) A Possible Role of Intestinal Microbiota in the Pathogenesis of Ankylosing Spondylitis. *Int J Mol Sci*. doi: 10.3390/ijms17122126
83. **Xu Y-Y, Tan X, He Y-T, Zhou Y-Y, He X-H, Huang R-Y** (2016) Role of gut microbiome in ankylosing spondylitis: an analysis of studies in literature. *Discov Med* 22:361–370
84. **Moalic V** (2008) Comment est réalisé un typage HLA ? *Réanimation* 17:407–411
85. **Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M** (2004) *Immunobiology, The Immune System in Health and Disease*. New York, NY
86. **Martínez-González O, Cantero-Hinojosa J, Paule-Sastre P, Gómez-Magán JC, Salvatierra-Ríos D** (1994) Intestinal permeability in patients with ankylosing spondylitis and their healthy relatives. *Br J Rheumatol* 33:644–647
87. **Collado A, Sanmarti R, Serra C, Gallart T, Cañete JD, Gratacos J, Vives J, Muñoz-Gomez J** (1991) Serum levels of secretory IgA in ankylosing spondylitis. *Scand J Rheumatol* 20:153–158
88. **Wen C, Zheng Z, Shao T, et al** (2017) Quantitative metagenomics reveals unique gut microbiome biomarkers in ankylosing spondylitis. *Genome Biol*. doi: 10.1186/s13059-017-1271-6
89. **Tito RY, Cypers H, Joossens M, Varkas G, Van Praet L, Glorieus E, Van den Bosch F, De Vos M, Raes J, Elewaut D** (2017) Brief Report: Dialister as a Microbial Marker of Disease Activity in Spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol* 69:114–121
90. **Breban M, Tap J, Leboime A, Said-Nahal R, Langella P, Chiochia G, Furet J-P, Sokol H** (2017) Faecal microbiota study reveals specific dysbiosis in spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis* 76:1614–1622
91. **Wright PB, McEntegart A, McCarey D, McInnes IB, Siebert S, Milling SWF** (2016) Ankylosing spondylitis patients display altered dendritic cell and T cell populations that implicate pathogenic roles for the IL-23 cytokine axis and intestinal inflammation. *Rheumatology* 55:120–132
92. **Ciccia F, Guggino G, Rizzo A, et al** (2015) Type 3 innate lymphoid cells producing IL-17 and IL-22 are expanded in the gut, in the peripheral blood, synovial fluid and bone marrow of patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 1739–1747
93. **Babaie F, Hasankhani M, Mohammadi H, Safarzadeh E, Rezaeiemanesh A, Salimi R, Baradaran B, Babaloo Z** (2018) The role of gut microbiota and IL-23/IL-17 pathway in ankylosing spondylitis immunopathogenesis: New insights and updates. *Immunol Lett* 196:52–62
94. **Wieczorek M, Abualrous ET, Sticht J, Álvaro-Benito M, Stolzenberg S, Noé F, Freund C** (2017) Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Front Immunol* 8:292
95. **Fauci AS, Wiener C, Braunwald E, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson JL, Loscalzo J** *Harrison's Principles of internal medicine* 17th Edition.
96. **Chaplin DD** (2010) Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 125:S3–S23
97. **Blees A, Janulienė D, Hofmann T, Koller N, Schmidt C, Trowitzsch S, Moeller A, Tampé R** (2017) Structure of the human MHC-I peptide-loading complex. *Nature*. doi: 10.1038/nature24627
98. **Turano C, Gaucci E, Grillo C, Chichiarelli S** (2011) ERp57/GRP58: a protein with multiple functions. *Cell Mol Biol Lett* 16:539–563
99. **Ellgaard L, Frickel E-M** (2003) Calnexin, calreticulin, and ERp57: teammates in glycoprotein folding. *Cell Biochem Biophys* 39:223–247
100. **Eggensperger S, Tampé R** (2015) The transporter associated with antigen processing: a key player in adaptive immunity. *Biol Chem* 396:1059–1072
101. **Reeves E, Elliott T, James E, Edwards CJ** (2014) ERAP1 in the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Immunol Res* 60:257–269

102. **Garbi N, Hämmerling G, Tanaka S** (2007) Interaction of ERp57 and tapasin in the generation of MHC class I-peptide complexes. *Curr Opin Immunol* 19:99–105
103. **Donaldson JG, Williams DB** (2009) Intracellular assembly and trafficking of MHC class I molecules. *Traffic Cph Den* 10:1745–1752
104. **Mathieu A, Paladini F, Vacca A, Cauli A, Fiorillo MT, Sorrentino R** (2009) The interplay between the geographic distribution of HLA-B27 alleles and their role in infectious and autoimmune diseases: A unifying hypothesis. *Autoimmun Rev* 8:420–425
105. **Khan MA** (2013) Polymorphism of HLA-B27: 105 subtypes currently known. *Curr Rheumatol Rep* 15:362
106. **Khan MA** (2017) An Update on the Genetic Polymorphism of HLA-B*27 With 213 Alleles Encompassing 160 Subtypes (and Still Counting). *Curr Rheumatol Rep*. doi: 10.1007/s11926-017-0640-1
107. **Van Gaalen FA** (2012) Does HLA-B*2706 protect against ankylosing spondylitis? A meta-analysis. *Int J Rheum Dis* 15:8–12
108. **McCutcheon JA, Lutz CT** (1992) Mutagenesis around residue 176 on HLA-B*0702 characterizes multiple distinct epitopes for anti-HLA antibodies. *Hum Immunol* 35:125–131
109. **Chen B, Li J, He C, Li D, Tong W, Zou Y, Xu W** (2017) Role of HLA-B27 in the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Mol Med Rep* 15:1943–1951
110. **Lee S, Khare SD, Griffiths MM, Luthra HS, David CS** (2000) HLA-B27 transgenic mice are susceptible to collagen-induced arthritis: type II collagen as a potential target in human disease. *Hum Immunol* 61:140–147
111. **Breban M, Costantino F, André C, Chiochia G, Garchon H-J** (2015) Revisiting MHC Genes in Spondyloarthritis. *Curr Rheumatol Rep*. doi: 10.1007/s11926-015-0516-1
112. **Paladini F, Cocco E, Cauli A, Cascino I, Vacca A, Belfiore F, Fiorillo MT, Mathieu A, Sorrentino R** (2008) A functional polymorphism of the vasoactive intestinal peptide receptor 1 gene correlates with the presence of HLA-B*2705 in Sardinia. *Genes Immun* 9:659–667
113. **Urban RG, Chicz RM, Lane WS, Strominger JL, Rehm A, Kenter MJ, UytdeHaag FG, Ploegh H, Uchanska-Ziegler B, Ziegler A** (1994) A subset of HLA-B27 molecules contains peptides much longer than nonamers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1534–1538
114. **Vitulano C, Tedeschi V, Paladini F, Sorrentino R, Fiorillo MT** (2017) The interplay between HLA-B27 and ERAP1/ERAP2 aminopeptidases: from anti-viral protection to spondyloarthritis. *Clin Exp Immunol* 190:281–290
115. **López-Larrea C, González S, Martínez-Borra J** (1998) The role of HLA-B27 polymorphism and molecular mimicry in spondylarthropathy. *Mol Med Today* 4:540–549
116. **Montserrat V, Galocha B, Marcilla M, Vázquez M, López de Castro JA** (2006) HLA-B*2704, an allotype associated with ankylosing spondylitis, is critically dependent on transporter associated with antigen processing and relatively independent of tapasin and immunoproteasome for maturation, surface expression, and T cell recognition: relationship to B*2705 and B*2706. *J Immunol Baltim Md* 1950 177:7015–7023
117. **Brooks JM, Murray RJ, Thomas WA, Kurilla MG, Rickinson AB** (1993) Different HLA-B27 subtypes present the same immunodominant Epstein-Barr virus peptide. *J Exp Med* 178:879–887
118. **Rückert C, Fiorillo MT, Loll B, Moretti R, Biesiadka J, Saenger W, Ziegler A, Sorrentino R, Uchanska-Ziegler B** (2006) Conformational dimorphism of self-peptides and molecular mimicry in a disease-associated HLA-B27 subtype. *J Biol Chem* 281:2306–2316
119. **Penttinen MA, Ekman P, Granfors K** (2004) Non-antigen presenting effects of HLA-B27. *Curr Mol Med* 4:41–49

120. **Khan MA, Mathieu A, Sorrentino R, Akkoc N** (2007) The pathogenetic role of HLA-B27 and its subtypes. *Autoimmun Rev* 6:183–189
121. **Khare SD, Lee S, Bull MJ, Hanson J, Luthra HS, Hammerling GJ, David CS** (1999) Peptide binding alpha1alpha2 domain of HLA-B27 contributes to the disease pathogenesis in transgenic mice. *Hum Immunol* 60:116–126
122. **Allen RL, O'Callaghan CA, McMichael AJ, Bowness P** (1999) Cutting edge: HLA-B27 can form a novel beta 2-microglobulin-free heavy chain homodimer structure. *J Immunol Baltim Md 1950* 162:5045–5048
123. **Santos SG, Lynch S, Campbell EC, Antoniou AN, Powis SJ** (2008) Induction of HLA-B27 heavy chain homodimer formation after activation in dendritic cells. *Arthritis Res Ther* 100:R100
124. **Giles J, Shaw J, Piper C, et al** (2012) HLA-B27 homodimers and free H chains are stronger ligands for leukocyte Ig-like receptor B2 than classical HLA class I. *J Immunol Baltim Md 1950* 188:6184–6193
125. **Kuijpers TW, Vendelbosch S, Berg M van den, Baeten DLP** (2016) Killer immunoglobulin receptor genes in spondyloarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 28:368–375
126. **Colbert RA, Tran TM, Layh-Schmitt G** (2014) HLA-B27 misfolding and ankylosing spondylitis. *Mol Immunol* 57:44–51
127. **Mear JP, Schreiber KL, Münz C, Zhu X, Stevanović S, Rammensee HG, Rowland-Jones SL, Colbert RA** (1999) Misfolding of HLA-B27 as a result of its B pocket suggests a novel mechanism for its role in susceptibility to spondyloarthropathies. *J Immunol Baltim Md 1950* 163:6665–6670
128. **Turner MJ, Sowders DP, DeLay ML, Mohapatra R, Bai S, Smith JA, Brandewie JR, Taurog JD, Colbert RA** (2005) HLA-B27 misfolding in transgenic rats is associated with activation of the unfolded protein response. *J Immunol Baltim Md 1950* 175:2438–2448
129. **Grootjans J, Kaser A, Kaufman RJ, Blumberg RS** (2016) The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* 16:469–484
130. **Lynch S, Santos SG, Campbell EC, Nimmo AMS, Botting C, Prescott A, Antoniou AN, Powis SJ** (2009) Novel MHC Class I Structures on Exosomes. *J Immunol* 183:1884–1891
131. **Raposo G, Tenza D, Mecheri S, Peronet R, Bonnerot C, Desaymard C** (1997) Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Mol Biol Cell* 8:2631–2645
132. **Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, Geuze HJ** (1996) B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 183:1161–1172
133. **Ohashi K** (2001) Pathogenesis of beta2-microglobulin amyloidosis. *Pathol Int* 51:1–10
134. **Fukunishi S, Yoh K, Kamae S, Yoshiya S** (2007) Beta 2-microglobulin amyloid deposit in HLA-B27 transgenic rats. *Mod Rheumatol* 17:380–384
135. **Lories RJU** (2006) Animal models of spondyloarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 18:342–346
136. **Hacquard-Bouder C, Ittah M, Breban M** (2006) Animal models of HLA-B27-associated diseases: new outcomes. *Joint Bone Spine* 73:132–138
137. **Breban M, Araujo LM, Chiochia G** (2014) Editorial: Animal Models of Spondyloarthritis: Do They Faithfully Mirror Human Disease?: Editorial. *Arthritis Rheumatol* 66:1689–1692
138. **Taurog JD** (1990) Immunology, genetics, and animal models of the spondyloarthropathies. *Curr Opin Rheumatol* 2:586–591
139. **Breban M** (1998) HLA-B27 transgenic rats model. *Ann Med Interne (Paris)* 149:139–141
140. **Jouhault Q** (2017) Modulation de la balance Th17/Treg par l'IL-27 et ICOS dans un modèle animal de Spondyloarthrite. Thèse, UVSQ

141. **Barnea E, Melamed Kadosh D, Haimovich Y, et al** (2017) The Human Leukocyte Antigen (HLA)-B27 Peptidome in Vivo, in Spondyloarthritis-susceptible HLA-B27 Transgenic Rats and the Effect of Erp1 Deletion. *Mol Cell Proteomics MCP* 16:642–662
142. **Marroquin Belaunzaran O, Kleber S, Schauer S, et al** (2015) HLA-B27-Homodimer-Specific Antibody Modulates the Expansion of Pro-Inflammatory T-Cells in HLA-B27 Transgenic Rats. *PLoS One* 1:e0130811
143. **Lin P, Bach M, Asquith M, et al** (2014) HLA-B27 and human β 2-microglobulin affect the gut microbiota of transgenic rats. *PLoS One* 9:e105684
144. **Uchanska-Ziegler B, Ziegler A** (2008) HLA-B27-transgenic rats, amyloid deposits, and spondyloarthropathies. *Mod Rheumatol* 18:425–426
145. **Khare SD, Luthra HS, David CS** (1995) Spontaneous inflammatory arthritis in HLA-B27 transgenic mice lacking beta 2-microglobulin: a model of human spondyloarthropathies. *J Exp Med* 182:1153–1158
146. **Kingsbury DJ, Mear JP, Witte DP, Taurog JD, Roopenian DC, Colbert RA** (2000) Development of spontaneous arthritis in β 2-microglobulin-deficient mice without expression of HLA-B27: Association with deficiency of endogenous major histocompatibility complex class I expression. *Arthritis Rheum* 43:2290–2296
147. **Capková J, Ivanyi P** (1992) H-2 influence on ankylosing enthesopathy of the ankle (ANKENT). *Folia Biol (Praha)* 38:258–262
148. **Weinreich S, Eulerink F, Capkova J, Pla M, Gaede K, Heesemann J, van Alphen L, Zurcher C, Hoebe-Hewryk B, Kievits F** (1995) HLA-B27 as a relative risk factor in ankylosing enthesopathy in transgenic mice. *Hum Immunol* 42:103–115
149. **Lories RJU, Derese I, Luyten FP** (2005) Modulation of bone morphogenetic protein signaling inhibits the onset and progression of ankylosing enthesitis. *J Clin Invest* 115:1571–1579
150. **Haynes KR, Pettit AR, Duan R, Tseng H-W, Glant TT, Brown MA, Thomas GP** (2012) Excessive bone formation in a mouse model of ankylosing spondylitis is associated with decreases in Wnt pathway inhibitors. *Arthritis Res Ther* 14:R253
151. **Tseng H-W, Glant TT, Brown MA, Kenna TJ, Thomas GP, Pettit AR** (2017) Early anti-inflammatory intervention ameliorates axial disease in the proteoglycan-induced spondylitis mouse model of ankylosing spondylitis. *BMC Musculoskelet Disord* 18:228
152. **Ebihara S, Date F, Dong Y, Ono M** (2015) Interleukin-17 is a critical target for the treatment of ankylosing enthesitis and psoriasis-like dermatitis in mice. *Autoimmunity* 48:259–266
153. **Jaller Char JJ, Jaller JA, Waibel JS, Bhanusali DG, Bhanusali N** (2018) The Role of IL-17 in the Human Immune System and Its Blockage as a Treatment of Rheumatoid Arthritis, Ankylosing Spondylitis, and Psoriatic Arthritis. *J Drugs Dermatol JDD* 17:539–542
154. **Adamopoulos IE, Tessmer M, Chao C-C, et al** (2011) IL-23 Is Critical for Induction of Arthritis, Osteoclast Formation, and Maintenance of Bone Mass. *J Immunol* 187:951–959
155. **Guerard S, Boieri M, Hultqvist M, Holmdahl R, Wing K** (2016) The SKG Mutation in ZAP-70 also Confers Arthritis Susceptibility in C57 Black Mouse Strains. *Scand J Immunol* 84:3–11
156. **Chow CY, Reiter LT** (2017) Etiology of Human Genetic Disease on the Fly. *Trends Genet TIG* 33:391–398
157. **Piper MDW, Partridge L** (2017) *Drosophila* as a model for ageing. *Biochim Biophys Acta*. doi: 10.1016/j.bbadis.2017.09.016
158. **Sen A, Cox RT** (2017) Fly Models of Human Diseases: *Drosophila* as a Model for Understanding Human Mitochondrial Mutations and Disease. *Curr Top Dev Biol* 121:1–27

159. **Pandey UB, Nichols CD** (2011) Human Disease Models in *Drosophila melanogaster* and the Role of the Fly in Therapeutic Drug Discovery. *Pharmacol Rev* 63:411–436
160. **Lőrincz P, Mauvezin C, Juhász G** (2017) Exploring Autophagy in *Drosophila*. *Cells*. doi: 10.3390/cells6030022
161. **Liu X, Hodgson JJ, Buchon N** (2017) *Drosophila* as a model for homeostatic, antibacterial, and antiviral mechanisms in the gut. *PLoS Pathog* 13:e1006277
162. **Marygold SJ, Crosby MA, Goodman JL, FlyBase Consortium** (2016) Using FlyBase, a Database of *Drosophila* Genes and Genomes. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 1478:1–31
163. **Reiter LT** (2001) A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences In *Drosophila melanogaster*. *Genome Res* 11:1114–1125
164. **Ugur B, Chen K, Bellen HJ** (2016) *Drosophila* tools and assays for the study of human diseases. *Dis Model Mech* 9:235–244
165. **Marsh JL, Pallos J, Thompson LM** (2003) Fly models of Huntington’s disease. *Hum Mol Genet* 12 Spec No 2:R187–193
166. **Prüßing K, Voigt A, Schulz JB** (2013) *Drosophila melanogaster* as a model organism for Alzheimer’s disease. *Mol Neurodegener* 8:35
167. **West RJH, Furmston R, Williams CAC, Elliott CJH** (2015) Neurophysiology of *Drosophila* models of Parkinson’s disease. *Park Dis* 2015:381281
168. **van der Voet M, Nijhof B, Oortveld MAW, Schenck A** (2014) *Drosophila* models of early onset cognitive disorders and their clinical applications. *Neurosci Biobehav Rev* 46:326–342
169. **Bell GP, Thompson BJ** (2014) Colorectal cancer progression: lessons from *Drosophila*? *Semin Cell Dev Biol* 28:70–77
170. **Sonoshita M, Cagan RL** (2017) Modeling Human Cancers in *Drosophila*. *Curr Top Dev Biol* 121:287–309
171. **Hsouna A, Nallamotheu G, Kose N, Guinea M, Dammai V, Hsu T** (2010) *Drosophila* von Hippel-Lindau tumor suppressor gene function in epithelial tubule morphogenesis. *Mol Cell Biol* 30:3779–3794
172. **Herranz H, Cohen SM** (2017) *Drosophila* as a Model to Study the Link between Metabolism and Cancer. *J Dev Biol* 5:50
173. **Daenzer JMI, Fridovich-Keil JL** (2017) *Drosophila melanogaster* Models of Galactosemia. *Curr Top Dev Biol* 121:377–395
174. **Xu Y, Condell M, Plesken H, Edelman-Novemsky I, Ma J, Ren M, Schlame M** (2006) A *Drosophila* model of Barth syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:11584–11588
175. **Qian L, Bodmer R** (2012) Probing the polygenic basis of cardiomyopathies in *Drosophila*. *J Cell Mol Med* 16:972–977
176. **Musselman LP, Kühnlein RP** (2018) *Drosophila* as a model to study obesity and metabolic disease. *J Exp Biol*. doi: 10.1242/jeb.163881
177. **McBride SM, Bell AJ, Jongens TA** (2012) Behavior in a *Drosophila* model of fragile X. *Results Probl Cell Differ* 54:83–117
178. **Kreipke RE, Kwon YV, Shcherbata HR, Ruohola-Baker H** (2017) *Drosophila melanogaster* as a Model of Muscle Degeneration Disorders. *Curr Top Dev Biol* 121:83–109
179. **Lin S-C, Chang Y-Y, Chan C-C** (2014) Strategies for gene disruption in *Drosophila*. *Cell Biosci* 4:63
180. **Xu J, Ren X, Sun J, Wang X, Qiao H-H, Xu B-W, Liu L-P, Ni J-Q** (2015) A Toolkit of CRISPR-Based Genome Editing Systems in *Drosophila*. *J Genet Genomics Yi Chuan Xue Bao* 42:141–149

181. **Majumdar S, Rio DC** (2015) P Transposable Elements in *Drosophila* and other Eukaryotic Organisms. *Microbiol Spectr* 3:MDNA3–0004–2014
182. **Kaya-Çopur A, Schnorrer F** (2016) A Guide to Genome-Wide In Vivo RNAi Applications in *Drosophila*. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 1478:117–143
183. **Buchon N, Silverman N, Cherry S** (2014) Immunity in *Drosophila melanogaster* — from microbial recognition to whole-organism physiology. *Nat Rev Immunol* 14:796–810
184. **Boman HG, Nilsson I, Rasmuson B** (1972) Inducible antibacterial defence system in *Drosophila*. *Nature* 237:232–235
185. **Pham LN, Dionne MS, Shirasu-Hiza M, Schneider DS** (2007) A Specific Primed Immune Response in *Drosophila* Is Dependent on Phagocytes. *PLoS Pathog* 3:e26
186. **Letourneau M, Lapraz F, Sharma A, Vanzo N, Waltzer L, Crozatier M** (2016) *Drosophila* hematopoiesis under normal conditions and in response to immune stress. *FEBS Lett* 590:4034–4051
187. **Gold KS, Brückner K** (2015) Macrophages and cellular immunity in *Drosophila melanogaster*. *Semin Immunol* 27:357–368
188. **Crozatier M, Krzemien J, Vincent A** (2007) The hematopoietic niche: a *Drosophila* model, at last. *Cell Cycle Georget Tex* 6:1443–1444
189. **Cláudio N, Dalet A, Gatti E, Pierre P** (2013) Mapping the crossroads of immune activation and cellular stress response pathways. *EMBO J* 32:1214–1224
190. **Crozatier M, Meister M** (2007) *Drosophila* haematopoiesis. *Cell Microbiol* 9:1117–1126
191. **Kounatidis I, Ligoxygakis P** (2012) *Drosophila* as a model system to unravel the layers of innate immunity to infection. *Open Biol* 120075
192. **Myllymäki H, Valanne S, Rämetsä M** (2014) The *Drosophila* imd signaling pathway. *J Immunol Baltim Md* 195 192:3455–3462
193. **Valanne S, Wang J-H, Rämetsä M** (2011) The *Drosophila* Toll signaling pathway. *J Immunol Baltim Md* 195 186:649–656
194. **Ryoo HD** (2015) *Drosophila* as a model for unfolded protein response research. *BMB Rep* 48:445–453
195. **Engin F** (2016) ER stress and development of type 1 diabetes. *J Investig Med Off Publ Am Fed Clin Res* 64:2–6
196. **Corazzari M, Gagliardi M, Fimia GM, Piacentini M** (2017) Endoplasmic Reticulum Stress, Unfolded Protein Response, and Cancer Cell Fate. *Front Oncol* 7:78
197. **Clark AL, Urano F** (2016) Endoplasmic reticulum stress in beta cells and autoimmune diabetes. *Curr Opin Immunol* 43:60–66
198. **Ochoa CD, Wu RF, Terada LS** (2018) ROS signaling and ER stress in cardiovascular disease. *Mol Aspects Med*. doi: 10.1016/j.mam.2018.03.002
199. **Smith JA** (2016) The role of the unfolded protein response in axial spondyloarthritis. *Clin Rheumatol* 35:1425–1431
200. **Preston GM, Brodsky JL** (2017) The evolving role of ubiquitin modification in endoplasmic reticulum-associated degradation. *Biochem J* 474:445–469
201. **Fuchs Y, Steller H** (2011) Programmed Cell Death in Animal Development and Disease. *Cell* 147:742–758
202. **Hasnain SZ, Lourie R, Das I, Chen AC-H, McGuckin MA** (2012) The interplay between endoplasmic reticulum stress and inflammation. *Immunol Cell Biol* 90:260–270
203. **Elmore S** (2007) Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 35:495–516

204. **Clavier A, Rincheval-Arnold A, Colin J, Mignotte B, GuénaI I** (2016) Apoptosis in *Drosophila*: which role for mitochondria? *Apoptosis Int J Program Cell Death* 21:239–251
205. **Zhou X, Jiang W, Liu Z, Liu S, Liang X** (2017) Virus Infection and Death Receptor-Mediated Apoptosis. *Viruses*. doi: 10.3390/v9110316
206. **Sano R, Reed JC** (2013) ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1833:3460–3470
207. **Rock KL, Kono H** (2008) The Inflammatory Response to Cell Death. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 3:99–126
208. **Bleil J, Sieper J, Maier R, Schlichting U, Hempfing A, Syrbe U, Appel H** (2015) Cartilage in facet joints of patients with ankylosing spondylitis (AS) shows signs of cartilage degeneration rather than chondrocyte hypertrophy: implications for joint remodeling in AS. *Arthritis Res Ther*. doi: 10.1186/s13075-015-0675-5
209. **Guruharsha KG, Rual J-F, Zhai B, et al** (2011) A Protein Complex Network of *Drosophila melanogaster*. *Cell* 147:690–703
210. <http://www.sdbonline.org/sites/fly/aimain/aadevinx.htm>.
211. **Ammeux N, Housden BE, Georgiadis A, Hu Y, Perrimon N** (2016) Mapping signaling pathway cross-talk in *Drosophila* cells. *Proc Natl Acad Sci* 113:9940–9945
212. **Salazar VS, Gamer LW, Rosen V** (2016) BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nat Rev Endocrinol* 12:203–221
213. **Katagiri T** (2012) [BMP signaling and bone formation]. *Clin Calcium* 22:1677–1683
214. **Katagiri T, Tsukamoto S** (2013) The unique activity of bone morphogenetic proteins in bone: a critical role of the Smad signaling pathway. *Biol Chem*. doi: 10.1515/hsz-2012-0310
215. **Urist MR** (1965) Bone: formation by autoinduction. *Science* 150:893–899
216. **Reddi AH, Huggins C** (1972) Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:1601–1605
217. **Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA** (1988) Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242:1528–1534
218. **Wozney JM, Rosen V, Byrne M, Celeste AJ, Moutsatsos I, Wang EA** (1990) Growth factors influencing bone development. *J Cell Sci Suppl* 13:149–156
219. **Harrison CA, Wiater E, Gray PC, Greenwald J, Choe S, Vale W** (2004) Modulation of activin and BMP signaling. *Mol Cell Endocrinol* 225:19–24
220. **Katagiri T, Watabe T** (2016) Bone Morphogenetic Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8:a021899
221. **Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M** (2010) Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem (Tokyo)* 147:35–51
222. **Mueller TD** (2015) Mechanisms of BMP–Receptor Interaction and Activation. In: *Vitam. Horm.* Elsevier, pp 1–61
223. **Heldin C-H, Moustakas A** (2012) Role of Smads in TGF β signaling. *Cell Tissue Res* 347:21–36
224. **Miyazawa K, Miyazono K** (2017) Regulation of TGF- β Family Signaling by Inhibitory Smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9:a022095
225. **Derynck R, Zhang YE** (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature* 425:577–584
226. **Liu TM, Lee EH** (2013) Transcriptional regulatory cascades in Runx2-dependent bone development. *Tissue Eng Part B Rev* 19:254–263

227. **Sedlmeier G, Sleeman JP** (2017) Extracellular regulation of BMP signaling: welcome to the matrix. *Biochem Soc Trans* 45:173–181
228. **Balemans W, Van Hul W** (2002) Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Dev Biol* 250:231–250
229. **Brazil DP, Church RH, Surae S, Godson C, Martin F** (2015) BMP signalling: agony and antagonism in the family. *Trends Cell Biol* 25:249–264
230. **Krause C, Guzman A, Knaus P** (2011) Noggin. *Int J Biochem Cell Biol* 43:478–481
231. **De Robertis EM, Moriyama Y** (2016) The Chordin Morphogenetic Pathway. *Curr Top Dev Biol* 116:231–245
232. **Rosen V** (2006) BMP and BMP inhibitors in bone. *Ann N Y Acad Sci* 1068:19–25
233. **Ramel M-C, Hill CS** (2012) Spatial regulation of BMP activity. *FEBS Lett* 586:1929–1941
234. **Piccolo S, Agius E, Leyns L, Bhattacharyya S, Grunz H, Bouwmeester T, De Robertis EM** (1999) The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* 397:707–710
235. **Deglicerti A, Haremak T, Warmflash A, Sorre B, Brivanlou AH** (2015) Coco is a dual activity modulator of TGF β signaling. *Dev Camb Engl* 142:2678–2685
236. **Nolan K, Thompson TB** (2014) The DAN family: modulators of TGF- β signaling and beyond. *Protein Sci Publ Protein Soc* 23:999–1012
237. **Hsu DR, Economides AN, Wang X, Eimon PM, Harland RM** (1998) The *Xenopus* dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Mol Cell* 1:673–683
238. **van Bezooijen RL, Roelen BAJ, Visser A, van der Wee-Pals L, de Wilt E, Karperien M, Hamersma H, Papapoulos SE, ten Dijke P, Löwik CWGM** (2004) Sclerostin Is an Osteocyte-expressed Negative Regulator of Bone Formation, But Not a Classical BMP Antagonist. *J Exp Med* 199:805–814
239. **Lintern KB, Guidato S, Rowe A, Saldanha JW, Itasaki N** (2009) Characterization of wise protein and its molecular mechanism to interact with both Wnt and BMP signals. *J Biol Chem* 284:23159–23168
240. **Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R, Gawantka V, Delius H, Massagué J, Niehrs C** (1999) Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* 401:480–485
241. **Jin W, Yun C, Kim H-S, Kim S-J** (2007) TrkC binds to the bone morphogenetic protein type II receptor to suppress bone morphogenetic protein signaling. *Cancer Res* 67:9869–9877
242. **Corradini E, Babitt JL, Lin HY** (2009) The RGM/DRAGON family of BMP co-receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 20:389–398
243. **Colucci S, Pagani A, Pettinato M, Artuso I, Nai A, Camaschella C, Silvestri L** (2017) The immunophilin FKBP12 inhibits hepcidin expression by binding the BMP type I receptor ALK2 in hepatocytes. *Blood* 130:2111–2120
244. **Murakami G, Watabe T, Takaoka K, Miyazono K, Imamura T** (2003) Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Mol Biol Cell* 14:2809–2817
245. **Kowanetz M, Lönn P, Vanlandewijck M, Kowanetz K, Heldin C-H, Moustakas A** (2008) TGFbeta induces SIK to negatively regulate type I receptor kinase signaling. *J Cell Biol* 182:655–662
246. **Peterson AJ, O'Connor MB** (2014) Strategies for exploring TGF- β signaling in *Drosophila*. *Methods* 68:183–193
247. **Affolter M, Basler K** (2007) The Decapentaplegic morphogen gradient: from pattern formation to growth regulation. *Nat Rev Genet* 8:663–674

248. **Hamaratoglu F, Affolter M, Pyrowolakis G** (2014) Dpp/BMP signaling in flies: From molecules to biology. *Semin Cell Dev Biol* 32:128–136
249. **Bangi E** (2006) Dual function of the *Drosophila* Alk1/Alk2 ortholog Saxophone shapes the Bmp activity gradient in the wing imaginal disc. *Development* 133:3295–3303
250. **Raftery LA, Twombly V, Wharton K, Gelbart WM** (1995) Genetic screens to identify elements of the decapentaplegic signaling pathway in *Drosophila*. *Genetics* 139:241–254
251. **Wisotzkey RG, Mehra A, Sutherland DJ, Dobens LL, Liu X, Dohrmann C, Attisano L, Raftery LA** (1998) Medea is a *Drosophila* Smad4 homolog that is differentially required to potentiate DPP responses. *Dev Camb Engl* 125:1433–1445
252. **Tsuneizumi K, Nakayama T, Kamoshida Y, Kornberg TB, Christian JL, Tabata T** (1997) Daughters against dpp modulates dpp organizing activity in *Drosophila* wing development. *Nature* 389:627–631
253. **Arora K, Dai H, Kazuko SG, Jamal J, O'Connor MB, Letsou A, Warrior R** (1995) The *Drosophila* schnurri gene acts in the Dpp/TGF beta signaling pathway and encodes a transcription factor homologous to the human MBP family. *Cell* 81:781–790
254. **Winter SE, Campbell G** (2004) Repression of Dpp targets in the *Drosophila* wing by Brinker. *Dev Camb Engl* 131:6071–6081
255. **Takaesu NT, Johnson AN, Sultani OH, Newfeld SJ** (2002) Combinatorial signaling by an unconventional Wg pathway and the Dpp pathway requires Nejire (CBP/p300) to regulate dpp expression in posterior tracheal branches. *Dev Biol* 247:225–236
256. **de Celis JF, Barrio R** (2009) Regulation and function of Spalt proteins during animal development. *Int J Dev Biol* 53:1385–1398
257. **Grimm S, Pflugfelder GO** (1996) Control of the gene optomotor-blind in *Drosophila* wing development by decapentaplegic and wingless. *Science* 271:1601–1604
258. **Yu K, Srinivasan S, Shimmi O, Biehs B, Rashka KE, Kimelman D, O'Connor MB, Bier E** (2000) Processing of the *Drosophila* Sog protein creates a novel BMP inhibitory activity. *Dev Camb Engl* 127:2143–2154
259. **Ross JJ, Shimmi O, Vilmos P, Petryk A, Kim H, Gaudenz K, Hermanson S, Ekker SC, O'Connor MB, Marsh JL** (2001) Twisted gastrulation is a conserved extracellular BMP antagonist. *Nature* 410:479–483
260. **Hopkins DR, Keles S, Greenspan DS** (2007) The bone morphogenetic protein 1/Tolloid-like metalloproteinases. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol* 26:508–523
261. **Fan R** (2015) Genetics and its Associated Pathways of Pulmonary Arterial Hypertension. *Int J Respir Pulm Med*. doi: 10.23937/2378-3516/1410031
262. **Ashe HL** (2016) Modulation of BMP signalling by integrins. *Biochem Soc Trans* 44:1465–1473
263. **Jackson SM, Nakato H, Sugiura M, Jannuzi A, Oakes R, Kaluza V, Golden C, Selleck SB** (1997) dally, a *Drosophila* glypican, controls cellular responses to the TGF-beta-related morphogen, Dpp. *Dev Camb Engl* 124:4113–4120
264. **Norman M, Vuilleumier R, Springhorn A, Gawlik J, Pyrowolakis G** (2016) Pentagone internalises glypicans to fine-tune multiple signalling pathways. *eLife*. doi: 10.7554/eLife.13301
265. **Szuperak M, Salah S, Meyer EJ, Nagarajan U, Ikmi A, Gibson MC** (2011) Feedback regulation of *Drosophila* BMP signaling by the novel extracellular protein Larval Translucida. *Development* 138:715–724
266. **Li J, Li WX** (2006) A novel function of *Drosophila* eIF4A as a negative regulator of Dpp/BMP signalling that mediates SMAD degradation. *Nat Cell Biol* 8:1407–1414

267. **Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T, Miyazono K** (2002) Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells Devoted Mol Cell Mech* 7:1191–1204
268. **Miyazono K, Kusanagi K, Inoue H** (2001) Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol* 187:265–276
269. **Luo K** (2017) Signaling Cross Talk between TGF- β /Smad and Other Signaling Pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9:a022137
270. **Guo X, Wang X-F** (2009) Signaling cross-talk between TGF- β /BMP and other pathways. *Cell Res* 19:71–88
271. **Ehrlich M, Gutman O, Knaus P, Henis YI** (2012) Oligomeric interactions of TGF- β and BMP receptors. *FEBS Lett* 586:1885–1896
272. **Olsen OE, Wader KF, Hella H, Mylin AK, Turesson I, Nesthus I, Waage A, Sundan A, Holien T** (2015) Activin A inhibits BMP-signaling by binding ACVR2A and ACVR2B. *Cell Commun Signal CCS* 13:27
273. **Montero JA, Lorda-Diez CI, Gañan Y, Macias D, Hurle JM** (2008) Activin/TGF β and BMP crosstalk determines digit chondrogenesis. *Dev Biol* 321:343–356
274. **Grönroos E, Kingston IJ, Ramachandran A, Randall RA, Vizán P, Hill CS** (2012) Transforming growth factor β inhibits bone morphogenetic protein-induced transcription through novel phosphorylated Smad1/5-Smad3 complexes. *Mol Cell Biol* 32:2904–2916
275. **Zi Z, Chapnick DA, Liu X** (2012) Dynamics of TGF- β /Smad signaling. *FEBS Lett* 586:1921–1928
276. **Chen G, Deng C, Li Y-P** (2012) TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci* 8:272–288
277. **Upadhyay A, Moss-Taylor L, Kim M-J, Ghosh AC, O'Connor MB** (2017) TGF- β Family Signaling in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. doi: 10.1101/cshperspect.a022152
278. **Shimmi O, Ralston A, Blair SS, O'Connor MB** (2005) The crossveinless gene encodes a new member of the Twisted gastrulation family of BMP-binding proteins which, with Short gastrulation, promotes BMP signaling in the crossveins of the *Drosophila* wing. *Dev Biol* 282:70–83
279. **Hevia CF, de Celis JF** (2013) Activation and function of TGF β signalling during *Drosophila* wing development and its interactions with the BMP pathway. *Dev Biol* 377:138–153
280. **Raftery LA, Umulis DM** (2012) Regulation of BMP activity and range in *Drosophila* wing development. *Curr Opin Cell Biol* 24:158–165
281. **Blair SS** (2007) Wing Vein Patterning in *Drosophila* and the Analysis of Intercellular Signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23:293–319
282. **Crozatier M, Glise B, Vincent A** (2004) Patterns in evolution: veins of the *Drosophila* wing. *Trends Genet* 20:498–505
283. **Klein T** (2001) Wing disc development in the fly: the early stages. *Curr Opin Genet Dev* 11:470–475
284. **Bangi E, Wharton K** (2006) Dpp and Gbb exhibit different effective ranges in the establishment of the BMP activity gradient critical for *Drosophila* wing patterning. *Dev Biol* 295:178–193
285. **O'Connor MB** (2005) Shaping BMP morphogen gradients in the *Drosophila* embryo and pupal wing. *Development* 133:183–193
286. **Marcus JM** (2001) The development and evolution of crossveins in insect wings. *J Anat* 199:211–216
287. **Brooks A, Dou W, Yang X, Brosnan T, Pargett M, Raftery LA, Umulis DM** (2012) BMP signaling in wing development: A critical perspective on quantitative image analysis. *FEBS Lett* 586:1942–1952
288. **Coles E, Christiansen J, Economou A, Bronner-Fraser M, Wilkinson DG** (2004) A vertebrate crossveinless 2 homologue modulates BMP activity and neural crest cell migration. *Dev Camb Engl* 131:5309–5317

289. **Chen J, Honeyager SM, Schleede J, Avanesov A, Laughon A, Blair SS** (2012) Crossveinless d is a vitellogenin-like lipoprotein that binds BMPs and HSPGs, and is required for normal BMP signaling in the *Drosophila* wing. *Dev Camb Engl* 139:2170–2176
290. **Sato D, Sugimura K, Satoh D, Uemura T** (2010) Crossveinless-c, the *Drosophila* homolog of tumor suppressor DLC1, regulates directional elongation of dendritic branches via down-regulating Rho1 activity. *Genes Cells*. doi: 10.1111/j.1365-2443.2010.01399.x
291. **Haerry TE, Khalsa O, O'Connor MB, Wharton KA** (1998) Synergistic signaling by two BMP ligands through the SAX and TKV receptors controls wing growth and patterning in *Drosophila*. *Dev Camb Engl* 125:3977–3987
292. **Worthington JJ, Fenton TM, Czajkowska BI, Klementowicz JE, Travis MA** (2012) Regulation of TGF β in the immune system: An emerging role for integrins and dendritic cells. *Immunobiology* 217:1259–1265
293. **Bollum LK, Huse K, Oksvold MP, Bai B, Hilden VI, Forfang L, Yoon SO, Wälchli S, Smeland EB, Myklebust JH** (2017) BMP-7 induces apoptosis in human germinal center B cells and is influenced by TGF- β receptor type I ALK5. *PLOS ONE* 12:e0177188
294. **Kuczma M, Kurczewska A, Kraj P** (2014) Modulation of bone morphogenetic protein signaling in T-cells for cancer immunotherapy. *J Immunotoxicol* 11:319–327
295. **Pirracò RP, Reis RL, Marques AP** (2013) Effect of monocytes/macrophages on the early osteogenic differentiation of hBMSCs. *J Tissue Eng Regen Med* 7:392–400
296. **Hong JH, Lee GT, Lee JH, Kwon SJ, Park SH, Kim SJ, Kim IY** (2009) Effect of bone morphogenetic protein-6 on macrophages. *Immunology* 128:e442–e450
297. **Martínez VG, Hernández-López C, Valencia J, Hidalgo L, Entrena A, Zapata AG, Vicente A, Sacedón R, Varas A** (2011) The canonical BMP signaling pathway is involved in human monocyte-derived dendritic cell maturation. *Immunol Cell Biol* 89:610–618
298. **Wu M, Chen G, Li Y-P** (2016) TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res* 4:16009
299. **Zuo C, Huang Y, Bajis R, Sahih M, Li Y-P, Dai K, Zhang X** (2012) Osteoblastogenesis regulation signals in bone remodeling. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA* 23:1653–1663
300. **Bandyopadhyay A, Yadav PS, Prashar P** (2013) BMP signaling in development and diseases: A pharmacological perspective. *Biochem Pharmacol* 85:857–864
301. **Mishina Y, Hanks MC, Miura S, Tallquist MD, Behringer RR** (2002) Generation of *Bmpr/Alk3* conditional knockout mice. *Genes N Y N* 2000 32:69–72
302. **Sánchez-Duffhues G, Hiepen C, Knaus P, ten Dijke P** (2015) Bone morphogenetic protein signaling in bone homeostasis. *Bone* 80:43–59
303. **Seeherman HJ, Li XJ, Bouxsein ML, Wozney JM** (2010) rhBMP-2 induces transient bone resorption followed by bone formation in a nonhuman primate core-defect model. *J Bone Joint Surg Am* 92:411–426
304. **Daluiski A, Engstrand T, Bahamonde ME, Gamer LW, Agius E, Stevenson SL, Cox K, Rosen V, Lyons KM** (2001) Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. *Nat Genet* 27:84–88
305. **Fong D, Bisson M, Laberge G, McManus S, Grenier G, Faucheux N, Roux S** (2013) Bone morphogenetic protein-9 activates Smad and ERK pathways and supports human osteoclast function and survival in vitro. *Cell Signal* 25:717–728

306. **Okamoto M, Murai J, Imai Y, Ikegami D, Kamiya N, Kato S, Mishina Y, Yoshikawa H, Tsumaki N** (2011) Conditional deletion of *Bmpr1a* in differentiated osteoclasts increases osteoblastic bone formation, increasing volume of remodeling bone in mice. *J Bone Miner Res* 26:2511–2522
307. **Kaneko H, Arakawa T, Mano H, Kaneda T, Ogasawara A, Nakagawa M, Toyama Y, Yabe Y, Kumegawa M, Hakeda Y** (2000) Direct stimulation of osteoclastic bone resorption by bone morphogenetic protein (BMP)-2 and expression of BMP receptors in mature osteoclasts. *Bone* 27:479–486
308. **Nerurkar NL, Mahadevan L, Tabin CJ** (2017) BMP signaling controls buckling forces to modulate looping morphogenesis of the gut. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:2277–2282
309. **Batts LE, Polk DB, Dubois RN, Kulesa H** (2006) Bmp signaling is required for intestinal growth and morphogenesis. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat* 235:1563–1570
310. **Peterson LW, Artis D** (2014) Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 14:141–153
311. **Auclair BA, Benoit YD, Rivard N, Mishina Y, Perreault N** (2007) Bone morphogenetic protein signaling is essential for terminal differentiation of the intestinal secretory cell lineage. *Gastroenterology* 133:887–896
312. **Taylor KR, Vinci M, Bullock AN, Jones C** (2014) *ACVR1* Mutations in DIPG: Lessons Learned from FOP. *Cancer Res* 74:4565–4570
313. **Tian A, Jiang J** (2014) Intestinal epithelium-derived BMP controls stem cell self-renewal in *Drosophila* adult midgut. *eLife* 3:e01857
314. **Kim B-G, Li C, Qiao W, et al** (2006) Smad4 signalling in T cells is required for suppression of gastrointestinal cancer. *Nature* 441:1015–1019
315. **Ayyaz A, Li H, Jasper H** (2015) Haemocytes control stem cell activity in the *Drosophila* intestine. *Nat Cell Biol* 17:736–748
316. **Zhou J, Florescu S, Boettcher A-L, Luo L, Dutta D, Kerr G, Cai Y, Edgar BA, Boutros M** (2015) Dpp/Gbb signaling is required for normal intestinal regeneration during infection. *Dev Biol* 399:189–203
317. **Kaplan FS, Chakkalakal SA, Shore EM** (2012) Fibrodysplasia ossificans progressiva: mechanisms and models of skeletal metamorphosis. *Dis Model Mech* 5:756–762
318. **Pignolo RJ, Shore EM, Kaplan FS** (2011) Fibrodysplasia ossificans progressiva: clinical and genetic aspects. *Orphanet J Rare Dis* 6:80
319. **Bauer AH, Bonham J, Gutierrez L, Hsiao EC, Motamedi D** (2018) Fibrodysplasia ossificans progressiva: a current review of imaging findings. *Skeletal Radiol*. doi: 10.1007/s00256-018-2889-5
320. **Nakahara Y, Suzuki R, Katagiri T, Toguchida J, Haga N** (2015) Phenotypic differences of patients with fibrodysplasia ossificans progressive due to p.Arg258Ser variants of *ACVR1*. *Hum Genome Var*. doi: 10.1038/hgv.2015.55
321. **Le V, Anderson E, Akiyama T, Wharton KA** (2017) *Drosophila* models of FOP provide mechanistic insight. *Bone*. doi: 10.1016/j.bone.2017.11.001
322. **Hashemi J, Shahfarhat A, Beheshtian A** (2011) Fibrodysplasia ossificans progressiva: report of a case and review of articles. *Iran J Radiol Q J Publ Iran Radiol Soc* 8:113–117
323. **Taslimi R, Jafarpour S, Hassanpour N** (2015) FOP: still turning into stone. *Clin Rheumatol* 34:379–384
324. **Bridges AJ, Hsu KC, Singh A, Churchill R, Miles J** (1994) Fibrodysplasia (myositis) ossificans progressiva. *Semin Arthritis Rheum* 24:155–164

325. **Dugar M, Limaye V, Cleland LG, Ahern MJ** (2010) Fibrodysplasia ossificans progressiva presenting as ankylosing spondylitis: Letters to the Editor. *Intern Med J* 40:862–864
326. **Grandon B, Jah N, Rincheval-Arnold A, Guenal I, Gaumer S, Breban M, Chiocchia G** (2016) La drosophile comme outil de compréhension moléculaire du rôle de HLA-B27 dans la spondylarthrite. *Rev Rhum* 83:A54
327. **Milia AF, Ibba-Manneschi L, Manetti M, Benelli G, Generini S, Messerini L, Matucci-Cerinic M** (2011) Evidence for the prevention of enthesitis in HLA-B27/hβ2m transgenic rats treated with a monoclonal antibody against TNF-α. *J Cell Mol Med* 15:270–279
328. **Milia AF, Manetti M, Generini S, Polidori L, Benelli G, Cinelli M, Messerini L, Ibba-Manneschi L, Matucci-Cerinic M** (2008) TNFα blockade prevents the development of inflammatory bowel disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Cell Mol Med* 13:164–176
329. **Wendling D, Cedoz J-P, Racadot E, Dumoulin G** (2007) Serum IL-17, BMP-7, and bone turnover markers in patients with ankylosing spondylitis. *Joint Bone Spine* 74:304–305
330. **Park M, Park Y, Lee S** (2008) Relationship of bone morphogenetic proteins to disease activity and radiographic damage in patients with ankylosing spondylitis. *Scand J Rheumatol* 37:200–204
331. **Chen H-A, Chen C-H, Lin Y-J, Chen P-C, Chen W-S, Lu C-L, Chou C-T** (2010) Association of Bone Morphogenetic Proteins with Spinal Fusion in Ankylosing Spondylitis. *J Rheumatol* 37:2126–2132
332. **Lories RJU, Derese I, Ceuppens JL, Luyten FP** (2003) Bone morphogenetic proteins 2 and 6, expressed in arthritic synovium, are regulated by proinflammatory cytokines and differentially modulate fibroblast-like synoviocyte apoptosis: BMPs in Chronic Arthritis. *Arthritis Rheum* 48:2807–2818
333. **Joo YB, Bang S-Y, Kim T-H, Shim S-C, Lee S, Joo KB, Kim JH, Min HJ, Rahman P, Inman RD** (2014) Bone Morphogenetic Protein 6 Polymorphisms Are Associated with Radiographic Progression in Ankylosing Spondylitis. *PLoS ONE* 9:e104966
334. **Wendling D, Cedoz J-P, Racadot E** (2008) Serum levels of MMP-3 and cathepsin K in patients with ankylosing spondylitis: Effect of TNFα antagonist therapy. *Joint Bone Spine* 75:559–562
335. **Cortes A, Maksymowych WP, Wordsworth BP, et al** (2015) Association study of genes related to bone formation and resorption and the extent of radiographic change in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 74:1387–1393
336. **Halevi L, Barnea E, Beer I, Mann M, Admon A** (2010) The HLA-B2705 peptidome. *Arthritis Rheum* NA–NA
337. **Lee YH, Song GG** (2015) Meta-analysis of differentially expressed genes in ankylosing spondylitis. *Genet Mol Res* 14:5161–5170
338. **Alessi Wolken DM, Idone V, Hatsell SJ, Yu PB, Economides AN** (2018) The obligatory role of Activin A in the formation of heterotopic bone in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. *Bone* 109:210–217
339. **Jones KL, Mansell A, Patella S, Scott BJ, Hedger MP, de Kretser DM, Phillips DJ** (2007) Activin A is a critical component of the inflammatory response, and its binding protein, follistatin, reduces mortality in endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:16239–16244
340. **Jackson MR, Song ES, Yang Y, Peterson PA** (1992) Empty and peptide-containing conformers of class I major histocompatibility complex molecules expressed in *Drosophila melanogaster* cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:12117–12121
341. **Tan FK, Farheen K** (2011) The potential importance of Toll-like receptors in ankylosing spondylitis. *Int J Clin Rheumatol* 6:649–654
342. **Snelgrove T, Lim S, Greenwood C, Peddle L, Hamilton S, Inman R, Rahman P** (2007) Association of toll-like receptor 4 variants and ankylosing spondylitis: a case-control study. *J Rheumatol* 34:368–370

343. **Yang Z-X, Liang Y, Zhu Y, Li C, Zhang L-Z, Zeng X-M, Zhong R-Q** (2007) Increased expression of Toll-like receptor 4 in peripheral blood leucocytes and serum levels of some cytokines in patients with ankylosing spondylitis: TLR4 in PBL and TNF- α , IL-2 and soluble TRAIL. *Clin Exp Immunol* 149:48–55
344. **Myles A, Aggarwal A** (2011) Expression of Toll-like receptors 2 and 4 is increased in peripheral blood and synovial fluid monocytes of patients with enthesitis-related arthritis subtype of juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology* 50:481–488
345. **Wright C, Edelmann M, diGleria K, Kollnberger S, Kramer H, McGowan S, McHugh K, Taylor S, Kessler B, Bowness P** (2009) Ankylosing spondylitis monocytes show upregulation of proteins involved in inflammation and the ubiquitin proteasome pathway. *Ann Rheum Dis* 68:1626–1632
346. **Rudwaleit M, Baeten D** (2006) Ankylosing spondylitis and bowel disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 20:451–471
347. **Colmegna I, Cuchacovich R, Espinoza LR** (2004) HLA-B27-Associated Reactive Arthritis: Pathogenetic and Clinical Considerations. *Clin Microbiol Rev* 17:348–369
348. **Gill T, Asquith M, Brooks SR, Rosenbaum JT, Colbert RA** (2018) Effects of HLA-B27 on Gut Microbiota in Experimental Spondyloarthritis Implicate an Ecological Model of Dysbiosis. *Arthritis Rheumatol* 70:555–565
349. **Onal S, Kazokoglu H, Incili B, Demiralp EE, Yavuz S** (2006) Prevalence and Levels of Serum Antibodies to Gram Negative Microorganisms in Turkish Patients with HLA-B27 Positive Acute Anterior Uveitis and Controls. *Ocul Immunol Inflamm* 14:293–299
350. **Laitio Päi, Virtala M, Salmi M, Pelliniemi LJ, Yu DTY, Granfors K** (1997) HLA-B27 modulates intracellular survival of *Salmonella enteritidis* in human monocytic cells. *Eur J Immunol* 27:1331–1338
351. **David T, Ling SF, Barton A** (2018) Genetics of immune-mediated inflammatory diseases. *Clin Exp Immunol*. doi: 10.1111/cei.13101

Titre : La drosophile transgénique HLA-B27 : un nouveau modèle pour l'étude des spondyloarthrites

Mots clés : Spondylarthrite ankylosante, *Drosophila melanogaster*, HLA-B27, Protéines morphogénétiques osseuses

Résumé : Les spondyloarthrites (SpA) sont des maladies inflammatoires chroniques articulaires qui se caractérisent par des atteintes de la colonne vertébrale et des articulations périphériques, en particulier des enthèses, souvent associées à des manifestations extra-articulaires telles que le psoriasis, l'uvéite, ou l'inflammation intestinale. Ces maladies complexes possèdent une forte composante génétique dominée par l'antigène HLA-B27 du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I), présent chez plus de 80% des patients atteints de SpA. Découverte il y a 45 ans, l'association entre HLA-B27 et le développement des SpA reste inexplicée. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer cette association au niveau moléculaire. Cependant, la plupart se heurtent à des incohérences expérimentales qui semblent les invalider. Pour élucider les mécanismes moléculaires pathogènes liés au HLA-B27, nous avons utilisé une nouvelle approche. *Drosophila melanogaster* est un puissant modèle génétique qui a permis des avancées considérables dans la compréhension de nombreuses fonctions des cellules de métazoaires, ainsi que dans la description des processus cellulaires et moléculaires de nombreuses pathologies humaines. Nous avons établi plusieurs lignées de drosophiles transgéniques pour des formes d'HLA-B associées aux SpA ou pour une forme non associée à la maladie, ainsi que pour la chaîne invariante du CMH-I, la $\beta 2m$ humaine ($h\beta 2m$). L'expression des formes associées à la maladie, exclusivement en présence de la $h\beta 2m$, dans l'aile et dans l'œil de la drosophile conduit à l'apparition de deux phénotypes spécifiques. Mes résultats ont permis de mettre en évidence que le phénotype de perte des veines transversales de l'aile était associé à une perturbation de la signalisation par la voie des Bone Morphogenetic Protein (BMP). Cette perturbation est associée à une co-localisation de HLA-B27 avec le récepteur BMP de type I, Sax. Nos résultats préliminaires obtenus dans les cellules de patients atteints de SpA suggèrent l'existence d'une co-localisation analogue d'HLA-B27 avec le récepteur ALK2, orthologue de Sax. L'ensemble de nos résultats plaide en faveur d'un rôle pathogène de HLA-B27 passant par une dérégulation de la voie BMP à l'intersection des voies de l'ossification et de l'inflammation et pourrait donc s'appliquer à la physiopathologie des SpA.

Title : The transgenic *Drosophila* HLA-B27 : a new model for the study of spondyloarthritis

Keywords : Ankylosing spondylitis, *Drosophila melanogaster*, HLA-B27, Bone morphogenetic Protein

Abstract : Spondyloarthritis (SpA) is a chronic inflammatory rheumatic disorder characterized by joint manifestations affecting the spine, peripheral joints and entheses, as well as extra-articular manifestations such as psoriasis, uveitis, or intestinal inflammation. This complex disorder has a strong genetic component dominated by the HLA-B27 antigen of the major histocompatibility complex class I (MHC-I), which is present in more than 80% of SpA patients. Discovered 45 years ago, the association between HLA-B27 and SpA development remains unexplained. Several hypotheses have been proposed to explain this association at the molecular level, but all face experimental inconsistencies that seem to invalidate them. Therefore, it appeared to us essential to elaborate new and yet unexplored approaches in order to better understand the molecular role of HLA-B27 in SpA development. *Drosophila melanogaster* is a powerful genetic model that has led to considerable advances in understanding numerous functions of metazoan cells, as well as in describing the cellular and molecular processes of many human pathologies. To elucidate the molecular pathogenic mechanisms associated with HLA-B27, we have established several transgenic *Drosophila* lines for SpA-associated and non-associated of HLA-B alleles, as well as for the MHC-I invariant chain, the human $\beta 2$ -microglobulin ($h\beta 2m$). Expression of the HLA-B27 alleles, in the presence of $h\beta 2m$, in the *Drosophila* wing and eye led to two specific phenotypes. The crossveinless wing phenotype is due to a disturbance in the Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling pathway. Interestingly, this misregulation is associated with a co-localization of HLA-B27 and the BMP type I receptor named Sax. Our preliminary results obtained in SpA patient cells suggest that HLA-B27 also colocalizes with ALK2 receptor, which is ortholog to Sax. Altogether, our results suggest that the pathogenic role of HLA-B27 in SpA may depend on a BMP signaling misregulation at the crosstalk between ossification and inflammation.

