



**HAL**  
open science

# Contribution à l'étude de la pathogénèse de la polyarthrite rhumatoïde : analyse des mécanismes régulateurs de la réponse inflammatoire

Ramzi Nehmar

## ► To cite this version:

Ramzi Nehmar. Contribution à l'étude de la pathogénèse de la polyarthrite rhumatoïde : analyse des mécanismes régulateurs de la réponse inflammatoire. Rhumatologie et système ostéo-articulaire. Université de Strasbourg, 2016. Français. NNT : 2016STRAJ122 . tel-02918061

**HAL Id: tel-02918061**

**<https://theses.hal.science/tel-02918061>**

Submitted on 20 Aug 2020

**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.

**ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé ED\_414**

**UMR\_S 1109 ImmunoRhumatologie Moléculaire**

**THÈSE** présentée par :

**Ramzi NEHMAR**

Soutenue le : **16 Décembre 2016**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Immunologie

**Contribution à l'étude de la  
pathogénèse de la Polyarthrite  
Rhumatoïde**

**Analyse des mécanismes régulateurs de la  
réponse inflammatoire**

**THÈSE dirigée par :**

**Monsieur Philippe GEORGEL** Professeur, Université de Strasbourg, INSERM UMR\_S 1109

**RAPPORTEURS :**

**Monsieur Bernhard RYFFEL** Directeur de recherche, CNRS UMR 7355, Orléans

**Monsieur Jacques MOREL** Professeur, Praticien Hospitalier, Université de Montpellier, CHU de Montpellier. CNRS UMR 5535.

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Madame Sylviane MULLER** Directeur de recherche, CNRS UPR 3572, Strasbourg



Tout est possible à qui rêve, ose,  
travaille et n'abandonne jamais.

Xavier Dolan, prix du jury du Festival de Cannes, 2014

---





## Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier les membres du jury de cette thèse, Madame Sylviane Muller, Directeur de recherche, Monsieur le Professeur Jacques Morel et Monsieur Bernhard Ryffel, Directeur de recherche pour l'honneur qu'ils me font en acceptant d'évaluer mon travail.

Me voilà maintenant arrivé au moment où je regarde derrière moi avec un peu de mélancolie et beaucoup de nostalgie. C'est là que je réalise que le travail que j'ai accompli n'aurait pas été possible sans les personnes qui ont été à mes côtés toute au long de cette période.

Je remercie le directeur du laboratoire qui m'a accueilli pour que je puisse réaliser ma thèse, le Professeur Siamak Bahram. Il a su entretenir ma détermination avec ses remises en question et la pertinence de ses remarques. C'est aussi grâce à lui que j'ai eu accès au matériel et à l'infrastructure qui m'ont permis d'arriver à cet aboutissement.

J'adresse mes remerciements les plus chaleureux à mon directeur de thèse, le Professeur Philippe Georgel, sans qui rien n'aurait été possible. Il m'a fait confiance en me recrutant et a maintenu sa confiance pendant toute la période de ma thèse. Il a su me guider, me diriger, me motiver, et optimiser mes compétences et performances. Il a toujours gardé sa porte ouverte pour moi, répondu à mes mails très tard le soir ou tôt le matin, et grâce à cela je ne me suis jamais senti seul ou abandonné. Avec toi, je me suis senti libre et autonome dans la gestion des projets et rien que pour cela je trouve que ma thèse a été une expérience formidable. Saches aussi que tu es une source d'inspiration pour moi, et un modèle à suivre. (Attention la phrase qui suit contient des références à Star Wars) Au début de ma thèse je me sentais comme un petit Padawan et maintenant je me sens capable de maîtriser la Force, et cela grâce à toi. Donc pour tout ce que tu m'as appris, UN GIGANTESQUE MERCI.

**Padawan** : Apprenti Jedi, sous l'enseignement d'un professeur qui a le rang de Chevalier ou Maître

**Jedi** : Gardien de la paix et de la justice dans la galaxie, maîtrisant la Force

**La Force** : une sorte d'énergie omniprésente et mystérieuse, tout individu capable de la contrôler obtient d'intéressantes facultés

Je remercie aussi les membres du laboratoire d'ImmunoRhumatologie Moléculaire, pour tout ce que j'ai appris à leur contact et leur sympathie quotidienne. Car débiter une thèse, dans une ville que je ne connaissais pas et de plus à l'étranger était pour moi une véritable

aventure. Par chance, j'ai trouvé des gens formidables qui m'ont immédiatement mis à l'aise. Ils ont répondu à mes questions (qui étaient nombreuses), m'ont orienté et j'ai pu compter sur eux chaque fois que j'en ai eu besoin. Ils m'ont accompagné dans les différents stades par lesquels je suis passé, au cours de ces années de doctorat. En bref, ils m'ont tout simplement montré comment fonctionne un laboratoire de recherche.

Dès mes premiers jours, j'ai eu l'occasion de suivre des « manips » avec quasiment tout le monde. Tout particulièrement, avec le Docteur Ghada Alsaleh, qui est une véritable boule d'énergie (on a intérêt à s'accrocher pour la suivre). Elle m'a initié aux techniques maîtrisées dans le laboratoire et m'a permis de m'intégrer aux différents sujets sur lesquelles elle travaillait. Je te remercie infiniment pour toutes nos discussions (scientifiques ou pas), tes conseils, tes astuces, les weekends où tu m'as accompagné au laboratoire, pour tout cela et bien plus, MERCI.

Je remercie aussi les bio-informaticiens du laboratoire, avec lesquels j'ai eu des échanges qui m'ont appris à prendre du recul, au vu de nos visions fondamentalement différentes. Bien sûr, quand on parle de statistique ou de bioinformatique on pense tout de suite à l'incontournable Nicodème, qui m'a beaucoup enseigné. Bizarrement, je pense que la grande partie de nos discussions ont eu lieu à la cafétéria, lors de la pause déjeuner. Ces discussions m'ont permis, certes, de m'améliorer en statistique, mais nos sujets de discussion étaient divers et variés et parfois même philosophiques, sans aucune limite ! Je remercie aussi Laure, la personne que j'appelais au secours à chaque fois que j'avais des questions administratives et (comme par magie) elle gérait les choses qui me paraissaient bien compliquées avec une totale sérénité. Je remercie aussi tous les « stagiaires, doctorants, ingénieurs, techniciens et post doctorants » que j'ai pu croiser durant cette période, et qui ont mis une bonne ambiance dans mes journées au laboratoire. Je pense que je pourrais écrire plusieurs pages sur chaque membre de l'unité Inserm 1109, car chacun à sa façon, a participé à mon parcours. J'ai partagé avec vous une période importante de ma vie et cela m'a permis de grandir. A vous tous merci.

Je remercie aussi toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer, en particulier, Vincent Flacher, Benjamin Voisin et Christopher Mueller à IBMC, Stephan Blum de l'université de Vienne ou encore Philippe Kastner et Susan Chan de IGBMC, car elles m'ont permises d'avoir un travail abouti.

Et je remercie tout particulièrement le Docteur Véronique Rolli et le Docteur Mirjana Radosavljevic pour les corrections apportées à ma thèse.

Il faut aussi que je remercie la personne qui m'a été de la plus grande aide durant cette période, bien sûr mon épouse Radhia. Elle m'a soutenu sans relâche, elle m'a supporté quand je n'étais pas bien, elle m'a remonté le moral quand je ne croyais plus en moi, elle m'a encouragé quand j'en ai eu besoin. Elle m'a transmis sa force, qui est incommensurable (même si elle n'en a pas conscience), et grâce à elle j'ai surmonté les périodes les plus difficiles. Quand tu es à mes côtés le compliqué devient simple, le pénible devient léger, et l'impossible n'existe plus. Tu es la meilleur et Merci d'exister.

Je remercie bien sûr, ma famille, en commençant par mon père, qui a largement participé à mon parcours et qui m'a encouragé et aidé dans mes démarches. Même s'il est passé par des périodes très difficiles, il a toujours été là pour moi. Je sais que je ne pourrai jamais te rendre tout ce que tu as fait pour moi mais j'espère que je pourrai te rendre fier de ton fils. Sans oublier que tu m'as transmis tes cheveux gris qui me donnent un petit côté sérieux (atout ou inconvénient ?).

Chère sœur, sache que c'est grâce à tes encouragements et tes prières que j'avance serein chaque jour sans avoir peur de l'échec. Et bien sûr mon grand frère, et toute sa petite famille, à chaque fois que je le vois avec ses enfants et son épouse, ça me procure un sentiment de joie indéfinissable. Le fait de savoir que tu veilles sur la famille me permet de me concentrer pleinement sur mon travail, Merci.

Je termine en remerciant la personne qui a fait de moi ce que je suis actuellement (sauf pour les défauts que j'ai acquis par moi-même). C'est la personne qui a toujours cru en moi, elle m'a inspiré sa confiance en l'avenir, et grâce à elle j'ai commencé à croire que je pouvais réaliser des choses bien. C'est la personne qui a toujours trouvé les arguments pour m'intéresser aux études, alors que je rêvassais à autre chose. Je pense que c'est en voulant mériter toute la confiance qu'elle a mis en moi que j'ai décidé d'aller au bout du mon cursus universitaire. Je me souviens quand elle me disait « passes ton brevet des collèges, c'est important » et quelques années plus tard « passes ton bac, après tu feras ce que tu veux ». Elle n'a jamais baissé les bras. Une fois à l'université, elle me disait « décroche ta licence tant que t'y es ». Ton amour inconditionnel m'a porté, car quand j'y pense, j'étais un enfant plutôt turbulent, et un élève pour le moins dissipé, mais tu as réussi! Cette thèse c'est ta réussite. Tout ce que je fais c'est pour toi et j'espère un jour mériter tous les espoirs et les rêves que tu avais pour moi. Je t'aime Maman.



# Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Abréviations

Introduction :	3
Chapitre I : La polyarthrite rhumatoïde	9
1. Généralités	10
1.1. Traitement de la PR	10
1.2. Les traitements biologiques, une révolution	10
2. Physiopathologie de la PR	12
2.1. Facteur rhumatoïde	12
2.2. Infiltrat cellulaire	13
2.2.1. Rôle des lymphocytes T	15
2.2.1.1. Arguments fonctionnels	15
2.2.1.2. Arguments morphologiques	16
2.2.1.3. Rôle des différentes sous populations des LT	16
2.2.1.3.1. Rôle des LT CD4+ effecteurs	16
2.2.1.3.2. Rôle des LT CD4+ régulateurs	18
2.2.1.3.3. Rôle de LT CD8+	20
2.2.2. Rôle des lymphocytes B	20
2.2.3. Rôle des polynucléaires neutrophiles	22
2.2.4. Rôle des Macrophages	24
2.3. Cellules résidentes : Rôle des FLS	26
2.4. Rôle des microsARNs	27
2.5. Rôle des interférons	29
2.5.1. Rôle des IFN de type I	29
2.5.2. Rôle des IFNs de type II, IFN- $\gamma$	34
2.5.3. Rôle des IFNs de type III, IFN- $\lambda$	34
Chapitre II : Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs)	39
1. Les cellules dendritiques, généralités	39
2. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs), généralités	43

3. Les marqueurs de surfaces des pDCs .....	49
4. Développement des pDCs (ontogénie) .....	52
4.1. Rôle des cytokines et des facteurs de transcriptions impliqués dans l'ontogénèse des pDCs .....	54
5. Circulation et localisation des pDCs .....	62
6. Rôle dans les maladies inflammatoires et/ou auto-immunes .....	64
7. Rôle dans la polyarthrite rhumatoïde .....	72
8. Rôle des pDCs dans les maladies infectieuses et les cancers .....	74
Objectifs du travail .....	83
Résultats .....	89
1. Résultats du manuscrit 1 .....	89
1.1. Discussion Manuscrit 1 .....	121
2. Résultats publication 1 .....	124
2.1. Discussion publication 1 .....	134
Conclusions et perspectives: .....	189
Matériels et méthodes .....	195
Données supplémentaires .....	213
Annexes .....	221
Bibliographie .....	277

# Liste des illustrations

<b>Figure 1.</b> Evaluation de la santé des patients atteints de PR .....	9
<b>Figure 2.</b> Stratégie thérapeutique dans la phase initiale de la prise en charge d'une PR.....	10
<b>Figure 4.</b> Rôles des lymphocytes B au niveau périphérique et synovial chez les patients atteints de PR... ..	22
<b>Figure 5.</b> Rôles possibles des neutrophiles dans la modulation de l'immunité innée et adaptative au cours de la PR .....	24
<b>Figure 6.</b> Rôles et communication des macrophages avec les cellules immunitaires dans le contexte de la PR.....	26
<b>Figure 7.</b> Biogénèse et mécanisme d'action des microARNs.....	28
<b>Figure 8.</b> Nouvelle stratégie thérapeutique synergique avec l'utilisation de concentrations subthérapeutiques d'IFN- $\beta$ en association avec un inhibiteur spécifique de IKK $\epsilon$ .....	34
<b>Figure 9.</b> Classement des différentes populations de DCs par rapport à leurs fonctions, leur morphologie et les marqueurs de surface.....	41
<b>Figure 10.</b> Signalisation des récepteurs surexprimés dans les pDCs par rapport aux autres DCs.....	45
<b>Figure 11.</b> Différentes voies d'induction de la tolérance par les cellules dendritiques plasmacytoïdes.....	49
<b>Figure 12.</b> Schéma simplifié de l'expression des marqueurs exprimés à la surface des pDCs et caractéristiques de leur développement physiologique, de leur activation et de leur localisation tissulaire chez la souris. ....	51
<b>Figure 13.</b> Les voies possibles de différenciation hématopoïétiques aboutissant à la production de cellules dendritiques plasmacytoïdes.....	54
<b>Figure 14.</b> Schéma représentant la voie de signalisation FLT3/ STAT3/ PI3K/AKT/mTOR dans les pDCs.....	56



<b>Figure 15.</b> Ontogénèse et sous-types de cellules dendritiques plasmacytoïdes.....	58
<b>Figure 16.</b> Rôle central des pDCs et de l'IFN de type I dans la physiopathologie du LED .....	67
<b>Figure 17.</b> Modèle simplifié de l'effet délétère des pDCs et des IFNs-I dans plusieurs pathologies auto-immune et/ ou auto-inflammatoire.....	68
<b>Figure 18.</b> Homéostasie immunitaire intestinale, induite par l'interaction entre les pDCs et les virus entériques résidants, et la production d'IFN- $\beta$ .....	71
<b>Figure 19.</b> Diversité et spécificité des senseurs viraux selon leur localisation subcellulaire (membranaire, cytosolique et endosomale).....	75
<b>Figure 20.</b> Les sources cellulaires de l'IFN-I au cours de l'infection virale.....	76
<b>Figure 21.</b> Implication des pDCs dans le contrôle de l'infection virale par certaines cellules de l'immunité.....	77
<b>Figure 22.</b> Fonctions et rôles attribués aux pDCs .....	80
<b>Tableau I.</b> Agents thérapeutiques les plus utilisés en clinique avec leurs effets associés.....	4
<b>Tableau II.</b> Fréquence des sujets non répondeurs selon les critères de l'American College of Rheumatology (ACR20, ACR50) dans des essais clinique avec des anti-TNF et des anti-IL-1.....	12
<b>Tableau III.</b> Marqueurs de surface des différentes populations de DCs à l'état basal .....	42

## Abréviations

1-MT1 : Methyl-DL-tryptophan	CCR : C-C chemokine receptor
4E-BP1 : 4E-binding protein 1	CD : clusteur de différenciation
Ac : anticorps	cDC : cellules dendritiques conventionnelles
ACR : l'American College of Rheumatology	CDPs : common dendritic cells progenitor
ADN : acide désoxyribonucléique	CG : centre germinatif
AhR : Arylhydrocarbon Receptor	CIA : collagen induced arthritis, arthrite induite par l'injection de collagène
AIA : adjuvant-induced arthritis model	CIITA : classe II transactivator
AID : activation-induced cytidine deaminase	CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
Akt : ou PKB pour Protéine kinase B	CMKLR1 : chemerine recepteur
APRIL : A proliferation-inducing ligand	CMP : progéniteurs myéloïdes communs
ARN : acide ribonucléique	CPA : cellules présentatrices d'antigène
ARNdb : ARN double brin	CpG : Cytosine-phosphate-Guanosine
ARNm : ARN messenger	CTLA-4 : cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
BAFF : B-cell activating factor	CX <sub>3</sub> CR1 : CX3C chimiokine receptor 1
BCL-11A : B cell lymphoma 11A	CXCL : chemokine (C-X-C motif) ligand
BCR : B-cell receptor	CXCR : C-X-C chemokine receptor
BDCA : Blood dendritic cell antigen	DBA/1 : souche de souris (fond génétique)
bHLH : basic helix-loop-helix	DC : cellules dendritiques
BLyS : B Lymphocyte Stimulator	Dntt : nucleotidylexotransferase
BrdU : Bromodésoxyuridine	DT : toxine diphtérique
Btk : Bruton's tyrosine kinase	DT1 : diabète de type I
C57BL/6 : souche de souris (fond génétique)	DTR : récepteur à la toxine diphtérique
C5a : composant du complément 5a	
CCL : chemokine C-C motif ligand	
CCP : peptides cycliques citrullinés	

## Abréviations

E2-2 : basic helix-loop-helix transcription factor (E protein)

EBV : Virus d'Epstein-Barr

ELPs : Early Lymphoid Progenitors

Fc : fragment cristallisable des immunoglobulines

Fc $\gamma$ R ou FcR : récepteurs du fragment cristallisable des immunoglobuline

FDC : cellules dendritiques folliculaires

FLS : Fibroblast-like synoviocyte

FLT3 : Fms-like related Tyrosine Kinase 3

FLT3L : Fms-like related Tyrosine Kinase 3 Ligand

Foxp3 : forkhead box P3

FR : facteur rhumatoïde

FS : fluide synoviale

GATA-3 : Trans-acting T-cell-specific transcription factor GATA-3

GFP : Green Fluorescent Protein

GIF1 : growth factor independent 1

GLs : ganglions lymphatiques

GM-CSF : granulocyte-monocyte-colony-stimulating factor

HCV : virus de l'hépatite C

HIF1 $\alpha$  : hypoxia-inductible factor 1 $\alpha$

HMGB1 : high mobility group box 1

HSV : Herpès Simplex Virus

i.p : intra péritonéale

i.v : intra veineuse

ICOS-L : Inducible T-cell COStimulatorligand

Id : DNA-binding protein inhibitor ID-2

IDO : indolamine 2, 3-dioxygenase

IFIT : Interferon-Induced with Tetratricopeptide repeats

IFN : interféron

IFNAR1 : Interferon-alpha/beta receptor alpha chain

IFN- $\gamma$ R : récepteur de l'IFN $\gamma$

IFRG28 : 28 kDa interferon responsive protein

Ig : immunoglobulines

Ik : Ikaros

IKK $\epsilon$  : Inhibitor- $\kappa$ B kinase  $\epsilon$

IL : interleukine

IL1-Ra : interleukin-1 receptor antagonist

IL7R $\alpha$  : IL-7 receptor alpha chain

IMQ : Imiquimod

iNKT : inductible Natural Killer T cells

IRAK : interleukine receptor-associated kinase

IRF : interferon regulatory factor

ISGs : Interferon-Stimulated Genes

## Abréviations

LAMTOR2 : Late endosomal/lysosomal adaptor and MAPK and MTOR activator 2

LB : lymphocytes B

LC3 : Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain3

LCMV : Lymphocytic Choriomeningitis Virus

LCs : les cellules de Langerhans

LED : lupus érythémateux disséminé

LL37 ou CRAMP : Cathelicidin-related antimicrobial peptides are a family of polypeptides

LPS : lipopolysaccharide

LT : lymphocytes T

LT<sub>H</sub> : lymphocytes T helper

LTreg : lymphocytes T régulateurs

LT- $\alpha$ 1 $\beta$ 2 : lymphotoxine  $\alpha$ 1 $\beta$ 2

LT $\gamma$ / $\delta$  : lymphocytes T gamma delta ( $\gamma$  $\delta$ )

Ly49H : lymphocyte antigen 49 complex, locus H

Ly49Q : lymphocyte antigen 49 complex, locus Q

Ly6C : lymphocyte antigen 6 complex, locus C

Ly6G : lymphocyte antigen 6 complex, locus G

MADCAM1 : mucosal addressing cell adhesion molecule 1

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

MCMV : cytomégalo­virus murin

MCMV : Murine Cytomegalovirus

MCP-1 $\alpha$  : Monocyte chemoattractant protein-1  $\alpha$

M-CSF : macrophage colony-stimulating factor

M-CSFR : macrophage colony-stimulating factor receptor

MDA5 : Melanoma Differentiation-Associated protein 5

MICI : maladies inflammatoires chroniques intestinales

Micro-CT : Computed Tomography

miR ou miARN : microARNs

MMP : métallo-protéinases

MoDC : les cellules dendritiques dérivées de monocytes

MOG : Myelin oligodendrocyte glycoprotein

MTG16 : Myeloid translocation gene 16

mTORC1 : mammalian target of rapamycin complex 1

MTT : sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium)

MTX : methotrexate

MX1 : myxovirus resistance 1

MyD88 : myeloid differentiation primary response gene 88

## Abréviations

NAB2 : nuclear polyadenylated RNA-binding protein 2

NETose : libération des NETs par les neutrophiles actives

NETs : neutrophil extracellular traps

NF- $\kappa$ B : nuclear factor-kappa B

NK : Natural Killer

NO : oxyde d'azote

NOD : non-obese diabetic

Notch1 : Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)

NZB/W : New Zealand black mice

OCP : cellules myéloïdes progéniteurs d'ostéoclaste

ODN : oligodéoxynucléotides

OPG : ostéoprotégérine

OVA : ovalbumine

PACSIN1 : protein kinase substrate in neurons protein

PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Patterns

PAX5 : Paired box protein Pax-5

PDCA-1 : plasmacytoid dendritic cell antigen-1

pDCs : cellules dendritiques plasmacytoïdes

PD-L1 : programmed death-ligand 1

PG : protéoglycane

PI3-K : phosphoinositide 3-kinase

PKD1 : phosphatidylinositol 3-dependent kinase 1

PMNs : leucocytes polynucléaires

Poly I:C : Polyinosinic:polycytidylic acid

PR : polyarthrite rhumatoïde

pré-miARN : précurseur de microARN

pri-miARN : microARN primaire

PRR : Patterns Recognition Receptors

Pten : phosphatase and tensin homolog

PTPN22 : Protein Tyrosine Phosphatase Nonreceptor type 22

RAG : Recombination activating gene

RAGE : Receptor for Advanced Glycation End products

RANK : receptor activator of nuclear factor kappa-B

RANK-L : receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand

RIG-I : retinoic acid-inducible gene I

RISC : RNA-induced silencing complex

ROS : réactives dérivées d'oxygène

RUNX2 : runt-related transcription factor 2

s.c : sous-cutané

SCH : cellules souches hématopoïétiques

SCID : Severe Combined ImmunoDeficiency

## Abréviations

---

Segments V(D)J : variable (V), joining (J), and diversity (D) gene segments

SEP : sclérose en plaque

SLEDAI : Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index

SNC : système nerveux central

SpiB : Transcription factor Spi-B

SR1 : stemregenin 1

STA K/BxN : modèle d'arthrite induite par transfert de sérum arthritogène provenant de souris K/BxN (Serum-transfer arthritis)

STAT : Signal Transducer and Activators of Transcription

sTNFR : soluble tumor necrosis factor receptors

TAB2 : TGF $\beta$ -activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 2

TCR : T cell receptor

TdT : Terminal désoxynucléotidyl Transférase

TGF- $\beta$  : Transforming growth factor  $\beta$

TLR : toll like receptor

TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor  $\alpha$

tolDCs : DCs tolérogènes

Tr1 : Type 1 regulatory T cells

TRAF : TNF receptor-associated factor

TRAIL: tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand

TS : tissu synoviale

TSLP : Thymique Stromal Lymphopoietin

UTR : Untranslated Transcribed Region, La région 3' ou 5' non traduite de l'ADN

VSV : Virus de la Stomatite Vésiculaire

Wnt : Wingless



# Introduction





## Introduction :

De nombreux progrès ont été réalisés ces dernières décennies en matière de compréhension et de traitement des pathologies auto-immunes et/ou auto-inflammatoires. Ce sont des maladies qui touchent 3 à 5 % de la population, parmi lesquelles la thyroïdite auto-immune et le diabète de type I (DT1) sont les maladies les plus fréquemment retrouvées. Il existe une centaine de pathologies auto-immunes différentes ; certaines d'entre elles sont spécifiques d'un seul organe ou système comme la cirrhose biliaire primitive, d'autres reflètent un désordre immunologique systémique impliquant de multiples organes comme dans le cas du lupus érythémateux disséminé (LED) (Wang et al., 2015).

Certains mécanismes à l'origine des signes cliniques ont été décrits dans des études pionnières réalisées il y a environ 60 ans par Macfarlane Burnet (lauréat du prix Nobel de physiologie et de Médecine en 1960) et ses collaborateurs. Ces travaux ont conduit aux premières descriptions des mécanismes d'auto-immunité et des processus responsables du développement des cellules lymphoïdes, de l'éducation thymique, de l'apoptose et de la délétion des cellules auto-réactives. Ils ont également permis un meilleur diagnostic et une classification de ces maladies (Wang et al., 2015).

Actuellement, les traitements conventionnels des pathologies auto-immunes utilisent essentiellement des anti-inflammatoires de type corticoïdes ou non corticoïdes, ainsi que d'autres molécules visant à réduire la prolifération des cellules immunitaires (comme le méthotrexate, MTX). Plus récemment, l'avènement des biothérapies a nettement enrichi l'arsenal thérapeutique destiné aux patients atteints de pathologies auto-immunes/ auto-inflammatoires. Cette dernière approche consiste en l'utilisation d'un agent biologique qui bloque ou qui module spécifiquement une voie de l'inflammation (La liste des agents thérapeutiques les plus utilisés dans les maladies auto-immunes est donnée dans le Tableau I).

**Tableau I: Agents thérapeutiques les plus utilisés en clinique avec leurs effets associés (Wang et al., 2015).**

Agents	Treatment effect	Side effects
Glucocorticoid (cortisone, prednisone, budesonide)	Suppress the whole activated immune system (most ADs)	1) Increase the rates of infections 2) Osteoporosis 3) General toxicity 4) Hormone-induced drug addiction
Mycophenolate mofetil	Immunosuppressive agent; inosine monophosphate dehydrogenase inhibitor, which exerts antiproliferative and pro-apoptotic effects, particularly on activated T cells, and suppresses antibody formation by B cells (SLE, MS, AIH, etc.).	1) Adverse effects (gastrointestinal or hematopoietic system, such as diarrhoea, nausea, vomiting, leukopenia, anaemia) 2) Increased risk of developing lymphoma and other malignancies (particularly skin) 3) Increased risk of serious infections 4) Foetal harm
Methotrexate	Directly inhibits the metabolism of folic acid, which will inhibit T-cell activation, selectively downregulate B-cell function (RA, SLE, psoriasis, IBD, PBC, etc.)	1) Predisposition to infection 2) Pulmonary fibrosis 3) Hair loss 4) Nausea 5) Headache 6) Skin pigmentation
Belimumab	Binds to soluble B cell activation factor from the TNF family (BAFF) and inhibits its binding to receptors, which will deplete activated and naive B cells and plasma cells but not memory B cells (only approved for SLE, still in clinical trials for other ADs)	1) Adverse events (infection, neoplasm) 2) Infusion reactions 3) Hypersensitivity reactions
CTLA4-immunoglobulin (abatacept, RG2077)	Inhibits T-cell activation (only approved for RA, still in clinical trials for other ADs)	1) Adverse events (infection, malignancies) 2) Acute infusion events 3) Autoimmunity (psoriasis, vasculitis)
Azathioprine (purine analogues)	Inhibits synthesis of DNA (SLE, CD, MS, PBC, myasthenia gravis, AIH, etc.)	1) Increase risk of malignancy 2) Bone marrow suppression 3) Nausea and vomiting
TNF inhibitors (infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab, golimumab)	Treat various inflammatory conditions within the main categories of systemic rheumatic disease and IBD	1) Infusion reactions (acute and delayed) 2) Infections 3) Malignancies 4) Neurological disorders
IL-6 inhibitor (tocilizumab)	Blocks the signal pathway of IL-6 (only approved for RA, still in clinical trials for other ADs)	1) Infection 2) Gastrointestinal complaints 3) Rash 4) Headache 5) Biochemical abnormalities
Ustekinumab	Blocks the signal pathway of IL-12	1) Increased incidence of nonmelanoma skin cancer 2) Headache 3) Back pain
Anti-CD20 antibody (rituximab)	Selective B-cell depletion	1) Infusion reaction 2) Infections (progressive multifocal leukoencephalopathy, Hepatitis B virus (HBV), tuberculosis) 3) Hypogammaglobulinemia 4) Herpes zoster reactivation

Cependant, il est à signaler que les traitements actuels sont lourds, contraignants et engendrent divers effets secondaires (voir tableau I). Enfin, si les traitements actuels corrigent certains symptômes, ils ne traitent en aucun cas la cause sous-jacente et ne rétablissent donc pas une homéostasie du système immunitaire à long terme.

Dans la plupart de ces maladies, il est établi qu'il existe un emballement anormal du système immunitaire. Ce dernier assimile certains composants du soi à des éléments étrangers et induit, de ce fait, des réponses délétères. Des facteurs génétiques et environnementaux sont associés au développement de ces pathologies. C'est la raison pour laquelle une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'initiation et le maintien de cet emballement reste un objectif à atteindre. L'objectif des recherches actuelles vise à mieux connaître ces maladies, à améliorer l'efficacité des traitements et à fournir des cibles thérapeutiques innovantes. Même si la plupart des acteurs majeurs, qu'ils soient cellulaires (lymphocytes B et T, macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques ou synoviocytes) ou moléculaires (anticorps, produits du complément et cytokines) ont déjà été identifiés, il est nécessaire de mieux comprendre les interactions complexes au site de l'inflammation qui mêlent antagonisme, synergie et régulation inflammatoire. Il reste aussi à découvrir de nouveaux acteurs peut-être moins importants par leur nombre, ou par les effets qu'ils engendrent, mais qui ne sont, néanmoins, pas négligeables pour autant.



Introduction

Chapitre I :

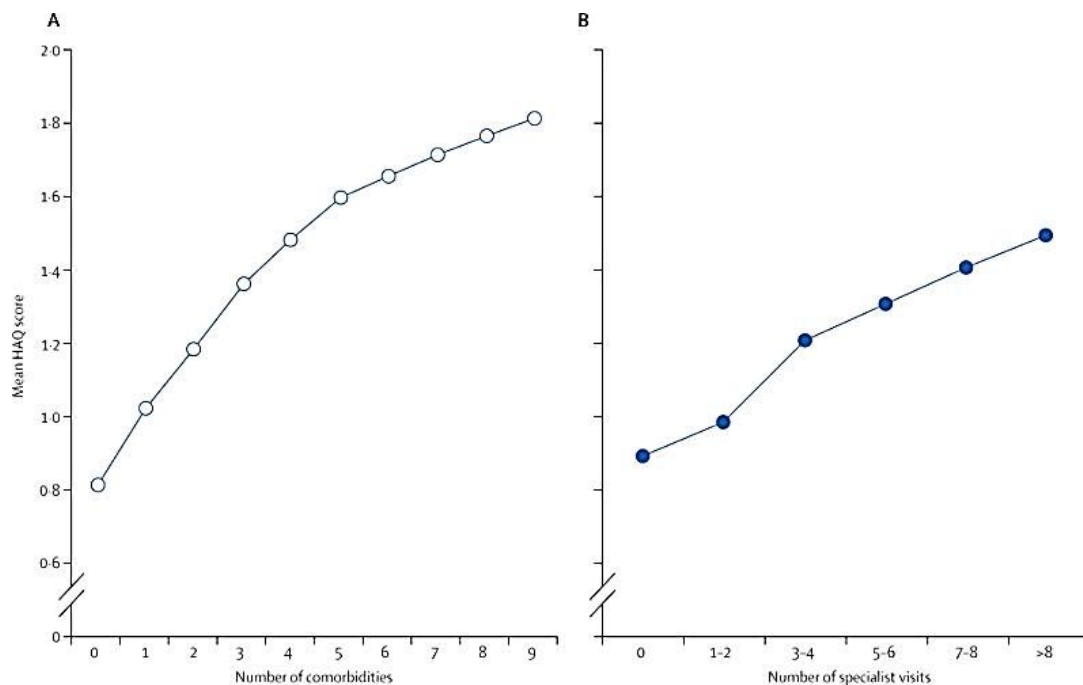
La polyarthrite  
rhumatoïde



## Chapitre I : La polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est un exemple prototypique de ces pathologies chroniques auto-inflammatoires et/ou auto-immunes. C'est une maladie qui atteint principalement les articulations, dont les causes sont multiples et impliquant des facteurs génétiques, épigénétiques, hormonaux et environnementaux. La PR peut provoquer des handicaps sévères et dégrader ainsi la qualité de vie des patients. Actuellement, c'est une maladie incurable qui présente une alternance entre des phases de rémissions et des phases aiguës.

Cette maladie réduit aussi la durée de vie des sujets atteints, à cause de répercussions systémiques qui touchent le système cardiovasculaire (infarctus du myocarde). Elle est aussi associée à un risque plus élevé d'infections et de cancers (poumon, lymphome, mélanome ou d'autres cancers de la peau). En revanche, la PR peut être associée à une réduction de certains cancers, comme celui de l'intestin et du sein (Scott et al., 2010). Au cours de cette pathologie, une multitude d'acteurs cellulaires et moléculaires interagissent les uns avec les autres dans des processus complexes. Actuellement, ces processus et ces interactions ne sont pas complètement élucidés.



**Figure 1 : Evaluation de la santé des patients atteints de PR (questionnaire sur un panel de 24000 patients). (A) nombre de comorbidités (B) nombre de visites chez un rhumatologue. Source : Banque nationale de données Américaine. (Scott et al., 2010)**



## 1. Généralités

La PR est le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires, avec une prévalence de 0.4% en France et de 1% au niveau mondial. C'est une maladie chronique qui apparaît à un âge relativement avancé, le plus souvent entre 30 et 50 ans. Elle atteint d'avantage les femmes (3 femmes pour 1 homme). La prise en charge est longue et coûteuse. L'estimation des coûts annuels de la prise en charge des patients atteints de PR en France varie entre 5,7 à 7,1 milliards d'euros (Sany, 2003).

### 1.1. Traitement de la PR

La stratégie thérapeutique est assez bien codifiée (Figure 2). Le premier traitement sera classiquement le méthotrexate (MTX), même si dans de rares cas, des formes agressives justifient d'emblée une association MTX/ anti-TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ), ou bien une combinaison avec un traitement par glucocorticoïdes. En cas d'échec ou de contre-indication au MTX, les risques d'évolution ainsi que l'activité de la maladie orientent le praticien vers l'utilisation d'un traitement biologique adéquat. Ce dernier doit répondre à de nombreux paramètres concernant sa tolérance, la voie d'administration (voie intraveineuse i.v, ou sous cutané s.c), la comorbidité associée, ainsi que les risques d'infections et/ou de carcinogénèse documentés (Vittecoq, 2013).

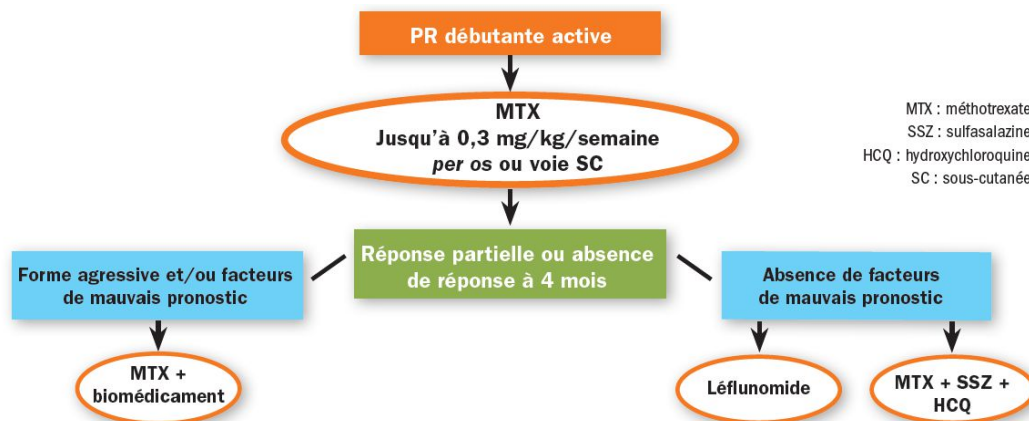


Figure 2 : Stratégie thérapeutique dans la phase initiale de la prise en charge d'une PR (Vittecoq, 2013)

### 1.2. Les traitements biologiques, une révolution

L'avènement des médicaments biologiques notamment les anti-TNF- $\alpha$ , anti-CD20 (Edwards and Cambridge, 2001), anti IL-1 $\beta$ , CTLA-4Ig a largement contribué à l'amélioration de la qualité de vie des patients atteints de cette maladie. Cependant, ces molécules ont un coût élevé et leurs effets secondaires (immunogénicité, hépatotoxicité, hypersensibilité, immunodéficience induisant une sensibilisation aux infections et aux

cancers) ainsi qu'une efficacité sélective et relativement courte limitent leur utilisation. Environ 30% des patients ne répondent pas aux anti-TNF- $\alpha$  (échec primaire) et chez les patients répondeurs, il n'est possible de maintenir le traitement 4 ans après son initiation, que chez 50% des malades (Benucci et al., 2015). De plus, si on se réfère aux évaluations symptomatiques en utilisant des indicateurs validés par l'*American College of Rheumatology* (ACR20/50/70), l'efficacité de ces traitements chez les patients répondeurs ne conduit jamais à la rémission ni même à une amélioration de 70% des différents paramètres de score (ACR70). Le taux de réponse le plus faible (ACR20) n'est constaté que chez 42 à 72% (selon l'agent biologique utilisé) chez les patients répondeurs (Redlich et al., 2003). De plus, la réponse est dépendante des traitements antécédents (Smolen and Aletaha, 2015). Le pourcentage de patients réfractaires aux traitements biologiques les plus fréquemment utilisés figure dans le Tableau II.

Tous ces facteurs imposent la recherche de nouvelles solutions. Il est aussi à mentionner que le vieillissement de la population, qui accompagne la hausse de l'espérance de vie, suggère une augmentation à venir de la prévalence de cette maladie, en particulier dans les pays développés avec des prises en charge de plus en plus longues.

**Tableau II : Fréquence des sujets non répondeurs selon les critères de l'American College of Rheumatology (ACR20, ACR50) dans des essais clinique avec des anti-TNF et des anti-IL-1 (Redlich et al., 2003) .**

Frequency of nonresponders according to the American College of Rheumatology 20% and 50% improvement criteria (ACR20 and ACR50, respectively) in clinical trials with tumor necrosis factor or interleukin-1 blockers

Compound	ACR20 nonresponder, %	Placebo nonresponder, %	ACR50 nonresponder, %	Duration of treatment, weeks
Infliximab <sup>*</sup>	48	83	67	54
Etanercept <sup>†</sup>	29	73	61	24
Adalimumab <sup>†</sup>	34	85	46	24
PEG-TNFR1 <sup>‡</sup>	50	74	80	12
Anakinra <sup>†</sup>	58	77	76	24
Etanercept	28	35 <sup>‡</sup>	35	52

\* With concomitant methotrexate.

† Pegylated recombinant methionyl human soluble tumor necrosis factor type I.

‡ Methotrexate used as comparator.

## 2. Physiopathologie de la PR

A partir du milieu du 20<sup>ème</sup> siècle, de nombreuses théories concernant la mise en place de la pathologie et son maintien, ont été élaborées. Elles établissent l'implication de plusieurs molécules et/ou types cellulaires. Durant les paragraphes qui vont suivre, je donnerai un aperçu sur l'évolution des stratégies qui ont été mises en place pour la compréhension et le traitement de cette pathologie.

### 2.1. Facteur rhumatoïde

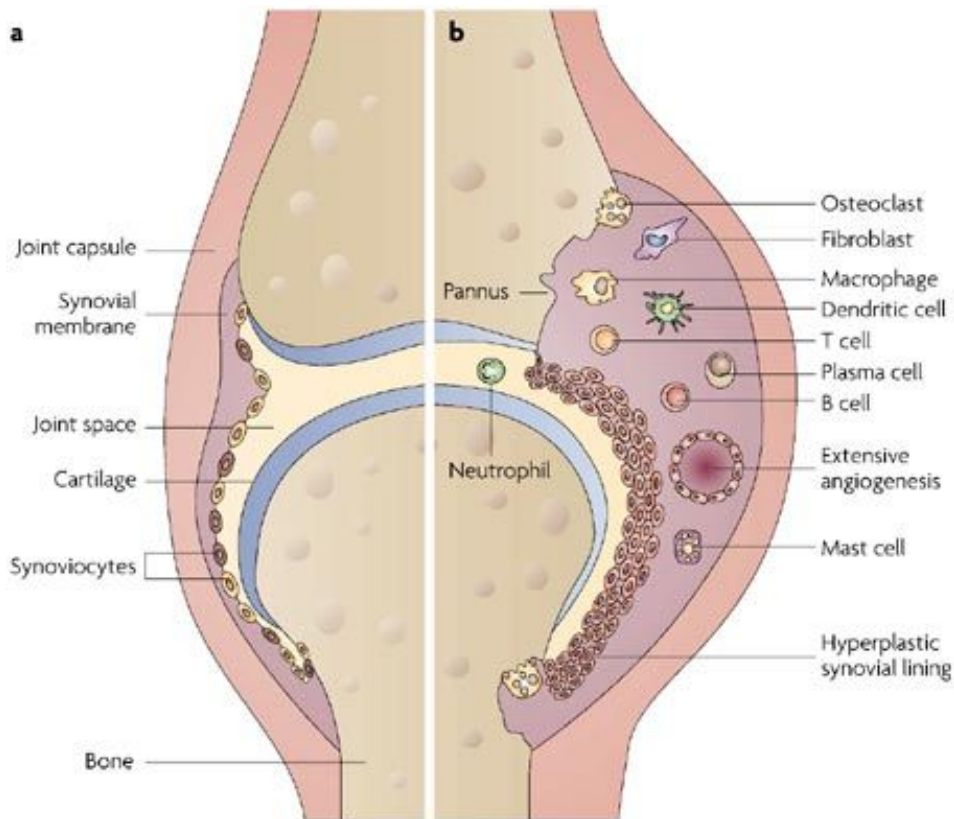
Les travaux de Franklin EC en 1957 mettent en évidence pour la première fois la nature d'un composé, encore inconnu jusque-là, souvent présent dans le sérum de patients atteints de PR et découvert à l'origine par Waaler en 1939 (Erik Waaler, 1939) et Rose en 1948. La caractérisation de ce composé a permis d'établir qu'il s'agit d'un anticorps qui se lie à la portion du fragment cristallisable (Fc) des immunoglobulines (Franklin et al., 1957). Environ 80% des patients atteints de PR sont séropositifs pour ce qui est maintenant appelé le facteur rhumatoïde (FR). La présence de ce facteur est généralement synonyme d'un mauvais pronostic. Cette découverte a fortement suggérée que la PR est une pathologie auto-immune provoquée par des auto-anticorps. La vision la plus logique, dans les années 1960, est que l'accumulation dans l'articulation de complexes immuns comportant des FR, avec ou sans d'autres composants auto-réactifs, provoque une inflammation par l'activation du

complément. Cette activation induit la libération de chimiokines comme le composant du complément (C5a). Celui-ci crée un gradient chimiotactique, qui attire et active les cellules inflammatoires, en particulier les neutrophiles, qui s'accumulent dans le liquide synovial, fixent les complexes immuns et libèrent des enzymes protéolytiques (Firestein, 2003) (Zvaifler, 1973).

Malgré une accumulation de données qui soutiennent cette hypothèse, la seule présence du FR ne suffit pas à expliquer l'établissement de la PR et ses spécificités pathologiques (Firestein, 2003). En effet, il est possible d'identifier des sujets sains adultes (2 à 10%) séropositifs pour le FR (leur fréquence augmente avec l'âge), dont la présence est également rencontrée dans de nombreuses autres pathologies inflammatoires, chroniques ou infectieuses. Ainsi, le FR est présent chez 90% des patients atteints de syndrome de Gougerot-Sjögren, dans 30% des cas de lupus, 50% des connectivites mixtes (syndrome de Sharp), 30% des sclérodermies, 50% des endocardites infectieuses et même 100% des leishmanioses. Il peut être aussi retrouvé lors d'une fibrose pulmonaire idiopathique, dans des cas de silicose, de cirrhose hépatique ou d'hémopathies lymphoïdes (Devulder et al., 2002).

## 2.2. Infiltrat cellulaire

En 1975 une étude effectuée par Abrahamsen TG et ses collaborateurs a permis de constater la présence d'un infiltrat cellulaire important au niveau des tissus synoviaux isolés de patients atteints de PR. Les résultats obtenus démontrent la présence de plusieurs populations cellulaires immunitaires avec une prédominance des lymphocytes (85%), de cellules de type macrophages (12%) et des quantités variables de granulocytes. La population lymphocytaire est composée essentiellement de lymphocytes T (LT, 73,6%) tandis que les lymphocytes B (LB) ne représentent que 9.7% (Abrahamsen et al., 1975). Un aperçu global de l'infiltrat articulaire est représenté dans la figure 3.



Nature Reviews | Drug Discovery

**Figure 3 : Caractéristiques articulaires des sujets atteints de PR (b) par rapport aux sujets sains (a). (Strand et al., 2007)**

Trois phénomènes majeurs sont constatés chez les sujets atteints de PR (Fig 3 b). (i) La présence d'un infiltrat immunitaire d'origine hématopoïétique (lymphocytes T et B, plasmocytes, macrophages, cellules dendritiques, mastocytes) qui peut se mettre en place dans l'articulation notamment grâce à la vasodilatation. (ii) Une hyperplasie de la membrane synoviale, qui au lieu d'être formée d'une seule couche de cellules à l'état normal, compte jusqu'à 20 couches chez les sujets atteints de PR. (iii) Ce pannus (épaississement de la membrane synoviale) provoque une inflammation chronique et conduit à l'activation pathologique des ostéoclastes.

## 2.2.1. Rôle des lymphocytes T

### 2.2.1.1. Arguments fonctionnels

La forte proportion de LT dans le liquide synovial (synovie) de patients a fait prendre conscience de l'importance de ce type cellulaire dans la physiopathologie de la PR. La preuve la plus évidente fut apportée par un modèle de greffe hétérologue de membrane synoviale (provenant de patients atteints de PR) humaine chez des souris immuno-déficientes SCID (*Severe Combined ImmunoDeficiency*) (Klimiuk et al., 1999). Après leur implantation, les expérimentateurs procèdent à la déplétion de (80 à 90%) des LT présents initialement dans le greffon par l'injection d'un anticorps (Ac) anti-CD2. La réduction du nombre de LT dans la synovie entraîne une diminution spectaculaire de la production de facteurs inflammatoires. On observe également une réduction de l'ARNm (ARN messenger) (de l'ordre de 70%) codant pour IL-1 $\beta$ , de 86% pour le Tnf- $\alpha$  et de 84% pour l'Il-15. Une réduction importante (72%) est aussi constatée dans la production de transcrits codant les métalloprotéinases (MMP1 et MMP3). Il a aussi été constaté, par immunohistochimie, qu'une population cellulaire CD68<sup>+</sup> qui correspond aux macrophages et produisant l'essentiel des facteurs inflammatoires, est réduite de façon drastique suite à la déplétion des LT. Ces expériences ont été validées *in vitro*, avec l'établissement d'un modèle où la production de cytokines pro-inflammatoires ainsi que la destruction tissulaire engendrée par les métalloprotéinases est contrôlée par les LT. Dans ce modèle, cette population cellulaire produit de l'IFN $\gamma$  (interféron  $\gamma$ ) qui régule la survie et la fonction délétère des macrophages par l'induction de GM-CSF (granulocyte-monocyte-colony-stimulating factor) (Klimiuk et al., 1999).

Les LT CD4<sup>+</sup> peuvent aussi promouvoir la destruction et le remodelage osseux par le biais d'une cytokine appelée RANK-L (*receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*). Cette cytokine active son récepteur RANK (*receptor activator of nuclear factor kappa-B*) situé principalement au niveau des ostéoclastes. L'interaction entre la cytokine et son récepteur contribue à l'ostéoclastogénèse. Dans un modèle de co-culture *in vitro* où la seule source de RANK-L soluble et membranaire est le LT activé, l'activation des ostéoclastes fut constatée. L'érosion osseuse a aussi été associée à ce mécanisme dans un modèle de transfert adoptif de LT CTLA4<sup>-/-</sup> (LT activés de façon native : en l'absence de CTLA-4, le CD28 ne rencontre aucune compétition pour se lier aux molécules B7-1 et B7-2, ce qui induit une prolifération non régulée des LT CD4<sup>+</sup> effecteurs). Dans ce cas de figure, l'érosion peut être réduite avec l'injection d'un antagoniste de RANK : OPG (le récepteur osteoprotégerin). Ce mécanisme a été confirmé dans un autre modèle *in vivo* d'arthrite expérimentale induite par

un adjuvant chez le rat Lewis AIA (adjuvant-induced arthritis model) avec des résultats qui confirment la capacité des LT activés à engendrer une action destructrice sur l'os qui peut être réduite par OPG (Kong et al., 1999).

### 2.2.1.2. Arguments morphologiques

Des microstructures lymphoïdes complexes avec un centre germinatif (CG), ont été mises en évidence dans la cavité synoviale chez un groupe (15 à 25%) de patients atteints de PR (Young et al., 1984) (Takemura et al., 2001). Cette architecture s'organise autour de certaines cellules essentielles pour le déclenchement et le maintien de la pathologie. Une étude sur les synovites, réalisée par l'équipe du Professeur Goronzy avec une cohorte de 64 patients (Takemura et al., 2001), a permis de déterminer 3 modèles d'architectures cellulaires intra articulaires incluant différentes populations cellulaires dont les LT. Le premier modèle présent chez 56.3% des patients est un modèle d'infiltrats diffus qui contient des LT, LB, des macrophages et des cellules dendritiques (DC). Les deux autres modèles sont plus structurés : Le deuxième modèle présent chez 20.3% des patients comprend des agrégats de LB et LT sans CG dans lesquels les cellules dendritiques folliculaires (FDC) sont absentes. Le troisième modèle, présent chez 23.4% des patients, comprend des agrégats de LT et LB mais cette fois-ci avec des CG et la présence de réseaux de FDC. Les populations de cellules plasmatiques qui s'accumulent sous les couches de la membrane synoviale sont retrouvées chez les 2 derniers groupes. Les cellules correspondant aux DCs sont bien présentes dans tous les groupes (Takemura et al., 2001).

### 2.2.1.3. Rôle des différentes sous populations des LT

#### 2.2.1.3.1. Rôle des LT CD4<sup>+</sup> effecteurs

De nombreux résultats incriminent les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans la pathologie. Cependant, le rôle exact des différentes sous-populations de LT à savoir T<sub>H1</sub>(*helper*) /T<sub>H2</sub>/T<sub>H17</sub> /Treg reste encore à clarifier.

Le concept qui suggère un effet délétère des cellules T<sub>H1</sub> et un effet plus protecteur des T<sub>H2</sub> (Bessis et al., 1996)(Marcelletti et al., 1991)(Klimiuk et al., 1999) est mis à mal par plusieurs études indiquant que l'IFN $\gamma$  ne participerait pas au déclenchement de la maladie dans le modèle animal et montrerait même un effet plutôt bénéfique. L'IFN $\gamma$  est une cytokine particulièrement associée (marqueur) à la voie T<sub>H1</sub>.

En effet, un modèle de souris (DBA/1) déficientes en IFN $\gamma$  (IFN $\gamma^{-/-}$ ) a montré une susceptibilité plus élevée à l'arthrite induite par l'injection de collagène (CIA) (Guedez et al., 2001). Le même résultat est constaté chez des souris (DBA/1) déficientes pour le récepteur de l'IFN $\gamma$  (IFN- $\gamma$ R $\alpha^{-/-}$ ) (Vermeire et al., 1997).

L'effet protecteur de l'IFN $\gamma$  a pu aussi être validé sur d'autres modèles d'arthrite chez les souris C57BL/6. Une étude a pu révéler un effet bénéfique de l'injection d'IFN $\gamma$  chez la souris dans le modèle de transfert de sérum K/BxN (STA K/BxN). Les auteurs ont expliqué cet effet en montrant une inhibition de la migration des neutrophiles. Cette inhibition est due à la fixation de l'IFN $\gamma$  sur son récepteur IFN- $\gamma$ R et cela même si ce dernier n'est pas directement impliqué dans la capacité des neutrophiles à migrer au niveau de l'articulation arthritique (Wu et al., 2007). D'autres investigations suggèrent un effet modulateur de l'IFN $\gamma$  sur la production d'IL-17, une autre cytokine pro-inflammatoire essentiellement produite par les LT<sub>H</sub>17. Cette étude, réalisée sur le modèle d'induction d'arthrite par injection d'antigène (AIA), montre une exacerbation des symptômes chez des souris IFN $\gamma^{-/-}$ . Une augmentation des niveaux des cytokines pro-inflammatoires (IL-2, IL-4, IL-5, et IL-6) ainsi que des taux d'IgG est constatée chez ces mêmes souris. Toutefois, l'augmentation la plus spectaculaire concerne l'IL-17. L'exacerbation des symptômes constatée est réduite par l'utilisation d'un anticorps anti-IL-17 chez ces souris. Les auteurs montrent même que l'IFN $\gamma$  possède la capacité de réduire la production d'IL-17 *in vitro* (Irmeler et al., 2007).

Autre élément qui va dans ce sens : lors du prétraitement des souris arthritiques (CIA) avec un anticorps anti-IL-12, qu'elles soient sauvages ou IFN $\gamma^{-/-}$ , un effet bénéfique (réduction des symptômes) a été constaté. Cet effet est associé à une réduction de la quantité d'anticorps anti-collagène de type II. Cela suggère fortement un effet de l'IL-12 indépendamment de l'IFN $\gamma$ . (L'IL-12 est connue pour augmenter la production de l'IL-2 et du TNF- $\alpha$  ainsi que pour son effet inhibiteur sur la production d'IL-4 et d'IL-5, orientant ainsi la balance T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 vers la voie T<sub>H</sub>1) (Matthys et al., 1998). Cependant, cet effet bénéfique, ou du moins non délétère, de l'IFN $\gamma$  reste controversé. Au cours d'un travail dans lequel les auteurs ont établi une implication pathologique du TLR4 (*toll like receptor 4*) dans le modèle murin STA K/BxN, une injection d'IL-12 ou d'IFN $\gamma$  a pu rétablir les symptômes arthritiques chez les souris TLR4 $^{-/-}$ , et cela serait dû à une réduction du TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor  $\beta$* ) (Kim and Chung, 2012). Pris ensemble, ces résultats montrent bien la complexité des effets que possèdent ces cytokines et la difficulté à démontrer clairement leurs rôles précis. En effet, ces molécules sont pléiotropiques et leurs différents effets dépendent fortement du



contexte, comme par exemple le modèle étudié (K/BxN, CIA, AIA), ou encore le stade de la pathologie (présence ou absence d'inflammation lors du traitement). Il est donc intéressant d'indiquer que les souris déficientes en IFN $\gamma$  ou son récepteur montrent des symptômes exacerbés, et qu'on constate une réduction des symptômes chez les souris arthritiques traitées par l'IFN $\gamma$ . Tandis que, chez les souris qui échappent à l'arthrite grâce à un déficit qui se situe en amont de la production de cette cytokine, son injection semble restaurer les symptômes. Finalement, il est aussi à indiquer que l'attribution/association de la production de l'IFN $\gamma$  aux cellules LT<sub>H1</sub> n'est pas toujours évidente, surtout dans le modèle STA K/BxN qui est connu pour son indépendance à la réponse immunitaire adaptative et donc aux LT. Les études actuelles font souvent ce raccourci qui exclut partiellement le potentiel des autres cellules comme les NK (Natural Killer) à produire de l'IFN $\gamma$ .

D'autres résultats établissent une implication séquentielle des réponses T<sub>H0</sub>/T<sub>H1</sub> puis T<sub>H2</sub> dans le modèle d'arthrite induite par le collagène (CIA), avec une apparition précoce post-immunisation des cellules T<sub>H0</sub>/T<sub>H1</sub> qui produisent de l'IFN $\gamma$  et/ou de l'IL-4 puis progressivement les cellules T<sub>H2</sub> deviennent prédominante. À 25 jours post-immunisation, les cellules T<sub>H0</sub>-like représentent 33%, les T<sub>H1</sub> 11% et les T<sub>H2</sub> qui secrètent de l'IL-4 et l'IL-5, 56% du total des LT<sub>H</sub> présents au niveau des ganglions lymphatiques inguinaux et poplités. Au jour 55, qui représente le pic de l'arthrite clinique, un profil nettement T<sub>H2</sub> est constaté.(Doncarli et al., 1997).

#### **2.2.1.3.2. Rôle des LT CD4<sup>+</sup> régulateurs**

Cependant, tous les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ne sont pas délétères dans cette maladie. Certains LT peuvent, en effet, avoir des rôles protecteurs dans la pathologie, parmi lesquels plusieurs sous-populations ont été décrites : T reg1, Tr1, T<sub>H3</sub>, T NK, T CD8 régulateurs, T $\gamma$ / $\delta$  régulateurs. Si des similarités entre ces cellules peuvent exister, la population la plus décrite et étudiée reste sans conteste les LTreg (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>).

Un des premiers éléments permettant d'identifier un effet des LTreg est l'association de la pathologie, dans son état précoce, avec un déficit sanguin de cette population cellulaire. L'analyse des populations cellulaires du sang, chez des sujets atteints de PR qui n'ont pas reçu de traitement modificateur de l'immunité, montre une réduction significative des LTreg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup>, avec une fréquence moyenne de 4,25% contre 5,3% chez les sujets sains, ce qui peut être un facteur contributeur au déclenchement de la maladie (Lawson et al., 2006).

Chez les sujets atteints de PR, les cellules CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> (LTreg) sont présentes et même enrichies dans le fluide synovial par rapport au sang. Indépendamment de leur origine sanguine ou synoviale, dans des circonstances normales, ces cellules possèdent la capacité de supprimer la prolifération des lymphocytes T autologues *in vitro* (Cao et al., 2003). Cependant, leur capacité à réguler l'auto-inflammation *in vivo* est réduite dans la PR, notamment par la perte de leur capacité à inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules effectrices (LT effecteurs, monocytes) (Ehrenstein et al., 2004). Cette inefficacité serait liée à l'environnement inflammatoire qui influence leur métabolisme. Les mécanismes de régulation du facteur de transcription Foxp3 (forkhead box P3) sont importants pour l'efficacité des LTreg mais restent encore mal compris (Yagi et al., 2004). Il existe des chevauchements importants entre les sites de fixation de Foxp3 et les gènes cibles de la voie Wnt (Wingless) au niveau de la séquence génomique. De façon intéressante, l'activation de la voie Wnt au niveau des LTreg réduit leurs capacités fonctionnelles *in vivo* et *in vitro*, et les LT effecteurs activés produisent Wnt3a, un activateur de la voie Wnt. Dans une étude de Jorg Van Loosdregt (2013), il a été démontré qu'il existe une association entre la production de Wnt3a par les cellules mononuclées du fluide synovial et l'incapacité des LTreg présents dans l'articulation à réguler l'inflammation. Cette observation a été établie aussi bien à partir d'un modèle *ex vivo* réalisé sur des prélèvements de patients présentant une arthrite juvénile idiopathique humaine que dans un modèle *in vivo* d'arthrite induite par l'injection de protéoglycane (PG) chez la souris (van Loosdregt et al., 2013).

Il a aussi été démontré que le traitement avec l'anti TNF- $\alpha$  (infliximab, rimicade®) augmente le nombre de cellules CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> et de cellules productrices d'IL-10 dans le sang chez les sujets répondeurs. Les LTreg retrouvent aussi leurs capacités à inhiber la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires produites par les cellules effectrices, et cela semble passer par un contact cellule-cellule. Ces données peuvent expliquer en partie l'action bénéfique des anti-TNF- $\alpha$  dans la PR (Ehrenstein et al., 2004). Elles suggèrent aussi un effet protecteur des LTreg fonctionnels dans la PR.

L'ensemble de ces résultats démontre l'implication de plusieurs sous populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans la physiopathologie de l'arthrite; à ces observations se superpose le phénomène de plasticité qui permet à ces cellules de passer d'une sous-population à l'autre.

### 2.2.1.3.3. Rôle des LT CD8<sup>+</sup>

Enfin, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ont aussi été étudiés dans le contexte de la PR. Dans une étude effectuée chez des patients qui possèdent des structures lymphoïdes tertiaires avec de multiples CG, les LT CD8<sup>+</sup> semblent très importants d'un point de vue architectural. Ils sont primordiaux dans la formation des CG ectopiques dans la PR, malgré le fait qu'ils ne représentent qu'une petite portion des LT dans l'infiltrat synovial. Il a pu être constaté, par une technique d'hybridation *in situ* ciblant spécifiquement les ARNm codant les TCR (*T cell receptor*) de LT CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> au niveau du CG des microstructures synoviales, un pourcentage très important de TCRβ originaires des LT CD8<sup>+</sup> (70% des transcrits totaux de TCR). Ce résultat peut indiquer que ces cellules sont préférentiellement activées et régulent à la hausse la transcription du TCR (Kang et al., 2002).

Dans une expérience où les tissus synoviaux avec CG sont implantés chez des souris SCID, les auteurs ont pu constater que l'utilisation d'un anticorps anti-CD8 entraîne une réduction significative de la synthèse du TNF-α et de l'IFN-γ dans les tissus synoviaux. La déplétion des LT CD8<sup>+</sup> provoque aussi une déstructuration de l'architecture des CG ectopiques synoviaux. Ceci a pour conséquence une réduction de l'activité de synthèse des immunoglobulines IgG, aussi bien au niveau transcriptionnel (dans les LB isolés de la synovie) qu'au niveau sérique chez les souris transplantées. De manière intéressante, deux éléments sont essentiels au fonctionnement des CG, les FDCs et les LT-α1β2 (lymphotoxine α1β2). Les résultats de cette étude indiquent le rôle essentiel des LT CD8<sup>+</sup> dans la production des LT-α1β2 et la rétention dans la membrane synoviale des FDCs (Kang et al., 2002).

L'évidence de l'action des lymphocytes T dans l'établissement des manifestations chroniques a été largement documentée. Cependant, l'émergence de nouvelles données indique, plus particulièrement, un rôle prépondérant des lymphocytes B dans la physiopathologie de la PR.

### 2.2.2. Rôle des lymphocytes B

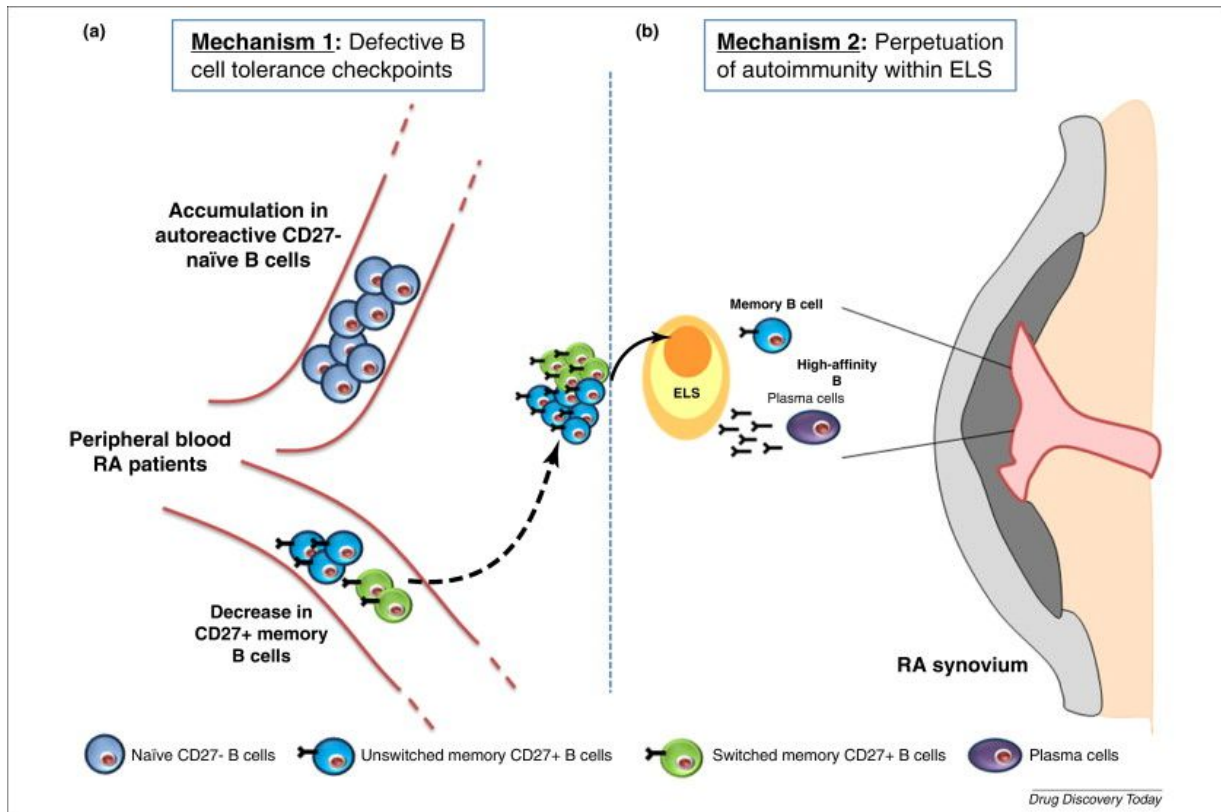
Les LB participent à la fois aux mécanismes de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. Ils expriment divers PRR (*Patterns Recognition Receptors*) pouvant être activés par des PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) et ils ont une activité de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) qui s'ajoute à leur capacité à se différencier en plasmocytes sécréteurs d'Ac. Dans le contexte de l'inflammation arthritique, les LB présents dans l'infiltrat articulaire sont à l'origine de la synthèse de plusieurs Ac, comme le FR ou bien les

Ac anti-peptides citrullinés (qui sont associés à la PR), suggérant que ces cellules jouent un rôle pivot dans la physiopathologie de la PR. De plus, l'apparition d'auto-anticorps peut précéder de nombreuses années le début des premiers symptômes cliniques de la PR (Rantapää-Dahlqvist et al., 2003), ce qui indique que l'activation/ implication des LB précède celle d'autres cellules immunitaires impliquées dans la pathologie (Potter et al., 2002; Sellam et al., 2011).

Des données récentes indiquent des défauts précoces dans les points de contrôles lors de la genèse des LB (probablement au niveau de la moelle osseuse), ce qui entraîne l'accumulation des LB auto-réactifs dans la circulation (Samuels et al., 2005). Comme la recombinaison des segments V(D)J est un mécanisme aléatoire, ils n'est pas étonnant que soient produits des LB ayant une affinité avec le « soi ». Cependant, des mécanismes physiologiques (délétion, anergie et réédition du BCR) permettent de réduire le nombre de LB auto-réactifs circulants. Les patients atteints de PR présentent un niveau de LB auto-réactifs entre 35 et 52% par rapport au total des LB naïfs matures, alors que cette proportion chez les sujets sains reste aux environs de 20%. De plus, chez certains patients atteints de PR, les LB poly-réactifs sont plus nombreux que chez les sujets sains (Samuels et al., 2005). Cette anomalie qualitative peut-être à l'origine de la production d'Ac reconnaissant des composants du soi, en particulier dans la synovite où la maturation de LB peut avoir lieu dans les structures lymphoïdes tertiaires, et cela en présence ou en absence de FDC (Corsiero et al., 2014).

Les FLS (*Fibroblast-like synoviocyte*) activés produisent BAFF (*B-cell activating factor*) et APRIL (*A proliferation-inducing ligand*), deux facteurs de survie et de prolifération des LB. Cet environnement induit l'expression d'AID (*activation-induced cytidine deaminase*) par les LB, une enzyme responsable de l'hyper-mutation somatique, favorisant ainsi la commutation de classe isotypique et la différenciation en plasmocytes (Bombardieri et al., 2011; Corsiero et al., 2014; Ohata et al., 2005). (Fig 4).

Le rôle pathologique des LB est également appuyé par l'efficacité du Rituximab dans la PR, un Ac anti-CD20 qui cible particulièrement les LB. Cette réduction des LB diminue de façon considérable l'inflammation synoviale et les marqueurs pathologiques de la polyarthrite rhumatoïde.



**Figure 4 : Rôles des lymphocytes B au niveau périphérique et synovial chez les patients atteints de PR. (a) Défaut quantitatif et qualitatif des LB en périphérie (b) Activation locale des LB et différenciation en plasmocytes sécréteurs d'AcS dans la cavité articulaire. ELS = structure lymphoïde ectopique (Corsiero et al., 2014).**

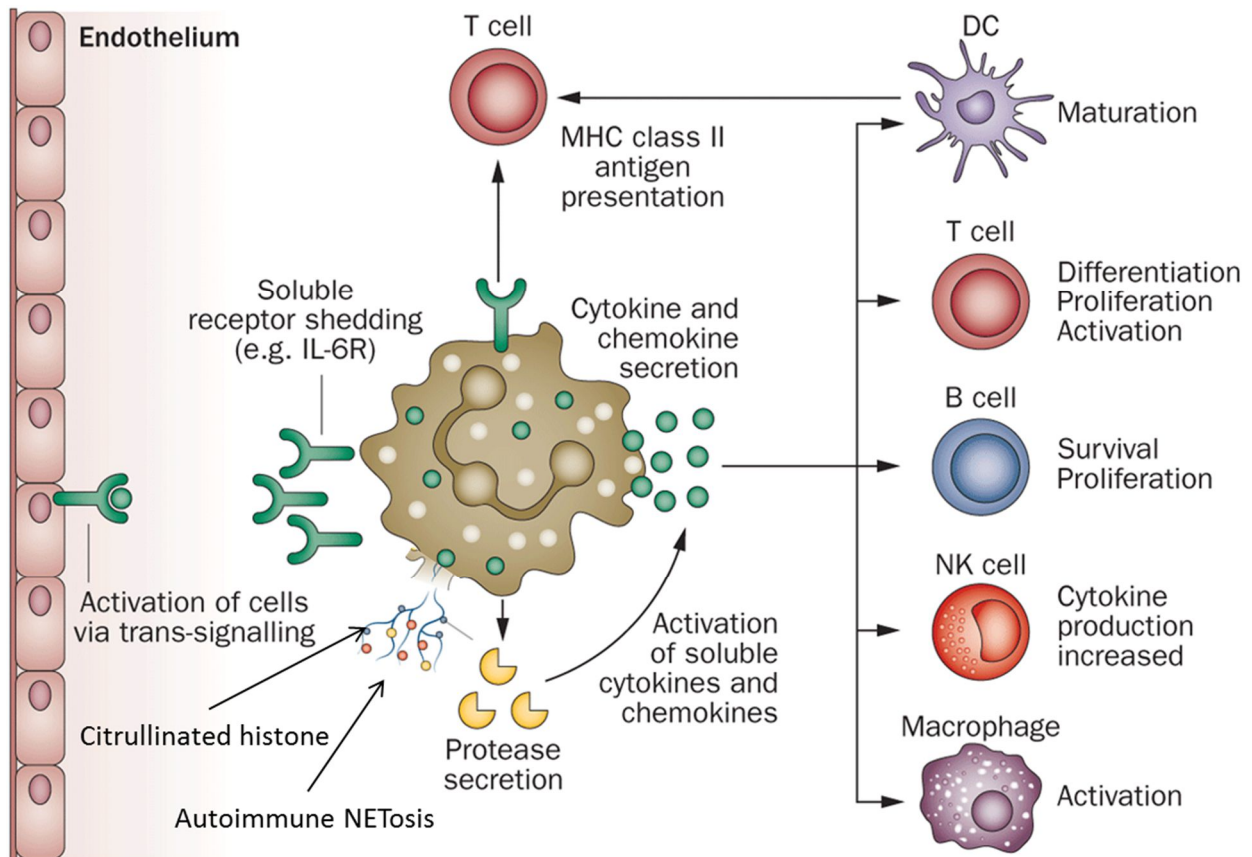
### 2.2.3. Rôle des polynucléaires neutrophiles

Parmi toutes les cellules impliquées dans la pathogénèse de la PR, les neutrophiles possèdent le plus grand potentiel cytotoxique en raison de leur aptitude à libérer des enzymes de dégradation et des espèces réactives dérivées d'oxygène (ROS). Ils contribuent aussi à la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines qui induisent le recrutement et le fonctionnement de presque toutes les autres cellules immunitaires. Ils peuvent aussi contribuer à la réponse immunitaire par des interactions cellule-cellule, par exemple, en activant les NK, qui augmentent ainsi leurs productions de cytokines. Ils peuvent aussi induire une régulation positive de protéines de la membrane plasmique, comme les molécules du CMH de classe II (complexe majeur d'histocompatibilité de classe II) qui leur permettent de présenter des antigènes aux LTs. Ils possèdent aussi le potentiel de libérer des protéases comme : l'élastase, la gélatinase, collagénase, la myéloperoxydase et la lactoferrine. Ces dernières peuvent avoir un rôle sur l'activation ou la désactivation de cytokines et

chimiokines. La présence de complexes immuns (comme le FR) dans le tissu synovial ou bien directement déposé à la surface du cartilage, provoque l'activation des neutrophiles. Cela est principalement dû à la fixation de ces complexes immuns aux récepteurs FcγR présents à la surface des neutrophiles, ce qui déclenche la production de ROS et de protéases impliquées dans la dégradation articulaire.

Par ailleurs, les neutrophiles de patients atteints de PR, par rapport aux cellules isolées de sujets sains, montrent une prédisposition à la production de ROS. Les neutrophiles activés, exprimant le CMH de classe II à leur surface, sont abondamment présents dans la membrane et le fluide synovial de patients atteints de PR. En outre, une production de RANKL et de BAFF est détectée chez ces neutrophiles infiltrant, deux cytokines connues pour participer respectivement à l'activation des ostéoclastes et des LB.

De nouvelles preuves suggèrent un autre rôle des neutrophiles dans les maladies auto-immunes. Lors de la NETose, les neutrophiles libèrent des pièges extra cellulaires (NETs, *Neutrophil extracellular traps*) contenant de la chromatine associée à des enzymes. Au-delà du fait de neutraliser les micro-organismes extracellulaires, ce mécanisme constitue une source d'autoantigènes dans un milieu inflammatoire où les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) sont présentes. Par exemple, les peptides citrullinés qui peuvent agir comme des épitopes dans la perte de la tolérance, sont générés par des peptidyl-arginine désaminases, des enzymes présentes dans les neutrophiles et qui remplacent l'arginine par des résidus citrulline. Les neutrophiles de patients atteints de PR sont sujets à la NETose et libèrent ainsi des protéines citrullinées dans l'environnement. La présence d'anticorps dirigés contre les protéines citrullinées constitue un marqueur prédictif d'une arthrite érosive. De ce fait, les neutrophiles, en étant une source d'autoantigènes, montrent un effet délétère additionnel dans la PR (Wright et al., 2014).



**Figure 5 : Rôles possibles des neutrophiles dans la modulation de l'immunité innée et adaptative au cours de la PR, adapté de (Wright et al., 2014).**

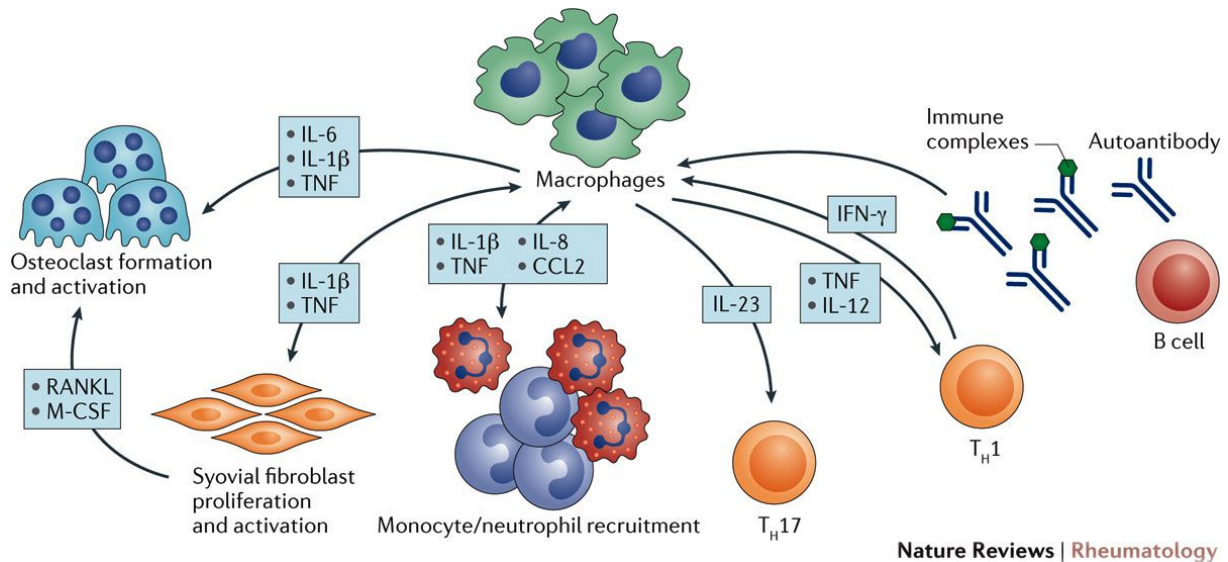
#### 2.2.4. Rôle des Macrophages

Le grand nombre de macrophages identifiés dans les biopsies de membrane synoviale de patients atteints de PR indique que ces cellules sont très importantes dans la physiopathologie de la maladie. Par ailleurs, des études immunohistochimiques ont montré que les macrophages constituent la source majeure du  $TNF\alpha$  dans la membrane synoviale inflammée de patients souffrant de PR. Le mécanisme sous-jacent de cette production excessive de  $TNF\alpha$  n'est pas totalement compris, mais cela semble dû à l'environnement inflammatoire synovial dans lequel sont présents, entre autres molécules pro-inflammatoires, de nombreuses cytokines, chimiokines et des pièges extra cellulaires (NETs) libérés par les neutrophiles lors de la NETose. Les macrophages activent les cellules résidentes, les FLS, ce qui a pour conséquence, une production de RANK-L et d'IL-6 aboutissant à l'activation des ostéoclastes. Les macrophages peuvent aussi activer directement les fonctions des ostéoclastes par la production de  $TNF\alpha$ , d'IL-6 et d'IL-1. Cette activation chronique des ostéoclastes induit une atteinte osseuse et cartilagineuse chez les patients atteints de PR. D'autre part, les

macrophages isolés des patients produisent constitutivement l'IL-8, une chimiokine impliquée dans le recrutement des neutrophiles. Enfin, les macrophages participent aussi à la progression de la maladie par leur capacité à présenter les antigènes et ils contribuent directement aux effets délétères par la production de ROS et d'enzymes de dégradation de la matrice (des métalloprotéases, MMPs). Ces divers effets des macrophages au niveau de la cavité synoviale sont schématisés dans la Figure 6.

Cependant, les macrophages répondent aussi aux stimuli environnementaux et peuvent adopter des polarisations spécifiques en fonction de la présence ou de l'absence de certaines molécules. Historiquement une distinction entre les macrophages M1 (activation classique) et M2 (activation alternative) a été proposée. Actuellement, on considère que les phénotypes M1 et M2 sont des extrêmes d'un continuum et plusieurs états intermédiaires ont été aussi décrits. Néanmoins, cette différence de polarisation entraîne une différence fonctionnelle incluant la production de cytokines. Par exemple, la polarisation M1 est associée à une production importante d'IL-1 et d'IL-23 alors que l'IL-10 est faiblement produite. Par contre, les M2 produisent très peu d'IL-1 et d'IL-23, tandis que l'IL-10 est massivement produite. On retrouve cette différence dans la production de chimiokines comme CXCL9 et CXCL10 par les M1, CCL17 et CCL22 étant plus spécifiques des macrophages M2. L'expression de protéines de surface des cellules est aussi modifiée, car les M1 sont caractérisés par une forte expression de CMH de classe II alors que ce n'est pas le cas pour les M2. Même le métabolisme et les microARNs sont modulés avec une expression de miR-155 par les M1 et de miR-146a et miR-223 par les M2. Toutes ces modifications se traduisent par des profils distincts avec une implication des M1 dans la résistance aux pathogènes intracellulaires et la lutte anti tumorale dans le contexte de réponses  $T_H1$ . Alors que la polarisation M2 des macrophages participe à la résistance aux parasites en plus d'un effet immunomodulateur. Même si cela n'est pas totalement clair, les macrophages infiltrant la membrane synoviale des patients atteints de PR semblent présenter une polarisation M1 du fait de leur production massive d'IL-1 $\beta$  et de TNF $\alpha$  (Udalova et al., 2016).





**Figure 6 : Rôles et communication des macrophages avec les cellules immunitaires dans le contexte de la PR.**

Les macrophages de la membrane synoviale produisent des cytokines qui favorisent l'inflammation par le recrutement de cellules immunitaires, la polarisation des lymphocytes T et l'activation des FLS résidentes. Ce mécanisme engendre une communication intercellulaire aboutissant au maintien de l'inflammation par l'activation des ostéoclastes, la production de cytokines, de chimiokines et de complexes immuns (Udalova et al., 2016).

### 2.3. Cellules résidentes : Rôle des FLS

La fonction principale des FLS est de produire le lubrifiant (généralement l'acide hyaluronique) au niveau de la cavité synoviale. Cependant, ces cellules produisent aussi des métalloprotéases, la hyaluronidase et en parallèle du collagène ce qui participe à l'équilibre dynamique de la matrice extracellulaire (Müller-Ladner et al., 2007).

Les FLS de patients atteints de PR possèdent des caractéristiques les distinguant des FLS présents chez les patients atteints d'arthrose (non inflammatoire) ou de sujets sains. En effet, les FLS de patients atteints de PR présentent un phénotype agressif. Cela a pu être confirmé dans une étude où des FLS de patients atteints de PR sont co-implantés avec du cartilage humain chez des souris (SCID). Les FLS qui ne sont plus sous l'influence de l'environnement inflammatoire dans l'articulation des patients sont tout de même capables d'adhérer et d'envahir le cartilage, alors que cela n'a pas été le cas avec les FLS provenant des patients atteints d'arthrose et des sujets sains (Müller-Ladner et al., 1996). Une dérégulation de leur cycle de vie semble aussi décrite, ce qui peut expliquer l'apparition d'une hyperplasie de la

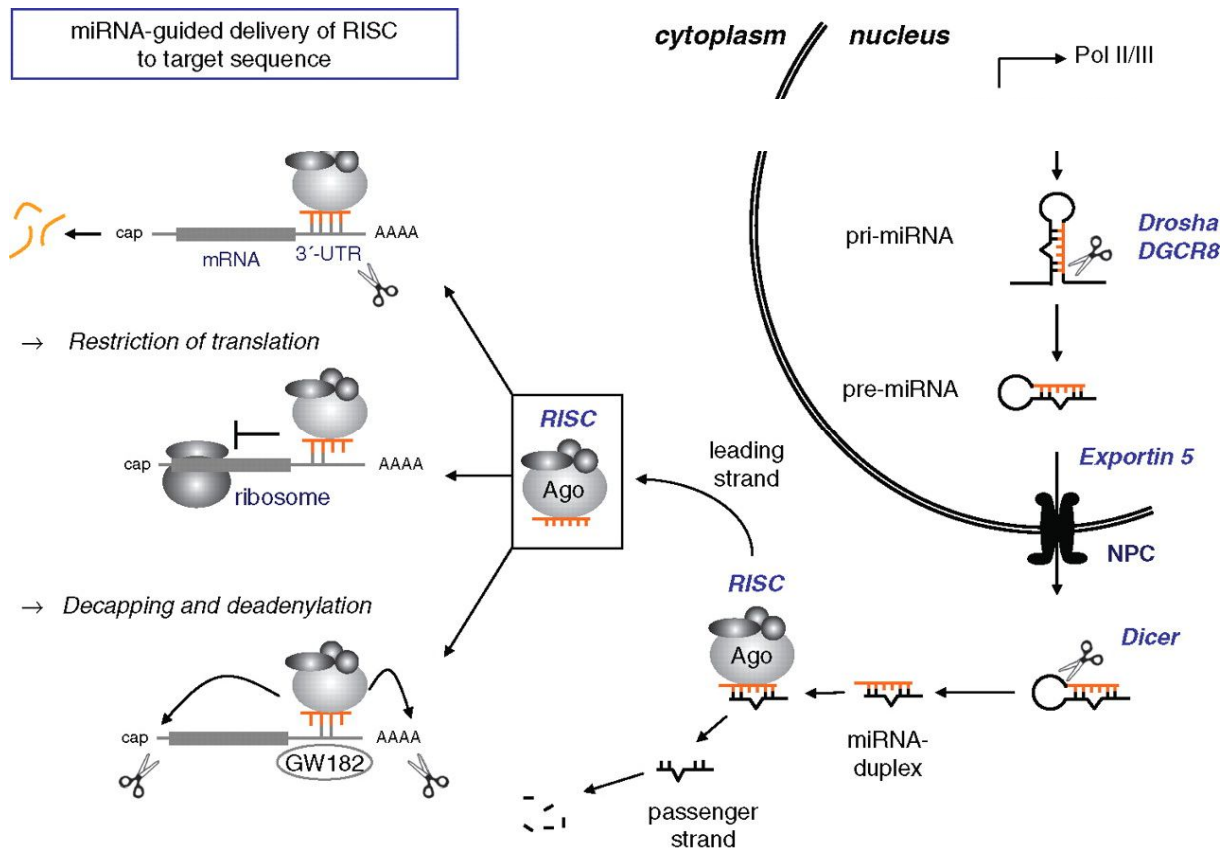
membrane synoviale (Franz et al., 2000; Irmeler et al., 1997). Les FLS sont activés par des cytokines produites par les LT et les macrophages (TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ ) et contribuent en retour à la polarisation de ces derniers par la production de cytokines. En effet, les FLS produisent RANK-L et M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor) qui sont essentiels à la différenciation et l'activation respective des ostéoclastes et des macrophages résidant dans l'articulation (Udalova et al., 2016). Ces cellules possèdent aussi la capacité de répondre aux activations par les PAMPs grâce à leurs PRRs (Al-Okla et al., 1999), ce qui leur permet de produire principalement et en grande quantité l'IL-6, mais aussi des prostanoïdes (prostaglandine E<sub>2</sub>), du NO et des chimiokines (Filer et al., 2008; Müller-Ladner et al., 1996; Pierer et al., 2004). Cependant, et malgré leur caractère agressif dans le contexte de la PR, les FLS ne secrètent pas de TNF $\alpha$ , ni d'IL-1 $\beta$  ou d'IL-18, qui sont des cytokines contribuant fortement à la pathogénèse de la PR (Zeisel et al., 2004). Ce système de régulation propre aux FLS est induit par un phénomène épigénétique qui implique miR-346. Ce microARN bloque la sécrétion d'IL-18 (Alsaleh et al., 2009a) et du TNF $\alpha$  (Semaan et al., 2011) en déstabilisant leurs ARN messagers respectifs et empêchant ainsi ces cytokines d'être secrétées. Cependant, le mécanisme précis de cette inhibition n'est pas encore totalement compris.

#### 2.4. Rôle des microARNs

La biogénèse d'un microARN débute par la transcription du gène correspondant dans le noyau. Le miARN primaire (pri-miARN) est constitué d'une séquence courte avec une structure tige-boucle dont les bases sont imparfaitement appariées. Le pri-miARN est pris en charge dans le noyau par une RNase III nommée DROSHA (qui fait partie d'un complexe fonctionnel nécessitant DGCR8 appelé aussi PASHA) ce qui libère une séquence d'environ 70 bases avec une structure en épingle à cheveux correspondant au précurseur miARN (pré-miARN) (Wittmann and Jäck, 2011).

Les pré-miARNs sont transportés vers le cytoplasme par l'EXPORTIN 5. Ils sont alors pris en charge par DICER, une autre RNase III, qui coupe au niveau de la boucle terminale, ce qui résulte en un ARN double brin imparfaitement apparié d'environ 22 pb. L'ARN ainsi obtenu se lie à des protéines de la famille Argonaute, qui font partie du complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*); seul un brin est gardé, le brin complémentaire est libéré. Ce complexe va se fixer en général sur la région 3' UTR (*Untranslated Transcribed Region*) d'un ARNm dans laquelle le brin présent dans le complexe RISC trouve une région complémentaire. Cette complémentarité, dans les rares cas où elle est totale, conduit au

clivage de l'ARNm cible grâce à l'activité RNase d'Argonaute. Le plus souvent, quand la complémentarité est partielle, l'interaction miARN / ARNm conduit soit à une répression traductionnelle ou bien au decapping et à la déadénylation de l'ARNm (Wittmann and Jäck, 2011). La figure 7 résume la biogenèse des miARNs.



**Figure 7 : Biogenèse et mécanisme d'action des microARNs (Wittmann and Jäck, 2011)**

L'implication des miARNs dans la physiopathologie de la PR a été démontrée ces dernières années où plusieurs miARNs ont été impliqués dans la régulation de l'inflammation arthritique, parmi lesquels miR-146a (Nakasa et al., 2008), miR-155 (Blüml et al., 2011; Kurowska-Stolarska et al., 2011), mir-124a (Nakamachi et al., 2009), miR-203 (Stanczyk et al., 2011). Notre groupe a participé à l'identification de miARNs qui sont dérégulés au niveau de synoviocytes de type fibroblastiques activés : miR-346 (Alsaleh et al., 2009b; Semaan et al., 2011), miR-19 (Philippe et al., 2012), miR-20a (Philippe et al., 2013).

## 2.5. Rôle des interférons

Plusieurs études ont envisagé et analysé la contribution des Interférons dans l'initiation, la modulation, le maintien mais aussi le traitement de la PR.

Les IFNs sont des cytokines très controversées par rapport à leur participation dans les différentes maladies auto-immunes, et notamment dans la PR. En 1979, Notkins et ses collaborateurs ont démontré, pour la première fois, la présence d'IFNs chez les patients atteints de PR (Hooks et al., 1979). Toutefois, cette observation ne permet pas de conclure quant à leurs fonctions. En effet, il est possible de considérer que leur présence les rend responsables de la pathologie ou, au contraire, qu'elle témoigne d'une réponse physiologique visant à diminuer les symptômes. Les IFNs peuvent ainsi être décrits dans la littérature comme pathologiques ou bien, au contraire, comme bénéfiques dans la PR.

### 2.5.1. Rôle des IFN de type I

En accord avec la première possibilité, il a été montré que l'utilisation d'IFN- $\alpha$  chez des patients infectés chroniquement par le HCV (virus de l'hépatite C) pouvait, dans certains cas, induire une PR (Cacopardo et al., 2013). Par ailleurs, des gènes de réponse aux IFNs (appelés ISGs pour *Interferon-Stimulated Genes*) sont surexprimés chez des patients atteints de PR de façon similaire à ce qui est observé dans d'autres pathologies auto-immunes comme le LED, définissant ainsi la « signature IFN » de ces maladies (Kraan et al., 2007). Parmi ces gènes, on peut y recenser *G1p2/ISG15* (*Interferon Stimulated Gene 15*), *MX1* (*Myxovirus resistance 1*), *IFIT1* (*Interferon-Induced with Tetratricopeptide repeats 1*), *IFIT2*, *IRF7* (*interferon regulatory factor7*) et *IFRG28* (*28 kDa interferon responsive protein*) (Kraan et al., 2007). En outre, la présence d'une concentration plus élevée en IFN-I dans le sérum des patients atteints de PR par rapport aux sujets sains (Mavragani et al., 2010) et leur détection au niveau du fluide synovial (Conigliaro et al., 2010), appuie cette vision pathogénique des IFN-I dans la PR. D'autre part, la présence à la fois d'ARNdb (ARN double brin) viral (provenant par exemple d'EBV (Virus d'Epstein-Barr)) (Bokarewa et al., 2008), ou d'ADN bactérien (van der Heijden et al., 2000) en plus des DCs (source majeure d'IFN-I) fut démontrée au site de l'inflammation arthritique chez des patients atteints de PR (Narendra et al., 2014). Par ailleurs, l'injection intra articulaire d'ARNdb peut déclencher une arthrite chez la souris (Magnusson et al., 2006). Dans ce modèle murin, les DCs sont détectées dans la synovie des souris après l'induction de l'arthrite. De même, des DCs provenant de la rate ou différenciées à partir de la moelle osseuse et préalablement activées par l'ARNdb suffisent à induire une

arthrite lorsqu'elles sont injectées en intra articulaire. Ce phénomène requiert la signalisation en aval du récepteur IFNAR1 (*Interferon-alpha/beta receptor alpha chain*) dans les souris donneuses de pDC (cellules dendritiques plasmacytoïdes), indiquant le rôle majeur des IFNs-I dans le déclenchement de l'arthrite dans ce modèle murin (Narendra et al., 2014). Plusieurs autres études indiquent un effet délétère potentiel de la signature IFN. Cela est corroboré par des associations de gènes induits par les IFNs dans les cellules du sang périphérique avec la pathologie ou encore une capacité accrue à produire de l'IFN $\beta$  retrouvée chez les macrophages, DCs et FLS de patients PR (López de Padilla and Niewold, 2016).

Concernant l'effet des IFNs lors du traitement des patients atteints de PR, plusieurs études ont exploré ce champ d'investigation, dans le but d'identifier des marqueurs d'action des agents thérapeutiques actuellement utilisés, en particulier les traitements biologiques. L'objectif de ces travaux est de mieux cibler les patients répondeurs, d'éviter l'administration de traitements inefficaces aux patients, mais aussi de réduire les coûts de ces traitements, en ne les utilisant que chez les sujets répondeurs. Des effets de régulation réciproque ont déjà été décrits concernant les IFNs de Type I et le TNF- $\alpha$  (*a priori* l'augmentation de l'un peut induire la diminution de l'autre) ce qui peut constituer un phénomène contribuant à l'homéostasie inflammatoire (Mavragani et al., 2007; Palucka et al., 2005). Des résultats plutôt contradictoires sont actuellement disponibles concernant ces approches. Approximativement 50% des patients atteints de PR et n'ayant jamais été traités avec un anti-TNF- $\alpha$  montrent une signature IFN dans les cellules du sang périphérique. Dans une étude analysant l'effet du traitement par un anti-TNF- $\alpha$  (infliximab), un groupe de patients a montré une augmentation de leur signature IFN post traitement. Cette augmentation semble corrélée négativement avec le résultat clinique bénéfique du traitement (Baarsen et al., 2010). D'autre part, dans une étude récente, les auteurs se sont plus intéressés aux quantités d'IFN-I (d'IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$  actifs) avant le traitement avec les différents anti-TNF- $\alpha$  disponibles. Dans cette étude réalisée sur un groupe préliminaire de 32 patients et une cohorte de validation de 92 patients (majoritairement d'origine européenne), les auteurs ont pu montrer que le rapport IFN- $\beta$ /IFN- $\alpha$  constitue l'élément le plus apte à prédire le devenir des patients traités. Ainsi, quand ce ratio est inférieur à 1,3 avant le traitement cela est en corrélation avec une efficacité de l'action thérapeutique de l'anti-TNF- $\alpha$  à 14 semaines. Curieusement, le dosage des IFNs à 4-6 semaines post-traitement avec l'anti-TNF- $\alpha$  indique une réduction significative d'IFN- $\beta$  chez les non répondeurs, alors que ce n'est pas le cas chez les répondeurs (Muskardin et al., 2016). Cependant, dans une étude antérieure (Mavragani et al., 2010) un résultat totalement différent a été montré sur une cohorte de patients hispaniques. Dans ce travail, une corrélation

entre la présence de niveaux relativement élevés d'IFN-I avant le traitement et une bonne réponse au traitement par l'anti-TNF- $\alpha$  a été constatée. Cette observation suggère un potentiel effet protecteur des IFN-I, ou que leur présence constitue un marqueur prédictif de l'action anti-inflammatoire de l'anti-TNF- $\alpha$ . Cette étude indique également que le ratio IFN- $\beta$ /IFN- $\alpha$  est positivement associé à une réduction plus importante des symptômes, avec des taux d'IL1-Ra (*interleukin-1 receptor antagonist*) plus élevés. Malgré ces résultats apparemment contradictoires, il ressort tout de même que l'efficacité d'action de l'anti-TNF- $\alpha$  serait potentiellement tributaire des niveaux d'IFN de type I et du rapport entre les sous-types de ces cytokines avant le traitement.

D'autre part, plusieurs observations recensent des associations entre la PR et des polymorphismes dans des gènes impliqués dans la réponse aux IFN de type I, comme les gènes codant les facteurs de transcriptions IRF5 et IRF8 (Messemaker et al., 2015). Par ailleurs, l'un des gènes les plus fortement associés à l'apparition de PR quand il est muté (en dehors des gènes du CMH) est *PTPN22* (*Protein Tyrosine Phosphatase Nonreceptor type 22*) qui est impliqué dans la cascade de signalisation aboutissant à la production des IFNs de type I (Wang et al., 2013). De plus, IRF7, un facteur de transcription placé en aval de TLR7 et primordial à la production d'IFN de type I, a été associé à la régulation de l'arthrite dans un modèle murin. Dans une étude utilisant le modèle de transfert de sérum arthritogène provenant de souris K/BxN (STA K/BxN), les auteurs ont montré une exacerbation significative des symptômes, accompagnée de taux sériques élevés de cytokines pro inflammatoires et une atteinte osseuse plus importante en l'absence d'IRF7 (Sweeney et al., 2012). De plus, des études sur le rôle des IFNs de type I ont indiqué un effet plutôt protecteur. L'IFNs de type I peut avoir par exemple le potentiel de réduire la différenciation et l'activation ostéoclastique. C'est en tout cas ce qui ressort d'un travail publié en 2006, où les auteurs mettent en parallèle l'effet des IFNs de type I et du TNF- $\alpha$ . L'IFN de type I, présent chez les patients atteints de LED, serait associé à une réduction de l'ostéoclastogénèse, tandis que, chez les patients PR, le TNF- $\alpha$  posséderait le potentiel de recruter des cellules myéloïdes CD11b<sup>+</sup> progéniteurs d'ostéoclaste (OCP) à partir de la moelle osseuse jusqu'aux articulations où ils se différencieraient en ostéoclastes actifs dans la synovie de ces patients enrichie en RANK-L (Schwarz et al., 2006). Ce résultat indique que les IFNs de type I pourraient induire une polarisation antiérosive, contrebalançant l'effet du TNF- $\alpha$  et réduisant ainsi les dommages articulaires constatés au cours de la PR (Schwarz et al., 2006). Autre exemple, l'IFN- $\beta$  est retrouvé dans les tissus synoviaux de patients atteints de PR, ce qui pourrait indiquer un effet important de cette cytokine (Holten et al., 2005a). Lors d'investigations plus poussées dans le

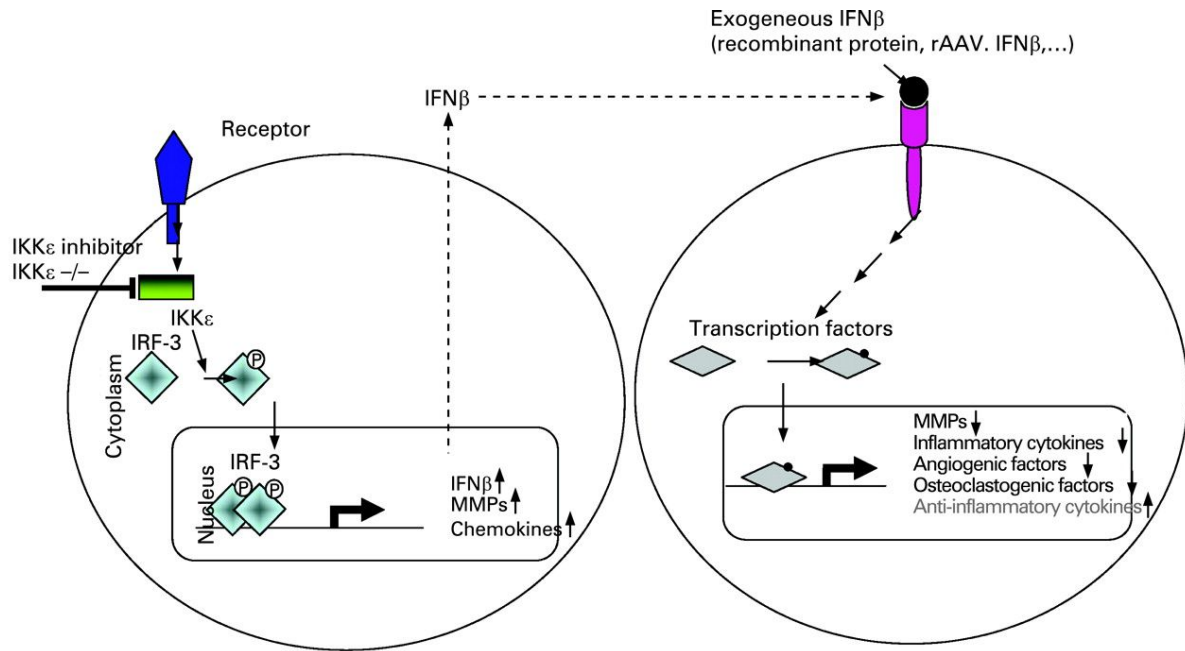
modèle d'induction par injection de collagène hétérologue chez la souris (CIA), un effet protecteur associé à l'IFN- $\beta$  a été démontré. Administré par injection intrapéritonéale (i.p) chez les souris au début de la pathologie, l'IFN- $\beta$  réduit significativement les symptômes cliniques, les dommages du cartilage, l'expression des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-6, alors qu'il augmente la production d'IL-10. Il réduit aussi l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (*nuclear factor-kappa B*). De plus, *in vitro*, l'IFN- $\beta$  réduit l'expression d'IL-6, d'IL-8 et de GM-CSF dans les FLS de patients atteints de PR (Van Holten et al., 2004). Cet effet positif est aussi constaté chez le rat dans une étude utilisant une thérapie génique locale par injection d'adénovirus recombinant codant pour l'IFN- $\beta$ . L'administration du virus thérapeutique aux premiers signes de la pathologie réduit là aussi de façon significative les symptômes et les différents marqueurs de l'inflammation arthritique (Adriaansen et al., 2006).

Par ailleurs, le traitement des patients souffrant de PR par les IFNs de type I a été évalué chez l'Homme avec plus au moins de succès. Par exemple, un traitement par l'IFN- $\alpha$  a montré une certaine efficacité par l'augmentation de la production des récepteurs soluble d'IL-1 $\beta$  (IL-1Ra) et du TNF- $\alpha$  (sTNFR *soluble tumor necrosis factor receptors*) dans le fluide et les tissus synoviaux. Cependant, ce résultat n'a pu être décrit que sur un nombre restreint de patients (Wong et al., 2003). Mais, c'est l'IFN- $\beta$  qui a suscité le plus d'enthousiasme au vu de son action anti-inflammatoire potentielle, entraînant la réduction de la production d'IL-6, du TNF- $\alpha$  et même des MMPs (Matrix Metalloproteinases). D'ailleurs, des résultats obtenus dans les modèles murins avaient indiqué un fort potentiel régulateur de cette cytokine dans le contexte de l'arthrite inflammatoire. D'autres expériences ont suivi et ont donné lieu à des résultats plutôt mitigés. Dans un travail publié en 1999, des singes rhésus ont été traités par des injections d'IFN- $\beta$  après induction d'arthrite induite au collagène. Un traitement quotidien pendant 4 semaines a entraîné une amélioration chez 75% des animaux. De même, une étude pilote menée sur 12 patients atteints de PR ayant reçu un traitement par l'IFN- $\beta$  3 fois (voie sous-cutané, s.c) par semaine pendant 12 semaines a montré une tendance à l'amélioration des symptômes. Cependant, malgré l'utilisation de concentrations différentes, aucune relation dose/réponse n'a pu être identifiée (Tak, 1999). Au vu de ces résultats considérés comme encourageant, un autre essai clinique a été mené dans une étude en double aveugle avec sélection aléatoire des patients (randomisation) sur un nombre de sujets considérablement augmenté (209 patients). Les auteurs ont constitué 3 groupes : 1 groupe placebo et deux groupes traités par des doses différentes d'IFN- $\beta$  (2,2 et 44  $\mu$ g). Les patients ont reçu le traitement par voie sous cutané (s.c) à la fréquence de 3 fois par semaine pendant 24

semaines. Cette étude a conclu à une inactivité de ce traitement avec cette posologie (Holten et al., 2005). Cependant, il est à signaler que les concentrations d'IFN- $\beta$  utilisées sont plus faible proportionnellement que celles qui avait été efficaces chez l'animal, afin d'éviter d'éventuels effets secondaires. La voie d'administration peut elle aussi être discutée, car la distance entre le point d'injection et les articulations arthritiques risque de diluer l'effet potentiel. De plus, tous les patients étaient déjà sous traitement conventionnel, ce qui n'est pas le cas dans les tests précliniques sur les modèles animaux. Enfin, le stade de la pathologie lors du traitement est probablement un élément dont il n'a pas été tenu compte. En effet, les animaux montrant une très bonne réponse au traitement ont été traités très précocement après induction de l'arthrite et les injections d'INF- $\beta$  ont été réalisées pendant la phase effectrice de la maladie. Chez les patients atteints de PR, l'alternance entre les phases de rémissions et les phases aiguës devraient donc être prises en considération lors des essais cliniques.

Afin de pallier aux imperfections des protocoles de traitement actuels, de nouvelles stratégies ont vu le jour. Parmi ces stratégies nous pouvons citer : (i) la thérapie génique intra articulaire dont le but est d'induire une production *in situ* de fortes concentrations d'IFN- $\beta$ , ce qui réduira les effets systémiques non souhaitables tout en augmentant l'effet local. Cependant, cette approche est sujette à caution car elle nécessite l'administration d'ADN exogène (Par exemple avec injection d'adénovirus recombinant codant pour l'IFN- $\beta$ ) chez des sujets humains, ce qui ne semble pas dénué de risque ; (ii) un traitement synergique qui ciblerait des voies de signalisation aboutissant à une réduction de l'expression de cytokines pro-inflammatoires, et serait combiné à un apport exogène d'IFN- $\beta$  pour réduire le déficit potentiel de cette cytokine induit par le traitement (Vervoordeldonk et al., 2009). Un exemple de thérapie synergique serait l'utilisation d'un inhibiteur d'IKK $\epsilon$  (*Inhibitor- $\kappa$ B kinase  $\epsilon$* ), une protéine impliquée dans la voie NF- $\kappa$ B aboutissant à la production de chimiokines, de MMP et d'IFN- $\beta$ . En effet, il a été montré dans le modèle d'arthrite STA K/BxN que le déficit d'IKK $\epsilon$  induisait une légère réduction des symptômes et que le traitement avec des quantités très faible d'IFN- $\beta$  (inefficaces chez les souris sauvages) améliorerait considérablement l'état des souris. La figure 8 représente un schéma d'un potentiel effet synergique (Corr et al., 2009).





**Figure 8 : Nouvelle stratégie thérapeutique synergique avec l'utilisation de concentrations subthérapeutiques d'IFN- $\beta$  en association avec un inhibiteur spécifique de IKK $\epsilon$  (Vervoordeldonk et al., 2009)**

### 2.5.2. Rôle des IFNs de type II, IFN- $\gamma$

Comme l'IFN $\gamma$  est connue pour être la cytokine associée à la voie T<sub>H</sub>1, ce sujet est déjà traité dans la partie : Rôle des T<sub>H</sub>1 dans la PR aux pages 16, 17 et 18.

### 2.5.3. Rôle des IFNs de type III, IFN- $\lambda$

Les IFNs de type III, IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2 et IFN- $\lambda$ 3 (ou respectivement IL-29, IL-28A et IL28B), ont surtout été étudiés pour leurs effets antiviraux et leur rôle dans les maladies auto-immunes/auto-inflammatoires reste encore largement inexploré. L'IFN- $\lambda$ 1 (IL-29) est la cytokine principale de cette famille produite chez l'Homme; elle n'est pas retrouvée chez la souris où l'IFN- $\lambda$ 2 (IL-28A) joue un rôle majeur. Leurs voies de signalisation sont similaires à celles induites par les IFNs de type I (avec l'utilisation de STAT1/2, *Signal Transducer and Activators of Transcription*), suggérant des effets immuno-modulateurs potentiels pour les IFNs de type III.

Une étude évaluant le rôle de l'IL-28A dans le modèle de CIA a montré un effet protecteur de cette cytokine quand elle est injectée en intra péritonéal aux premiers signes de la pathologie (Blazek et al., 2015). Ce résultat est constaté par la réduction du score clinique et du gonflement des pattes et par une diminution de l'infiltrat cellulaire articulaire, de l'épaississement de la membrane synoviale et de la détérioration de l'articulation. De plus, l'action effectrice de cette molécule semble passer par un effet local, en réduisant les T<sub>H</sub>17 et les LT $\gamma\delta$ , ce qui réduit les niveaux des transcrits codant l'IL-17, l'IL-23p19 et l'IL-1 $\beta$ . Mais l'effet le plus flagrant reste l'inhibition de l'infiltration des neutrophiles dans l'articulation. Les neutrophiles, qui expriment le récepteur à l'IL-28A, sont documentés pour leur implication pathologique dans ce modèle d'arthrite. La liaison de l'IL-28A sur son récepteur provoque l'inhibition de la migration des neutrophiles (Blazek et al., 2015).

Les trois types d'IFNs n'ont jamais montré, à ce jour, une efficacité suffisamment convaincante chez l'Homme. En conséquence, les protocoles et les stratégies thérapeutiques visant à leur utilisation, ne sont pas arrivés à l'étape de validation finale pour un usage clinique. Néanmoins, une meilleure compréhension de leur mode d'action, des posologies plus adaptées, un ciblage plus localisé, une sélection plus précise des sous-types d'IFNs efficaces, l'utilisation synergique avec d'autres molécules complémentaires ou même une meilleure caractérisation des patients sur lesquels les essais sont effectués, pourraient sans doute apporter de meilleurs résultats cliniques.



Introduction

Chapitre II :

Les cellules

dendritiques

plasmacytoïdes



## Chapitre II : Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs)

### 1. Les cellules dendritiques, généralités

Les cellules dendritiques (DCs) ont été découvertes par Ralph Steinman et Zanvil Cohn dans les années 1970 (Steinman and Cohn, 1973, 1974) (prix Nobel de physiologie et de médecine attribué à Ralph Steinman en 2011). Les DCs constituent une population cellulaire hétérogène. Celle-ci dérive d'un progéniteur commun CDPs (*common dendritic cells progenitor*) au niveau hématopoïétique qui exprime les marqueurs phénotypiques suivants :  $\text{Lin}^- \text{c-kit}^{\text{int}} \text{Flt3}^+ \text{Csf-1R}^+$  (Naik et al., 2007; Onai et al., 2007).

Les cellules dendritiques font partie des cellules présentatrices d'antigène (CPA). Elles ont d'ailleurs principalement été étudiées pour cette particularité, d'où leur appellation de « CPA professionnelles ». Elles sont présentes en faible quantité dans le sang (1 à 5% des cellules sanguines) et sont retrouvées dans différents tissus lymphoïdes et non lymphoïdes. Elles possèdent la capacité de phagocytter des particules / antigènes (Ags) (bactéries, virus, allergènes, etc.), puis de présenter les peptides antigéniques aux LTs. La reconnaissance du peptide antigénique, associé en général au CMH II (complexe majeur d'histocompatibilité de classe II), par le TCR (*T cell receptor*) des lymphocytes T va alors permettre le déclenchement d'une réponse immunitaire adaptative.

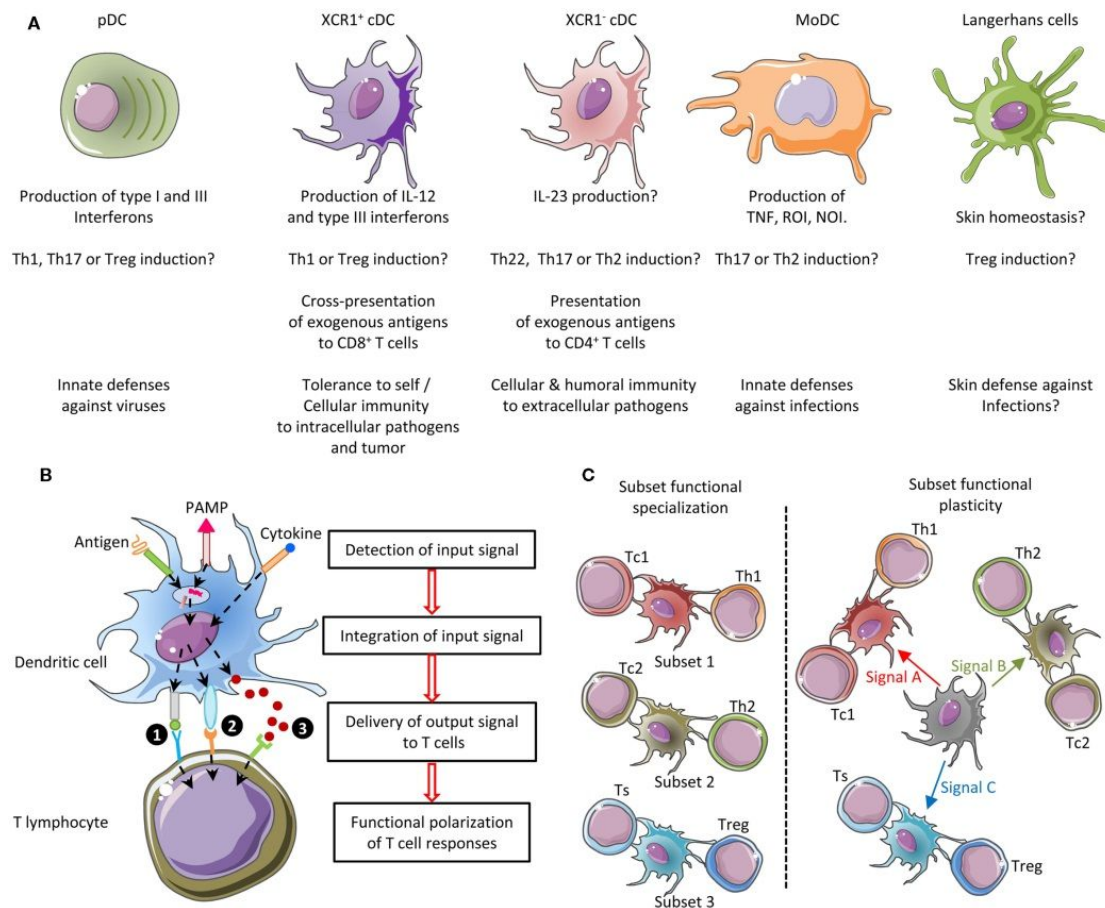
Parmi les sous populations qui sont actuellement caractérisées phénotypiquement (par leur morphologie et la présence de marqueurs de surface), on retrouve : (i) les cellules de Langerhans (LCs), décrites pour la première fois par Paul Langerhans en 1868 (Langerhans, 1868), (ii) les cellules dendritiques conventionnelles qui incluent 2 sous-types  $\text{XCR1}^+ \text{cDC}$  et  $\text{XCR1}^- \text{cDC}$  (Dorner et al., 2009) (Crozat et al., 2010), (iii) les cellules dendritiques dérivées de monocytes (MoDC) (Steinbach et al., 1995) et (iv) les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs), qui ressemblent morphologiquement aux lymphocytes plasmacytoïdes (plasmocytes) et qui secrètent de grandes quantités d'IFN de type I en réponse aux infections virales (Siegal et al., 1999) (Cella et al., 1999). Des fonctions différentes ont été attribuées à ces différentes populations (Vu Manh et al., 2015). (Figure 9).

Les cellules de Langerhans (LCs) sont une catégorie de DCs qui résident dans l'épiderme. Elles représentent 3-5 % des cellules de l'épiderme ( $700 \text{ LCs}/\text{mm}^3$ ) (Merad et al., 2008). Leur apparence morphologique montre la présence de dendrites. Elles expriment particulièrement la langerine (CD207), à un niveau faible le CMH II et à un niveau intermédiaire le CD11c (Merad et al., 2013). Elles possèdent comme toutes les autres DCs la

capacité de phagocyter des particules et de présenter les Ags associés à leurs molécules de CMH de classe II aux lymphocytes T effecteurs.

Les cDCs incluent plusieurs sous populations distinctes de cellules dendritiques dont les plus connues actuellement sont les cDC XCR1<sup>+</sup> et les cDC XCR1<sup>-</sup>. Les cDC XCR1<sup>+</sup> sont particulièrement efficaces pour la présentation croisée d'Ag (*cross presentation*) aux LT CD8<sup>+</sup>, du moins chez la souris (Croizat et al., 2010). Les cDC XCR1<sup>-</sup> sont, quant à elles, plus efficaces pour la présentation des Ags aux LT<sub>H</sub> CD4<sup>+</sup>, particulièrement pour des polarisations de type T<sub>H</sub>2 et T<sub>H</sub>17 et la promotion de la réponse humorale (Vu Manh et al., 2015). Les MoDC sont dérivées de la population monocytaire. Elles peuvent aussi avoir un rôle phagocytaire et de présentation d'Ag (Steinbach et al., 1995).

Le contexte inflammatoire peut induire une modification dans la fonction des cDCs. De plus leur fonction de présentation d'Ag aux LTs est tributaire d'un ensemble de signaux qui sont : (i) la présence et la nature des molécules de co-stimulation ; (ii) La fonction des cytokines au site de l'interaction ; (iii) La nature et/ou l'origine du peptide antigénique complexé à la molécule du CMH de classe II. Ainsi, lors de la présentation antigénique, si les DCs expriment le CD86 dans un contexte marqué par la présence d'IL-12, une réponse immunogénique du LT sera induite. En revanche, la présence de PD-L1 (*programmed death-ligand 1*) à la surface des DCs, ainsi que d'IL-10 dans l'environnement semble conduire vers une réaction plutôt tolérogénique (Vu Manh et al., 2015).



**Figure 9 : Classement des différentes populations de DCs par rapport à leurs fonctions, leur morphologie et les marqueurs de surface (Vu Manh et al., 2015)**

Les DCs ne sont pas toujours évidentes à distinguer les unes des autres. La cytométrie en flux permet certes une première discrimination (Tableau III), mais les chevauchements de plusieurs marqueurs de surface communs rendent la séparation des sous-populations complexe. Pour des études plus précises, il existe actuellement de nouvelles méthodes basées sur le profilage moléculaire (au niveau d'une population ou même au niveau cellulaire)(Vu Manh and Dalod, 2016). L'ontogénie ou leur fonction peut aussi permettre cette discrimination (Merad et al., 2013) (Vu Manh et al., 2015).

Les DCs sont décrites comme étant les seules cellules capables d'induire une activation efficace des LT CD4<sup>+</sup> naïfs (Merad et al., 2013). Elles présentent aussi des antigènes (Ag) du soi pour induire une tolérance (Klein et al., 2009). Ces propriétés fonctionnelles sont dues à plusieurs caractéristiques :

1. Une localisation à l'état basal dans les tissus non-lymphoïdes et dans la zone marginale de la rate où elles peuvent en priorité rencontrer les Ags.



2. Une machinerie cellulaire adaptée à la dégradation et à la présentation des Ag (l'apprêtage ou *processing*)
3. Après leur rencontre avec l'Ag, elles détiennent la capacité de migrer dans les ganglions lymphatiques (GLs) au niveau de la zone T.
4. Une capacité à augmenter leur production de molécules du CMH de classe II post-activation.
5. Une capacité unique à induire une réponse des LT naïfs (Merad et al., 2013).

**Tableau III :** Marqueurs de surface des différentes populations de DCs à l'état basal (Alexandre et al., 2014)

Name	Markers
XCR1 <sup>+</sup> cDC**	Lin <sup>-</sup> CD11b <sup>-</sup> CD11c <sup>high</sup> XCR1 <sup>+</sup> CD24 <sup>+</sup> CD8α <sup>+/-</sup> CD103 <sup>+/-</sup>
CD11b <sup>+</sup> cDC	Lin <sup>-</sup> CD64 <sup>-</sup> MerTK <sup>-</sup> CD11c <sup>high</sup> CD11b <sup>+</sup>
pDC	Lin <sup>-</sup> CD11b <sup>-</sup> CD11c <sup>int</sup> Bst2 <sup>+</sup> SiglecH <sup>+</sup>
Classical monocytes/ MDSC/MoDC***	Lin <sup>-</sup> MerTK <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup> Ly6C <sup>high</sup> CCR2 <sup>+</sup> CD64 <sup>+/low</sup>
Non-classical monocytes	Lin <sup>-</sup> MerTK <sup>-</sup> Ly6C <sup>-/low</sup> CD11b <sup>+</sup> CX3CR1 <sup>high</sup>
LC	Lin <sup>-</sup> CD11c <sup>+</sup> CD24 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD207 <sup>high</sup>

## 2. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs), généralités

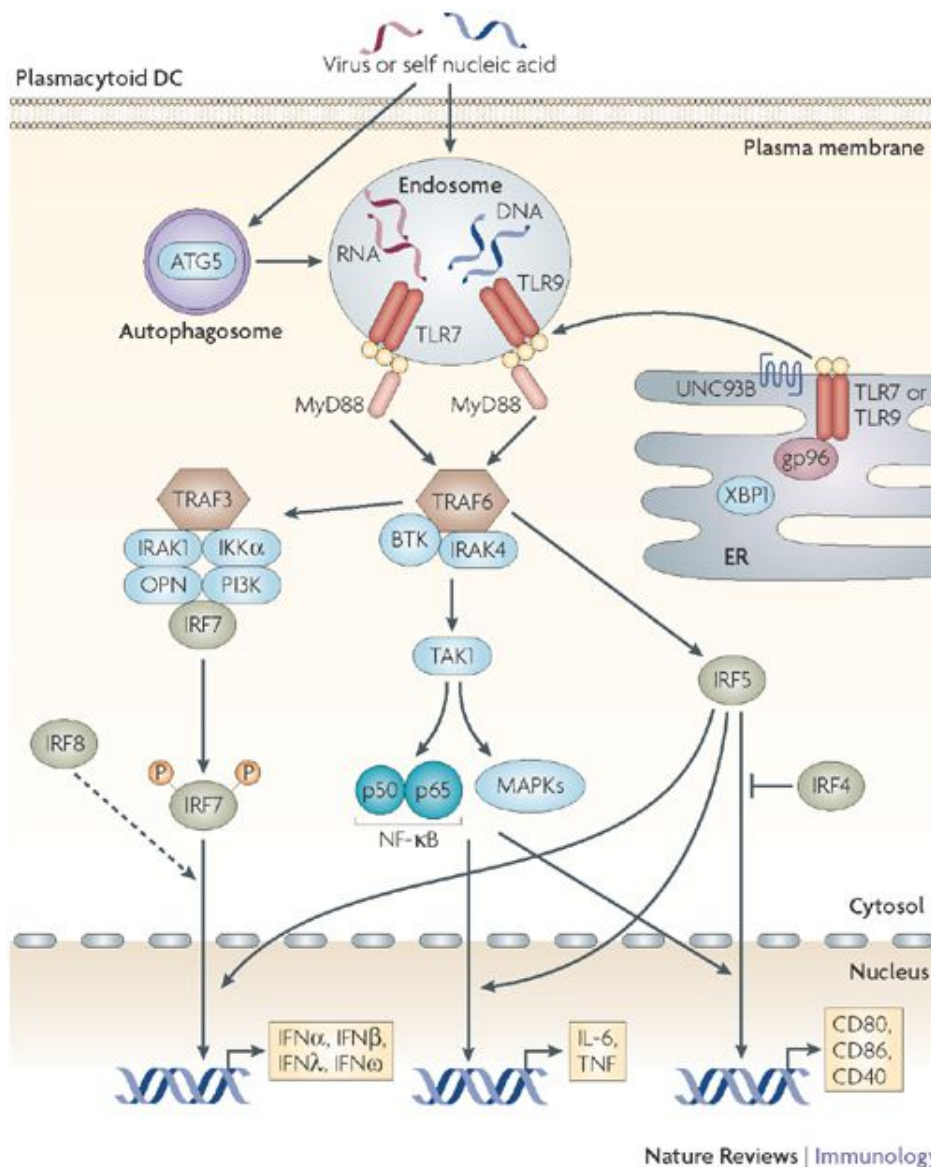
Les pDCs représentent l'autre sous type bien décrit parmi les populations de DCs. Elles constituent une population rare (0.3 à 0.5 % dans le sang chez l'Homme et dans les organes lymphoïdes chez la souris). Phénotypiquement et fonctionnellement, les pDCs murines et humaines sont très semblables. Leur morphologie est ronde et proche de celle des plasmocytes et leur niveau d'expression du CMH de classe II et de molécule de co-stimulation est relativement faible en comparaison aux cDCs (Liu et al., 2007) (Reizis et al., 2011).

Initialement plusieurs noms furent donnés à cette population : précurseur DC de type 2 (Pre-DC2), monocytes plasmacytoïdes ou encore cellules productrices d'IFN (IPC). Finalement, les équipes de Liu et de Colonna ont apporté les preuves indiquant que toutes ces cellules appartiennent à un seul et même type cellulaire (Siegal et al., 1999) (Cella et al., 1999). Cependant, au début des années 2000, il est possible de retrouver différentes appellations comme « P-preDCs » ce qui signifie en français : « Précurseur Plasmacytoïde de Cellules Dendritiques ».

Le taux de renouvellement des pDCs à l'état physiologique est faible et leur durée de vie est ainsi relativement longue (environ deux semaines). Comme le montre un test d'intégration de BrdU (Bromodésoxyuridine) *in vivo* chez la souris, le pourcentage de pDCs qui intègre le BrdU (cellules nouvelles) dans la rate reste très faible : 10% à 3 jours contre 90% pour les cDCs. Pour atteindre le même pourcentage (90%) dans les pDCs, il faut attendre 14 jours. Ce taux de renouvellement des pDCs est un peu augmenté dans le sang à l'état basal et dans la rate de souris qui reçoivent des injections de CpG (Cytosine-phosphate-Guanosine), où il atteint 40% respectivement à 3 jours et 5 jours. (O'Keeffe et al., 2002).

Les pDCs sont des cellules spécialisées dans la réponse antivirale. Elles produisent massivement et rapidement de l'IFN de type I (200 à 1000 fois plus que tout autre type de cellules) et cela en réponse à des acides nucléiques, en particulier l'ARN ou l'ADN, d'origine virale. Leur réponse est essentiellement déclenchée par l'activation du TLR7 et/ou du TLR9. Plusieurs type d'IFN-I sont sécrétés par les pDCs, dont l'IFN $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ ,  $\omega$ ,  $\lambda$  (Ito et al., 2006). Cette capacité sécrétoire reste partiellement inexplicée. Cependant, il existe des éléments de réponse, comme le facteur de transcription XBP-1 (*X-box binding protein 1*), qui est présent chez les pDCs et les empêche de rentrer en apoptose à cause du stress causé par l'accumulation de protéines dans le réticulum endoplasmique (Iwakoshi et al., 2007). Un autre élément est la présence de niveaux élevés d'IRF7 (interferon regulatory factor 7) de façon

basale chez les pDCs. Cette caractéristique est due à une réduction des répresseurs traductionnel d'IRF7 à savoir 4E-BP1 et 4E-BP2 (Colina et al., 2008). L'IRF7 est un facteur de transcription primordial pour la production rapide d'IFN de type I (Izaguirre et al., 2003). La présence abondante du récepteur aux IFN de type I (IFNAR) chez les pDCs constitue aussi un argument expliquant leur forte capacité à produire des IFN de type I. En effet, une boucle d'activation positive est induite dans ces cellules lors de la détection d'IFN de type I, ce qui augmente considérablement le nombre de cellules productrices et la quantité d'IFN-I produite (Kumagai et al., 2009). Comme déjà mentionné, la production d'IFN-I est induite essentiellement par l'activation des TLR endosomaux (TLR7/9), qui sont surexprimés par les pDCs par rapport aux autres types cellulaires (Kadowaki et al., 2001). Le TLR7 détecte des fragments d'ARNs viraux riches en guanosine ou en uridine, ainsi que des composants synthétiques comme les imidazoquinolines (l'imiquimod, le risiquimod (R848), le gardiquimod) (Guery and Hugues, 2013). Le TLR9, quant à lui, reconnaît plutôt les ADN simples brins contenant des motifs CpG (Cytosine-phosphate-Guanosine) non méthylés, fréquemment retrouvés dans les génomes bactériens et viraux, ou d'autres oligodéoxynucléotides (ODN) (Guery and Hugues, 2013). L'engagement du TLR7 entraîne l'activation par phosphorylation d'IRF7 via une voie de signalisation mobilisant l'adaptateur MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) (Honda et al., 2005). L'activation de cette protéine adaptatrice déclenche une cascade de signalisation impliquant IRAK-4 (*interleukine 1 receptor-associated kinase 4*), TRAF-6 (*TNF receptor-associated factor 6*), et Btk (*Bruton's tyrosine kinase*). Cela induit la formation d'un autre complexe formé par TRAF-3/ IRAK-1/ IKK- $\alpha$ / OPN et PI<sub>3</sub>K. En conséquence IRF7 est phosphorylé et transloque vers le noyau où il initie la transcription des gènes d'IFNs. TRAF-6 possède aussi le potentiel d'activer NF- $\kappa$ B et d'autres voies dépendantes des MAPKs (*Les Mitogen-activated protein kinases*), ce qui peut conduire à la production d'autres cytokines et à l'expression de molécules de co-stimulation (voir figure 10) (Gilliet et al., 2008).



**Figure 10 : Signalisation des récepteurs surexprimés dans les pDCs par rapport aux autres DCs (Gilliet et al., 2008).**

Ces signalisations peuvent aussi être régulées par des facteurs de nature épigénétique, comme les micro-ARNs (miR). Le miR-126 a ainsi été décrit comme ayant un rôle dans la survie et la fonction des pDCs, en ciblant la voie mTOR (dont le rôle sera décrit dans la partie ontogenèse de pDCs (pages 55 et 56, Figure 14) et en régulant l'expression de gènes comme *Tlr7* et *Tlr9*. D'ailleurs, chez les souris invalidées pour miR-126 (*miR-126<sup>-/-</sup>*), l'homéostasie et la réponse aux ligands de TLRs se trouvent perturbées, ce qui indique que ce micro-ARN participe à l'induction des IFN-I. D'autre part, l'expression de miR-146a est détectée lors de l'activation du TLR7 et TLR9 et cela réduit l'engagement de la voie NF-κB en aval de l'activation des TLRs dans les pDCs. Quant aux miR-155 et miR-155\* (pour la définition de

« \* » voir l'encadré ci-après), ils sont exprimés dans les pDCs suite à l'activation du TLR7, et semblent avoir des rôles opposés sur la production de IFN-I. Le miR-155\* est régulé à la hausse très tôt suite à l'activation du TLR7 et son effet consiste à inhiber IRAK3 (*interleukin-1 receptor-associated kinase 3*), ce qui aboutit à l'amélioration de la production d'IFN-I. *A contrario*, le miR-155 apparaît de façon plus tardive et régule à la baisse la production d'IFN-I par le ciblage de TAB2 (*TGFβ-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 2*) (Swiecki and Colonna, 2015).

**Brin *star* « \* » des micro-ARNs : Il est admis que la forme *star* « \* » possède l'énergie de liaison à l'ARNm la plus faible des deux brins constituant le duplex miR, généralement il n'est pas intégré au complexe RISC, et va donc être dégradé. C'est pour cette raison qu'il est le brin le moins abondant des 2 dans la cellule. Cependant, il peut aussi être fonctionnel comme il est décrit dans l'étude de Yang et al., 2011.**

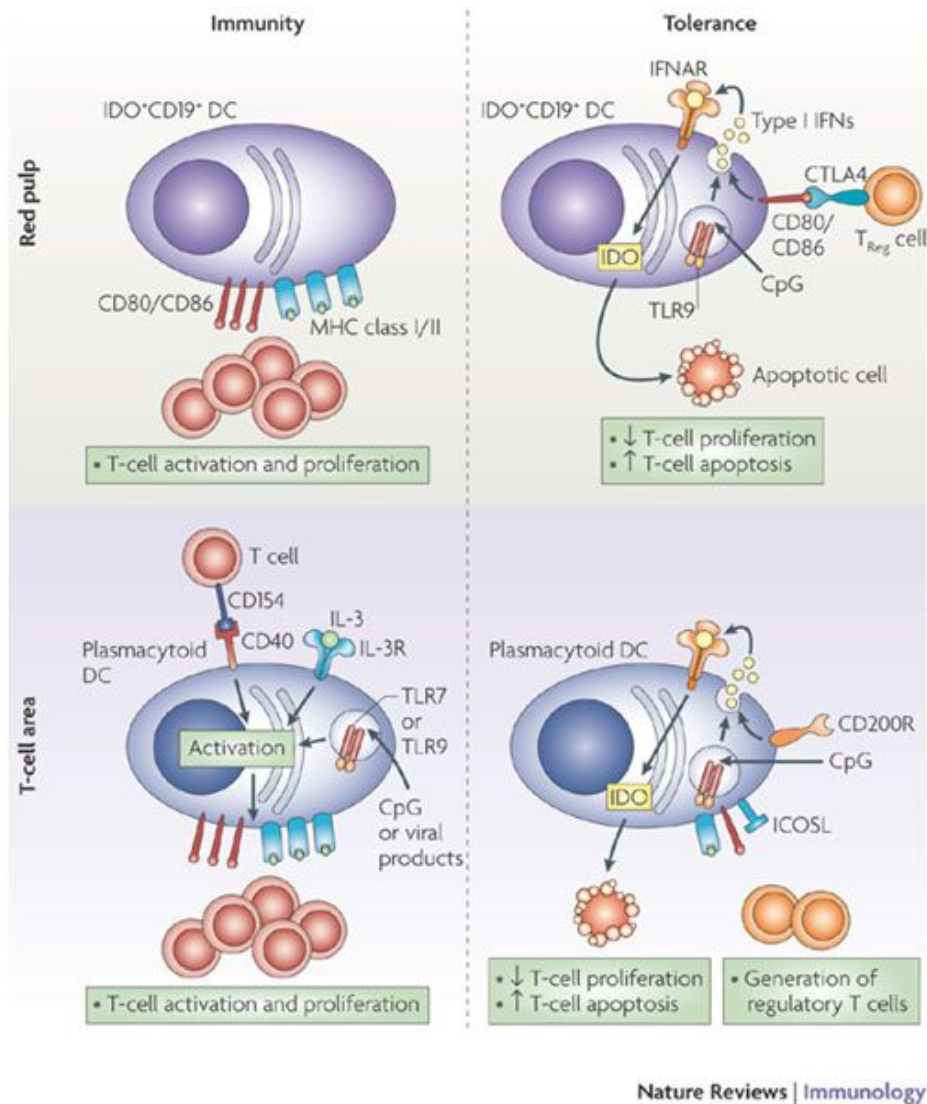
Les pDCs possèdent aussi la propriété d'induire une réponse immunitaire par le biais de l'activation des LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques, car elles peuvent leur présenter l'Ag complexé au CMH de classe I. Cette capacité est même maintenue chez les pDCs déjà activées (par des stimulus), et qui rencontrent par la suite des Ags viraux (Young et al., 2008). Elles possèdent aussi la capacité de présenter des Ags aux LT CD4<sup>+</sup> (Guéry and Hugues, 2013; Liu, 2005; Young et al., 2008). D'ailleurs, ce processus de présentation de l'Ag aux LT CD4<sup>+</sup> est fondamentalement différent entre les cDCs et les pDCs. Les pDCs montrent un maintien de la production de molécules du CMH de classe II longtemps après leur activation, contrairement aux cDCs. Le système d'ubiquitination du CMH de classe II est, lui aussi, maintenu chez les pDCs, ce qui accélère son renouvellement. Cela réduit la capacité des pDCs à présenter les Ags extracellulaires (temps d'exposition court) mais augmente l'efficacité de présentation des motifs viraux intracellulaires. Cette différence permet aux DCs de couvrir un large panel de motifs du « non-soi » qui peuvent ainsi être efficacement présentés aux LT CD4<sup>+</sup> naïfs (Young et al., 2008). Les pDCs peuvent aussi avoir le potentiel d'induire une réponse LT<sub>H</sub>17. Dans un contexte tumoral, les pDCs, chargées avec un Ag tumoral et qui sont activées par du CpG, induisent la différenciation/activation des LT<sub>H</sub>17 au niveau des ganglions lymphatiques distaux. Les LT<sub>H</sub>17 ainsi activés sont recrutés au site tumoral et participent *in situ* à la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires qui *in fine* réduisent la croissance tumorale (Guéry and Hugues, 2015).

Paradoxalement, les pDCs montrent aussi des fonctions tolérogéniques par la déplétion des LT CD8<sup>+</sup> et l'anergie des LT CD4<sup>+</sup>. En effet les pDCs humaines isolées sont capables d'induire une anergie des LT CD4<sup>+</sup> (Kuwana, 2002). Chez la souris, une déplétion des pDCs induit une hypersensibilité des LT CD8<sup>+</sup> à l'encontre des Ags oraux, alors que le transfert adoptif des pDCs immatures chargées avec les mêmes Ags semble réduire les réponses immunogéniques des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> spécifiques. Cela suggère que la tolérance orale serait régulée par les pDCs et que ce mécanisme est dépendant de la présentation antigénique (Goubier et al., 2008; Guery and Hugues, 2013). Les mêmes constatations ont été retrouvées chez le rat. Dans le contexte du rejet de greffe cardiaque, les pDCs paraissent compétentes dans l'inhibition des LT CD4<sup>+</sup> et cela, soit par une action directe médiée parIDO (indolamine 2, 3-dioxygénase), soit par une action indirecte médiée par l'induction de LT reg CD8<sup>+</sup> (Guery and Hugues, 2013; Li et al., 2010). Des fonctions d'induction de la tolérance centrale peuvent aussi être attribuées aux pDCs, car les pDCs périphériques CCR9<sup>+</sup> possèdent la capacité de migrer vers le thymus pour participer à la tolérance centrale en présentant des Ag, du moins chez la souris (Hadeiba et al., 2012). Ces mêmes cellules (pDCs CCR9<sup>+</sup>), toujours chez la souris, peuvent induire la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> en LTreg producteurs d'IL-10 *in vitro*. Les cellules ainsi induites inhibent la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> effecteurs et leur production de cytokines pro-inflammatoires. De plus, dans la même étude, les auteurs arrivent à démontrer *in vivo* que ce processus inhibe la réponse du greffon contre l'hôte (GvHD) dans un modèle murin (Hadeiba et al., 2008). Dans une autre étude récemment publiée, les auteurs ont utilisé des souris transgéniques qui expriment le récepteur BDCA-2 (CD303) spécifiquement à la surface des pDCs. Chez ces dernières, un adressage antigénique ciblant les pDCs est réalisé par le biais du couplage des Ags avec des Ac anti-BDCA2, ce qui résulte en une induction de la tolérance aux Ags utilisés *in vivo*. Cela a été constaté grâce à la réduction des Acs et des LT CD4<sup>+</sup> Ags spécifiques, qui est accompagnée d'une augmentation des LTregs autologues correspondant, dont le rôle est important. D'ailleurs, la déplétion des LTregs a annihilé l'effet régulateur constaté (Chappell et al., 2014). Cette induction des LTreg a déjà été montrée auparavant chez l'Homme, dans des travaux où les auteurs ont travaillé sur des pDCs humaines isolées puis activées par des ODN-CpG. Dans cette étude, les CpG, aussi bien de type A, B ou C, induisent une activation des pDCs qui à leur tour, provoquent une différenciation des LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en LTreg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> par un système de contact cellulaire (Moseman et al., 2004). Ces cellules ainsi induites présentent les caractéristiques typiques des LTreg, à savoir : la présence du facteur de transcription Foxp3, la sécrétion d'IL-10, une hyposensibilité aux stimuli antigéniques et une forte capacité à inhiber la prolifération des LT

CD4<sup>+</sup> autologues et allogéniques de façon aspécifique de l'Ag (Moseman et al., 2004). Toujours chez l'Homme, ce mécanisme a été expliqué quelques années plus tard en démontrant que l'activation par un stimulus, aboutissant au processus de présentation antigénique aux LT, est intrinsèquement différente entre les cDCs et les pDCs. Dans le phénomène d'activation de ces 2 types cellulaires, on retrouve une augmentation des molécules de co-stimulation CD80 et CD86. Cependant, seules les pDCs régulent positivement l'expression de la molécule de co-stimulation ICOS-L (inductible costimulator ligand) (Ito et al., 2007). Cette dernière est directement impliquée dans la capacité des pDCs activées à engendrer une différenciation des LT CD4<sup>+</sup> naïfs en LTreg producteurs d'IL-10 (Akbari et al., 2002). Dans une étude publiée ultérieurement, la même capacité à induire des LT reg fut attribuée aux pDCs provenant de patients atteints de PR en rémission. Les auteurs ont pu démontrer *ex vivo* (et ainsi déduire *in vivo*) que dans ce cas de figure particulier, cette capacité semblait passer par une production d'IDO par les pDCs et non pas par une action dépendante d'ICOS-L (*Inducible T-cell COStimulatorligand*) ou de PD-L1 (*Programmed cell death-ligand 1*). Pour cela, les auteurs se sont basés sur un système de co-culture pDCs-LT en présence ou en absence d'un inhibiteur spécifique d'IDO, le 1-MT1 (*Methyl-DL-tryptophan*). La co-culture pDCs-LT en présence de 1-MT provoque une moins forte inhibition des LT effecteurs et une réduction limitée de la production d'IL-10 par rapport à celle constatée en absence de 1-MT. Aucun effet direct sur le taux de LTreg n'a toutefois été démontré (Kavousanaki et al., 2010). Il est à signaler que l'IDO, en plus d'avoir une action enzymatique directe sur les cellules avoisinantes, est aussi retrouvé dans la signalisation en aval du TGF- $\beta$  dans les pDCs. Cette cascade impliquant l'IDO pourrait aussi partiellement expliquer l'effet tolérogénique constaté (Pallotta et al., 2011). Pour finir, le rôle des pDCs dans la tolérance centrale par l'induction de LTreg au niveau du thymus est aussi retrouvé chez l'Homme. Dans une étude sur la tolérance centrale, les auteurs arrivent à identifier des pDCs au niveau du thymus humain. Ces pDCs, co-localisent et induisent la différenciation des LTreg naturels (nTreg, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) à partir de LT post sélection positive (LT CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD69<sup>high</sup>TCR<sup>high</sup>). Cela semble être déclenché par l'activation de pDCs via l'axe CD40L-CD40 en présence d'IL-3, ce qui engendre l'expression de CD80/86 à la surface des pDCs et participe à l'induction des nTreg. Les LTreg ainsi produits ont un fort potentiel de production d'IL-10 et de TGF- $\beta$  (Martín-Gayo et al., 2010).

Ainsi, il semble bien y avoir un effet des pDCs dans les systèmes de régulation de l'inflammation et de la tolérogénèse en général. Cela est renforcé par leurs capacités à générer des LTreg dans certaines conditions. Néanmoins, les mécanismes exacts qui sont mis en jeu

s'avèrent encore incertains. La figure 11 ci-après résume partiellement les mécanismes précédemment cités (Morelli and Thomson, 2007).



**Figure 11: Différentes voies d'induction de la tolérance par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (Morelli and Thomson, 2007)**

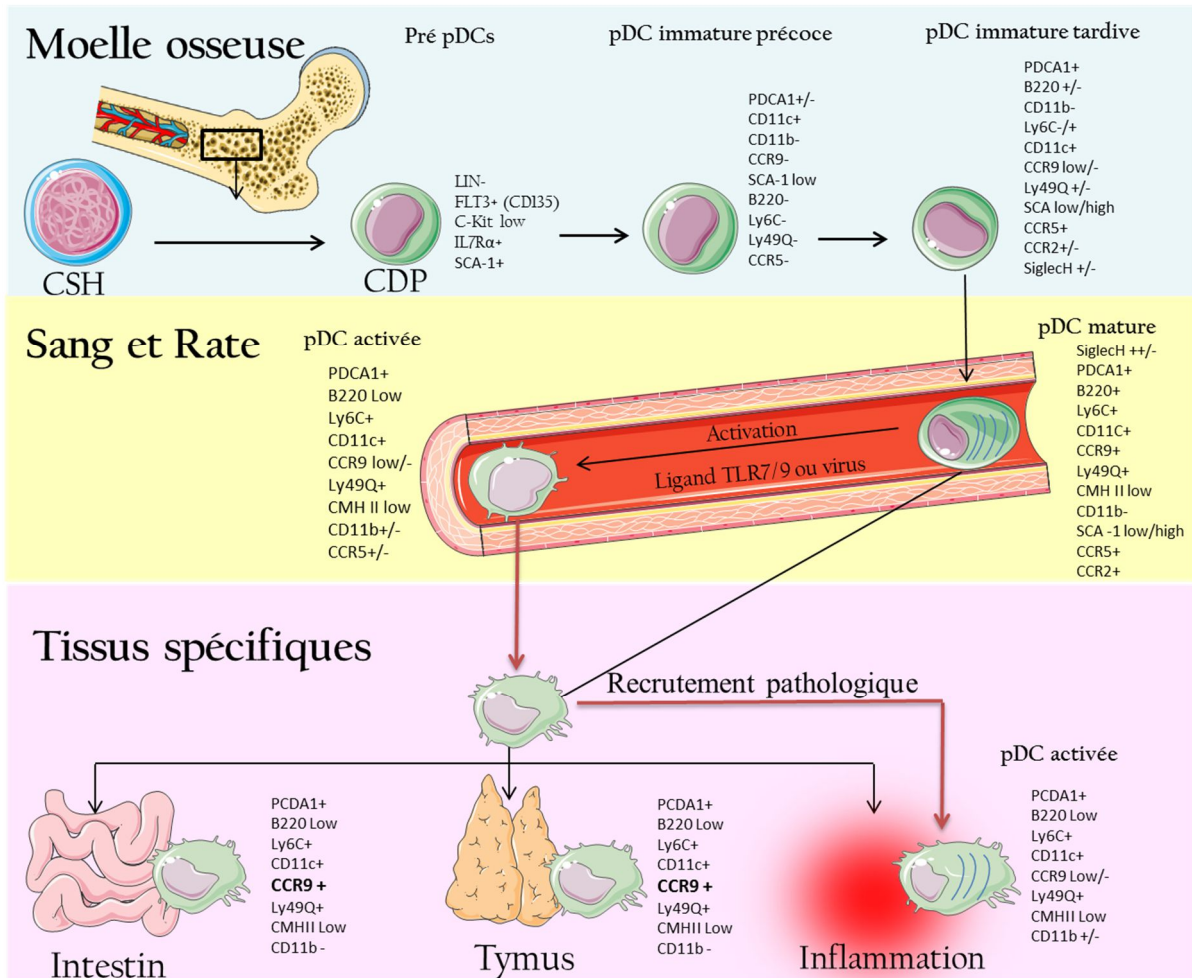
### 3. Les marqueurs de surfaces des pDCs

En termes de marqueurs de surface, les pDCs ne possèdent pas un marqueur seul et unique qui permettrait de les définir spécifiquement et c'est plutôt une combinaison de marqueurs qui les discrimine. Les pDCs murines sont censées présenter traditionnellement un phénotype CD11c<sup>+</sup>, CD45R<sup>+</sup>(B220), CD45RA<sup>+</sup>, PDCA-1<sup>+</sup>(CD317), Siglec-H<sup>+</sup>, Ly6C<sup>+</sup>,



Ly49Q<sup>+</sup> et CCR9<sup>+</sup> (Onai et al., 2007) (Wendland et al., 2007) (Kamogawa-Schifter et al., 2005). Certains de ces marqueurs sont associés plus spécifiquement à des états cellulaires précis : Ly6C et Ly49Q correspondent à un état mature des pDCs (Omatsu et al., 2005; Vremec et al., 2007). D'ailleurs, dans l'étude qui a établi la présence de Ly49Q chez les pDCs mais pas chez les NK ou les autres sous types de DCs, les auteurs ont montré que, dans la moelle osseuse, coexistent deux sous populations de pDCs Ly49Q<sup>+</sup> et Ly49Q<sup>-</sup>, avec des capacités de réponse à certains Ag inégales, comme dans le cas du virus de la grippe. Cette diversité n'est cependant pas retrouvée dans la périphérie (sang, ganglions lymphatiques et rate) où les auteurs ont retrouvé principalement des pDCs Ly49Q<sup>+</sup> à l'état basal (Kamogawa-Schifter et al., 2005). Siglec-H semble plutôt être présent à un état précoce et posséder une fonction de récepteur endocytaire (Zhang et al., 2006). Quant au PDCA-1 (BST-2, CD317), peut être le marqueur le plus spécifique, on lui attribue la fonction d'empêcher le relargage de virions par leur rétention à la surface cellulaire suivi d'une endocytose (Neil et al., 2008). CCR9 semble avoir de nombreux rôles, parfois contradictoires, au vu des études réalisées. Sa présence a pu être liée à un état mature dans le développement physiologique des pDCs (les pDCs CCR9<sup>-</sup> sont des précurseurs de pDCs et potentiellement de cDCs (Schlitzer et al., 2012)) ou bien à un état non activé, (immature dans le sens non activé par un stimuli) avec des fonctions tolérogéniques (mobilisation des pDCs CCR9<sup>+</sup> périphériques au niveau thymique et capacité à induire les LTreg *in vitro*). Il semble même que l'expression de CCR9 soit réduite lors de l'activation des pDCs par des agonistes de TLR7 et 9 (Hadeiba et al., 2008, 2012). Enfin le CCR9 est un récepteur à la chimiokine CCL25, ce qui participe à la mobilisation des pDCs CCR9<sup>+</sup> au niveau de l'intestin grêle (Wendland et al., 2007). Tous ces résultats pris ensemble suggèrent, à mon avis, qu'il existe un état initialement immature des pDCs CCR9<sup>-</sup> dans la moelle osseuse, et qu'elles acquièrent ce marqueur au cours de leur développement (du moins pour une partie importante des pDCs). Mais, cette expression peut aussi être perdue après l'activation des TLR7/9 par des mécanismes qui restent encore assez flous pour le moment (Shortman et al., 2013).

L'expression des marqueurs de surface indique des stades de maturation et des étapes d'activation différentes aussi bien dans la moelle osseuse que dans la périphérie et dans les sites de migration des pDCs. Le résumé de l'expression de ces différents marqueurs associés à chaque étape est décrit dans le schéma ci-dessous (Figure 12). Je tiens à faire remarquer que les études citées ne font en général pas la différence entre la maturation physiologique des pDCs (qui ne nécessite aucun stimulus) et une activation *via* la détection d'un stimulus.



**Figure 12 : Schéma simplifié de l'expression des marqueurs exprimés à la surface des pDCs et caractéristiques de leur développement physiologique, de leur activation et de leur localisation tissulaire chez la souris.**

Les pDCs humaines se distinguent habituellement des autres DCs avec les marqueurs BDCA-2<sup>+</sup> (CD303), BDCA4<sup>+</sup> (CD304), ILT-7<sup>+</sup>, IL3Ra (CD123)<sup>+</sup>. Le CD11c est absent chez cette population cellulaire (Reizis et al., 2011). Il faut aussi ajouter le fait que des pDCs activées peuvent être CD2<sup>+</sup> ou CD2<sup>-</sup> (chez l'Homme). Dans le sang humain, les pDCs CD2<sup>high</sup> correspondent à une partie des pDCs activées qui secrètent de l'IFNα et expriment granzyme B et TRAIL (*tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand*) autant que les pDCs CD2<sup>-</sup>. Cependant, les pDCs CD2<sup>high</sup> possèdent un haut potentiel de production d'IL-12p40 ; elles expriment à des niveaux élevés le CD80 et induisent une plus forte prolifération des lymphocytes T naïfs allogéniques. Ce sont aussi les seules à exprimer les lysozymes et elles sont présentes dans les amygdales et les tumeurs (Matsui et al., 2009).

#### 4. Développement des pDCs (ontogénie)

Compte tenu des fonctions diverses et souvent paradoxales attribuées aux pDCs, il n'est pas surprenant de constater qu'elles peuvent suivre différentes voies de développement. De façon similaire aux cDCs, les pDCs peuvent se développer à partir du progéniteur commun dendritique (CDP), un progéniteur distinct de celui des lymphocytes. Cependant, la présence de quelques marqueurs CDP comme Flt3<sup>+</sup>, c-Kit<sup>low</sup> et IL7Rα<sup>+</sup> est commune aussi aux progéniteurs de lymphocytes (Sitnicka et al., 2007). L'origine hématopoïétique précise des pDCs reste pour le moment sujette à discussion, car différentes études établissent des progéniteurs plus ou moins proches des CDP. Dans les paragraphes qui suivent, je vais essayer de donner une vue d'ensemble sur les connaissances actuelles concernant l'origine hématopoïétique des pDCs chez la souris. Je ne mettrai en avant que les faits les plus généralement admis actuellement.

Dans une étude effectuée chez la souris, une double origine pour les pDCs a été constatée (Pelayo et al., 2005). Dans un premier temps, les auteurs se sont intéressés au rendement dans la production de pDCs *in vitro*, en comparant différentes cellules situées au sommet de la hiérarchie hématopoïétique. Ils ont constaté que les progéniteurs précoces lymphoïdes ELPs Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>Hi</sup>Sca-1<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>Flk-2<sup>+</sup> (*Early Lymphoid Progenitors* = ELPs), ainsi que les cellules souches hématopoïétiques SCH Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>Hi</sup>Sca-1<sup>+</sup>RAG1<sup>-</sup>, se montrent très efficaces dans la production de pDCs avec des rendements considérés comme élevés. D'un autre côté, ni les progéniteurs myéloïdes CMP Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>Hi</sup>Sca-1<sup>+</sup>RAG1<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>FcγR<sup>L</sup>, ni les progéniteurs pro-lymphocytes Pro-Ls Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>Lo</sup>Sca-1<sup>+/-</sup>CD27<sup>+</sup>Flk-2<sup>+</sup> (situés en aval des ELPs), ne montrent un rendement comparable (Pelayo et al., 2005).

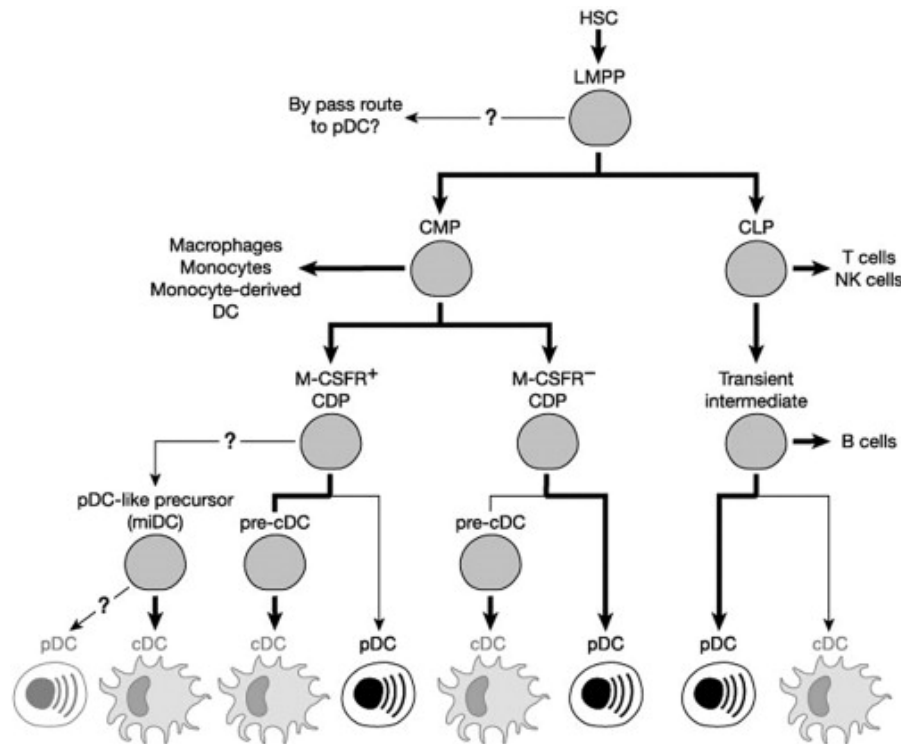
Dans un second temps, les auteurs ont voulu identifier si les pDCs passent par les mêmes étapes de développement quelle que soit leur origine primaire (précurseurs différents). Pour cela ils ont associé l'expression d'une protéine marqueur, la GFP (*Green Fluorescent Protein*), à celle de RAG-1 (*Recombination Activating Gene*). RAG-1 étant associée au développement lymphocytaire uniquement (absent à tous les stades du développement dans les lignées monocytaires). Cela permet de séparer les populations sur la base d'une expression de RAG-1 à un moment donné du développement.

Les auteurs n'ont obtenu qu'une seule population de pDCs GFP<sup>low</sup> lorsque les ELPs RAG1/GFP<sup>+</sup> sont utilisées comme précurseurs, ce qui suggère qu'il n'existe qu'un seul mode de développement à partir du progéniteur utilisé. Cependant, en utilisant le précurseur CSH RAG1/GFP<sup>+</sup>, deux populations de pDCs distinctes ont été obtenues (CD45R/B220<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>

CD11c<sup>L0</sup>Ly-6C<sup>+</sup>) GFP<sup>+</sup> et GFP<sup>-</sup>. Ces deux populations de pDCs expriment de la même façon les transcrits des gènes liés aux lignées lymphoïdes à savoir PU.1<sup>+</sup>, Ikaros, E47<sup>+</sup>, B29/Igβ<sup>+</sup>, GATA-3<sup>+</sup>, Notch1<sup>+</sup>, et TdT<sup>+</sup>, et aucune n'exprime les récepteurs qui indiqueraient une parenté avec les cellules myéloïdes, bien que des traces de l'ARNm correspondant à M-CSFR (*macrophage colony-stimulating factor receptor*) aient pu être détectées chez les pDCs GFP<sup>-</sup>. De plus, seules les pDCs GFP<sup>+</sup> contiennent les transcrits codant RAG1 et les 4 gènes liés à la lignée lymphoïde B : Bcl11a, EBF, mb1/CD79, Pax5, transcrits identiques à ceux qui sont exprimés dans les pro-B, mais à des niveaux plus faibles que chez ces derniers. Les pDCs GFP<sup>+</sup> montrent un réarrangement des chaînes D<sub>H</sub>-J<sub>H</sub>, un réarrangement génétique des Immunoglobulines (Ig), ce qui n'est pas constaté chez les pDCs GFP<sup>-</sup> (Pelayo et al., 2005). Ces résultats indiquent clairement qu'à partir d'un même précurseur, 2 trajets de maturation peuvent produire des pDCs.

Il a aussi été rapporté que le développement des pDCs à partir d'ELPs Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>Hi</sup>Sca-1<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>Flk-2<sup>+</sup> isolés de souris C57BL/6 est inhibé par l'activation des récepteurs de la famille Notch (Pelayo et al., 2005), tout comme la différenciation des LB. Cette activation des récepteurs de la famille Notch semble par contre, favoriser la différenciation des LT à partir de ces mêmes progéniteurs (Pui et al., 1999). Donc en plus des différentes populations qui expriment différemment des marqueurs de surface, s'ajoute une multipolarité de l'origine.

Ces constatations ont été reprises par la suite pour aboutir à une structure hiérarchique où les pDCs peuvent dériver de quasiment n'importe quel progéniteur hématopoïétique. Ceci nous donne le modèle illustré dans la figure 13.



**Figure 13 : Les voies possibles de différenciation hématopoïétiques aboutissant à la production de cellules dendritiques plasmacytoïdes (Shortman et al., 2013)**

#### 4.1. Rôle des cytokines et des facteurs de transcriptions impliqués dans l'ontogénèse des pDCs

Le développement des pDCs ne semble pas nécessiter la présence de RAG1, RAG2, IL7R $\alpha$  ou Pax5, car les souris déficientes en ces protéines produisent un nombre important de pDCs (Pelayo et al., 2005).

Pour rappel :

RAG1 et RAG2 sont impliqués dans la recombinaison V(D)J.

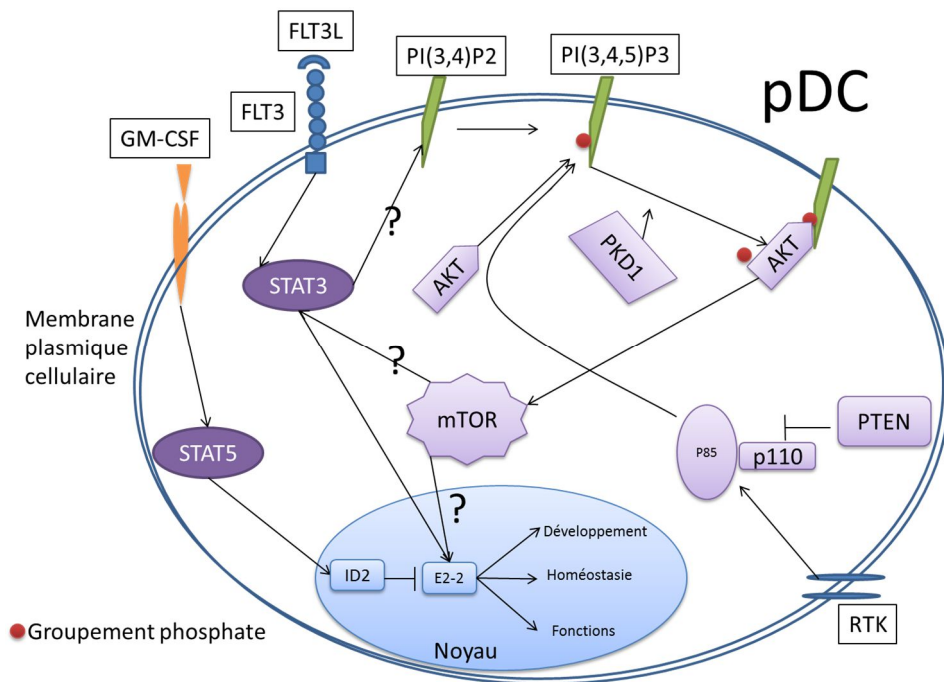
IL7R $\alpha$  est un récepteur activé par IL-7 et TSLP (*Thymique Stromal Lymphopoietin*) qui sont impliqués dans le développement des LT (Pelayo et al., 2005)

Pax5 induit l'engagement des LB et contrôle des évènements ultérieurs à cet engagement (Mikkola et al., 2002).

Il existe pourtant des protéines essentielles au développement des pDCs. FLT3 (*Fms-like related Tyrosine Kinase 3*) qui est le récepteur de la cytokine FLT3L (*Fms-like related Tyrosine Kinase 3 Ligand*) est connu pour jouer un rôle-clé dans la différenciation des pDCs à partir de cellules de moelle osseuse *in vivo* et *in vitro* (D'Amico and Wu, 2003; Gilliet et al., 2002; Waskow et al., 2008). STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) est

indispensable à l'action de FLT3 *in vivo* et *in vitro* dans le processus de genèse des progéniteurs communs des DCs. Comme le montre une étude utilisant des souris STAT3 déficientes (*Stat3*<sup>-/-</sup>), l'absence de cette molécule de signalisation affecte l'action de FLT3L à des concentrations physiologiques avec une réduction des DCs *in vivo* à l'état basal. Cela est aussi vrai quand les souris reçoivent du FLT3L exogène. Cependant, l'action de STAT3 en aval de FLT3 semble spécifique aux progéniteurs des DCs, car d'autres cellules comme les NK, les LT et les LB, répondent normalement au FLT3/FLT3L de façon indépendante de la présence ou de l'absence de STAT3 (Laouar et al., 2003). La suite de la signalisation initiée par la fixation de FLT3L sur son récepteur fait appel à l'activation de la cascade STAT3/PI3-K (phosphoinositide 3-kinase) qui active et recrute la protéine kinase Akt (ou PKB pour Protéine kinase B) qui est phosphorylée par PKD1 (phosphatidylinositol 3-dependent kinase 1). Akt phosphorylée provoque ainsi l'activation de la cible mammalienne de la rapamycine (mTOR). Ce mécanisme aboutit au développement des DCs et en particulier des pDCs. D'ailleurs, l'action du FLT3L sur la production des pDCs est abrogé, dans des cultures *in vitro*, lors de l'utilisation de rapamicine (qui cible mTOR) (Sathaliyawala et al., 2010). (Figure 14)

En outre, cette voie de signalisation a aussi été associée à la capacité de sécrétion de l'IFN-I consécutive à l'activation du TLR9 chez les pDCs (Cao et al., 2008). Cependant, la délétion de l'inhibiteur de la voie mTOR, la phosphatase Pten (*phosphatase and tensin homolog*) qui empêche Akt d'être recrutée par PI3-K, ne régule pas à la hausse la production de pDCs. Par ailleurs, cette délétion de Pten dérégule de façon générale la production de DCs en augmentant globalement leur production (Sathaliyawala et al., 2010). Il est aussi à signaler que la déstabilisation du complexe de signalisation lié à mTOR par l'inactivation de LAMTOR2 (composant du complexe mTORC1 dans les endosomes tardifs/lysosomes), spécifiquement dans les cellules CD11c<sup>+</sup> (incluant les DCs), engendre l'accumulation de FLT3 sur la membrane plasmique. De façon inattendue, les auteurs ont même constaté une augmentation de la signalisation Akt/mTOR en aval de FLT3, qui conduit à l'expansion des cDCs et des pDCs (Scheffler et al., 2014). Ces résultats indiquent nettement une implication de la voie mTOR dans le développement et l'action des pDCs, même si cela n'est pas encore totalement clair.



**Figure 14 : Schéma représentant la voie de signalisation FLT3/ STAT3 / PI3K/ AKT/ mTOR dans les pDCs.**

**RTK** : récepteur à activité tyrosine-kinase ; **PIP2** : Phosphatidylinositol 3,4,5-diphosphate ; **PIP3** : phosphatidylinoditol-3,4,5-triphosphate; **PDK1** : 2 et 3 phosphoinositide dépendent tyrosine kinase 1 et 2 ; **PTEN** : *phosphatase and tensin homologue deleted chromosome 10* ; **PI3K** : phosphatidyl inositol 3-OH-kinase ; **mTOR** : *Mammalian Target Of Rapamycine*

Les facteurs de transcription IRF8 (*interferon regulatory factor 8*) (Schiavoni et al., 2002) et SpiB semblent eux aussi être essentiels au développement des pDCs (Schotte et al., 2004), alors que STAT5 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 5*) s'avère être un inhibiteur du développement des pDCs. La différenciation des pDCs provoqué par l'axe FLT3/FLT3L peut ainsi être bloquée par le CM-CSF *via* l'activation de STAT5 qui réprime la transcription d'IRF8 (Esashi et al., 2008).

Un autre facteur de transcription nommé E2-2 est primordial au développement des pDCs. Ce facteur de transcription fait partie des protéines E de la famille des bHLH (*basic helix-loop-helix*). Cette famille inclut E12, E47 (qui sont codés par le même gène, *E2a*) et HEB qui peuvent former des homo- ou des hétéro-dimères avec d'autres membres de la famille. L'activité des protéines E est inhibée par les protéines Id (Id1- Id4) qui se fixent sur une protéine E pour constituer un hétéro-dimère non fonctionnel.

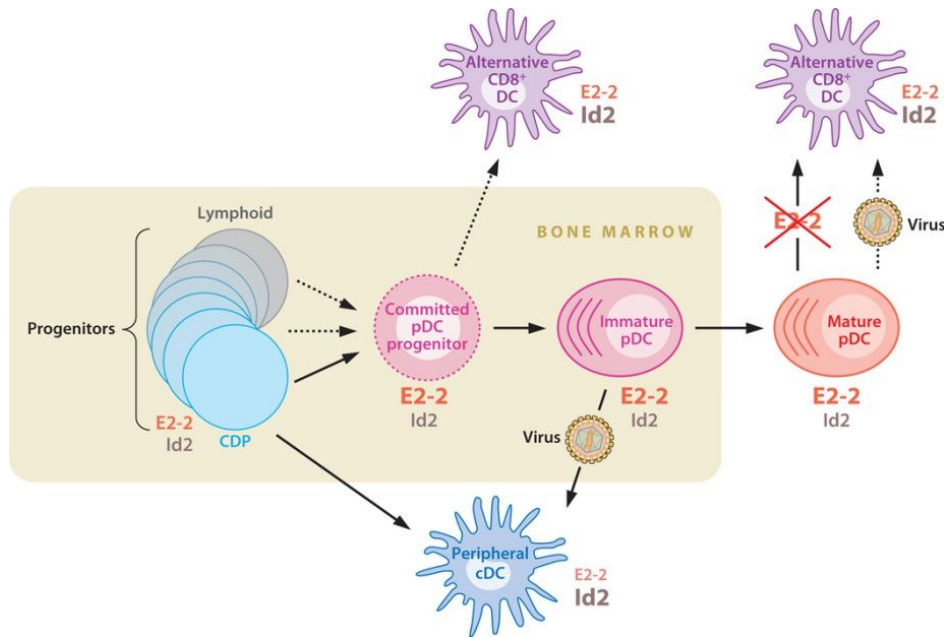
Le gène *E2a* est connu pour être nécessaire au développement et au maintien des LB. Il est aussi nécessaire au réarrangement des immunoglobulines et à l'expression de *RAG1/2* et *Tdt (Dntt)*. *E2a* et *HEB* sont nécessaires au réarrangement du *TCR* (T cell receptor) et au processus de sélection et de développement des LT. Cependant, E2-2 ne semble pas être indispensable dans le développement des LT et des LB. De plus, sa fonction dans le système immunitaire n'est pas totalement élucidée.

Néanmoins, des preuves de l'implication d'E2-2 dans l'ontogénèse des pDCs ont été apportées par une étude qui montre que les pDCs expriment abondamment la protéine E2-2 en comparaison aux autres types de cellules dendritiques. De plus, dans un modèle murin de reconstitution de moelle osseuse par injection de cellules de foie fœtal E2-2<sup>-/-</sup> (exprimant le marqueur CD45.2<sup>+</sup>) chez des souris irradiées (CD45.1<sup>+</sup>) dans lesquelles les cellules hématopoïétiques proviennent exclusivement du donneur, l'ontogénèse des pDCs est complètement abrogée, alors que celle des autres cellules lymphoïdes et myéloïdes, comprenant les sous-types de cDCs, n'est pas modifiée. Un blocage dans la maturation des pDCs a été identifié en absence d'E2-2. En l'absence de ce facteur de transcription, les pDCs n'arrivent pas à exprimer B220 et PDCA1, deux marqueurs de pDCs matures (Cisse et al., 2008).

Une autre preuve de l'implication du gène *E2-2* est aussi apportée par le modèle murin. Chez des souris possédant des constructions génétiques permettant d'effectuer des délétions conditionnelles par la technologie Cre/lox. La délétion spécifique d'*E2-2*, chez les souris où la recombinaison Cre est sous le contrôle du promoteur du *CD11c*, ou bien exprimée de manière ubiquitaire chez d'autres souris E2-2<sup>flox/flox</sup> ; R26-CreERT2<sup>+</sup> (après injection de tamoxifène), aboutit fatalement à une déplétion spécifique des pDCs, sans affecter significativement les autres cellules du système immunitaire dont les cDCs (Cisse et al., 2008) (Cervantes-Barragan et al., 2012).

La persistance du CD8 chez les cellules qui expriment CX<sub>3</sub>CR1 (*CX3C chemokine receptor 1*) et E2-2 peut aboutir à une population cellulaire proche des pDCs mais avec des caractéristiques assez différentes. Par exemple ces cellules montrent une quasi absence de sécrétion d'IFN $\alpha$  en réponse à un stimulus viral ou encore un niveau d'expression de E2-2 relativement faible (Bar-On et al., 2010) (Fig 15).





**Figure 15: Ontogénèse et sous-types de cellules dendritiques plasmacytoïdes.**

**Lors de l'ontogénèse des pDCs, l'expression d'E2-2 peut varier et engendrer ainsi différents sous types avec différentes fonctions (Reizis et al., 2011).**

Une autre protéine, IKAROS, un facteur de transcription à doigt de zinc, s'avère lui aussi, être indispensable au développement des pDCs. Différentes études ont démontré que la présence d'IKAROS est une condition *sine qua non* à l'ontogénèse de différentes lignées hématopoïétiques comme les lymphocytes (Georgopoulos et al., 1994) ou les cellules dendritiques (Wu et al., 1997).

D'une façon plus précise, l'importance d'IKAROS varie selon le type cellulaire concerné. En 2006, Allman *et al* ont décrit une mutation hypomorphe d'*Ikaros* chez la souris. Ces souris sont générées par l'insertion du gène rapporteur ( $\beta$ -galactosidase) dans la partie 5' du locus *Ikaros* (exon 3)(Allman et al., 2006a). Ces souris, sont soit hétérozygotes  $Ik^{+L}$ , soit homozygote  $Ik^{L/L}$  et expriment moins de protéine IKAROS fonctionnelle dans leurs cellules hématopoïétiques, en particulier chez les  $Ik^{L/L}$  pour lesquelles le niveau d'expression est le plus faible (10% d'expression résiduelle). Cette condition induit une réduction drastique et spécifique des pDCs ( $CD11c^{+}120G8^{+}B220^{+}$ ), alors que le nombre des autres sous-populations de cellules dendritiques, à savoir ( $CD11c^{+}CD11b^{+}$ ) et ( $CD11c^{+}CD8\alpha^{+}$ ) reste comparable aux souris sauvages (Tableau II). Ces mesures ont été effectuées au niveau périphérique (Allman et al., 2006a).

**Tableau IV :** Résumé des résultats obtenus : Effet de la mutation hypomorphe d'IKAROS sur la quantité de cellules (pDCs, CD8 $\alpha^+$ , CD11b $^+$ ) (Allman et al., 2006a).

Impact of *Ik<sup>L/L</sup>* mutation on peripheral dendritic cell subsets

Subset/genotype	Spleen		Lymph node <sup>†</sup>	
	% <sup>‡</sup>	No. of cells, $\times 10^{-4}$	% <sup>‡</sup>	No. of cells, $\times 10^{-3}$
<b>pDC</b>				
WT	0.29 (0.04)	25.7 (0.48)	0.08 (0.009)	3.41 (0.40)
<i>Ik<sup>L/+</sup></i>	0.08 (0.01)	6.7 (1.0)	0.04 (0.006)	2.05 (0.27)
<i>Ik<sup>L/L</sup></i>	0.002 (0.003)	0.11 (0.19)	0.001 (0.002)	0.041 (0.081)
<b>CD8<math>\alpha^+</math></b>				
WT	0.43 (0.21)	37.9 (1.8)	0.07 (0.01)	2.78 (0.45)
<i>Ik<sup>L/+</sup></i>	0.34 (0.02)	28.2 (0.15)	0.07 (0.005)	3.08 (0.37)
<i>Ik<sup>L/L</sup></i>	0.80 (0.17)	41.7 (9.9)	0.08 (0.01)	3.09 (0.43)
<b>CD11b<math>^+</math></b>				
WT	0.54 (0.20)	52.0 (13.1)	0.09 (0.01)	3.88 (0.38)
<i>Ik<sup>L/+</sup></i>	0.46 (0.04)	37.8 (3.4)	0.09 (0.01)	3.98 (0.16)
<i>Ik<sup>L/L</sup></i>	0.66 (0.10)	45.8 (3.4)	0.10 (0.01)	3.38 (0.31)

Mean absolute cell numbers derived from 3 mice were calculated by multiplying the total cell numbers by the percent cells within each population. Standard deviations are indicated in parentheses.

La forme mutée du gène *Ikaros* réduit le nombre de pDCs sans changer significativement le nombre d'autres cellules impliquées dans la réponse immunitaire.

Les souris hypomorphes *Ikaros<sup>L/L</sup>* ne sont plus capables de répondre correctement à une infection virale et présentent une hypersusceptibilité, notamment vis-à-vis du Cytomégalo virus murin (MCMV). Elles produisent 10 fois moins d'IFN- $\alpha$  que les souris sauvages *Ik<sup>+/+</sup>*. Par contre, les réponses dépendantes des cDCs et des NK restent normales.

Les auteurs retrouvent chez les souris sauvages une population cellulaire dans la moelle osseuse avec un phénotype CD11c $^+$ , B220 $^+$ , Ly-6C $^+$ , 120G8 $^+$ . Ces cellules présentent néanmoins une expression plutôt hétérogène de B220. Cette population cellulaire est comparable aux pDCs spléniques même si ces dernières expriment B220 de façon plus homogène. Il existe dans la moelle osseuse des souris *Ik<sup>L/L</sup>* une population similaire à celle retrouvée chez les souris sauvages, sauf que l'expression de B220 y est totalement abrogée. L'expression de B220 reste normale dans les LB de souris *Ik<sup>L/L</sup>*. Les deux populations pré-pDCs retrouvées au niveau de la moelle osseuse présentent une morphologie plasmacytoïde, mais les auteurs constatent une réduction de l'expression du CCR9 et l'absence du Ly49Q chez les *Ik<sup>L/L</sup>*. Cela suggère fortement que la mutation hypomorphe d'*Ikaros*, entraîne un blocage dans le développement des pDCs au niveau de la moelle osseuse, empêchant ainsi

l'expression des marqueurs essentiels à la maturation comme Ly49Q et B220. Ce blocage les empêche aussi de quitter la moelle osseuse, ce qui explique que ces souris présentent une déficience en pDCs périphériques (Allman et al., 2006a).

D'autres facteurs de transcription sont associés au développement des pDCs. Un cofacteur de la famille ETO nommé MTG16 (connu aussi sous le nom de CBA2T3), possède le potentiel de réprimer ID2, favorisant ainsi le développement des pDCs. SpiB et IRF8 (cités précédemment), BCL-11A (*B cell lymphoma 11A*), RUNX2 (*runt-related transcription factor 2*) et CIITA (*classe II transactivator*) sont induits par E2-2 et se trouvent ainsi régulés positivement. En outre, PU 1 régule l'expression de FLT3. HIF1 $\alpha$  (*hypoxia-inductible factor 1 $\alpha$* ) est également impliqué, lors du manque d'oxygène, en augmentant l'expression d'ID2, ce qui réduit la production de pDCs par la voie FLT3. GIF1 (*growth factor independent 1*) se trouve impliqué dans la voie de développement des pDCs et cDCs par des modulations de l'activité de STAT3. Quant à NAB2 (*nuclear polyadenylated RNA-binding protein 2*), il intervient dans l'expression des récepteurs induisant l'apoptose TRAIL (*tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand*) chez les pDCs (Swiecki and Colonna, 2015).

Le même programme génique à l'origine de toutes ces modulations est aussi responsable de l'augmentation de marqueurs de surface comme BDCA2 (chez l'Homme), ILT7, Siglec H et des récepteurs endosomiques comme le TLR7/9 et PACSIN1 (*protein kinase substrate in neurons protein*) (Swiecki and Colonna, 2015). Il se trouve que l'inhibition du récepteur AhR (*Arylhydrocarbon Receptor*) par son antagoniste avec SR1 (stemregenin 1) aboutit à une augmentation significative de la production de DCs, dont les pDCs *ex vivo* à partir de progéniteurs hématopoïétiques humain CD34<sup>+</sup> d'origine ombilicale. Cela suggère fortement un effet inhibiteur de AhR dans le développement des DCs en général, et des pDCs en particulier (Thordardottir et al., 2014).

Le programme transcriptomique conduisant à la formation de pDCs implique aussi le système de régulation contrôlé par les microARNs (miR). Le miR-22 a été impliqué dans le développement des pDCs. Dans une étude analysant le niveau d'expression de ce miR entre les pDCs et les cDCs de souris, les auteurs ont signalé une abondance de miR-22 dans les cDCs ce qui n'est pas retrouvé chez les pDCs. D'ailleurs ce miR est induit lors du traitement de cellules en culture avec du GM-CSF (un inhibiteur de la différenciation des pDCs) mais pas avec à FLT3L. Ces résultats suggèrent un rôle de miR-22 en faveur de la différenciation en cDCs au détriment des pDCs. Ces constatations ont mené les auteurs à utiliser des cellules invalidées pour miR-22, chez lesquelles une polarisation vers les pDCs a été clairement constatée. Cela est accompagné d'une augmentation des transcrits d'IRF8. Par un système de

gène rapporteur (luciférase) sur lequel la partie 3'UTR du gène *Irf8* a été fusionnée, les auteurs ont pu montrer que l'action de miR-22 passe par la liaison et la régulation négative des transcrits d'*Irf8* (Li et al., 2012).

Les pDCs sont caractérisées par une très grande plasticité. L'exemple le plus parlant est leur capacité à se différencier en CD11b<sup>+</sup> cDCs-like au cours d'une infection virale. Il a été montré dans un premier temps que lors d'une infection par le LCMV (*lymphocytic choriomeningitis virus*) ou lors d'une stimulation par du poly (I:C), les pDCs de la moelle osseuse *ex vivo* expriment le marqueur CD11b et se polarisent vers une lignée cDCs (Zuniga et al., 2004). Cette constatation a été confirmée *in vivo* par des analyses PCR qui ont permis de détecter la présence d'un marqueur permanent intrinsèque de certaines pDCs, à savoir, le réarrangement IgH DJ dans la population CD11b<sup>+</sup> après infection par le LCMV. Les résultats montrent la présence de ce marqueur dans une partie de la population CD11b<sup>+</sup> chez les souris infectées, alors qu'il n'est pas retrouvé dans la même population CD11b<sup>+</sup> chez les souris contrôles. Pour confirmer ce résultat les auteurs ont procédé à une stratégie de transfert adoptif de pDCs provenant de moelle osseuse et possédant le marqueur CD45.2 dans des souris receveuses exprimant le marqueur CD45.1. Les pDCs provenaient soit de souris naïves (contrôles), soit de souris infectées avec du LCMV. Après cette étape de transfert adoptif, la population de pDCs CD45.2<sup>+</sup> des souris receveuses a été analysée par cytométrie en flux sur sa capacité à exprimer CD11b<sup>+</sup>. Chez les souris infectées par du LCMV, les auteurs ont constaté la présence de cellules CD11b<sup>+</sup> CD45.2<sup>+</sup> (à hauteur de 15-20% dans la rate et ~7% dans la moelle osseuse), alors qu'ils n'ont pas retrouvé cette population chez les souris contrôles. Cette expression de CD11b est aussi accompagnée de l'expression du CD11c, du CD86 (une molécule de co-stimulation) et du CMH de classe II. Cette population CD11b dérivée des pDCs est induite par la signalisation de l'IFN de type I, car chez les souris déficientes en récepteurs aux interférons de type I (IFNAR<sup>-/-</sup>), la conversion des pDCs n'est plus observée (Liou et al., 2008).

En conclusion, l'origine des pDCs du point de vue hématopoïétique peut être variée avec des rendements inégaux, et elle est dépendante du type de progéniteur qui se trouve en amont de leur différenciation. Cela engendre des pDCs différentes qui possèdent des spécificités variées en matière de sécrétion de cytokines, d'activation par les stimuli et même de capacité de stimulation des LT (Pelayo et al., 2005) (Matsui et al., 2009).

Il existe des protéines essentielles à l'ontogenèse des pDCs comme FLT3/FLT3L, E2-2, IRF8, XBP1, SpiB et IKAROS, tandis que d'autres semblent facultatives, comme RAG1, RAG2, IL7R $\alpha$  ou PAX5.

Le modèle de développement des pDCs le plus communément admis actuellement est lié à l'expression de E2-2 chez certains progéniteurs à différents stades, en réponse à des signaux encore inconnus. Cette expression d'E2-2 les dérive de leur profil et induit un programme génique favorisant l'expression d'IRF8 et SpiB. Cette population exprimant E2-2, chevauche avec celles exprimant FLT3. Id2, un inhibiteur de E2-2, est sous exprimé chez les pDCs en comparaison avec les autres cellules de l'immunité innée comme certaines cDCs et les NK. Cela pourrait expliquer certaines caractéristiques lymphoïdes retrouvées chez les pDCs en particulier leur similarité avec les LB. La capacité des pDCs stimulées à devenir des cDCs-like indique que la polarisation lymphoïde dans cette population cellulaire est potentiellement réversible (Reizis, 2010).

Néanmoins, la différence dans les molécules sécrétées et l'activité fonctionnelle des pDCs pourrait simplement témoigner de différents niveaux de maturation et/ou d'activation et non pas d'une différence d'origine. En effet, des cellules issues d'origine différentes ne présentent pas forcément de différence morphologique ou phénotypique (expression de marqueurs de surface). Un autre élément est trop souvent négligé dans les études sur les pDCs : ces cellules nécessitent un certain nombre de facteurs de survie, comme l'IL-3, quand elles sont étudiées *ex vivo/ in vitro* (Grouard et al., 1997). Cependant, le critère de la survie, n'est pas toujours pris en compte dans les différentes études, ce qui pourrait expliquer partiellement les différences de résultats observés avec les différentes procédures expérimentales utilisées (Shortman et al., 2013).

## 5. Circulation et localisation des pDCs

Les pDCs circulent entre le sang et différentes organes (organes lymphoïdes, tissus périphériques) à travers des veinules à endothélium épais, un processus dans lequel différents récepteurs et chimiokines interviennent. CXCR4 est par exemple important pour la rétention des pDCs dans la niche stromale de la moelle osseuse. CXCR4, conjointement avec CCR7, participe aussi à la migration des pDCs vers la pulpe blanche de la rate. CXCR4 peut aussi participer au recrutement des pDCs sur des sites tumoraux. Pendant l'inflammation CXCR3 et CCR5 conduisent les pDCs vers le tissu inflammé, et chez l'Homme c'est la présence du CCR6 et du CCR10 à la surface des pDCs qui facilite leur localisation au site de l'inflammation épithéliale, en réponse à CCL20 et CCL27 (Swiecki and Colonna, 2015). Comme déjà mentionné, des études associent la présence de CCR9 à la localisation des pDCs au niveau du thymus et d'autres avec une localisation dans l'intestin (Wendland et al., 2007). Cependant la localisation dans le colon semble indépendante du CCR9. Les pDCs semblent

aussi pouvoir migrer en réponse à la chimerine, l'adénosine, le C3a et le C5a lorsque ces molécules sont libérées à partir d'un site tissulaire. De façon intéressante le facteur de transcription RUNX2, exprimé préférentiellement chez les pDCs, induit l'expression de CCR2 et CCR5. Lors de l'inactivation de RUNX2, les pDCs se retrouvent bloquées dans la moelle osseuse avec une capacité de migration vers la périphérie réduite, et une diminution à la réponse au chimiotactisme de CCL2, MCP-1 $\alpha$  et RANTES. CCR2 et CCR5 sont préférentiellement exprimés par les pDCs par rapport aux cDCs. Cependant, il semblerait que le CCR2 ne soit pas exprimé chez la totalité des pDCs, même si son expression corrèle positivement avec celle du Ly49Q, ce qui indique une implication partielle de CCR2 et redondante avec CCR5 dans le processus de sortie de la moelle osseuse (Sawai et al., 2013). En outre, CCR5 et ses ligands ont été montrés comme étant des éléments phare dans le recrutement des pDCs, en particulier vers les ganglions lymphatiques périphériques lors d'une inflammation (Diacovo et al., 2005). Cependant, le rôle de l'axe CCR2/CCL2 dans le recrutement des pDCs n'est pas moins important. Le groupe de Maria Sibilía a pu détecter la présence de pDCs dans la peau, suite au traitement topique avec l'ALDARA® (contenant 5% d'imiquimod-IMQ), ce qui n'est pas le cas en absence de traitement avec l'IMQ. Ceci est remarqué, aussi bien dans une peau saine que dans un modèle de mélanome chez la souris (Palamara et al., 2004). Dans une étude ultérieure, toujours du même groupe, avec un modèle murin de mélanome, les auteurs ont pu démontrer que le recrutement de pDCs est dépendant de l'axe CCR2/CCL2. Dans les mêmes conditions, l'utilisation de souris invalidées pour *Ccl2* (*Ccl2*<sup>-/-</sup>) a abouti à la perte de l'effet induit par l'IMQ, avec un infiltrat de pDCs inexistant, indiquant clairement le rôle joué par cette chimiokine dans le recrutement des pDCs. Cet effet nécessite l'activation de la voie TLR7/MyD88, car les souris déficientes en chacune de ces protéines ne montrent aucun effet conséquent à l'application d'IMQ (Drobits et al., 2012). D'autres molécules, telles que les molécules d'adhésion, participent aussi à la localisation des pDCs. MADCAM1 (*mucosal addressing cell adhesion molecule 1*) et l'intégrine  $\beta$ 7 participent à la localisation intestinale intra-épithéliale des pDCs.

L'ensemble de ces résultats indique le potentiel des pDCs à être mobilisées. Lors de leur maturation, ces cellules sortent de la moelle osseuse, transitent par le sang et atteignent par la suite différents compartiments où elles peuvent exercer leurs rôles. Les différents récepteurs aux chimiokines présents à leur surface participent à leur mobilisation. Ces mobilisations sont principalement induites dans l'objectif d'avoir une modulation immunitaire de la part de ces cellules. Les pDCs sont de ce fait souvent mobilisées dans les organes lymphoïdes comme la rate, les ganglions lymphatiques ou le thymus, mais aussi dans des sites

d'inflammation locale. Cependant, elles peuvent aussi être mobilisées dans des sites non inflammés comme l'intestin, probablement afin de jouer un rôle de sentinelles, *via* les molécules d'adhésion qui peuvent les aider à se localiser dans ce type de compartiment. Enfin, leur mobilisation peut être induite par l'application topique de molécules possédant des activités immuno-modulatrices, comme l'IMQ, qui déclenche la production de chimiokines *in situ*.

## 6. Rôle dans les maladies inflammatoires et/ou auto-immunes

Les pDCs sont des cellules impliquées dans l'immunité innée et adaptative, il est couramment admis qu'elles constituent un relais entre ces deux modes de réponse. Cependant, leur rôle précis est difficile à déterminer *in vivo*, et différentes procédures expérimentales montrent des fonctions contradictoires concernant les interactions pDCs – LTs (Guery and Hugues, 2013).

En conditions physiologiques, l'ADN du soi n'est pas reconnu par les pDCs. En effet, l'ADN, libéré généralement lors de l'apoptose et surtout lors de la nécrose (Pisetsky and Fairhurst, 2007), est dégradé par les nucléase (DNase) dans le compartiment extracellulaire. De plus, les récepteurs aux acides nucléiques (TLRs) présents chez les pDCs, participent à la discrimination entre les acides nucléiques du soi et du non soi par leur localisation au niveau des endosomes. Les acides nucléiques exogènes proviennent de virus ou de bactéries qui soit infectent la cellule, soit sont directement phagocytés, leur permettant, une fois pris en charge par les différents mécanismes cellulaires, d'être co-localisés dans les mêmes compartiments que les TLRs (Barton et al., 2006). L'interaction des TLRs et de leurs ligands engendre une cascade de transduction du signal et l'activation des cellules (caractérisée par la production de cytokines comme les IFNs de type I et l'expression de molécules de co-stimulation etc....).

En condition pathologique, comme chez les patients souffrant de Lupus Erythémateux Disséminé (LED), une activation des pDCs qui expriment fortement les molécules de co-stimulation (CD40 et CD86) est retrouvée. Cela a été rapporté comme étant lié à l'induction de la signature IFNs chez ces patients (Nie et al., 2010). Les pDCs étant les principales cellules productrices d'IFNs de type I, elles se trouvent incriminées dans le LED par plusieurs évidences. Tout d'abord, des études sur des patients infectés par le virus de l'hépatite C (HCV) ou atteints de leucémie, et traités par des IFNs, montrent dans certains cas le développement d'un syndrome lupique (Ho et al., 2008; Schilling et al., 1991; Tolaymat et al., 1992). Par ailleurs, la concentration en IFN $\alpha$  dans le sérum corrèle positivement avec le niveau d'Ac anti-ADNdb (ADN double brin) et avec l'indice d'activité de la maladie lupique

(SLEDAI) chez les patients présentant un LED (Dall'era et al., 2005). Le fait que les cellules du sang périphérique des patients atteints de LED montrent une augmentation de la transcription des gènes de réponse aux IFNs de type I (ISGs) constitue aussi un fort argument en faveur du rôle pathologique de ces cytokines. Finalement, dans un modèle animal : la souris NZB/W sujette au lupus, l'absence des récepteurs aux IFNs de type I réduit la pathologie alors que l'injection d'IFN $\alpha$  induit une exacerbation des symptômes (Chan et al., 2012).

Du point de vue cellulaire et moléculaire, l'action de l'IFN de type I dans ce contexte s'explique par un effet sur les LB en diminuant leur seuil de réactivité, ce qui augmente la production d'AcS et promeut la commutation de classe isotypique. Cela augmente aussi la mémoire immunitaire *in vivo* en agissant directement sur les LBs et les LTs ou par l'activation préalable des cDCs. En présence d'IL-6, les IFNs de type I induisent la différenciation des LB en plasmocytes sécrétant d'AcS. L'action des pDCs sur les mDCs par le biais des IFN $\alpha$  dans le LED est aussi intéressante, car la production des cDCs à partir de cellules souches hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> et de monocytes, est augmentée en présence d'IFN $\alpha$ . Les pDCs, en sécrétant des IFNs de type I, induisent aussi une activation des cDCs en régulant positivement CD80, CD86 et CMH II, ce qui améliore leur capacité de présentation de l'Ag aux LTs et peut réduire la tolérance aux Ags du soi. Enfin, les IFNs de type I agissent surtout sur les pDCs, et engendrent une boucle de régulation positive qui participe à l'augmentation de leur propre production, et ainsi à la pérennisation de la maladie (Chan et al., 2012).

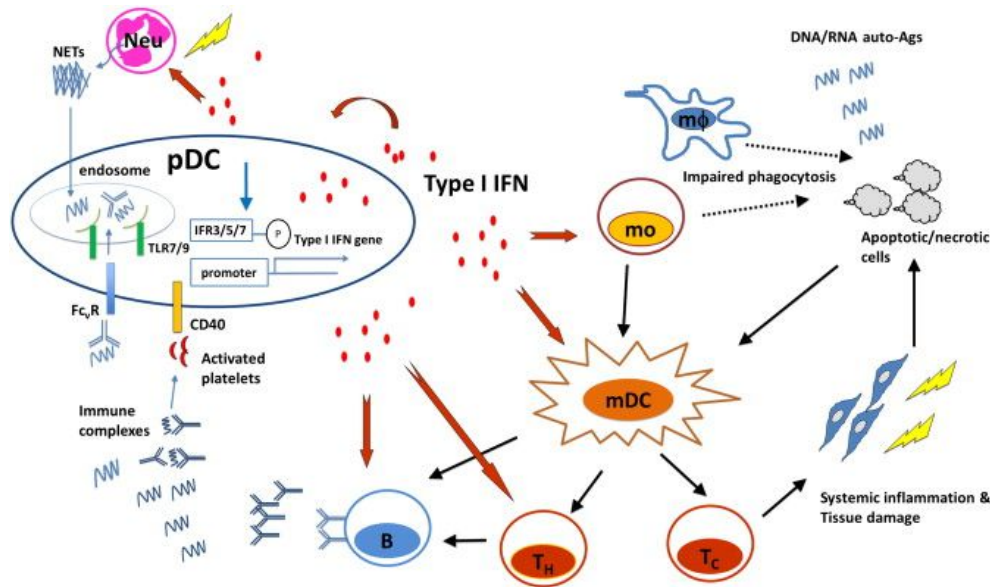
Comme mentionné précédemment, les pDCs expriment plus de TLR7 et 9 par rapport aux autres types cellulaires. Le TLR7 est associé à un rôle pathologique. En effet son positionnement sur le chromosome X peut expliquer partiellement la prévalence féminine plus élevée du LED. Chez la souris mâle BXSB, le locus *Yaa* accélère l'apparition du syndrome lupique. Cela est dû à une duplication du fragment chromosomique contenant le *Tlr7*, conduisant à une surexpression du récepteur. En outre, lorsque les souris MRL/Mp<sup>*lpr/lpr*</sup> sont déficientes en TLR7, elles montrent une réduction des symptômes, associés à moins d'auto-Ac, une réduction de l'expression du CMH II par les pDCs et une chute de l'activité des LT (Chan et al., 2012). D'ailleurs, un nouveau modèle de lupus-like induit chez la souris (sous différents fonds génétiques FVB/N, BALB/c et C57BL/6) est totalement basé sur l'activation du TLR7 par certains agonistes comme l'imiquimod ou le R848. En effet, leur application au niveau de l'oreille 3 fois par semaine pendant 4 semaines provoque le développement d'une pathologie auto-immune systémique évocatrice du lupus, avec la présence d'Ac anti-ADNdb et une atteinte d'organes multiples : gloméronephrites, hépatites, inflammations cardiaques



(péricardite et myocardite). Cette inflammation systémique est associée à une splénomégalie. L'expression de gènes de réponses à l'IFN $\alpha$  (*Ifna* et *Mx1*) est augmentée dans les organes des souris lupiques dans ce modèle. Le mode d'action de cette induction de lupus-like semble associé à l'activation de l'axe TLR7/pDCs/IFN $\alpha$ . L'induction des symptômes par l'application topique d'imiquimod se trouve abrogée lors de l'utilisation de souris invalidées pour *Tlr7* mais pas pour *Tlr9*. Enfin, les symptômes sont éliminés par l'utilisation d'un Ac déplétant spécifiquement les pDCs (Yokogawa et al., 2014).

Dans le contexte du LED et lors de la NETose, les neutrophiles peuvent libérer des molécules comme la protéine LL37 (un peptide antimicrobien appelé aussi cathélicidine produit par les kératinocytes) et HMGB1 (*high mobility group box 1*) qui se complexent à l'ADN, libéré par ces mêmes neutrophiles, engendrant la formation de complexes de type immunitaire (ADN/autoAc Anti-ADN). Tous ces composants peuvent mener à l'activation des pDCs, soit en passant par la voie de la phagocytose dépendante de la protéine LC3 (*Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain3*), ou bien *via* les récepteurs Fc $\gamma$ RII (CD32) pour les auto-Ac, ce qui active la signalisation en aval des TLRs endosomaux et la production d'IFN de type I. Par ailleurs, HMGB1 qui interagit avec RAGE (*Receptor for Advanced Glycation End products*) à la surface des pDCs facilite la liaison TLR9/ADN dans l'endosome (Guery and Hugues, 2013). De façon intéressante, l'analyse de pDCs provenant de 62 sujets en bonne santé et 58 patients souffrant de LED montre une régulation à la hausse du pouvoir de stimulation des LT allogéniques par les pDCs des patients LED, même en absence de chargement antigénique. En contrepartie les pDCs perdent leur capacité d'induire des LT reg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, après leur internalisation et chargement d'Ags provenant de polynucléaires (PMNs) apoptotiques. En outre, la production de cytokines est, elle aussi modifiée, quand les pDCs sont en présence de PMNs apoptotiques. Curieusement, les pDCs de patients LED régulent à la baisse l'expression d'IL-6 et d'IL-18, mais maintiennent la synthèse d'IL-10. Dans les mêmes conditions, une réduction de la transcription de *Tlr9* est aussi constatée (Jin et al., 2010). Ces derniers résultats indiquent un changement profond dans le métabolisme des pDCs chez les patients atteints de LED.

L'ensemble de ces résultats sous-tend l'implication des pDCs dans la pathogénèse du LED. (Figure 16).

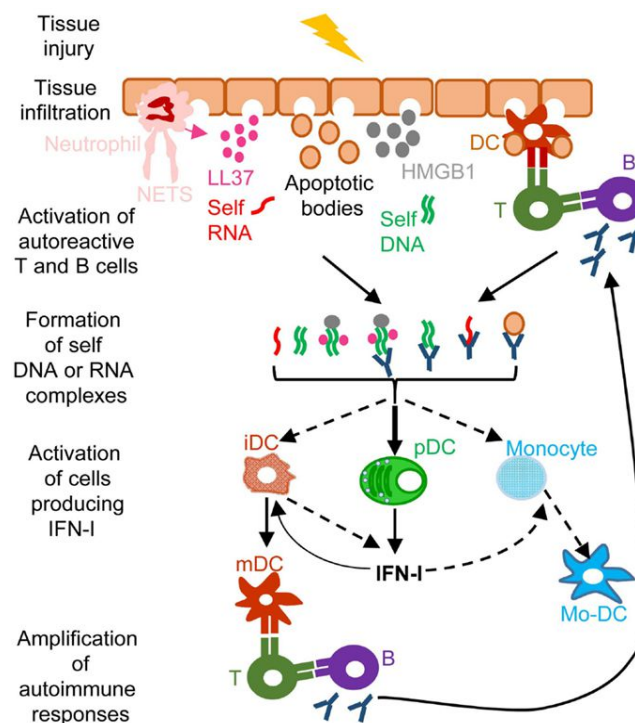


**Figure 16 : Rôle central des pDCs et de l'IFN de type I dans la physiopathologie du LED (Chan et al., 2012).**

Dans une autre maladie auto-immune, le psoriasis, il est généralement admis que l'ADN du soi libéré par la peau endommagée et sa détection par les pDCs induit la production d'IFNs de type I responsables de la pathologie. Cette réaction particulière semble être partiellement expliquée par l'action de LL37 dont l'expression est augmentée dans la peau lors d'atteintes psoriasiques chez l'Homme. La surexpression de LL37 complexé à l'ADN du soi provoque la formation d'agrégats qui convertissent l'ADN inerte en un puissant activateur du TLR9, par son accès aux endosomes précoces et tardifs (Lande et al., 2007). Par ailleurs, cet effet pathologique des pDCs est aussi retrouvé lors de l'application topique d'ALDARA® contenant l'Imiquimod (IMQ), qui est un ligand du TLR7, sur une plaque psoriasique. Cela s'accompagne d'un infiltrat conséquent de pDCs et d'une signature IFN de type I (Gilliet M et al., 2004).

Dans le diabète de type 1 (DT1), le rôle de l'axe pDCs/ IFN-I apparaît comme délétère. Dans une étude publiée en 2013, les auteurs semblent avoir démontré de façon claire l'effet et le mode d'action pathogénique des pDCs et de la sécrétion d'IFN-I dans le DT1 (Diana et al., 2013). Ils ont analysé l'impact des cellules du système immunitaire inné dans l'initiation de DT1. Tout d'abord, un infiltrat constitué de neutrophiles, de pDCs, et de LB a été observé au niveau du pancréas de jeunes souris NOD (*non-obese diabetic*), mais pas dans des souches de souris non diabétiques comme les C57BL/6 ou les BALB/c. Une grande quantité de cellules B-1a produisant un taux élevé d'Ac anti-ADNdb a été détecté au niveau des îlots

pancréatiques. Cela peut expliquer l'activation des pDCs *via* le TLR9, de façon similaire à ce que l'on retrouve dans le psoriasis ou le LED. De plus la population de neutrophiles infiltrant indique aussi un système d'activation des pDCs identique à celui retrouvé dans le LED, à savoir, *via* LL-37 (CRAMP chez la souris) et la formation de NETs. D'ailleurs, les neutrophiles retrouvés au niveau du pancréas étaient CRAMP positifs. L'injection de CRAMP dans les pancréas de souris induisait une signature IFNs plus forte, et la déplétion des neutrophiles par un Ac anti-Ly6G réduisait l'expression des gènes de réponse à l'IFN $\alpha$ . Finalement, les auteurs ont conclu à une coopération entre les neutrophiles, les cellules B-1a et les pDCs dans l'induction des premières phases du DT1 (Diana et al., 2013). Cependant, des études antérieures indiquent un effet potentiellement régulateur des pDCs du fait de leur capacité à interagir avec les iNKT (*inductible Natural Killer T cells*). Cette interaction favoriserait la production, par les pDCs, de TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ) qui convertit les LT auto-réactifs en LTreg Foxp3<sup>+</sup> au niveau des ganglions lymphatiques distaux. Les LTreg ainsi produits sont recrutés au niveau des îlots pancréatiques où ils produisent eux-mêmes du TGF- $\beta$  qui inhibe l'action délétère des LT CD8<sup>+</sup> auto-réactifs, réduisant ainsi la sévérité du DT1 (Diana et al., 2011).

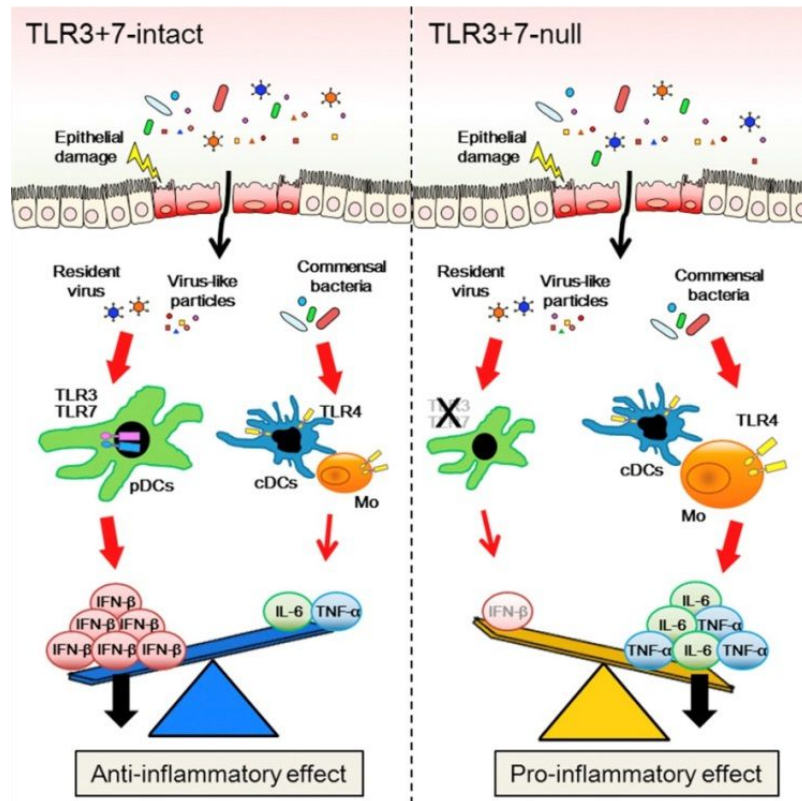


**Figure 17 : Modèle simplifié de l'effet délétère des pDCs et des IFNs-I dans plusieurs pathologies auto-immune et/ ou auto-inflammatoire (Tomasello et al., 2014).**

Concernant la sclérose en plaque (SEP), les pDCs semblent avoir un potentiel protecteur. En effet, dans le modèle murin de la maladie (*EAE-Encéphalomyélite Autoimmune Experimentale*), une déplétion des pDCs induite par l'injection en intra veineuse (i.v) d'un Ac anti-mPDCA1 cause une aggravation des symptômes (Bailey-Bucktrout et al., 2008). L'action bénéfique des pDCs serait dû à leur production d'IFN de type I et chez les patients souffrant de SEP, un bénéfice concret est constaté après traitement avec l'IFN $\beta$ . En outre, l'absence du récepteur aux IFNs de type I au niveau du système nerveux central (SNC) induit une exacerbation de la maladie dans le modèle murin. Cet effet bénéfique de l'axe pDCs/ IFN de type I pourrait aussi être dû à une réduction des cDCs, ce qui réduit le taux de LTh17 au niveau du SNC. Cependant, les mécanismes moléculaires exacts induisant la suppression locale des LT pathogéniques par le biais des IFN-I ne sont pas parfaitement décrits (Guery and Hugues, 2013).

La preuve la plus évidente du rôle bénéfique des pDCs a été apportée récemment par l'équipe de Stéphanie Hugues qui a démontré que, lors de l'initiation de l'EAE, les pDCs chargées avec un antigène de la myéline (MOG<sub>35-55</sub> *Myelin oligodendrocyte glycoprotein*) contribuent à induire des LTreg *via* la présentation de l'Ag sur le CMH II. Les LTreg ainsi générés possèdent des propriétés anti-inflammatoires qui atténuent la gravité de l'EAE (Irla et al., 2010). Par la suite, afin d'évaluer le rôle des pDCs dans la pathologie déjà établie, les auteurs ont procédé au transfert adoptif des pDCs lors de la phase aiguë de la maladie. L'injection (i.v) chez des souris, après l'apparition de la maladie, de pDCs dérivées de la moelle osseuse chargées avec un Ag de myéline MOG<sub>35-55</sub>, induit la diminution des scores cliniques et quasiment leur disparition après 10 jours. De façon remarquable, les L<sub>TH</sub>1 et L<sub>TH</sub>17 sont réduits au niveau du SNC, et cela s'accompagne d'un infiltrat de pDCs exogènes (25%) et endogènes (75%), ce qui inhibe la phase effectrice de la maladie. De plus, en absence des pDCs endogènes, dans un modèle de souris déficientes en pDCs (BDCA2-DTR), l'effet protecteur de la procédure de transfert adoptif de pDCs est perdu. Ce recrutement des pDCs endogènes dans le SNC semble passer par l'axe Chemerine/CMKLR1 (*chemerine receptor*). L'effet protecteur sur l'EAE ne semble pas passer par l'IFN $\beta$  et les IFN-I en général, car l'effet protecteur des pDCs est conservé aussi bien chez les souris IFN $\beta^{-/-}$  que chez les IFNAR $^{-/-}$ . En outre, la présence du CMH II au niveau des pDCs ne semble pas non plus indispensable. Néanmoins, le chargement préalable des pDCs avec MOG<sub>35-55</sub> avant leur injection apparaît comme une condition *sine qua non* pour cet effet protecteur des pDCs (Duraes et al., 2016).

Le rôle des pDCs dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI), semble avoir trouvé sa réponse récemment, même si cela reste encore préliminaire et non validé chez l'Homme. Dans une étude publiée en 2016, un mécanisme protecteur exercé par les pDCs a été démontré par l'exacerbation de la colite induite au DSS (*Dextran Sulfate Sodium*) chez les souris qui ne possèdent pas de virus entériques résidants (suite à un traitement antiviral). Ce résultat a été aussi retrouvé chez les souris invalidées simultanément pour *Tlr7* et *Tlr3*. Par contre, la stimulation des cellules de l'immunité innée par l'administration d'un agoniste de TLR7 (l'IMQ) et TLR3 (le Poly I:C) réduit les symptômes de la colite induite par le DSS. Afin de comprendre le mécanisme sous-jacents, les auteurs ont isolé différents types cellulaires immunitaires (Monocytes, cDCs et pDCs) de l'intestin de souris souffrant de colite. Ils ont pu montrer que l'activation des TLRs par différents stimuli (LPS (lipopolysaccharide), Poly I:C (acide polyinosinique-polycytidylique), Imiquimod), induisait la production de cytokines pro-inflammatoire (IL-6, TNF- $\alpha$ ) par les Monocytes et les cDCs mais pas par les pDCs. De façon remarquable, les pDCs produisent de l'IFN $\beta$  en présence de Poly I:C et d'Imiquimod. L'analyse de l'ensemble de leurs résultats leur a permis de décrire un mécanisme expliquant la régulation de l'inflammation intestinale par l'IFN $\beta$  produit par les pDCs activées (Figure 18) (Yang et al., 2016).



**Figure 18 : Homéostasie immunitaire intestinale, induite par l'interaction entre les pDCs et les virus entériques résidants, et la production d'IFN- $\beta$  (Yang et al., 2016)**

Enfin, les pDCs participent aussi à la physiopathologie de l'asthme. Dans une étude sur les effets de la sensibilisation aux Ags inertes inhalés, il a été démontré que l'inhalation d'un Ag inoffensif par des souris déplétées en pDCs conduit à une réaction inflammatoire avec les caractéristiques cardinales de l'asthme (éosinophilie, production d'IgE, production de cytokines LTh2, et hyperplasie des cellules caliciformes). De plus le transfert adoptif de pDCs avant la sensibilisation empêche l'apparition de la maladie. Dans ce modèle, les pDCs suppriment la génération des LT effecteurs induits par les cDCs (Heer et al., 2004).

Ainsi, le rôle des pDCs semble être contexte-dépendant, puisque ces cellules peuvent avoir à la fois des fonctions immunogéniques et tolérogéniques durant le développement de maladies auto-immunes. Leurs réponses s'ajustent au type de maladie, à son état d'avancement et aux caractéristiques de l'inflammation qui est mise en place. Il est aussi probable que le site où s'établit l'inflammation joue un rôle sur la présence initiale des pDCs et/ou sur leur recrutement.

## 7. Rôle dans la polyarthrite rhumatoïde

Le rôle des pDCs dans la PR n'est pas clairement défini actuellement et le nombre de publications qui traite de ce sujet est encore relativement restreint. Les équipes qui ont cherché à évaluer le rôle des pDCs chez l'Homme ou dans des modèles animaux (murins) n'ont pu aboutir qu'à des réponses partielles et parfois contradictoires. Cela est probablement dû aux différences entre les procédures expérimentales chez la souris, et chez l'homme, au stade pathologique où les données sont collectées et à l'état général des patients (facteurs environnementaux, facteurs génétiques, prise d'un traitement modificateur du système immunitaire etc.).

Dans une première étude publiée en 2005 et réalisée chez l'Homme, les auteurs ont quantifié et caractérisé les sous-populations de DCs circulantes et présentes dans le liquide synovial chez des patients atteints de PR ou d'arthrose. Ces données indiquent une réduction des DCs dans le sang, ainsi qu'une augmentation du rapport cDCs / pDCs dans le liquide synovial par rapport au sang chez les patients PR. D'autre part, un phénotype immature (non activé) caractérise les pDCs dans la synovie. Ce défaut de pDCs circulantes a été interprété comme étant la conséquence de l'infiltration de ces cellules dans l'articulation, ce qui engendrerait un effet pathologique (Jongbloed et al., 2005). Cependant, cette réduction de pDCs dans la périphérie pourrait également résulter d'un défaut de sortie des pDCs de la moelle osseuse, ce qui pourrait participer à l'initiation de la pathologie. Dans une étude publiée ultérieurement, la présence des deux populations de DCs dans le tissu synovial (TS) avec un phénotype plutôt immature (non activé, correspondant à l'expression réduite des molécules de co-stimulation) a été retrouvée. Les profils cytokiniques de ces deux populations étaient clairement distincts. Cependant, contrairement aux résultats de la première publication, les auteurs retrouvent un rapport cDCs/ pDCs en faveur des pDCs. De plus ils montrent une corrélation entre le nombre de pDCs dans la synovie et la présence de Facteur Rhumatoïde (FR) ou d'anticorps anti-protéine citrullinée (Anti-CCP). Ces données suggèrent une relation entre les pDCs dans le liquide synovial et une réponse humorale plus forte. En faveur de cette hypothèse, les auteurs montrent la présence de cytokines activatrices des LB (BAFF/ BLyS) dans le liquide synovial des patients PR (Lebre et al., 2008). Ce résultat n'est pas étonnant, puisque ces patients présentent des taux d'auto-anticorps (FR, Anti-CCP) élevés. Néanmoins, les auteurs n'excluent pas la possibilité d'un effet anti-inflammatoire de l'IFN  $\beta$  produit *in situ* par les pDCs (van Holten et al., 2002), ou par l'action de l'IFN de type I directement sur les cDCs, inhibant leur production d'IL-12 et ainsi la capacité d'activation des LT<sub>H1</sub> (McRae

et al., 1998). Enfin la propriété des pDCs à induire des LTreg au niveau du liquide synovial a aussi été envisagée par les auteurs (Moseman et al., 2004). Ils concluent sur la possibilité de cibler les DCs, en particulier les pDCs infiltrant l'articulation, comme une stratégie thérapeutique potentielle (Lebre et al., 2008). A l'issue de ces travaux, le même investigateur a analysé le rôle des pDCs chez la souris (Jongbloed et al., 2009). En utilisant un nouveau modèle d'arthrite, non conventionnel, qui consiste en l'injection intraveineuse de LT<sub>H1</sub> et LT<sub>H2</sub> DO11.10 (ces cellules possèdent un TCR transgénique reconnaissant spécifiquement l'ovalbumine-OVA). Ensuite, une préparation d'OVA agglutinée par la chaleur est injectée en péri-articulaire chez les souris, ce qui engendre une réponse inflammatoire arthritique qui mime une polyarthrite rhumatoïde (Maffia et al., 2004). Après déplétion des pDCs par l'injection d'un anticorps spécifique (120g8) au moment de l'induction de l'arthrite, aucun phénotype n'a été visible en termes de symptômes ou de gonflements des articulations. Cependant, l'analyse histologique a montré une exacerbation significative de la pathologie (hyperplasie synoviale, dégradation du cartilage et invasion du pannus) à un temps relativement précoce, suggérant que le manque de pDCs cause une accélération des phénomènes pathogéniques. Un effet protecteur des pDCs est alors proposé dans ce modèle d'arthrite expérimental, ce qui est renforcé par l'augmentation du titre des Ac anti-collagène chez les souris déplétées en pDCs. De plus, une augmentation des taux d'auto-anticorps circulants (anti-OVA, anti-collagène, anti-IgG2a, anti-CCP) a été détectée par ELISA (Jongbloed et al., 2009). Ces résultats étaient totalement à l'opposé des premières conclusions, ce qui a remis en question le dogme encore admis jusque-là, d'une réponse délétère engendrée potentiellement par les pDCs dans la PR. Il est aussi à mentionner que dans la même année, une étude réalisée avec des pDCs de patients atteints de PR a montré une capacité particulière de ces cellules à induire, à partir de LT naïfs, des LTreg producteurs d'IL-10, qui possèdent un fort potentiel anti-inflammatoire (Kavousanaki et al., 2010). Dans ce travail, les auteurs ont d'abord constaté une augmentation (restauration) du taux de pDCs dans le sang des patients en rémission de la PR comparativement aux patients avec une PR active. De plus, ces pDCs présentaient un état activé. Ils ont aussi pu constater des niveaux d'expression plus élevés d'*Ido* par les pDCs circulantes provenant de patients en rémission. Cette caractéristique pourrait expliquer leur capacité à induire des LTreg (mécanisme cité dans la partie généralité sur les pDCs, pages 47, 48 et 49 Fig 11). Ces LTreg générés en coculture avec les pDCs de patients PR en rémission sont capables de réduire la prolifération de LT CD4<sup>+</sup> naïfs autologues et d'inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires. Ces auteurs ont donc proposé une association entre la rémission des patients et l'augmentation du

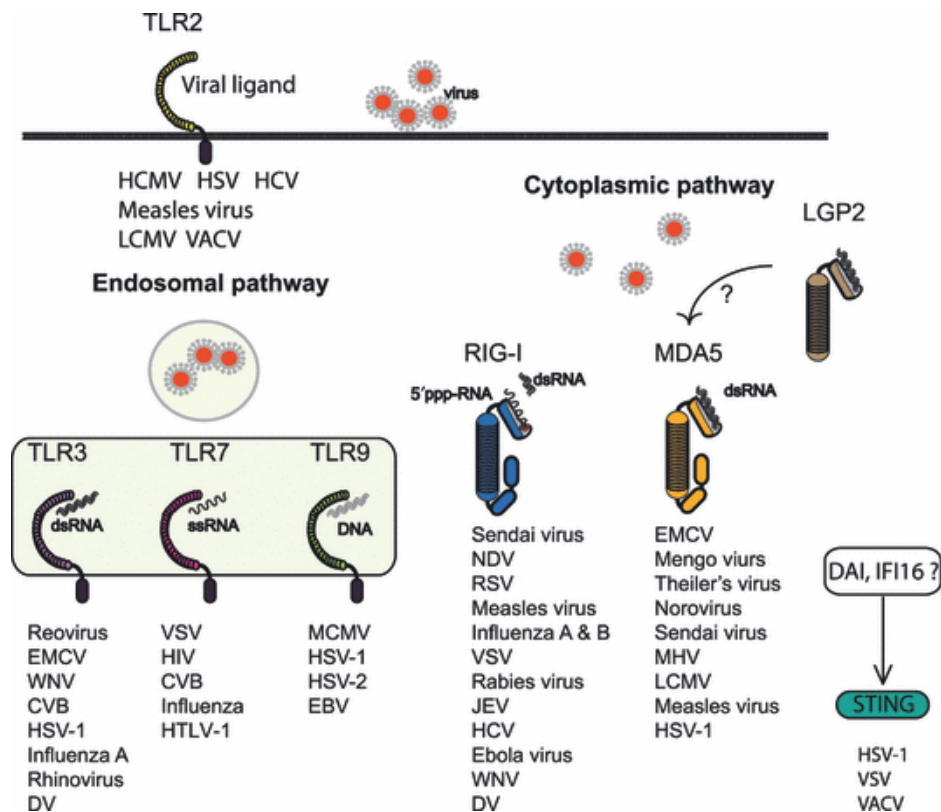


taux de pDCs. Ils spéculent aussi sur un éventuel mécanisme dans lequel un environnement pro-inflammatoire agirait sur les pDCs en les activant et en les polarisant vers un phénotype tolérogénique, qui à terme contrôlerait l'inflammation articulaire (Kavousanaki et al., 2010). Un autre argument qui plaide en faveur d'un rôle protecteur des pDCs est l'effet protecteur d'IRF7 (un facteur de transcription clairement associé aux pDCs et à leur capacité de production d'IFN-I). Dans une étude sur des souris déficientes en IRF7 (*Irf7*<sup>-/-</sup>), ayant reçu du sérum arthritogène K/BxN, une exacerbation significative des symptômes a été constatée. Ces observations concernent aussi bien les symptômes cliniques que l'expression de cytokines et les dommages osseux analysés par Micro-CT (*Computed Tomography*). De plus, ce phénotype est atténué quand les souris sont traitées avec de l'IFN $\beta$  (Sweeney et al., 2012). Cependant, d'autres études ont produit des résultats paradoxaux. Ainsi, il a été proposé que les pDCs immatures (CD34<sup>+</sup>, BDCA4<sup>+</sup>) provenant de patients atteints de PR puissent être des progéniteurs des FLS activés sécrétant d'IL-6 retrouvés au niveau de la membrane synoviale de ces patients. Ce phénomène se produirait après migration des pDCs immatures de la moelle osseuse vers la synovie où elles rencontreraient un environnement cytokinique marqué en particulier par la présence de TNF- $\alpha$ , ce qui les engagerait dans cette voie de différenciation (Hirohata et al., 2011). En faveur de ce modèle, il semble que des pDCs immatures s'accumulent au niveau de la moelle osseuse chez les patients atteints de PR (Hirohata et al., 2013).

L'ensemble de ces résultats illustre la complexité de l'effet potentiel des cellules dendritiques.

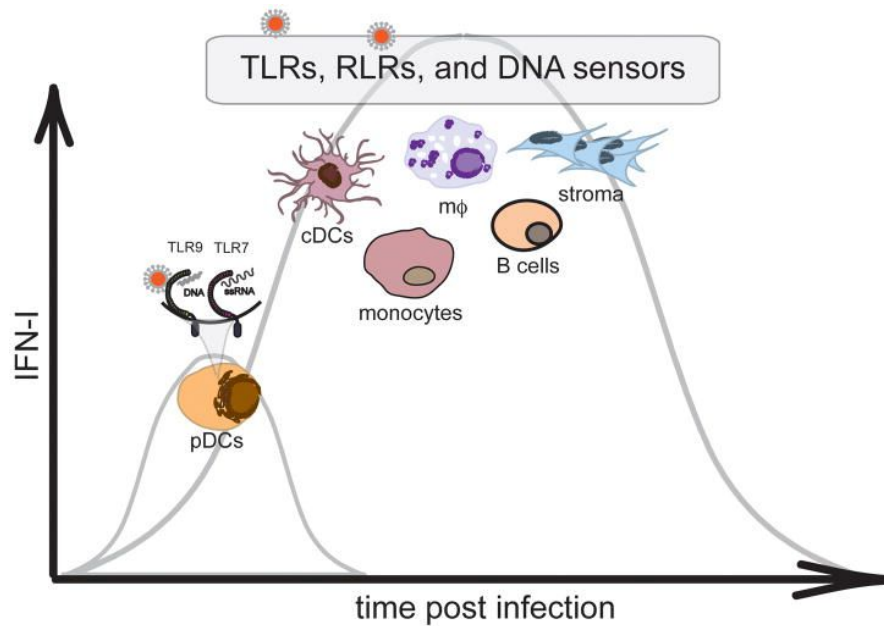
## 8. Rôle des pDCs dans les maladies infectieuses et les cancers

Stimulées de façon adéquate, les pDCs peuvent produire de grandes quantités d'IFNs. Contrairement aux cDCs, les pDCs ne semblent pas exprimer le TLR2, le TLR4 ou le TLR3 mais elles détectent l'ADN et ARN viral à travers l'activation du TLR7 et du TLR9 exprimés abondamment dans leurs endosomes et dont l'activation conduit à la production d'IFNs et de cytokines pro inflammatoires comme l'IL-12, l'IL-6 et le TNF $\alpha$ . La présence d'IRF7 de façon constitutive les rend réfractaires à la réplication virale. RIG-I et MDA5, malgré leur présence, ne semblent pas être nécessaires pour la détection des stimuli viraux (Wang et al., 2011).



**Figure 19 : Diversité et spécificité des senseurs viraux selon leur localisation subcellulaire (membranaire, cytosolique et endosomale) (Wang et al., 2011).**

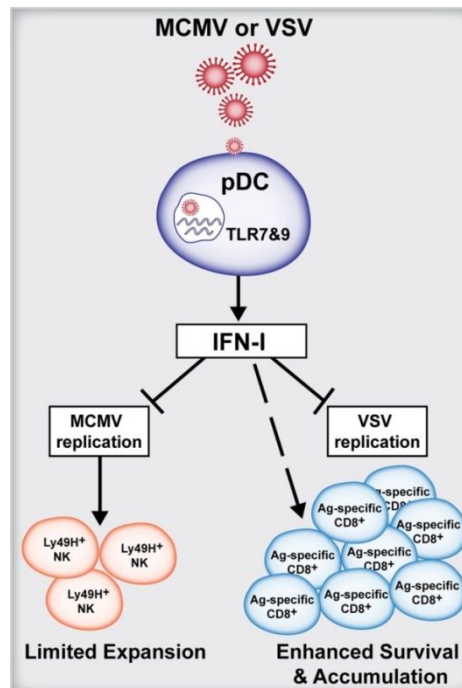
Les pDCs sont considérées comme la première ligne de défense cellulaire dans la lutte antivirale, car elles constituent une source initiale mais limitée d'IFNs. Elles ne peuvent totalement contrôler l'infection virale que lorsque les charges virales inoculées sont relativement faibles, contrairement aux conditions expérimentales où des doses élevées de virus sont inoculées aux souris. Dans les conditions physiologiques, l'infection virale a lieu en général avec des doses relativement faibles de virus. En outre, les IFNs produits précocement par les pDCs, induisent un état antiviral en augmentant la transcription des ISG, ce qui rend les cellules résistantes aux infections virales. De plus, les IFNs précocement produits contribuent à l'induction d'autres détecteurs (senseurs) viraux dans les cellules immunitaires et stromales, ce qui amplifie la réponse IFNs (Wang et al., 2011).



**Figure 20 : Les sources cellulaires de l'IFN-I au cours de l'infection virale (Wang et al., 2011).**

Dans une étude effectuée par l'équipe de Marco Colonna, les auteurs montrent qu'en plus de la réponse IFNs précoce, les pDCs sont aussi impliquées dans l'activation d'autres cellules ayant un rôle dans la réponse antivirale en particulier les NK et les LT CD8<sup>+</sup> (Swiecki et al., 2010). Les auteurs ont utilisé des souris BDCA2-DTR, des souris qui expriment spécifiquement le récepteur de la toxine diphtérique (DT) à la surface des pDCs, ce qui permet d'induire une déplétion spécifique par l'injection de la DT chez ces souris. Chez les souris déplétées en pDCs, une réduction de l'efficacité des NK pour la lyse des cellules cibles est détectée à 24h mais cette différence n'est plus retrouvée à 48h post infection par le MCMV (Murine Cytomegalovirus). Cela suggère fortement que les pDCs sont nécessaires à la phase précoce de l'activation des NK. Par ailleurs, une charge virale plus importante est constatée aux sites de réplication virale chez les souris déficientes en pDCs ce qui indique un moins fort potentiel à contrôler l'infection en absence de pDCs. Par contre, les NK des souris déficientes se montrent compétentes dans la production d'IFN $\gamma$  dans la phase de réponse précoce et leur nombre est plus élevé durant la phase de réponse tardive par rapport aux souris sauvages. Le développement de la réponse NK spécifique n'est pas affectée par la déplétion des pDCs, car les auteurs ont retrouvé des NK 1.1<sup>+</sup> et des Ly49H<sup>+</sup> (ces populations témoignent d'une réponse spécifique au MCMV et de l'établissement de populations mémoire) à des niveaux similaires dans les deux groupes à la phase précoce et à des niveaux plus élevés chez les souris déficientes en pDCs aux phases tardives de l'infection par le

MCMV. Cependant, cette forte expansion des NK aux phases tardives peut ne pas être reliée au manque de pDCs mais juste au fait d'avoir une charge virale élevée chez les souris (Swiecki et al., 2010). L'utilisation d'un virus à ARN, le VSV (*Virus de la Stomatite Vésiculaire*), chez les même souris a montré aussi une activation précoce des pDCs, induisant la production d'IFN- $\alpha$ , ce qui contrôle la charge virale. En outre, les souris déficientes en pDCs possédaient significativement moins de LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques dirigés spécifiquement contre le virus et leur capacité à produire de l'IFN $\gamma$  était aussi réduite. Cela serait partiellement dû au potentiel des pDCs à participer à la survie des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques. Ce résultat indique clairement la nécessité des pDCs dans l'établissement de la réponse anti virale à différentes phases dans ce modèle (Swiecki et al., 2010). (Figure 21).



**Figure 21: Implication des pDCs dans le contrôle de l'infection virale par certaines cellules de l'immunité (Swiecki et al., 2010).**

Dans une étude ultérieure menée par la même équipe, lors de l'utilisation du HSV (Herpès Simplex Virus), les pDCs ne semblaient pas être essentielles à la survie ni à la réduction de la charge virale lors de l'infection vaginale par HSV-1. Elles ne sont *a priori* pas indispensables non plus à la réponse LT CD8<sup>+</sup> spécifique lors de l'inoculation en sous cutané par HSV-2. Toutefois, les pDCs auraient une importance majeure dans la production d'IFN-I de façon précoce, dans l'induction de cytokines pro-inflammatoires et dans l'activation des NK et des LT CD8<sup>+</sup> durant l'infection systémique (quand le virus est inoculé dans le sang) (Swiecki et al., 2013).

La réponse antivirale adaptative semble aussi impliquer les pDCs. Quand des souris présentant une déficience constitutive de pDCs sont exposées à une infection persistante par le LCMV (*Lymphocytic Choriomeningitis Virus*), elles montrent une incapacité à neutraliser la chronicité. Cet échec semble être relié à un défaut de nombre et de fonction des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Par ailleurs, l'action des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> spécifique au LCMV a été montrée comme étant dépendante de la présence d'IFN-I. Indépendamment de la présentation antigénique, les LT CD4<sup>+</sup> spécifiques au LCMV nécessitent la présence de pDCs (les pDCs n'exprimant pas le CMH II sont aussi efficaces pour l'induction de la réponse LT CD4<sup>+</sup>) (Cervantes-Barragan et al., 2012).

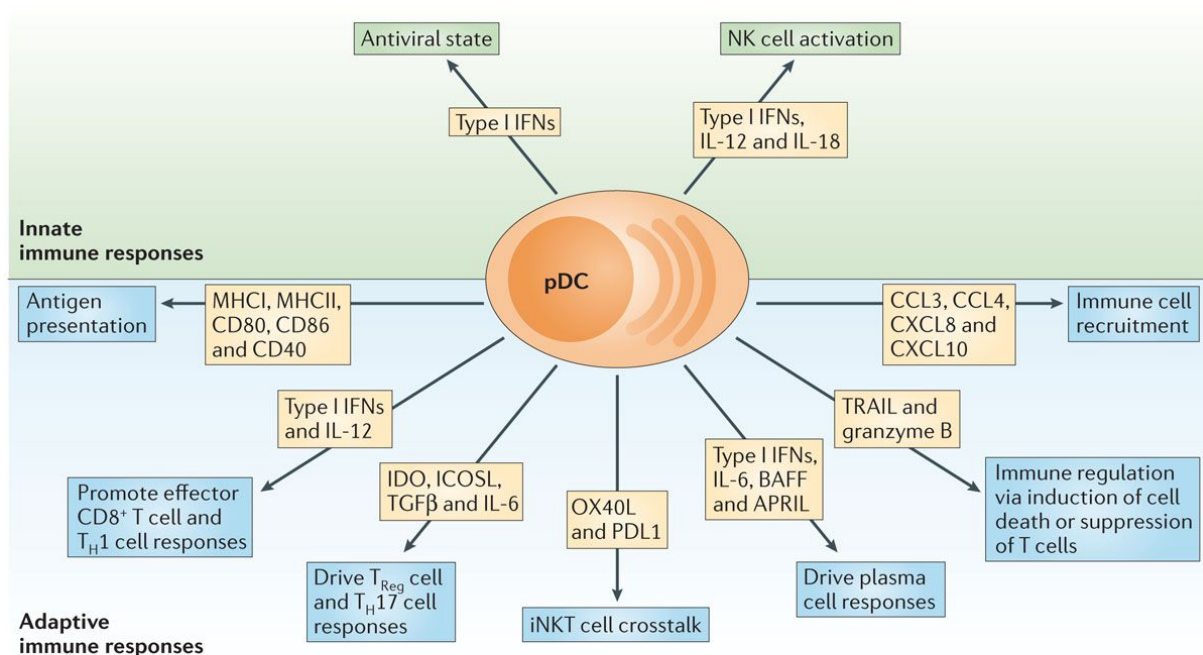
Ces résultats indiquent une importance certaine des pDCs spécialement par le biais de la production rapide d'IFN-I. Toutefois, cette importance dépend du type de virus et de la localisation de l'infection. Il semble assez clair qu'à la phase précoce de l'infection, les pDCs sont sollicitées et déclenchent une réponse IFN-I induisant un environnement antiviral, ce qui influence d'autres cellules du système immunitaire qui prennent le relais dans les phases les plus tardives. Toutefois, la réponse immunitaire adaptative dépendante des lymphocytes T dans le cas des infections chroniques semble nécessiter la présence d'IFN-I et de pDCs. Ces résultats démontrent une implication des pDCs et des IFNs de type I au cours des différentes infections virales afin d'arriver à la clairance virale et l'établissement de la mémoire immunitaire. Il est aussi à signaler que la production rapide d'IFN-I par les pDCs permet à l'organisme d'éviter des surinfections par des virus opportunistes qui peuvent être facilement réactivés.

Il est en général admis que les pDCs sont aussi impliquées dans les cancers, mais leur rôle est très discuté. Leur recrutement dans les tumeurs est documenté comme étant initié par des chimiokines produites par le site tumoral comme CXCL12 (Zou et al., 2001). Ce recrutement, ainsi qu'une activité antitumorale, peut aussi être induit par des molécules exogènes, comme c'est le cas lors de l'application topique d'ALDARA® contenant 5% d'Imiquimod (IMQ). Dans le processus du traitement des cancers baso-cellulaires (indication thérapeutique d'ALDARA), le recrutement des pDCs est induit par le CCL2 produit de façon subséquente à l'application topique d'ALDARA. Dans ce cas de figure, les pDCs recrutées, par une action autocrine de l'IFN-I, arriveraient à réduire la tumeur par l'action de TRAIL et du granzyme B ; c'est en tout cas le mode d'action défini dans le modèle de mélanome chez la souris (Drobits et al., 2012). Au-delà de ce mode d'action dépendant exclusivement de l'immunité innée, un effet dépendant de l'immunité adaptative peut aussi leur être attribué. Dans une étude pilote réalisée sur 15 patients atteints de mélanome métastatique, une stratégie

de vaccination thérapeutique a montré un résultat tout à fait encourageant. Les pDCs sont chargées avec des peptides antigéniques associés aux tumeurs, et injectées dans le ganglion lymphatique. Ce traitement abouti à une signature IFNs et une distribution des pDCs à différents ganglions lymphatiques. Une augmentation de la réponse LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> spécifique est aussi constatée (Tel et al., 2013). Ce résultat indique une capacité des pDCs à engendrer une réponse adaptative, dépendante des lymphocytes T, à l'encontre des tumeurs. De plus, les pDCs possèdent la capacité à présenter les Ags tumoraux, et cela par le biais d'un processus nommé « trogocytose », qui permet aux pDCs de capter puis présenter des antigènes de tumeurs aux LTs (Bonaccorsi et al., 2014). Ce processus peut aboutir à la promotion de la réponse LT<sub>H</sub>17. Dans un modèle murin de tumeurs (Thymome EG7 OVA), où des cellules tumorales de thymus de souris exprimant l'OVA (l'ovalbumine) de poulet sont transplantées à des souris par voie sous-cutanée (s.c), un effet antitumoral des pDCs a été documenté. Cet effet antitumoral des pDCs a été relié à leur capacité de présentation des antigènes tumoraux associés au CMH de classe II (perte d'efficacité chez les pDCs qui n'expriment pas le CMH II). Le rôle effecteur « tumorocide », dans ce processus est assumé par les LT CD8<sup>+</sup> et les LT<sub>H</sub>17 (Guéry et al., 2014).

Cependant, même si le CXCL12 semble promouvoir un recrutement des pDCs, il semble aussi réduire leur activité immunogénique (Zou et al., 2001). Par ailleurs, chez l'Homme, la présence de pDCs dans l'infiltrat du site tumoral est associé à un mauvais pronostic, aussi bien dans le cancer de l'ovaire (Labidi-Galy et al., 2012) que dans le cancer du sein (Treilleux et al., 2004). Cet effet délétère des pDCs peut être partiellement expliqué par leur potentiel à induire un environnement tolérogénique par l'orientation des populations de lymphocytes T effecteurs vers les LT régulateurs. Cette propriété à produire des LTreg est largement documentée, notamment par le biais de IDO ou ICOSL (Guery and Hugues, 2013; Ito et al., 2007; Swiecki and Colonna, 2015). En effet, l'expression d'IDO dans les ganglions lymphatiques drainant les tumeurs est associée à un mauvais pronostic clinique chez les patients atteints de tumeurs malignes, comme un carcinome mammaire (Munn et al., 2004). L'environnement tolérogénique induit par les pDCs peut être aussi dû au fait que la production de granzyme B par ces derniers peut avoir un effet apoptotique (ou anergique) sur les LT effecteurs (Jahrsdörfer et al., 2010), ce qui protégerait la progression tumorale. Le fait que les pDCs ne produisent pas la perforine (une protéine cytosolique qui permet de perméabiliser les cellules cibles), réduirait le potentiel d'activité lytique du granzyme B sur les cellules tumorales (Swiecki and Colonna, 2015).

L'ensemble de ces résultats indique que dans le cancer, tout comme dans les maladies auto-immunes et/ou auto-inflammatoires, les pDCs sont capables du meilleur comme du pire. Leurs rôles apparaissent aussi très dépendants du contexte inflammatoire, ce qui indique clairement que ces mêmes cellules peuvent avoir des rôles différents, dans des contextes différents. Mieux comprendre leur métabolisme, leurs systèmes internes de régulation, les signaux externes qui peuvent les influencer, leurs stratégies de développement et leur plasticité et surtout leur mode d'action, permettra sûrement de maîtriser un outil thérapeutique avec un très grand potentiel. Ce type cellulaire fait penser à une sorte de couteau suisse immunologique avec toutes les capacités qu'on lui attribue. De ce fait, il est important de déterminer si les pDCs représentent une population cellulaire ou bien un ensemble de sous-populations ayant chacune un rôle. Le fait que les études actuelles ne discriminent pas toujours ces sous-populations pourrait être à l'origine des données contradictoires que l'on retrouve actuellement dans la littérature. (Figure 22)



Nature Reviews | Immunology

**Figure 22 : Fonctions et rôles attribués aux pDCs (Swiecki and Colonna, 2015)**

# Objectifs du travail





## Objectifs du travail

La polyarthrite rhumatoïde est une pathologie à l'origine de douleurs intenses et de difficultés quotidiennes d'ordre social et professionnel, handicapant considérablement la vie des patients qui en sont affectés. En l'absence de traitement, elle peut causer des dommages majeurs et irréversibles. Depuis une quinzaine d'années, l'efficacité des traitements a considérablement augmenté et permettent une nette réduction des symptômes et des douleurs, sans, cependant, conduire à une guérison des patients. Parmi les progrès réalisés récemment, les traitements dits « biologiques » ont constitué une révolution car ils augmentent considérablement la qualité de vie des patients. Ces molécules sont le plus souvent des anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre des cytokines impliquées dans l'inflammation articulaire, comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  ou IL-6, ou bien directement contre des cellules immunitaires par le biais de marqueurs de surface, comme pour l'anti-CD20 qui cible les lymphocytes B. Cependant, les patients peuvent être réfractaires aux traitements ou parfois, développer une résistance à leur encontre. Par ailleurs, un certain nombre d'effets secondaires peuvent y être associés. De plus, le coût de ces nouveaux traitements ne permet pas une prescription généralisée en première ligne, et par conséquent, un nombre considérable de patients, en général dans les pays en voie de développement, n'y ont pas accès. Enfin, la prévalence de l'arthrite qui a déjà une incidence importante dans la population (environ 1%), est amenée à croître avec le prolongement de l'espérance de vie, en particulier dans les pays développés.

Pour toutes ces raisons, il est essentiel de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de cette maladie afin d'identifier de nouveaux acteurs cellulaires ou moléculaire impliqués dans son induction et son maintien.

Le but principal de ma thèse a été d'étudier le rôle d'une population de cellules immunitaires, les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) dans le contexte de l'arthrite inflammatoire induite chez la souris. Le rôle des pDCs dans les pathologies auto-immunes et/ou auto-inflammatoires est très discuté, et plus particulièrement dans le contexte de la PR, parce-que leur impact reste encore mal compris. De plus, les pDCs sont la source majeure des IFN-I dont le rôle est très controversé dans la PR. D'un point de vue fondamental, la compréhension du rôle précis que peuvent exercer les pDCs et les molécules qu'elles sécrètent dans le processus physiopathologique de l'arthrite inflammatoire peut fournir une nouvelle vision sur cette maladie. Ces résultats pourront aussi aboutir à des investigations fournissant de nouvelles cibles thérapeutiques et ainsi proposer un champ applicatif. *In fine* la

démonstration d'un effet des pDCs dans les processus auto-inflammatoires et/ou auto-immuns peut même aboutir à de nouveaux concepts dans la réponse immunitaire et les systèmes de régulation contrôlant son effet délétère qui se manifeste chez les patients souffrant d'auto-immunité ou d'immunosuppression.

Afin d'apporter une réponse à la question du rôle des pDCs dans la PR, j'ai développé deux modèles murins d'arthrite et analysé différents modèles de souris déficientes en pDCs, de façon génétique ou inductible.

Ce travail est exposé sous la forme d'un manuscrit actuellement soumis (Manuscrit 1).

La deuxième partie de mon travail concerne le rôle des microARNs dans la physiopathologie de l'arthrite. Durant ma thèse j'ai participé à la démonstration de l'implication de la protéine DICER, une RNase III cytosolique responsable du clivage des précurseurs de microARN et conduisant à la génération des microARN matures. Notre équipe a pu démontrer, aussi bien chez la souris que chez l'Homme, une relation entre la perte de DICER et la pathologie. Ce travail a été publié (Publication 1).

J'ai aussi initié un deuxième projet concernant le rôle des microARN dans la PR. Pour ce projet nous nous sommes focalisés sur un type cellulaire particulier, les FLS. Car contrairement aux macrophages, ces cellules ne sécrètent ni TNF- $\alpha$  ni IL-18, deux cytokines majeures dans la pathogénèse de la PR et dont l'inhibition réduit de manière significative les symptômes de la maladie. Le microARN miR-346, qui a été identifié précédemment dans notre laboratoire (Alsaleh et al., 2009b; Semaan et al., 2011), est exprimé par les FLS mais absent dans les macrophages. Notre laboratoire a déjà établi et publié une étude démontrant que la transfection de miR-346 dans des cellules d'une lignée macrophagique (THP1) permet d'inhiber la sécrétion de TNF- $\alpha$  et d'IL-18 induite par le LPS. Il a été aussi établi au laboratoire que miR-346 cible de façon indirecte la protéine BTK (*Bruton's Tyrosine Kinase*) qui est impliquée dans la stabilisation de l'ARNm du TNF- $\alpha$  (Alsaleh et al., 2009b; Semaan et al., 2011). Cependant, le ou les ARNm ciblés directement par miR-346 *in vivo* ne sont pas encore connus à ce jour et toutes les prédictions informatiques se sont révélées non concluantes. Par ailleurs, d'autres études impliquent divers autres microARNs (miR-19, miR-20, miR-146a, miR-155, miR-124, et miR-203) dans la physiopathologie de la PR, et pour la plupart d'entre eux, les cibles sont le résultat de prédictions. Nous avons alors entrepris de réaliser la détection de l'ensemble des transcrits (ARNm) ciblés par des miARNs dans des FLS isolés de patients souffrant de PR.

Cette dernière étude permettra (1) de définir l'ensemble du transcriptome régulé par les miARNs dans les FLS de patient atteints de PR et (2) d'identifier des cibles plausibles de miR-346 par identification de séquences seed spécifiques dans certains transcrits. Nous envisageons ensuite de valider ces cibles par inactivation de miR-346 dans les FLS par la technique CRISPER/Cas9. Ce travail n'est actuellement pas assez avancé pour me permettre de présenter des résultats, mais il fera l'objet d'un manuscrit qui sera probablement soumis en 2017.

### **Travaux en collaboration**

Notre laboratoire collabore avec l'équipe du Dr. Florence Apparailly (INSERM U 1183 Montpellier) (Manuscrit 2) et celle du Dr. Stephan Bluml (Medical University Vienna) (Manuscrit 3), afin de décrire le rôle de miR-146 dans les FLS et dans les monocytes. Deux manuscrits dans lesquels je suis co-auteur sont actuellement soumis à *Annals of the Rheumatic Diseases*.

**Liste des manuscrits et publications :**

**Manuscrit 1 :** pDC recruitment by topical application of the TLR7 agonist Imiquimod reduces local inflammation and prevents bone erosion in mouse models of rheumatoid arthritis. **Ramzi Nehmar**, Ghada Alsaleh, Vincent Flacher, Birgit Niederreiter, Thierry Vandamme, Philippe Kastner, Susan Chan, Christopher Mueller, Seiamak Bahram, Stephan Blüml and Philippe Georgel.

Soumis à Nature Medecine

**Publication 1 :** Reduced DICER1 Expression Bestows Rheumatoid Arthritis Synoviocytes Proinflammatory Properties and Resistance to Apoptotic Stimuli.

Alsaleh G, **Nehmar R**, Blüml S, Schleiss C, Ostermann E, Dillenseger JP, Sayeh A, Choquet P, Dembele D, Francois A, Salmon JH, Paul N, Schabbauer G, Bierry G, Meyer A, Gottenberg JE, Haas G, Pfeffer S, Vallat L, Sibia J, Bahram S, Georgel P.

Publié dans Arthritis & Rheumatol. 2016 Aug;68(8):1839-48. doi: 10.1002/art.39641.

**Manuscrit 2 :** Therapeutic delivery of miR-146a to inflammatory monocytes interferes with pathogenic bone loss during inflammatory arthritis.

M. Ammari, I. Duroux-Richard, J. Presumey, C. Ponsolles, G. Roussignol, C. Roubert, V. Escriou, K. Toupet, A-L. Mausset-Bonnefont, P. Georgel, **R. Nehmar**, L. Taams, M. Grün, T. Häupl, A. Grützkau, Y-M. Pers, C. Jorgensen and F. Apparailly.

Soumis à Annals of the Rheumatic Diseases

**Manuscrit 3:** MicroRNA-146a controls joint pathology in inflammatory arthritis.

Victoria Saferding, Antonia Puchner, Eliana Goncalves-Alves, Emine Sahin, Birgit Niederreiter, Silvia Hayer, Philippe Georgel, **Ramzi Nehmar**, Marije M. Koenders, Mark Boldin, Gernot Schabbauer, Mariola Kurowska-Stolarska, Günter Steiner, Josef S. Smolen, Kurt Redlich and Stephan Blüml.

Soumis à Annals of the Rheumatic Diseases

# Résultats



## Résultats

### 1. Résultats du manuscrit 1

**Le recrutement des pDCs induit par l'application topique d'un agoniste de TLR7 (Imiquimod) réduit l'inflammation articulaire locale et l'érosion osseuse dans des modèles murins d'arthrite inflammatoire.**

**pDC recruitment by topical application of the TLR7 agonist Imiquimod reduces local inflammation and prevents bone erosion in mouse models of rheumatoid arthritis**

Ramzi Nehmar, Ghada Alsaleh, Benjamin Voisin, Vincent Flacher, Birgit Niederreiter, Thierry Vandamme, Gernot Schabbauer, Philippe Kastner, Susan Chan, Christopher Mueller, Seiamak Bahram, Stephan Bluml and Philippe Georgel

Publication en soumission à Nature Medecine

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie multifactorielle dans laquelle des paramètres d'origine génétique, épigénétique, hormonaux et environnementaux jouent des rôles importants. Actuellement, en plus des traitements conventionnels (stéroïdes et immunomodulateurs) souvent empiriques, les molécules « biologiques » comme des anticorps monoclonaux ou des récepteurs tronqués ciblant des cellules (LT, LB) ou des cytokines (TNF $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-6) de façon spécifique sont de plus en plus employées. Cependant, malgré leurs rôles connus dans le développement des réponses immunitaires (innées et adaptatives), les cellules dendritiques ne sont pas actuellement ciblées. Les cellules dendritiques constituent une population hétérogène, contenant différentes sous populations parmi lesquelles les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) dont le rôle dans la PR est relativement mal connu. Afin d'analyser l'effet des pDCs, nous avons étudié l'effet de leur délétion/ réduction ou au contraire de leur recrutement au niveau de l'articulation arthritique pour apporter une réponse claire sur leur rôle dans la physiopathologie de cette maladie.



**Augmentation des symptômes locaux, des marqueurs systémiques et des marqueurs histologiques osseux caractérisant l'inflammation arthritique chez les souris *Ik<sup>L/L</sup>* déficientes constitutivement en pDCs périphériques.**

Afin de comprendre l'effet que les pDCs pourraient avoir dans le processus physiopathologique de l'arthrite inflammatoire, nous avons décidé d'induire une arthrite transitoire par le modèle de transfert de sérum provenant de souris K/BxN (STA K/BxN) chez des souris génétiquement déficientes en pDCs. Nous avons ainsi induit l'arthrite chez les souris *Ikaros<sup>L/L</sup>* possédant une mutation hypomorphe dans le gène qui code pour le facteur de transcription IKAROS. Cette mutation provoque une absence quasi totale de pDCs dans la circulation et les organes lymphoïdes secondaires, sans affecter le nombre ou la fonction des autres populations de cellules immunitaires comme les LB, les LT, les NK ou encore les cDCs (Allman et al., 2006b).

Nous avons tout d'abord confirmé l'absence de pDCs dans la rate chez ces souris mutantes. Pour identifier ces cellules par cytométrie en flux (FAS), nous avons analysé les marqueurs PDCA1<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup> (Fig M1).

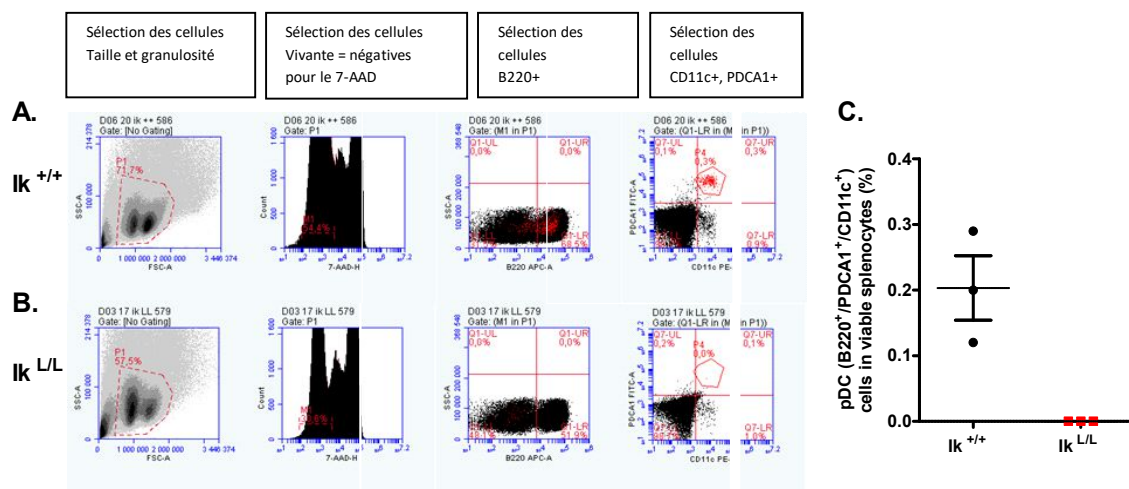


Figure M1. **Déficit constitutif et total en pDCs au niveau de la rate des souris *Ikaros<sup>L/L</sup>*.** A et B, Images illustrant la stratégie de détection des pDCs (PDCA1<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>) dans la rate par cytométrie en flux respectivement chez les souris contrôle *Ik<sup>+/+</sup>* et les souris mutantes déficientes en pDCs *Ik<sup>L/L</sup>*. C, Représentation graphique de la déplétion constatée chez les souris mutantes déficientes en pDCs *Ik<sup>L/L</sup>* par rapport aux souris contrôles *Ik<sup>+/+</sup>*.

Cette analyse nous a permis de valider l'absence des pDCs au niveau périphérique. Par la suite, nous avons induit l'arthrite par transfert de sérum K/BxN (STA K/BxN) chez ces souris

puis analysé par cytométrie en flux la présence de pDCs au niveau des articulations arthritiques au pic de l'inflammation à J9.

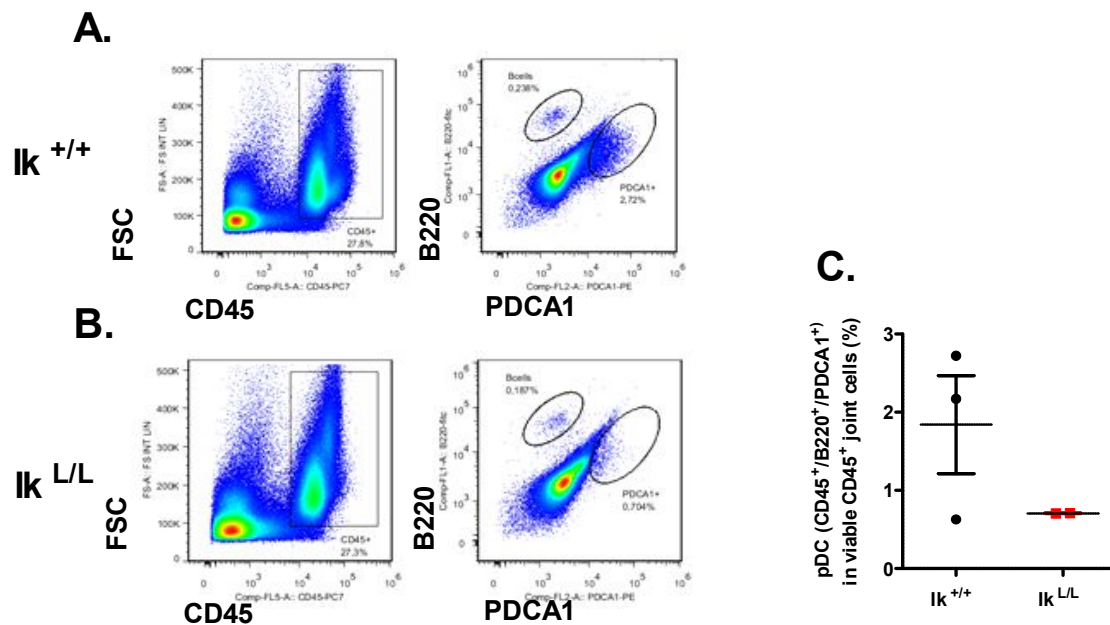


Figure M2. Absence de pDCs au niveau des articulations arthritiques chez les *Ikaros*<sup>L/L</sup>. A et B, Images illustrant la stratégie de détection des pDCs (PDCA1<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>) dans le tissu peri-articulaire par cytométrie en flux respectivement chez les souris contrôles *Ik*<sup>+/+</sup> et les souris mutantes déficientes en pDCs *Ik*<sup>L/L</sup>. C, Représentation graphique du pourcentage de pDCs retrouvé dans l'infiltrat immunitaire de l'articulation arthritique chez les souris mutantes déficientes en pDCs *Ik*<sup>L/L</sup> par rapport aux souris contrôles *Ik*<sup>+/+</sup>.

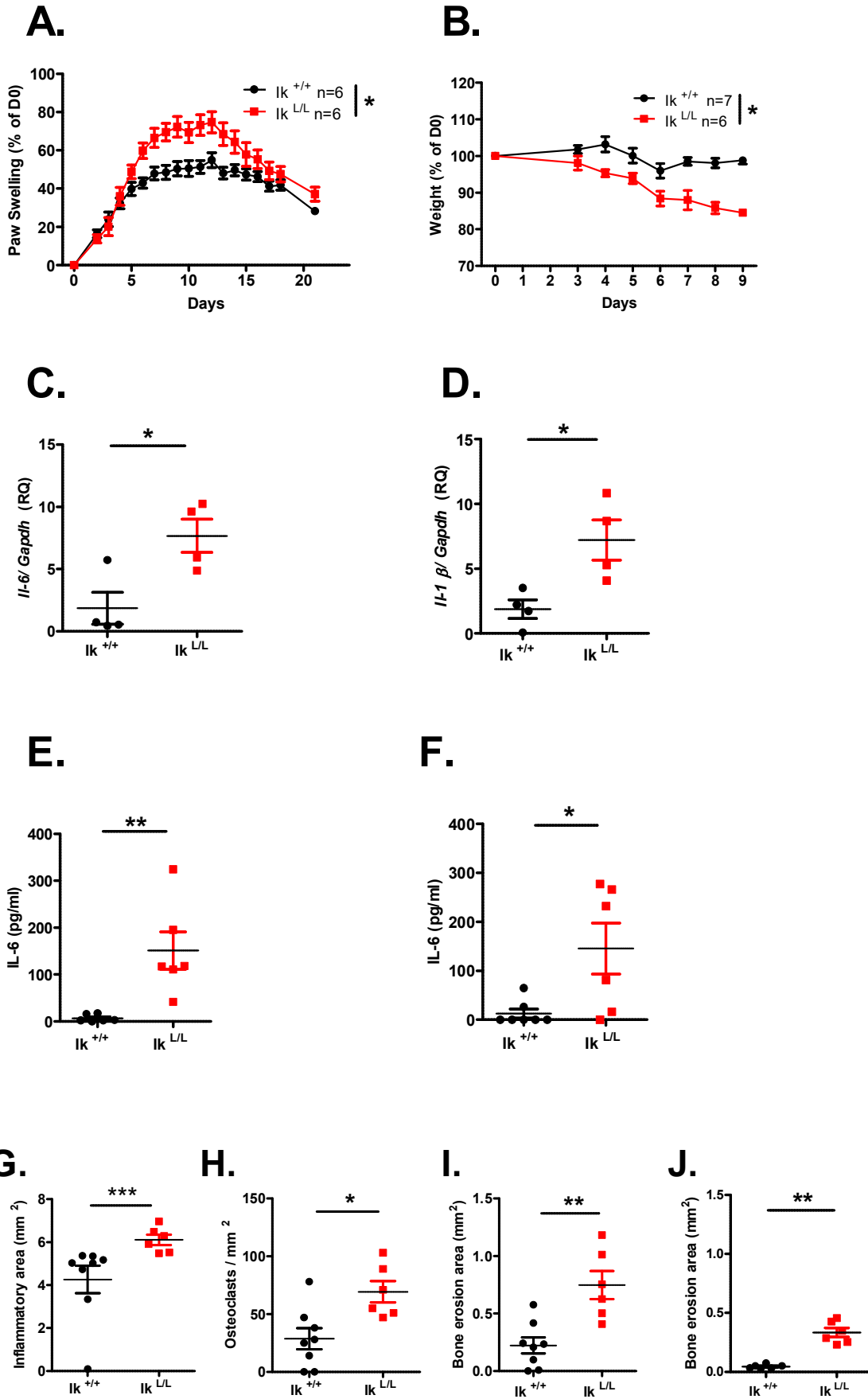
Comme attendu, nous n'avons pas retrouvé de pDCs chez les souris mutantes *Ik*<sup>L/L</sup> alors qu'une faible proportion a été retrouvée chez les souris contrôles *Ik*<sup>+/+</sup> (Fig M2).

Nous avons aussi constaté une exacerbation des symptômes arthritiques chez les souris déficientes en pDCs. Cette constatation est confirmée par les mesures du gonflement des articulations effectuées au pied à coulisse. Comme illustré sur la Figure M3, une augmentation significative du gonflement articulaire (Fig M3A) et du score visuel des pattes (Fig M3M) est retrouvée chez les souris mutantes *Ik*<sup>L/L</sup>. Une perte plus importante de poids est aussi constatée chez ces souris déficientes en pDCs (Fig M3B), ce qui témoigne d'une atteinte systémique plus forte.

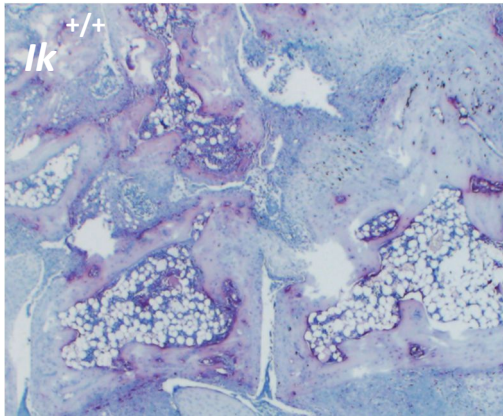
Cette exacerbation des symptômes est corroborée par une expression locale significativement plus élevée des transcrits de deux cytokines marqueurs de l'inflammation arthritique dans ce modèle, à savoir, l'*Il-6* (Fig M3C) et l'*Il-1β* (Fig M3D). L'IL-6 sérique qui constitue aussi un marqueur de l'inflammation arthritique est significativement augmentée au jour 5 (phase

précoce) (Fig M3E) et au jour 9 (pic des symptômes cliniques) (Fig M3F) chez les souris déficientes en pDCs.

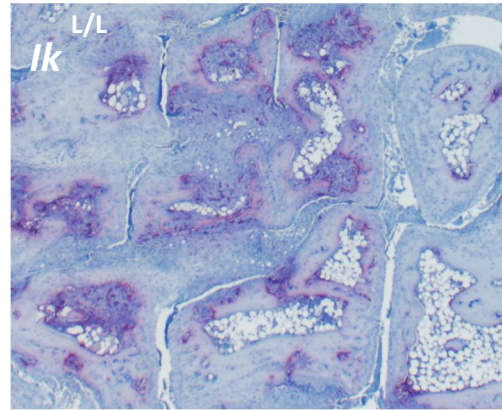
L'analyse histologique montre clairement une augmentation des signes pathologiques osseux chez les souris *Ik<sup>L/L</sup>* déficientes en pDCs (Fig M3K et M3L). Nous pouvons ainsi constater une augmentation significative de l'inflammation osseuse, quantifiée par l'analyse de la zone osseuse infiltrée par des cellules immunitaires (Fig M3G), du nombre d'ostéoclastes (Fig M3H) et de l'érosion osseuse au pic des symptômes cliniques J9 (Fig M3I) et à la fin de l'arthrite transitoire J22 (Fig M3J).



**K.**



**L.**



**M.**

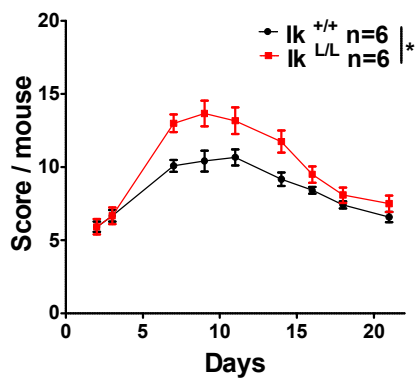


Figure M3. **Augmentation des signes cliniques et des marqueurs locaux et systémiques de l'inflammation articulaire chez les souris  $Ik^{L/L}$  déficientes en pDCs par rapport aux souris contrôles  $Ik^{+/+}$ .** **A**, Évolution du gonflement articulaire après induction de l'arthrite (STA K/BxN) chez les souris déficientes en pDCs  $Ik^{L/L}$  (en rouge n=6) en comparaison aux souris contrôles  $Ik^{+/+}$  (en noir n=6), évaluée par mesure au pied à coulisse et rapportée aux mesures correspondantes au jour 0 (avant l'induction de l'arthrite). Le test statistique est réalisé en prenant en compte la surface des aires sous les courbes de la totalité de la période de l'arthrite. **B**, Évolution du poids des souris rapporté au poids à jour 0 pour les souris  $Ik^{L/L}$  (en rouge n=6) en comparaison aux souris contrôles  $Ik^{+/+}$  (en noir n=7). **C** et **D**, Expression locale des transcrits de cytokines marqueurs de l'arthrite inflammatoire, *Il-6* et *Il1- $\beta$* , évaluée au niveau des pattes avant entières au jour 9 par PCR quantitative (qRT-PCR). **E** et **F**, Evaluation de IL-6 sérique par dosage immuno-enzymatique (ELISA) au jour 5 et jour 9. **G**, **H**, **I** et **J**, Analyse histologique osseuse par les techniques de marquage TRAP et coloration hématoxyline/ éosine, pour quantifier l'inflammation osseuse, le nombre d'ostéoclastes, l'érosion osseuse à jour 9 et à jour 22. **K** et **L**, Images représentatives du marquage TRAP effectué chez les souris contrôles  $Ik^{+/+}$  et les souris déficientes en pDCs  $Ik^{L/L}$ . **M**, Évolution des scores visuels (tenant compte du gonflement et des rougeurs ; score compris entre 0 et 4 par patte) pour les souris  $Ik^{L/L}$  (en rouge n=6) en comparaison aux souris contrôles  $Ik^{+/+}$  (en noir n=6). Le test statistique est réalisé en prenant en compte la surface des aires sous les courbes de la totalité de la période de l'arthrite. Les valeurs représentées sont les moyennes  $\pm$  les écarts types. Le test statistique est un t-test corrigé par Mann-Whitney \* =  $P < 0.05$  ; \*\* =  $P < 0.01$  \*\*\* =  $P < 0.001$ .

L'ensemble de ces résultats indique que l'absence de pDCs périphériques dans les souris  $Ik^{L/L}$  induit une aggravation des symptômes arthritiques provoqués par l'injection de sérum K/BxN.

**Le phénotype osseux et la capacité de différenciation des ostéoclastes à l'état basal sont similaires chez les souris contrôles  $Ik^{+/+}$  et les souris mutantes  $Ik^{L/L}$ .**

Afin de nous assurer que le phénotype osseux observé était bien dû à l'arthrite et qu'il n'est pas présent à l'état basal, nous avons effectué une analyse exhaustive des os des pattes arrière chez les souris contrôles  $Ik^{+/+}$  (n=3) et les mutants  $Ik^{L/L}$  (n=3).

**Tableau M1 : Analyses histologiques osseuses des souris contrôles  $Ik^{+/+}$  et des souris mutantes**

**$Ik^{L/L}$**

	T.Ar	B.Ar	N.Ob	N.Oc	BV/TV	Tb.Th	N.Ob/T. Ar	N.Ob/B. Pm	N.Ob/Ob .Pm	N.Oc/T. Ar	N.Oc/B. Pm	N.Oc/Oc. Pm	Tb.Sp	Tb.N
<b><math>Ik^{+/+}</math> n= 3</b>	1,93 044 62	0,219 50017	435,333 333	75,6666 667	11,5288	29,1619 333	228,140 667	28,8037 333	91,21253 33	38,9542 333	4,96043 333	32,94063 33	226,885 367	3,92233 333
<b><math>Ik^{L/L}</math> n= 3</b>	1,67 597 023	0,159 16567	321,666 667	48	9,34046 667	33,8757	199,444	36,8147	93,40946 67	28,5484	5,1578	32,56323 33	333,406 9	2,7687
la p value du t test corrigé par mann whitney	0,7	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,4	0,7	0,2	1	0,7	0,1	0,1

La valeur affichée est la moyenne. Le test statistique est un t-test corrigé par Mann-Whitney, les légendes sont disponibles dans la partie « Données supplémentaires Tableau SI page 213 ».

Comme constaté dans le Tableau M1, aucun des critères analysés ne montre de différence significative entre les souris contrôles  $Ik^{+/+}$  et les souris mutantes  $Ik^{L/L}$  déficientes en pDCs. Ce résultat indique que la mutation du gène *Ikaros* ne modifie pas le phénotype osseux des souris.

Afin de nous assurer que le phénotype osseux constaté après l'induction de l'arthrite n'était pas dû à une augmentation de l'ostéoclastogénèse provoquée par la mutation *Ikaros*<sup>L/L</sup>, nous avons réalisé un test de différenciation des ostéoclastes en incubant des cellules de moelle osseuse avec RANKL. Nous n'avons pas retrouvé de différence significative entre les souris contrôles  $Ik^{+/+}$  (n=9) et  $Ik^{L/L}$  (n=8) (Fig M4).

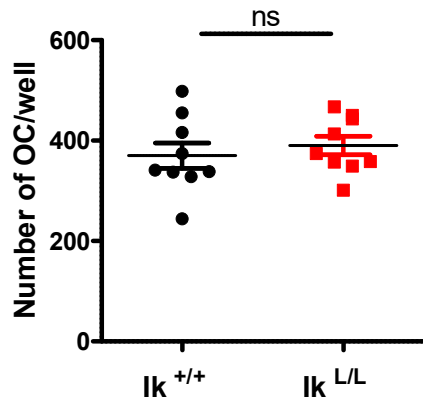


Figure M4. Analyse *in vitro* de l'ostéoclastogénèse à partir de cellules de la moelle osseuse de souris contrôles  $Ik^{+/+}$  (n=9) et  $Ik^{L/L}$  (n=8). Test de différenciation des ostéoclastes à partir de cellules de la moelle osseuse. Les cellules sont traitées avec du RANKL et la numération des ostéoclastes est réalisée 4 jours après le début de l'induction. La valeur représentée est la moyenne  $\pm$  l'écart type. Le test statistique est un t-test corrigé par Mann-Whitney ns= non significatif.

Les cellules provenant de la moelle osseuse des souris, qu'elles soient contrôles  $Ik^{+/+}$  ou mutantes  $Ik^{L/L}$ , ne montrent aucune différence dans leur capacité à se différencier en ostéoclastes sous l'effet du RANKL. Ce résultat indique que l'atteinte osseuse constatée chez les souris mutantes  $Ik^{L/L}$  n'est pas dû à un potentiel de différenciation amélioré des ostéoclastes chez les souris  $Ik^{L/L}$ .

L'ensemble de ces résultats démontre que le phénotype osseux à l'état basal ainsi que la capacité de différenciation des ostéoclastes ne sont pas modifiés par la mutation hypomorphe d'*Ikaros*, suggérant que les modifications observées après induction de l'arthrite sont exclusivement dues à l'absence des pDCs périphériques.

Afin de confirmer nos observations dans le modèle  $Ik^{L/L}$ , nous avons utilisé 2 autres approches permettant d'induire une déplétion des pDCs. Dans un premier temps, nous avons utilisé le système *Bdca-2-Dtr*, puis l'injection de l'anticorps monoclonal 120g8. Dans les deux cas, la déplétion induite des pDCs s'est avérée moins efficace que le modèle constitutif  $Ik^{L/L}$ .

**Augmentation des symptômes locaux et de l'IL-6 sérique chez les souris *Bdca-2-Dtr* déplétées en pDCs périphériques par injection de la toxine diphtérique (DT) après induction d'une arthrite par transfert de sérum.**

Après plusieurs injection de DT, nous avons constaté une nette déplétion des pDCs spléniques chez les souris transgéniques *Bdca-2-Dtr* *Tg*<sup>+</sup> par rapport aux souris contrôles non transgéniques *Bdca-2-Dtr* *Tg*<sup>-</sup> (Fig M5).

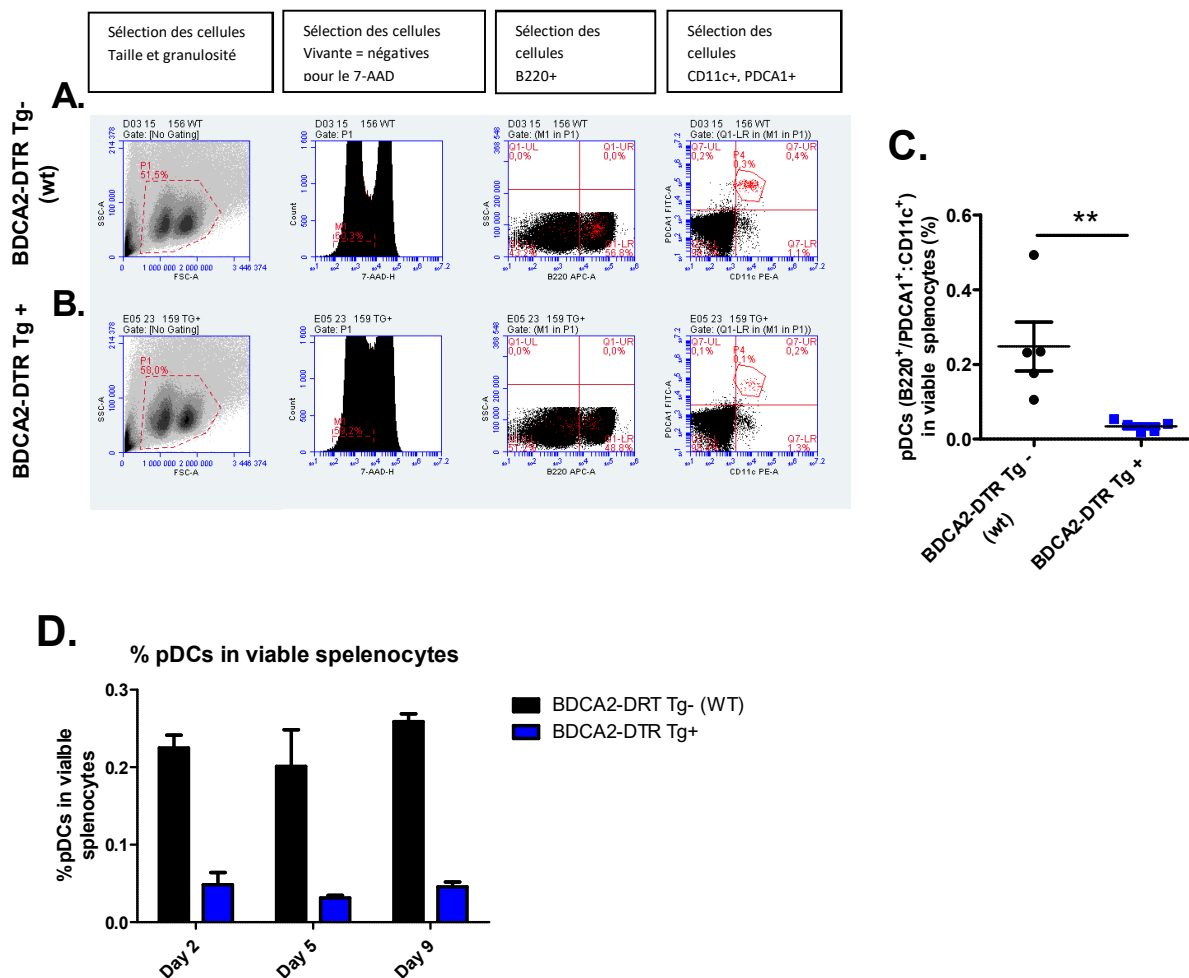


Figure M5. Réduction des pDCs au niveau de la rate de souris *Bdca-2-Dtr* *Tg*<sup>+</sup> par rapport aux souris contrôles *Bdca-2-Dtr* *Tg*<sup>-</sup> après injection de la toxine diphtérique. A et B, Images illustrant la stratégie de détection des pDCs (PDCA1<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>) par cytométrie en flux chez les souris contrôles *Bdca-2-Dtr* *Tg*<sup>-</sup> et les souris *Bdca-2-Dtr* *Tg*<sup>+</sup> au pic de l'arthrite induite par transfert de sérum K/BxN (jour 9) et sous traitement avec la toxine diphtérique (DT). C, Représentation graphique de la déplétion constatée au pic de l'arthrite induite par transfert de sérum K/BxN (jour 9) chez les souris mutantes *Bdca-2-Dtr* *Tg*<sup>+</sup> (n=5) par rapport aux souris contrôles *Bdca-2-Dtr* *Tg*<sup>-</sup> (n=5). D, Représentation graphique du suivi de la déplétion des pDCs avec traitement au DT, à jour 2, 5 et 9 sur des souris mutantes *Bdca-2-Dtr* *Tg*<sup>+</sup> par rapport aux souris contrôles *Bdca-2-Dtr* *Tg*<sup>-</sup>.



La valeur représentée est la moyenne  $\pm$  l'écart type. Le test statistique est un t-test corrigé par Mann-Whitney \*\* =  $P < 0.01$ .

Ce résultat, montre la capacité de déplétion des pDCs par l'injection de DT dans le modèle de souris mutantes *Bdca-2-Dtr Tg+*. Cependant, l'efficacité semble être plus faible par comparaison au modèle déficient génétiquement en pDCs *Ikaros<sup>L/L</sup>*, car une présence résiduelle de pDCs est observée.

L'arthrite induite par transfert de sérum STA K/BxN dans le modèle de souris *Bdca-2-Dtr* nous a permis de constater une augmentation significative du gonflement articulaire (Fig M6A) et des signes cliniques arthritiques (Fig M6B) chez les souris déplétées en pDCs *Bdca-2-Dtr Tg+* par rapport aux souris contrôles *Bdca-2-Dtr Tg-*. Cette constatation s'accompagne d'une augmentation significative de l'IL-6 sérique à J5 (Fig M6C). Cependant, nous n'avons pas observé d'augmentation significative de l'atteinte osseuse (Fig M6 D, E et F) comme cela est le cas dans le modèle *Ik<sup>L/L</sup>*. Cette différence entre les 2 modèles pourrait s'expliquer par la présence de pDCs résiduelles chez les souris *Bdca-2-Dtr Tg+* après l'induction de la déplétion. En effet, les pDCs sont une sous population constituée d'un nombre faible de cellules, mais dont l'activité biologique est importante. Il est donc possible que les rares pDCs résiduelles puissent atténuer le phénotype d'atteinte osseuse dans les souris *Bdca-2-Dtr Tg+*.

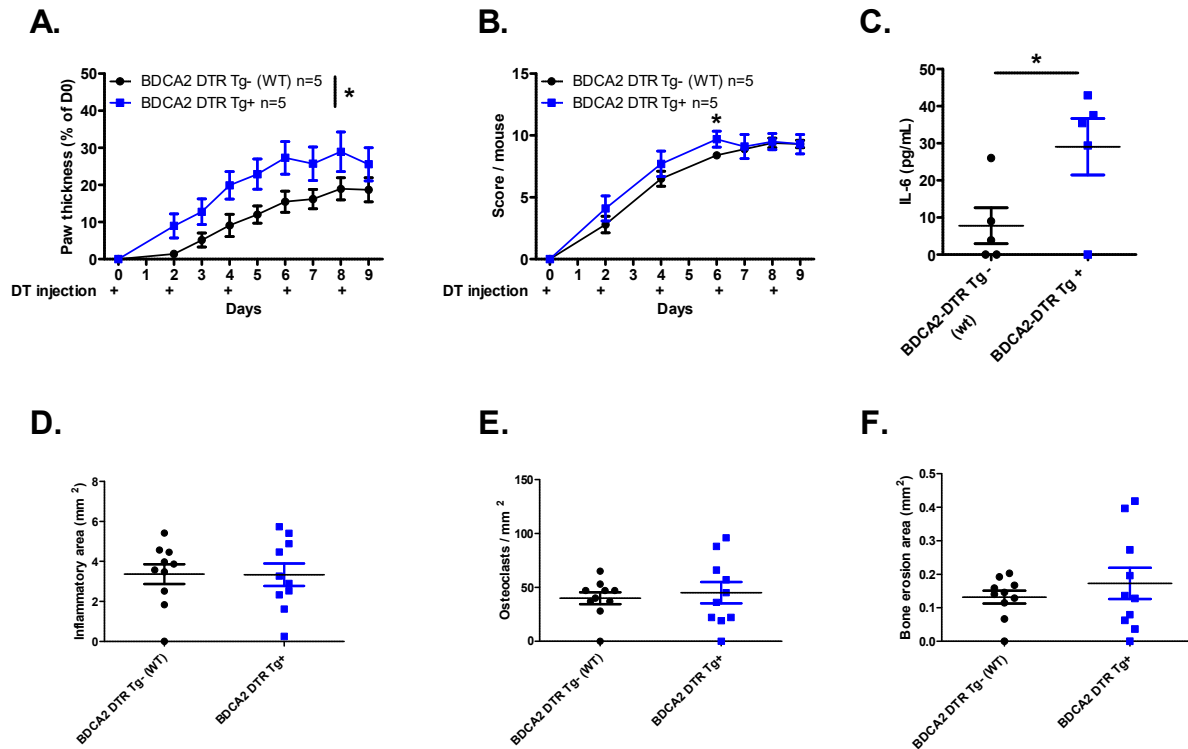


Figure M6. Augmentation des signes cliniques et du niveau d'IL-6 dans le sérum chez les souris déficientes en pDCs *Bdca-2-Dtr Tg+* par rapport aux souris contrôles *Bdca-2-Dtr Tg-*. **A**, Évolution du gonflement articulaire, après induction de l'arthrite (STA K/BxN) chez les souris déficientes en pDCs *Bdca-2-Dtr Tg+* (en bleu n=5) en comparaison aux souris contrôles *Bdca-2-Dtr Tg-* (en noir n=5), évalué par mesure au pied à coulisse et rapportée aux mesures correspondantes au jour 0 (avant l'induction de l'arthrite). Le test statistique est réalisé en prenant en compte l'aire sous la courbe de la totalité de la période de l'arthrite. **B**, Évolution des scores visuels (gonflement, rougeur) par l'attribution d'un score entre 0 et 4 par patte pour les souris *Bdca-2-Dtr Tg+* (en bleu n=5) en comparaison aux souris contrôles *Bdca-2-Dtr Tg-* (en noir n=5). **C**, Evaluation de IL-6 sérique par dosage immuno-enzymatique (ELISA), au jour 5. **D**, **E** et **F** Analyse histologique osseuse par les techniques de marquage TRAP et de la coloration hématoxyline/éosine, pour quantifier l'inflammation osseuse (**D**), le nombre d'ostéoclastes (**E**), l'érosion osseuse (**F**) à jour 9. La valeur représentée correspond à la moyenne  $\pm$  l'écart type. Le test statistique est un t-test corrigé par Mann-Whitney \* =  $P < 0.05$ .

**Détérioration des signes cliniques locaux et augmentation de l'expression d'IL-6 sérique chez les souris déplétées en pDCs périphériques par injection de l'anticorps monoclonal 120g8.**

L'évaluation de la déplétion des pDCs nous a permis de constater, à jour 9, une réduction limitée des pDCs spléniques chez les souris dans lesquelles a été injecté l'anticorps monoclonal 120g8 (Fig M7A et B).

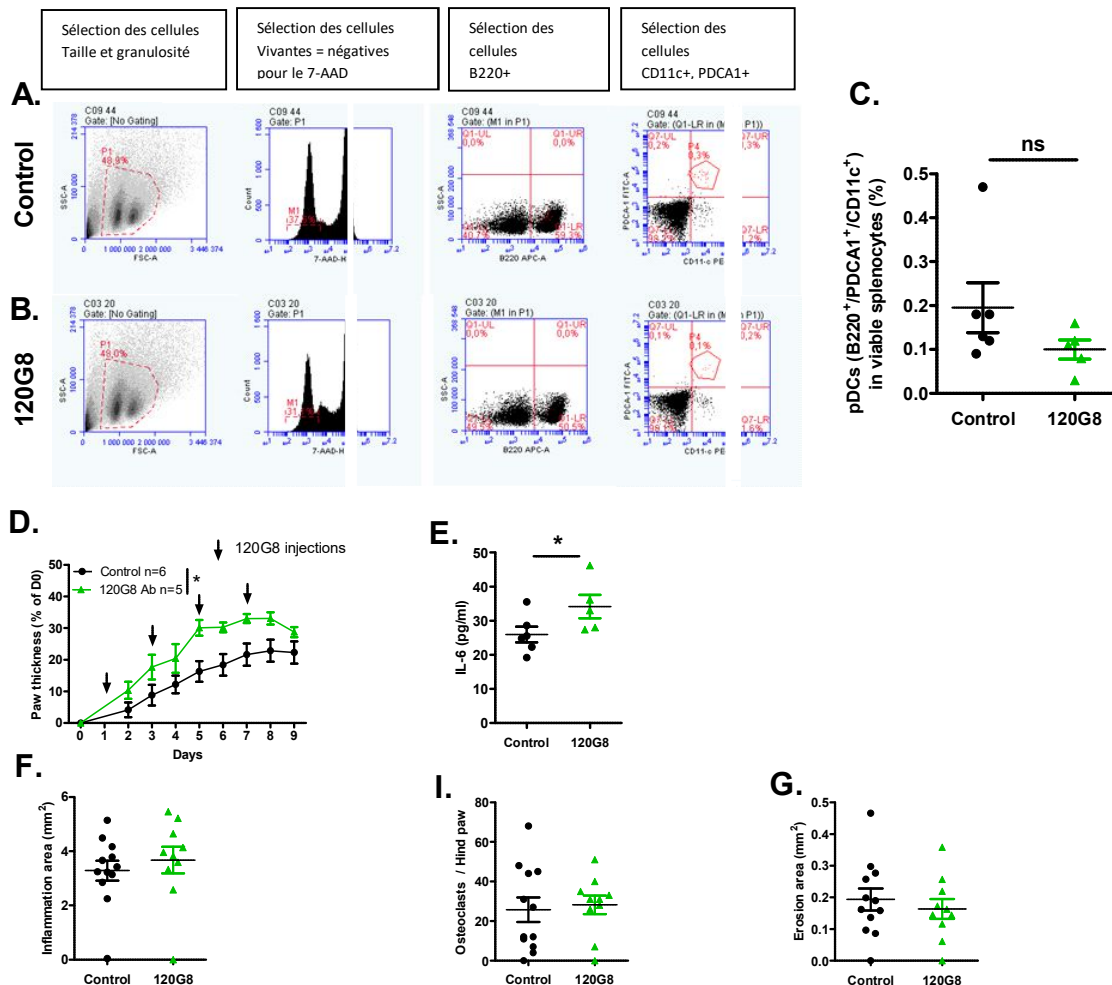


Figure M7. Augmentation des signes cliniques et du niveau d'IL-6 sérique des souris montrant une faible réduction de pDCs, induite par injection de 120g8, à jour 9 par rapport aux souris contrôles dans lesquelles a été injecté un anticorps contrôle. A et B, Images illustrant la stratégie de détection des pDCs (PDCA1<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>) dans la rate, par cytométrie en flux à jour 9, respectivement chez les souris contrôles et les souris ayant été traitées par l'anticorps 120g8. C, Représentation graphique de la déplétion constatée chez les souris injectées par 120g8 au jour 9 par rapport aux souris contrôles. D, Évolution du gonflement articulaire, après induction de l'arthrite (STA K/BxN) chez les souris présentant une réduction en pDCs injectées par le 120g8 (en vert n=5) en comparaison aux souris contrôles (en noir n=6), évaluée par mesure au pied à coulisse et rapportée aux mesures correspondantes au jour 0 (avant l'induction de l'arthrite). Le test statistique est réalisé en prenant en compte l'aire sous la courbe de la totalité de la période de l'arthrite. E, Quantification de l'IL-6 sérique par dosage immuno-enzymatique (ELISA), à jour 5. F, I et G Analyse histologique osseuse par les

techniques de marquage TRAP et coloration hématoxyline/éosine pour quantifier l'inflammation osseuse (F), le nombre d'ostéoclastes (I), l'érosion osseuse (G) à jour 9. La valeur représentée est la moyenne  $\pm$  l'écart type. Le test statistique est un t-test corrigé par Mann-Whitney \* =  $P < 0.05$  ; \*\* =  $P < 0.01$  \*\*\* =  $P < 0.001$ .

Ce résultat montre que l'effet de l'anticorps monoclonal 120g8 est surement partiel et temporaire. Ainsi la capacité de déplétion des pDCs par l'injection de l'anticorps 120g8 montre une efficacité réduite par rapport au modèle *Ikaros*<sup>L/L</sup> déficient constitutivement en pDCs.

L'arthrite induite par transfert de sérum STA K/BxN dans le modèle de déplétion de pDCs par injection de l'anticorps monoclonal 120g8, nous a permis de constater une augmentation significative du gonflement articulaire (Fig M7D) chez les souris déplétées en pDCs par rapport aux souris contrôles. Cette constatation s'accompagne d'une augmentation significative du niveau d'IL-6 sérique à J5 (Fig M7E). Cependant, nous n'avons pas observé de phénotype articulaire et osseux (Fig M7 F, I et G) similaire au modèle déficient constitutivement en pDCs *Ik*<sup>L/L</sup> (Fig M3 G, H, I, J).

Conformément aux données obtenues sur le modèle *Bdca-2-Dtr*, il existe probablement un effet dose/ réponse, car il semble y avoir une corrélation négative entre la quantité de pDCs résiduelles présentes dans la rate des souris et l'augmentation des symptômes arthritiques, en particulier concernant l'atteinte osseuse qui semble être préservée par une quantité résiduelle minimale de pDCs.

### **L'application topique d'imiquimod (IMQ 5%) induit le recrutement articulaire des pDCs.**

Afin de déterminer si les pDCs peuvent avoir un effet protecteur sur l'arthrite inflammatoire, comme semblent l'indiquer nos premiers résultats obtenus sur des souris déficientes en pDCs, nous avons décidé d'induire le recrutement de ces cellules au niveau des articulations arthritiques. Pour tester notre hypothèse nous avons utilisé un ligand synthétique du TLR7, l'imiquimod (IMQ), connu pour sa capacité à recruter des pDCs dans les tumeurs cutanées (mélanome murin) (Drobits et al., 2012).

Nous avons d'abord validé la capacité du traitement topique par imiquimod dans l'induction du recrutement de pDCs au niveau articulaire. Comme le montre la figure M8, nous observons dans le tissu péri-articulaire des pattes de souris traitées par l'IMQ, une population cellulaire correspondant aux pDCs (CD45<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, B220<sup>low</sup>, PDCA1<sup>+</sup>). Cette population est présente en proportion plus faible dans le tissu péri-articulaire des souris non traitées.

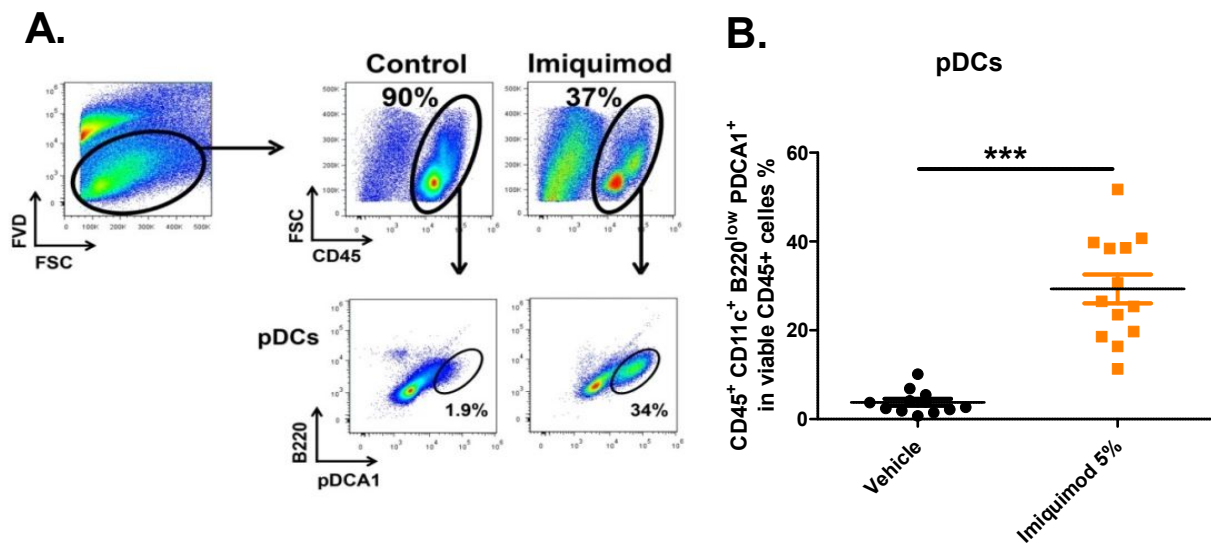


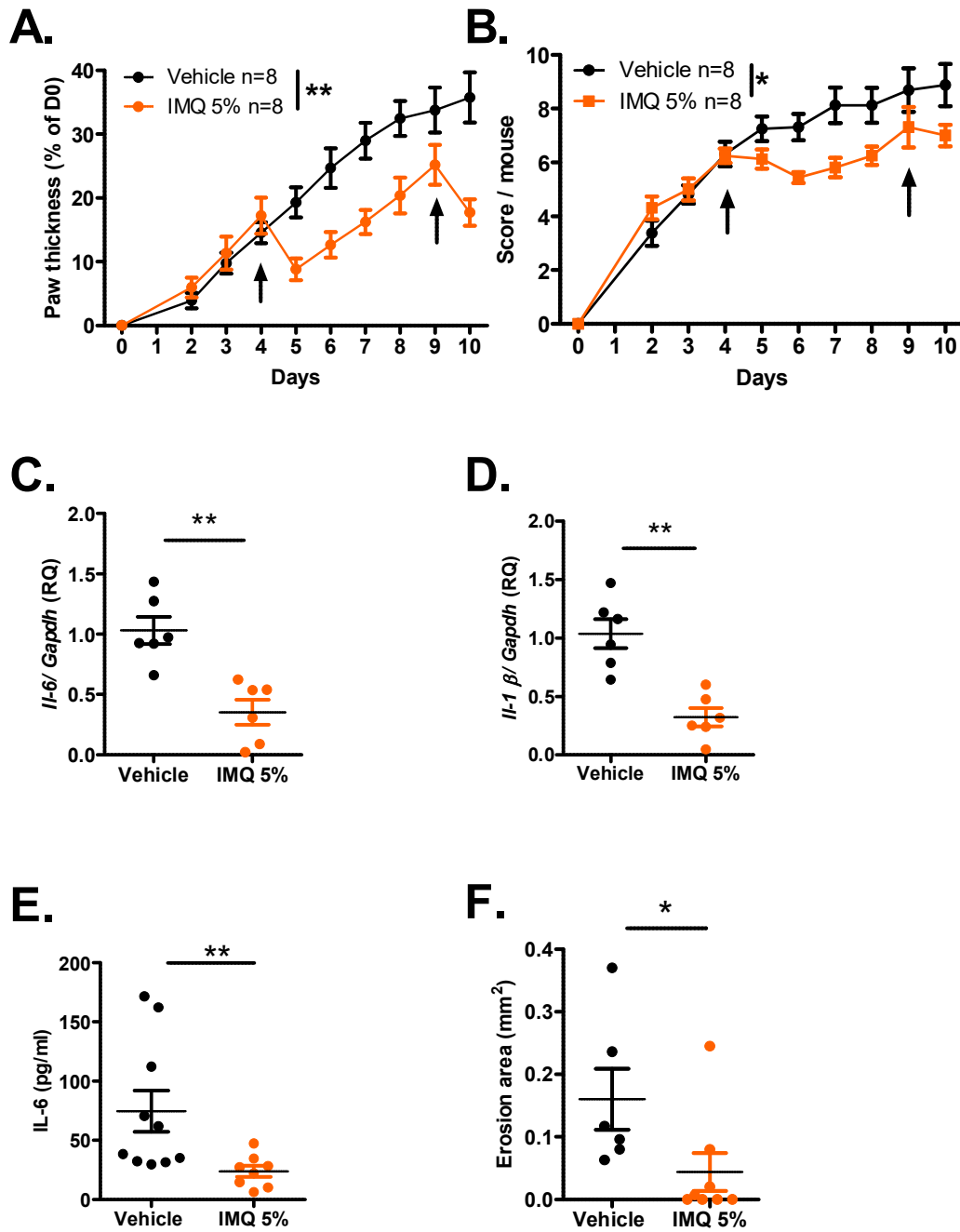
Figure M8. **Recrutement péri-articulaire de pDCs induit par l'application topique d'imiquimod (IMQ 5%).** A, Images illustrant la stratégie de détection des pDCs (CD45<sup>+</sup>, PDCA1<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, B220<sup>low</sup>) par cytométrie en flux dans le tissu péri-articulaire des souris contrôle de même portée traitées avec la crème contrôle (vehicle) et des souris traitées par la crème contenant 5% d'IMQ. B, Représentation graphique du recrutement de pDCs constaté chez les souris traitées avec l'IMQ un jour après traitement par rapport aux souris contrôles traitées par la crème contrôle (vehicle).

Ce résultat illustre la capacité de l'application topique d'imiquimod dans l'induction du recrutement local des pDCs au niveau de l'articulation inflammée. Nous avons alors choisi cette stratégie pour enrichir l'articulation en pDCs afin d'évaluer l'effet de ces cellules dans le contexte de l'arthrite inflammatoire chez les souris sauvages.

**Les pDCs recrutées par l'application topique d'imiquimod (IMQ 5%) réduisent les symptômes locaux, les marqueurs systémiques et les marqueurs histologiques osseux caractérisant l'inflammation arthritique dans le modèle STA K/BxN.**

Nous avons évalué l'effet du recrutement articulaire des pDCs induit par l'application cutanée d'imiquimod et nous avons constaté une réduction notable et rapide de l'inflammation après chaque traitement. Deux applications, au jour 4 (phase précoce) et au jour 9 (pic des symptômes cliniques), suffisent à réduire significativement le gonflement des articulations (Fig M9A) et les symptômes cliniques (Fig M9B) du groupe traité. Cette réduction du phénotype inflammatoire articulaire est confirmée par une diminution significative de l'expression locale des transcrits de cytokines marqueurs de l'inflammation arthritique dans

ce modèle, l'*Il-6* (Fig M9C) et l'*Il-1 $\beta$*  (Fig M9D). L'IL-6 sérique est elle aussi significativement réduite au jour 5 (phase précoce) (Fig M9E) chez les souris traitées par l'imiquimod. L'analyse histologique des pattes arrière montre clairement une réduction de l'érosion osseuse au pic des symptômes cliniques à J9 (Fig M9F).



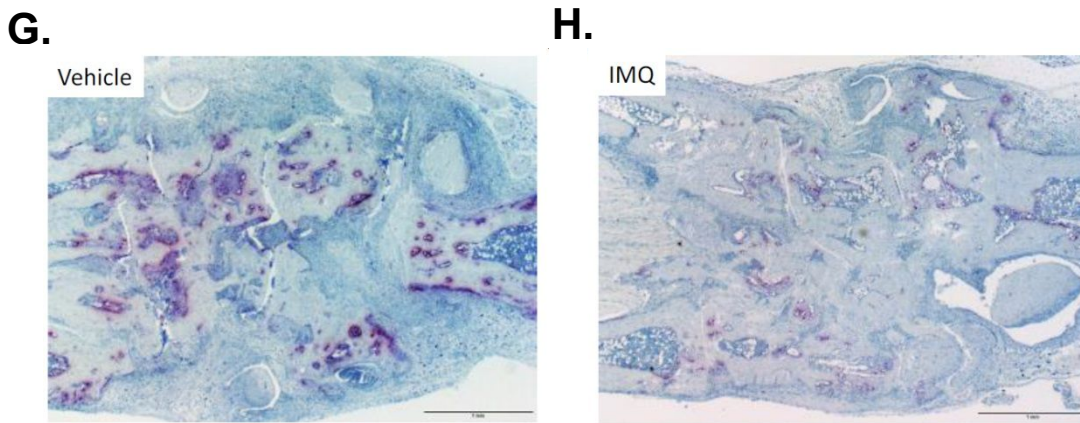


Figure M9. **L'application topique d'imiquimod (IMQ 5%) réduit significativement les symptômes locaux, les marqueurs systémiques et les marqueurs histologiques osseux caractérisant l'inflammation arthritique dans le modèle murin d'arthrite induite K/BxN.** **A**, Évolution du gonflement articulaire après induction de l'arthrite (STA K/BxN) chez les souris contrôle traitées avec la crème véhicule (en noir n=8) en comparaison aux souris traitées par l'application topique d'imiquimod (IMQ 5%) (en orange n=8). L'épaisseur de l'articulation est mesurée au pied à coulisse et rapportée aux mesures correspondantes au jour 0 (avant l'induction de l'arthrite). Le test statistique est réalisé en prenant en compte l'aire sous la courbe de la période débutant au jour après le premier traitement. **B**, Évolution des scores visuels (gonflement, rougeur) par l'attribution d'un score entre 0 et 4 par patte souris contrôle traitées avec la crème véhicule (en noir n=8) en comparaison aux souris traitées par l'application topique d'imiquimod (IMQ 5%) (en orange n=8). Le test statistique est réalisé en prenant en compte l'aire sous les courbes de la période débutant au jour après le premier traitement. **C**, et **D**, Expression locale des transcrits de cytokines marqueurs d'arthrite inflammatoire, *Il-6* et *Il-1 $\beta$* , évaluées au niveau des pattes avant entières au jour 10 (un jour après le 2<sup>ème</sup> traitement) par PCR quantitative (qRT-PCR). **E**, Evaluation de l'IL-6 sérique par dosage immuno-enzymatique (ELISA), au jour 5. **F**, Analyse histologique osseuse, effectuée sur les pattes arrière, par la technique de marquage TRAP pour quantifier l'érosion osseuse à jour 10. **G et H**, Images représentatives du marquage TRAP effectué chez les souris contrôles traitées avec la crème véhicule et les souris traitées avec l'application topique d'imiquimod (IMQ 5%). Les valeurs représentées sont les moyennes  $\pm$  l'écart type. Les flèches indiquent les traitements. Le test statistique est un t-test corrigé par Mann-Whitney \* =  $P < 0.05$  ; \*\* =  $P < 0.01$ .

Afin de confirmer que l'effet protecteur de l'imiquimod, en application topique, est dépendant du recrutement des pDCs au niveau articulaire, nous avons décidé d'utiliser ce traitement chez des souris déficientes en pDCs. Nous avons ainsi évalué l'effet de l'application d'imiquimod dans le modèle *Ikaros*<sup>L/L</sup> de souris déficientes constitutivement en pDCs. Pour cela, nous avons induit l'arthrite STA K/BxN chez les souris contrôle *Ik*<sup>+/+</sup> et chez les souris déficientes en pDCs *Ik*<sup>L/L</sup>, et nous avons par la suite traité les deux groupes à deux reprises (jour 4 et jour 9) par l'imiquimod.

Nous avons d'abord évalué la proportion de pDCs dans le tissu péri-articulaire à jour 10 (1 jour après le 2<sup>ème</sup> traitement) dans les deux groupes de souris traitées (Fig M10).

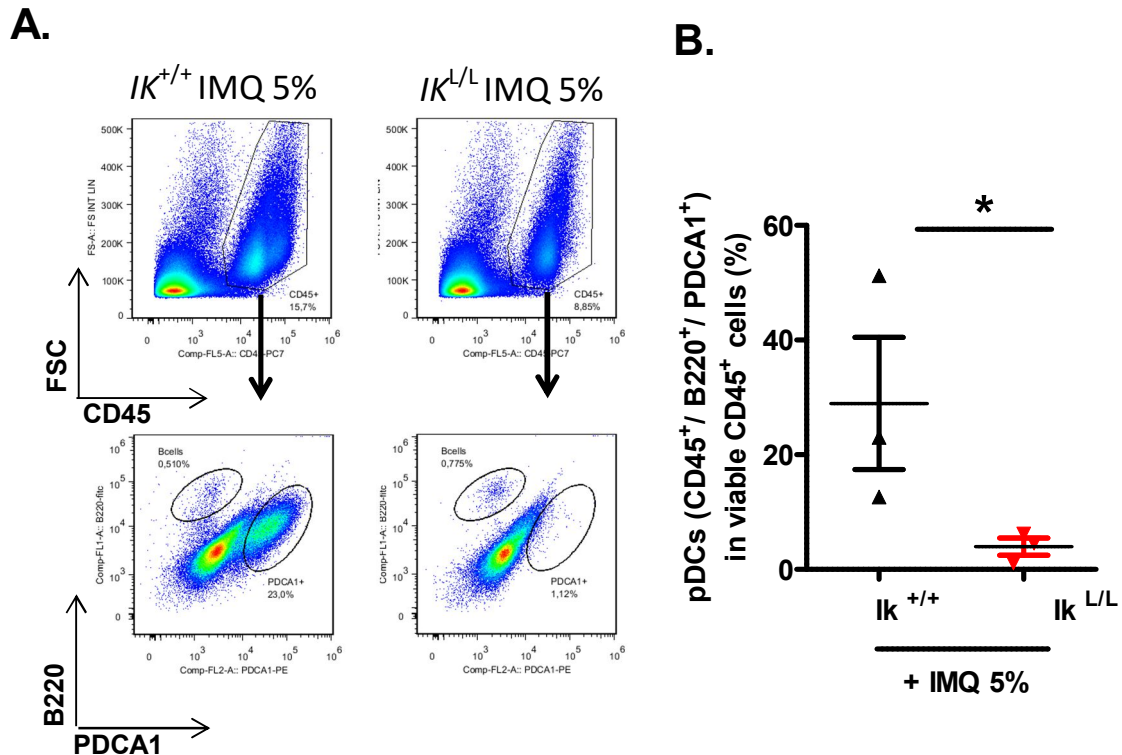


Figure M10. L'imiquimod, en application topique, induit un recrutement péri-articulaire des pDCs chez les souris contrôles *Ik*<sup>+/+</sup> mais pas chez les souris déficientes en pDCs *Ik*<sup>L/L</sup>. **A** Images illustrant la stratégie de détection des pDCs (CD45<sup>+</sup>, PDCA1<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, B220<sup>low</sup>) par cytométrie en flux dans le tissu péri-articulaire des souris contrôles *Ik*<sup>+/+</sup> et des souris déficientes en pDCs *Ik*<sup>L/L</sup>, après traitement des deux groupes par la crème contenant 5% d'IMQ. **B**, Représentation graphique du recrutement de pDCs dans le tissu péri-articulaire des souris contrôles *Ik*<sup>+/+</sup> et des souris déficientes en pDCs *Ik*<sup>L/L</sup>, un jour après le deuxième traitement par l'imiquimod.

Sans surprise, les souris contrôles *Ik*<sup>+/+</sup> ont montré une proportion plus élevée de pDCs dans le tissu péri-articulaire par rapport à celle observée chez les souris déficientes en pDCs *Ik*<sup>L/L</sup>. Ce résultat suggère que les pDCs recrutées au niveau articulaire après l'application d'imiquimod sont d'origine périphérique.

Afin de constater si la réponse à l'imiquimod varie en présence et en absence de pDCs articulaires, nous avons évalué les symptômes arthritiques et l'effet de l'application d'imiquimod sur ces symptômes chez les souris contrôles *Ik*<sup>+/+</sup> et chez les souris déficientes en pDCs *Ik*<sup>L/L</sup>. Nous avons alors constaté que le traitement réduit clairement les symptômes chez les souris contrôle *Ik*<sup>+/+</sup> (n=3), alors que les souris déficientes en pDCs *Ik*<sup>L/L</sup> (n=3) ne montraient pas un effet aussi net avec le traitement (Fig M11A et B). Une reprise de poids chez les souris contrôles *Ik*<sup>+/+</sup> (n=3) traitées est aussi constatée alors que ce n'est pas le cas chez les souris déficientes en pDCs *Ik*<sup>L/L</sup> (n=3) (Fig M11C). Le taux d'IL-6 sérique semble



aussi réduit chez les souris sauvages  $Ik^{+/+}$  traitées alors qu'il reste élevé chez les souris mutantes  $Ik^{L/L}$  ayant elles aussi reçu le traitement (Fig M11D).

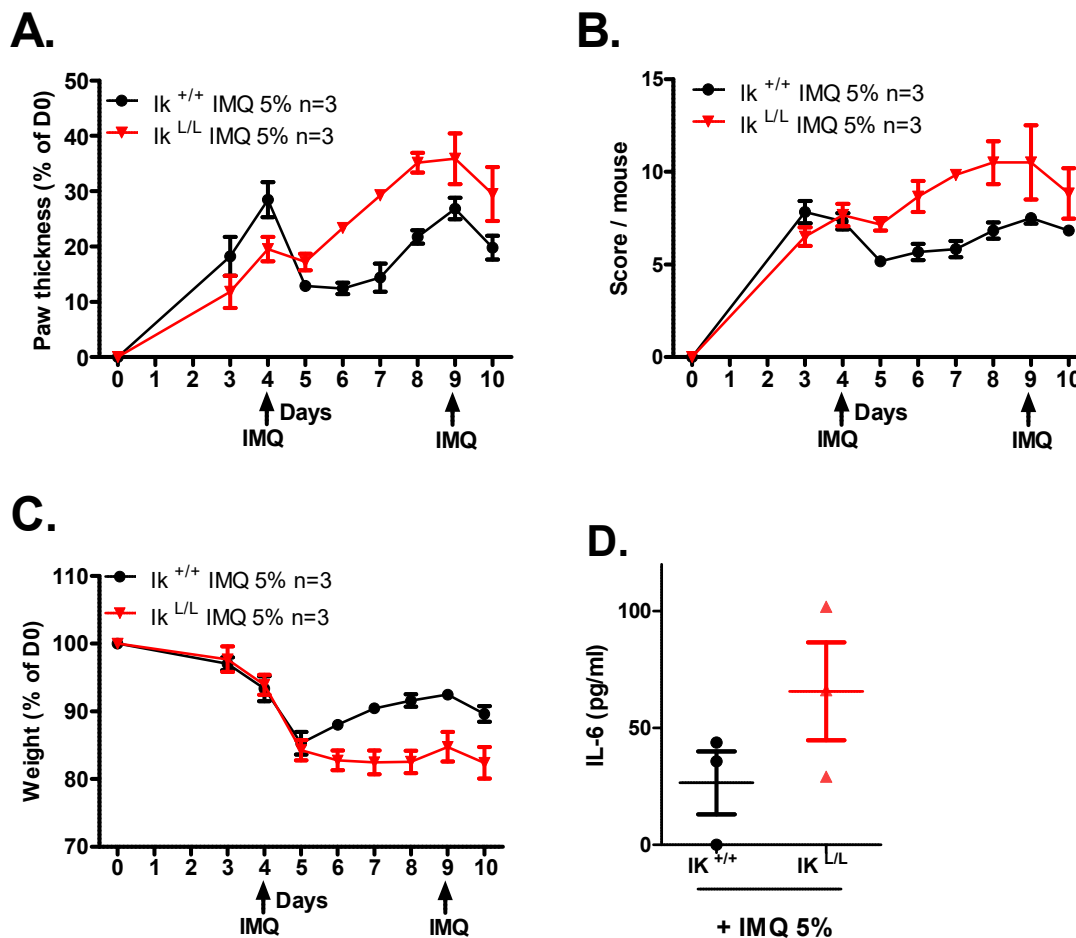


Figure M11. L'effet bénéfique de l'imiquimod sur les symptômes arthritiques est réduit chez les souris déficientes en pDCs  $Ik^{L/L}$  par rapport aux souris contrôle  $Ik^{+/+}$ . **A.** Évolution du gonflement articulaire, après induction de l'arthrite (STA K/BxN) chez les souris contrôles  $Ik^{+/+}$  (en noir n=3) et les souris déficientes en pDCs  $Ik^{L/L}$  (en rouge n=3) quand les deux groupes sont traités par application topique d'imiquimod (IMQ 5%) ; les mesures sont évaluées au pied à coulisse et rapportées aux mesures correspondantes au jour 0 (avant l'induction de l'arthrite). **B.** Évolution des scores visuels (gonflement, rougeur) par l'attribution d'un score entre 0 et 4 par patte souris contrôle  $Ik^{+/+}$  (en noir n= 3) et souris déficientes en pDCs  $Ik^{L/L}$  (en rouge n=3) traitées par application topique d'imiquimod (IMQ 5%). **C.** Évolution du poids des souris rapporté au poids à jour 0 pour les souris traitées par application topique d'imiquimod (IMQ 5%) d'animaux contrôles  $Ik^{+/+}$  (en noir n= 3) et déficients en pDCs  $Ik^{L/L}$  (en rouge n=3). **D.** Evaluation de l'IL-6 sérique par dosage immuno-enzymatique (ELISA) au jour 5.

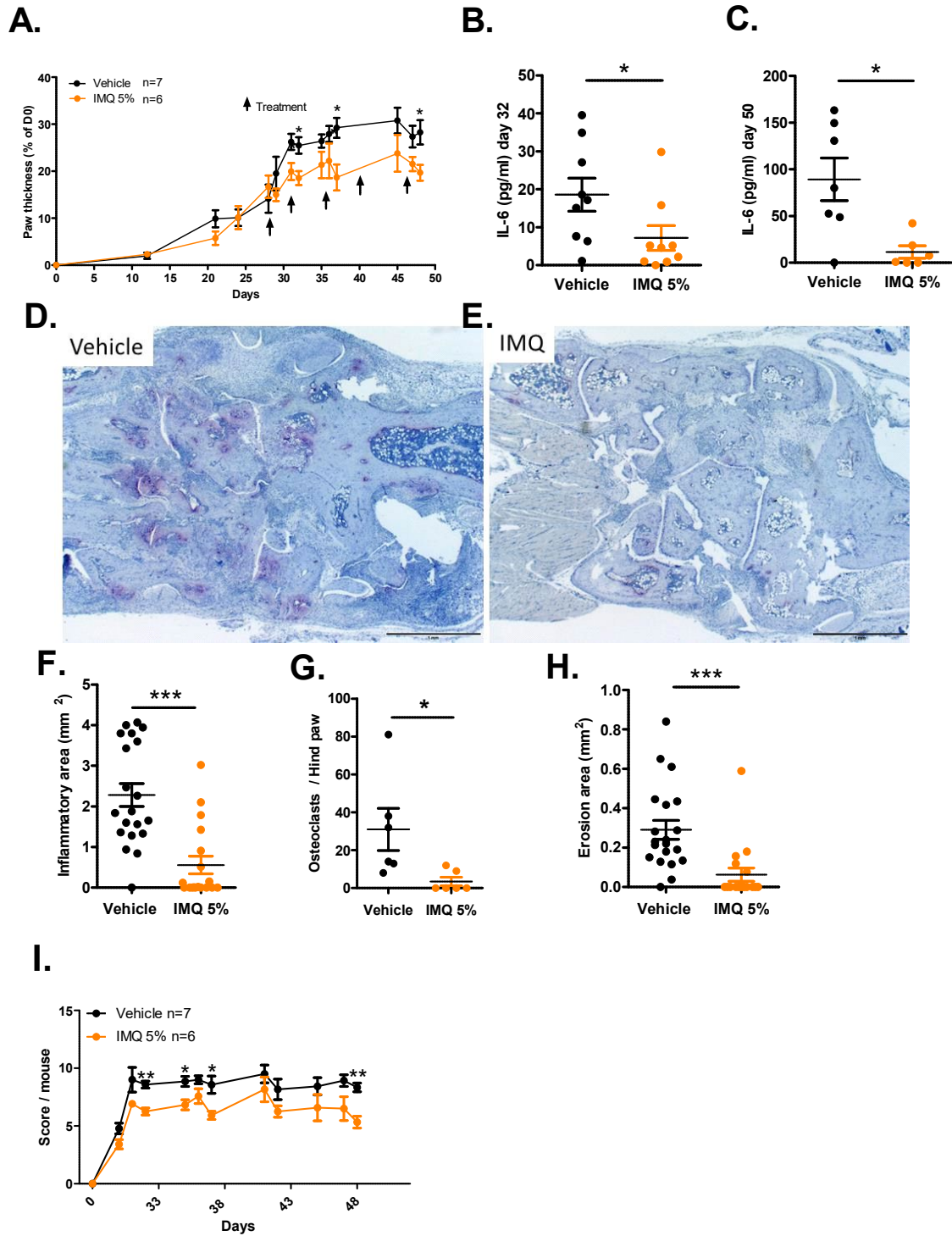
Cette expérience montre une réduction de l'efficacité du traitement par l'imiquimod en absence d'un recrutement articulaire des pDCs. Cela suggère fortement que l'effet protecteur de l'IMQ dans les modèles murins d'arthrite dépend essentiellement des pDCs recrutées.

L'ensemble de ces résultats confirme un effet protecteur induit par l'application d'imiquimod et du recrutement de pDCs au niveau articulaire dans le modèle STA K/BxN. Cependant, le

fait que ce modèle soit exclusivement dépendant de l'immunité innée nous a poussés à évaluer l'efficacité d'un tel traitement dans d'autres modèles murins dépendants de l'immunité adaptative, comme le modèle d'induction par injections répétées de collagène hétérologue (CIA) et le modèle dépendant du TNF (souris transgéniques pour hTNF).

**L'application topique d'imiquimod (IMQ 5%) réduit les symptômes locaux, l'IL-6 sérique et les marqueurs histologiques osseux caractérisant l'inflammation arthritique dans le modèle CIA.**

Afin d'évaluer cette hypothèse qui suggère un effet protecteur des pDCs et la possibilité d'induire cet effet par leurs recrutements au site de l'inflammation arthritique articulaire, nous avons testé l'effet du traitement topique avec l'imiquimod dans le modèle d'arthrite induite par l'injection répétée (immunisation) de collagène hétérologue (CIA). Pour cela, nous avons induit l'arthrite chez les souris DBA/1 (un fond génétique plus propice au développement d'arthrite par cette méthode). Le développement de l'arthrite nécessitant plus de temps pour se mettre en place et arriver au pic des symptômes cliniques par rapport au modèle K/BxN, nous avons traité les souris à 5 reprises. Nous avons constaté, et cela à partir du premier traitement, une réduction claire et significative des symptômes. Cet effet est observé après chaque traitement topique par l'imiquimod (Fig M12A, I, J). Nous avons aussi constaté une réduction significative de l'IL-6 sérique, après le 2<sup>ème</sup> traitement (32 ième jour) (Fig M12B), mais aussi au pic des symptômes cliniques (50 ième jour) (Fig M12C). Ces constatations sont accompagnées par une réduction très importante du phénotype arthritique osseux, comme le montre l'analyse histologique des pattes arrière (Fig M12D et E). Nous pouvons ainsi constater, au pic des symptômes cliniques, une réduction significative de l'inflammation osseuse (Fig M12F), du nombre d'ostéoclastes (Fig M12G) et de l'érosion osseuse (Fig M12H) chez les souris traitées avec l'imiquimod par rapport aux souris traitées avec une crème véhicule (contrôle).



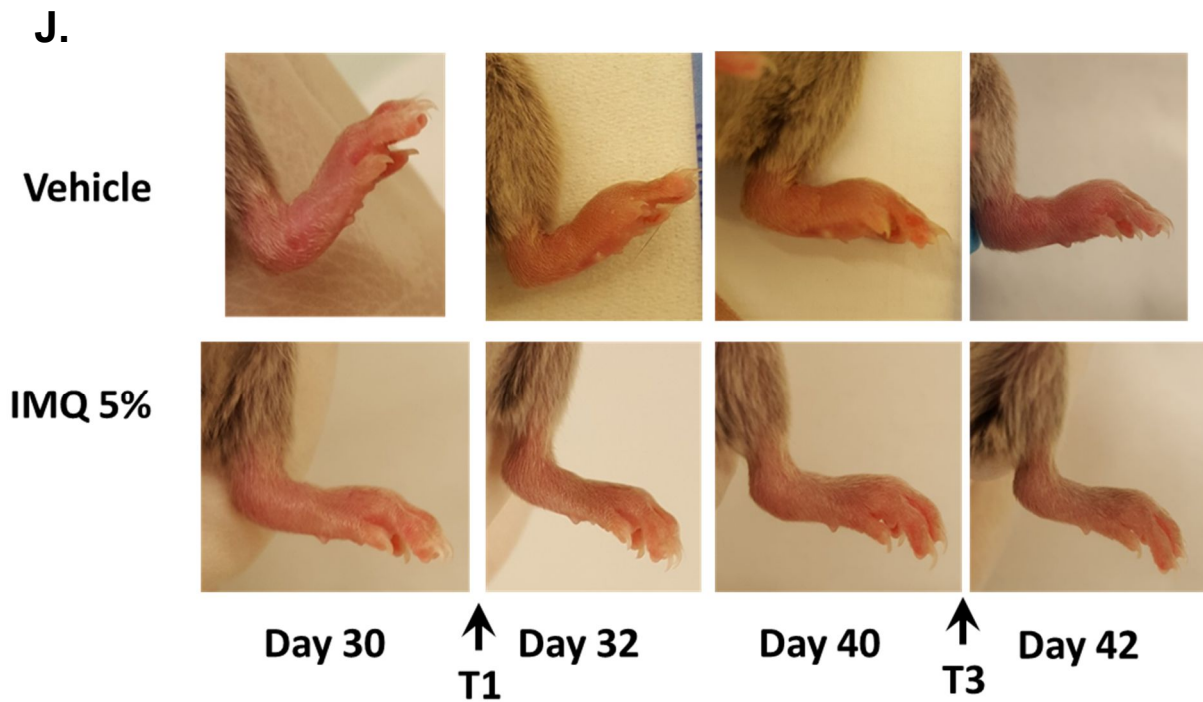


Figure M12. L'application topique d'imiquimod (IMQ 5%) réduit significativement les symptômes locaux, l'IL-6 sérique et les marqueurs histologiques osseux caractérisant l'inflammation arthritique dans le modèle murin d'arthrite induite par injection répétée de collagène hétérologue (CIA). **A**, Évolution du gonflement articulaire, après induction de l'arthrite (CIA) chez les souris contrôles traitées avec la crème véhicule (en noir n=7) en comparaison aux souris traitées avec l'application topique d'imiquimod (IMQ 5%) (en orange n=6), évaluée par mesure au pied à coulisse et rapportée aux mesures correspondantes au jour 0 (avant l'induction de l'arthrite). Le test statistique est réalisé entre les résultats sur un seul jour entre les deux groupes. **B** et **C**, Evaluation de IL-6 sérique par dosage immuno-enzymatique (ELISA) au jour 32 et au jour 50. **D** et **E**, Images représentatives du marquage TRAP effectué chez les souris contrôles traitées avec la crème véhicule et les souris traitées avec l'application topique d'imiquimod (IMQ 5%). **F**, **G** et **H**, Analyse histologique osseuse, effectuée sur les pattes arrière pour quantifier l'inflammation osseuse, le nombre d'ostéoclastes et l'érosion osseuse au jour 50 (pic des symptômes cliniques). **I**, Évolution des scores visuels (gonflement, rougeur quantifiés par l'attribution d'un score entre 0 et 4 par patte) des souris contrôles traitées avec la crème véhicule (en noir n=7) en comparaison aux souris traitées avec l'application topique d'imiquimod (IMQ 5%) (en orange n=6). Le test statistique est réalisé entre les résultats sur un seul jour entre les deux groupes. **J**, Images représentatives de l'évolution des pattes de souris contrôles, traitées avec la crème véhicule (en noir n=7), en comparaison aux souris traitées avec l'application topique d'imiquimod (IMQ 5%). Les valeurs représentées sont les moyennes  $\pm$  les écarts types. Le test statistique est un t-test corrigé par Mann-Whitney \* =  $P < 0.05$  ; \*\* =  $P < 0.01$ .

Ce résultat indique que l'effet protecteur des pDCs recrutées par l'application topique d'imiquimod se révèle aussi efficace dans un modèle murin d'arthrite dépendant de l'immunité innée.

**L'application topique d'imiquimod (IMQ 5%) réduit les marqueurs histologiques osseux caractérisant l'inflammation arthritique dans le modèle hTNF.**

Finalement, nous avons décidé d'évaluer l'effet du traitement par l'Imiquimod dans un autre modèle murin d'arthrite spontanée et érosive basé sur la production excessive du TNF $\alpha$  humain, le modèle hTNG-Tg. De plus, le TNF $\alpha$  est une cytokine largement impliquée dans la physiopathologie de la PR chez l'Homme. Ces souris sont traitées dès leur naissance avec un Ac anti-TNF $\alpha$  afin qu'elles ne développent l'arthrite qu'au moment souhaité. Nous avons alors constitué deux groupes de souris hTNG-Tg+. Les traitements topiques ont été réalisés, soit avec l'imiquimod (IMQ 5%) soit avec la crème véhicule contrôle pendant 4 semaines après l'arrêt du traitement des souris avec l'Ac anti-TNF $\alpha$ . Nous pouvons ainsi constater, comme dans les autres modèles d'arthrite induite, une réduction significative de l'inflammation osseuse (Fig M13A), du nombre d'ostéoclastes (Fig M13B) et de l'érosion osseuse (Fig M13C) chez les souris traitées avec l'imiquimod par rapport aux souris traitées avec une crème contrôle (vehicle).

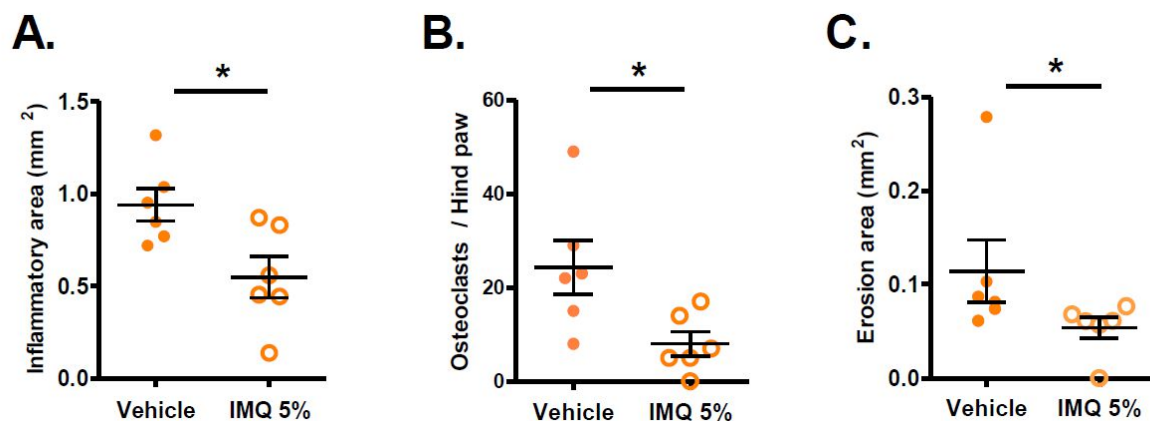


Figure M13. **A, B et C, Analyse histologique osseuse, effectuée sur les pattes arrière pour quantifier l'inflammation osseuse, le nombre d'ostéoclastes et l'érosion osseuse réalisé après 4 semaines de traitement avec l'imiquimod (IMQ 5%) ou la crème contrôle (véhicule).**

Après avoir confirmé l'effet bénéfique de l'imiquimod (IMQ 5%) sur l'arthrite inflammatoire, nous avons voulu mieux comprendre son mécanisme d'action. Tout d'abord, nous avons confirmé que son action est déclenchée par une signalisation dépendante de TLR7. Par la suite, nous avons analysé les populations de cellules immunitaires présentes au niveau péri-articulaire et finalement nous nous sommes intéressés à l'expression locale des transcrits des principaux gènes impliqués dans l'arthrite induite chez les souris avec et sans traitement par l'imiquimod (IMQ 5%).

**Le mode d'action de l'imiquimod (IMQ 5%) en application topique passe par l'activation du TLR7.**

Pour déterminer la nécessité du TLR7 dans le mode d'action de l'imiquimod en application topique dans les modèles d'arthrite, nous avons induit l'arthrite par transfert de sérum (STA) K/BxN chez des souris invalidées pour le gène *Tlr7*. Deux groupes d'animaux *Tlr7*<sup>-/-</sup> ont été suivis durant leur période d'arthrite transitoire, un groupe contrôle, traité avec la crème véhicule (n=6) et un groupe traité avec la crème contenant 5% d'Imiquimod (n=6). Comme on le voit sur la figure M14, les souris *Tlr7* KO, qu'elles soient traitées avec la crème véhicule ou avec l'IMQ 5% ne montrent aucun effet régulateur de l'inflammation articulaire. Cela est constaté sur les mesures du gonflement artériel au pied à coulisse (Fig M14A), les scores (Fig M14B) ou encore avec le suivi du poids des souris (Fig M14C). Cette absence d'action de l'IMQ 5% dans ce modèle est confirmée par le dosage sérique de l'IL-6 qui ne montre aucune différence entre les deux conditions (Fig M14D). Lors de l'analyse du tissu péri-articulaire par cytométrie en flux (Fig M14E et F), nous avons constaté l'absence de recrutement des pDCs chez les souris traitées par IMQ.

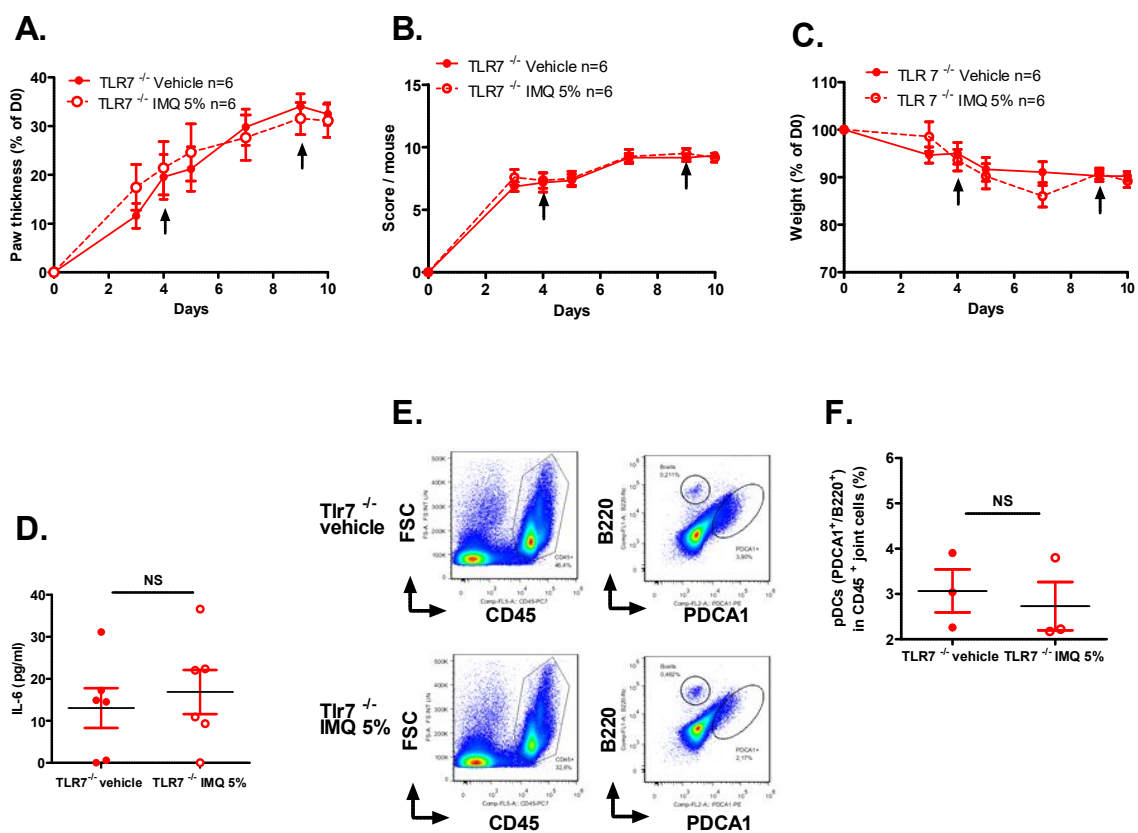


Figure M14. **L'application topique d'imiquimod (IMQ 5%) n'est pas efficace chez les souris invalidées pour *Tlr7*.** **A**, Évolution du gonflement articulaire, après induction de l'arthrite (STA K/BxN) chez les souris *Tlr7*<sup>-/-</sup>, traitées avec la crème véhicule (Disques rouges n=6) en comparaison aux souris traitées avec l'application topique d'imiquimod (IMQ 5%) (Cercles rouges n=6), évaluée par mesure au pied à coulisse et rapportée aux mesures correspondantes au jour 0 (avant l'induction de l'arthrite). **B**, Évolution des scores visuels (gonflement, rougeur) par l'attribution d'un score entre 0 et 4 par patte des souris *Tlr7*<sup>-/-</sup> traitées avec la crème véhicule (Disques rouges n=6) en comparaison aux souris traitées avec l'application topique d'imiquimod (IMQ 5%) (Cercles rouges n=6). **C**, Évolution du poids des souris rapporté au poids à jour 0 pour les souris *Tlr7*<sup>-/-</sup>, traitées avec la crème véhicule (Disques rouges n=6) en comparaison aux souris traitées avec l'application topique d'imiquimod (IMQ 5%) (Cercles rouges n=6). **D**, Evaluation de l'IL-6 sérique par dosage immuno-enzymatique (ELISA) au jour 5. **E**, Images illustrant la stratégie de détection des pDCs (PDCA1<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>) par cytométrie en flux dans le tissu péri-articulaire des souris *Tlr7*<sup>-/-</sup> traitées avec la crème véhicule (*Tlr7*<sup>-/-</sup> vehicle) en comparaison aux souris traitées avec l'application topique d'imiquimod (IMQ 5%) (*Tlr7*<sup>-/-</sup> IMQ 5%). **F**, Représentation graphique de la détection de pDCs au niveau péri-articulaire chez les souris *Tlr7*<sup>-/-</sup>, traitées avec la crème véhicule (Disques rouges n=3) en comparaison aux souris traitées avec l'application topique d'imiquimod (IMQ 5%) (Cercles rouges n=3). Les valeurs représentées sont les moyennes ± les écarts types. Le test statistique est un t-test corrigé par Mann-Whitney \* = P < 0.05 ; \*\* = P < 0.01.

Cette expérience, confirme la nécessité de la signalisation du TLR7 au niveau local pour produire un recrutement articulaire des pDCs et ainsi induire l'effet bénéfique du traitement.

### **Réduction de l'infiltrat immunitaire, en particulier des neutrophiles, dans les articulations des souris après traitement topique par l'imiquimod (IMQ 5%).**

L'application d'imiquimod recrute les pDCs au niveau articulaire. Pour évaluer son effet sur la totalité de l'environnement cellulaire au niveau articulaire, nous avons analysé les différentes populations de cellules immunitaires présentes dans le tissu péri-articulaire par cytométrie en flux. Nous avons constaté une modification importante de l'infiltrat immunitaire chez les souris traitées avec l'imiquimod (IMQ 5%) par rapport aux souris ayant reçu la crème véhicule (Fig M15F).

Nous avons tout d'abord observé une réduction globale des leucocytes (CD45<sup>+</sup>) infiltrant les articulations des souris traitées avec l'IMQ 5% par rapport aux souris traitées avec la crème véhicule (Fig M15A). Conformément à nos premiers résultats, la proportion des pDCs (CD45<sup>+</sup>, B220<sup>low</sup>, PDCA1<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>) est significativement augmentée par le traitement IMQ 5% (Fig M15B). Une augmentation moins franche des macrophages (CD45<sup>+</sup>, Lin<sup>-</sup>, Ly6C<sup>-</sup>, CD64<sup>+</sup>) est aussi constatée chez les souris traitées par l'IMQ 5% (Fig M15C). En accord avec la réduction des symptômes inflammatoires, une réduction spectaculaire des neutrophiles (CD45<sup>+</sup>, Gr1<sup>high</sup>, PDCA1<sup>-</sup>, CD11b<sup>+</sup>) est observée chez les souris traitées par l'IMQ 5% (Fig M15D). Enfin, une diminution des cDCs (CD45<sup>+</sup>, PDCA1<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup>, CMH II<sup>+</sup>) est aussi observée (Fig M15E).



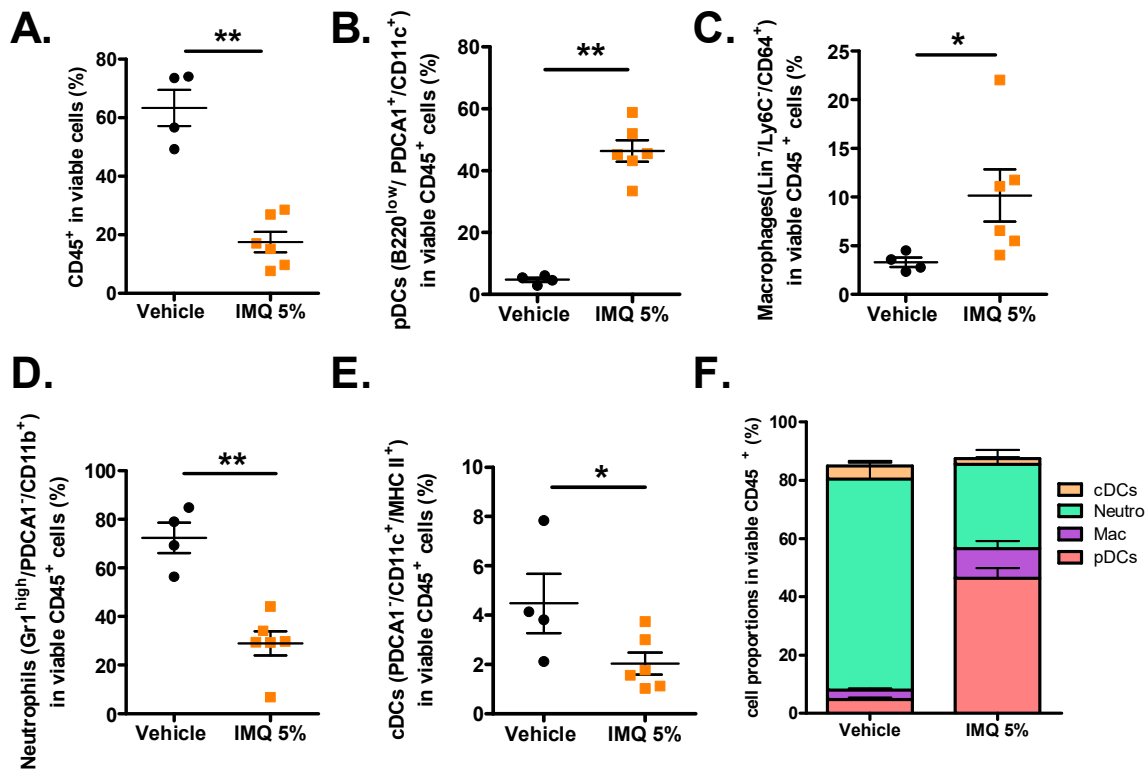
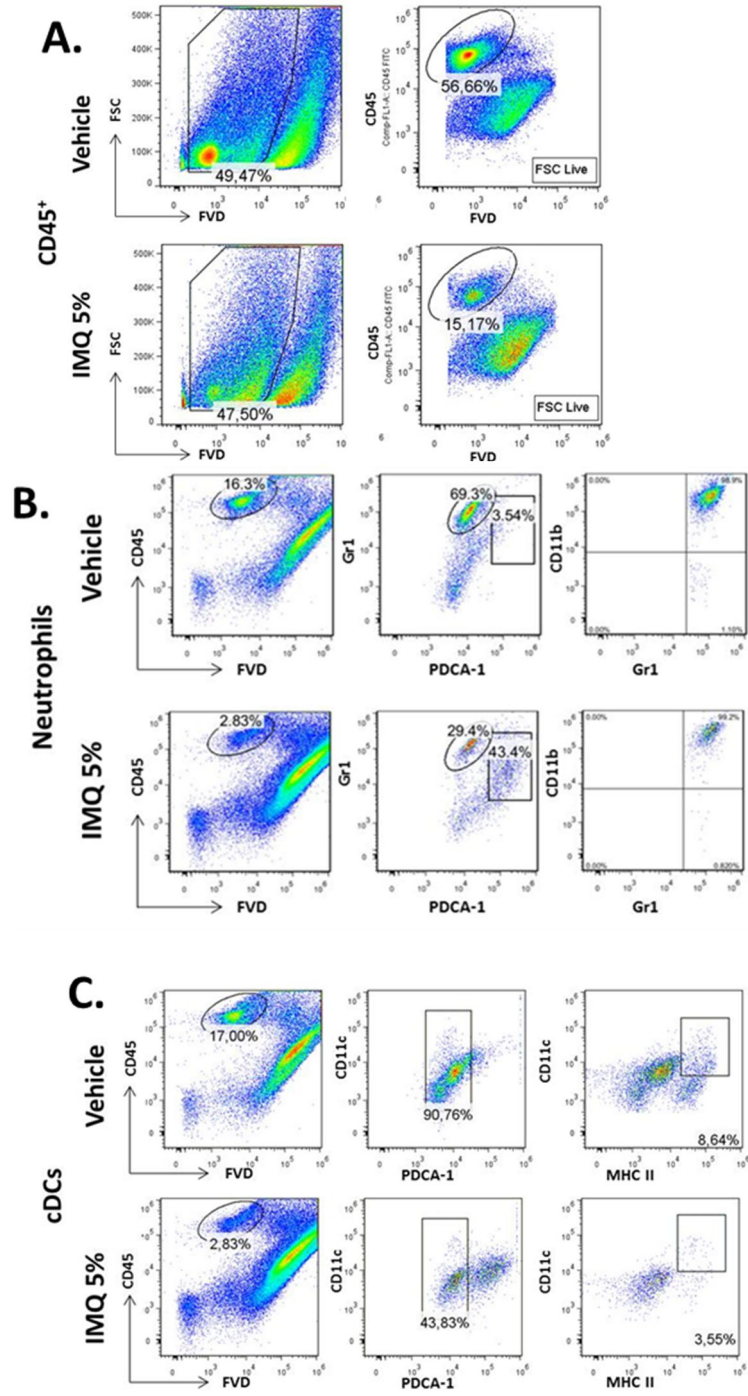


Figure M15. **Modification de l'infiltrat immunitaire dans le tissu péri-articulaire des souris après traitement par l'imiquimod (IMQ 5%).** A, Proportion des leucocytes (CD45<sup>+</sup>) parmi les cellules viables. B, Proportion des pDCs (B220<sup>low</sup>, PDCA1<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>) parmi les leucocytes (CD45<sup>+</sup>) viables. C, Proportion des macrophages (Lin<sup>-</sup>, Ly6C<sup>-</sup>, CD64<sup>+</sup>) parmi les leucocytes (CD45<sup>+</sup>) viables. D, Proportion des neutrophiles (Gr1<sup>high</sup>, PDCA1<sup>-</sup>, CD11b<sup>+</sup>) parmi les leucocytes (CD45<sup>+</sup>) viables. E, Proportion des cDCs (PDCA1<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup>, CMH II<sup>+</sup>) parmi les leucocytes (CD45<sup>+</sup>) viables. Cette analyse est réalisée sur les cellules provenant du tissu péri-articulaire de souris arthritiques traitées avec la crème véhicule (en noir) ou par l'IMQ 5% (en orange). Les valeurs représentées sont les moyennes ± les écarts types. Le test statistique est un t-test corrigé par Mann-Whitney \* = P < 0.05 ; \*\* = P < 0.01. F, représentation graphique de la composition de l'infiltrat immunitaire au niveau du tissu péri-articulaire de souris arthritiques traitées avec la crème véhicule ou avec l'IMQ 5%. Lin = B220 + NK1.1 + Langerine + Ly6G + CD3+.

Ces résultats montrent un changement profond dans l'environnement cellulaire articulaire induit par le traitement topique avec l'imiquimod (IMQ 5%). La réduction spectaculaire des neutrophiles peut expliquer en partie les modifications phénotypiques constatées sur les articulations des souris après traitement.





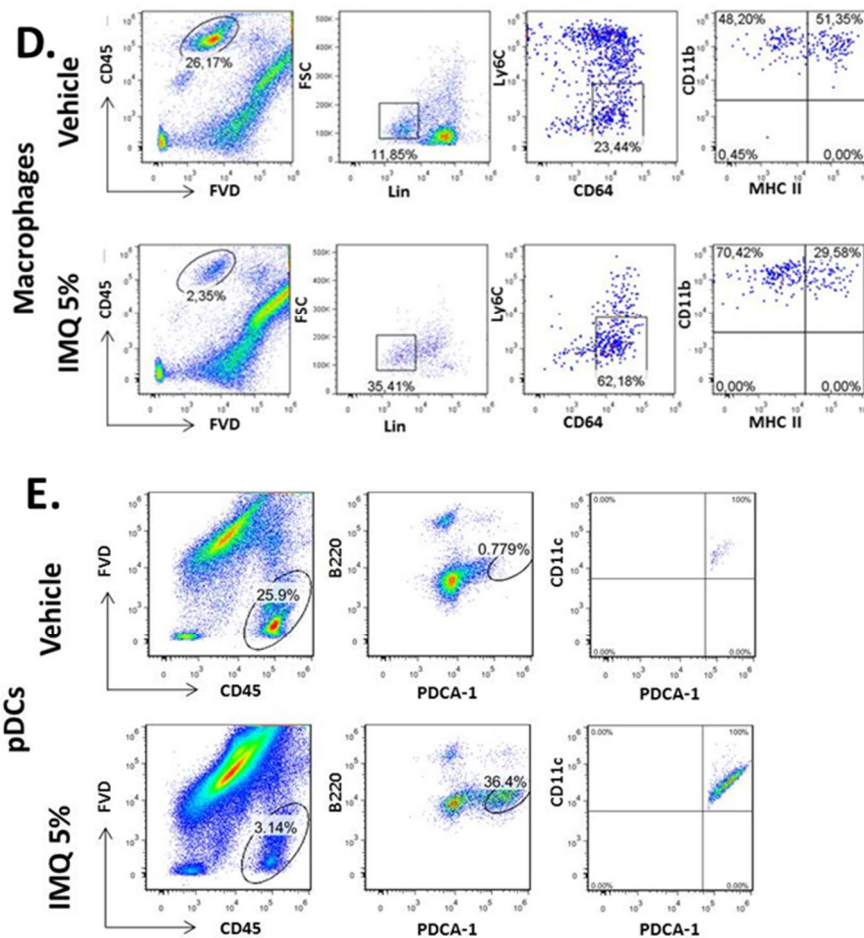


Figure M16. **Stratégie de sélection des cellules pour l'analyse par cytométrie en flux.** **A**, Images illustrant la stratégie de détection des leucocytes viables (FVD<sup>-</sup>, CD45<sup>+</sup>). **B**, Images illustrant la stratégie de détection des neutrophiles (Gr1<sup>high</sup>, PDCA1<sup>-</sup>, CD11b<sup>+</sup>). **C**, Images illustrant la stratégie de détection des cDCs (PDCA1<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup>, CMH II<sup>+</sup>). **D**, Images illustrant la stratégie de détection des macrophages (Lin<sup>-</sup>, Ly6C<sup>-</sup>, CD64<sup>+</sup>). **E**, Images illustrant la stratégie de détection des pDCs (PDCA1<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>). Lin = B220 + NK1.1 + Langerine + Ly6G + CD3+. Les cellules analysées sont des cellules du tissu péri-articulaire de souris arthritique traitées avec la crème véhicule ou avec l'IMQ 5%.

**Profil transcriptionnel anti-inflammatoire au niveau des articulations de souris traitées par l'imiquimod (IMQ 5%).**

Afin de comprendre quelles sont les conséquences moléculaires du traitement par l'Imiquimod, nous avons analysé l'expression de transcrits d'un panel de gènes impliqués dans l'inflammation arthritique. Parmi les gènes analysés se trouvent des cytokines pro-inflammatoires marqueurs de l'inflammation articulaire (Il-6, Il-1b), des chimiokines impliquées dans le recrutement cellulaire (Cxcl-1, Cxcl-2), des gènes impliqués dans le remodelage osseux (Mmp8), d'autres qui témoignent d'une signature interférons (Mx1, Ifit 1) ou enfin des gènes qui peuvent révéler des activations cellulaires (Cd14, iNos) (Fig M17).

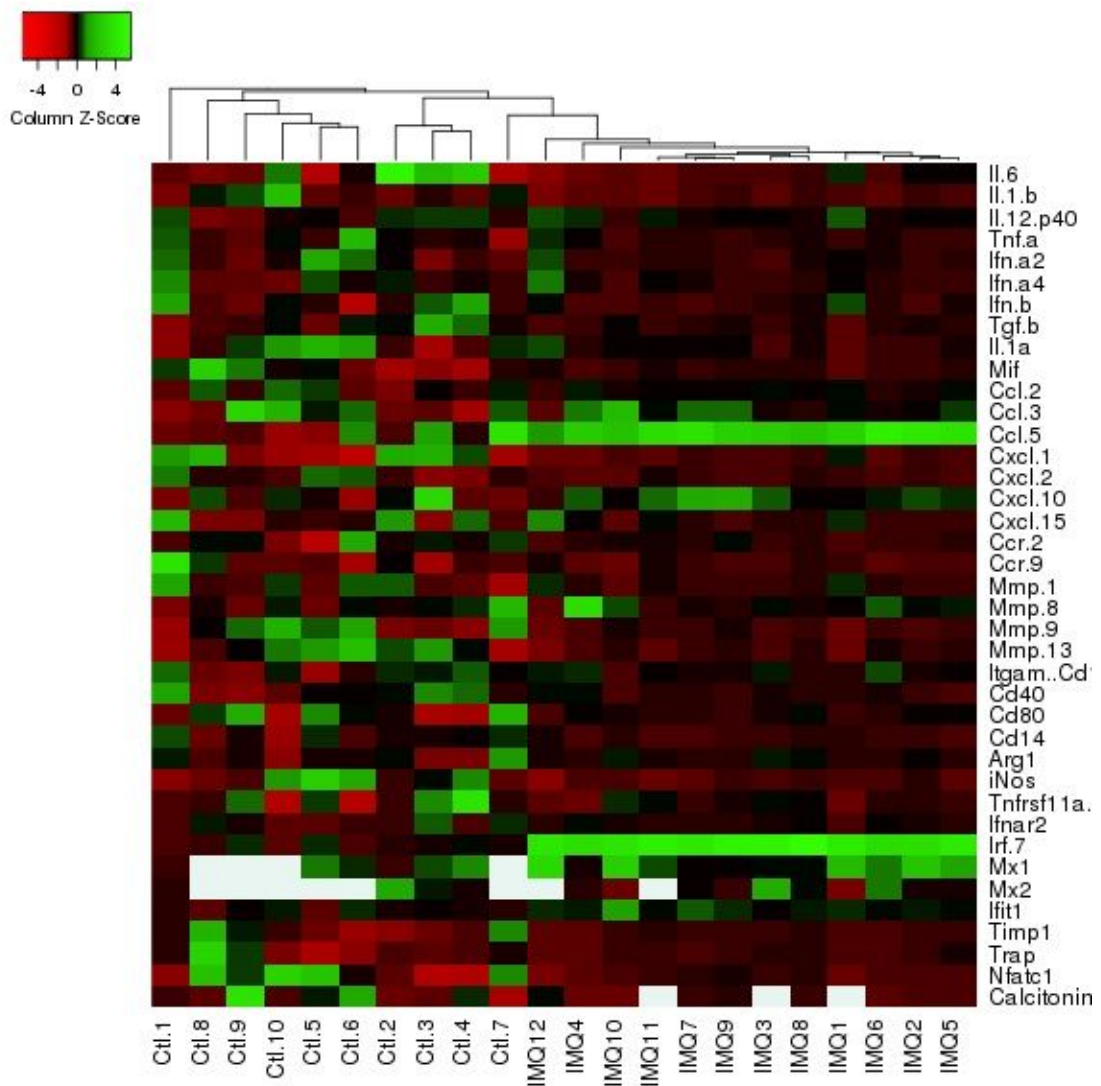


Figure M17. **Heatmap illustrant l'expression des transcrits de plusieurs gènes au niveau articulaire.** Image représentant le niveau d'expression des transcrits de différents gènes impliqués dans la physiologie de l'arthrite inflammatoire dans des souris arthritiques traitées par une crème contrôle ou par l'IMQ 5%. Cette image est obtenue grâce au logiciel en ligne heatmapper: <http://www2.heatmapper.ca/expression/>

Cette analyse nous a permis de constater des variations significatives dans l'expression des transcrits de plusieurs gènes impliqués dans la physiopathologie de l'arthrite inflammatoire. Parmi ces changements, nous avons observé, chez les souris traitées par IMQ 5%, l'augmentation notable des transcrits de chimiokines impliquées dans le recrutement des pDCs, à savoir, *Ccl-2* et *Ccl-5* (Fig M18A et B) (Drobits et al., 2012; Sawai et al., 2013). En contrepartie, une réduction des transcrits des chimiokines *Cxcl-1* et *Cxcl-2* est retrouvée chez ces mêmes souris traitées par IMQ 5% (Fig M18C et D). Ces deux chimiokines ont été décrites pour leur effet dans le recrutement des neutrophiles dans le modèle d'arthrite

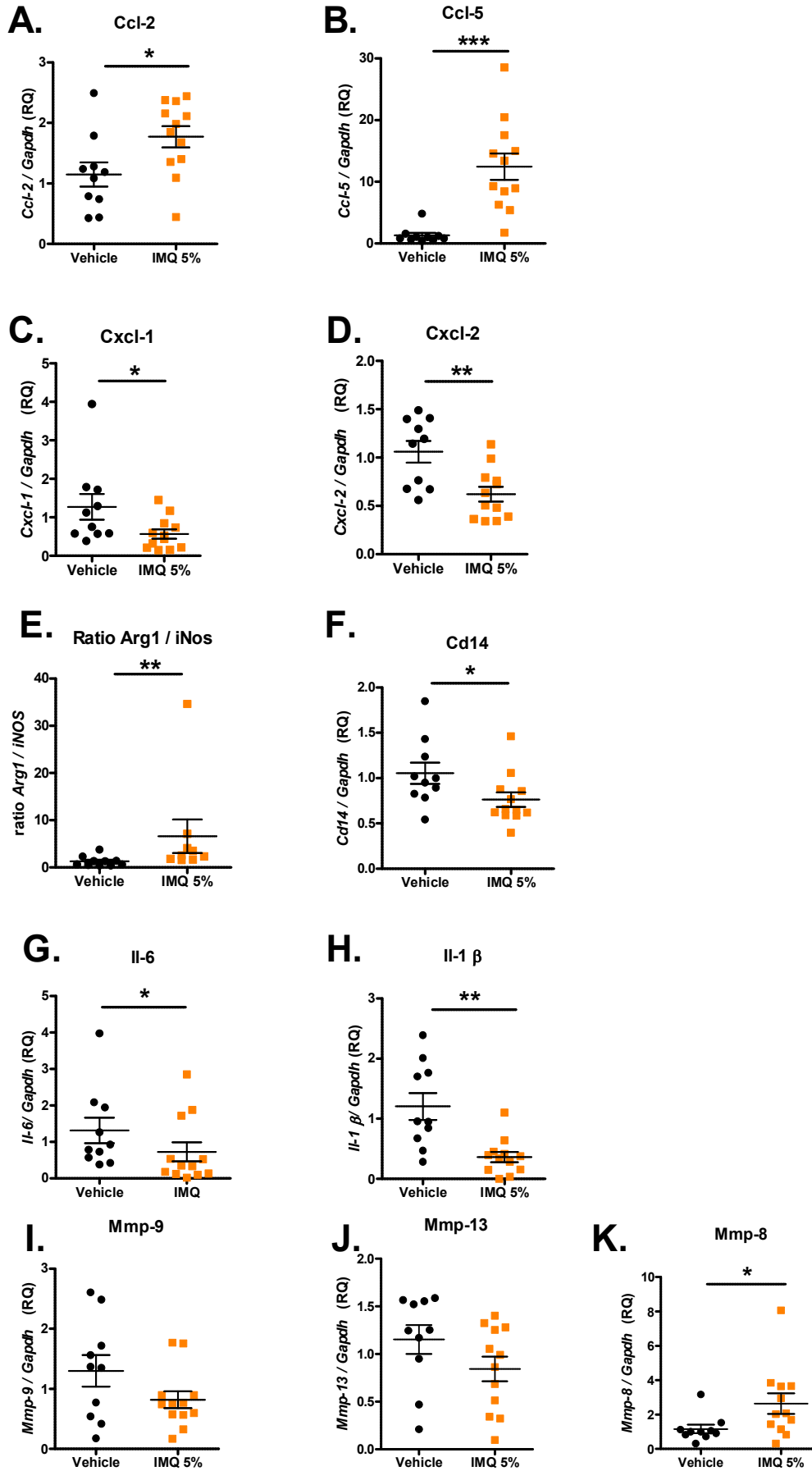
inflammatoire K/BxN (Christensen et al., 2016). Ces résultats concordent parfaitement avec l'analyse de l'infiltrat immunitaire au niveau du tissu péri-articulaire qui a montré un recrutement des pDCs et une forte réduction des neutrophiles en réponse à l'application d'IMQ.

De façon intéressante, le rapport *Arg1/iNos* est significativement augmenté chez les souris traitées avec IMQ 5% (Fig M18E), tandis que *Cd14* est régulé à la baisse (Fig M18F), tout comme l'*Il-6* et l'*IL1 $\beta$*  (Fig M18G et H). Ces résultats, associés au fait que les macrophages expriment moins de CMH-II à leur surface (Fig M16E), indiquent que les macrophages semblent être polarisés vers un profil alternatif (anti-inflammatoire, ou M2).

L'analyse de l'expression des transcrits de MMPs confirme la réduction des dommages osseux chez les souris traitées avec l'IMQ 5%. Des réductions de l'expression des transcrits de MMPs pathologiques comme *MMP9* (Itoh et al., 2002) et *MMP13* (Singh et al., 2013) sont constatées, même si ce résultat n'est pas statistiquement significatif (Fig M18I et J). En même temps, une augmentation significative des transcrits de *MMP8*, qui possède un effet protecteur dans l'arthrite inflammatoire STA K/BxN (le KO augmente l'érosion osseuse) (García et al., 2010), est constatée avec le traitement par l'IMQ 5% (Fig M18K).

L'ensemble de ces résultats semble corrélérer à la réduction, chez les souris traitées par l'IMQ 5%, de l'inflammation et des dommages osseux causés par l'arthrite induite.

Enfin, l'analyse transcriptomique a aussi mis en évidence une signature interféron claire avec l'augmentation de l'expression des transcrits de gènes de réponse aux IFNs (ISGs, Interferon-stimulated genes) tels que : *Irf7*, *Ifit1* et *Mx1* (Fig M18L, M et N), malgré le fait que l'expression des transcrits des Interférons de type I n'ait pas pu être détectée, sans doute parce que ces cytokines sont produites rapidement et de façon transitoire. Nous pouvons aussi noter l'augmentation de l'expression du transcrit de *Cxcl-10*, un gène de réponse à l'FN $\gamma$ .



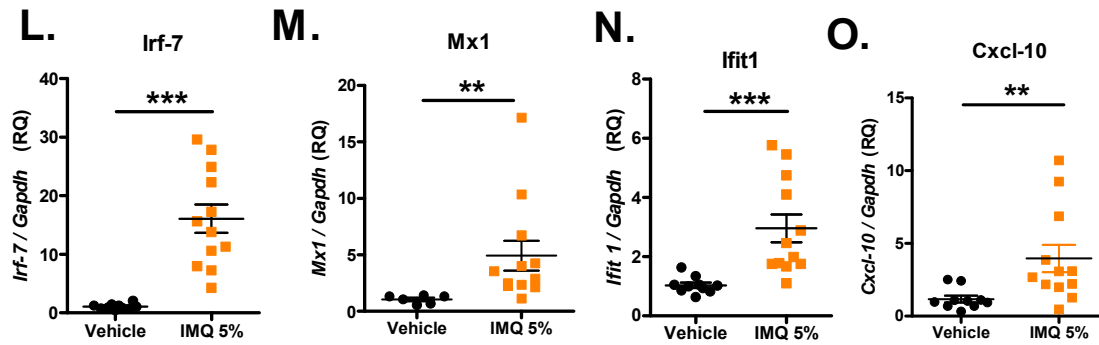


Fig M18. **Représentation graphique des changements d'expression des transcrits induits par l'application topique d'IMQ 5% dans l'environnement péri-articulaire.** A, Expression des transcrits de Ccl-2. B, Expression des transcrits de Ccl-5. C, Expression des transcrits de Cxcl-1. D, Expression des transcrits de Cxcl-2. E, Rapport entre l'expression des transcrits locaux d'Arg1 et d'iNos. F, Expression des transcrits de Cd14. G, Expression des transcrits d'Il-6. H, Expression des transcrits d'Il-1 $\beta$ . I, Expression des transcrits de Mmp9. J, Expression des transcrits de Mmp13. K, Expression des transcrits de Mmp8. L, Expression des transcrits d'Irf7. M, Expression des transcrits Mx1. N, Expression des transcrits d'Ifit1. O, Expression des transcrits Cxcl-10. Analyse par RT-qPCR sur des pattes avant de souris arthritiques contrôles traitées avec la crème véhicule (en noir) ou par l'imiquimod (IMQ5%). Les valeurs représentées sont les moyennes  $\pm$  les écarts types. Le test statistique est un t-test corrigé par Mann-Whitney \* = P < 0.05 ; \*\* = P < 0.01 ; \*\*\* = P < 0.001.

Les autres gènes analysés à J10, ainsi que la totalité des gènes analysés à J5 sont disponibles dans la partie « Données supplémentaires pages Fig S1 214, 215 pour l'analyse à J10 et Fig S2 pages 216, 217 pour l'analyse à J5 »

Ayant constaté une signature interféron claire lors de notre analyse transcriptomique, et afin de comprendre l'importance de cette signature, nous avons décidé d'évaluer l'effet du traitement topique par l'imiquimod dans un modèle de souris invalidé pour le gène qui code pour la sous-unité 1 du récepteur aux IFNs de type 1 (*Ifnar1*<sup>-/-</sup>).

Nous avons alors traité les souris *Ifnar1*<sup>-/-</sup> dans lesquelles une arthrite a été préalablement induite par transfert de sérum (STA K/BxN), soit par la crème véhicule (n=6), soit par la crème contenant 5% d'imiquimod (n=5). Comme on peut l'observer sur la figure M19, aucun effet régulateur de l'IMQ sur l'inflammation articulaire n'a pu être détecté chez les souris *Ifnar1*<sup>-/-</sup>. Cela est constaté sur les mesures du gonflement articulaire au pied à coulisse (Fig M19A), les scores (Fig M19B) ou encore avec le suivi pondéral des souris (Fig M19C). Cette absence d'action de l'IMQ dans ce modèle est confirmée par le dosage sérique de l'IL-6 qui ne montre aucune différence entre les souris traitées avec le véhicule ou bien avec l'IMQ (Fig M19D).

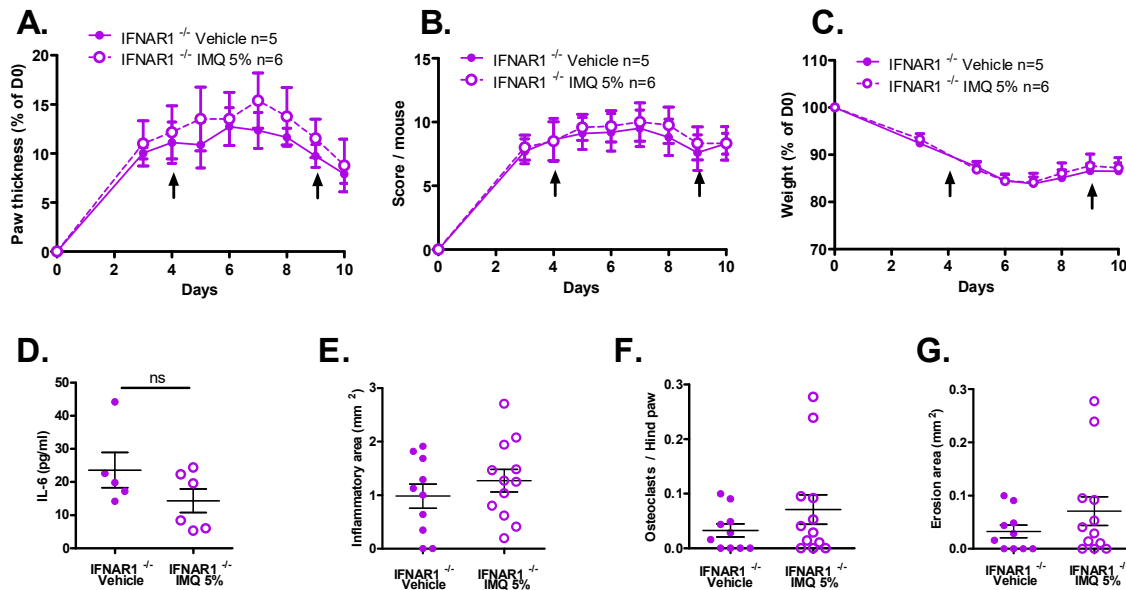


Figure 19. L'effet bénéfique de l'imiquimod nécessite la signalisation par IFNAR1. **A**, Évolution du gonflement articulaire, après induction de l'arthrite (STA K/BxN) chez les souris *Ifnar1*<sup>-/-</sup>, traitées avec la crème véhicule (Ronds violet n=5) en comparaison aux souris traitées avec l'application topique d'imiquimod (IMQ 5%) (Cercles violet n=6), évaluée par mesure au pied à coulisse et rapportée aux mesures correspondantes au jour 0 (avant l'induction de l'arthrite). **B**, Évolution des scores visuels (gonflement, rougeur) par l'attribution d'un score entre 0 et 4 par patte des souris *Ifnar1*<sup>-/-</sup>, traitées avec la crème véhicule (Ronds violet n=5) en comparaison aux souris traitées avec l'application topique d'imiquimod (IMQ 5%) (Cercles violet n=6). **C**, Évolution du poids des souris rapporté au poids à jour 0 pour les souris *Ifnar1*<sup>-/-</sup>, traitées avec la crème véhicule (Ronds violet n=5) en comparaison aux souris traitées avec l'application topique d'imiquimod (IMQ 5%) (Cercles violet n=6). **D**, Evaluation de l'IL-6 sérique par dosage immuno-enzymatique (ELISA) au jour 5. **E**, **F**, et **G**, Analyse histologique osseuse, effectué sur les pattes arrière, par les techniques de coloration hématoxyline / éosine et de marquage TRAP pour quantifier respectivement l'inflammation osseuse, le nombre d'ostéoclastes et l'érosion osseuse au jour 10.

Ce résultat suggère fortement que l'effet bénéfique de l'imiquimod dans ce modèle d'arthrite chez la souris dépend de la signalisation induite par les IFNs de type I.



### 1.1. Discussion Manuscrit 1

Le rôle des pDCs ainsi que celui des interférons dans la pathogénèse de la polyarthrite rhumatoïde est plutôt controversé. Plusieurs constatations, comme un déficit sanguin et un enrichissement articulaire chez les patients atteints de PR, indiquent un effet délétère des pDCs (Jongbloed et al., 2005). Plus récemment, une accumulation des progéniteurs de pDCs dans la moelle osseuse de patients et la différenciation de pDCs en cellules résidentes de l'articulation arthritique ont été observées (Hirohata et al., 2011, 2013). De plus, plusieurs études ont associé une augmentation de la production d'IFNs de type I et la transcription des ISGs (la « signature IFN ») retrouvées chez certains patients atteints de PR, avec un effet pathologique de ces molécules (Kraan et al., 2007). Enfin, des cas cliniques d'induction de symptôme d'arthrite inflammatoire associée au traitement de l'hépatite C par le PEG-IFN ont été rapportés (Cacopardo et al., 2013). Cependant, des études dans des modèles animaux n'ont pas abouti aux mêmes conclusions. Par exemple, les souris invalidées pour le gène qui code pour IRF7 (*Irf7*<sup>-/-</sup>) montrent une exacerbation des symptômes arthritiques dans le modèle K/BxN (Sweeney et al., 2012). Pour rappel, IRF7 est un facteur de transcription important pour les pDCs où il est relativement surexprimé à l'état basal et qui joue un rôle primordial pour la production d'IFNs de type I. Les pDCs ont même été associées à un rôle protecteur dans le modèle murin (Jongbloed et al., 2009) ainsi que chez l'Homme, où des patients en rémission de PR montraient une augmentation de la proportion de pDCs dans le sang (Kavousanaki et al., 2010). En outre, plusieurs études sur des modèles murins ont montré un effet bénéfique lors du traitement par l'IFN- $\beta$  sur l'arthrite induite (van Holten et al., 2004). Ce traitement a même montré des effets bénéfiques dans un modèle d'arthrite chez le singe rhésus et un petit nombre (n=11) de patients humains (Smeets et al., 2000). Malgré ces résultats prometteurs, le traitement d'un nombre plus large de patients n'a pas pu reproduire les mêmes effets bénéfiques (Holten et al., 2005b).

Dans notre étude, en utilisant trois modèles de souris déficientes en pDCs, nous fournissons des preuves solides d'un effet protecteur de cette population cellulaire dans l'arthrite inflammatoire (Fig M3, M6 et M7). Nous avons aussi réussi à recruter ces cellules au site de l'inflammation arthritique en appliquant localement de l'imiquimod (un ligand du TLR7). Cette procédure simple a abouti à une efficacité remarquable, tant au niveau de la résolution de l'inflammation que de l'inhibition de l'atteinte osseuse. Nous avons surtout pu démontrer l'efficacité de ce protocole dans trois modèles différents d'arthrites murines caractérisés par des spécificités différentes en termes de mécanisme d'initiation et de maintien de la



pathologie. Aussi bien l'arthrite induite par transfert de sérum STA K/BxN (Fig M9), que l'arthrite induite par injection de collagène hétérologue CIA (Fig M12) et l'arthrite provoquée par la surproduction de TNF $\alpha$  humain par des souris transgéniques hTNF Tg (Fig M13), ont montré un effet bénéfique de l'imiquimod. Enfin, nos analyses de l'environnement articulaire par cytométrie en flux (Fig M15 et 16) et transcriptomique (Fig M17 et 18) après application de l'imiquimod sur des souris sauvages (*wild-type*) et mutantes (*Tlr7<sup>-/-</sup>*, Fig M14 et *Ifnar1<sup>-/-</sup>*, Fig M19), nous ont permis de proposer un scénario d'action plausible. Ce scénario débute par le déclenchement de la signalisation du TLR7 par l'IMQ, ce qui induit la production locale de chimiokines (CCL-2 et CCL-5) (Fig M18A et B) impliquées dans le recrutement des pDCs (Drobits et al., 2012; Sawai et al., 2013). Ces cellules recrutées au niveau de l'articulation arthritique semblent être activées (Données supplémentaires, Fig S3 pages 218) et produisent des IFNs de type I. Ces IFNs produits localement induisent l'expression d'ISGs (Fig M18L-O) et ont aussi forcément un effet autocrine sur les pDCs elles-mêmes (qui expriment le récepteur aux IFN de type I), ce qui pourrait induire une boucle de régulation positive. Les IFNs-I sont aussi libérés dans la circulation (Données supplémentaires, Fig S4 pages 218) et peuvent inhiber le recrutement des neutrophiles au site de l'inflammation arthritique (Fig M15D). Cette inhibition du recrutement des neutrophiles a déjà été démontrée dans une étude où la fixation de l'IFN $\gamma$  (produit par les cellules NK) sur son récepteur présent à la surface des neutrophiles, les empêche d'être recrutés au site de l'inflammation articulaire (Wu et al., 2007). L'environnement cellulaire de l'articulation arthritique étant appauvri en neutrophiles, qui sont des acteurs primordiaux à l'inflammation arthritique (Wright et al., 2014), on observe une réduction de l'expression du transcrite d'*Il1- $\beta$*  (Fig M18H) ou de *Cxcl-2* (Fig M18D). Nous observons aussi une réduction de l'*Il6* (Fig M18G) et de *Cxcl-1* (Fig M18C), ce qui témoigne d'une régulation négative de l'inflammation de la membrane synoviale, et est probablement la conséquence de la réduction d'*Il1- $\beta$* . Cette diminution de production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires participe à la réduction du recrutement des neutrophiles, et probablement aussi des cDCs, dans le tissu péri-articulaire (Fig M15E). Dans cet environnement articulaire où les macrophages ne sont plus soumis à des stimuli pro-inflammatoires, il est probable que ces cellules sont polarisées vers un profil alternatif (M2 ou anti-inflammatoire), ce qui participe à la régulation immunitaire, comme semble l'indiquer la diminution de l'expression du CMH de classe II à leur surface (Fig M16D), l'expression réduite des transcrits de *Cd14* (Fig M18F) ou encore l'augmentation du rapport *Arg1/ iNos* (Fig M18E). Ces facteurs induisent une modification dans le remodelage osseux, en réduisant l'expression de *Mmp9* (Fig M18I) et de *Mmp13* (Fig M18J) qui sont délétères (Itoh et al.,

2002; Singh et al., 2013) et en favorisant au contraire l'expression de *Mmp8* (Fig M18K) qui possède un effet protecteur contre l'érosion osseuse (García et al., 2010). Cette modification dans l'expression des *Mmp* probablement associée à une activation réduite des ostéoclastes, diminue l'atteinte osseuse (confirmée par la diminution de l'expression du récepteur de la calcitonine « Données supplémentaires, Fig S3T page 215 ») dans les différents modèles étudiés, K/BxN (Fig M9F), CIA (Fig M12F, G et H) et hTNF (Fig M13A, B, C).

Nos résultats vont dans le sens d'observations récentes qui ont permis de réévaluer les rôles des pDCs et des IFNs-I dans la physiopathologie de différents processus auto-inflammatoires, comme l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) (Duraes et al., 2016) ou l'inflammation intestinale (Yang et al., 2016).

Le rétablissement de la tolérance immunitaire et l'inhibition des dommages osseux, pour un coût raisonnable, constitue un objectif thérapeutique dans la PR. Jusqu'à présent, l'utilisation thérapeutique de DCs a été considérée surtout par une approche de transfert adoptif, comme montré dans le modèle EAE chez la souris, où l'effet protecteur de pDCs injectées a été constaté (Duraes et al., 2016). De même, l'utilisation de DCs tolérogènes (tolDCs) chez les patients atteints de PR (Bell et al., 2016) a été envisagée. Cependant, même si la perfusion de tolDCs autologues semble faisable et peut-être bénéfique dans les grandes articulations (ce qui reste encore à être démontré), cette procédure s'avère coûteuse, contraignante et peu susceptible d'être applicable sur un nombre de patients toujours plus nombreux. En outre, cette procédure ne semble pas adaptée aux petites articulations dans lesquelles les injections sont des interventions douloureuses.

Nous pensons que le recrutement des pDCs par l'application topique d'imiquimod 5%, bien que non dépourvue de risque (Yokogawa et al., 2014), pourrait représenter une alternative rentable et efficace à ajouter à l'arsenal thérapeutique actuel. Dans un futur proche, un essai clinique est envisagé par notre laboratoire afin d'apporter une réponse claire sur le potentiel thérapeutique de ce protocole chez l'Homme.

## 2. Résultats publication 1

**L'expression réduite de DICER1 induit une augmentation des propriétés pro-inflammatoires des synoviocytes de type fibroblastiques et leur confère une résistance à des stimuli pro-apoptotiques**

**Reduced DICER1 Expression Bestows Rheumatoid Arthritis Synoviocytes Proinflammatory Properties and Resistance to Apoptotic Stimuli.**

Alsaleh G, Nehmar R, Blüml S, Schleiss C, Ostermann E, Dillenseger JP, Sayeh A, Choquet P, Dembele D, Francois A, Salmon JH, Paul N, Schabbauer G, Bierry G, Meyer A, Gottenberg JE, Haas G, Pfeffer S, Vallat L, Sibia J, Bahram S, Georgel P.

**Arthritis Rheumatol. 2016 Aug;68(8):1839-48. doi: 10.1002/art.39641.**

Bien que le rôle de certains microARNs isolés soit décrit dans la régulation de la physiopathologie de l'arthrite inflammatoire, le rôle de DICER1 dans cette maladie n'a pas encore été étudié. Dans cette étude nous avons analysé l'effet de la réduction de l'expression de DICER1 chez des souris (*Dicer*<sup>d/d</sup>) sur le développement de l'arthrite induite par transfert de sérum (STA K/BxN). Nous avons aussi analysé l'expression des facteurs impliqués dans la biogénèse des miARNs dans les synoviocytes de type fibroblastiques de patients atteints de PR.

### **Expression réduite de DICER1 dans les FLS de patients atteints de PR**

L'expression de DICER1 dans les FLS de patients atteints de PR, d'arthrose (OA) et de sujets sains est évaluée par RT-qPCR. Les Synoviocytes de type fibroblastiques (FLS) primaires cultivés à partir de biopsies ont été étudiés et une réduction significative de l'expression de DICER1 a été retrouvée dans les cellules provenant de patients atteints de PR (n=11) par rapport aux patients atteints d'arthrose (n=11) et aux sujets sains (n=10) (Fig P1A), ce qui a été confirmé par Western blot (Fig P1B). Par contre, l'analyse de l'expression de DICER1 dans les cellules du sang périphérique ne montre pas de différences significatives dans l'expression de DICER1.

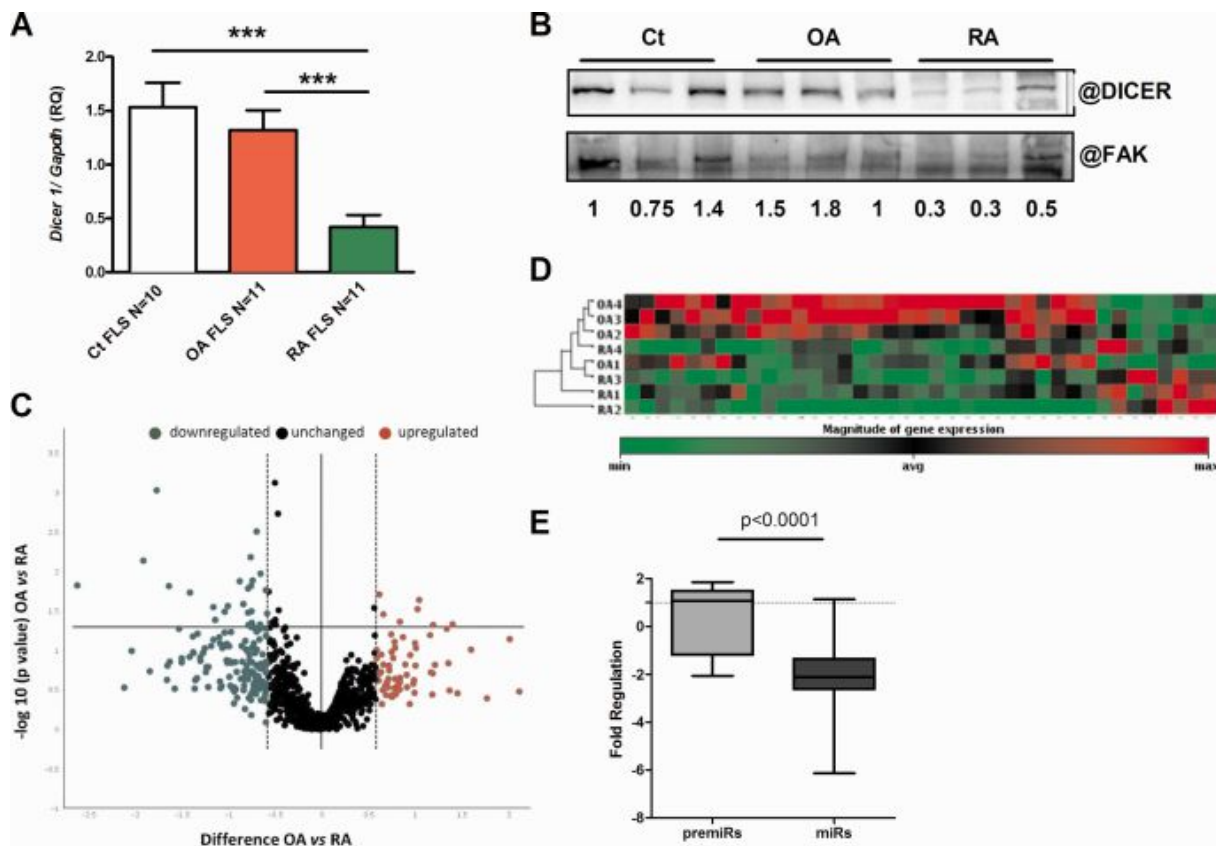


Figure P1. **Réduction de l'expression de DICER1 et des microARNs dans les FLS provenant de patients atteints de PR.** **A**, Expression de *DICER1* dans les cultures primaires de FLS provenant de biopsies de donneurs sains contrôles (Ct) (n=10), de patients atteints d'arthrose (OA) (n=11) et de patients atteints de PR (RA) (n=11), déterminée par RT-qPCR. Les résultats sont normalisés par rapport à l'expression de la GAPDH. La valeur représentée est la moyenne  $\pm$  l'écart type. \*\*\* =  $P < 0.0001$ . **B**, Western blot montrant l'expression de la protéine DICER1 dans les FLS provenant de biopsies de donneurs sains contrôles (Ct) (n=3), de patients atteints d'arthrose (OA) (n=3) et de patients atteints de PR (RA) (n=3). L'expression de la FAK (Focal Adhesion Kinase), une protéine avec une expression ubiquitaire et un haut poids moléculaire (125 kDa), est présentée comme contrôle. Les nombres indiquent le signal de DICER1 après normalisation du signal par rapport à celui de la FAK. **C**, Analyse par volcano plot de l'expression des microARNs réalisée par Macroarray sur les FLS de patients atteints de PR (RA) (n=4) par rapport aux patients atteints d'arthrose (OA) (n=4). Le graphe montre la relation entre les facteurs de changements et la significativité entre les groupes, en utilisant l'analyse de dispersion. Les miARNs exprimés en dessous du seuil de détection (fixé à [Ct] <35) ont été exclus. L'axe des x représente le facteur de changement en  $\log_2$ . Les lignes verticales en pointillé indiquent la limite du facteur de changement d'expression du microARN >1.5 ; la ligne horizontale indique la limite du p value du t-test ( $p < 0.05$ ). **D**, Analyse par regroupement hiérarchique par rapport à l'expression des microARNs dans les FLS de patients atteints de PR (RA) (n=4) par rapport aux patients atteints d'arthrose (OA) (n=4). L'analyse par regroupement de 39 microARNs qui sont exprimés différemment entre OA et RA a été réalisée en utilisant un logiciel en ligne de Qiagen. **E**, Quantification de 20 précurseurs de microARNs (pre-miRNAs) ou de microARNs matures miRNA (miRNAs) dans les FLS provenant de patients atteints de PR (RA) (n=4) par rapport aux patients atteints d'arthrose (OA) (n=4), qui ont été analysés par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés sous forme d'un rapport aux facteurs de changements ( $-1/\text{facteur de changement} = \text{Fold Regulation}$ ), où les patients atteints de OA constituent le groupe contrôle. La ligne horizontale représente le seuil de 1 (pas de différences entre les échantillons OA et RA). Les données sont présentées par des boîtes à moustache. La ligne à l'intérieur de la boîte représente la médiane. Les lignes à l'extérieur des boîtes indiquent les valeurs minimales et maximales. La P value a été déterminée par le t-test de Student. RQ = quantité relative ; @ = antibody.

Cette expérience a montré une réduction globale des microARNs dans les FLS provenant de patients atteints de PR. Notamment, 39 miARNs présentaient une expression différentielle statistiquement significative entre les deux conditions, dont 80% sont réduits dans les FLS de patients atteints de PR (Fig P1C). La classification hiérarchique non supervisée de ces 39 microARNs a permis de différencier les échantillons provenant de patients atteints de PR et d'arthrose (Fig P1D).

L'implication de *DICER1* dans la production de 20 microARNs mature (miRs) est montrée par l'analyse en RT-qPCR de miR-19b, -199b, -577, let-7c, -10b, -1260a, -328, -34b, -3182, -670, -2116, -190a, -597, -497, -610, -30c-2, -502, 5-85, -218-1, -125b-2, and -1246 et des microARNs précurseurs correspondant (pre-miARNs) chez 4 patients atteints de PR et 4 patients atteints d'arthrose. Les miRs matures sont significativement réduits dans les FLS de patients atteints de PR, ce qui illustre la plus faible expression de microARNs dans les FLS de patients atteints de PR comparativement aux FLS de patients atteints d'arthrose (Fig P1E).

Par la suite, nous avons quantifié l'expression de *DICER1* dans des types cellulaires équivalents (cellules résidentes) de deux autres maladies inflammatoires : la sclérodémie systémique et le syndrome de Sjögren. Des fibroblastes dermiques humains ont été cultivés à partir de biopsies de patients atteints de sclérodémie systémique et de sujets sains pour le groupe contrôle. Des cellules épithéliales de glandes salivaires ont été obtenues à partir de patients atteints du syndrome de Sjögren primaire et de patients présentant des symptômes secs mais sans caractéristiques auto-immunes. Des niveaux d'expression similaires ont été observés dans les différents échantillons indépendamment de leur origine (Fig P2A).

Nous avons également quantifié l'expression de tous les gènes connus pour être impliqué dans la biogénèse des microARNs dans les FLS de patients atteints de PR. Nous n'avons pas trouvé de défaut d'expressions des autres gènes impliqués dans ce processus (Fig P2B). L'ensemble de ces résultats, indique que la réduction de l'expression de *DICER1* est une caractéristique spécifique aux FLS de patients atteints de PR.

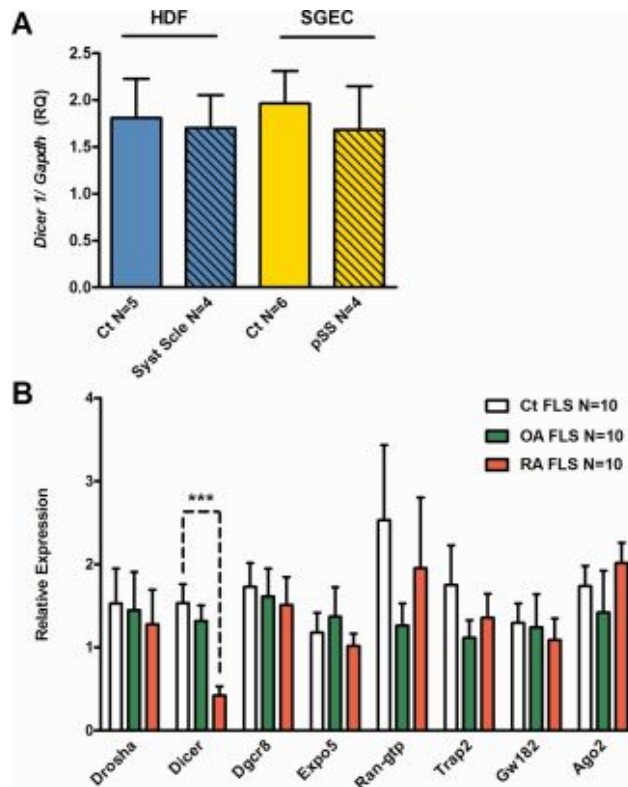


Figure P2. **La réduction de l'expression de *DICER1* est une caractéristique spécifique des FLS de patients atteints de PR.** **A**, Quantification de l'expression de *DICER1* dans les fibroblastes dermiques humains (HDF) de patients atteints de sclérodémie systémique (Syst Scl) (n=5) et de sujets sains contrôle (Ct) (n=4), ainsi que dans les cellules épithéliales des glandes salivaires provenant de patients atteints du syndrome de Sjögren primaire (pSS) (n=6) ou des donneurs sains (n=4). **B**, Quantification de l'ensemble des gènes connus pour participer à la voie de biogénèse des microARNs, dans les FLS de sujets sains, de patients souffrant d'arthrose et de patients atteints de PR. Analyses réalisées par RT-qPCR et normalisées par rapport à l'expression de la GAPDH. La valeur représentée est la moyenne  $\pm$  l'écart type. \*\*\* =  $P < 0.0001$ . Regarder la figure P1 pour d'autres indications.

### Aggravation de l'inflammation articulaire chez les souris *Dicer*<sup>d/d</sup> après induction de l'arthrite par injection de sérum arthritogène (STA K/BxN)

Afin d'évaluer les conséquences de la réduction de l'expression de *Dicer* dans un modèle animal d'arthrite inflammatoire, nous avons utilisé une lignée de souris qui possède une mutation hypomorphe dans le gène *Dicer* (*Dicer*<sup>d/d</sup>) induisant un faible niveau d'expression de *Dicer*, ce qui permet d'obtenir des adultes viables (Ostermann et al., 2012; Otsuka et al., 2007). D'abord, nous avons confirmé la réduction de l'expression de *Dicer* dans les FLS de ces souris, l'expression des autres gènes impliqués dans la voie de biogénèse des microARNs restant inchangée (Fig P3A), une situation comparable à celles des FLS de patients atteints de PR (Fig P2B). La mutation du gène *Dicer* affecte un sous ensemble de microARNs (Ostermann et al., 2012), l'analyse par RT-qPCR de l'expression des microARNs homologues à ceux retrouvés associés à la PR confirme la même tendance. Les niveaux

d'expression de plusieurs microARNs (9 sur 17) sont significativement réduits dans les FLS des souris *Dicer*<sup>d/d</sup>. En dépit de cette réduction des microARNs, les souris *Dicer*<sup>d/d</sup> adultes semblent normales et ne développent spontanément aucun phénotype inflammatoire manifeste.

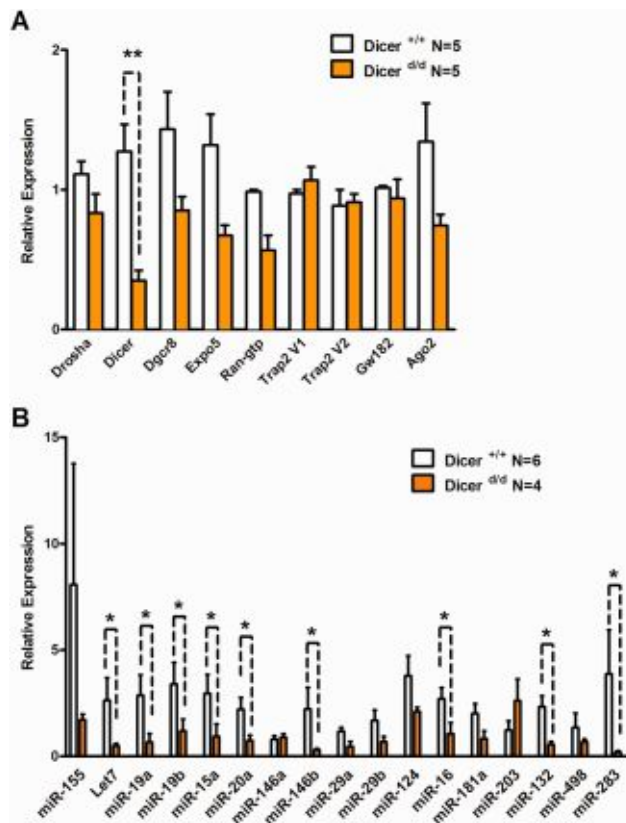


Figure P3. **Réduction de la maturation des microARNs chez les souris déficientes en *Dicer* (*Dicer*<sup>d/d</sup>).** **A**, Expression des gènes impliqués dans la voie de biogénèse de microARNs dans les FLS de souris contrôles (*Dicer*<sup>+/+</sup>) et de souris déficientes en *Dicer* (*Dicer*<sup>d/d</sup>). **B**, Expression de microARNs dans les FLS de souris contrôles (*Dicer*<sup>+/+</sup>) et de souris déficientes en *Dicer* (*Dicer*<sup>d/d</sup>), analyses réalisées par RT-qPCR et normalisées par rapport à l'expression de la GAPDH. La valeur représentée est la moyenne  $\pm$  l'écart type. \* =  $P < 0.05$  ; \*\*\* =  $P < 0.001$ .

Afin d'évaluer l'effet de la réduction de l'expression de *Dicer*, nous avons induit une arthrite par injection de sérum arthritogène (STA K/BxN) (Ditzel, 2004). Nous avons observé une augmentation significative de l'inflammation articulaire chez les souris *Dicer*<sup>d/d</sup> 8 à 12 jours après le transfert de sérum. Une augmentation du gonflement des tissus mous péri-articulaires est aussi observée chez les souris *Dicer*<sup>d/d</sup> par l'analyse au micro-tomodensitomètre (*micro-computed tomography*) à J9.

Nous avons ensuite réalisé chez les souris une série de 4 inductions successives d'arthrite (sur une durée totale de 88 jours), ce qui est sensé mimer la succession de phases aiguës qui caractérise la PR humaine. L'évolution du score de l'arthrite est représentée dans la figure P4A. Au pic de la première induction, les souris *Dicer*<sup>d/d</sup> montrent une augmentation significative des symptômes de l'inflammation articulaire par rapport aux souris contrôles *Dicer*<sup>+/+</sup>. Les inductions suivantes permettent de faire la même observation, avec une différence de plus en plus claire.

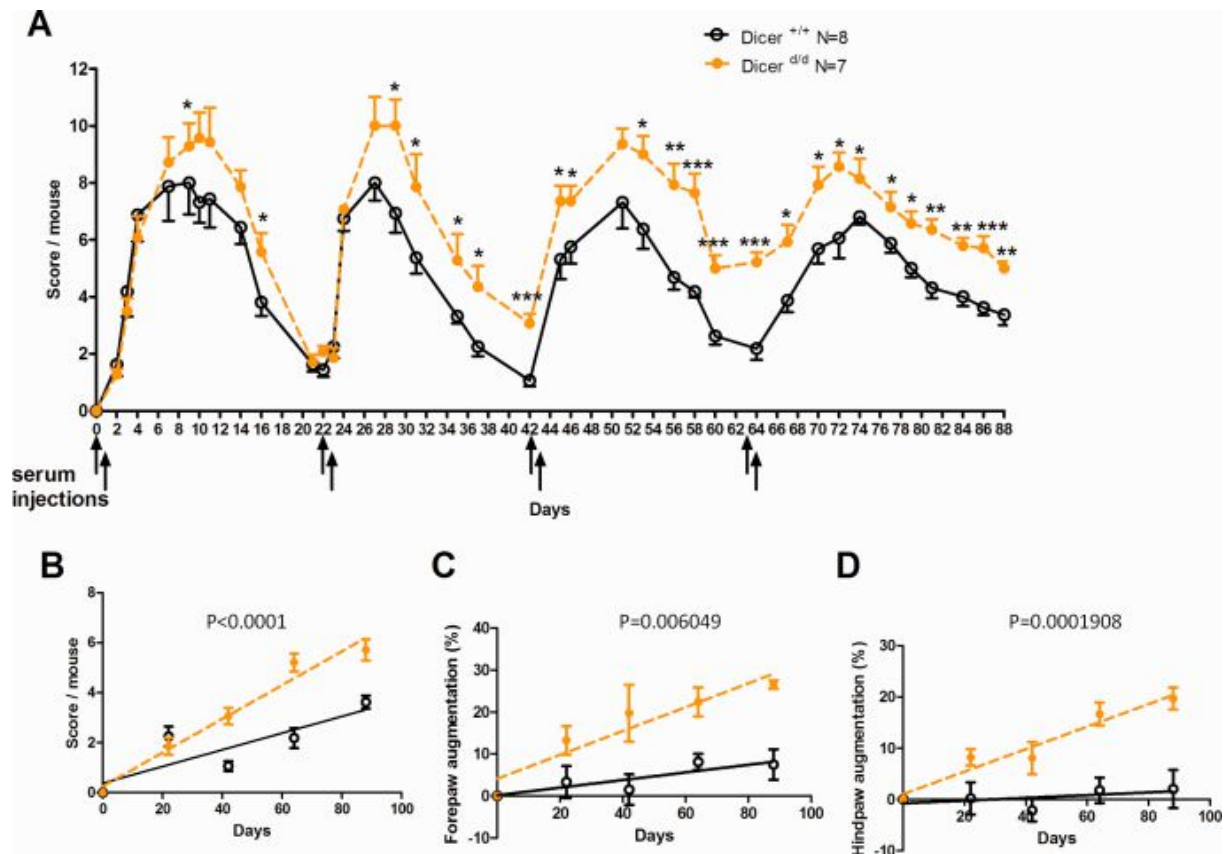


Figure P4. Aggravation des symptômes inflammatoires arthritiques chez les souris déficientes en *Dicer* (*Dicer*<sup>d/d</sup>) après 4 injections successives de sérum arthritogène. **A**, Evolution des scores de l'arthrite sur 88 jours chez les souris contrôles (*Dicer*<sup>+/+</sup>) et les souris mutantes déficientes en *Dicer* (*Dicer*<sup>d/d</sup>). Les flèches indiquent les jours d'injection du sérum arthritogène provenant de souris K/BxN (150µl : jours 0, 1, 22, 23, 42, 43, 63, et 64). **B-D**, Analyses de régression linéaire des scores obtenus aux jours 22, 42, 63 et 88 (**B**), le gonflement des pattes avant (**C**), et des pattes arrière (**D**), pour les souris contrôles (*Dicer*<sup>+/+</sup>) et les souris mutantes déficientes en *Dicer* (*Dicer*<sup>d/d</sup>). Résultat représentatif de 2 expériences indépendantes avec des nombres similaires de souris. La valeur représentée est la moyenne ± l'écart type. \* =  $P < 0.05$  ; \*\* =  $P < 0.001$  ; \*\*\* =  $P < 0.0001$

L'analyse histologique des articulations prélevées sur ces animaux au jour 88 a été réalisée. Nous avons évalué la zone d'inflammation de la membrane synoviale, la zone d'érosion des tarsi et le nombre d'ostéoclastes dans ces zones. Pris individuellement, aucun de ces paramètres n'a montré une différence significative entre les *Dicer*<sup>d/d</sup> et le groupe contrôle



*Dicer*<sup>+/+</sup>, bien que chacun semble être augmenté chez les souris mutantes. Cependant, une analyse de corrélation a montré une association entre l'inflammation et l'érosion et entre l'érosion et le nombre d'ostéoclastes à la fois chez les souris mutantes et le groupe contrôle. De façon intéressante, une corrélation positive est retrouvée entre le nombre d'ostéoclastes et l'inflammation synoviale mais cette fois seulement chez les souris mutantes.

### **Réponse inflammatoire exacerbée et résistance à l'apoptose chez les FLS de souris *Dicer*<sup>d/d</sup>**

Afin d'analyser les effets fonctionnels de la réduction de l'expression de *DICER1* dans les FLS humains, nous avons quantifié l'expression et la sécrétion d'IL-6 par les FLS en culture provenant de patients souffrant de PR, d'arthrose (OA) ainsi que de donneurs sains (Fig P5). L'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire importante dans la physiopathologie de la PR. De façon intéressante, l'expression et la sécrétion de cette cytokine semble être augmentée déjà à l'état basal (sans aucune stimulation) et cela se confirme lors de l'activation des cultures cellulaires par du LPS (lipopolysaccharide). Pour comprendre si cet effet était dû à la réduction de *DICER1*, nous avons évalué (i) si la transfection de siRNA dirigé contre *DICER1* dans des cellules provenant de sujets sains pouvait mimer le phénotype retrouvé chez les FLS de patients, (ii) ou si la transfection du même siRNA dans des FLS de patients PR pouvait amplifier leur phénotype. Nous avons bien constaté une augmentation de la transcription d'*IL-6* à l'état basal. Curieusement, lorsque les FLS sont activés par du LPS, l'expression d'IL-6 est significativement réduite. Ce résultat est en contradiction avec nos précédentes observations, mais indique que la seule réduction de *DICER1* ne suffit pas pour récapituler la complexité des modifications manifestées par les FLS de patients PR. Cependant, ce résultat met en avant la relation étroite entre le niveau d'expression de *DICER1* et l'homéostasie des cytokines.

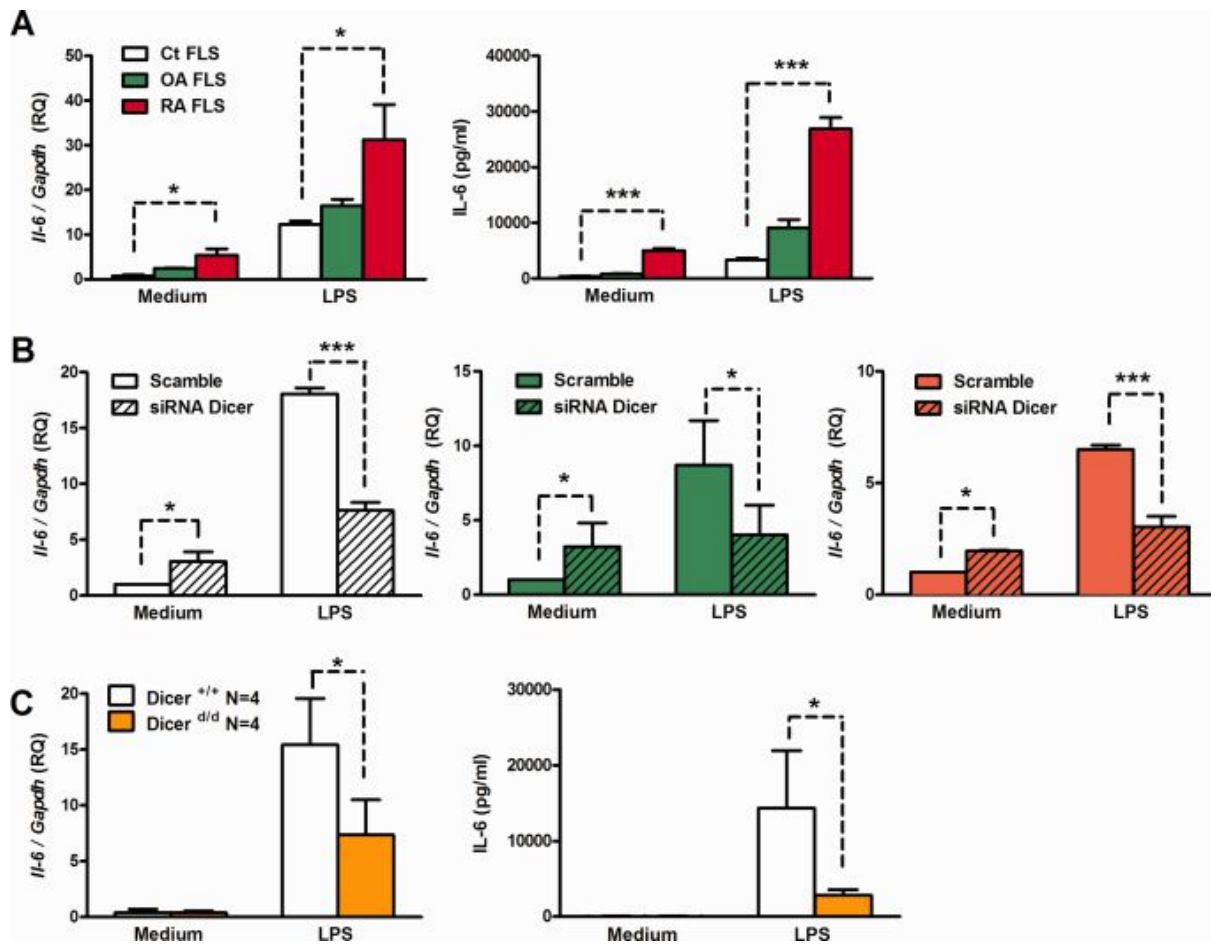


Figure P5. Effet de la réduction de l'expression de *DICER1* sur l'expression et la sécrétion d'IL-6 par les FLS. **A**, Quantification d'IL-6 dans des FLS provenant de sujets sains contrôles (n=3), de patients atteints d'OA (n=3) et de patients atteints de PR (n=3). Les cellules sont mises en culture et traitées ou non avec du lipopolysaccharide (LPS) pendant 6 heures. Les transcrits d'*IL-6* sont évalués par RT-qPCR et normalisés par rapport à l'expression de la *Gapdh* (gauche), alors que la sécrétion d'IL-6 est évaluée par dosage immuno enzymatique (ELISA) (droite). **B**, Quantification de l'*Il6* dans les FLS provenant de sujets sains contrôles (gauche), de patients atteints d'OA (milieu) et de patients atteints de PR (droite) après transfection soit par un siRNA contrôle (Scramble) soit par un siRNA ciblant *DICER1* (siRNA Dicer). Les cellules sont traitées ou pas avec du LPS pendant 6h avant que les transcrits d'*Il6* soit évalués en RT-qPCR et normalisés par rapport à l'expression de la *Gapdh*. **C**, Quantification de l'*Il6* dans les FLS provenant de souris contrôles (*Dicer*<sup>+/+</sup>) ou de souris mutantes (*Dicer*<sup>d/d</sup>). Les FLS en cultures sont traités ou non avec du LPS pendant 6h avant que les transcrits d'*IL-6* soit dosés en RT-qPCR et normalisés par rapport à l'expression de la *Gapdh* (gauche), alors que la sécrétion d'IL-6 est évaluée par dosage immuno enzymatique (ELISA) (droite). Résultat représentatif de 3 expériences indépendantes avec des nombres similaires de souris. La valeur représentée est la moyenne  $\pm$  l'écart type. \* =  $P < 0.05$  ; \*\* =  $P < 0.001$  ; \*\*\* =  $P < 0.0001$ .

Nous avons également évalué la transcription et la sécrétion d'IL-6 dans des cultures de FLS provenant de souris sauvages *Dicer*<sup>+/+</sup> et de souris mutantes *Dicer*<sup>d/d</sup> (Fig P5C). Nous avons alors constaté une réduction, tant au niveau de l'ARN que de la protéine, de l'IL-6 dans les cultures de FLS provenant de souris *Dicer*<sup>d/d</sup>. Ce résultat peut sembler en contradiction avec le résultat *in vivo* montrant une aggravation des symptômes arthritiques chez les souris mutantes

*Dicer*<sup>d/d</sup> après induction par STA K/BxN. Toutefois, ce paradoxe doit être interprété en considérant le mécanisme inflammatoire du modèle STA K/BxN, qui est dépendant du complément et non pas de l'IL-6.

En prenant en compte ces résultats nous avons pensé que le milieu inflammatoire lui-même pourrait induire la régulation à la baisse de l'expression de *Dicer*. Nous avons donc quantifié son expression dans les FLS provenant de sujets sains après stimulation avec diverses cytokines inflammatoires. Nous avons observé que l'addition d'IL-6 au milieu de culture pouvait induire une réduction dans l'expression de *Dicer* (Fig S4 *Additional Supporting Information* page 185). Cependant, les FLS isolés directement d'articulation de souris K/BxN, qui produisent des taux d'IL-6 élevés, expriment un niveau de *Dicer* comparable à celui retrouvé dans les FLS de souris contrôles. Cette observation reflète les différences entre les modèles murins et la pathologie humaine.

Dans nos expériences de cultures cellulaires, nous avons observé une confluence plus précoce pour les FLS provenant de souris *Dicer*<sup>d/d</sup> par rapport aux FLS de souris contrôles *Dicer*<sup>+/+</sup>, semblant indiquer une prolifération accrue ou une apoptose réduite de ces cellules isolées de souris mutantes. Nous avons confirmé cette observation par un test de coloration MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) (Fig 5S *Additional Supporting Information* page 186) alors que la mesure de la prolifération cellulaire par intégration de BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) n'a montré aucune différence entre les FLS provenant de souris *Dicer*<sup>d/d</sup> et les contrôles *Dicer*<sup>+/+</sup> dans des conditions de culture normales (sans stimuli) ou après traitement avec du LPS (Fig 6S *Additional Supporting Information* page 186). Enfin, nous avons constaté, après induction par FasL ou la staurosporine, une résistance à l'apoptose chez les FLS provenant de souris *Dicer*<sup>d/d</sup> (Fig P6A et P6B). De façon intéressante, nous avons aussi constaté la même résistance pour les cellules provenant de patients atteints de PR (Fig P6C).

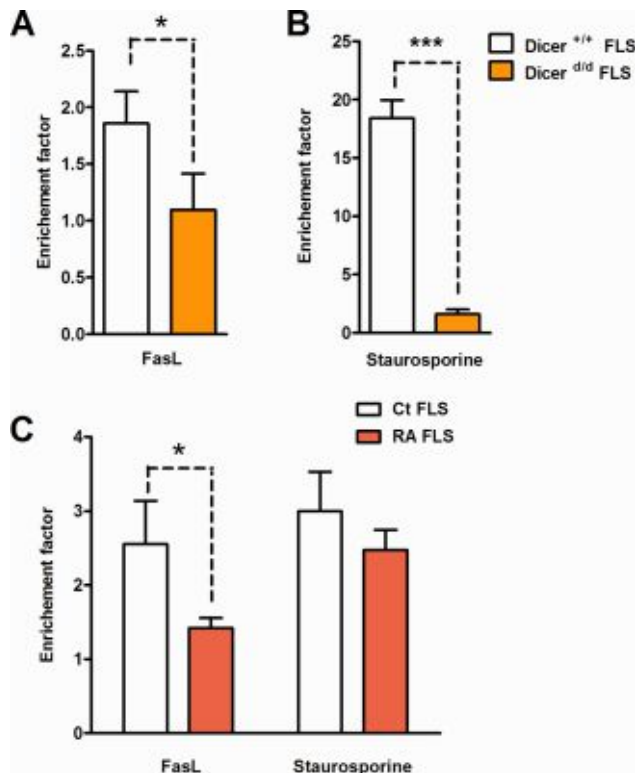


Figure P6. **Résistance à la stimulation apoptotique par les FLS déficients en *Dicer* provenant de souris mutantes (*Dicer*<sup>d/d</sup>) et de patients atteints de PR.** **A et B**, Evaluation de l'apoptose induite sur des FLS provenant de souris contrôles (*Dicer*<sup>+/+</sup>) (n=4) et de souris mutantes (*Dicer*<sup>d/d</sup>) (n=4) en réponse au FasL (**A**) et à la staurosporine (**B**). Les cellules sont incubées avec 500 ng/ml de FasL ou 1 μM de staurosporine, et la mort cellulaire est évaluée par quantification des mononucléosomes en dosage immuno enzymatique. Le facteur d'enrichissement correspond à la différence de la densité optique mesuré sur le même échantillon avant et après traitement. Le résultat est représentatif de deux expériences indépendantes. **C**, Evaluation de l'apoptose induite sur des FLS provenant de sujets sains contrôles (n=5) ou de patients atteints de PR (n=5). Les cellules sont incubées avec 500 ng/ml de FasL ou 1 μM de staurosporine, et le résultat est évalué comme dans **A** et **B**. La valeur représentée est la moyenne ± l'écart type. \* = P < 0.05 ; \*\* = P < 0.001 ; \*\*\* = P < 0.0001.

## 2.1. Discussion publication 1

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie multifactorielle dont les analyses de génétique associative ont montré l'existence de plus de 100 loci de susceptibilité (Diogo et al., 2014; Eyre et al., 2012). En plus de ces gènes qui codent pour des protéines, plusieurs miRNAs montrent une expression dérégulée qui permet de les impliquer dans cette pathologie (Ammari et al., 2013). Dans cette étude nous avons pu montrer une réduction de *DICER1*, une protéine impliquée dans la biogénèse des microARNs, dans les FLS de patients atteints de PR. Si le mécanisme précis reliant la réduction de l'expression de *DICER1* et l'aggravation de la PR reste encore à élucider, nos résultats indiquent une corrélation positive entre la quantité d'ostéoclaste et l'inflammation synoviale chez les souris *Dicer<sup>d/d</sup>*, et peuvent être interprétés de deux manières.

La première hypothèse, est que l'augmentation de l'ostéoclastogénèse est déclenchée de façon directe par la diminution des microARNs et que cela participe au maintien d'une inflammation. Par ailleurs, des données préliminaires de notre laboratoire indiquent que cette réduction de microARNs pourrait favoriser l'ostéoclastogénèse *ex vivo*, en accord avec un concept récent, suggérant que l'atteinte osseuse pourrait précéder les processus d'inflammation (Kleyer and Schett, 2014).

La deuxième hypothèse est que la réduction de microARNs induit une inflammation excessive. Ce modèle est corroboré par le fait que les FLS de patients atteints de PR expriment de grandes quantités d'IL-6 à l'état basal *ex vivo* (Fig P5A). Cette augmentation de l'expression de l'IL-6 à l'état basal est aussi retrouvée chez les FLS de sujets sains après transfection par un siRNA ciblant *DICER1* (Fig P5A). Cela suggère que les microARNs ont un effet régulateur important sur l'expression excessive et spontanée de médiateurs de l'inflammation, qui sont eux-mêmes impliqués dans la différenciation des ostéoclastes (Charles et al., 2012). Ce qui relie cette fois la diminution de l'expression de *DICER1* et l'atteinte osseuse de façon indirecte.

Un rôle alternatif de *DICER1* (indépendamment de son rôle sur les microARNs) peut aussi être considéré. En effet, *DICER1* est engagé dans plusieurs complexes qui sont impliqués dans des processus divers, tels que l'assemblage de la chromatine ou la signalisation des récepteurs nucléaires (Kurzynska-Kokorniak et al., 2015). Enfin, il a récemment été montré que *DICER1* prend en charge les séquences Alu et évite ainsi l'accumulation de grandes quantités d'ARNdb dans les cellules épithéliales pigmentées de la rétine, les protégeant ainsi contre l'inflammation excessive induite par l'activation de l'inflammasome NLRP-3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3) (Kaneko et al., 2011; Tarallo et al., 2012).

Compte tenu de la réduction modeste de l'expression des miARNs observée dans les FLS de patients atteints de PR, un tel mécanisme d'action de la protéine DICER1 pourrait être aussi impliqué dans la physiopathologie de l'inflammation arthritique.

L'absence de symptômes inflammatoires arthritiques spontanés dans le modèle murin déficient en *Dicer* démontre que la réduction importante de l'expression de cette protéine ne suffit pas à récapituler les interactions complexes qui mènent au déclenchement de l'arthrite. Cependant, l'induction de l'arthrite chez ces souris par des injections répétées de sérum K/BxN qui miment la succession des phases aiguës constatées dans la pathologie humaine, a abouti à une aggravation des symptômes chez les souris *Dicer*<sup>d/d</sup>. Ce résultat indique que la réduction de DICER crée des conditions favorables à la mise en place de la chronicité de l'inflammation articulaire et des lésions tissulaires. Cette observation est en accord avec des résultats publiés montrant que la réduction de l'expression des microARNs ne suffit pas à déclencher des phénotypes majeurs, et que des événements extérieurs sont nécessaires à l'observation d'un effet concret (Emde and Hornstein, 2014).

Les patients atteints de pathologies auto-inflammatoires / auto-immunes comme la PR, montrent une susceptibilité accrue au développement de certains lymphomes (Dias and Isenberg, 2011; Franks and Slansky, 2012). Le lien exact entre ces pathologies reste très mal compris. Néanmoins, plusieurs caractéristiques sont partagées entre PR et cancer, principalement, la prolifération cellulaire. Des mutations, par exemple dans le gène codant P53, ont été identifiées dans plusieurs cancers ; elles sont directement impliquées dans le contrôle de la prolifération cellulaire et se trouvent aussi associées à une susceptibilité augmentée pour la PR (Pap et al., 2001). De plus, jusqu'à présent les variants de *DICER1* ont été décrits dans des maladies de prolifération cellulaire incontrôlée (cancer de l'ovaire, tumeur pleuro pulmonaire et hyperplasie du parenchyme de la thyroïde dans le goitre). De façon intéressante, nous avons constaté qu'aussi bien les FLS provenant de patients atteints de PR que de souris *Dicer*<sup>d/d</sup> montrent une résistance à l'apoptose induite par le FasL ou la staurosporine (Fig P6), une particularité qui peut expliquer l'hyperplasie de la membrane synoviale observée chez les patients atteints de PR.

Cependant, des investigations plus poussées sur des cohortes plus nombreuses de patients et conduisant à la mesure de divers paramètres de la PR, comme l'activité de la maladie à travers le DAS28 (Score visuel sur 28 articulations) ou le niveau de la protéine C-réactive et d'autres marqueurs de l'inflammation, pourront nous renseigner sur la corrélation éventuelle entre le niveau d'expression de *DICER1* et l'incidence ou la sévérité de la PR. Malgré tout, notre

étude a décrit pour la première fois le rôle central de *DICER1* dans l'inflammation, l'atteinte osseuse et la prolifération cellulaire dans le contexte de la PR.

# Résultats Manuscrits soumis et publiés





**Manuscrit 1 :****plasmacytoid dendritic cells are potent anti-inflammatory cells in arthritis that can be harnessed therapeutically**

**Ramzi Nehmar**<sup>1,2</sup>, Ghada Alsaleh<sup>1,2</sup>, Benjamin Voisin<sup>3</sup>, Vincent Flacher<sup>3</sup>, Birgit Niederreiter<sup>4</sup>, Thierry Vandamme<sup>5</sup>, Gernot Schabbauer<sup>6</sup>, Philippe Kastner<sup>7</sup>, Susan Chan<sup>7</sup>, Christopher Mueller<sup>3</sup>, Jean Sibia<sup>1,2</sup>, Seiamak Bahram<sup>1,2</sup>, Stephan Blüml<sup>4</sup> and Philippe Georgel<sup>1,2</sup>

1 Université de Strasbourg, INSERM, IRM UMR-S 1109, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Faculté de Médecine. F-67000 Strasbourg, France

2 Fédération Hospitalo-Universitaire, OMICARE, Centre de Recherche d'Immunologie et d'Hématologie, 67085 Strasbourg, France.

3 Université de Strasbourg, CNRS UPR 3572, Laboratory of Immunopathology and Therapeutic Chemistry/Laboratory of Excellence MEDALIS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire , 67000 Strasbourg, France

4 Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine 3, Medical University Vienna , Vienna , Austria

5 Université de Strasbourg, CNRS UMR 7199, Faculté de Pharmacie. 67400 Illkirch, France

6 Institute for Physiology, Center for Physiology and Pharmacology, Medical University of Vienna Vienna, Austria.

7 Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Université de Strasbourg, INSERM U964, CNRS UMR 7104, 67404 Illkirch, France

**Abstract**

Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) are major type I Interferon (IFN) producers following activation. They play important roles in responses to viral infections and participate to the etiology of several chronic inflammatory/autoimmune diseases. However, also anti-inflammatory properties of pDCs have been reported. Here we report that pDCs are a central cell type limiting the severity of inflammatory arthritis. PDC-deficient mice showed exacerbation of inflammatory and arthritic symptoms after arthritogenic serum transfer. In contrast, enhancing pDC recruitment and activation to arthritic joints by topical application of the TLR7 agonist Imiquimod significantly ameliorated arthritis in various models. Imiquimod induces an interferon signature and leads to reduced infiltration with inflammatory cells, and its therapeutic effects are dependent on TLR7 and type I interferon signaling. Our results therefore demonstrate a central role for pDCs in joint inflammation which potentially could be exploited for therapeutic purposes in patients with inflammatory arthritides.

## Introduction

Rheumatoid Arthritis (RA) is a multifactorial (depending on genetic, epigenetic and/or environmental factors <sup>1</sup>) polygenic autoimmune disease in which secondary autoinflammatory mechanisms are major contributors to the pathogenesis, hence its central position in the immunological disease continuum defined by the classification of McGonagle and McDemott <sup>2</sup>. This implies that the –still partially understood- etiology of this severe condition involves numerous different cell types, among which innate and adaptive immune cells, along with the resident synovial fibroblasts, participate to the initiation and maintenance of an inflammatory milieu in the affected joints <sup>3</sup>. Indeed, the current dogma holds that interactions between heredity and environmental triggers promote a break of tolerance to self-antigens, leading to both B- and T-cell activation which feeds a vicious circle leading to proinflammatory cytokine production, increased aberrant adaptive responses, neovascularisation and fibroblast-like synoviocyte (FLS) activation. To control or avoid this pathogenic interplay of cells in the synovium of RA patients, drugs acting on different cellular and / or molecular levels have been developed <sup>4</sup> and major successes have been obtained in the past 15 years with the marketing of highly effective specific biological drugs <sup>5,6</sup>, among which those targeting various cytokines offer remarkable therapeutic advances <sup>7</sup> which are, however, accompanied by unwanted side effects <sup>4</sup>. While current available therapies aim at controlling the various stages leading to RA pathogenesis either by blocking proinflammatory cytokines mainly produced by innate cells or synoviocytes or by impairing B- or T-cell functions, dendritic cells (DCs), which are at the crossroads of the dialog between innate and adaptive immune cells, are presently not considered as potential therapeutic targets. This appears paradoxical at least concerning a subpopulation of DCs, the plasmacytoid DCs (pDCs) which are characterized by their capacity to secrete large amount of Type I Interferons (IFNs), which are inflammatory cytokines of paramount importance in the pathophysiology of many autoimmune / autoinflammatory diseases <sup>8</sup>. However, while the involvement of type I IFNs in RA pathogenesis is substantiated by several observations, such as linkage with SNPs in genes like *Irf5* or *Irf8* noticed upon GWAS analysis of RA cohorts <sup>9</sup> or the so-called “IFN signature”, which translates the overexpression of a subset of IFN-stimulated genes (ISGs) in the peripheral blood cells of RA patients <sup>10,11</sup>, the precise effect of these cytokines remains controversial. This is particularly well evidenced by the dichotomy between the positive and promising action of Type I IFNs when administered by intra-articular delivery in animal models <sup>12</sup> and the subsequent absence of biological effects when these molecules were delivered in the context of unsuccessful clinical trials <sup>13</sup>. Hence, the precise role of Type I IFNs, either beneficial or detrimental, in RA pathogenesis still remains debated. Therefore the potential to target these cytokines or the cells that produce them (pDCs) in order to expand the spectrum of molecules that may be prescribed to RA patients is still largely unexplored, despite obvious medical needs (among RA patients, 30-40% do not respond to biologics and complete remission is achieved in only 25-30% <sup>4</sup>) and clear evidence demonstrating the presence of pDCs in the synovium of RA patients <sup>14</sup>.

The present work aims at clarifying this debate. Using various models of pDC-depleted mice in which joint inflammation has been triggered by arthritogenic K/BxN serum transfer, we observed worsened symptoms, thus suggesting that these cells exert protective functions in RA pathophysiology. We next showed that mobilization/activation of pDCs upon topical application of the TLR7 ligand imiquimod (IMQ) induces a remarkable reduction of the inflammation and bone erosion induced in three different mouse models of RA. This effect is accompanied by local recruitment of pDCs and reduced neutrophil infiltrates in the joint, as revealed by FACS and transcriptomic analyses. Importantly, the beneficial effects of IMQ require Type I IFN signaling. These observations highlight

the potential efficacy of IMQ, an FDA-approved molecule and its possible future utilization as the first, painless, topical treatment of RA.

## Results

### pDC deficiency exacerbates joint inflammation in serum transfer arthritis.

To evaluate the contribution of pDCs in the pathogenesis of RA, we first performed serum transfer arthritis (STA) with arthritogenic serum (K/BxN) serum injections in control and *Ikaros*<sup>L/L</sup> mice, in which a hypomorphic mutation causes a deprivation of peripheral pDCs while myeloid and other lymphoid cells (B, T and NK cells) remain unaffected<sup>15</sup> (Suppl. Fig. 1A-C). The severity of joint inflammation was evaluated upon measurement of paw thickness. *Ikaros*<sup>L/L</sup> mice exhibited significant increase in joint swelling from day 6 to 15 (Fig. 1A). Visual scoring of the joints (considering redness and swelling) gave similar results (Suppl. Fig. 1D). Increased weight loss (Fig. 1B) additionally indicated that pDC depletion promoted more severe systemic effects in *Ikaros*<sup>L/L</sup> mice upon serum transfer. These observations were confirmed by cytokine quantification which showed increased *Il-6* and *Il-1b* gene expression in the paws of *Ik*<sup>L/L</sup> mice at the peak of the response (day 9, Fig. 1 C, D) and augmented secreted IL-6 in the blood of mutant animals at days 5 and 9 (Fig. 1E, F). Histological examination performed at day 9 (illustrated Fig. 1 K-L) indicated increased inflammatory infiltrate, osteoclast numbers and, importantly, bone erosion in the paws of *Ik*<sup>L/L</sup> mice (Fig. 1 G-I, see representative pictures of TRAP staining in panels K and L). While the STA model is characterized by its acute feature and quick recovery, we noticed a lasting bone erosion phenotype in *Ik*<sup>L/L</sup> mice 22 days after the induction of arthritis (Fig. 1J). Of note, *Ik*<sup>L/L</sup> mice did not spontaneously develop any obvious bone defect, as evidenced from an exhaustive bone morphometric analysis (Suppl. Table 1). Furthermore, similar numbers of osteoclasts were obtained upon RANKL-stimulation of bone marrow cells from wild-type and *Ik*<sup>L/L</sup> mice (Suppl. Fig. 1E), indicating that osteoclastogenesis is also not impacted by the *Ikaros* mutation. Finally, we also detected a population of infiltrating pDCs (CD45<sup>+</sup>/B220<sup>low</sup>/PDCA1<sup>+</sup>) in periarticular tissues of STA-triggered control mice at day 10, which is absent in *Ik*<sup>L/L</sup> animals (Suppl. Fig. 1 F-H). Altogether, these data indicate that the presence of pDCs is important to limit/resorb the articular inflammation triggered by serum transfer.

To further demonstrate the role of pDCs, we used two different ablation methods. First, we injected the monoclonal antibody 120G8<sup>16</sup> specific for the bone marrow stromal antigen 2 (BST2 / Tetherin / CD317) predominantly expressed by mouse pDCs<sup>17</sup>, and followed inflammatory arthritis upon K/BxN serum transfer. Paw swelling was significantly increased in mice receiving 4 injections of 120G8 mAb compared to those in which a control isotypic antibody was injected (Suppl. Fig. 2A). Serum IL-6 levels quantified 5 days after arthritis induction were reduced in 120G8-treated mice compared to controls (Suppl. Fig. 2B). However, histological analysis did not reveal marked differences between pDC-depleted and control animals (Suppl. Fig. 2 C-E), which might be related to the resistant population of pDCs (B220<sup>+</sup>/PDCA1<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup>) remaining after 120G8 injections (Suppl. Fig. 2F-G) or alternatively, to the consumption of complement caused by the iterative mAb injections. Indeed, inflammation in the STA models is particularly complement-dependent<sup>18</sup>. To circumvent this caveat, we used BDCA2-DTR transgenic mice to perform inducible pDC ablation<sup>19</sup>. Using this approach, we first noticed that 5 successive injections (day 0, 2, 4, 6 and 8) of Diphtheria Toxin (DT) partially phenocopied the *Ik*<sup>L/L</sup> mutation. Indeed, a significant increase of paw swelling (Suppl. Fig. 3A) and systemic IL-6 secretion at day 5 (Suppl. Fig. 3B) was noticed in DTR transgenic mice upon DT injection. However, RT-qPCR quantification of *Il-6* and *Il-1b* transcripts at day 9 did not show any difference between controls and BDCA2-DTR mice (Suppl. Fig. 3C). Accordingly, this protocol; although efficient,

did not enable a pDC depletion as extensive as in  $I\kappa^{L/L}$  mice (Suppl. Fig. 3D, E). Therefore, in line with our previous analysis of 120G8-depleted mice, BDCA2-DTR Tg animals did not exhibit enhanced arthritic characteristics upon histological analysis (Suppl. Fig. 3 F-H). Altogether, these data suggest a protective role of pDCs in inflammatory arthritis.

**pDC recruitment/activation dampens inflammation and reduces bone destruction in mouse RA models.**

We next sought to recruit and activate pDCs with the aim of controlling experimental inflammatory arthritis. Imiquimod (IMQ), a Toll-like receptor 7 (TLR7) agonist, has been shown to induce psoriasis-like lesions upon topical application *via* the recruitment and activation of pDCs<sup>20,21</sup>. We first tested the effect of a cream containing 5% IMQ in the STA model and observed that 2 topical applications of 0.75  $\mu$ g of IMQ on the inflamed joints at days 4 and 9 significantly reduced swelling (Fig. 2A, B) accompanied by diminution of local *Il-6* and *Il-1b* gene expression (Fig. 2C, D) and systemic IL-6 secretion (Fig. 2E). Of note, increased IFN- $\beta$  secretion was also observed after IMQ application at day 4 (Fig. 2F). This reduced inflammation ameliorated bone quality, as seen by decreased erosion in the IMQ-treated group compared to the vehicle (Fig. 2 G-H). Importantly, IMQ application increased the population of peri-articular pDCs in wild-type animals (compared to vehicle-treated mice, see Suppl. Fig 1F), but not in  $I\kappa^{L/L}$  mutants (Fig. 2 I-K) in which the treatment appeared poorly effective both locally (swelling/score) and systemically (weight) (Fig. 2L-N) compared to wild-type mice.

To expand these observations to alternative RA models<sup>22</sup>, we also tested the effect of iterative IMQ applications in DBA-1 mice following collagen-induced arthritis (CIA). We initiated IMQ applications when the first signs of inflammation appeared at day 28 and then repeated the treatment 4 times (days 31, 36, 41, 46). This led to reduced swelling of the paws compared to the animals that received the vehicle cream (Fig. 3A; Suppl. Fig. 4). This observation was corroborated by decreased IL-6 secretion in the IMQ-treated group at the peak of the symptoms (day 50, Fig. 3B). Histology of the paws revealed marked reduction of the inflammatory area, of the numbers of osteoclasts per hind paw and importantly, of bone erosion (Fig. 3 C-G).

Finally, we performed serial IMQ (or vehicle) application on one hind paw of hTNF-transgenic (Tg) mice, which are considered as a relevant model of erosive arthritis<sup>23</sup>. As seen in Figure 4 A-C, mice receiving IMQ exhibited reduced arthritis symptoms, as monitored by histological parameters.

**Imiquimod-mediated therapeutic effects require type I interferon signaling.**

Having established the beneficial impact of topical IMQ on joint inflammation, we aimed at describing its mechanism of action. First, we confirmed that topical application of IMQ requires signaling through TLR7 to induce its protective effects on joint inflammation. As shown in Suppl. Fig 5, IMQ applications at days 4 and 9 has no beneficial effects on local (increased joint swelling and score, panels A and B) or systemic (weight loss, panel C) arthritic symptoms caused K/BxN serum transfer in  $Tlr7^{-/-}$  animals. These observations correlate with steady-state levels of circulating IL-6 at day 5 (panel D) and lack of pDC mobilization in the joints (Panels E, F).

Next, we gathered additional details by (i) analyzing by flow cytometry (gating strategy in Suppl. Fig 6) the consequences of IMQ application to the innate immune cell populations present in the peri-articular tissue and (ii) performing a transcriptomic analysis of this microenvironment. We noticed that IMQ application (but not that of the vehicle cream) on the joints of wild-type mice performed at days 4 and 9 following K/BxN serum transfer drastically reduced the infiltrate of CD45+ immune cells (Fig. 5A), which is consistent with reduced swelling and expression of inflammatory markers (*Il-6* and

*Il-1*, Fig. 2C-E). Furthermore, IMQ induces the recruitment of pDCs, which become the major hematopoietic cell population in the periarticular tissues (Fig.5B, F), and Macrophages (Fig. 5C). These changes are accompanied by reduced conventional dendritic cells (cDCs, Fig. 5D) and neutrophils (Fig. 5E). Concordant with these observations, we observed IMQ-induced changes in our transcriptomic profiling, such as decreased expression of the genes encoding the neutrophil chemoattractants CXCL-1 and CXCL-2<sup>24</sup>, and increased expression of *Ccl-2* and *Ccl-5*, the products of which attract monocytes<sup>25</sup> and pDCs<sup>26</sup> (Fig. 6 G, Suppl. Fig 7). Importantly, the *Arg1/iNos* ratio indicated that infiltrating macrophages of IMQ-treated mice are polarized towards alternative activation<sup>27</sup>, which fits with reduced *Il-6*, *Il-1* and *Cd14* expression and reduced MHC-II staining in macrophages (Suppl. Fig 6D). Of note, a clear IFN signature was evidenced by increased *Irf-7* and several ISGs (Interferon-stimulated genes) such as *Mx1*, *Ifit 1* and *Cxcl-10* transcription. The lack of changes in the expression of *Ifn-b*, *Ifn a4* and *Ifn-a2* might reflect the fact that these genes are fast, non-lasting responders. Finally, the quantification of transcripts encoding matrix metalloproteinase (MMPs) which are important effectors participating in the bone damage following STA confirms the protective effect of IMQ. Indeed, expression of *Mmp-8* (whose KO increases bone erosion, thereby classifying this Mmp as “protective”<sup>28</sup>) is augmented by IMQ application, while transcripts encoding the “pathogenic” *Mmp-9*<sup>29</sup> and *-13*<sup>30</sup> were slightly reduced. RT-qPCR of a set of osteoclast related genes additionally showed reduced expression of the *Calcitonin Receptor* gene in the IMQ-treated samples, in line with the effects of the treatment on bone erosion, as seen upon histological examination. This analysis showed that topical application of IMQ induces profound changes in the cellular cocktail that infiltrates that joint after STA induction. Most of these changes (M2 polarization of macrophages, reduced proportion of neutrophils) likely account for the beneficial effects of IMQ on joint inflammation and subsequent bone damages induced in STA-induced mice. Finally, the transcriptomic “IFN signature” prompted us to evaluate the importance of type I IFN signaling in the anti-inflammatory effects mediated by IMQ application. For this, we followed the impact of IMQ application in *Ifnar*<sup>-/-</sup> mice upon K/BxN serum transfer. The data demonstrated that absence of type I IFN signaling impairs IMQ-dependent anti-inflammatory effects, as judged by paw swelling, weight, IL-6 expression and histological analyses on the arthritic joints (Fig. 6). Altogether, we reveal a stepwise scenario whereby the sequence of events IMQ-TLR7-pDCs-Type I IFN creates an appropriate environment to dampen joint inflammation and reduce subsequent bone damage.

## Discussion

The role of type I IFNs in the pathogenesis of RA is a matter of controversy<sup>10</sup>. Several reports pointed to an association between increased type I IFN secretion and subsequent transcription of IFN-stimulated genes (the so called “IFN signature”<sup>31</sup>) in some RA patients<sup>32</sup>. This suggests that this cytokine family exerts pro-pathogenic roles, which correlates with cases of disease induction in hepatitis C patients treated with PEG-IFN<sup>33</sup>. However, several mouse studies have challenged this concept. For instance, IRF-7-deficient mice are resistant to serum transfer arthritis<sup>34</sup> and several authors have reported beneficial effects on IFN- $\beta$  injections in mice<sup>12</sup> or rhesus monkeys<sup>35</sup> following arthritis induction. This has led to a first clinical trial involving a small (11) number of patients<sup>36</sup> whose promising results could not be reproduced when the number of subjects was scaled-up (209)<sup>13</sup>. Furthermore, a pathogenic role of type I IFNs is also difficult to reconcile with the correlation between a reduction in pDCs and the severity of arthritis shown in mice<sup>37</sup> and in humans<sup>38</sup>, since pDCs are the main source of type I IFNs. Here, using three models of pDC depletion, we provide substantial evidence for a protective role of pDCs in inflammatory arthritis (Fig. 1 and Suppl. Fig 1-3).

We also managed to mobilize these cells at the inflamed site using topical application of imiquimod, a TLR7 ligand. Interestingly, IMQ is the active component of an FDA-approved topical treatment of superficial basal cell carcinoma and external genital warts, a process which is also pDC-dependent<sup>26</sup>. This simple procedure exhibited remarkable efficacy, both at the level of the resolution of the inflammation and for the protection from bone damages. Importantly, we demonstrated that this protocol is efficient in three different models of joint arthritis characterized by different specificities in term of mechanisms of disease initiation and perpetuation<sup>39</sup>, the K/BxN serum transfer, the collagen-induced and the hTNF-Tg (Fig. 2-4). Finally, our flow cytometry and transcriptomic analyses (Fig. 5) of periarticular tissues revealed that IMQ application induces a TLR7-pDC-type I IFN cascade which ultimately reduces the proportion of infiltrating neutrophils, whose cytotoxic functions make them major contributors to RA pathology<sup>40</sup>. This is accompanied by increased macrophage presence whose polarization towards an alternatively activated phenotype likely participates to the maintenance of an anti-inflammatory milieu.

In accordance with a previous report describing CpG-mediated inhibition of STA-induced arthritis<sup>41</sup>, our data suggest that pDCs are major players in the regulation of inflammatory reactions in the joints. While the precise mechanisms of the cellular crosstalk remain to be deciphered, both IMQ- and CpG-mediated resolution of inflammatory arthritis appears to converge toward a reduction of the neutrophils infiltrate in the joint. A more thorough transcriptomic analysis (using RNA sequencing) of the inflamed joint following IMQ application should identify signatures enabling the identification and activation status of the different innate immune cells present in this compartment<sup>42</sup>. However, our work extends these observations beyond the innate immunity-dependent models of arthritis in mice (namely K/BxN serum transfer and hTNF-transgenic) to the CIA model in which T and B cell activation is required. Furthermore, the present work points to an essential role of type I IFN signaling in the protective effect of IMQ following experimental arthritis. This is for instance illustrated by the upregulation of the ISG *Cxcl-10* which, through its antiangiogenic properties<sup>43</sup>, may also participate in this therapeutic process. In addition, our data fit with recent observations which enabled a re-evaluation of the role of IFN- $\beta$  and pDCs in the dampening of excessive inflammation occurring in various pathological settings<sup>44,45</sup>.

Up to now, manipulation of DCs for therapeutic purposes has been considered by means of adoptive transfer, for instance of pDCs which confer recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)<sup>44</sup> or of tolerogenic DCs (tolDCs) in RA patients<sup>46</sup>. While infusion of autologous tolDC appears feasible, and possibly beneficial (although not yet demonstrated) in large joints, this expensive procedure is unlikely to be applicable to the ever-growing number of patients in developed countries. Furthermore, it does not appear suitable for smaller joints in which injections remains a very painful procedure. We believe that mobilization of pDCs upon topical application of IMQ, although not devoid of risks<sup>47</sup>, might represent an attractive, cost-effective and efficient alternative to improve the management of RA patients. A future clinical trial should clarify this opportunity.

## Online Materials and Methods

### Mice.

Ikaros-deficient mice (Ik<sup>L/L</sup>) were described in<sup>15</sup>. *Tlr 7*<sup>-/-</sup> were provided by Lena Alexopoulou (CIML, Marseille); BDCA2-DTR were obtained from Maria Sibilja, Medical University, Vienna, with the agreement of Marco Colonna, Washington University, St. Louis, MO; *Ifnar1*<sup>-/-</sup> were obtained from Rolf Zinkernagel, University Hospital, Zurich. Littermate controls are indicated by +/+ in all figures.

Mice used in all experiments were age- and sex-matched. Animals were maintained under pathogen-free conditions in the animal care facility of the Institut d'Immunologie et d'Hématologie. hTNF-transgenics were provided by George Kollias (Biomedical Sciences Research Center Alexander Fleming",Vari, Greece) and maintained in the animal facility of the Medical University Vienna.

### **Ethics statement**

Handling of mice and experimental procedures were conducted in accordance with the French Law for the Protection of Laboratory Animals. The procedures were approved by the service vétérinaire de la Préfecture du Bas-Rhin (France) and by the Regional Ethical Committee for Animal Experimentation (CREMEAS) of the Strasbourg University under the authorization number 01608.01. Experiments performed in Vienna were approved by the animal ethics committee of the Medical University Vienna and comply with institutional guidelines (BMWF-66.009/0103-C/GT/2007 and BMWF-66.009/0241-II/3b/2011).

### **K/BxN serum transfer-induced arthritis and clinical scoring**

K/BxN serum was collected from 9-week-old arthritic K/BxN mice. The serum samples were pooled and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Arthritis was induced in 12-16 week-old mice by two successive i.p. injections of K/BxN serum (150  $\mu\text{L}$ , at day 0 and 1). The articular arthritis index was visually determined on a 0–4 scale, where 0 = no swelling or erythema, 1 = slight swelling and/or erythema, 2 = low-to-moderate edema, 3 = pronounced edema with limited use of the joint, and 4 = excessive edema with joint rigidity. Clinical indices for all four paws were added as a composite score. Hindpaw and forepaw thickness was measured with a caliper and mice were weighed daily.

### **Collagen-induced arthritis**

Collagen-induced arthritis (CIA<sup>48</sup>) was induced in 12 week-old DBA/1 mice by intradermal injection of 50  $\mu\text{l}$  of an emulsion containing 2mg/mL chicken collagen (Sigma C9301-25MG), and 2mg/mL heat-killed *M. tuberculosis* H37Ra (InvivoGen, TLRL-HKMT-1) in complete Freund's adjuvant (Sigma F5881). The emulsion is obtained by adding drop by drop the collagen dissolved in 10mM acetic acid in the adjuvant under intense mechanical stirring. Injection is performed in anesthetized mice at the tail base with a glass syringe (Hamilton). Two weeks later, a booster shot is performed by injection of 50  $\mu\text{l}$  of an emulsion composed of collagen 2 mg/ml in incomplete Freund's adjuvant (Sigma F5506). Arthritis is quantified by measurement of paw swelling using a caliper and a visual score. First symptoms appear at day 21-28 after the first injection and the peak of inflammation is reached at day 50-55.

### **IMQ applications.**

#### **RNA preparation from paws.**

Hind paws are harvested from euthanized mice and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Before RNA extraction, paws are sliced with a scalpel in a Petri dish placed on dry ice. Pieces are placed in a polypropylene tube maintained in ice and 2 ml Trizol (TRI Reagent T9424-200ML) are added before homogenization with a tissue tearor (OMNI International Tissue MASTER 125). Homogenates are transferred in a nuclease-free 1.5 ml Eppendorf tube and RNA is purified as previously described<sup>49</sup>. RNA quality is evaluated with a bioanalyzer and quantification is performed using a nanodrop.



### Real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

Total RNA was reverse transcribed using the First Strand cDNA Synthesis Kit according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Real-time quantitative RT-qPCR was performed in a total volume of 20  $\mu$ l using SensiMix Plus SYBR kit (Quantace, Corbett Life Science) and gene-specific primers are presented in table 1. After an initial denaturing at 96° C for 10 min, the temperatures used were 95° C for 10 s, 60° C for 15 s, 72° C for 25 s using a Rotor-Gene 6000 real-time PCR machine (Corbett Life Science). Amplification products were detected as an increased fluorescent signal of SYBR Green during the amplification cycles. Results were obtained using SDS Software (Perkin Elmer) and evaluated using Excel (Microsoft). Melting-curve analysis was performed to assess the specificity of PCR products. Relative expression was calculated using the comparative threshold cycle (Ct) method.

### Histological Examination

Hind paws were fixed in 4.5% formalin for 6 hours and then were decalcified in a 14% EDTA/ammonium hydroxide buffer (pH 7.2; Sigma-Aldrich) at 4°C until the bones were pliable. Serial paraffin sections (2  $\mu$ m) were stained with hematoxylin and eosin (H&E), with toluidine blue, or for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity. For quantification of inflammation, areas of H&E-stained sections were measured. The total area of inflammation for each mouse was calculated by evaluating the tarsal joints of the hind paws. The same H&E-stained sections were analyzed as described above for quantification of erosions. The number of osteoclasts in TRAP-stained serial sections was counted as described above. Cartilage breakdown (i.e., proteoglycan loss and matrix dissolution) was measured from toluidine blue–stained serial sections. Total and destained cartilage areas were measured, and the percentages of destained areas indicating low proteoglycan content were ascertained. Quantification of the areas of inflammation, H&E sections were evaluated using an Axioskop 2 microscope (Carl Zeiss MicroImaging) and Osteomeasure Analysis System (OsteoMetrics).

### Antibodies:

FITC-labeled: anti-CD45 (Clone 30F11, BD Bioscience), anti-B220 (Clone RA3-6B2, BD Bioscience), anti-Gr1 (Clone RB6-8C5, BD Bioscience), anti-NK1.1 (Clone PK136 (RUO), BD Bioscience), anti-CD207 Langerine (Clone 929F3, Dendritics), anti-CD3e (Clone 145-2C11, BD Bioscience), anti-Ly6G (Clone 1A8, BD Bioscience) and anti-PDCA1 (Clone eBio927, eBioscience).

PE-labeled: anti-PDCA1 (Clone eBio 129c, eBioscience), anti-Ly6C (Clone AL-21, BD Bioscience) and PE-labeled CD11c (Clone HL3, BD biosciences).

PercP-Cy5-labeled: anti-CD11c (Clone N418, BD biosciences) and anti-CD11b (Clone M1/70, BD biosciences).

APC-labeled: anti-B220 (Clone RA3-6B2, eBioscience), anti-CD86 (Clone GL1, Beckman Coulter), anti-CD11b (Clone M1/70, BD biosciences), anti-CD64 (Clone X54-5/7.1, Biolegend).

AF 700-labeled: anti-MHC II (Clone M5/114.15.2, eBioscience).

PE-Cy7-labeled: anti-CCR9 (Clone CW1.2, Biolegend) and anti-CD45 (Clone I3/2.3 and 30F11, Biolegend)

Fc-Block anti-CD16/CD32 (Clone 2.4G2, BD Bioscience)

### Analysis of pDC depletion in spleen by flow cytometry

Spleens were harvested, cut into small pieces before being incubated in dissociation solution (RPMI supplemented with 2% FCS, 50µg/mL DNase I (Roche) and 1mg/mL Collagenase D (Roche)) at 37°C for approximately 2h under agitation. Cell suspensions were then filtered (with a 100µm- and then a 40µm-cell strainer, Corning) and 5mM EDTA was added in the medium to stop enzyme activity. A red cell lysis is performed using lysis buffer (NH<sub>4</sub>Cl 0,83%, NaHCO<sub>3</sub> 0,1%, EDTA 0,1mM).

For flow cytometry analysis, cells were pre-incubated for 20 minutes at 4°C with 5µg/mL anti-CD16/CD32 antibody aiming to block the Fc-receptors. Surface staining was realized by an incubation of cells with the selected antibody mix at 4°C for 25 minutes in staining buffer (PBS 2% FCS and 2.5mM EDTA), protected from light. Afterwards, the cells were washed 2 times in staining buffer. A cellular viability dye (7AAD, eBioscience) was added in each cell sample, 5 minutes before flow cytometry acquisition. The flow cytometry acquisition was realized with a BD Accuri™ C6 and data were analyzed with BD Accuri™ C6 software.

### Analysis of immune cell recruitment/maturation in paws and spleen after IMQ treatment

For paw cell isolation, periarticular tissues (surrounding paws bones), including skin and muscles, were dissected with forceps, cut into small pieces before being incubated in dissociation solution (RPMI supplemented with 2% FCS, 50µg/mL DNase I (Roche) and 1mg/mL Collagenase D (Roche) at 37°C for approximately 2h under agitation. Cell suspensions were then filtered (on a 100µm- and then a 40µm-cell strainer, Corning) and 5mM EDTA was added in the medium to stop enzyme activity.

To perform flow cytometry analysis, viable cells were labeled and Fc-Receptors blocked by pre-incubation for 20 minutes at 4°C with fixable viability dye eF780 (eBioscience) and 5µg/mL of anti-CD16/CD32 antibody respectively. Surface staining was realized by an incubation of cells with the selected antibody mix at 4°C for 25 minutes in staining buffer (PBS 2% FCS and 2.5mM EDTA), protected from light. For intracellular staining, cells were fixed and permeabilized for 20 minutes at 4°C (Cytofix/Cytoperm buffer, BD), washed and labeled with 0.5µg/mL of appropriated antibodies for 20 minutes at 4°C. Cells were washed again and flow cytometry acquisitions performed with a Gallios™ Flow Cytometer system (Beckman Coulter). Data were analyzed with FlowJo software.

### Statistical analysis

To analyze the time-dependent evolution of several parameters (paw thickness, joint arthritic score, weight), we calculated the area under the curve (AUC) and used non-parametric Mann-Whitney t (two-tailed unpaired) test to compare two independent groups using GraphPad 5.04 software. Similarly, IL-6 expression, RT-qPCR, quantification of cell population or osteomeasure data were analyzed using Mann-Whitney t (two-tailed unpaired) test. A probability (p) value of <0.05 was considered to be significant. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001.

### Figure legends

**Figure 1. Ikaros hypomorphic mutants display enhanced arthritis symptoms upon K/BxN serum transfer. (A)** Clinical quantification of paw swelling in wt (Ik<sup>+/+</sup>, n=6) and Ikaros mutants (Ik<sup>L/L</sup>, n=6) after induction of STA. **(B)** Incidence of STA induction on the weight of wt (Ik<sup>+/+</sup>, n=6) and Ikaros mutants (Ik<sup>L/L</sup>, n=6) mice. **(C)** Quantification of *Il-6* and **(D)** *Il-1b* expression by RT-qPCR in the paws of wt (Ik<sup>+/+</sup>, n=4) and Ikaros mutants (Ik<sup>L/L</sup>, n=4) 9 days after STA induction. **(E)** Quantification of serum

IL-6 by ELISA in wt (Ik<sup>+/+</sup>, n=6) and Ikaros mutants (Ik<sup>L/L</sup>, n=6) 5 days and **(F)** 9 days after STA induction. **(G)** Histomorphometric quantification of inflammatory area, **(H)** number of osteoclasts and **(I)** bone erosion of hind paws of wt and Ikaros<sup>L/L</sup> mice 9 days after induction of STA. **(J)** Histomorphometric quantification of bone erosion of hind paws of wt and Ikaros<sup>L/L</sup> mice 22 days after induction of STA. **(K)** Representative image and TRAP-stained histology of hind paws of wt and **(L)** Ikaros<sup>L/L</sup> mice 9 days after STA induction. Data are expressed as means +/- s.e. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001. Plots show data from one representative experiment of at least two with similar results.

**Figure 2. Imiquimod topical application reduces joint inflammation and bone damage caused by STA induction.** **(A)** Quantification of paw swelling and **(B)** clinical scoring of wt (C57Bl/6) mice after induction of STA. Animals were either treated by topical application of 5% IMQ (n=8) or a vehicle cream (n=8) on the wrists and ankles at days 5 and 9. **(C)** Quantification of *Il-6* and **(D)** *Il-1b* expression by RT-qPCR in the paws of IMQ- (n=6) or vehicle-treated C57Bl/6 mice (n=6) 9 days after STA induction. **(E)** Quantification of serum IL-6 by ELISA in IMQ- (n=6) or vehicle-treated C57Bl/6 mice (n=6) 9 days after STA induction. **(F)** Quantification of serum IFN- $\gamma$  by ELISA in IMQ- (n=6) or vehicle-treated C57Bl/6 mice (n=4) 5 days after STA induction **(G)** Representative image and TRAP-stained histology of hind paws of vehicle- and IMQ-treated C57Bl/6 mice 9 days after STA induction. **(H)** Histomorphometric quantification of bone erosion of hind paws of IMQ- (n=6) or vehicle-treated C57Bl/6 mice (n=6) 9 days after STA induction. **(I)** Representative flow cytometry analysis of joint infiltrating pDCs (CD45<sup>+</sup>; PDCA1<sup>+</sup>; B220<sup>+</sup>) in wt (Ik<sup>+/+</sup>) and Ikaros<sup>L/L</sup> mice treated by topical application of IMQ 5%. **(K)** Quantification of joint infiltrating pDCs in wt (Ik<sup>+/+</sup>, n=3) and Ikaros<sup>L/L</sup> (n=3) mice treated by topical application of IMQ 5%. **(L)** Clinical evaluation of arthritic symptoms following paw thickness, **(M)** visual score and **(N)** weight of wt (Ik<sup>+/+</sup>, n=3) and Ikaros<sup>L/L</sup> (n=3) mice treated by topical application of IMQ 5%. Data are expressed as means +/- s.e. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01. Plots show data from one representative experiment of at least two with similar results.

**Figure 3. Imiquimod topical application reduces joint inflammation and bone damage caused by CIA induction.** **(A)** Quantification of paw swelling of DBA/1 mice after induction of STA. Animals were either treated by topical application of 5% IMQ (n=6) or a vehicle cream (n=7) on the wrists and ankles at days 28, 31, 36, 41 and 46. **(B)** Quantification of serum IL-6 by ELISA in IMQ- (n=6) or vehicle-treated DBA/1 mice (n=7) 50 days after CIA induction. **(C)** Representative image and TRAP-stained histology of hind paws of vehicle- **(D)** IMQ-treated DBA/1 mice 50 days after CIA induction. **(E)** Histomorphometric quantification of inflammatory area, **(F)** number of osteoclasts and **(G)** bone erosion of hind paws of vehicle- and IMQ-treated DBA/1 mice 50 days after CIA induction. Data are expressed as means +/- s.e. \*p < 0.05; \*\*\*p < 0.001. Plots show data from one representative experiment of two with similar results.

**Figure 4. Imiquimod topical application reduces arthritic symptoms in hTNF transgenic mice.** **(A)** Histomorphometric quantification of inflammatory area, **(B)** number of osteoclasts and **(C)** bone erosion of hind paws of vehicle- and IMQ-treated hTNF-transgenic mice. Data are expressed as means +/- s.e. \*p < 0.05. Plots show data from one representative experiment of two with similar results.

**Figure 5. Imiquimod induces major cellular and transcriptional changes in inflamed joints following STA induction.** (A) Quantification by flow cytometry of immune cells (CD45+), (B) pDCs, (C) macrophages, (D) neutrophils and (E) cDCs present in the periarticular tissue of vehicle- (n= 4) or IMQ-treated (n=6) C57Bl/6 mice 9 days after STA induction. (F) Representation of the proportion of cDCs, neutrophils, macrophages and pDCs among CD45+ cells present in the periarticular tissue of vehicle- (n= 4) or IMQ-treated (n=6) C57Bl/6 mice 9 days after STA induction. (G) Heatmap depiction of transcriptional profiling in the paws of vehicle- (n= 10) or IMQ-treated (n=12) C57Bl/6 mice 9 days after STA induction.

**Figure 6. Type I Interferon signaling is necessary for Imiquimod-mediated anti-inflammatory and bone protective effects.** (A) Clinical evaluation of arthritic symptoms following paw thickness, (B) visual score and (C) weight of vehicle (n=5) – or IMQ-treated (n=6) *Ifnar1*<sup>-/-</sup> mice upon STA induction. (D) Quantification of serum IL-6 by ELISA in IMQ- (n=6) or vehicle-treated (n=5) *Ifnar1*<sup>-/-</sup> mice 9 days after STA induction. (E) Histomorphometric quantification of inflammatory area, (F) number of osteoclasts and (G) bone erosion of hind paws of IMQ- (n=6) or vehicle-treated (n=5) *Ifnar1*<sup>-/-</sup> mice 9 days after STA induction. Data are expressed as means +/- s.e. Plots show data from one representative experiment of two with similar results.

**Suppl. Figure 1. Ikaros hypomorphic mutants display enhanced arthritis symptoms upon K/BxN serum transfer.** (A) Representative flow cytometry analysis of viable splenic pDCs (B220<sup>+</sup>; PCDA1<sup>+</sup>; CD11c<sup>+</sup>) in wt (Ik<sup>+/+</sup>) and (B) Ik<sup>L/L</sup> mice. (C) Quantification of splenic pDCs (B220<sup>+</sup>; PCDA1<sup>+</sup>; CD11c<sup>+</sup>) in wt (Ik<sup>+/+</sup> n=3) and (B) Ik<sup>L/L</sup> (n=3) mice. (D) clinical scoring of wt (Ik<sup>+/+</sup> n=6) and Ik<sup>L/L</sup> (n=6) mice after induction of STA. (E) Number of osteoclast (OC) of wt (Ik<sup>+/+</sup> n=8) and Ik<sup>L/L</sup> (n=8) after stimulation of bone marrow cells with macrophage colony-stimulating factor (M-CSF). (F) Representative flow cytometry analysis of viable periarticular pDCs (B220<sup>+</sup>; PCDA1<sup>+</sup>; CD11c<sup>+</sup>) in wt (Ik<sup>+/+</sup>) and (G) Ik<sup>L/L</sup> mice. (H) Quantification of joint pDCs (B220<sup>+</sup>; PCDA1<sup>+</sup>; CD11c<sup>+</sup>) in wt (Ik<sup>+/+</sup> n=3) and Ik<sup>L/L</sup> (n=3) mice. Data are expressed as means +/- s.e. \*p < 0.05. Plots show data from one representative experiment of two with similar results.

**Suppl. Figure 2. Antibody (120G8) depletion of pDCs enhances inflammation in STA-induced mice.** (A) Quantification of paw swelling in control C57Bl/6 (n=6) and 120G8-treated (n=5) mice after induction of STA. (B) Quantification of serum IL-6 by ELISA in control (n=6) and 120G8-treated (n=5) 5 days after STA induction. (C) Histomorphometric quantification of inflammatory area, (D) number of osteoclasts and (E) bone erosion of hind paws of C57Bl/6 controls (n=6) or 120G8-treated (n=5) mice 9 days after STA induction. (F) Representative flow cytometry analysis of viable splenic pDCs (B220<sup>+</sup>; PCDA1<sup>+</sup>; CD11c<sup>+</sup>) in control C57Bl/6 (n=6) and 120G8-treated (n=5) mice. (G) Quantification of splenic pDCs (B220<sup>+</sup>; PCDA1<sup>+</sup>; CD11c<sup>+</sup>) in control C57Bl/6 (n=6) and 120G8-treated (n=5) mice. Data are expressed as means +/- s.e. Plots show data from one representative experiment of two with similar results.

**Suppl. Figure 3. Diphtheria Toxin-mediated depletion of pDCs enhances inflammation in STA-induced mice.** (A) Quantification of paw swelling in controls (non DTR transgenic, n=5) and DTR-treated (n=5) mice after induction of STA. (B) Quantification of serum IL-6 by ELISA in controls (n=6) and 120G8-treated (n=5) mice 5 days after STA induction. (C) Quantification of *Il-6* and *Il-1b* expression by RT-qPCR in the paws of controls (n=6) and 120G8-treated (n=5) mice 9 days after STA

induction. **(D)** Representative flow cytometry analysis of viable splenic pDCs (B220<sup>+</sup>; PCDA1<sup>+</sup>; CD11c<sup>+</sup>) in controls (non DTR transgenic, n=5) and DTR-treated (n=5) mice at day 9. **(E)** Quantification of splenic pDCs (B220<sup>+</sup>; PCDA1<sup>+</sup>; CD11c<sup>+</sup>) in controls (non DTR transgenic, n=5) and DTR-treated (n=5) mice at day 9 after STA induction. **(F)** Histomorphometric quantification of inflammatory area, **(G)** number of osteoclasts and **(H)** bone erosion of hind paws of controls (non DTR transgenic, n=5) and DTR-treated (n=5) mice 9 days after STA induction. Data are expressed as means +/- s.e. Plots show data from one representative experiment of two with similar results.

**Suppl. Figure 4. IMQ topical application reduces joint swelling in Collagen-Induced Arthritis.** Representative pictures of hind paw of DBA/1 mice following CIA at days 30 (before first IMQ treatment-T1) and 32 (after T1) and days 40 (before treatment 3-T3) and 42 (after T3). Controls are mice receiving the vehicle cream.

**Suppl. Figure 5. TLR7 deficiency impairs IMQ-dependent treatment of joint symptoms in STA.** **(A)** Clinical evaluation of arthritic symptoms following paw thickness, **(B)** visual score and **(C)** weight of vehicle (n=5) – or IMQ-treated (n=6) *Tlr7*<sup>-/-</sup> mice upon STA induction. **(D)** Quantification of serum IL-6 by ELISA in IMQ- (n=6) or vehicle-treated (n=5) *Tlr7*<sup>-/-</sup> mice 9 days after STA induction. **(E)** Representative flow cytometry analysis of viable periarticular pDCs (CD45<sup>+</sup>; B220<sup>+</sup>; PCDA1<sup>+</sup>) in vehicle- (n=3) and IMQ\_treated (n=3) *Tlr7*<sup>-/-</sup> mice 9 days after STA induction. **(F)** Quantification of periarticular pDCs (CD 45<sup>+</sup>; B220<sup>+</sup>; PCDA1<sup>+</sup>) in vehicle- (n=3) and IMQ-treated (n=3) *Tlr7*<sup>-/-</sup> mice 9 days after STA induction. Data are expressed as means +/- s.e. Plots show data from one representative experiment of two with similar results.

**Suppl. Figure 6. Flow cytometry gating strategy for joint-infiltrating cells.** **(A)** Identification of CD45<sup>+</sup> cells in vehicle and IMQ-treated mice. **(B)** Identification of neutrophils (CD45<sup>+</sup>, Gr1<sup>+</sup>; CD11b<sup>+</sup>). **(C)** Identification of conventional dendritic cells (cDCs) (CD45<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>) and MHC-II staining. **(D)** Identification of macrophages (Lin<sup>-</sup>; CD64<sup>+</sup>; Ly6C<sup>-</sup>; CD11b<sup>+</sup>) and MHC-II staining. **(E)** Identification of plasmacytoid dendritic cells (pDCs) (CD45<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>; PDCA1<sup>+</sup>; CD11c<sup>+</sup>).

**Suppl. Figure 7. Gene expression analysis of periarticular tissues upon IMQ topical application.** Quantification by RT-qPCR of genes in the paws of vehicle- (n= 10) or IMQ-treated (n=12) C57Bl/6 mice 9 days after STA induction. Data are expressed as means +/- s.e. \*p < 0.05; \*\*\*p < 0.001.

### Acknowledgements

This work was supported by institutional funding from INSERM, Strasbourg University and the Laboratoire d'Excellence TRANSPLANTEX (ANR-11-LABX-0070\_TRANSPLANTEX). Funding from Campus France (PHC Program Amadeus 33696WM) is also acknowledged.

### References

1. Firestein, G.S. The disease formerly known as rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 16, 114 (2014).
2. McGonagle, D. & McDermott, M.F. A proposed classification of the immunological diseases. *PLoS medicine* 3, e297 (2006).
3. McInnes, I.B. & Schett, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine* 365, 2205-2219 (2011).

4. Zampeli, E., Vlachoyiannopoulos, P.G. & Tzioufas, A.G. Treatment of rheumatoid arthritis: Unraveling the conundrum. *J Autoimmun* 65, 1-18 (2015).
5. Smolen, J.S. & Aletaha, D. Rheumatoid arthritis therapy reappraisal: strategies, opportunities and challenges. *Nature reviews. Rheumatology* 11, 276-289 (2015).
6. Burmester, G.R., Feist, E. & Dorner, T. Emerging cell and cytokine targets in rheumatoid arthritis. *Nature reviews. Rheumatology* 10, 77-88 (2014).
7. McInnes, I.B., Buckley, C.D. & Isaacs, J.D. Cytokines in rheumatoid arthritis - shaping the immunological landscape. *Nature reviews. Rheumatology* 12, 63-68 (2016).
8. Swiecki, M. & Colonna, M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 15, 471-485 (2015).
9. Messemaker, T.C., Huizinga, T.W. & Kurreeman, F. Immunogenetics of rheumatoid arthritis: Understanding functional implications. *J Autoimmun* 64, 74-81 (2015).
10. Conigliaro, P., et al. The type I IFN system in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity* 43, 220-225 (2010).
11. Lopez de Padilla, C.M. & Niewold, T.B. The type I interferons: Basic concepts and clinical relevance in immune-mediated inflammatory diseases. *Gene* 576, 14-21 (2016).
12. van Holten, J., et al. Treatment with recombinant interferon-beta reduces inflammation and slows cartilage destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 6, R239-249 (2004).
13. van Holten, J., et al. A multicentre, randomised, double blind, placebo controlled phase II study of subcutaneous interferon beta-1a in the treatment of patients with active rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 64, 64-69 (2005).
14. Takakubo, Y., et al. Distribution of myeloid dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells in the synovial tissues of rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* 35, 1919-1931 (2008).
15. Allman, D., et al. Ikaros is required for plasmacytoid dendritic cell differentiation. *Blood* 108, 4025-4034 (2006).
16. Asselin-Paturel, C., Brizard, G., Pin, J.J., Briere, F. & Trinchieri, G. Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody. *J Immunol* 171, 6466-6477 (2003).
17. Blasius, A.L., et al. Bone marrow stromal cell antigen 2 is a specific marker of type I IFN-producing cells in the naive mouse, but a promiscuous cell surface antigen following IFN stimulation. *J Immunol* 177, 3260-3265 (2006).
18. Monach, P.A., et al. Circulating C3 is necessary and sufficient for induction of autoantibody-mediated arthritis in a mouse model. *Arthritis Rheum* 56, 2968-2974 (2007).
19. Swiecki, M., Gilfillan, S., Vermi, W., Wang, Y. & Colonna, M. Plasmacytoid dendritic cell ablation impacts early interferon responses and antiviral NK and CD8(+) T cell accrual. *Immunity* 33, 955-966 (2010).
20. Urosevic, M., et al. Disease-independent skin recruitment and activation of plasmacytoid predendritic cells following imiquimod treatment. *J Natl Cancer Inst* 97, 1143-1153 (2005).
21. Glitzner, E., et al. Specific roles for dendritic cell subsets during initiation and progression of psoriasis. *EMBO Mol Med* 6, 1312-1327 (2014).
22. Christensen, A.D., Haase, C., Cook, A.D. & Hamilton, J.A. K/BxN Serum-Transfer Arthritis as a Model for Human Inflammatory Arthritis. *Front Immunol* 7, 213 (2016).
23. Kollias, G. TNF pathophysiology in murine models of chronic inflammation and autoimmunity. *Semin Arthritis Rheum* 34, 3-6 (2005).

24. De Filippo, K., et al. Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood* 121, 4930-4937 (2013).
25. Szekanecz, Z. & Koch, A.E. Successes and failures of chemokine-pathway targeting in rheumatoid arthritis. *Nature reviews. Rheumatology* 12, 5-13 (2016).
26. Drobits, B., et al. Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells. *J Clin Invest* 122, 575-585 (2012).
27. Martinez, F.O. & Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports* 6, 13 (2014).
28. Garcia, S., et al. Matrix metalloproteinase-8 deficiency increases joint inflammation and bone erosion in the K/BxN serum-transfer arthritis model. *Arthritis Res Ther* 12, R224 (2010).
29. Itoh, T., et al. The role of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in antibody-induced arthritis. *J Immunol* 169, 2643-2647 (2002).
30. Singh, A., et al. Collagenase-3 (MMP-13) deficiency protects C57BL/6 mice from antibody-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 15, R222 (2013).
31. Higgs, B.W., et al. Patients with systemic lupus erythematosus, myositis, rheumatoid arthritis and scleroderma share activation of a common type I interferon pathway. *Ann Rheum Dis* 70, 2029-2036 (2011).
32. van der Pouw Kraan, T.C., et al. Rheumatoid arthritis subtypes identified by genomic profiling of peripheral blood cells: assignment of a type I interferon signature in a subpopulation of patients. *Ann Rheum Dis* 66, 1008-1014 (2007).
33. Cacopardo, B., Benanti, F., Pinzone, M.R. & Nunnari, G. Rheumatoid arthritis following PEG-interferon-alfa-2a plus ribavirin treatment for chronic hepatitis C: a case report and review of the literature. *BMC Res Notes* 6, 437 (2013).
34. Sweeney, S.E., Corr, M. & Kimbler, T.B. Role of interferon regulatory factor 7 in serum-transfer arthritis: regulation of interferon-beta production. *Arthritis Rheum* 64, 1046-1056 (2012).
35. Tak, P.P., et al. The effects of interferon beta treatment on arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 38, 362-369 (1999).
36. Smeets, T.J., et al. The effects of interferon-beta treatment of synovial inflammation and expression of metalloproteinases in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43, 270-274 (2000).
37. Jongbloed, S.L., et al. Plasmacytoid dendritic cells regulate breach of self-tolerance in autoimmune arthritis. *J Immunol* 182, 963-968 (2009).
38. Jongbloed, S.L., et al. Enumeration and phenotypical analysis of distinct dendritic cell subsets in psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 8, R15 (2006).
39. Asquith, D.L., Miller, A.M., McInnes, I.B. & Liew, F.Y. Animal models of rheumatoid arthritis. *European journal of immunology* 39, 2040-2044 (2009).
40. Wright, H.L., Moots, R.J. & Edwards, S.W. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nature reviews. Rheumatology* 10, 593-601 (2014).
41. Wu, H.J., et al. Inflammatory arthritis can be reined in by CpG-induced DC-NK cell cross talk. *The Journal of experimental medicine* 204, 1911-1922 (2007).
42. Spinelli, L., Carpentier, S., Montanana Sanchis, F., Dalod, M. & Vu Manh, T.P. BubbleGUM: automatic extraction of phenotype molecular signatures and comprehensive visualization of multiple Gene Set Enrichment Analyses. *BMC genomics* 16, 814 (2015).
43. Strieter, R.M., Burdick, M.D., Gomperts, B.N., Belperio, J.A. & Keane, M.P. CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine & growth factor reviews* 16, 593-609 (2005).

44. Duraes, F.V., et al. pDC therapy induces recovery from EAE by recruiting endogenous pDC to sites of CNS inflammation. *J Autoimmun* 67, 8-18 (2016).
45. Yang, J.Y., et al. Enteric Viruses Ameliorate Gut Inflammation via Toll-like Receptor 3 and Toll-like Receptor 7-Mediated Interferon-beta Production. *Immunity* 44, 889-900 (2016).
46. Bell, G.M., et al. Autologous tolerogenic dendritic cells for rheumatoid and inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis* (2016).
47. Yokogawa, M., et al. Epicutaneous application of toll-like receptor 7 agonists leads to systemic autoimmunity in wild-type mice: a new model of systemic Lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol* 66, 694-706 (2014).
48. Brand, D.D., Latham, K.A. & Rosloniec, E.F. Collagen-induced arthritis. *Nature protocols* 2, 1269-1275 (2007).
49. Alsaleh, G., et al. Reduced DICER1 Expression Bestows Rheumatoid Arthritis Synoviocytes Proinflammatory Properties and Resistance to Apoptotic Stimuli. *Arthritis Rheumatol* 68, 1839-1848 (2016).



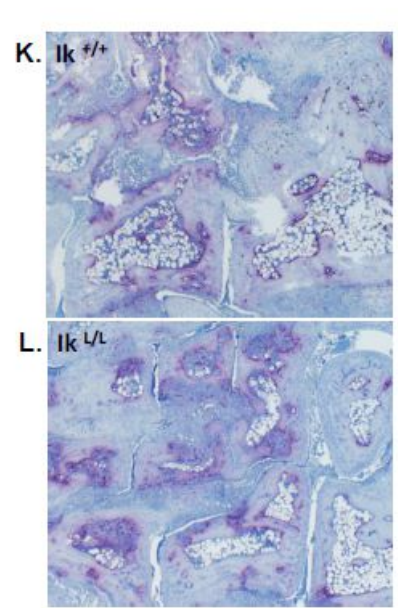
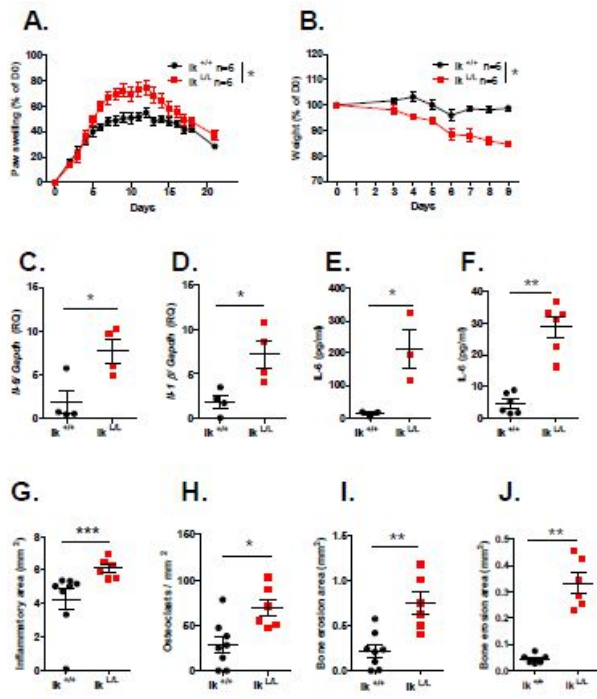


Fig 1

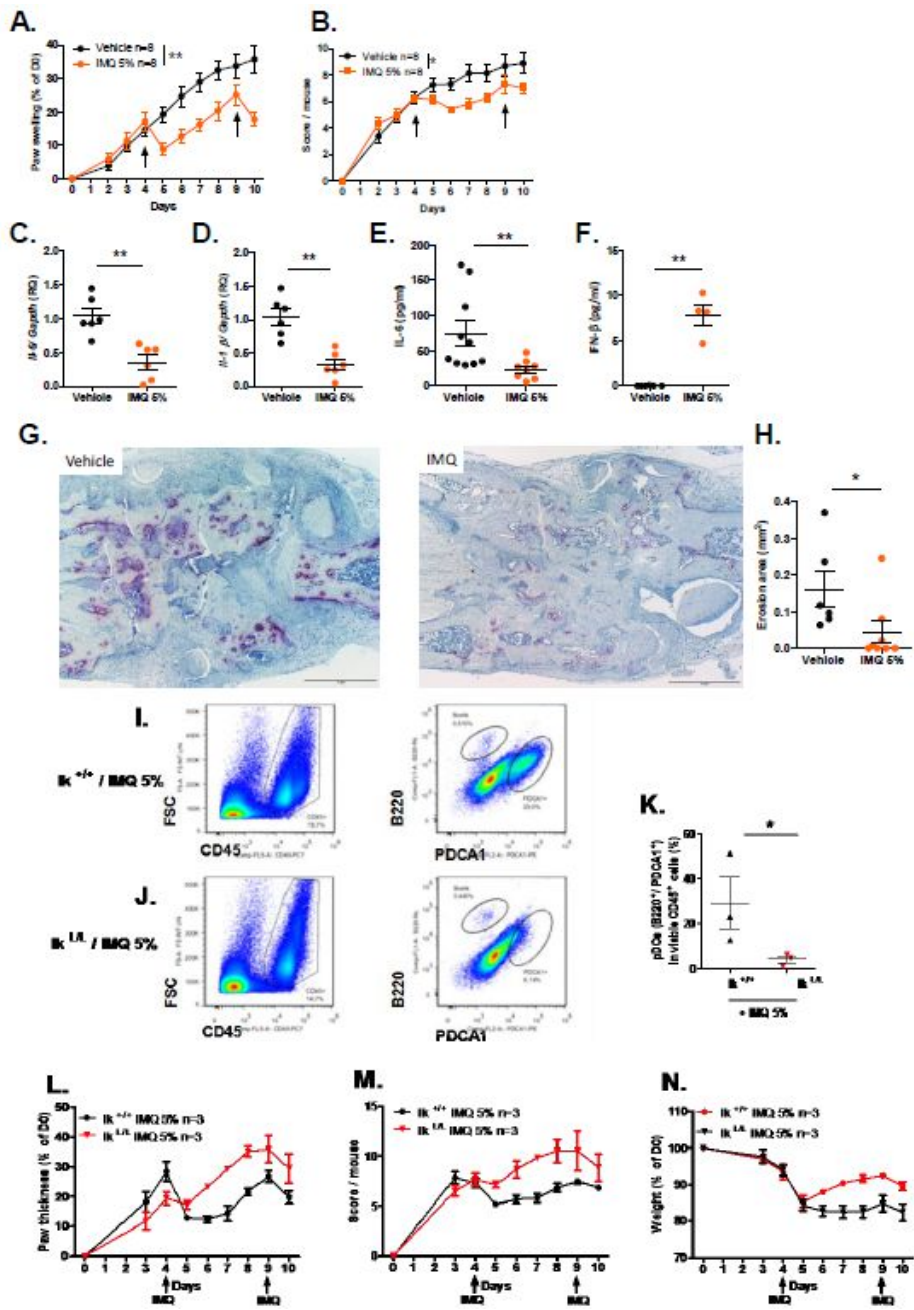


Fig 2

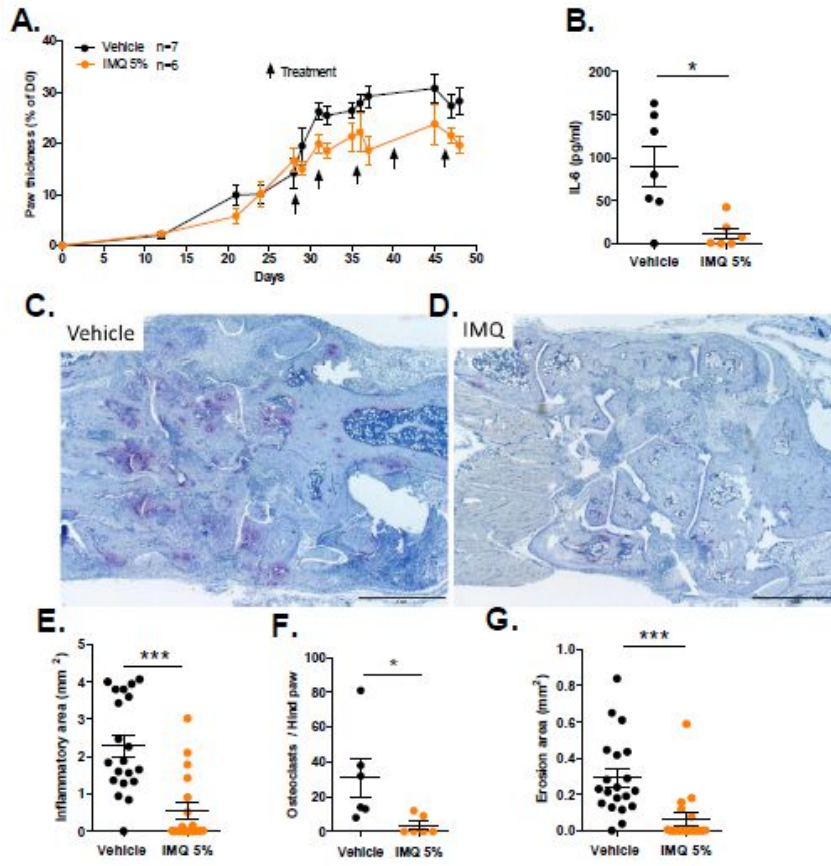


Fig 3

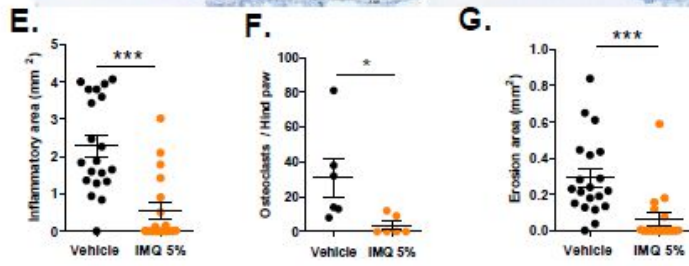
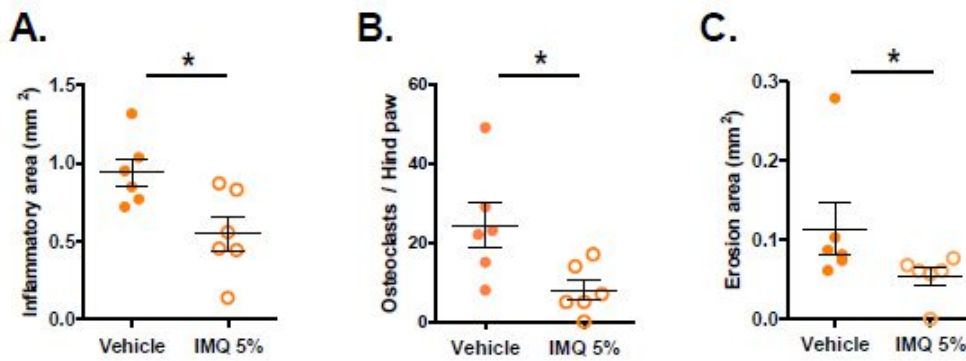


Fig 4



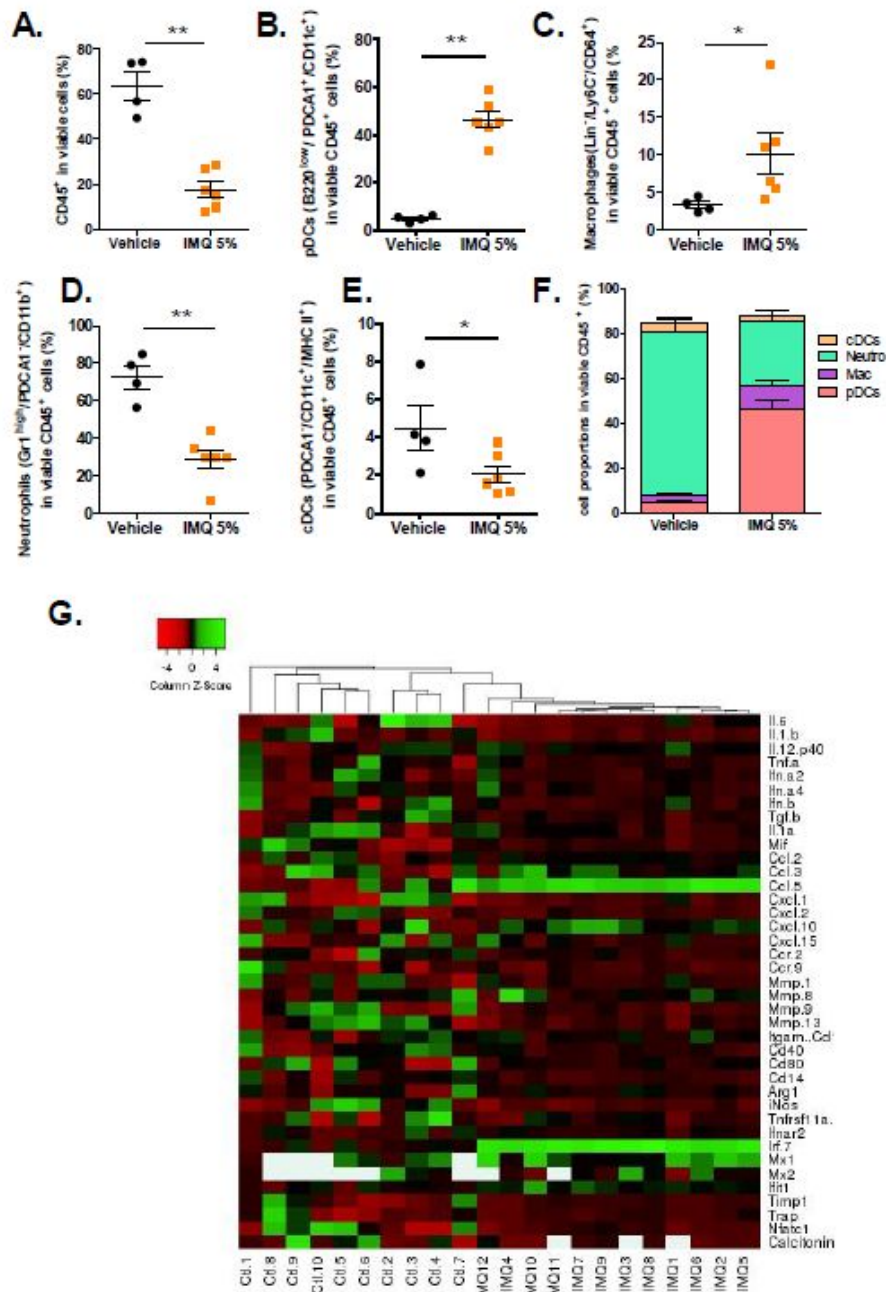
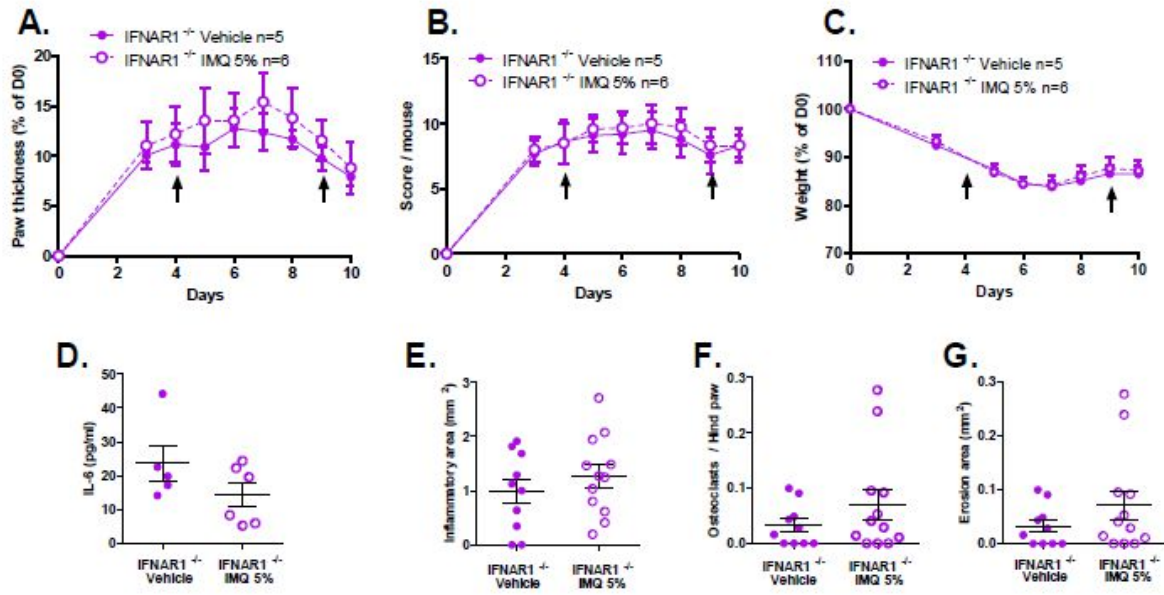


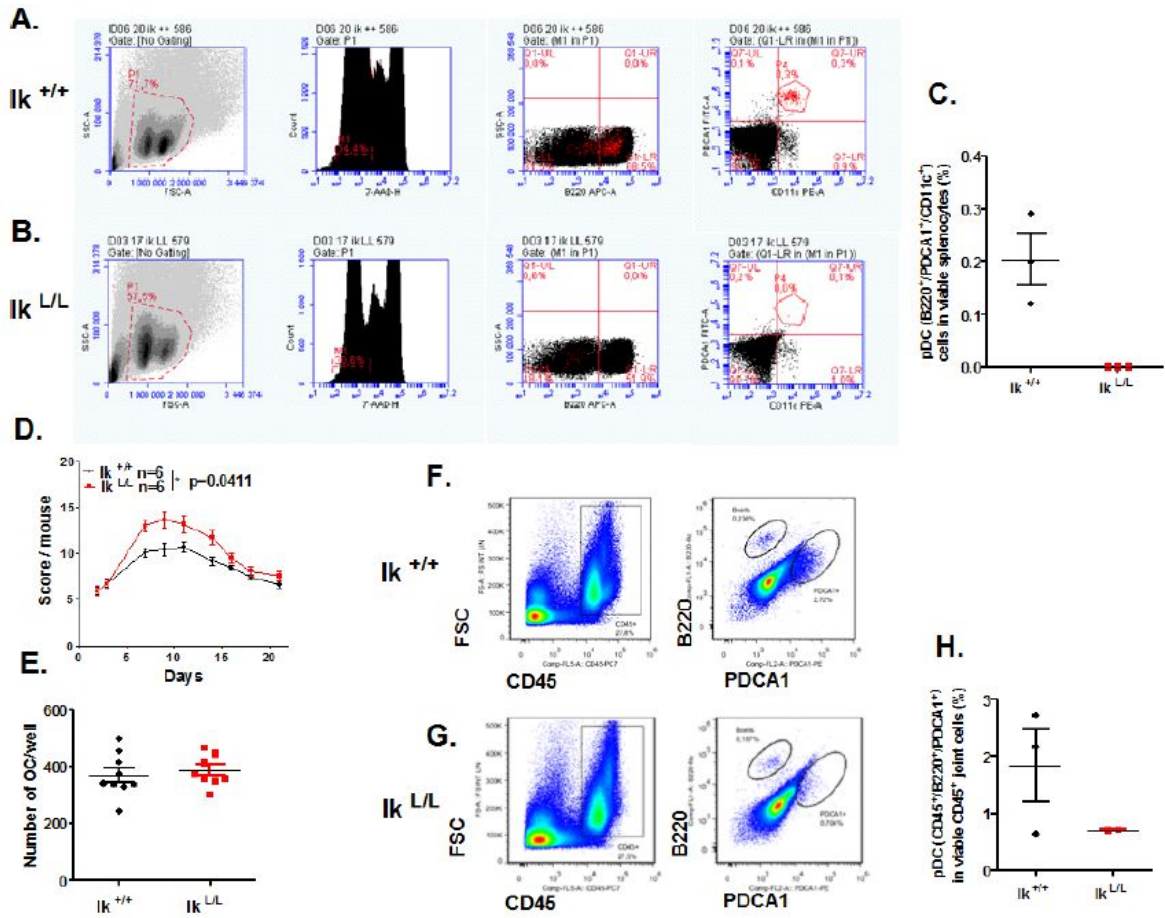
Fig 5

Fig 6

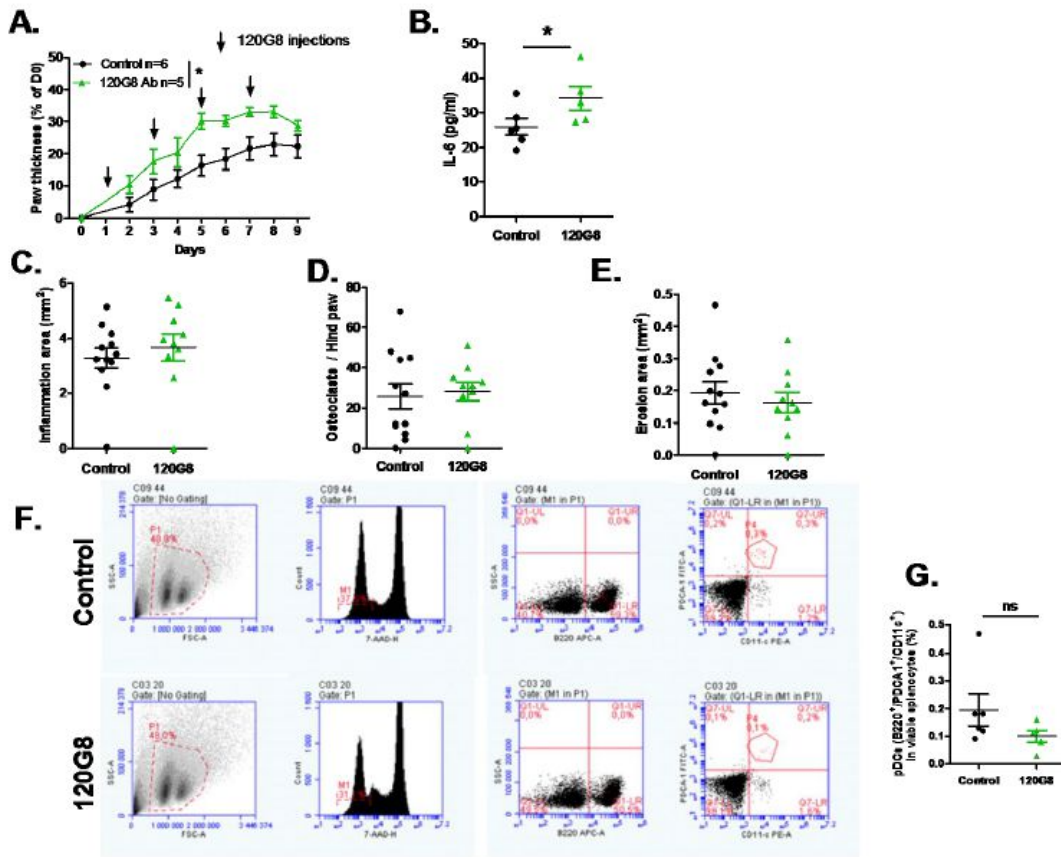




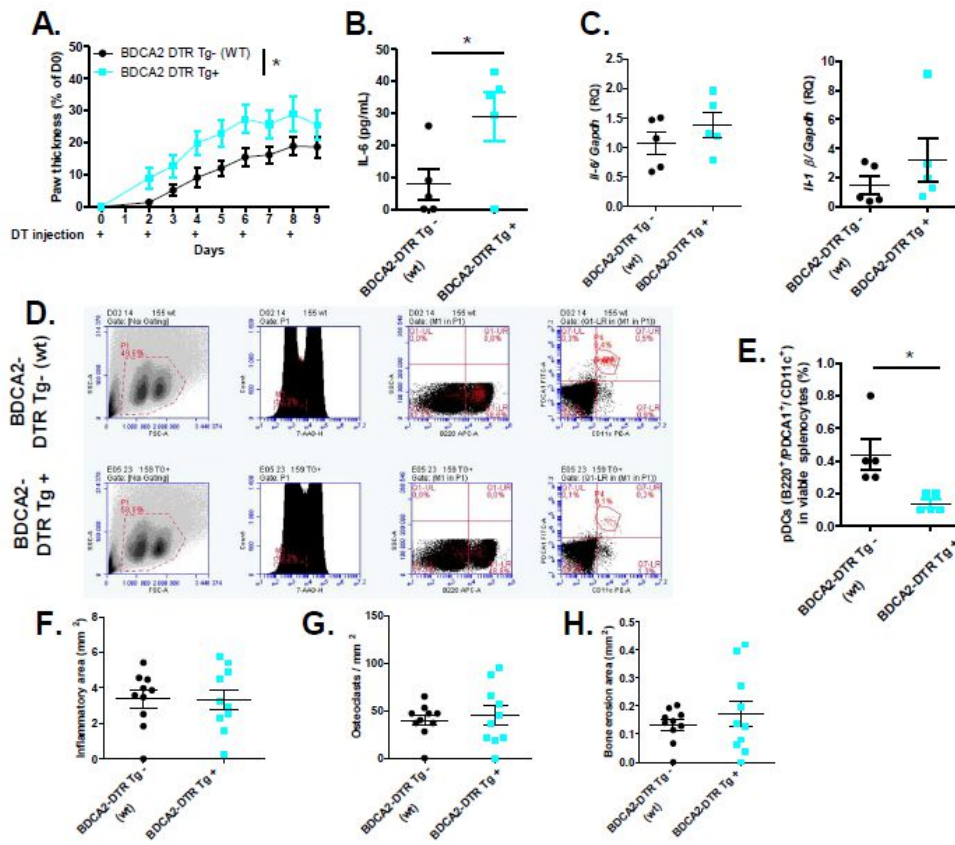
Suppl. Fig 1



Suppl. Fig 2



Suppl. Fig 3

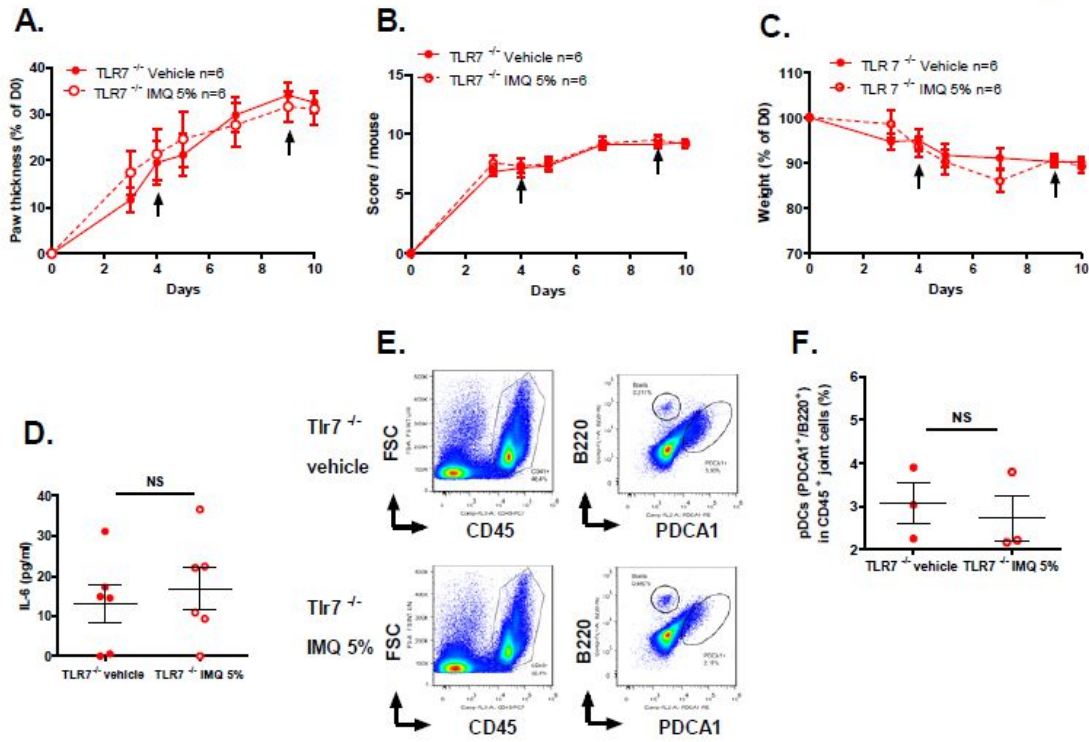


Suppl. Fig 4

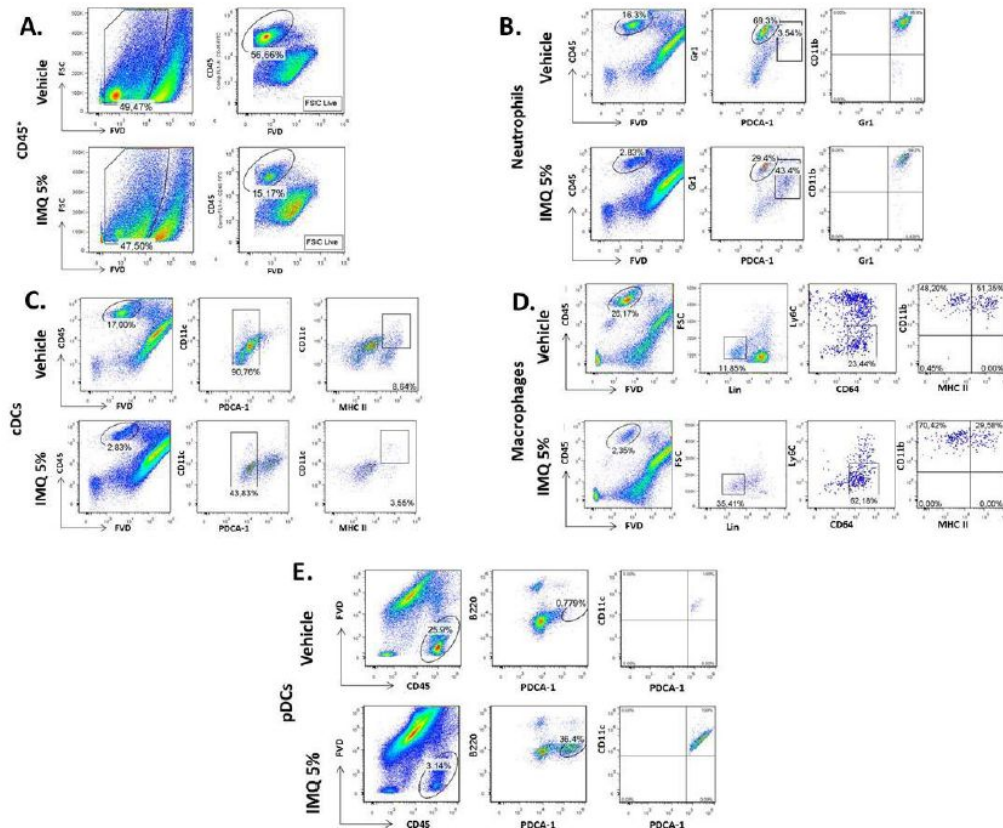




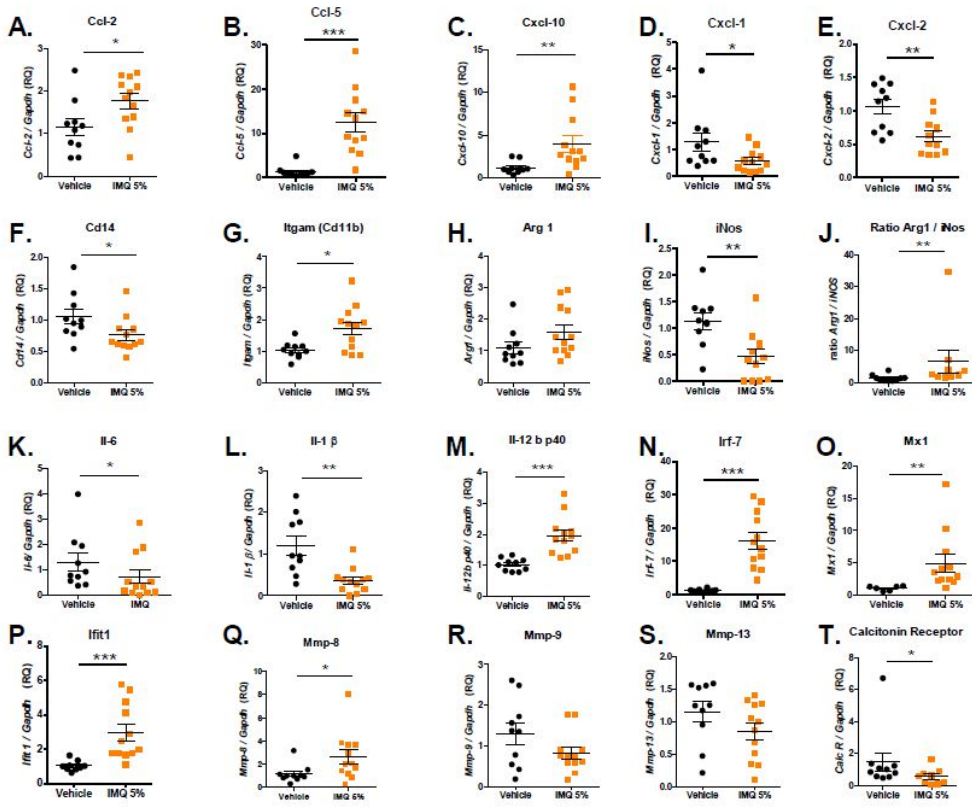
Suppl. Fig 5



Suppl. Fig 6



Suppl. Fig 7



## Publication 1 :

Reduced DICER1 Expression Bestows Rheumatoid Arthritis Synoviocytes Proinflammatory Properties and Resistance to Apoptotic Stimuli

## Authors

Ghada Alsaleh, **Ramzi Nehmar**, Stephan Blüml, Cédric Schleiss, Eleonore Ostermann, Jean-Philippe Dillenseger, Amira Sayeh, Philippe Choquet, Doulaye Dembele, Antoine Francois, Jean-Hugues Salmon, Nicodème Paul, Gernot Schabbauer, Guillaume Bierry, Alain Meyer, Jacques-Eric Gottenberg, Gabrielle Haas, Sebastien Pfeffer, Laurent Vallat, Jean Sibilila, Seiamak Bahram, Philippe Georget

First published: 27 July 2016 [Full publication history](#)

DOI: [10.1002/art.39641](https://doi.org/10.1002/art.39641) [View/save citation](#)

Cited by: 0 articles [Citation tools](#)

Article has an altmetric score of 7

## Funding Information

Supported by the Agence Nationale de la Recherche (Laboratoire d'Excellence [LABEX] TRANSPLANEX; ANR-11-LABX-0070\_TRANSPLANTEX), INSERM, the University of Strasbourg, and the Institut Universitaire de France.

## Abstract

## Objective

While the regulatory role of individual microRNAs (miRNAs) in rheumatoid arthritis (RA) is well established, the role of DICER1 in the pathogenesis of the disease has not yet been investigated. The purpose of this study was to analyze the expression of factors involved in miRNA biogenesis in fibroblast-like synoviocytes (FLS) from RA patients and to monitor the arthritis triggered by K/BxN serum transfer in mice deficient in the Dicer gene (*Dicerd/d*).

## Methods

The expression of genes and precursor miRNAs was quantified by quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction (qRT-PCR). MicroRNA macroarray profiling was monitored by qRT-PCR. Cytokines were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay. Experimental arthritis in mice was achieved by the transfer of serum from K/BxN donors. Apoptosis was quantified using an enzyme-linked immunosorbent assay.

## Results

We found decreased DICER1 and mature miRNA expression in synovial fibroblasts from RA patients. These cells were hyperresponsive to lipopolysaccharide, as evidenced by their increased interleukin-6 secretion upon stimulation. Experimental serum-transfer arthritis in *Dicerd/d* mice confirmed that an unbalanced biogenesis of miRNAs correlated with an enhanced inflammatory response. Synoviocytes from both RA patients and *Dicerd/d* mice exhibited increased resistance to apoptotic stimuli.

## Conclusion

The findings of this study further substantiate the important role of DICER1 in the maintenance of homeostasis and the regulation of inflammatory responses.

The involvement of microRNAs (miRNAs) in the regulation of fundamental cellular mechanisms, such as development, differentiation, apoptosis, or cell division, is now supported by numerous findings indicating that dysfunction of miRNAs is associated with several human disorders [1]. Among these is rheumatoid arthritis (RA), a multifactorial, complex disease of an immunoinflammatory nature that affects millions of people worldwide. In the last 5 years, several miRNAs (e.g., miR-146a [2], miR-155 [3, 4], miR-124a [5], and miR-203 [6]) that exhibit differential expression in samples from RA patients have been discovered (for review see refs. [7-9]). Our group has contributed to the identification of miRNAs showing deregulated expression in activated synoviocytes: miR-346 [10, 11], miR-19 [12], and miR-20a [13, 14].

Surprisingly however, reports describing disease-associated global dysregulation of miRNA production are scarce. This appears to be at odds with the description of mutations in the DICER1 gene, which are associated with a diverse set of human diseases, mainly tumor-related, such as pleuropulmonary blastoma [15], cystic nephroma [16], nonepithelial ovarian cancer [17], multinodular goiter [18, 19], and Wilms' tumors [20]. In addition to DICER1, germline mutations in other components of the miRNA biosynthesis pathway (TARBP2, AGO2, TNRC6A, TNRC6C, and XPO5) are also associated with a predisposition to cancer in humans [16, 21, 22]. Therefore, an evaluation of the global impact of miRNAs on the inflammatory response might be relevant.

In the present study, we first investigated the expression of genes involved in the miRNA biogenesis machinery in synoviocytes from RA patients as compared to cells isolated from osteoarthritis (OA) patients and from healthy control subjects. We next evaluated the involvement of miRNAs in RA, upon global deregulation of the miRNA pathway in mice carrying a hypomorphic Dicer mutation (*Dicerd/d*), driving diminished expression of the gene. We also monitored the impact of reduced expression of DICER1 on lipopolysaccharide (LPS)-dependent proinflammatory cytokine secretion and response to apoptotic stimuli in mouse mutant fibroblast-like synoviocytes (FLS) or in human FLS upon small interfering RNA (siRNA) DICER1-mediated knockdown.

## MATERIALS AND METHODS

### Patient characteristics

Human FLS were isolated from synovial tissues obtained from 15 RA patients, 15 OA patients, and 15 healthy subjects at the time of arthroscopic synovectomy of the knee joint (Supplementary Table 1, available on the Arthritis & Rheumatology web site at <http://onlinelibrary.wiley.com.gate2.inist.fr/doi/10.1002/art.39641/abstract>). Human dermal fibroblasts were obtained by 4-mm punch biopsy of the dorsal forearm of 4 patients with systemic

sclerosis (Supplementary Table 1) and from the corresponding area of 3 healthy subjects. Systemic sclerosis patients had diffuse cutaneous disease and anti-Scl 70 antibodies. Minor salivary gland biopsy samples from 4 patients with primary Sjögren's syndrome (Supplementary Table 1) and 5 healthy controls were obtained for the primary culture of salivary gland epithelial cells. Samples were also obtained from 5 age- and sex-matched controls with sicca syndrome, but without any features of autoimmunity: no autoantibody; no salivary gland lymphocytic infiltrate. Informed consent was obtained from all donors.

## Cell culture

Human FLS were isolated from synovial tissues obtained from RA and OA patients and healthy controls undergoing knee joint arthroscopic synovectomy. The diagnosis of RA conformed to the 2010 revised criteria of the American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism [23].

FLS from mice were isolated from synovial tissues obtained from Dicerd/d and littermate controls and were cultured as described previously [24]. Experiments were performed between the third and ninth passages. Cell number and cell viability were checked by MTT assay. Human and mouse FLS ( $2 \times 10^5$  cells) were stimulated with 1 ml of medium alone or medium containing LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ).

## Transfection assays

Transfection of human FLS with siRNA DICER (20 pM per sample) or with AllStars negative control siRNA was performed using a Human Dermal Fibroblast Nucleofector kit from Lonza [10]. Human FLS were plated in 24-well plates ( $1 \times 10^5$  cells/well). At 48 hours after transfection, cells were stimulated with LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) for 6 hours. Transfection efficiency was evaluated with the pmaxGFP vector. Total RNA was extracted using TRIzol, and the release of interleukin-6 (IL-6) was measured in culture supernatants by a heterologous 2-site sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

## MTT and cell death assays

To evaluate the cell density, culture medium was removed and FLS ( $1 \times 10^4$  cells) were resuspended at different time points (24, 48, and 72 hours) in 200  $\mu\text{l}$  of a 0.4 mM concentration of MTT dissolved in phosphate buffered saline and incubated for 4 hours at 37°C. Staining solution was removed, and after cell lysis and formazan solubilization in 100  $\mu\text{l}$  of DMSO, optical density (OD) was measured at 570 nm.

Cell death assay was performed on FLS ( $1 \times 10^4$  cells) stimulated for 20 hours with 200  $\mu\text{l}$  of complete medium containing staurosporine (1  $\mu\text{M}$ ) or FasL (500 ng/ml). Cell death was measured in cell lysate by ELISA (Cell Death Detection ELISA Plus; Roche Diagnostics). This method specifically detects mono- and oligonucleosomes (using monoclonal mouse antibodies directed against single-stranded and double-stranded DNA and histones H1, H2A, H2B, H3, and H4) in the cytoplasm of apoptotic cells, indicating apoptosis-associated DNA degradation. An enrichment factor was determined by

calculating the OD of cells treated with an apoptosis-inducing agent (FasL or staurosporine) divided by the OD of the same samples before treatment.

#### Mice

Dicer-deficient mice (*Dicerd/d*) described previously [25] were backcrossed more than 10 times against C57BL/6 mice in our laboratory. Littermate controls are designated as *Dicer+/+*. Mice used in all experiments were age- and sex-matched. The animals were maintained under specific pathogen-free conditions in the Animal Care Facility of the Institut d'Immunologie et d'Hématologie in Strasbourg.

#### K/BxN serum transfer-induced arthritis and clinical scoring

Serum was collected from 9-week-old K/BxN mice. The samples were pooled and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used. Arthritis was induced in adult female *Dicerd/d* and *Dicer+/+* mice by 2 intraperitoneal injections of K/BxN serum (150  $\mu\text{l}$  each). In the "multiple flares" model, recipient mice were injected on days 0, 1, 22, 23, 42, 43, 63, and 64. An articular arthritis index was determined by visual inspection and scoring of changes on a 0–4 scale (0 = no swelling or erythema, 1 = slight swelling and/or erythema, 2 = low-to-moderate edema, 3 = pronounced edema with limited use of the joint, and 4 = excessive edema with joint rigidity). Clinical indices for all 4 paws were added as a composite score. Hindpaw and forepaw thickness was measured with calipers.

#### Ethics information

Handling of mice and experimental procedures were conducted in accordance with the French Law for the Protection of Laboratory Animals. The procedures were approved by the Service Vétérinaire de la Préfecture du Bas-Rhin (France; authorization no. A-67-345) and by the Regional Ethical Committee for Animal Experimentation (CREMEAS) of Strasbourg University. Human cells were obtained after informed consent was given by the donors.

#### Data sharing

Data reported herein (including the supplementary data) will be shared if needed. The miRNA macroarray data are available at the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) database (accession no. GSE72564).

#### Statistical analysis

The nonparametric Mann-Whitney unpaired 2-tailed t-test was used to compare 2 independent groups. Pearson's correlation was performed to analyze the relationship between different parameters, and linear regression was used to monitor progression over time by comparing the slopes. In all cases, we used GraphPad 5.04 software. P values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Decreased DICER1 expression in RA FLS

To obtain an overview of the miRNA expression landscape in RA, we investigated DICER1 transcripts by quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction (qRT-PCR) in FLS from patients with RA. Primary cells cultured from biopsy samples obtained from healthy controls or from OA patients were used as controls. In this setting, we observed significant reduction of DICER1 mRNAs ( $P < 0.001$ ) in FLS from RA patients ( $n = 11$ ) (see Supplementary Table 1) as compared to healthy controls ( $n = 10$ ) or OA patients ( $n = 11$ ) (Figure 1A). This differential DICER1 expression was not observed in peripheral blood mononuclear cells from RA patients ( $n = 10$ ) as compared to healthy donors ( $n = 10$ ) (data not shown). Western blotting confirmed decreased DICER1 expression in RA FLS as compared to OA or healthy FLS (Figure 1B).

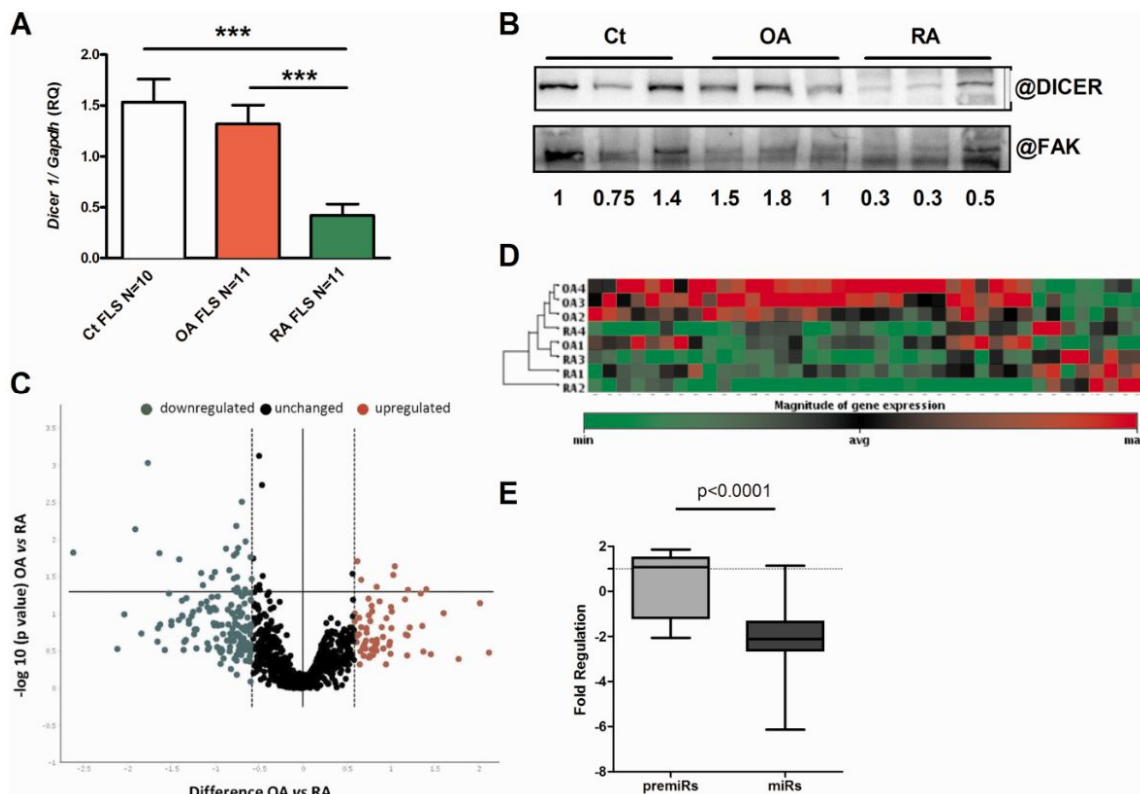


Figure 1

Diminished DICER and microRNA (miRNA) expression in rheumatoid arthritis (RA) fibroblast-like synoviocytes (FLS). A, DICER1 expression in primary FLS from biopsy samples obtained from healthy control (Ct) donors, osteoarthritis (OA) patients, and RA patients, as determined by quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction (qRT-PCR). Results are normalized to GAPDH. Values are the mean  $\pm$  SEM. \*\*\* =  $P < 0.0001$ . B, Western blot showing DICER1 expression in FLS from biopsy samples obtained from 3 control subjects, 3 OA patients, and 3 RA patients. Expression of the focal

adhesion kinase (FAK), a high molecular weight (125-kd) ubiquitously expressed protein, is shown as the loading control. Numbers indicate the intensity of the DICER1 signal normalized to that of FAK. C, Macroarray analysis of miRNAs isolated from RA (n = 4) and OA (n = 4) FLS. The volcano plot displays the relationship between the fold change and the significance between groups, using a scatterplot view. Expression of miRNAs below the detection level (threshold cycle [Ct] <35) was excluded from the analysis. The x-axis represents the log<sub>2</sub> fold change. Vertical dotted lines indicate a threshold of 1.5-fold change in miRNA expression; horizontal line indicates the P value of the t-test threshold (P < 0.05). D, Hierarchical cluster analysis of miRNA expression in 4 RA and 4 OA patients. Cluster analysis of the 39 miRNAs that were differentially expressed between OA and RA patients was done using online Qiagen software. E, Quantification of 20 precursor miRNAs (pre-miRs) or mature miRNAs (miRs) in FLS from 4 RA and 4 OA patients, as determined by qRT-PCR. Results are expressed as fold regulation (–1/ fold change [FC]), where OA patients represent the control group. Horizontal line represents a threshold of 1 (no difference between RA and OA samples). Data are shown as box plots. Each box represents the 25th to 75th percentiles. Lines inside the boxes represent the median. Lines outside the boxes represent the minimum and maximum of all the data. P value was determined by Student's t-test. RQ = relative quantity; @ = antibody.

To demonstrate the biologic significance of lower expression of DICER1 in RA FLS, we used low-density arrays to analyze 1,066 miRNAs (miRBase V16) by qRT-PCR in cultured FLS from 4 RA and 4 OA patients (normalized data and analyses shown in Supplementary Table 2, available at <http://onlinelibrary.wiley.com/gate2.inist.fr/doi/10.1002/art.39641/abstract>). Raw data have been deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) database (GSE72564). This experiment revealed that the overall fold regulation was significantly below the theoretical value of 1 (P < 0.0001). Thirty-nine miRNAs exhibited significant differential expression between the two conditions (P < 0.05), 80% of which showed reduced expression in RA FLS. This is illustrated in Figure 1C. Notably, unsupervised hierarchical clustering of these 39 miRNAs enabled the segregation of RA versus OA patients, with the exception of sample OA1, which was characterized by down-regulated genes similar to those seen in the RA samples (Figure 1D). This phenotype may be accounted for by the fact that sample OA1 was from the oldest OA patient.

DICER1-specific involvement was demonstrated by using qRT-PCR to analyze the expression of 20 mature miRNAs (miR-19b, 199b, 577, let-7c, 10b, 1260a, 328, 34b, 3182, 670, 2116, 190a, 597, 497, 610, 30c-2, 502, 585, 218-1, 125b-2, and 1246) and the corresponding precursor microRNAs (pre-miRs) in FLS from 4 RA and 4 OA samples. As shown in Figure 1E, the fold regulation of mature miRNAs was significantly decreased (P < 0.0001) compared to that of pre-miRs, which illustrates lower expression of miRNAs in RA samples than in OA.

Next, we quantified DICER1 transcripts in similar cell types involved in 2 other inflammatory diseases: systemic sclerosis and Sjögren's syndrome. Human dermal fibroblasts were cultured from skin biopsy samples obtained from patients with systemic sclerosis or from healthy controls, and salivary gland epithelial cells were obtained from patients with primary Sjögren's syndrome or from controls with sicca symptoms but without any features of an autoimmune disease (Supplementary Table 1). Similar levels of expression were observed in the different samples (Figure 2A), irrespective of origin. We



also quantified the expression of all genes involved in the miRNA biosynthesis machinery in RA FLS (Figure 2B) and found that these cells specifically exhibited a defect in DICER1 expression. Taken together, these data reveal reduced DICER1 expression as a specific feature of RA FLS.

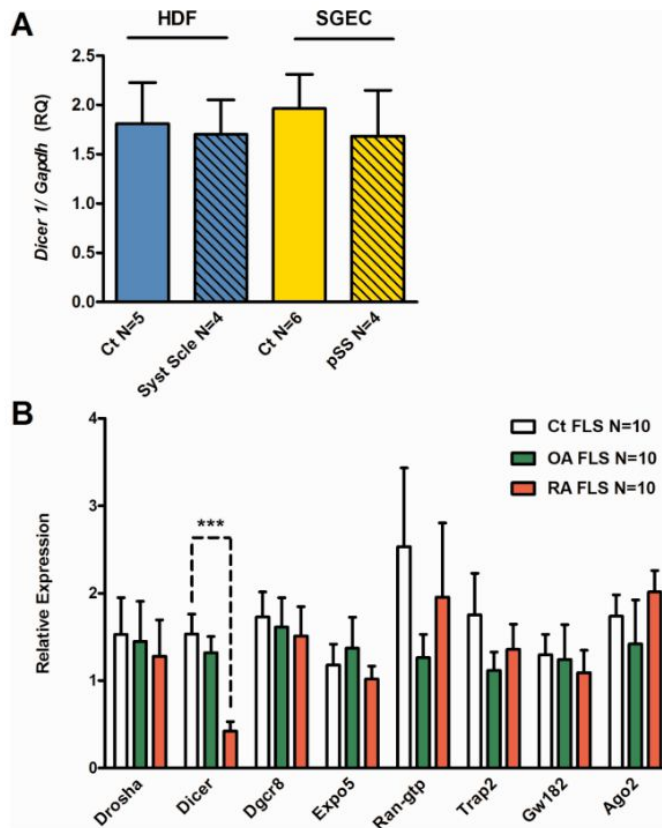


Figure 2.

Specific down-modulation of DICER1 expression in RA FLS. A, DICER1 expression in human dermal fibroblasts (HDFs) from skin biopsy samples obtained from healthy control donors and systemic sclerosis (Syst Scle) patients, as well as in salivary gland epithelial cells (SGECs) from healthy control donors and primary Sjögren's syndrome (pSS) patients, as determined by qRT-PCR. Results are normalized to GAPDH. B, Quantification of all of the genes participating in the miRNA biogenesis pathway in FLS from healthy control donors, OA patients, and RA patients. Results are expressed relative to GAPDH. Values are the mean  $\pm$  SEM. \*\*\* =  $P < 0.0001$ . See Figure 1 for other definitions. Color figure can be viewed in the online issue, which is available at <http://onlinelibrary.wiley.com.gate2.inist.fr/journal/doi/10.1002/art.39641/abstract>.

#### Worsened joint inflammation in Dicerd/d mice upon injection of arthritogenic serum

To investigate the consequences of reduced Dicer expression in an animal model, we used a mouse line with a hypomorphic mutation in the Dicer gene (*Dicerd/d*), in which low levels of Dicer expression still enables the production of viable adults [25, 26]. We first confirmed that Dicer transcripts were reduced in FLS from the *Dicerd/d* mice (Figure 3A), whereas the expression of the other genes of the miRNA biogenesis pathway remained unaffected, a situation comparable to that in human RA FLS (Figure 2B). The *Dicerd/d* mutation affects a subset of miRNAs [26], and our qRT-

PCR analysis of selected miRNAs homologous to those associated with RA in humans reproduced this trend. As shown in Figure 3B, the amount of several (9 of 17) miRNAs was significantly reduced in FLS from *Dicerd/d* mice. Notably, despite this significant reduction in miRNA expression, *Dicerd/d* mutant adult mice appeared normal and did not spontaneously develop any overt inflammatory phenotype.

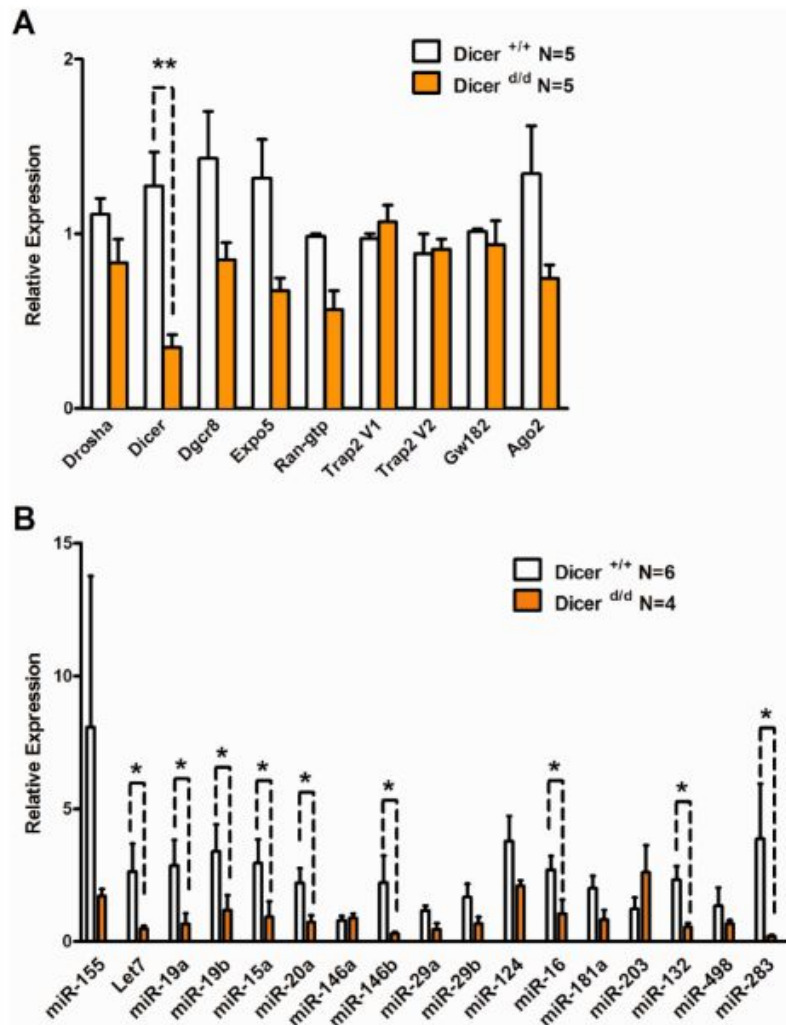


Figure 3.

Decreased miRNA maturation in *Dicer*-deficient (*Dicerd/d*) mice. A, Expression of the genes involved in the miRNA machinery in FLS from *Dicer* littermate control (*Dicer*<sup>+/+</sup>) mice and *Dicer*-mutant (*Dicerd/d*) mice, as determined by qRT-PCR. B, Expression of individual miRNAs in FLS from *Dicer*<sup>+/+</sup> littermate control mice and *Dicerd/d* mice, as determined by qRT-PCR. Results are expressed relative to GAPDH in A and relative to U6 RNA in B. The data are representative of 3 independent experiments using similar numbers of mice. Values are the mean ± SEM. \* = P < 0.05; \*\* = P < 0.001. See Figure 1 for other definitions. Color figure can be viewed in the online issue, which is available at <http://onlinelibrary.wiley.com.gate2.inist.fr/journal/doi/10.1002/art.39641/abstract>.

In order to test the impact of limited *Dicer* expression, we induced arthritis by injecting the animals with K/BxN mouse sera [27]. We observed a significant increase in joint inflammation in *Dicerd/d* mice 8–12 days following serum transfer, and increased swelling of the soft tissues of *Dicerd/d* mice

was noted by use of micro-computed tomography on day 9 (Supplementary Figure 1, available at <http://onlinelibrary.wiley.com.gate2.inist.fr/doi/10.1002/art.39641/abstract>).

We then reproduced in *Dicer*<sup>d/d</sup> mice successive flares of arthritis, a characteristic feature of RA in humans, by 4 successive injections of serum. The evolution of the arthritis score over 88 days is shown in Figure 4A. At the peak of the first flare, *Dicer*<sup>d/d</sup> mice exhibited more severe symptoms, a phenomenon that was repeatedly observed during the next 3 waves. In addition, repeated injections of K/BxN serum every 21–22 days also indicated that *Dicer*<sup>d/d</sup> mice failed to recover from the induced inflammation. Linear regression analysis of the scores measured on days 21, 42, 63, and 84 in wild-type *Dicer*<sup>+/+</sup> mice and mutant *Dicer*<sup>d/d</sup> mice (Figure 4B) indicated that the slope of the 2 curves was significantly different ( $P < 0.001$ ). This clearly demonstrates that from day 42 to the end of the experiment on day 88, *Dicer*<sup>d/d</sup> mice exhibited worsening of their arthritic symptoms. This was corroborated by a similar analysis performed on the hindpaw and forepaw thickness measurements in the same mice (Figures 4C and D). Additionally, after the second flare, we noticed severe swelling of the toes in the *Dicer*<sup>d/d</sup> mice (Supplementary Figures 2A and B, available at <http://onlinelibrary.wiley.com.gate2.inist.fr/doi/10.1002/art.39641/abstract>).

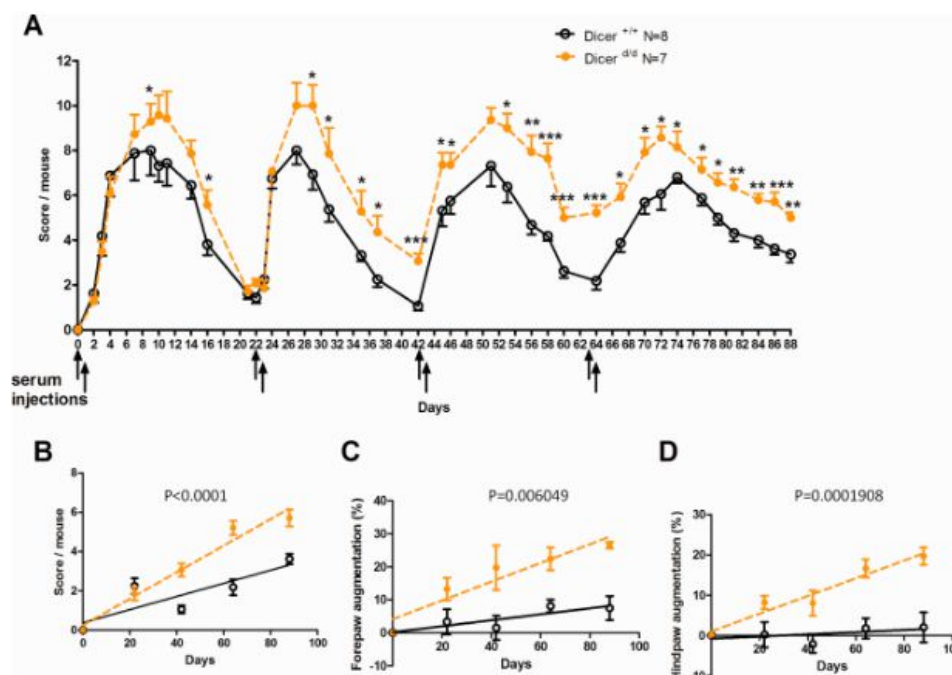


Figure 4.

Worsening of rheumatoid arthritis symptoms in *Dicer*-deficient (*Dicer*<sup>d/d</sup>) mice upon successive injections of K/BxN mouse serum. A, Evolution of arthritis scores over 88 days in *Dicer* littermate control (*Dicer*<sup>+/+</sup>) mice and *Dicer*-mutant (*Dicer*<sup>d/d</sup>) mice. Arrows indicate injections of K/BxN mouse serum (150  $\mu$ l; days 0, 1, 22, 23, 42, 43, 63, and 64). B–D, Linear regression analysis of the scores obtained on days 22, 42, 63, and 88 (B), as well as of the thickness of the forepaws (C) and hindpaws (D), in *Dicer*<sup>+/+</sup> littermate control mice and *Dicer*<sup>d/d</sup> mice. Results are representative of 2 experiments with similar numbers of mice. Values are the mean  $\pm$  SEM. \* =  $P < 0.05$ ; \*\* =  $P < 0.001$ ;

\*\*\* =  $P < 0.0001$ . Color figure can be viewed in the online issue, which is available at <http://onlinelibrary.wiley.com.gate2.inist.fr/journal/doi/10.1002/art.39641/abstract>.

Histologic analysis of the joints harvested from these animals on day 88 was performed. We recorded the mean area of the synovial membrane inflammation, the mean area of the tarsal zone erosion, and the number of osteoclasts in this area. Taken individually, none of these parameters enabled significant discrimination between the *Dicer1*<sup>d/d</sup> mice and the control group, albeit each appeared to be increased in the mutant mice. Correlation analyses (see Supplementary Figures 3A–C, available at <http://onlinelibrary.wiley.com.gate2.inist.fr/doi/10.1002/art.39641/abstract>) showed, as expected, an association between inflammation and erosion and between erosion and the amount of osteoclasts in both wild-type and mutant animals. Interestingly, we noted that the amount of osteoclasts also correlated positively with synovial inflammation only in the mutant mice.

#### Aberrant inflammatory and apoptotic responses in FLS from *Dicer1*<sup>d/d</sup> mice

To analyze the functional effects of low *DICER1* expression in human FLS, we quantified IL-6 expression and secretion in synoviocytes cultured from RA and OA patients as well as from healthy donors (Figure 5A). IL-6 is a major proinflammatory cytokine in the pathogenesis of RA, and interestingly, its basal expression appeared augmented in primary RA FLS at the transcription and protein levels. This difference was also observed in LPS-activated FLS. Because RA FLS also exhibit down-modulation of *DICER1* expression, we tested whether transfection of siRNA directed against *DICER1* would either mimic this phenotype in healthy cells or even amplify it in RA FLS. We observed increased IL6 transcription upon *DICER1* knockdown in FLS isolated from control subjects, OA patients, and RA patients under steady-state conditions (Figure 5B). However, when LPS was used to activate these cells, a significantly lower number of IL-6 transcripts were detected when *DICER1* expression was knocked-down upon siRNA transfection. This is in sharp contrast with our previous observation indicating that IL-6 is expressed at a higher level in RA FLS and indicates that the sole impairment of *DICER1* does not recapitulate the genetic complexity which accounts for the defects manifested in RA synoviocytes. Nevertheless, this experiment indicated that *DICER1* is likely an important player in cytokine homeostasis.

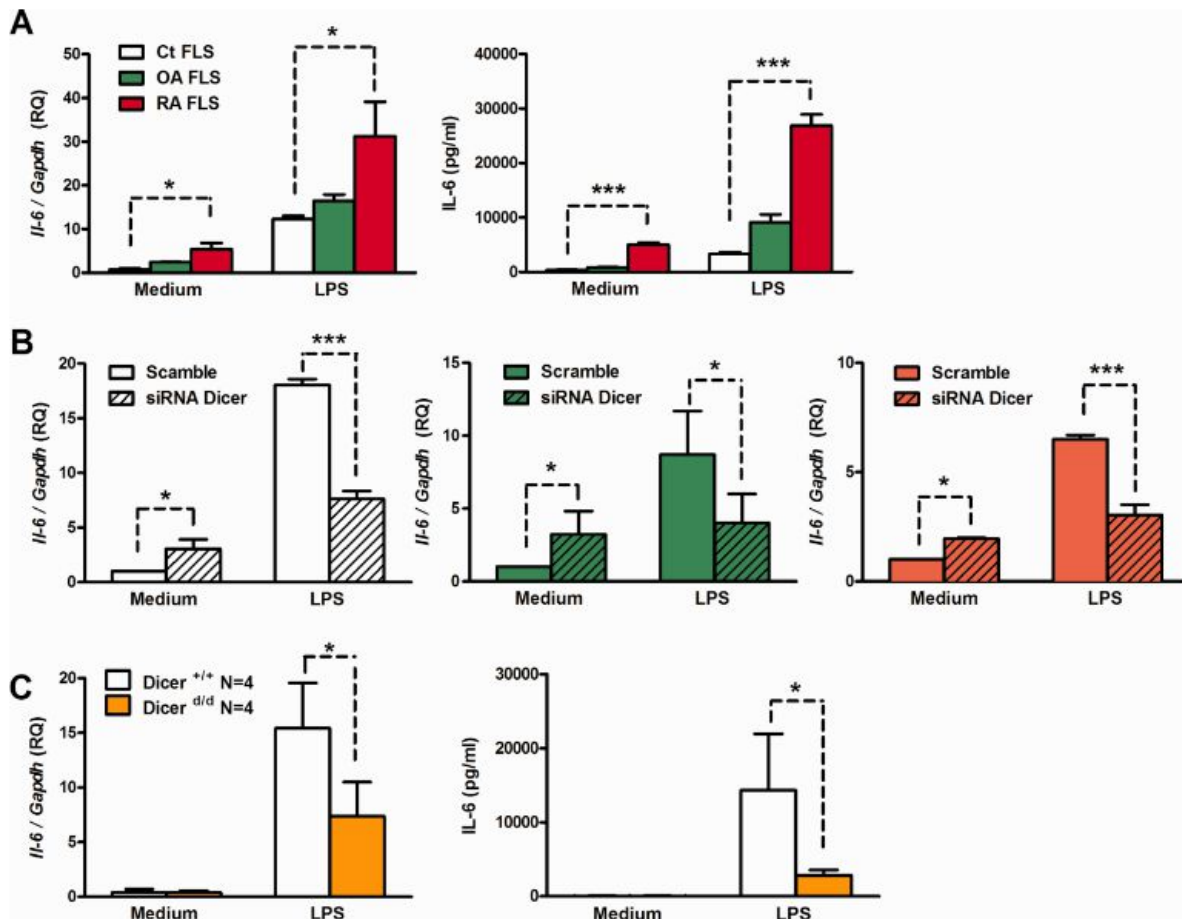


Figure 5.

Functional impact of reduced expression of DICER1 on the expression of interleukin-6 (IL-6). A, Quantification of IL-6 in FLS from healthy control donors, OA patients, and RA patients (n = 3 per group). Cells were left untreated (medium) or were treated for 6 hours with lipopolysaccharide (LPS), and then IL6 transcripts were quantified by qRT-PCR (normalized to GAPDH) (left), and IL-6 secretion in the supernatant was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (right). B, Quantification of IL6 transcripts in FLS from healthy control donors (left), OA patients (middle), and RA patients (right) following transfection with irrelevant small interfering RNA (siRNA) (scramble) or with DICER1 siRNA, as determined by qRT-PCR. Cells were transfected for 48 hours and then activated with LPS for 6 hours. C, Quantification of IL-6 transcripts in FLS from Dicer littermate control (Dicer<sup>+/+</sup>) mice and Dicer-mutant (Dicer<sup>d/d</sup>) mice. Cells were left untreated or were treated for 6 hours with LPS, and then IL6 transcripts were quantified by qRT-PCR (left), and IL-6 secretion in the supernatant was measured by ELISA (right). Results are representative of 3 independent experiments with similar numbers of mice. Values are the mean ± SEM. \* = P < 0.05; \*\*\* = P < 0.0001. See Figure 1 for other definitions. Color figure can be viewed in the online issue, which is available at <http://onlinelibrary.wiley.com.gate2.inist.fr/journal/doi/10.1002/art.39641/abstract>.

We also examined the inflammatory response of wild-type and Dicer<sup>d/d</sup> murine FLS (Figure 5C), which confirmed that LPS-dependent expression of IL-6 is decreased at both the RNA and protein levels in cells harvested from mutant mice. This result might seem to conflict with our in vivo results showing increased inflammation in Dicer<sup>d/d</sup> mice upon K/BxN serum transfer. However, this

apparent discrepancy must be interpreted in view of the mechanisms, mostly complement-dependent and IL-6 independent [28], that are responsible for the inflammatory response that is triggered upon serum transfer. The inflammatory milieu itself could account for the reduced DICER1 expression [29]. To explore this possibility, we quantified DICER1 expression in FLS isolated from healthy donors and stimulated with various inflammatory cytokines. We observed that addition of IL-6 to the culture medium of FLS can induce such down-modulation of DICER1 expression (Supplementary Figure 4, available at <http://onlinelibrary.wiley.com.gate2.inist.fr/doi/10.1002/art.39641/abstract>). However, Dicer expression in cultured FLS isolated from K/BxN animals, which exhibit high levels of IL-6 in the joints (28), remains comparable to that of controls (Supplementary Figure 5, available at <http://onlinelibrary.wiley.com.gate2.inist.fr/doi/10.1002/art.39641/abstract>), incidentally reflecting the gap between the animal model and the human disease.

We observed that cultured *Dicer*<sup>d/d</sup> FLS systematically reached confluence faster than control cells did (reflecting augmented cell number, as judged by MTT staining) (Supplementary Figure 6, available at <http://onlinelibrary.wiley.com.gate2.inist.fr/doi/10.1002/art.39641/abstract>), indicative of increased proliferation and/or diminished apoptosis. Whereas proliferation assays quantifying 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation did not show differences between FLS from wild-type *Dicer*<sup>+/+</sup> and *Dicer*<sup>d/d</sup> mice under normal culture conditions or upon LPS stimulation (data not shown), we noted that cells from *Dicer*<sup>d/d</sup> mice were resistant to FasL- or staurosporine-induced apoptosis (Figures 6A and B). Interestingly, FLS from the RA patients exhibited similar behavior (Figure 6C).

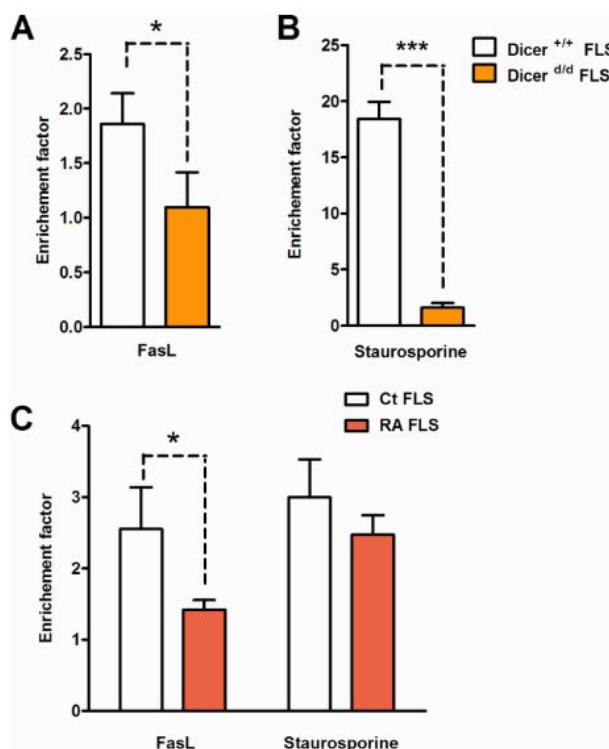


Figure 6.

Increased resistance to apoptotic stimulation in FLS from Dicer-deficient (*Dicerd/d*) mice. A and B, Measurement of apoptosis of FLS from Dicer littermate control (*Dicer+/+*) mice and *Dicerd/d* mice in response to FasL (A) and staurosporine (B) ( $n = 4$  mice per group). Cells were incubated with 500 ng/ml of FasL or with 1  $\mu$ M staurosporine, and cell death was determined as mononucleosome quantification by enzyme-linked immunosorbent assay. The enrichment factor corresponds to the ratio of the optical density in samples treated with apoptosis-inducing agents to that of the same samples before treatment. Results are representative of 2 independent experiments. C, Measurement of apoptosis of FLS from healthy control donors and RA patients in response to FasL and staurosporine ( $n = 5$  per group). Cells were stimulated and apoptosis was determined as in A and B. \* =  $P < 0.05$ ; \*\*\* =  $P < 0.0001$ . See Figure 1 for other definitions. Color figure can be viewed in the online issue, which is available at <http://onlinelibrary.wiley.com.gate2.inist.fr/journal/doi/10.1002/art.39641/abstract>.

## DISCUSSION

RA is a multifactorial disease involving more than 100 risk loci [30, 31]. In addition to these protein-coding genes, several miRNAs exhibiting deregulated expression have also been associated with disease susceptibility [32], and single-nucleotide polymorphisms close to some of these miRNAs have been linked to the occurrence of RA [33, 34]. Our present analysis revealed significantly reduced DICER1 expression in FLS isolated from RA patients.

The mechanism by which reduced DICER1 expression correlates with enhanced RA pathogenesis remains to be resolved, but 2 possibilities emerge from our finding of a positive correlation between the quantity of osteoclasts and synovial inflammation (Supplementary Figure 3C) in *Dicerd/d* mice. In this context, augmented osteoclastogenesis triggered by low miRNA production may participate in the maintenance of an inflammatory milieu, or alternatively, excessive inflammation driven by loss of miRNA-dependent negative regulation sends a positive signal to promote osteoclastogenesis. Ex vivo analysis of IL-6 expression showed that primary RA FLS expressed increased amounts of this cytokine (Figure 5A), similar to healthy FLS in which DICER1 had been knocked down upon siRNA transfection (Figure 5B). This suggests that miRNAs, which are important regulators for avoiding the spontaneous overexpression of potentially harmful mediators of inflammation, could indirectly affect the differentiation of osteoclasts, a process which was recently shown to be cytokine-dependent [35], and supports the second model. However, preliminary data from our laboratory indicate that low miRNA conditions favor osteoclast formation ex vivo, which supports the first hypothesis and the alternative concept recently formulated [36] and suggests that bone loss may precede inflammation.

Alternatively, miRNA-independent roles of DICER1 should also be considered. Indeed, DICER1 is engaged in complexes carrying various functions and is involved in multiple non-miRNA-related processes, such as chromatin assembly or nuclear receptor signaling [37]. Of note, DICER1-dependent processing of Alu-encoded RNAs is a major player in avoiding the accumulation of large amounts of double-stranded RNA in retinal pigmented epithelial cells and thereby protects them from NLRP3-dependent excessive inflammation [38, 39]. Considering the modest reduction in mature miRNA production observed in RA FLS, it is conceivable that this mechanism could also be at play in synoviocytes.

Notable information derived from our animal model is the absence of spontaneous RA symptoms in Dicerd/d mice before serum injection, thus demonstrating that Dicer deficiency per se does not trigger arthritis. Furthermore, LPS stimulation of cells in which DICER1 has been knocked down (or of FLS isolated from Dicerd/d mice) led to diminished IL-6 expression, contrary to the results in RA FLS, which showed increased IL-6 production. Hence, low levels of DICER activity in mice do not mimic the complex genetic and environmental networks that, when deregulated, lead to RA in humans. However, we performed repeated injections of serum, thereby creating “multiple flares” of arthritis, with the aim of reproducing the successive episodes of RA flares that generally occur in patients. These experiments showed that reduced expression of Dicer enhanced the RA-like symptoms at every peak following serum transfer. Importantly, diminished Dicer expression in the Dicerd/d mice may create the appropriate conditions for the establishment of chronic joint inflammation and tissue damage. Interestingly, the reduction of miRNA expression rarely leads to dramatic phenotypes, unless aggravated by stress [40], which precisely corresponds to our observations in the Dicerd/d mutant mice.

Notwithstanding that the KRN joint inflammation, which is essentially complement-driven, is quite distantly related to the human disease, which is mostly tumor necrosis factor–dependent, our adaptation of this model generated mice with chronic inflammation that showed tissue destruction in the joints and appeared to be more clinically relevant.

Patients with autoimmune diseases such as RA have a higher risk of developing certain lymphomas [41, 42]. The precise links between these 2 diseases are essentially unknown, but both share some similar features, among which proliferation appears to be crucial. Thus, mutations in several cancer genes, such as P53, which is involved in the control of cell proliferation, have already been identified as risk susceptibility genes in RA [43]. Up to now, DICER1 variants have been described in diseases that are caused by cell proliferation defects (ovarian cancer, pleuropulmonary blastoma, hyperplasia of the thyroid gland parenchyma in goiter). Interestingly, our own analysis of FLS from patients with RA or FLS from Dicerd/d mice showed that these cells are highly resistant to FasL- or staurosporine-induced apoptosis as compared to controls (Figure 6), a feature that may account for the synovial hyperplasia observed in RA patients.

More functional insights will be obtained upon analysis of a larger cohort of patients and correlation analyses between DICER1 expression and various parameters of RA, such as the Disease Activity Score in 28 joints and the C-reactive protein level. Nevertheless, our work already brings DICER1 to the core of interplay between inflammation, stress, and proliferation, all major contributors to the pathogenesis of RA.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Prof. François Bonnet (Department of Orthopedic Surgery) for synovial biopsy samples, Angélique Pichot and Cécile Macquin for technical help, and Bernhard Ryffel (UMR-7355 CNRS,



University of Orléans, Orléans, France) and Kim Midwood (The Kennedy Institute of Rheumatology, University of Oxford, Oxford, UK) for critical reading of the manuscript.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

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

### Study conception and design

Alsaleh, Nehmar, Ostermann, Georgel.

### Acquisition of data

Alsaleh, Nehmar, Blüml, Schleiss, Sayeh, Francois, Haas, Georgel.

### Analysis and interpretation of data

Alsaleh, Nehmar, Blüml, Dillenseger, Choquet, Dembele, Francois, Salmon, Paul, Schabbauer, Bierry, Meyer, Gottenberg, Pfeffer, Vallat, Sibia, Bahram, Georgel.

## REFERENCES

1. Mendell JT, Olson EN. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell* 2012;148:1172–87.
2. Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, Hashimoto M, Nishida K, Ochi M, et al. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum* 2008;58:1284–92.
3. Bluml S, Bonelli M, Niederreiter B, Puchner A, Mayr G, Hayer S, € et al. Essential role of microRNA-155 in the pathogenesis of autoimmune arthritis in mice. *Arthritis Rheum* 2011;63:1281–8.
4. Kurowska-Stolarska M, Alivernini S, Ballantine LE, Asquith DL, Millar NL, Gilchrist DS, et al. MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:11193–8.  
DICER1 EXPRESSION IN RA FLS 1847
5. Nakamachi Y, Kawano S, Takenokuchi M, Nishimura K, Sakai Y, Chin T, et al. MicroRNA-124a is a key regulator of proliferation and monocyte chemoattractant protein 1 secretion in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009;60:1294–304.
6. Stanczyk J, Ospelt C, Karouzakis E, Filer A, Raza K, Kolling C, et al. Altered expression of microRNA-203 in rheumatoid arthritis

- synovial fibroblasts and its role in fibroblast activation. *Arthritis Rheum* 2011;63:373–81.
7. Wittmann J, Jack HM. MicroRNAs in rheumatoid arthritis: midget RNAs with a giant impact. *Ann Rheum Dis* 2011;70 Suppl 1:i92–6.
8. Tomankova T, Petrek M, Gallo J, Kriegova E. MicroRNAs: emerging regulators of immune-mediated diseases. *Scand J Immunol* 2012;75:129–41.
9. Ceribelli A, Nahid MA, Satoh M, Chan EK. MicroRNAs in rheumatoid arthritis. *FEBS Lett* 2011;585:3667–74.
10. Alsaleh G, Suffert G, Semaan N, Juncker T, Frenzel L, Gottenberg JE, et al. Bruton's tyrosine kinase is involved in miR-346-related regulation of IL-18 release by lipopolysaccharide-activated rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol* 2009;182:5088–97.
11. Semaan N, Frenzel L, Alsaleh G, Suffert G, Gottenberg JE, Sibilja J, et al. miR-346 controls release of TNF- $\alpha$  protein and stability of its mRNA in rheumatoid arthritis via tristetraprolin stabilization. *PLoS One* 2011;6:e19827.
12. Philippe L, Alsaleh G, Suffert G, Meyer A, Georgel P, Sibilja J, et al. TLR2 expression is regulated by microRNA miR-19 in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol* 2012;188:454–61.
13. Philippe L, Alsaleh G, Pichot A, Ostermann E, Zuber G, Frisch B, et al. MiR-20a regulates ASK1 expression and TLR4-dependent cytokine release in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Ann Rheum Dis* 2013;72:1071–9.
14. Philippe L, Alsaleh G, Bahram S, Pfeffer S, Georgel P. The miR-17/92 cluster: a key player in the control of inflammation during rheumatoid arthritis. *Front Immunol* 2013;4:70.
15. Hill DA, Ivanovich J, Priest JR, Gurnett CA, Dehner LP, Desruisseau D, et al. DICER1 mutations in familial pleuropulmonary blastoma. *Science* 2009;325:965.
16. Bahubeshi A, Tischkowitz M, Foulkes WD. miRNA processing and human cancer: DICER1 cuts the mustard. *Sci Transl Med* 2011;3:111ps46.
17. Heravi-Moussavi A, Anglesio MS, Cheng SW, Senz J, Yang W, Prentice L, et al. Recurrent somatic DICER1 mutations in non-epithelial ovarian cancers. *N Engl J Med* 2012;366:234–42.
18. Rio Frio T, Bahubeshi A, Kanellopoulou C, Hamel N, Niedziela M, Sabbaghian N, et al. DICER1 mutations in familial multinodular goiter with and without ovarian Sertoli-Leydig cell tumors. *JAMA* 2011;305:68–77.
19. Darrat I, Bedoyan JK, Chen M, Schuette JL, Lesperance MM. Novel DICER1 mutation as cause of multinodular goiter in children. *Head Neck* 2013;35:E369–71.

20. Wu MK, Sabbaghian N, Xu B, Addidou-Kalucki S, Bernard C, Zou D, et al. Biallelic DICER1 mutations occur in Wilms tumours. *J Pathol* 2013;230:154–64.
21. Choong CS, Priest JR, Foulkes WD. Exploring the endocrine manifestations of DICER1 mutations. *Trends Mol Med* 2012;18:503–5.
22. Melo SA, Esteller M. Disruption of microRNA nuclear transport in human cancer. *Semin Cancer Biol* 2014;27:46–51.
23. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO III, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2010;62:2569–81.
24. Neff L, Zeisel M, Sibilia J, Scholler-Guinard M, Klein JP, Wachsmann D. NF- $\kappa$ B and the MAP kinases/AP-1 pathways are both involved in interleukin-6 and interleukin-8 expression in fibroblast-like synoviocytes stimulated by protein I/II, a modulin from oral streptococci. *Cell Microbiol* 2001;3:703–12.
25. Otsuka M, Jing Q, Georgel P, New L, Chen J, Mols J, et al. Hypersusceptibility to vesicular stomatitis virus infection in Dicer1-deficient mice is due to impaired miR24 and miR93 expression. *Immunity* 2007;27:123–34.
26. Ostermann E, Tuddenham L, Macquin C, Alsaleh G, SchreiberBecker J, Tanguy M, et al. Deregulation of type I IFN-dependent genes correlates with increased susceptibility to cytomegalovirus acute infection of dicer mutant mice. *PloS One* 2012;7:e43744.
27. Ditzel HJ. The K/BxN mouse: a model of human inflammatory arthritis. *Trends Mol Med* 2004;10:40–5.
28. Ji H, Pettit A, Ohmura K, Ortiz-Lopez A, Duchatelle V, Degott C, et al. Critical roles for interleukin 1 and tumor necrosis factor  $\alpha$  in antibody-induced arthritis. *The J Exp Med* 2002;196:77–85.
29. Wiesen JL, Tomasi TB. Dicer is regulated by cellular stresses and interferons. *Mol Immunol* 2009;46:1222–8.
30. Eyre S, Bowes J, Diogo D, Lee A, Barton A, Martin P, et al. High-density genetic mapping identifies new susceptibility loci for rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2012;44:1336–40.
31. Diogo D, Okada Y, Plenge RM. Genome-wide association studies to advance our understanding of critical cell types and pathways in rheumatoid arthritis: recent findings and challenges. *Curr Opin Rheumatol* 2014;26:85–92.
32. Ammari M, Jorgensen C, Apparailly F. Impact of microRNAs on the understanding and treatment of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2013;25:225–33.
33. Yang B, Chen J, Li Y, Zhang J, Li D, Huang Z, et al. Association

- of polymorphisms in pre-miRNA with inflammatory biomarkers in rheumatoid arthritis in the Chinese Han population. *Hum Immunol* 2012;73:101–6.
34. Hashemi M, Eskandari-Nasab E, Zakeri Z, Atabaki M, Bahari G, Jahantigh M, et al. Association of pre-miRNA-146a rs2910164 and premiRNA-499 rs3746444 polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis. *Mol Med Rep* 2013;7:287–91.
35. Charles JF, Hsu LY, Niemi EC, Weiss A, Aliprantis AO, Nakamura MC. Inflammatory arthritis increases mouse osteoclast precursors with myeloid suppressor function. *J Clinical Invest* 2012; 122:4592–605.
36. Kleyer A, Schett G. Arthritis and bone loss: a hen and egg story. *Curr Opin Rheumatol* 2014;26:80–4.
37. Kurzynska-Kokorniak A, Koralewska N, Pokornowska M, Urbanowicz A, Tworak A, Mickiewicz A, et al. The many faces of Dicer: the complexity of the mechanisms regulating Dicer gene expression and enzyme activities. *Nucleic Acids Res* 2015;43:4365–80.
38. Kaneko H, Dridi S, Tarallo V, Gelfand BD, Fowler BJ, Cho WG, et al. DICER1 deficit induces Alu RNA toxicity in age-related macular degeneration. *Nature* 2011;471:325–30.
39. Tarallo V, Hirano Y, Gelfand BD, Dridi S, Kerur N, Kim Y, et al. DICER1 loss and Alu RNA induce age-related macular degeneration via the NLRP3 inflammasome and MyD88. *Cell* 2012;149:847–59.
40. Emde A, Hornstein E. miRNAs at the interface of cellular stress and disease. *EMBO J* 2014;33:1428–37.
41. Dias C, Isenberg DA. Susceptibility of patients with rheumatic diseases to B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7:360–8.
42. Franks AL, Slansky JE. Multiple associations between a broad spectrum of autoimmune diseases, chronic inflammatory diseases and cancer. *Anticancer Res* 2012;32:1119–36.
43. Pap T, Aupperle KR, Gay S, Firestein GS, Gay RE. Invasiveness of synovial fibroblasts is regulated by p53 in the SCID mouse in vivo model of cartilage invasion. *Arthritis Rheum* 2001;44:676–81.

Additional Supporting Information

Fig. S1

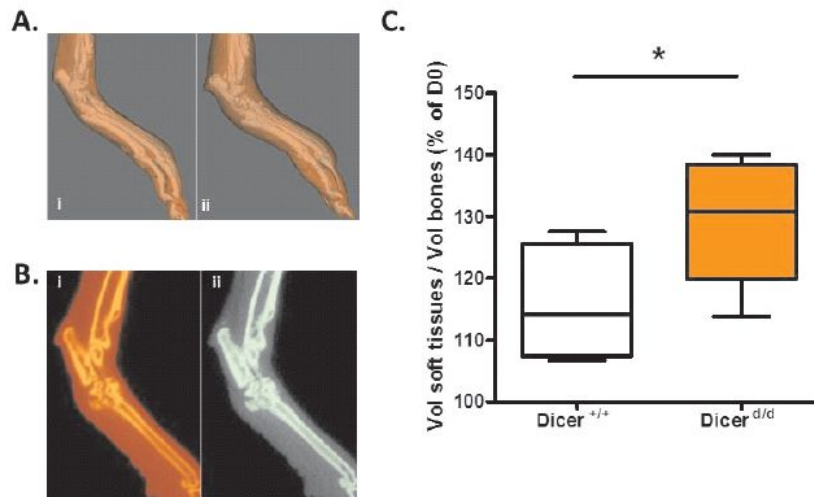


Fig. S1. In vivo microCT analysis reveals increased soft tissue swelling in Dicer d/d mice upon K/BxN serum transfer. A. Representative picture showing isosurface rendering of the right foot of a Dicer d/d mutant mouse at day 0 (i) and day 20 (ii). Skin rendering in orange (with transparency), bone rendering in white. B. Sagittal CT slices with (i) in red the complete ankle allowing to calculate its full volume ( $v_{total}$ ); (ii) in green the segmented bone allowing to calculate the bone volume of the ankle ( $V_{bone}$ ). C. Box plot showing the data calculated for 6 controls (Dicer +/+) and 6 mutants (Dicer d/d) and analysis using a Mann-Whitney t test. \* $p < 0.05$ .

Fig. S2

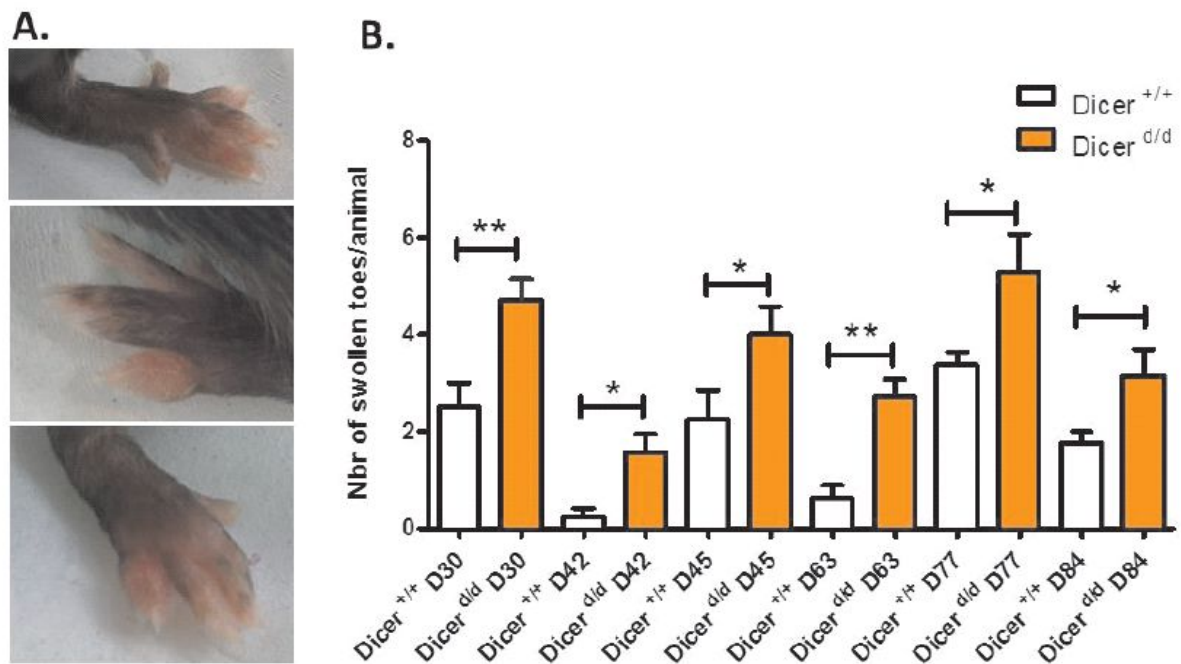


Fig. S2. Increased paw swelling in Dicer d/d mutant mice upon K/BxN serum transfer. A. representative pictures showing mutant mice affected by severe paw swelling. B. Swollen paws were quantified at various time points in control mice (Dicer +/+, white bars, N=8) and Dicer d/d animals (orange bars, n=7). Statistical analysis was performed using a two-tailed Mann-Whitney t test. \*p<0.05; \*\*p<0.01.

Fig. S3

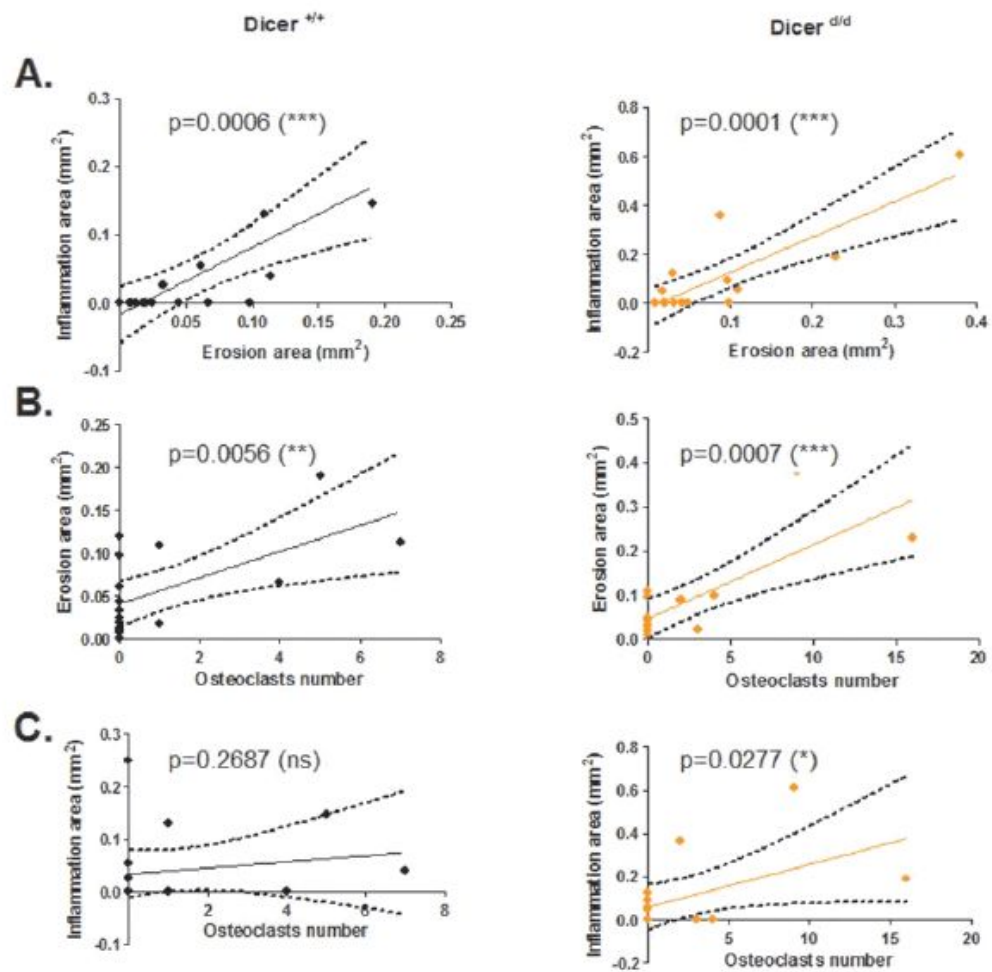


Figure S3. Analysis of the histological parameters of the joints of wild type and DICER d/d mice. Non-parametric correlation analysis between the three parameters (inflammation, erosion and osteoclast number, see Materials and Methods) which are quantified upon automatic histological examination of the joints harvested from controls (N=8) and Dicer d/d mutant mice (N=7= after 4 successive flares of arthritis). The dotted lines represent the 95% confidence interval. \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\*  $p<0.001$ .

Fig. S4

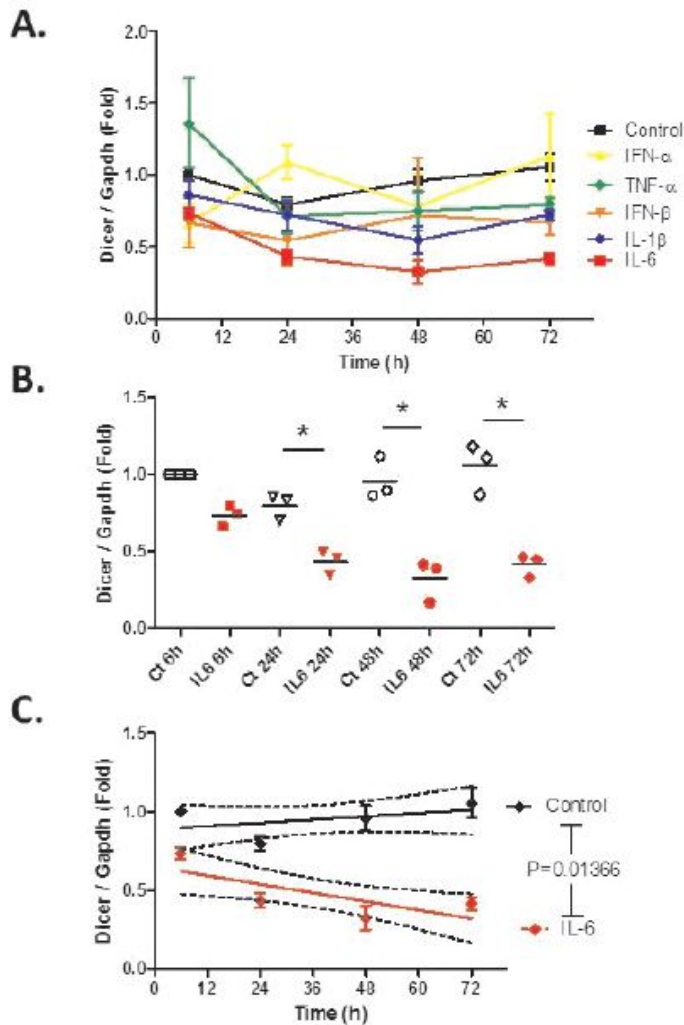


Fig. S4. DICER1 expression in human FLS upon stimulation with pro-inflammatory cytokines. A. DICER1 transcripts were quantified in FLS isolated from 3 healthy donors at various time points following Interferon-a (IFN-a, yellow line), Tumor necrosis factor-a (TNF- $\alpha$ , green line), Interferon-b (IFN-b, orange line), Interleukine-1b (IL-1b, blue line) or Interleukine-6 (IL-6, red line) stimulation. Control cells (black line) are FLS kept in regular conditions. Gene expression was normalized using GAPDH as house-keeping gene to obtain a  $\Delta\text{Ct}$ . Data are expressed as a fold expression ( $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ) using the expression at t=0 as reference +/- SD. B. Relative DICER1 expression upon 6, 24, 48 and 72 hours (h) of IL-6 stimulation. Statistical analysis was performed using a two-tailed Mann-Whitney t test. \*p<0.05. C. Linear regression analysis of relative DICER1 expression in untreated FLS (black) and upon IL-6 stimulation (red). The slope of the two curves was compared.



Fig. S5

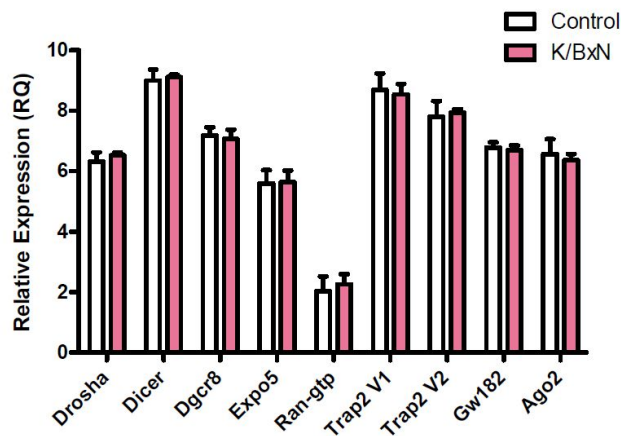


Fig. S5. Expression of genes involved in miRNA biogenesis in FLS isolated from K/BxN arthritic mice and controls. RT-qPCR experiments were performed on mRNA purified from primary FLS harvested in 10 weeks-old K/BxN mice (N=3) and age- and sex-matched non-transgenic mice (N=3) in the same genetic background. Gene expression is normalized to that of Gapdh and expressed as Relative Quantity (RQ). This histogram is representative of two independent experiments.

Fig. S6

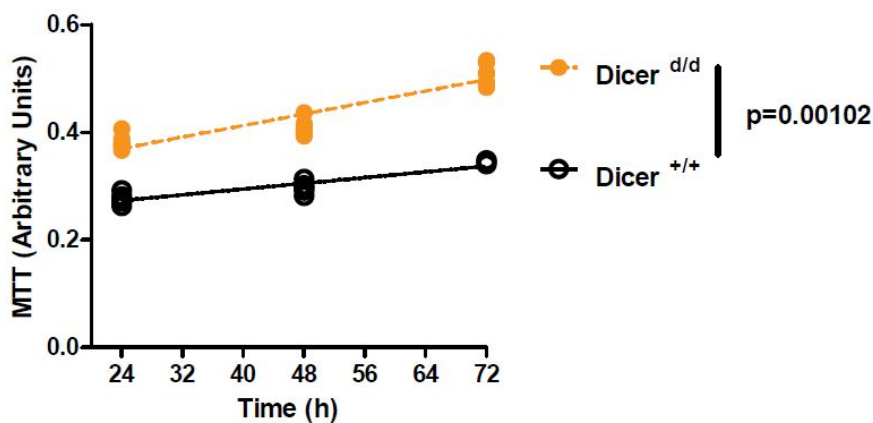


Fig. S6. Increased cellular density of cultured FLS harvested from Dicer d/d mutant mice. Cell density was quantified by MTT staining after 24, 48 and 72 hours (h) of culture of FLS isolated from six control mice (Dicer +/+, empty dots, plain line) and six mutants (Dicer d/d, orange dots, dashed line). A linear regression analysis was performed and the slope of the two lines was compared.

# Conclusions et perspectives



## Conclusions et perspectives:

Lors de ma thèse, je me suis intéressé aux mécanismes impliqués dans le contrôle de la réponse inflammatoire dont la dérégulation est la cause du déclenchement des maladies auto-inflammatoires et/ou auto-immunes. Je me suis particulièrement intéressé à deux aspects de la régulation de l'inflammation dans le contexte de la PR : (i) les mécanismes épigénétiques avec l'étude des microARNs et (ii) le rôle des pDCs. Mes travaux, qui ont débutés par des questions très fondamentales, m'ont permis finalement d'avoir un aperçu translationnel sur cette pathologie et d'obtenir des résultats avec des applications thérapeutiques potentiellement intéressantes.

Tout d'abord l'évaluation de l'implication de *DICER1* dans la PR nous a permis de comprendre qu'une diminution globale des microARNs dans les FLS, aussi bien chez les patients que dans le modèle animal (souris mutantes *Dicer<sup>d/d</sup>*) était reliée à l'aggravation de la pathologie, même si cette caractéristique ne suffit pas à récapituler la complexité aboutissant au déclenchement de la PR. Or, si la réduction globale des microARNs est associée à la réduction de l'expression de *DICER1*, les autres gènes participant à la biogénèse des microARNs (*DROSHA*, *DGCR8*, *EXP5*, *AGO2*, *GW182*, *TRAP2*) ne semblent pas impliqués dans le phénotype inflammatoire des FLS isolés de patients atteints de PR. Ce résultat suggère donc que la baisse d'expression des miARNs n'est peut-être pas l'élément central dans la dérégulation des réponses inflammatoires au cours de la PR, mais que les fonctions non canoniques de DICER (comme le catabolisme des ARNdb issus de la transcription des éléments Alu) sont essentielles à l'homéostasie de l'environnement synovial. Les FLS de patients atteints de PR montrent aussi une résistance à l'apoptose induite, autant que les FLS provenant de souris déficientes en *Dicer* (*Dicer<sup>d/d</sup>*) ce qui peut expliquer l'hyperplasie synoviale retrouvée lors de la PR. Cependant, cette réduction de l'expression de *DICER1* n'est pas retrouvée dans d'autres pathologies auto-inflammatoires comme la sclérodémie systémique et le syndrome de Sjögren indiquant une certaine spécificité de cette caractéristique à la PR. Par ailleurs, nous avons montré que la diminution de l'expression de *DICER1* dans les FLS de sujets sains, par l'utilisation d'un siRNA, induisait aussi une dérégulation de l'expression de l'*Il-6*, une cytokine pro-inflammatoire.

Ce travail a permis d'illustrer l'intervention de mécanismes épigénétiques dans la dérégulation de réponses inflammatoires impliquées dans la PR. S'il met en évidence le rôle de *DICER1* dans le contrôle de l'expression de médiateurs inflammatoires comme l'*Il-6*, il pose aussi la question du mode d'action de *DICER1* et des miARNs dans ces mécanismes.

Actuellement, l'intervention de DICER dans le catabolisme des ARNs transcrits à partir des éléments Alu constitue une voie de recherche privilégiée dans le laboratoire.

Malgré tout, l'étude du rôle des microARNs et de leurs interactions avec des ARNm cibles dans les FLS de patients atteints de PR reste un sujet majeur du laboratoire. C'est la raison pour laquelle nous avons entrepris une analyse exhaustive du transcriptome régulé par les miARNs dans les FLS par la technique PAR-Clip. Ce travail nous permettra dans un premier temps d'identifier les cibles de certains microARNs auxquels nous nous intéressons dans notre laboratoire, comme miR-346. Par la suite, nous envisageons de valider ces cibles par inactivation des micro-ARNs d'intérêts dans les FLS par la technique CRISPR/Cas9. Notre objectif final vise à mieux renseigner les mécanismes fondamentaux impliquant les microARNs et leurs cibles sur l'initiation et/ou le maintien d'un état inflammatoire conduisant à la pathogénèse de la PR.

Mon travail de thèse a surtout porté sur l'étude du rôle des pDCs et des IFNs de type I dans le contexte de l'arthrite inflammatoire en développant et en analysant des modèles murins. Mes travaux m'ont permis de montrer l'existence d'un système de régulation induit par cette population cellulaire qui est surtout connue pour son potentiel dans la lutte anti-virale et parfois anti-tumorale. J'ai ainsi pu établir un nouveau rôle des pDCs dans un contexte de l'inflammation arthritique articulaire en montrant qu'un déficit en pDCs provoquait une exacerbation de l'inflammation articulaire locale et de l'érosion osseuse chez les animaux dans lesquels une arthrite avait été induite. Ce résultat m'a amené à développer une stratégie thérapeutique basée sur le recrutement local et l'activation des pDCs par l'application topique, directement sur les articulations malades, d'une crème contenant un ligand du TLR7, l'Imiquimod. Ce traitement provoque une régulation négative de l'inflammation qui se traduit par la réduction de l'expression de cytokines, la diminution de de l'infiltrat inflammatoire, en particulier des neutrophiles, et l'inhibition de l'érosion osseuse. Cependant, la caractérisation précise des pDC infiltrant l'articulation (par l'expression de marqueurs de surfaces particuliers), les modifications/ polarisations (expression de gènes spécifiques) de ces cellules, ainsi que leur mécanisme d'action précis (interaction et communication avec les autres cellules de l'environnement) restent pour l'instant partiellement inconnus.

De nombreux travaux sont donc nécessaires pour mieux comprendre l'impact des pDCs dans la polyarthrite rhumatoïde, et plus généralement pour élucider la polarisation/ plasticité des pDCs qui, dans certaines conditions, leur permet de minimiser l'environnement inflammatoire et dans d'autres, les transforme en cellules sécrétrices de médiateurs puissamment pro-

inflammatoires. Identifier des signatures transcriptomiques correspondant à ces différents états constitue une des perspectives les plus ambitieuses de notre équipe.

Afin d'explorer ces différents aspects, différentes méthodologies seront développées au laboratoire :

La cytométrie en flux devrait permettre de caractériser de façon précise ces cellules grâce à des marqueurs de surface. Pour cela, l'analyse de petites populations de pDCs présentes naturellement dans l'articulation de souris ou de patients arthritiques sera menée. Les pDCs recrutées par application d'Imiquimod au niveau des articulations dans nos modèles de souris arthritiques (STA K/BxN, CIA, hTNF $\alpha$  tg) seront également caractérisées (et comparées aux pDCs activées lors d'infections virales). Chez les patients atteints de PR, une analyse exhaustive des pDCs circulantes et présentes dans le liquide synovial pourra être entreprise.

Après un tri cellulaire, l'analyse transcriptomique des pDCs présentes dans les articulations arthritiques à l'état basal ou après recrutement/activation par IMQ 5%, sera également très informative. Le profilage des ARN messagers et des miARNs permettra d'avoir une vue d'ensemble sur le métabolisme cellulaire qui se met en place pour induire leurs effets régulateurs.

Une analyse histologique à différents temps au niveau de l'articulation arthritique où sont recrutées les pDCs après traitement paraît aussi indispensable. Cette méthode permettra d'identifier les interactions cellulaires impliquant les pDCs et ainsi d'identifier leurs partenaires locaux. Cela pourrait permettre d'affiner les connaissances sur la PR, de perfectionner l'approche thérapeutique de cette maladie et d'en imaginer de nouvelles.

L'ensemble de mes travaux met en lumière des relations entre les différents acteurs cellulaires et moléculaires dans nos modèles d'étude de la Polyarthrite Rhumatoïde. Plus globalement, l'identification des interactions complexes (synergie, antagonisme) entre ces acteurs (par exemple via des miARN permettant le dialogue intercellulaire) lors de l'inflammation pourrait offrir de nouvelles pistes thérapeutiques.

Cette thèse m'a permis de me familiariser avec plusieurs aspects du système immunitaire (régulation épigénétique, rôle des pDCs) qui paraissent plutôt éloignés au premier abord, mais finalement s'intègrent harmonieusement les uns dans les autres. La diversité des projets auxquels je me suis intéressés m'a permis de prendre du recul pour mieux analyser l'iceberg que constitue la PR et les désordres immunitaires qui la caractérisent.



# Matériels et méthodes





## Matériels et méthodes

### Souris :

Les souris *Ikaros*<sup>L/L</sup> présentent un déficit en protéine fonctionnelle IKAROS, par l'insertion du gène codant pour la  $\beta$  galactosidase dans l'exon 3 du gène *Ikaros*. Ce transgène induit un épissage alternatif qui résulte en une mutation hypomorphe (Allman et al., 2006b). Ces souris ont été fournies par l'équipe de Philippe Kastner et Susan Chan, IGBMC, Université de Strasbourg.

Les souris *Tlr7* KO, invalidées pour le gène du *Tlr7*, ont été fournies par Lena Alexopoulou, CIML, Université de Marseille.

Les souris BDCA-2 DTR, possédant le gène qui code pour la toxine diphtérique sous le contrôle du promoteur du gène humain codant BDCA-2 (pour la construction complète voir Fig MM3, page 206) ont été fournies par Maria Sibia, Université de médecine, Vienne, avec l'accord de Marco Colonna, Washington University, St Louis (MO), USA

Les souris *Ifnar1* KO, invalidées pour le gène *Ifnar1*, ont été fournies par Rolf Zinkernagel, Université Hospital, Zurich, Suisse.

Les souris déficientes en DICER, par l'insertion du gène de fusion codant pour la  $\beta$ -galactosidase-néomycine entre l'exon 24 et 25 du gène *Dicer* (qui induit un épissage alternatif résultant en une mutation hypomorphe, (Otsuka et al., 2007)) sont élevées au laboratoire.

Les souris sous fond génétique DBA/1 proviennent de Charles River, France.

Les souris précédemment décrites ont été hébergées dans l'animalerie du centre d'hématologie et d'immunologie à 21°C dans un environnement exempt de pathogènes spécifiques.

Les expériences ont été réalisées avec l'avis favorable du Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg (CREMEAS), autorisation numéro 01608.01.

Les souris hTNF transgéniques, possédant le gène humain codant pour le TNF $\alpha$ , produisant un excès de cette cytokine, ont été fournies par George Kollias, Biomedical Sciences Research Center Alexander Fleming, Vari, Grèce. Ces souris sont hébergées dans l'animalerie

de l'université de Médecine de Vienne où elles ont été utilisées pour les expériences. Ces expériences ont été réalisées avec l'avis favorable du Comité de l'université de médecine de Vienne (BMWF-66.009/0103-C/GT/2007 and BMWF-66.009/0241-II/3b/2011).

### **Génotypages des souris par PCR :**

Les souris sont sevrées, baguées puis criblées (section de l'extrémité des queues). L'ADN est extrait par digestion des queues dans une solution de NaOH (hydroxyde de sodium) à 50mM (250 µl par échantillon) puis mis à incuber dans un agitateur à 95°C pendant 1h, l'ajout de tris 1M PH8 (25µl par échantillon) est réalisé pour la neutralisation du NaOH. Afin d'effectuer la PCR, à chaque échantillon (5µl) est ajouté, 2µl d'une solution de MgCl<sub>2</sub> à 25mM, 0,5µl de dNTP à 10mM, 0,5µl de chaque amorces (voir ci-après), 0,125µl de polymérase (CoTaq® M830B, PROMEGA) et de l'eau milliQ (eau ultra-purifiée). La PCR a été réalisée grâce au Thermocycleur (PCR System 9700, GeneAmp®) avec le protocole adéquat (voir ci-après).

Un gel d'agarose est préparé afin d'y déposer nos échantillons pour la migration par électrophorèse. Le gel est composé de 2% d'agarose standard (LE-8200, EUROMEDEX) dans 250 ml de tampon standard TAE à 1mM (voir ci-après) et 7µl d'un fluorochrome (GelRed 41003, BIOTIUM) y sont ajoutés pour marquer l'ADN.

TAE 50x : 242g de Tris, 18,6g d'EDTA, 700ml d'eau, 57,1ml d'acide acétique, QSP 1 litre

Cinq microlitres et demi (5,5µl) de chaque échantillon sont déposés dans chaque puits du gel d'agarose et une tension de 100mV y est appliquée pendant 1h20. Un marqueur de taille y est aussi déposé dans les mêmes conditions (04-03511, EUROMEDEX). Les révélations ont été effectuées grâce à une caméra (ChemiDoc XRS+, BIO-RAD).

### **Amorces pour souris *Bdca2-dtr* :**

- CCR2 (endogène) : ACATCTTATTGGTCATAAACCTGG
- CCR2' (endogène) : CTGTGGTCAGAGAACAAAATGATTA
- hGH (transgène) : GCCCCCGGGCAGCACAGCCACTGCCGGTCC
- hGH' (transgène) : GGCCAAGCGCTTGGGCACTGTTCCCTCCCT

Protocole du thermocycler : 5min à 94°C puis 28 cycles 45s à 94°C, 30s à 54°C et 45s à 65°C, puis 10 min à 65°C et enfin une température de maintien comprise entre 4 et 20°C.

**Amorces pour souris *Ikaros*<sup>L/L</sup> :**

- P1: 5' GAA GCC CAG GCA GTG AGG TTT TCC
- P2: 5' GGC AAA GCG CCA TTC GCC ATT CAG
- P3: 5' CAT GCC TCG ATC ACT CTT GGA GTT

Protocole du thermocycleur : 5min à 94°C puis 35 cycles 30s à 94°C, 30s à 60°C et 30s à 72°C, puis 5 min à 72°C et enfin une température de maintien comprise entre 4 et 20°C.

**Amorces pour souris *Ifnar*<sup>-/-</sup> :**

- 349) UM4: 5'-AAGATGTGCTGTTCCCTTCCTCTGCTCTGA-3'
- 350) UM5: 5'-ATTATTAAGAAAGACGAGGCGAAGTGG-3'
- 351) UM2: 5'-CAGAAGTCACACAGTTATCATGGCTCAAGG-3'
- 352) P2neo: 5'-CTTCCTCTTGCAAAACCACACTGCTCGACA-3'

Protocole du thermocycleur : 4min à 94°C puis 40 cycles 30s à 94°C, 30s à 58°C et 2min à 72°C, puis 10 min à 72°C et enfin une température de maintien comprise entre 4 et 20°C.

**Amorces pour souris *Tlr7*<sup>-/-</sup> :**

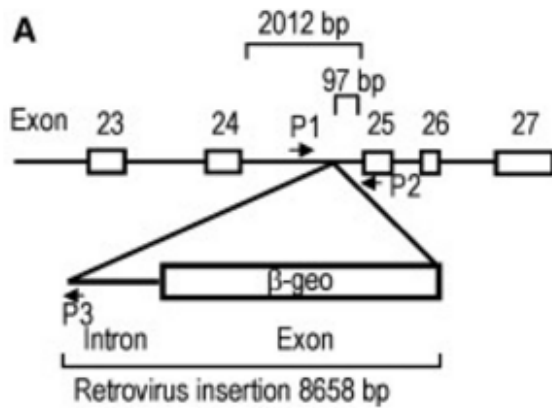
- (#169) PGKneo: 5'-TCA TTC TCA GTA TTG TTT TGC C-3'
- (#172) wild type antisense: 5'-ACC TTT GTG TGC TCC TGG AC-3''
- (#173) wild-type sense: 5'-AGG GTA TGC CGC CAA ATC TAA AG-3'

Protocole du thermocycleur : 3min à 94°C puis 30 cycles 30s à 94°C, 30s à 53°C et 40s à 72°C, puis 5 min à 72°C et enfin une température de maintien comprise entre 4 et 20°C.

**Amorces pour souris *Dicer*<sup>-/-</sup> :**

- Primer i2 : 5' TCA GTG ACA GGG CGA CTG GG
- Primer Ex25: 5' TTC TCC TCA TCC TCC TCG GAT CTC
- Primer Entn: 5' CAC TCC AAC CTC CGC AAA CTC CTA

Protocole du thermocycleur : 30 sec à 95°C puis 35 cycles 10s à 93°C, 30s à 58°C et 60s à 72°C, puis 7 min à 72°C et enfin une température de maintien comprise entre 4 et 20°C.



**Figure MM1. Illustration de la mutation *Dicer*<sup>d/d</sup> et du site d'insertion du transgène  $\beta$ -galactosidase-néomycine.**

### **Induction de l'arthrite STA K/BxN :**

Le sérum est prélevé chez les souris K/BxN à partir de leur 9<sup>ème</sup> semaine de vie (prélèvement rétro-orbitaire). Les sérums provenant de différentes souris sont réunis (mélangés) et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. L'arthrite est induite chez des souris qui sont âgées de 8-16 semaines par 2 injections intrapéritonéales (i.p) séparées de 24 heures avec du sérum provenant de souris K/BxN (150 $\mu$ l au jour 0 et au jour 1). L'évaluation de l'arthrite est déterminée visuellement par l'attribution de scores entre 0 et 4 par pattes (Fig MM2). **(e)** 0 = pas de gonflement ou de rougeur, **(d)** 1 = léger gonflement ou rougeur, **(c)** 2 = gonflement et rougeur modérés, **(b)** 3 = gonflement prononcé avec difficulté d'utilisation de la patte concernée par la souris, **(a)** 4 = gonflement excessif avec rougeur et incapacité d'utilisation de la patte par la souris. L'addition des scores attribués aux 4 pattes de chaque souris constitue le score final. L'évaluation du gonflement est aussi effectuée par des mesures au pied à coulisse au niveau des articulations de chaque patte. Chaque mesure est rapportée à la mesure effectuée sur la patte correspondante au jour 0 (avant l'induction de l'arthrite). Les souris ont été pesées tous les jours.



**Figure MM2 : Image représentative de l'état des pattes correspondant à l'attribution des scores.**

### **Induction de l'arthrite par injection de collagène hétérologue (CIA):**

Les souris utilisées sont sous fond génétique DBA/1 et âgées de 8-12 semaines. Ces souris possèdent l'allèle (I-A<sup>q</sup>) du CMH de classe II, ce qui permet d'obtenir une incidence optimale de l'arthrite.

Une émulsion injectable contenant 2mg/mL de collagène de poulet (Sigma C9301-25MG), 2mg/mL de *M. tuberculosis* H37Ra (invivoGen, TLRL-HKMT-1) est préparée avec de l'adjuvant complet de Freund (Sigma F5881).

L'émulsion est obtenue par l'ajout progressif (goutte à goutte) de la solution de collagène (collagène dissous dans l'acide acétique 10mM) à l'adjuvant de Freund (v/v) sous agitation mécanique intense par un broyeur de tissus (OMNI International Tissue MASTER 125) et cela sur de la glace afin que la chaleur ne dégrade pas le collagène.

Les souris sont anesthésiées et 50µL de l'émulsion leur sont injectés en intradermique (i.d) à environ 1,5 cm de la base de la queue. Pour cela, nous utilisons une seringue en verre (HAMILTON).

Une injection de rappel est effectuée 2 semaines après la première. Cette fois, l'émulsion ne contient que le collagène (2mg/ml) dans de l'adjuvant incomplet de Freund (Sigma F5506) sans *M. tuberculosis* H37Ra.

L'évaluation de l'arthrite est déterminée visuellement par l'attribution de scores entre 0 et 4 par pattes (voir figure MM2). La mesure du gonflement est effectuée au pied à coulisse au niveau des articulations de chaque patte et elle est rapportée aux mesures correspondantes au

jour 0 (avant l'induction de l'arthrite). Les souris ont été pesées à chaque prise de score ou de mesures.

Les premiers symptômes apparaissent entre les jours 21 et 28 après la première injection. Les souris arrivent au pic de l'inflammation arthritique vers 50 jours post-injection.

Pour plus de détails voir : Collagen-induced arthritis, NATURE PROTOCOL VOL.2 NO.5 2007 (Brand et al., 2007)

### **Préparation de l'ARN total à partir de pattes entière de souris:**

Les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale, les pattes avant sont prélevées et conservées à -80°C.

Lors de l'extraction de l'ARN les pattes ne doivent pas décongeler ; elles sont découpées avec une lame de scalpel dans une boîte de Pétri qui est placée sur de la carboglace. Les morceaux ainsi obtenus sont déposés dans un tube en polypropylène de 5 ml (Falcon 352063) avec 2ml de Trizol (TRI Reagent T9424-200ML). Les fragments sont broyés (15-30s) à l'aide d'un broyeur tissulaire (OMNI International Tissue MASTER 125) et les tubes sont maintenus tout au long de l'opération dans de la glace qui est elle-même placée sur de la carboglace afin qu'elle soit la plus froide possible (l'action du broyeur crée de la chaleur qui peut endommager l'ARN). Cette opération se termine avec la dissociation des fragments dans le Trizol.

Entre chaque patte (échantillon), la buse du broyeur est nettoyée par des passages successifs dans un tube contenant de l'éthanol à 75% et deux tubes contenant de l'eau ultra propre (milliQ).

Le contenu de chaque tube est réparti dans 2 tubes de 1,5ml sans nucléase (nucléase free) (Eppendorf 022431021) auxquels il est ajouté 200- 250µl de chloroforme. Après un mélange par vortex (15 secondes) et une incubation de 2 min, les échantillons sont centrifugés 15min à 12000g ce qui permet d'obtenir 3 phases. La phase supérieure, aqueuse, contient l'ARN (400µL-500µl). Cette phase est récupérée et déposée dans un nouveau tube 1,5mL (Eppendorf 022431021). 500µl d'isopropanol y sont ajoutés pour précipiter l'ARN. Les tubes sont mis à incuber 20 à 30 min à -20°C avant d'être centrifugés 15min à 12000g. Le culot ainsi obtenu (ARN) est lavé à deux reprises avec de l'éthanol 75% froid (centrifugation 5 min à 7500g). Le culot est repris dans de l'eau ultra propre sans nucléase (Ambion). Toutes les centrifugations sont réalisées à 4°C.

Avant de pouvoir utiliser l'ARN, sa qualité est évaluée au bio-analyseur (Agilent 2100 bioanalyzer).

La rétro-transcription débute par le dosage de l'ARN au Nanodrop 300, 1µg d'ARN est ensuite utilisé pour obtenir 20µl ADN complémentaire (ADNc) en utilisant le kit BioRad iScript (ref 1708841). Le volume est complété avec de l'eau jusqu'à 15µl pour chaque échantillon contenant 1µg d'ARN, puis sont ajoutés 1µl de rétro-transcriptase ainsi que 4µl de mix iScript 5X. Les tubes sont par la suite placés dans un thermocycleur avec le programme suivant : 25°C pendant 5 min, 42°C pendant 45 min, 85°C pendant 15min (inactivation de l'enzyme).

Pour chaque qPCR réalisée avec du SYBR Green (BioRad, 172-5274), 1µl d'ADN complémentaire est utilisé par gène analysé. Le protocole est décrit dans la partie (PCR quantitative RT-qPCR).

### **PCR quantitative RT-qPCR :**

La PCR quantitative est réalisée dans un volume total de 20µl / tube (PCR-0104-C) en utilisant SensiMix Plus SYBR Green (BioRad, 172-5274). Les séquences des amorces utilisées pour l'évaluation de l'expression de chaque gène sont présentées dans le tableau MM I. Après la dénaturation des deux brins d'ADN complémentaires à 96°C pendant 10 minutes, des cycles successifs (n=40) de 90°C pendant 10s, 60°C pendant 15s, 72°C pendant 25s en utilisant la machine Rotor-Gene 6000 de PCR en temps réel (Corbett, Life Science), sont réalisés. Les produits d'amplifications sont détectés par l'augmentation de la fluorescence produite par la fixation du SYBR Green au petit sillon de l'ADN néoformé pendant les cycles précédemment décrits. Les résultats bruts ont été obtenus par l'utilisation du logiciel SDS (Perkin Elmer). Afin de normaliser les résultats par rapport à la quantité de matériel biologique initialement utilisée, nous avons choisi d'évaluer en parallèle l'expression de la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (*Gapdh*). L'expression relative a été calculée par l'utilisation de la méthode de comparaison au niveau d'un seuil déterminé (Ct) (*cycle threshold*). Dans un premier temps le calcul du  $\Delta CT$  est réalisé (Ct gène d'intérêt - Ct *Gapdh*), puis la moyenne des  $\Delta CT$  des échantillons contrôles est soustraite de chaque  $\Delta CT$ , ce qui permet d'obtenir des  $\Delta\Delta CT$ . Pour l'obtention de l'amplitude de régulation, il suffit de comparer les facteurs de changements obtenus par la formule suivante :  $FC = 2^{-\Delta\Delta CT}$ . Ces calculs sont réalisés avec le logiciel Excel de Microsoft.



La spécificité des amorces utilisées pour chaque gène a été confirmée par l'utilisation du Melting-curve.

### **Analyse de cellules par cytométrie en flux :**

#### **Analyse de la déplétion de pDCs au niveau des rates de souris :**

##### **Isolement des splénocytes :**

Après euthanasie des souris par dislocation cervicale, les rates sont prélevées et découpées en très petits morceaux qui sont incubés avec une solution de digestion (RPMI supplémenté avec 2% de SVF, 50µg/ml DNase I (Roche, 04716728001,) et 1mg/ml de collagénase D (Roche, 11088866001)) à 37°C pendant environ 2h sous agitation (400-600 rpm). La digestion est arrêtée par l'ajout de 5mM d'EDTA. La suspension cellulaire ainsi obtenue est filtrée dans un premier temps à l'aide d'un filtre de 100µm de porosité (Corning, 431752) et dans un deuxième temps à l'aide d'un filtre de 40µm de porosité (Corning, 431750). Par la suite, les globules rouges sont lysés par un tampon de lyse (NH<sub>4</sub>Cl 0,83%, NaHCO<sub>3</sub> 0,1%, EDTA 0,1mM) pendant 5-10 minutes.

##### **Analyse des splénocytes par la cytométrie en flux :**

Les cellules une fois lavées par le tampon de cytométrie (PBS 2% SVF + 1 mM d'EDTA) sont récupérées et mises à incuber 20 minutes avec 5µg/ml d'un anticorps anti-CD-16/CD32 (553142, BD PHARMINGEN) afin de saturer les récepteurs des fragments cristallisables (récepteurs Fc) dans le but d'éviter toute liaison non spécifique. Le marquage des antigènes présents à la surface des cellules est réalisé par l'incubation des cellules avec le mélange d'anticorps adéquats à 4°C pendant 25 minutes dans le tampon de cytométrie, à l'abri de la lumière. Par la suite, les cellules sont lavées deux fois avec le tampon de cytométrie. 5 µl du marqueur de viabilité cellulaire (7AAD, eBioscience 00-6993-50) sont ajoutés dans chaque échantillon 5 minutes avant l'acquisition par le cytomètre. L'acquisition est réalisée avec le cytomètre BD Accuri<sup>TM</sup> C6 et les données sont analysées avec le logiciel BD Accuri<sup>TM</sup> C6. Les pDCs sont positives pour 3 marqueurs de surface : CD11c, PDCA-1 et B220.

Marquage des pDCs	PE-anti CD11c (Clone HL3, BD biosciences).	FITC-anti-PDCA1 (Clone eBio927, eBioscience)	APC-anti-B220 (Clone RA3-6B2, eBioscience),
-------------------	---	---	--

Un contrôle isotypique des anticorps de marquages est utilisé pour définir le seuil de positivité.

### **Analyse du recrutement et de la maturation des cellules immunitaires au niveau des pattes arthritiques et des rates de souris traitées avec l'imiquimod :**

#### **Isolement des cellules du tissu péri-articulaire**

Les pattes sont prélevées et le tissu péri-articulaire (autour de l'os de la patte), incluant la peau et les muscles, est retiré à l'aide de pinces puis découpé en très petits morceaux avant d'être incubé avec une solution de digestion à 37°C pendant environ 2h sous agitation (400-600 rpm). La digestion est arrêtée par l'ajout de 5mM d'EDTA. La suspension cellulaire ainsi obtenue est filtrée dans un premier temps à l'aide d'un filtre de 100µm de porosité (Corning, 431752) et dans un deuxième temps à l'aide d'un autre filtre de 40µm de porosité (Corning, 431750). Les rates sont aussi prélevées et le protocole décrit précédemment est utilisé pour l'obtention des splénocytes.

#### **Analyse des cellules provenant du tissu péri-articulaire et de la rate par la cytométrie en flux :**

Les cellules sont pré-incubées pendant 20 minutes à 4°C avec le marqueur de viabilité (FVD Fixable viability dye eBioscience 65-0865-14) 1/2000 et 5µl de l'anticorps anti-CD-16/CD32 (553142, BD PHARMINGEN). Le marquage des antigènes présents à la surface des cellules est réalisé par l'incubation des cellules avec le mélange d'anticorps adéquat à 4°C pendant 25 minutes dans le tampon de cytométrie, à l'abri de la lumière. Pour le marquage intracellulaire, les cellules sont fixées pendant 20 minutes par Cytofixe BD et perméabilisées pendant 20 minutes par Cytoperm BD, puis lavées avec le tampon de cytométrie. Ensuite 0.5µg/ml de l'anticorps adéquat est ajouté. Après une incubation de 20 minutes à 4°C à l'abri de la lumière, les cellules sont lavées une dernière fois avant l'acquisition par le système de cytométrie Gallios™ (Beckman Coulter) et les données sont analysées par le logiciel FlowJo.

Types cellulaires et marqueurs spécifiques	Anticorps de marquages
Marquage des pDCs (CD45 <sup>+</sup> , PDCA1 <sup>+</sup> , CD11c <sup>+</sup> , B220 <sup>+</sup> )	FITC-anti-CD45 (Clone 30F11, BD Bioscience), PE-anti-PDCA1 (Clone eBio 129c, eBoiscience), PercP-Cy5-anti-CD11c (Clone N418, BD biosciences), APC- anti-B220 (Clone RA3-6B2, eBioscience), AF 700- anti-MHC II (Clone M5/114.15.2, eBioscience).
Marquage de maturation des pDCs (CD86, CD11b, CMH II)	FITC-anti-B220 (Clone RA3-6B2, BD Bioscience), PE-anti-PDCA1 (Clone eBio 129c, eBoiscience), PercP-Cy5-anti-CD11b (Clone M1/70, BD biosciences), APC- anti-CD86 (Clone GL1, Beckman Coulter), AF 700- anti-MHC II (Clone M5/114.15.2, eBioscience).
Marquage des Neutrophiles (CD45 <sup>+</sup> , Gr1 <sup>high</sup> , PDCA1 <sup>-</sup> , CD11b <sup>+</sup> ) et des cDCs (CD45 <sup>+</sup> , PDCA1 <sup>-</sup> , CD11c <sup>+</sup> , CMH II)	FITC-anti-Gr1 (Clone RB6-8C5, BD Bioscience), PE-anti-PDCA1 (Clone eBio 129c, eBoiscience), PercP-Cy5-anti-CD11b (Clone M1/70, BD biosciences), APC- anti-CD11b (Clone M1/70, BD biosciences), AF 700- anti-MHC II (Clone M5/114.15.2, eBioscience).
Marquage des Macrophages (CD45 <sup>+</sup> , Lin <sup>-</sup> , Ly6C <sup>-</sup> , CD64 <sup>+</sup> )	FITC-Lin, PE-anti-Ly6C (Clone AL-21, BD Bioscience), PercP-Cy5-anti-CD11c (Clone N418, BD biosciences), APC- anti-CD64 (Clone X54-5/7.1, Biolegend), AF 700- anti-MHC II (Clone M5/114.15.2, eBioscience).
Marquage de Leucocytes CD45 <sup>+</sup>	FITC-anti-CD45 (Clone 30F11, BD Bioscience)

**FITC-Lin = anti-B220 (Clone RA3-6B2, BD Bioscience), anti-NK1.1 (Clone PK136 (RUO), BD Bioscience), anti-CD207 Langerine (Clone 929F3, Dendritics), anti-CD3e (Clone 145-2C11, BD Bioscience), anti-Ly6G (Clone 1A8, BD Bioscience).**

**Un contrôle isotypique des anticorps de marquages est utilisé pour définir le seuil de positivité.**

**Traitement topique des souris par l'imiquimod :**

Les souris arthritiques sont traitées aux premiers signes des symptômes cliniques, à deux reprises (jour 4 et 9) avec 5 jours d'intervalle dans le modèle STA K/BxN ou bien à 5 reprises avec une moyenne de 4-5 jours d'intervalle pour le modèle CIA. Concernant le modèle hTNF, les souris sont maintenues dès leur naissance sous traitement par un anticorps anti-TNF $\alpha$  afin qu'elles ne développent pas d'arthrite. Dans notre protocole, l'anti-TNF $\alpha$  est arrêté et les souris sont traitées une fois par semaine durant 8 semaines. Les souris sont traitées par application topique de l'imiquimod 5% (ALDARA®) ou de la crème contrôle. Un sachet d'ALDARA est utilisé en général pour traiter 14-16 pattes de souris. Ce qui signifie que pour chaque patte arthritique, une quantité équivalente à 0.8-1  $\mu$ g d'imiquimod est appliquée.

Pour le traitement, les souris sont anesthésiées par injection intramusculaire (i.m) de Ketamine/Xylazine et restent ainsi en sommeil une heure environ après l'application de la crème ce qui laisse le temps au principe actif de pénétrer.

**Déplétion des pDCs par injection de l'anticorps 120g8 :**

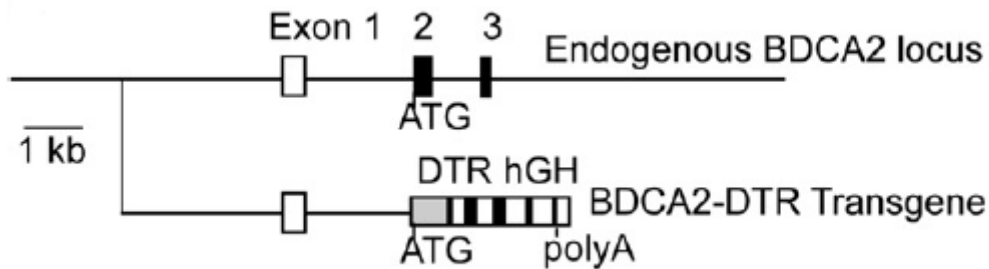
Les souris sauvages sous fond génétique C57BL/6 reçoivent des injections d'anticorps 120g8 selon le protocole suivant : 300 $\mu$ l d'une solution contenant environ 2 mg/ml d'Ac un jour avant l'induction de l'arthrite puis 250 $\mu$ l d'une solution contenant environ 2 mg/ml d'Ac aux jours 1, 3, 5, et 7. Les souris sont finalement euthanasiées au jour 9.

**Déplétion des pDCs chez les souris BDCA2-DTR par l'injection de DT :**

Après avoir constitué des groupes de différents génotypes (BDCA2-DTR Tg<sup>+</sup> ou Tg<sup>-</sup>), toutes les souris reçoivent des injections (i.p) de la toxine diphtérique (DT) (D0564-1MG, Sigma) selon le protocole suivant ; 25 ng/g de souris au jour 0 (premier jour d'induction de l'arthrite) puis 12,5 ng/g de souris aux jours 2, 4, 6, et 8. Les souris sont finalement euthanasiées au jour 9.

La DT est un hétérodimère composé d'une sous-unité A et d'une sous-unité B. La cytotoxicité de la DT est liée à son internalisation par endocytose via le DTR (autrement connu sous le nom de hbEGF) qui interagit avec la sous-unité B de la toxine (Jung et al., 2002). Une fois

internalisée, la sous-unité A, support de l'activité toxique, est libérée et entraîne l'ADP-ribosylation du facteur d'élongation 2 (ef2), résultant en l'inhibition de la synthèse protéique. Ce qui induit l'apoptose rapide de la cellule. De ce fait, seules les souris possédant le récepteur à la DT exprimé spécifiquement à la surface des pDCs montrent une déplétion de ces cellules.



**Figure MM3 : Transgène BDCA2-DTR.** Le transgène comprend 5kb en amont du codon ATG (codon d'initiation de la traduction) du gène BDCA-2, un fragment d'ADNc codant pour le DTR et le signal de polyadénylation du gène de l'hormone de croissance humaine.

### Culture cellulaire de FLS

Afin d'obtenir des FLS de souris, les différentes articulations des pattes arrières des souris sont prélevées et disséquées pour y extraire les membranes synoviales. Par la suite, le tout est placé dans des boîtes de Pétri (Becton-Dickinson) avec 6 ml d'un milieu de digestion (Milieu FLS (voir ci-après) avec 20% SVF, 1 mg/mL de collagénase (*Clostridium histolyticum*, Sigma)), le tout est incubé 3h à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Par la suite le contenu des boîtes est débarrassé des os et du cartilage puis collecté dans des tubes Falcon et centrifugé à 300g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est récupéré et resuspendu avec 6 ml de milieu de culture pour FLS (Milieu FLS) dans une boîte de culture de 25 cm<sup>2</sup> (Becton-Dickinson). Les cellules ainsi obtenues sont placées dans l'incubateur et des passages consécutifs sont réalisés. Les passages sont effectués par lavage des cellules adhérentes au tampon phosphate salin sans cations divalent (dPBS) (PAN biotech, Dutscher), puis les cellules sont traitées avec de la trypsine (TrypLE, Gipro) à 37°C pour les décoller. L'action de la trypsine est arrêtée par ajout de 5ml de milieu FLS. Après une centrifugation à 300g pendant 10 minutes, les cellules sont placées dans une nouvelle boîte.

On considère que ces cultures cellulaires sont constituées exclusivement de FLS au bout du 3<sup>ème</sup> passage.

Milieu FLS : les milieux RPMI 1640 Gluta-MAX (Gibco, Life Technologies) et 199 (Gibco) sont mélangés à volume équivalent ; ils contiennent 250 ng/ml d'Amphotéricine B (Fungisone, Gibco), 100U/ ml de Pénicilline et 100 µg/ml de Streptomycine (Sigma) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Dutscher) dé-complémenté au préalable par chauffage (56°C, 30 minutes) et le tout est filtré (filtre 0,22 µm, VWR).

### **ELISA :**

L'évaluation d'IL-6 sérique est réalisée à l'aide du kit DuoSet™ (R&D), utilisant la méthode de dosage immuno enzymatique ELISA dite « en sandwich ». Des anticorps de capture sont déposés dans un premier temps dans le nombre de puits correspondant au nombre d'échantillons à analyser, plus 8 puits pour la gamme étalon (explication plus bas) et le contrôle négatif. La plaque ainsi préparée est incubée toute la nuit à température ambiante. Avant le dépôt des échantillons à quantifier, trois lavages au tampon PBS tween20 (0.05%) sont réalisés, puis l'on procède à une étape de saturation, pendant 2h, avec une solution contenant 1% BSA (sérum albumine bovine). Les échantillons et la gamme sont alors déposés et incubés pendant 2 h. L'IL-6 se fixe ainsi sur les anticorps déjà présents dans les puits. Trois nouveaux lavages au PBS tween20 (0.05%) sont effectués. Par la suite, des anticorps de révélation biotinylés reconnaissant l'IL-6 y sont ajoutés. Après lavage, la HRP (peroxydase de raifort) couplée à la streptavidine est déposée dans chaque puits. La streptavidine se lie fortement à la biotine des anticorps déjà présents dans le puits. L'ajout d'un substrat de la HRP (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine ou TMB) provoque l'apparition d'une couleur bleue (proportionnellement à la quantité de HRP). Du HCL 1M est additionné à chaque puits pour arrêter la réaction enzymatique et par la même occasion, la couleur de révélation vire du bleu vers le jaune. Deux lectures de la DO (densité optique) sont réalisées dans les 5 minutes suivant la révélation, une lecture à 450 nm et l'autre à 570 nm. Le calcul de la concentration est réalisé grâce aux informations suivantes.

- La courbe étalon est réalisée à partir de dilutions successives au ½, réalisées 7 fois et à partir d'une concentration connue fournie par le fabricant. Pour l'IL-6 (1000, 500, 250,125, 62,5, 31,25, 15,625 et 0 pg/mL d'IL-6).

- **Concentration en pg/mL = (a DO (après correction) + b) x D**
- DO (après correction) = (DO450 - DO570) de chaque échantillon
- “a” correspond au coefficient directeur de la courbe étalon et “b” à l’ordonnée à l’origine.
- D correspond au facteur de dilution employé pour les échantillons testés

**Tableau MM I :** Liste des amorces utilisées en qPCR

CCAACGCTCTTGTCTGAAGATGC	Mouse CD69 f
CCCAATCCAATGTTCCAGTTCACC	Mouse CD69 R
CCGCAGAATCAGACACTGTCTGTA	Mouse CD40 F
TGGCCATCTCCATAACTCCAAAGC	Mouse CD40 R
TGAGTTTTGGTGTCTTCTGGC	Mouse Il1a F
TCGGGAGGAGACGACTCTAA	Mouse Il1a R
CGCCACACAAATGGATGCAA	Mouse Il12b P40 R
TGGCACGATGGAACCTTGTCT	Mouse Il12b P40 F
TGTCAAATTCATTCATGGCCT	Mouse Il10 R
ATCGATTTCTCCCCTGTGAA	Mouse Il10 F
TGAGCTCATTGAATGCTTGG	Mouse Ifng GAMMA R
ACAGCAAGGCGAAAAAGGAT	Mouse Ifng GAMMA F
CGAGCTCACTCTCTGTGGTG	Mouse IL-4 R
TGAACGAGGTCACAGGAGAA	Mouse IL-4 F
GGTCTCCCGAATTGGAAAGGGAAA	Mouse Cxcl15 (IL8)R
TTCCACCGGCAATGAAGCTTCT	Mouse Cxcl15 (IL8) F
GATGAATTGGCGTGGAAATCT	Mouse Ccl3 R
CTGCCCTTGCTGTTCTTCTC	Mouse Ccl3 F
CCACTTCTTCTCTGGGTTGG	Mouse Ccl5 R
GTGCCACGTCAAGGAGTAT	Mouse Ccl5 F
TTTGTTTTTGCAGATGATTCAA	Mouse Ccr2 R
TGCCATCATAAAGGAGCCAT	Mouse Ccr2 F
TAGATGGGAAACATCAGGGC	Mouse Mmp13 R
TGATGAAACCTGGACAAGCA	Mouse Mmp13 F
CCGCTAGAGATGAACGTGGA	Mouse Tnfrsf11a R
CTGATGAGAAGGGAGCCTCA	Mouse Tnfrsf11a F
CCCACAATGTGTTGCAGTTC	Mouse Tnfsf11 R
GACTCCATGAAAACGCAGGT	Mouse Tnfsf11 F
CCCCAATTACGTAGCGAATG	Mouse Itgam R
TGCTGCGAAGATCCTAGTTG	Mouse Itgam F
TGCCCAAAATATTGAATCCTG	Mouse Itgax R
GGAGGAGAACAGAGGTGCTG	Mouse Itgax F
GGCAAGGCAGCAATACCTTA	Mouse Cd80 R
CCATGTCCAAGGCTCATTCT	Mouse Cd80 F
AAAGGCTGTAGAGGACTCCAT	Mouse Xcr1 R
GCACTGGAGGAGATCAAAGG	Mouse Xcr1 F
CCAGAAGCAACAGCAACAAG	Mouse Cd14 R
GGAAGCCAGAGAACACCATC	Mouse Cd14 F
TTTTTCCAGCAGACCAGCTT	Mouse Arg1 R
CATGAGCTCCAAGCCAAAGT	Mouse Arg1 F
CCAGGTCTGTCTCCACAC	Mouse Mx1 R
TCTGAGGAGACCCAGACGAT	Mouse Mx1 F
CAGGAGTCGATGAGGTCAA	Mouse Mx2 R
CTTACCCAGTGGAGAGACGG	Mouse Mx2 F
TGTGCTTTCCTCGTGATGCTGA	Mouse IFN-a2 F
AAGGCCCTCTTGTTCCTGAGGTTA	Mouse IFN-a2 R
GAAATCGCAGCTTCTCCTGCAATC	Mouse IDO 1 F
AGCTATGTCGTGCAGTGCCTTT	Mouse IDO 1 R
TGCCTAGCCTTCCTTTGCTGTT	Mouse MMP-1 F
CCAGGTATTTCCAGACTGTCTCCA	Mouse MMP-1 R
AGGGTGCCATCGAGAAGAG	Mouse IL-28 F
GTGGTCAGGGCTGAGTCATT	Mouse IL-28 R
AGCCACGCTTCCTATCCGAAAA	<u>mouse cathepsin K Forward</u>
ACAGAGCAAAGCTCACCATGGGTA	<u>mouse cathepsin K Reverse</u>
AAGGGGAACCAAGGGGCTTACTTA	<u>mouse TRAP Acp5 Forward</u>
AGGAAAGCCCGTTCCCAAGAAA	<u>mouse TRAP Acp5 Reverse</u>
TTGTGGGTCCTCCTTGTCGATTG	<u>mouse Calcr F</u>
GGAACATGTGCTTGTGCAAGGT	<u>mouse Calcr R</u>
AATTAGGAGTGGGGGATCGT	<u>Nfatc1 mouse Forward</u>
ATCCAACCCAACCTCGCCT	<u>Nfatc1 mouse Reverse</u>
GGCTGGGATTCACCTCAAGAACAT	<u>Mouse Cxcl1 F</u>



<b>AAGCCTCGCGACCATTCTTGA</b>	<b><u>Mouse Cxcl1 R</u></b>
<b>CGCCTAAGGAACGGAAATTTGCAC</b>	<b><u>Mouse Timp1 F</u></b>
<b>CACAGCCAGCACTATAGGTCTTTG</b>	<b><u>Mouse Timp1 R</u></b>
<b>CCACTGCTTCCACAGATGACTACA</b>	<b><u>Mouse Ccr9 F</u></b>
<b>ACAAGCCAGTACAGAGGTGGAAGA</b>	<b><u>Mouse Ccr9 R</u></b>
<b>CTGAACAAAGGCAAGGCTAACTGAC</b>	<b><u>Mouse Cxcl2 F</u></b>
<b>CTTCCCAGGTGCTGTTTGTTTT</b>	<b><u>Mouse Cxcl2 R</u></b>
<b>CGGACCGGGTCTACATCAACTATT</b>	<b><u>Mouse Mif F</u></b>
<b>AAGAACAGCGGTGCAGGTAAGT</b>	<b><u>Mouse Mif R</u></b>
<b>TGGGGAAGCCATGGCAATAGTT</b>	<b><u>Mouse Foxp3 F</u></b>
<b>CGGATAAGGGTGGCATAGGTGAAA</b>	<b><u>Mouse Foxp3 R</u></b>
<b>AGCCCTCCAGTTTGCTTACTCACA</b>	<b><u>Mouse Siglech F</u></b>
<b>GTTTCCAGATGCCCACTTAAGCAC</b>	<b><u>Mouse Siglech R</u></b>

# Données supplémentaires

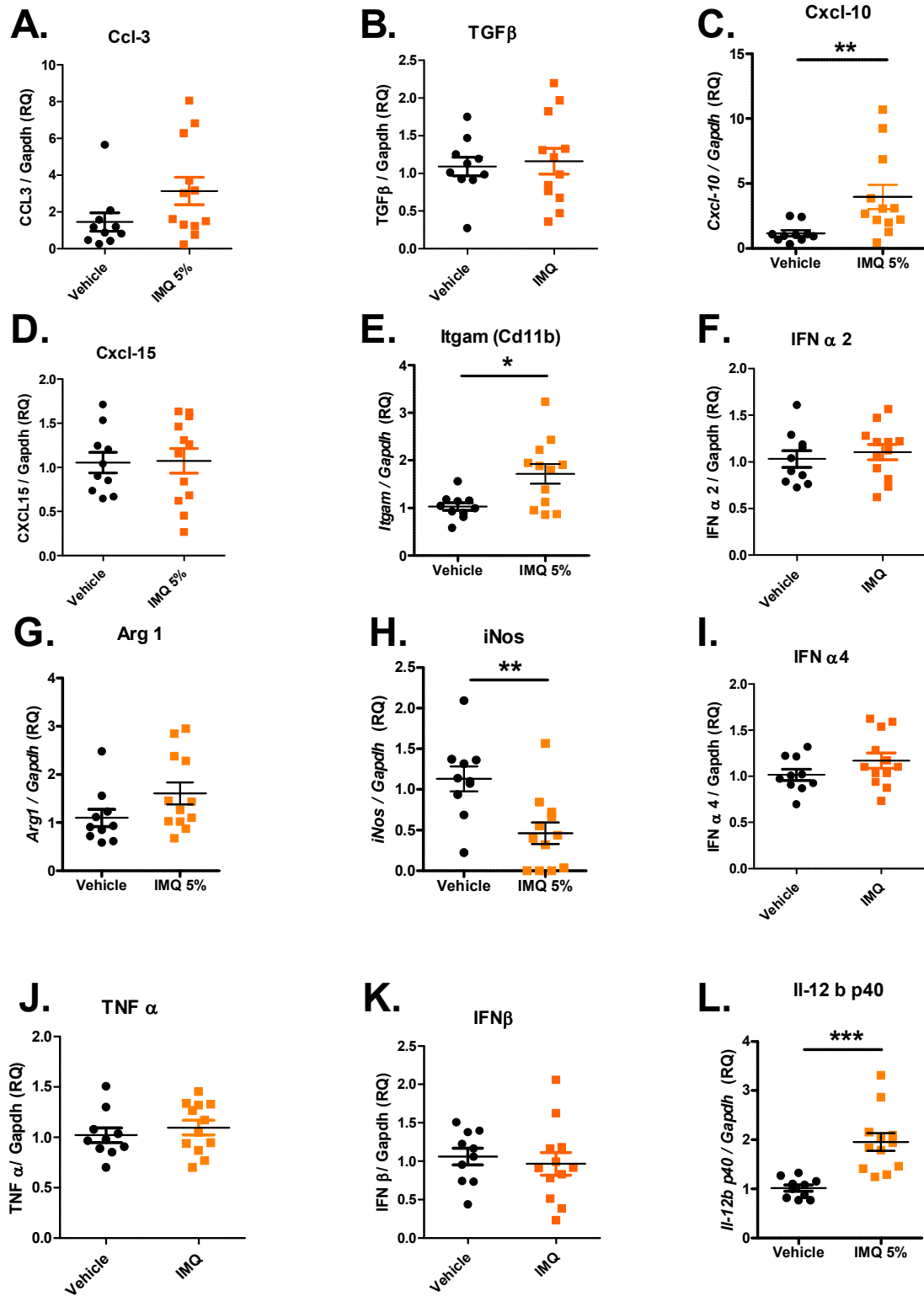


## Données supplémentaires

Tableau S.I : Légendes pour l'analyse histologique exhaustive

<b>Table 5. Histomorphometric Variables Processed by the Semi-Automated Image Analysis System (OsteoMeasure)</b>				
Static indices	Abbreviation	Value	Units	Normals
<u>Bone Volume</u>	BV/TV	13.5243	(%)	23.19 (4.37)
Osteoid Volume (TV)	OV/TV	0.0567	(%)	0.32 (0.19)
Osteoid Volume (BV)	OV/BV	0.4194	(%)	1.48 (0.93)
Mineralized Volume	Md.V/TV	13.4676	(%)	
Bone Surf/Tissue Vol Index	BS/TV	2.6964	(mm <sup>2</sup> /mm <sup>3</sup> )	3.50 (0.46)
Bone Surface/Volume Index	BS/BV	19.9374	(mm <sup>2</sup> /mm <sup>3</sup> )	
<u>Total Osteoid Surface</u>	OS/BS	3.1533	(%)	12.10 (4.64)
Bone Interface (Total)	BI/BS	3.1261	(%)	
<u>Osteoblast Surface</u>	Ob.S/BS	0.1555	(%)	3.90 (1.94)
<u>Eroded Surface</u>	ES/BS	1.8423	(%)	4.09 (2.33)
<u>Osteoclast Surface</u>	Oc.S/BS	0.2435	(%)	0.69 (0.61)
<u>Quiescent Surface</u>	QS/BS	95.0044	(%)	
Reversal Surface	Rv.S/BS	1.5988	(%)	2.70 (2.96)
Remodelling Surface	Rm.S/BS	4.9956	(%)	
Active Eroded Surface	Sl.S/BS	0.3554	(%)	
<u>Trabecular Thickness</u>	Tb.Th	100.3139	(µm)	133.0 (22.0)
Trabecular Profile Thickness	Tb.Pf.Th	0.0000	(µm)	
<u>Osteoid Thickness</u>	O.Th	6.5073	(µm)	10.34 (2.05)
Mineralized Thickness	Md.Th	*	(µm)	
Osteoblast Volume Density	N.Ob/T.Ar	0.0000	(/mm <sup>2</sup> )	
Osteoblast Surface Density	N.Ob/B.Pm	0.1545	(/mm)	
Osteoblast Osteoid Surf. Den.	N.Ob/O.Pm (Lm)	4.8999	(/mm)	
Osteoblast Index	N.Ob/Ob.Pm	99.3769	(/mm)	
Osteoclast Volume Density	N.Oc/T.Ar	0.000	(/mm <sup>2</sup> )	
Osteoclast Bone Surface Den.	N.Oc/B.Pm	0.0221	(/mm)	
Osteoclast Eroded Surf. Den.	N.Oc/E.Pm	1.1981	(/mm)	
Osteoclast Index	N.Oc/Oc.Pm	9.0644	(/mm)	
Structural indices	Abbreviation	Value	Units	Normals
<u>Trabecular separation</u>	Tb.Sp	641.4160	(µm)	570.6 (98.9)
<u>Trabecular Number</u>	Tb.N	1.3482	(/mm)	1.75 (0.23)
Kinetic indices	Abbreviation	Value	Units	Normals
Mineralizing Surface	MS/BS		(%)	76.4 (11.3)
<u>Mineralizing Surface (Osteoid)</u>	MS/OS		(%)	>60
<u>Mineral Apposition Rate</u>	MAR		(µm/d)	0.51 (0.04)
Adjusted Apposition Rate	Aj.Ar		(µm/d)	
Bone Formation Rate (Surface)	BFR/BS		(µm <sup>3</sup> /µm <sup>2</sup> /y)	35.8 (8.9)
Bone Formation Rate (Rel)	BFR/BV		(%/y)	
Bone Formation Rate	BFR/TV		(%/y)	
Mineralization Lag Time	Mlt		(d)	
Osteoid Maturation Time	Omt		(d)	
Total Period	Tl.P		(d)	
Formation Period	FP		(d)	
Active Formation Period	FP (a <sup>+</sup> )		(d)	
Resorption Period	Rs.P		(d)	
Reversal Period	Rv.P		(d)	
Remodelling Period	Rm.P		(d)	
Quiescent Period	QP		(d)	
Activation Frequency	Ae.f		(/y)	

Those variables we use most are underlined. (See Parfitt et al.<sup>48</sup> for details about individual indices.)



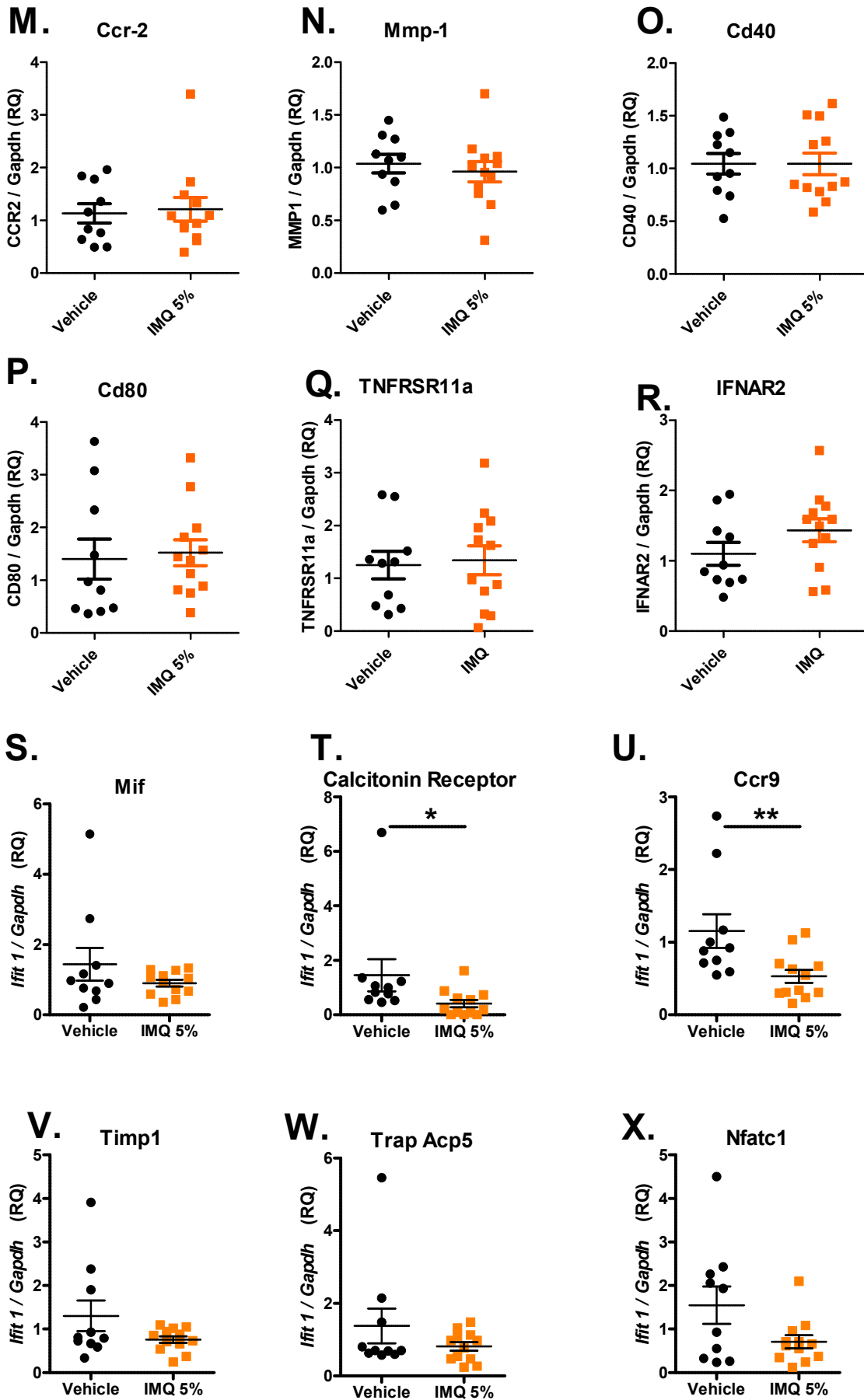
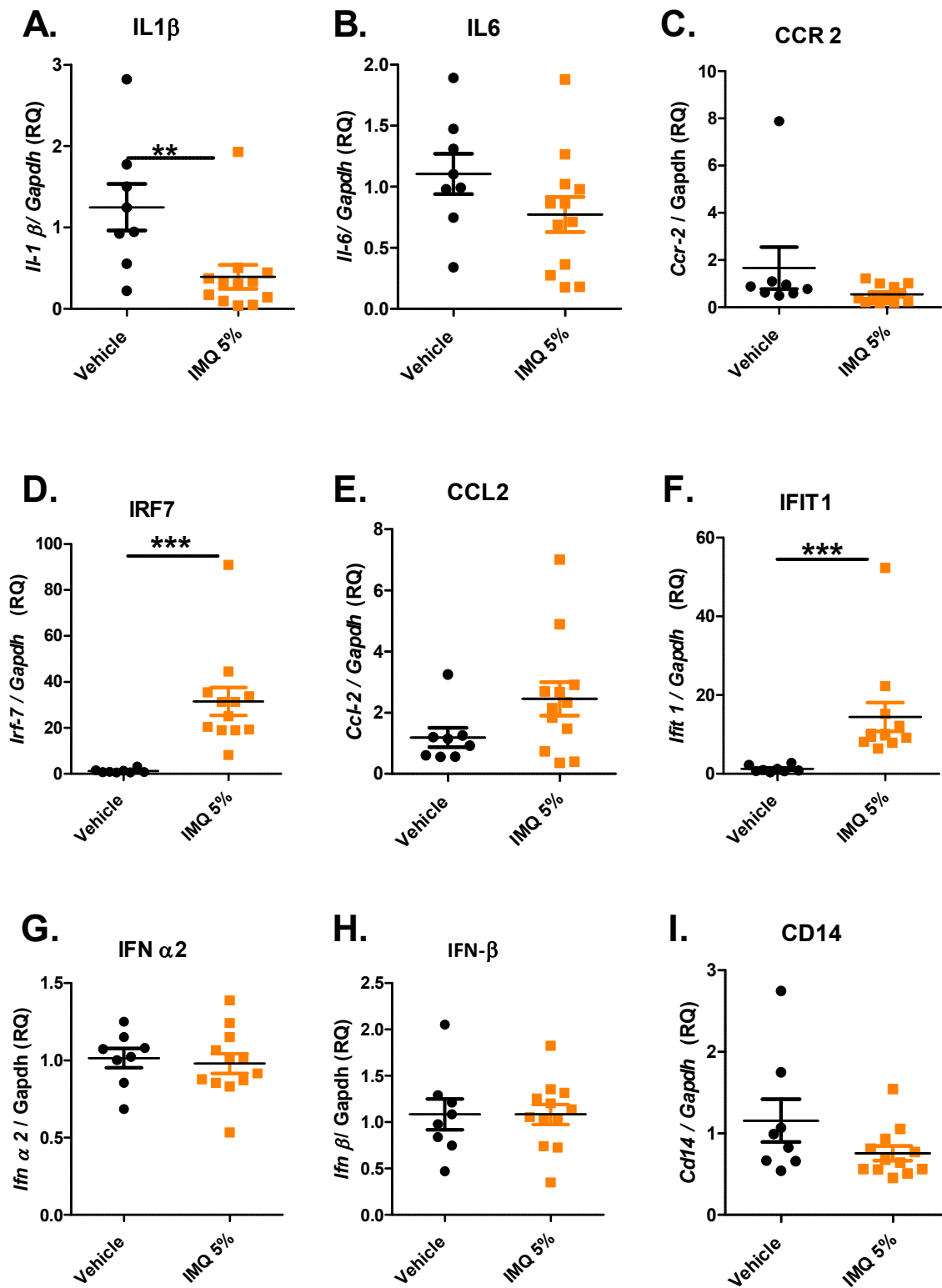


Figure S1 : Résultats de l'analyse d'expression relative des transcrits de gènes impliqués dans l'arthrite au jour 10 de l'arthrite STA K/BxN chez des souris traitées avec la crème contrôle (vehicle) ou avec l'imiquimod (IMQ5%).



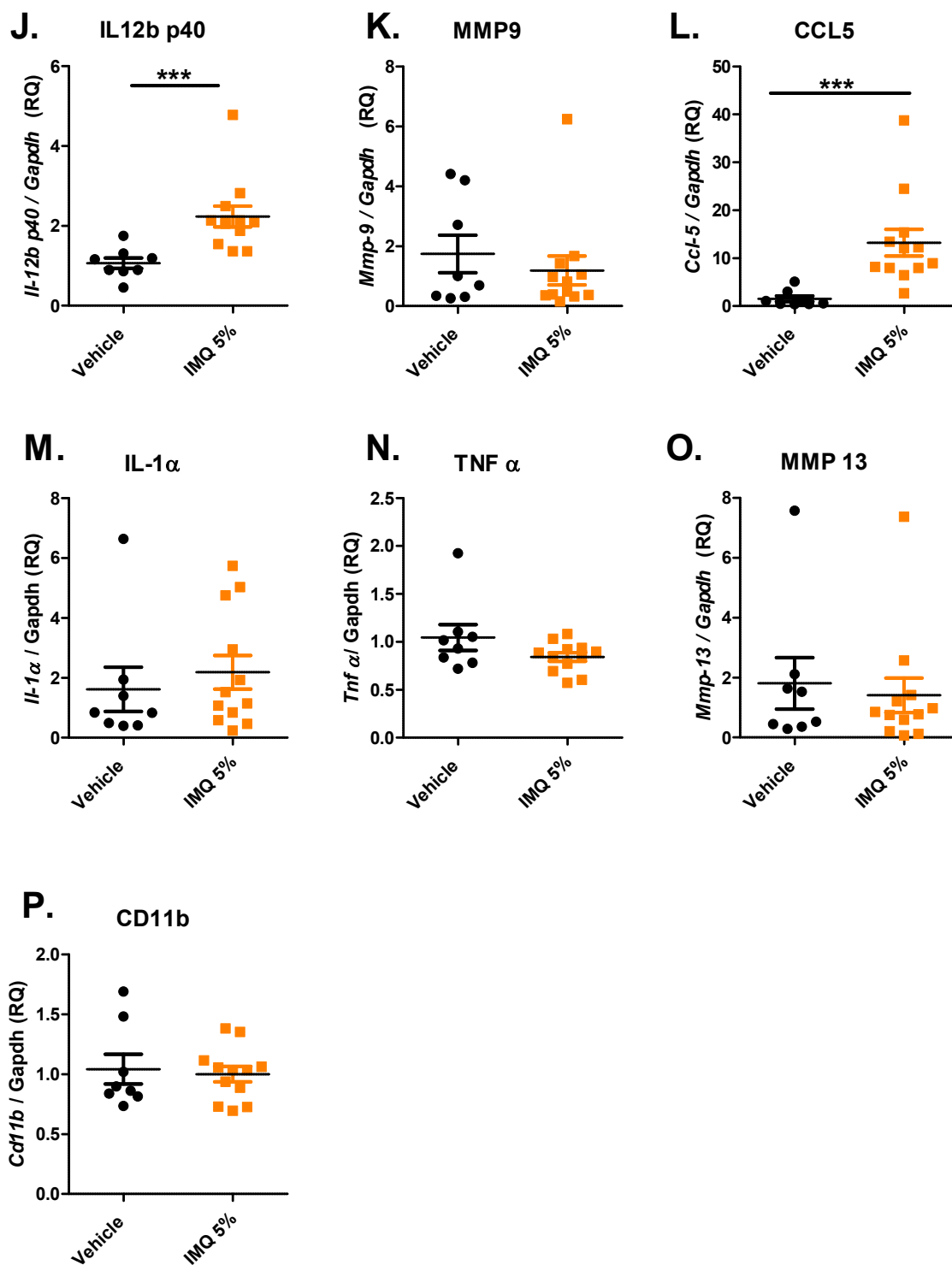
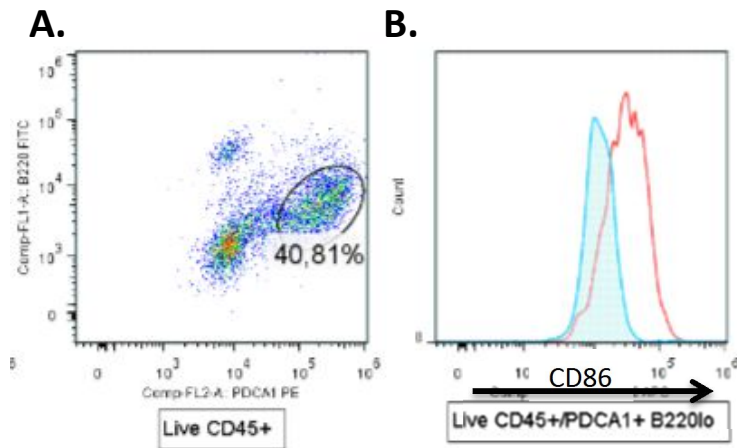
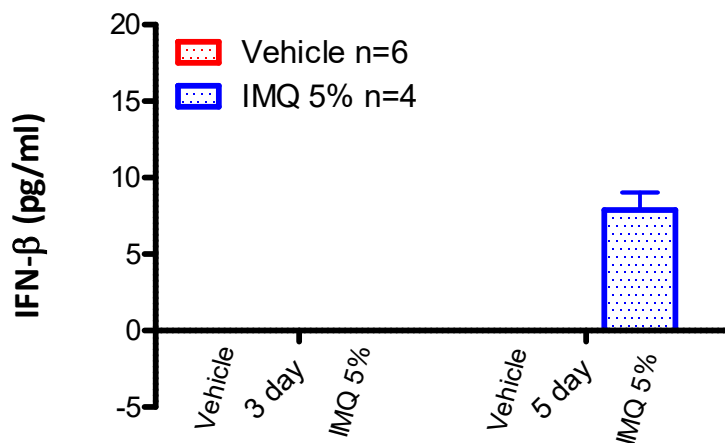


Figure S2. Analyse de l'expression relative des transcrits de gènes impliqués dans l'arthrite au jour 5 de l'arthrite STA K/BxN chez des souris traitées avec la crème contrôle ou avec l'imiquimod (IMQ5%).





**Figure S3.** Représentation de l'expression du CD86 (marqueur d'activation) par les pDCs recrutées au niveau des articulations arthritiques traitées par l'imiquimod (IMQ 5%). **A**, Sélection des pDCs ( $CD45^+$ ,  $PDCA1^+$ ,  $CD11c^+$ ,  $B220^+$ ). **B**, Expression du CD86 à la surface des pDCs de l'articulation après traitement par IMQ 5%, le contrôle isotypique est représenté par l'histogramme bleu, et l'anticorps spécifique du CD86 est représenté par l'histogramme rouge.



**Figures S4.** Dosage immuno-enzymatique par la technique ELISA de l'IFN- $\beta$  sérique aux jours 3 et 5 de l'arthrite STA K/BxN chez des souris traitées avec la crème contrôle ou avec l'imiquimod (IMQ5%).

# Annexes



## Annexes

La partie « Annexes » contient les résultats des travaux auxquels j'ai participé dans le cadre de collaborations avec d'autres équipes. Ces résultats sont présentés sous forme d'articles scientifiques soumis pour publication.

### Manuscrit 2:

Title: Therapeutic delivery of miR-146a to inflammatory monocytes interferes with pathogenic bone loss during inflammatory arthritis

Authors: M. Ammar<sup>1,2</sup>, I. Duroux-Richard<sup>1,2</sup>, J. Presumey<sup>1,2†</sup>, C. Ponsolles<sup>1,2</sup>, G. Roussignol<sup>3</sup>, C. Roubert<sup>3</sup>, V. Escriou<sup>4,5,6,7</sup>, K. Toupet<sup>1,2</sup>, A-L. Mausset-Bonnefont<sup>1,2</sup>, P. Geogel<sup>8</sup>, **R. Nehmar**<sup>8,L</sup>, Taams<sup>9</sup>, Grün<sup>10</sup>, T. Häupl<sup>11</sup>, A. Grützkau<sup>10</sup>, Y-M. Pers<sup>1,2,12</sup>, J. R. C. Jorgensen<sup>1,2,12</sup>, F. Apparailly<sup>1,2,12\*</sup>

One Sentence Summary: Overexpressing miR-146a in Ly6Chigh monocytes reduces bone erosion in arthritis.

Affiliations:

1INSERM, U1183, IRMB, University Hospital Saint Eloi, 80 rue Augustin Fliche, 34295 Montpellier, France

2University of Medicine, Boulevard Henri IV, 34090 Montpellier, France

3Exploratory Unit, Sanofi R & D, 371 rue du professeur J. Blayac, 34184 Montpellier, France

4INSERM, U1022, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 4 Avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

5CNRS, UMR8258, 75006 Paris, France

6Chemical and Genetic Pharmacology and Imaging Laboratory, Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes, 75270 Paris, France

7Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris, 11 Rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France

8INSERM, UMR\_S 1109, University of Strasbourg, Centre de Recherche d'Immunologie et d'Hématologie, 1 Place de l'Hopital, 67085 Strasbourg, France

9Centre for Molecular and Cellular Biology of Inflammation, King's College London, Guy's Campus, London SE1 1UL, UK

10Deutsches Rheuma-Forschungszentrum (DRFZ), Charitéplatz 1, 10117 Berlin, an Institute of the Leibniz-Association, Germany

11Rheumatologie, Charité, Tucholskystr. 2, 10117 Berlin, Germany

12Clinical department for osteoarticular diseases, University hospital Lapeyronie, 371 Avenue Gaston Giraud, 34295 Montpellier, France

\*To whom correspondence should be addressed: Florence APPARAILLY, INSERM unité U1183, Bâtiment IRMB, CHRU Saint Eloi, 80 Avenue Augustin Fliche, 34295 Montpellier, France. Phone: 33-467-335-696, Fax: 33-467-330-113, email: florence.apparilly@inserm.fr.

†Current address: Children's Hospital, CLS Bldg 3/Carroll Lab, 300 Longwood Ave, Boston MA 02115, USA.

#### Abstract:

Bone erosion is a central feature of rheumatoid arthritis (RA). Most current therapies for RA, as well as drugs in the therapeutic pipeline, reduce the inflammatory process but have little or no impact on bone erosion. Inhibition of osteoclastogenesis is critical to restore bone homeostasis and to prevent bone erosion in RA. Among regulatory molecules, microRNAs play important roles under physiological and pathological conditions but remain poorly studied in the context of osteoclastogenesis. Considering that (i) bone resorption is related to increased number and activity of subchondral osteoclasts, (ii) osteoclasts originate from monocytic precursors that exist in two main subsets committed to different functions, and (iii) miR-146a is a negative regulator of osteoclastogenesis, we investigated whether miR-146a differentially regulates osteoclastogenesis in monocyte subsets in the context of arthritis and could be targeted for anti-osteoclastogenic strategy. We show that miR-146a is down regulated during osteoclast differentiation and in Ly6Chigh osteoclast precursors isolated from arthritic individuals. Knock down of miR-146a significantly increased osteoclast differentiation in vitro and bone loss in inflammatory arthritis. Finally, in vivo delivery of miR-146a mimics to Ly6Chigh monocytes efficiently reduced osteoclast differentiation, osteoclast numbers and bone erosion in arthritic joints, and rescued bone loss in arthritic miR-146a<sup>-/-</sup> mice. Overall, our data suggest that low expression level of miR-146a in Ly6Chigh monocytes fosters osteoclastogenesis in inflammatory arthritis and identify miR-146a expression in the Ly6Chigh monocyte subset as a therapeutic target for osteoclast-directed therapy in arthritis.

[Main Text:]

#### Introduction

Monocytes are plastic cells of the innate immune system. They are found in all tissues and act as key regulators of both inflammation and tissue homeostasis. Due to their capacity to differentiate into dendritic cells (DC), macrophages (M $\phi$ ) and osteoclasts (OC), monocytes display functional diversity, playing key roles in controlling both immune responses and bone turnover. In addition, monocytes are heterogeneous and comprise several subtypes committed to different functions (1-3). Two main subsets exist, namely the « classical » mouse

inflammatory Ly6Chigh and « non-classical » patrolling Ly6Clow monocyte subsets, and their human CD14+CD16- and CD14dimCD16+ counterparts, respectively (1, 4). In mice, Ly6Chigh monocytes secrete inflammatory mediators and can differentiate into macrophages, inflammatory DC and OC (5-7). Ly6Clow monocytes survey endothelial cells and surrounding tissues for damage or viral infection and are involved in tissue repair (1). Several mouse models of inflammation and autoimmunity have been used to further delineate functional heterogeneity of monocytes in vivo. Increased activity of Ly6Chigh monocytes is a hallmark of inflammatory disorders, which accumulate in the blood and migrate to the site of inflammation (8-11). Although mouse studies have underscored the relevance of studying monocyte subsets, factors that regulate monocyte subset fate and functions remain poorly explored, especially under arthritic conditions.

Among key molecular rheostat of monocyte activation and differentiation, micro(mi)RNAs play critical roles. They are small, noncoding single-stranded RNA molecules that regulate genetic programs at the post-transcriptional level. They are mainly involved in repression of gene expression by pairing to the 3'-UTR of target transcripts and inducing mRNA cleavage or inhibition of translation (12, 13). The function of most of the mammalian miRNAs has yet to be determined. Finally, abnormal expression of miRNAs has been implicated in major human disorders, including cancer and autoimmunity, where they are suggested to represent promising marker molecules and innovative target genes. The role of miRNAs in regulating monocyte differentiation into macrophages and dendritic cells has been documented, but little is known about how they influence their differentiation into osteoclasts. Only very few groups have addressed this issue in bone physiology and disease (14-17), and never in the context of functional heterogeneity of monocyte subsets. Of note, miR-146a is the only miRNA identified as playing a role in functional heterogeneity of monocyte subsets (18). MiR-146a is a well-known negative regulator of inflammation in monocytes/macrophages (19) and is paradoxically highly expressed in inflammatory diseases that also display increased bone resorption such as RA (20-22). It has also been reported to abrogate osteoclastogenesis through ectopic expression in human PBMCs (23).

Considering that Ly6Chigh monocytes represent the major precursor cell population of OC, we hypothesized that miR-146a could regulate osteoclastogenesis in Ly6Chigh monocytes and not in Ly6Clow monocytes. Here, we investigated the role of miR-146a in osteoclasts differentiation and activity, in the context of monocyte heterogeneity, using various pathological conditions that challenge bone remodeling. Our data suggest that reduced expression of miR-146a in Ly6Chigh monocytes is responsible for increased osteoclastogenesis and bone loss in arthritis but not in osteoporosis, and that in vivo delivery of miR-146a mimics to Ly6Chigh monocytes prevent bone loss in inflammatory arthritis.

## Results

### Differential role of monocyte subsets in inflammatory arthritis

Several mouse models of inflammation and autoimmunity have been used to study the respective role of the two major monocyte subsets *in vivo* but so far, nothing is known about the implication of the respective monocyte subsets in the mouse model of CIA. We thus determined the temporal changes in monocyte subsets during progression of mouse CIA to assess their potential contribution to disease hallmarks, i.e. inflammation and bone erosion. In full-blown arthritic mice (40 days after induction), the number of blood Ly6Chigh monocytes was increased as compared with control mice (Fig. 1A). A kinetic study of the frequency of circulating monocyte subsets showed a 2-fold increase in Ly6Chigh monocytes before the clinical onset, whereas the frequency of Ly6Clow monocytes remained unchanged as compared with NI mice (Fig. 1B). The total number of leukocytes did not change (data not shown). Our data showed that the development of CIA is associated with a Ly6Chigh monocytosis in the circulation, starting before disease onset and gradually progressing with enhanced disease severity. In the spleen of arthritic animals, the frequency of Ly6Chigh monocytes was also increased, transiently after the boost (D21 post-immunization), while the frequency of Ly6Clow monocytes do not significantly change during CIA development (Fig. 1C). Although leukocytes were present in joints under steady state conditions (NI), joints from CIA mice were markedly infiltrated by leukocytes (Fig. 1D). There were 15 times more Ly6Chigh cells into the arthritic joints than in healthy joints, associated with increased number of macrophages. As previously reported, a substantial neutrophil infiltration was also observed into the arthritic joints. As assessed by intracellular cytokine staining, the Ly6Chigh monocytes infiltrating the joint tissue of arthritic mice produced TNF- $\alpha$  and displayed activated phenotype while those from NI mice did not (Fig. 1E). Ly6Chigh monocytes recruited into the joints express molecules such as MHC class II and CD80, but are F4/80-, and thus have antigen-presenting functions, but are not yet mature APCs or macrophages (24). When comparing healthy to CIA mice, the Ly6Clow monocyte counts did not vary, neither in the blood, nor in the spleen or joints (data not shown). Altogether, our data are indicative of a selective expansion of Ly6Chigh monocytes in the peripheral blood and spleen of CIA mice, which are mobilized to the inflamed joints and express an inflammatory profile, whereas Ly6Clow monocytes do not seem to contribute to the development of CIA. This is indicative of a critical role of Ly6Chigh monocytes in arthritis pathogenesis.

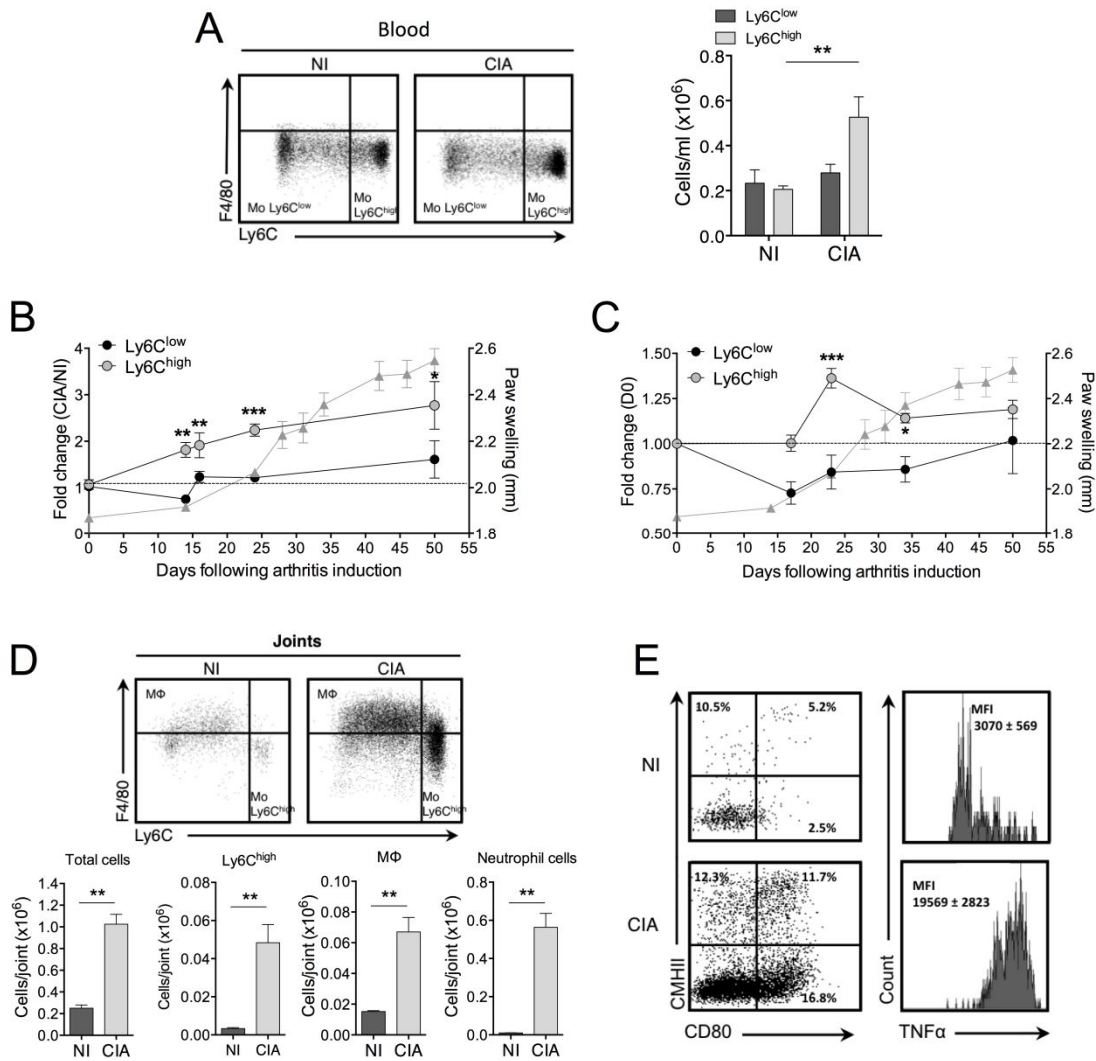


Fig. 1. Inflammatory Ly6Chigh monocytes are amplified in arthritis. DBA/1 mice were immunized with bovine type II collagen and boosted on day 21 to induce collagen-induced arthritis (CIA). Non-immunized DBA/1 mice were used as controls. Frequencies of Ly6Chigh (grey symbols) and Ly6Clow (black symbols) monocyte subsets were determined. Mice were sacrificed 40 days after immunization and frequencies of Ly6Chigh and Ly6Clow monocytes quantified in the blood (A). Temporal changes in Ly6Chigh and Ly6Clow monocyte subsets were quantified in peripheral blood (B) and spleen (C), compared to D0 of arthritis. Arthritis severity was assessed by measuring the hind-paw swelling for each mouse over the course of the disease (triangles). At day 50 post-immunization, leukocytes were isolated from ankle joints of CIA and control mice. Flow cytometric enumeration of Ly6Chigh monocytes (Mo Ly6Chigh), macrophages (MΦ) and neutrophils was performed (D). Activation status of joint infiltrating cells as well as TNF- $\alpha$  expression levels on Ly6Chigh monocytes were assessed by membrane staining of CD80 and MHCII and intracellular cytokine staining, respectively (E). The gates were set using isotype control antibodies. The frequency at each time point represents the mean  $\pm$  SEM of 3-8 mice/group. Differences between groups were compared



using two-way ANOVA (A), two-way repeated measures ANOVA (B, C), and non-parametric Mann-Whitney t-test (D). \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

### Monocyte subsets display distinct osteoclast differentiation potential

While physiological bone resorption and homeostasis are mostly dependent on bone marrow precursors, it has been proposed that, under pathological conditions, osteoclastogenic progenitors (OCP) from peripheral organs contribute to extramedullary osteolysis (6). There is indeed evidence that inflammatory arthritis is accompanied by an expansion of splenic CD11b<sup>+</sup> monocytes, which constitute a source of osteoclast precursors and lead to bone destruction in experimental arthritis once recruited to the bone-pannus interface (25). Due to the phenotypic and functional heterogeneity of CD11b<sup>+</sup> monocytes, we further determined osteoclast origin using FACS sorted splenic Ly6C<sup>high</sup> and Ly6C<sup>low</sup> monocytes subsets. As shown in Figure 2, osteoclasts develop preferentially from the Ly6C<sup>high</sup> monocyte subset, undergoing osteoclastic differentiation by day 2 of RANKL induction as evidenced by spread osteoclast precursors, and giving rise to higher numbers of TRAP (Tartrate-resistant acid phosphatase)-positive osteoclasts at day 5 than Ly6C<sup>low</sup> monocytes (Fig. 2).

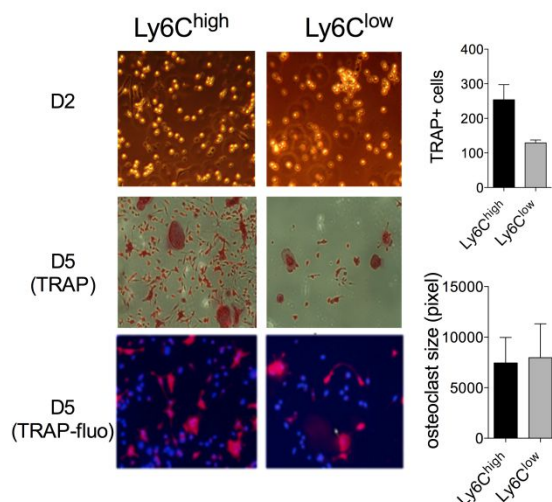


Fig. 2. Mouse monocyte subsets show distinct osteoclast differentiation potential. Ly6C<sup>high</sup> or Ly6C<sup>low</sup> monocytes were FACS sorted from DBA/1 mouse spleen and cultured in osteoclast differentiation medium for 5 days. The number and size of living TRAP-positive multinucleated osteoclasts were quantified at 5 days of differentiation using automated fluorescence imaging (n=20 areas/well). Representative pictures from two independent experiments are shown (10x magnification). Data are presented as mean  $\pm$  SEM (n=2 of 20-25 pooled spleen).

Interestingly, using automated fluorescence imaging analysis, 2-fold more TRAP-positive OC was quantified from Ly6Chigh monocytes than from Ly6Clow monocytes, while the size of osteoclasts formed was comparable. Finally, when RANKL-driven osteoclast differentiation was performed with primary cultures of mouse OC precursors (OCP) obtained from either bone marrow or spleen, the expression of miR-146a was rapidly down regulated in early stages of in vitro osteoclast differentiation (from day 2, data not shown). In parallel, mRNA levels for the early osteoclast transcription factor NFATc1 and the cytochemical marker of osteoclasts TRAP were increased, as well as mRNA levels of IRAK1, TRAF6 and RelB, which are validated target genes for miR-146a (18, 19) and mediate RANKL-induced OC differentiation, were increased (data not shown). Our data suggest that early down-regulation of miR-146a is critical for initiation of osteoclast differentiation, releasing its negative control on the canonical and non-canonical RANKL signalling pathways and allowing expression of genes specific for osteoclastogenesis), but then increased again by day 5 as the osteoclastogenic program ended.

Expression of miR-146a is decreased in classical monocytes of arthritic individuals

Since miR-146a plays important regulatory roles in the development and functions of monocytes, including osteoclastogenic differentiation (14), we compared the expression levels of miR-146a in blood sorted classical and non-classical monocytes in steady state and arthritic conditions (Fig. 3). We found that miR-146a was 42-fold more expressed in Ly6Clow monocytes than in Ly6Chigh monocytes (Fig. 3A). Consistent with findings that human CD14dimCD16+ monocytes resemble mouse Ly6Clow monocytes, miR-146a was also detected at higher levels in blood CD14dimCD16+ monocytes (18-fold difference between medians) than in CD14+CD16- monocytes, which resemble mouse Ly6Chigh monocytes (Fig. 3B). Importantly, the expression

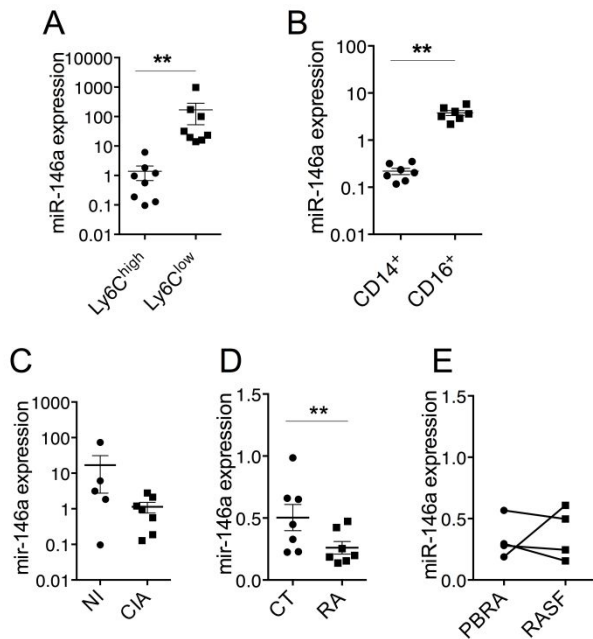


Fig. 3. Expression of miR-146a by Ly6Chigh monocytes is decreased in arthritic individuals. Classical and non-classical monocyte subsets were FACS sorted from mouse (A, C) and human (B, D, E) samples, isolated from either healthy (A-D) or arthritic individuals (C, D, E). Relative miR-146a expression was quantified using RT-qPCR in Ly6Chigh or Ly6Clow monocytes isolated from blood of healthy mice (A), in classical (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>) and non-classical (CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>) monocytes isolated from blood samples collected from healthy donors (B), in Ly6Chigh monocytes isolated from healthy (NI) mice and collagen-induced arthritic (CIA) mice (C), in CD14<sup>+</sup> monocytes isolated from the blood of either healthy donors (CT) or patients with rheumatoid arthritis (RA) (D), and in CD14<sup>+</sup> monocytes isolated from the peripheral blood (PB) or synovial fluid (SF) of RA patients (E). Data are presented as mean ± SEM of 3-8 biological replicates corresponding to either individual samples (human) or 20-25 pooled samples (mice). \*\*  $p < 0.01$ , two-tailed Wilcoxon test (A-B, E), and Mann-Whitney t-test (C-D).

level of miR-146a was decreased in Ly6Chigh monocytes of CIA mice compared with non-immunized (NI) mice (Fig. 3C,  $p = 0.053$ ). A significant reduction was also found in CD14<sup>+</sup> monocytes isolated from the blood of patients with RA, compared with healthy controls, and miR-146a expression levels were comparable between peripheral blood and synovial fluid CD14<sup>+</sup> monocytes (Fig. 3D-E). Considering the negative role of miR-146a on osteoclastogenesis, our data suggest that a reduction of the expression of miR-146a in Ly6Chigh monocytes under arthritic conditions might increase osteoclast-dependent bone resorption, responsible for bone destruction in CIA.

miR-146a is a sensor that negatively regulates osteoclastogenesis during inflammatory arthritis

To test the hypothesis that reduction of miR-146a expression in OCP is necessary to initiate osteoclast formation, we next investigated whether miR-146a deficiency in mouse OCP has an impact on bone homeostasis and osteoclast development. Ex vivo, osteoclast differentiation assay revealed that deficiency of miR-146a in primary bone marrow-derived precursors resulted in a significant increase in the number of TRAP positive multinucleated osteoclasts compared with control littermates (Fig. 4A). We observed similar differences using splenic CD11b<sup>+</sup> OCP (data not shown). Importantly, this was associated with increased OC activity as assessed by higher resorption area under miR-146a<sup>-/-</sup> conditions than in miR-146a<sup>+/+</sup> conditions (Fig. 4B). In vivo, using micro-computed tomography of the proximal femur, we found that the trabecular bone parameters remained however unchanged in miR-146a KO mice as compared with WT littermates under steady state conditions (Fig. 4C, black bars).

To further investigate the regulatory role of miR-146a in osteoclast under pathological conditions, we used two different experimental models that challenge bone remodeling, the K/BxN serum transfer arthritis (STA) (26) and ovariectomy-induced osteoporosis (OVX) models. Micro-computed tomography analyses revealed that global miR-146a deletion significantly reduced bone mass (BV/TV) and trabecular thickness (Tb.Th), compared with control arthritic littermates (Fig. 4C, grey bars). Quantification of TRAP-positive cells in the pannus was performed to monitor pathological osteoclasts (27). Analysis of serial knee sections revealed 2-fold higher number of TRAP-positive cells in miR-146a deficient mice compared with control littermated (Fig. 4D). Consistent with its negative regulation of inflammation, absence of miR-146a worsened disease severity, as evidenced with increased arthritic score in miR-146a<sup>-/-</sup> compared with wild type littermates (Fig. 4E). Ex vivo, similar to what we observed under steady state conditions (Fig. 4A), under arthritic conditions, miR-146a deletion increased osteoclastogenesis from both bone marrow and splenic CD11b<sup>+</sup> precursors compared with control littermates (Fig. 4F). As expected, the magnitude and speed of the OC differentiation was higher and faster when using splenic CD11b<sup>+</sup> than BM as progenitors. Finally, the TRAP<sup>+</sup> osteoclast number was augmented in cultures of BM miR-146a<sup>-/-</sup> progenitors isolated from arthritic mice compared to healthy controls (160%, Fig. 4G), to comparable level to the osteoclast number obtained when comparing miR-146a<sup>-/-</sup> versus miR-146a<sup>+/+</sup> progenitors from arthritic mice (142%, Fig. 4F right panel). Overall, under inflammation-driven bone remodelling conditions, the absence of miR-146a in the osteoclast lineage increases bone resorption and reduces bone mass, at least in part through increased osteoclastogenesis.

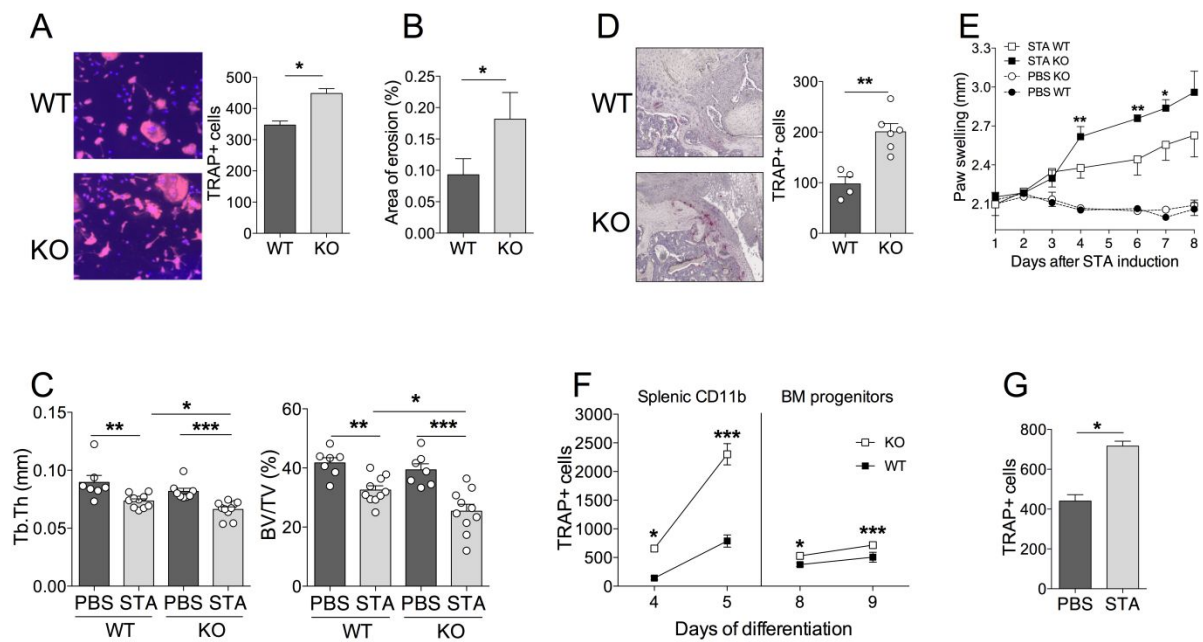


Fig. 4. miR-146a deficiency increases osteoclast differentiation and inflammatory arthritis-induced bone erosion. Osteoclast precursors from miR-146a<sup>-/-</sup> (KO) mice or wild type littermates (WT) were cultivated in osteoclast differentiation medium for 7 days. Number of TRAP-positive multinucleated osteoclasts was quantified using automated fluorescence imaging (n=20 areas/well, n=4 mice/group). Representative pictures from four independent experiments are shown (10x magnification) (A). Functional assay was performed on an Osteo Assay Surface plate. Relative resorption area was quantified using image J software (n=6 areas/well, two experimental replicates of 4 mice/group pooled) (B). miR-146a<sup>-/-</sup> (KO) mice or wild type littermates (WT) were injected i.p. on day 0 and 1 with K/BxN serum (grey bars) to induce serum-transfer arthritis (STA). Control groups were injected with PBS (black bars). Mice were sacrificed 11 days after the first injection (C-G) (n=4-10 mice/group). Micro-computed tomography analysis was performed at day 10 for 3-dimensional reconstruction of the anklebones and quantification of trabecular micro-architecture parameters of proximal femur bone, including trabecular thickness (Tb.Th, mm) and bone volume (BV/TV, %) (C). Knee sections were processed for TRAP and Hematoxylin stainings. Representative sections are shown (5x magnification). The number of TRAP positive osteoclast cells was counted at pannus site from KO and WT arthritic mice (D). Arthritis severity was monitored. Data are representative of four independent experiments (E). Temporal changes in osteoclast differentiation capacity of splenic and bone marrow precursors isolated from arthritic miR-146a<sup>-/-</sup> or miR-146a<sup>+/+</sup> mice were monitored at the indicated time points. The number of TRAP-positive multinucleated osteoclasts was quantified using automated fluorescence imaging (n=20 areas/well, n= 4 mice/group) (F). Osteoclast differentiation potential of miR-146a deficient progenitors isolated from arthritic or healthy mice after 9 days of culture (n=4). (G). Data are presented as mean ± SEM and representative of four independent experiments. Differences between groups were compared using Mann-Whitney t-test (A-B, D and G), two-

way ANOVA (C, F) or two-way repeated measures ANOVA (E). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

We next investigated whether the absence of miR-146a could attenuate postmenopausal osteoporosis using an OVX model. Reduction of uterine weight in all ovariectomized mice indicated efficient oestrogen depletion (data not shown). As expected, compared with sham controls, WT CD11b<sup>+</sup> monocytes isolated from OVX mice displayed increased osteoclast differentiation potential comparable to CD11b<sup>+</sup> precursors isolated from sham KO mice. The number of TRAP positive multinucleated osteoclasts was however comparable between both groups in miR-146 deficient mice, and *in vivo*, bone morphometric parameters were unaltered by the absence of miR-146a in ovariectomy-induced osteoporosis as compared with sham controls (data not shown). Overall, our data showed that inflammation-induced bone erosion, but not ovariectomy-induced osteoporosis, is increased in miR-146a<sup>-/-</sup> mice, revealing a functional specialization of miR-146a dependent on the inflammatory environment.

Enforced expression of miR-146a in Ly6Chigh monocytes attenuates bone erosion in arthritis

Our findings prompted us to investigate whether increased expression of miR-146a by circulating Ly6Chigh attenuates OC development and bone loss in inflammatory arthritis. We used the DMAPAP/DOPE cationic liposome (30) as a vehicle to deliver miR-146a mimics to Ly6Chigh monocytes upon intravenous injection of CIA mice and evaluated its effect on bone erosion. Efficiency of the delivery of miR-146a mimics to splenic CD11b<sup>+</sup> and Ly6Chigh monocytes was first validated. Systemic injection of miR-146a mimics-containing lipoplexes increased the expression of miR-146a on the CD11b<sup>+</sup> fraction when compared with arthritic mice injected with control miRNA mimics-containing lipoplexes, while miR-146a expression on the splenic CD11b<sup>-</sup> fraction was still (Fig. 5A). More importantly, while the expression level of miR-146a remained unchanged on Ly6Clow monocytes sorted from the CD11b<sup>+</sup> fraction, it was 7-fold increased on the Ly6Chigh monocyte subset 72 hours after a single intravenous injection of lipoplex (Fig. 5B). The effect of ectopic miR-146a expression on Ly6Chigh monocytes was then investigated on disease severity and joint histopathology. Weekly administration of miR-146a mimics-containing lipoplexes from day 18 over 3 weeks time increased 60-fold the expression of miR-146a on the Ly6Chigh monocytes compared with control miRNA mimics-containing lipoplexes (Fig. 5C). Compared with control mimics-treated CIA mice, mice injected with miR-146a mimics showed reduced number of osteoclasts at the sites of inflammation and decreased bone erosion as assessed by histological analyses (Fig. 5D-E). Interestingly, there was no clinical benefit on joint inflammation upon miR-146a overexpression in Ly6Chigh monocytes (data not shown). *Ex vivo*, when BM progenitors were cultured under osteoclastogenic conditions, OC differentiation was significantly reduced for miR-146a mimics-treated CIA mice compared with miRNA control-treated CIA mice (data not shown). These data were recapitulated *in vitro* when transfecting BM progenitors with miR-146a mimics compared with miRNA control mimics (data not

shown). Overall, these results indicate that modulating Ly6Chigh monocytes with miR-146a is sufficient to impede inflammatory bone loss during arthritis.

To further support this hypothesis, we rescued miR-146a expression in Ly6Chigh monocytes of miR-146a<sup>-/-</sup> mice under arthritic conditions. Micro-computed tomography analyses evidenced efficient rescue of the KO phenotype on bone erosion, as assessed by reduced bone erosion (BS/BV) and increased trabecular thickness (Tb.Th) in miR-146a-treated mice compared with miRNA control-injected KO mice. Importantly, bone morphometric characteristics reached levels of those observed in miR-146a<sup>+/+</sup> littermates injected with miRNA control (Fig. 5F).

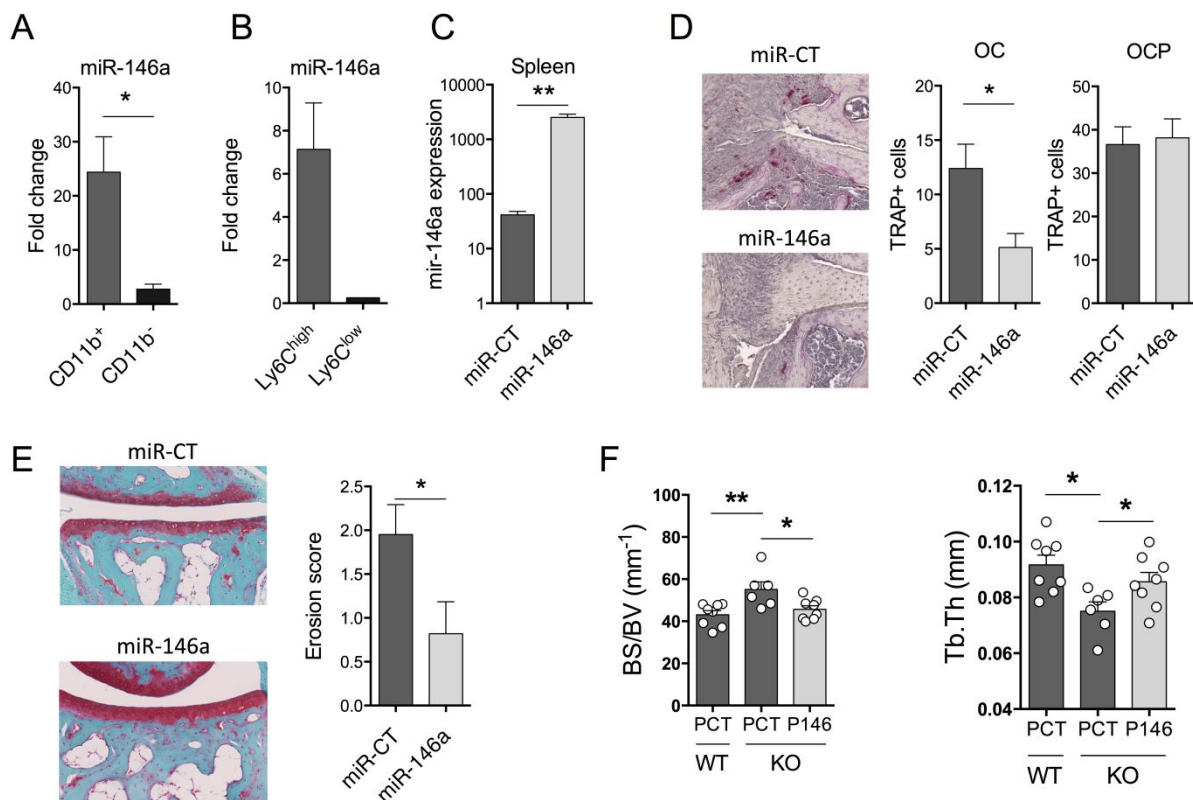


Fig. 5. In vivo delivery of miR-146a mimics to Ly6Chigh monocytes interferes with pathogenic bone erosion during inflammatory arthritis in wild type and knock out mice. The DMAPAP/DOPE cationic liposome was formulated with either miR-146a mimics (miR-146a, grey bars) or non-targeting miRNA mimics (miR-CT, black bars) and injected either only once (B-C) or weekly over a 3-weeks period (A, D-E). Mice were sacrificed either 72 (B-C) or 24 hours (A, D-E) after the last injection. DBA/1 mice were immunized with bovine type II collagen and boosted on day 21. The miR-146a mimic (0.5mg/kg) treatment was initiated on day 18. Fold increase of miR-146a expression in monocytic (CD11b<sup>+</sup>) and non-monocytic (CD11b<sup>-</sup>) populations in spleen of arthritic mice injected with miR-146a mimic-containing lipoplexes compared to miR-CT mimic-injected animals (A). Fold change of miR-146a

expression in splenic Ly6Chigh (black bar) and Ly6Clow (grey bar) monocyte subsets isolated from naive mice injected once with miR-146a mimic-containing lipoplexes compared to miR-CT mimic-injected animals (B). Expression level of miR-146a in splenic Ly6Chigh monocytes following treatment with either miR-146a mimic- (grey bar) or miR-CT mimic- (black bar) containing lipoplexes (C). At euthanasia (D33), knee (D) and ankle (E) joints were collected and processed for histopathological measurements. Tissue sections were processed for TRAP and Hematoxylin stainings. Representative sections are shown (20x magnification). The number of TRAP positive osteoclast precursor cells (OCP) and osteoclasts (OC) was counted at the sites of bone erosion (D). Tissue sections were stained with SafraninO/Fast green for evaluation of bone erosion. Representative sections are shown (20x magnification) and erosion score plotted (E). miR-146a<sup>-/-</sup> (KO) mice were injected i.p. on day 0 and 1 with K/BxN serum (grey bars) to induce arthritis. Mice were injected with miR-146a mimics or miR-CT-containing lipoplexes at day 4, 7 and 9. Micro-computed tomography analysis was performed for 3-dimensional reconstruction of knee joints and quantification of trabecular micro-architecture of proximal femur bone, including the following parameters: bone specific surface (BS/BV, mm<sup>-1</sup>) and trabecular thickness (Tb.Th, mm) (F). Data are presented as mean ± SEM of 1-6 biological replicates of pooled samples (A-C) or of 5-10 individual mice (D-F). Panels D-F refer to one representative experiment out of 2. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 versus controls using Mann-Whitney (A-E), and one-way ANOVA (F) tests.

miR-146a is a master regulator of osteoclast differentiation

Finally, to elucidate the molecular mechanisms responsible for the effect of miR-146a in the osteoclast lineage, we took advantage of its constitutively high expression level in Ly6Clow monocytes and compared genes involved in osteoclast differentiation pathways (<http://pathcards.genecards.org>) with the expression profiling of Ly6Clow monocytes sorted from WT and miR-146a deficient mice (Fig. 6). Among the 90 genes related to osteoclast differentiation, 41 were up-regulated following miR-146a knock down on monocytes, and 9 out of 52 genes are validated as direct targets of miR-146a in the literature (Fig. 6A). Consistent with lower levels of miR-146a in Ly6Chigh than in Ly6Clow monocytes, we found higher expression of RelB, one of the validated miR-146a targets, in Ly6Chigh than in Ly6Clow monocytes (Fig. 6B). Importantly, we found that ectopic miR-146a expression on Ly6Chigh monocytes in arthritic mice reduced RelB transcript levels compared with miR-CT-injected mice (Fig. 6C). Interestingly, TRAF6 mRNA levels did not vary among conditions, indicating that miR-146a/RelB axis might predominate in Ly6Chigh monocytes.



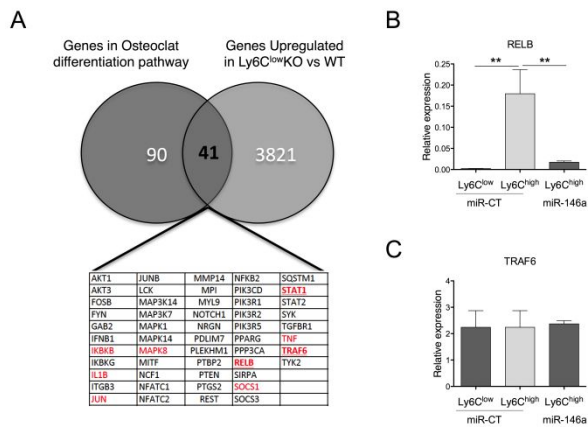


Fig. 6. miR-146a is a master regulator of osteoclastogenesis. Total RNA was extracted from FACS sorted Ly6C<sup>high</sup> or Ly6C<sup>low</sup> blood monocytes isolated from either miR-146a<sup>-/-</sup> (KO) or wild type (WT) mice (pool of 40 mice/group). After reverse transcription, transcriptomic analysis was performed using mouse GeneChip arrays (Affymetrix). Venn diagram illustrates the intersection between genes up regulated in Ly6C<sup>low</sup> monocytes of miR-146a<sup>-/-</sup> mice versus wild type mice and genes in the Osteoclast differentiation Pathway SuperPath (A). The table lists the 41 common osteoclast-specific genes among which 9 were previously validated as direct miR-146a targets (in red). DBA/1 mice were immunized with bovine type II collagen on day 0 and 21, and analyses were performed on day 28. Relative RELB and TRAF6 mRNA expression in Ly6C<sup>high</sup> or Ly6C<sup>low</sup> splenic monocytes isolated from arthritic mice (B). The DMAPAP/DOPE cationic liposome was formulated with either miR-146a mimics (0.5mg/kg) (miR-146a, grey bars) or non-targeting miRNA mimics (miR-CT, black bars) and injected twice on day 23 and 27 (pool of 5 mice/group). Mice were sacrificed 24 hours after the last injection and Ly6C<sup>high</sup> monocytes sorted from pooled spleen (n=2-3 pools of 5 mice/group). Relative RELB and TRAF6 mRNA expression were quantified using RT-qPCR. Data are presented as mean  $\pm$  SEM of 3 experimental replicates (C). \*\* p < 0.01 using one-way ANOVA

## Discussion

Collectively, our results highlight the importance of reduced miR-146a expression in the Ly6Chigh monocyte subset during inflammatory arthritis and that therapeutic delivery of miR-146a mimics to Ly6Chigh monocytes represent a promising treatment option to interfere with pathogenic bone loss (Figure 7).

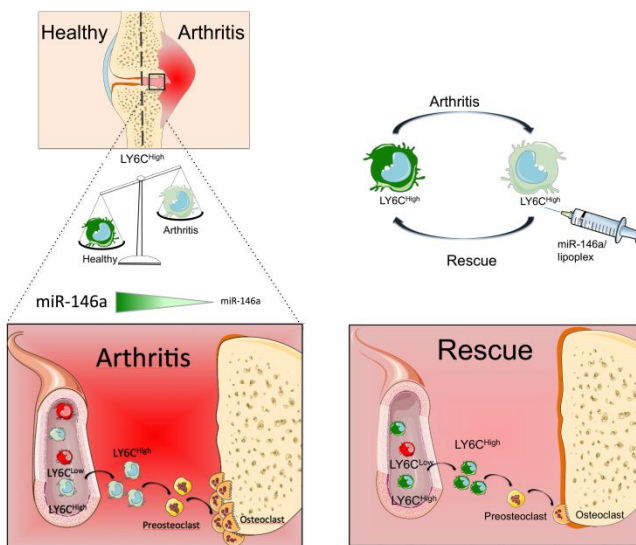


Fig. 7. Targeting Ly6Chigh monocytes in arthritis to over-express an anti-osteoclastogenic gene is an efficient strategy to interfere with bone loss. Arthritis is associated with decreased expression levels of miR-146a in Ly6Chigh monocytes as compared with healthy conditions (light versus dark green cells). Ly6Chigh blood monocytosis accompanying arthritis, together with reduced inhibition of their osteoclastogenic potential, increased frequency of Ly6Chigh monocytes in arthritic joints and their potency to differentiate into osteoclasts, leading to increased bone erosion. Ly6Chigh monocytes can be targeted to deliver therapeutic miRNA mimics and increase miR-146a expression in these osteoclast progenitors. Such therapeutic approach contributes to their decreased differentiation into osteoclasts, thus leading to reduced bone erosion under arthritic conditions.

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic systemic inflammatory disorder affecting joints. Although the etiology of RA remains unknown, several evidences suggest that monocytes are crucial in RA pathogenesis. Their excessive activation and abundance as well as their paracrine effects on other immune cells and resident fibroblasts identify monocytes as local and systemic amplifiers of disease (31). Monocyte numbers correlate with disease severity and with the efficacy of therapies (32-36). The rheumatoid synovium contains activated monocytes/macrophages that express large amount of inflammatory mediators, including IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ , which contribute to synovial cell proliferation, maintenance of an

inflammatory milieu and structural joint damage. Notably, this milieu promotes the development and maintenance of Th17 cells (37) that play a pathogenic role in RA by linking T cell activation and bone resorption (38-40). Finally, CD14<sup>+</sup> monocytes were shown to continuously migrate into the inflamed joints of patients with active RA (41) where they acquire an activated phenotype and specifically promote Th17 differentiation, but not Th1 or Th2 cell responses (42, 43), and perform local antigen-presentation and osteoclastogenesis. Thus, excessive activity of CD14<sup>+</sup> monocytes participates to RA disease progression, contributing to both tissue inflammation and bone destruction. Furthermore, depletion of monocytes upon liposome clodronate infusion ameliorates significantly experimental arthritis severity (44-46).

The discovery of the phenotypic and functional heterogeneity of monocyte subsets triggered an interest to investigate their respective contribution not only under steady state conditions but also under inflammatory conditions. In mouse models of myocardial infarction or muscle lesion, Ly6Chigh monocytes migrate first to the site of inflammation, followed by a second wave of Ly6Clow monocytes able to repair and remodel damaged tissues (47). The orchestration of these waves of monocytes required for myocardial healing is disturbed by blood Ly6Chigh monocytosis in atherosclerotic mice (48). In experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), Ly6Chigh monocytes accumulate in the blood and migrate to the central nervous system (CNS) before disease onset. Their numbers in the circulation is associated with enhanced disease severity, and they differentiate into dendritic cells (DCs) and macrophages in the brain lesions (49). In the present study, we investigated the respective contribution of monocyte subsets in two experimental models of arthritis. Both in the K/BxN serum transfer arthritis model (STA) and in the collagen-induced arthritis (CIA), we observed a blood monocytosis of the Ly6Chigh subset associated with increased disease severity, and accumulation of Ly6Chigh monocytes into the inflamed joints, while the Ly6Clow monocyte frequencies remained unchanged. The dynamic changes that we observed for Ly6Chigh monocytes during arthritis development thus suggest a higher contribution for this subset than for the Ly6Clow subset.

Based on the use of anti-CCR2 antibody (MC-21), previous studies demonstrate the importance of Ly6Chigh monocytes in arthritis. In mouse CIA, the depletion of Gr1+CCR2<sup>+</sup> monocytes in the synovial tissue, peripheral blood, and spleen reduced arthritis severity, cartilage and bone erosion (50). The same antibody strongly reduced the frequency of Ly6Chigh inflammatory monocytes in the STA model, leading to decreased osteoclast formation and bone destruction, without however sizable effect on inflammation (5). Finally, adoptive transfer of Ly6Clow monocytes following complete depletion of both monocyte subsets drives joint inflammation in STA arthritis model (51). Here, we found that enforced expression of miR-146a in Ly6Chigh monocytes is not effective in reducing joint inflammation, neither in STA nor in CIA models. While the contribution of Ly6Chigh monocytes to inflammation still seems debatable, all the reports that monitored structural

damages in arthritis models clearly evidenced a role for Ly6Chigh monocytes in bone erosion. This is further supported by bone morphology studies on CCR2<sup>-/-</sup> mice, which displayed higher bone mass and reduced osteoclast numbers in steady state conditions (52). Whether Ly6Chigh monocytes implication in arthritis bone destruction is mediated by a direct or an indirect effect still remains unclear.

Osteoclasts are large multinucleated cells specialized in bone resorption that derive from myeloid progenitors and increased osteoclastic activity contributes to bone resorption during arthritis. Since CD11b<sup>+</sup> monocytes constitute a source of OCP and lead to bone destruction in experimental arthritis once recruited to the joints, we compared the osteoclastogenic potential of splenic Ly6Chigh with Ly6Clow monocytes. We showed that both subsets display distinct OC differentiation potential, the Ly6Chigh subset being more efficient than the Ly6Clow subset to differentiate into TRAP positive cells. These results are in agreement with previous works performed with mouse bone marrow and peripheral blood precursors (5, 6, 25). Altogether, our findings suggest that, in the context of inflammatory arthritis, the Ly6Chigh monocyte subset represents a candidate cell target for anti-osteoclastogenic strategy design. To identify molecular components that control Ly6Chigh-specific dysfunctions in the context of arthritis, we investigated the contribution of miR-146a. Several miRNAs have been reported deregulated in arthritis, being implicated either in inflammation or bone destruction, the two main features of the disease (53). Among these, miR-146a is interestingly a negative regulator of both immune responses and bone erosion, thus representing a candidate of choice in arthritis (54). Genetic studies clearly demonstrate that miR-146a represents a significant brake on autoimmunity as targeted deletion of this gene resulted in several immune defects and as miR-146a transgenic mice developed spontaneous immune disorders that mimicked human autoimmune lymphoproliferative syndrome (55-57). As observed in the Lyme-induced arthritis model (58), we found that miR-146a deletion significantly aggravates joint inflammation in the STA model, confirming the *in vivo* suppressive role of miR-146a on inflammation. Concerning osteoclastogenesis, previous works suggested a negative regulatory role for miR-146a as it is down regulated in the RAW264.7 cell line during osteoclast differentiation (14) and its enforced expression in human PBMCs inhibited *in vitro* osteoclastogenesis (59). Here, using primary progenitor cells from either mouse bone marrow or spleen, we evidenced an early down-regulation of miR-146a during osteoclastogenesis, an increased *in vitro* osteoclastogenic potential of precursors isolated from miR-146a deficient mice, which was inhibited following miR-146a enforced expression. *In vivo*, miR-146a deletion has however no overt effect on physiological bone remodeling. The negative regulatory role of miR-146a on osteoclastogenesis was only revealed *in vivo* under inflammatory arthritis conditions. Overall, our results suggest a protective role of miR-146a in arthritis pathogenesis, both on inflammation and bone erosion, and suggest that miR-146a may be a molecular target to control bone loss mediated by Ly6Chigh monocytes.

Interestingly, we showed that the expression of miR-146a is down regulated in CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> monocytes of RA patients, as well as in their Ly6Chigh mouse counterparts in the preclinical mouse CIA model. In addition, we identified miR-146a as highly differentially expressed between classical and non-classical monocytes. Our data also suggest that low expression level of miR-146a in Ly6Chigh monocytes is indicative of increased osteoclastogenesis and bone erosion in arthritis. Altogether, the differential expression level of miR-146a between monocyte subsets could be responsible for their different osteoclastic potential. This is reinforced by our transcriptomic data showing that, among genes up-regulated following miR-146a deficiency on monocytes, 41 genes are related to osteoclast differentiation and 8 are validated as direct targets of miR-146a (18, 19). Finally, we showed that miR-146a gain-of-function in Ly6Chigh osteoclast precursors is sufficient to prevent pathological bone loss. Bone resorption of arthritic miR-146a<sup>-/-</sup> mice was reduced to levels comparable to control arthritic miR-146a<sup>+/+</sup> mice, and collagen-induced arthritic animals were protected from bone loss by inhibiting osteoclastic differentiation of precursors. Using a Ly6Chigh subset-specific approach, we recapitulate the benefit on CIA joint destruction observed by Nakasa et al. when using a global systemic over expression of miR-146a (59). Interestingly, under arthritic conditions, miR-146a does not seem to control Ly6Chigh expansion and the amplitude of cytokine production as it was previously reported upon bacterial infection (18) since no effect of miR-146a gain-of-function in Ly6Chigh was observed on arthritis severity, Ly6Chigh frequencies or cytokine secretion (data not shown).

Low level of miR-146a expression in Ly6Chigh monocytes from arthritic individuals is surprising since miR-146a expression in Ly6Chigh monocytes was reported to be induced by TNF or bacterial challenges, reaching levels matching those in Ly6Clow monocytes (18). Our findings suggest that Ly6Chigh or CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> monocytes are unable to raise miR-146a expression in response to an inflammatory arthritic environment. The documented break of tolerance described in arthritis, associated with the known role of miR-146a in the monocyte-specific molecular reprogramming process found in endotoxin tolerance (60, 61), might explain this apparent paradox. Indeed, during endotoxin tolerance miR-146a expression is up regulated and inhibits cytokine production to prevent deleterious effect of an excessive and prolonged activation of monocytes. In line with this, it has been speculated that the negative regulation of NF- $\kappa$ B signaling cascade by miR-146a is defective in RA patients, leading to high and prolonged TNF- $\alpha$  production (62).

The roles of miRNAs in osteoclastogenesis remain poorly studied while negative regulation of osteoclastogenesis is critical to restore bone homeostasis in arthritis (16). In addition, how miRNAs are altered along breakdown of tolerance in RA at cellular level is still unclear. Our finding that miR-146a deletion in precursors elevates osteoclast differentiation, together with the reduced expression level of miR-146a in the major precursor cell population of osteoclasts Ly6Chigh monocytes, prompted us to investigate whether therapeutic delivery of miR-146a mimics to Ly6Chigh monocytes can attenuate bone loss during inflammatory arthritis. Our work here not only investigated the regulatory role of miR-146a in osteoclastogenesis in the context of monocytes' functional heterogeneity using various pathological conditions, but also

demonstrated miR-146a potential as a novel therapeutic strategy to interfere with bone destruction in RA. This work also extends the current knowledge on Ly6Chigh monocytes, highlighting their predominant role in arthritis as osteoclast precursors responsible for pathological bone resorption, and suggests that analysis of miR-146a expression levels, specifically in Ly6Chigh subset, can be used as a bone erosive biomarker in arthritis.

## Materials and Methods

### Ethics statement

DBA/1 mice were obtained from Harlan laboratories and bred in our animal facility. Wild-type (WT) C57BL/6 and miR146a-KO (B6(FVB)-Mir146tm1.1Bal/J) mice were purchased from Charles River (France) and were bred in our facility. Experimental groups were obtained by crossing heterozygous mice to obtain WT and miR146a-KO littermates with the same genetic background. Animals were maintained in specific pathogen free conditions. Experiments were performed in accordance with European guidelines and approved by the Ethics Committee for Animal Research of Languedoc-Roussillon (00920.01) and French health authorities (C34-172-36). For RA patients and healthy controls, informed consents were provided in accordance with procedures approved by the local human ethics committee (Comité de Protection des Personnes Sud Méditerranée IV: ID RCB 2008-A01087-48). Fresh peripheral blood was obtained from healthy donors with no history of autoimmune diseases and from RA patients with a 28-joint-count Disease Activity Score (DAS28)  $\geq 5.1$ .

### Flow cytometry and cell sorting

The following monoclonal antibodies were used for mouse experiments: From BD Biosciences: FITC- anti CD43 (Clone S7), PE-anti CD11b (Clone M1/70), PercPCy5.5-anti CD11c (Clone HL3), PE-Cy7-anti Ly6C (Clone AL-21), APC-Cy7-anti Ly6G (Clone 1A8), V500-anti CD11b (Clone M1/70). From eBiosciences: APC-anti CD115 (AFS98) and PE-anti F4/80 (BM8). From BioLegend: Ly6G, CD90.2 (30-H12), B220 (RA3-6B2), CD49b (DX5), NK1.1 (PK136) or NKp46 (29A1.4), Ter-119 (TER-119) biotinylated antibody conjugated with APC-streptavidine (BD Biosciences) for lineage cocktail. Identification of mouse subset monocytes consisted of gating on lin-, CD11clow/neg, CD11bhigh, CD115high, CD43high/low, Ly6Chigh/low. Antibodies for human PBMCs were HLA-DR/FITC (clone TU36), CD2/PE (clone RPA-2.10), CD56/PE (clone MY31), CD19/PE (clone HIB19), CD14/PE-Cy7 (clone M5E2), CD16/APC (clone B73.1) (BD Biosciences). Identification of human subset monocytes consisted of gating on lin/PE-, HLA-DRhigh, CD14 high/low, and CD16high/low. For dead cells depletion, DAPI was used (Sigma-Aldrich).

For mice studies, blood and spleen samples were treated for 4 min with RBC and ACT red blood cell lysis buffer, respectively. For human blood samples, PBMCs were prepared on a Ficoll-Hypaque density gradient (Amersham). Then, the antibody staining was performed according to the manufacturer's instructions. Cells were FACS sorted on a BD FACSAria Cell Sorting System (BD Biosciences) with  $> 97\%$  purity by the Montpellier RIO imaging –

IGMM - Cytometry platform. Splenic CD11b cells were isolated using the CD11b Microbeads (Miltenyi Biotec). Blood CD14<sup>+</sup> monocytes were negatively selected (purity >97%) from PBMCs by magnetic separation (Dynabeads Untouched Human Monocytes, Invitrogen) isolated from healthy individuals or rheumatoid arthritis (RA) patients, according to the manufacturer's instructions.

#### Induction of arthritis models and clinical evaluation

The collagen-induced arthritis (CIA) mouse model was performed on 9 week-old DBA/1 male mice. CIA was induced as previously described (63) using bovine type II collagen from MD Biosciences (Zurich, Switzerland), acetic acid from Sigma-Aldrich, and Freund's adjuvants from Pierce (Bezons, France). Mice were injected intravenously from the indicated starting day, either once or weekly during 3 weeks, with 0.5mg/Kg of miR-146a mimics (miRIDIAN mmu-miR-146a, Fermentas GmbH, Germany) formulated as lipoplexes with the DMAPAP/DOPE cationic liposome as previously described (30). Controls were injected with lipoplexes containing irrelevant miRNA mimics. The serum transfer arthritis model (STA) was performed on 7-weeks-old B6 male mice injected intraperitoneally (i.p.) twice with 150 $\mu$ l of arthritogenic serum obtained from K/BxN mice (D0 and D1). Non-arthritic control mice received i.p. injections of PBS. For both models, paw thickness was measured with a Mitutoyo micrometer (Sigma-Aldrich) thrice a week. At euthanasia, paws and knees were fixed in PBS-PFA 4%, decalcified with PBS-EDTA 14%, and embedded in paraffin. 5 $\mu$ m paraffin paws sections were stained with SafraninO/Fast green. Erosion was qualitatively evaluated blindly and scored as previously described (63). 5 $\mu$ m paraffin knee sections were de-paraffined (xylene), rehydrated and stained with TRAP staining buffer for 20 minutes at 37°C, and co-stained with hematoxylin. Stained sections were scanned using an NDP Nanozoomer HT (Hamamatsu). TRAP positive osteoclast precursors and mature osteoclasts were visually counted in the pannus. For cell isolation from arthritic joint tissue, hind and front paws were cut open and digested with 1 mg/mL of Collagenase D (Roche) for 1 hour at 37°C. Cells were then filtered and used for FACS analyses.

#### Experimental osteoporosis model

After body weight measurements, 8-weeks old C57BL/6 female mice were anesthetized and underwent bilateral ovariectomy via the dorsal approach. Sham-operated mice had the ovaries exteriorized but not removed. Uterine weight was determined at sacrifice to verify the successful removal of the ovaries. Mice were subjected to microtomography analysis until day 16.

#### Osteoclast differentiation

FACS sorted Ly6Chigh or Ly6Clow and microbeads sorted splenic CD11b<sup>+</sup> cells were grown in  $\alpha$ -MEM containing 10% heat-inactivated FCS (Hyclone) with 2 mM glutamine, 40 ng/ml RANKL and 15 ng/ml M-CSF (Miltenyi Biotec), at the density of 5 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/well (24-well plate). For bone marrow-derived progenitor cells, bone marrow was flushed and cultured in  $\alpha$ -MEM containing 10% heat-inactivated FCS (Hyclone) for 24 hours. Non-adherent cells were collected and cultured in complete medium, supplemented with 15 ng/ml M-CSF to induce

BMDM (Bone Marrow Derived Macrophages) differentiation. After 48 hours, medium was changed and replaced by complete medium supplemented with 40 ng/ml RANKL and 15 ng/ml M-CSF and replaced every two day for extended time (Miltenyi Biotec). TRAP staining or RNA extraction were performed at the indicated time.

For TRAP staining, cells were fixed with PBS-PFA 4% for 10 minutes, then permeabilized 1 minute with 1:1 ethanol and acetone mixture, and staining for Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) for additional 20 minutes. TRAP staining buffer contained 0.1 mg/ml naphthol AS-MX phosphate and 0.6 mg/ml fast red violet LB salt in 0.1 M sodium acetate buffer pH 5 containing 50 mM sodium tartrate (64). Nuclei were stained with DAPI dye. Cells were observed and counted automatically using a Cellomics Arrayscan VTI (Thermo Scientific, Saint Herblain, France). TRAP<sup>+</sup> cells with more than three nuclei were considered as mature osteoclasts. For functional analysis of bone resorption, cells were cultured on Osteo Assay Surface plates for 7 days (Corning) and then removed by bleached. The surface of mineralized matrix degraded was quantified using image J software and relative resorption area was expressed as a percentage of total surfaces analyzed.

#### Quantitative Real-time PCR

Human and mouse miR-146a expression levels as well as various mRNA levels were independently analysed using the Taqman microRNA or gene expression assays (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Housekeeping genes used for normalization were RNU48 for human miR-146a, snoRNU6B and snoRNU135 for mouse miR-146a, and GAPDH for osteoclast genes. Analyses were performed using Rotor-gene Q software (QIAGEN). Relative gene expression was calculated using the comparative threshold cycle (CT) method.

#### Microarray hybridization and data analysis

Total RNA of Ly6Clow monocytes isolated from blood samples of miR-146a<sup>-/-</sup> mice or control littermates were extracted using RNeasy mini kit (Qiagen). Quality control was ensured with Bioanalyser (Agilent Technologies) and RNA quantification with NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies). The generation of cDNA, IVT express amplification, sample hybridization (using Affymetrix MG430\_2 pangenomic arrays) and scanning with a GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix) were performed as previously described (65). We compared the gene expression profiles to obtain a list of genes up regulated in KO Ly6Clow monocyte. For identification of new potential miR-146a-target mRNAs associated with osteoclast differentiation and function, we used PathCards software for selection of genes specific for osteoclast differentiation pathway (<http://pathcards.genecards.org/pathway/4141>) and miRTarBase for selection of experimentally validated miR-146a targets. We used the VENNY interactive tool to compare both lists and the Venn Diagrams from Oliveros, J.C. (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) to obtain common genes between osteoclast differentiation pathways, genes up-regulated in KO ly6Clow monocytes, and genes experimentally validated as direct miR-146a targets in previous studies.



### In vivo bone histophotometric analysis

Micro-computed tomography was performed to evaluate bone volume and architecture using the Skyscan 1176 microCT system on living mice (Bruker microCT, Belgium). At indicated time, mice legs were scanned using the following settings: isotropic voxels size of 18  $\mu\text{m}$ , voltage of 50kV, current of 500 mA, 0.5-mm aluminium filter, 180 degrees with a 0.7-degree rotation step and a 210-msec exposure time. Data were reconstructed using NRecon software (Bruker microCT, Belgium). Quantification of trabecular thickness (Tb.Th, mm), of bone volume (BV/TV, %) and of bone specific surface (BS/BV,  $\text{mm}^{-1}$ ) was performed on the trabecular region of each femur (CT Analyser software, Bruker microCT, Belgium). Three-D reconstructions of paws were obtained with CTvox software (Bruker microCT, Belgium).

### Statistical analyses

GraphPad prism software was used to perform unpaired Mann-Whitney or paired Wilcoxon non-parametric tests according to the experimental design for two groups comparison. One-way ANOVA followed by Fisher's post-test analysis was performed for statistical comparisons of more than two groups. Two-way repeated measures ANOVA followed by turkey's post-test analysis was performed for kinetic comparisons. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

### References and Notes

1. C. Auffray, M. H. Sieweke, F. Geissmann, Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27, 669-692 (2009).
2. M. A. Ingersoll, A. M. Platt, S. Potteaux, G. J. Randolph, Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. *Trends Immunol* 32, 470-477 (2011).
3. S. Gordon, P. R. Taylor, Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5, 953-964 (2005).
4. J. Cros et al., Human CD14<sup>dim</sup> monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33, 375-386 (2010).
5. M. Seeling et al., Inflammatory monocytes and Fc $\gamma$  receptor IV on osteoclasts are critical for bone destruction during inflammatory arthritis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 10729-10734 (2013).
6. C. E. Jacome-Galarza, S. K. Lee, J. A. Lorenzo, H. L. Aguila, Identification, characterization, and isolation of a common progenitor for osteoclasts, macrophages, and dendritic cells from murine bone marrow and periphery. *J Bone Miner Res* 28, 1203-1213 (2013).
7. F. K. Swirski et al., Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 325, 612-616 (2009).
8. B. Zhu et al., CD11b<sup>+</sup>Ly-6C(hi) suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 179, 5228-5237 (2007).
9. F. Leuschner et al., Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extramedullary monocytogenesis. *J Exp Med* 209, 123-137 (2012).

10. J. R. Grainger et al., Inflammatory monocytes regulate pathologic responses to commensals during acute gastrointestinal infection. *Nat Med* 19, 713-721 (2013).
11. C. Shi, E. G. Pamer, Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 11, 762-774 (2011).
12. M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, W. Lendeckel, T. Tuschl, Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853-858 (2001).
13. W. Filipowicz, S. N. Bhattacharyya, N. Sonenberg, Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9, 102-114 (2008).
14. T. Kagiya, S. Nakamura, Expression profiling of microRNAs in RAW264.7 cells treated with a combination of tumor necrosis factor alpha and RANKL during osteoclast differentiation. *J Periodontal Res* 48, 373-385 (2013).
15. T. Franceschetti, C. B. Kessler, S. K. Lee, A. M. Delany, miR-29 promotes murine osteoclastogenesis by regulating osteoclast commitment and migration. *J Biol Chem* 288, 33347-33360 (2013).
16. J. Y. Krzeszinski et al., miR-34a blocks osteoporosis and bone metastasis by inhibiting osteoclastogenesis and Tgif2. *Nature* 512, 431-435 (2014).
17. L. de la Rica et al., NF- $\kappa$ B-direct activation of microRNAs with repressive effects on monocyte-specific genes is critical for osteoclast differentiation. *Genome Biol* 16, 2 (2015).
18. M. Etzrodt et al., Regulation of monocyte functional heterogeneity by miR-146a and Relb. *Cell Rep* 1, 317-324 (2012).
19. K. D. Taganov, M. P. Boldin, K. J. Chang, D. Baltimore, NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12481-12486 (2006).
20. T. Nakasa et al., Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum* 58, 1284-1292 (2008).
21. K. Murata et al., Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 12, R86 (2010).
22. J. Stanczyk et al., Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 58, 1001-1009 (2008).
23. T. Nakasa, H. Shibuya, Y. Nagata, T. Niimoto, M. Ochi, The inhibitory effect of microRNA-146a expression on bone destruction in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 63, 1582-1590 (2011).
24. C. Jakubzick et al., Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity* 39, 599-610 (2013).
25. B. De Klerck et al., Enhanced osteoclast development in collagen-induced arthritis in interferon-gamma receptor knock-out mice as related to increased splenic CD11b+ myelopoiesis. *Arthritis Res Ther* 6, R220-231 (2004).
26. P. Monach et al., The K/BxN mouse model of inflammatory arthritis: theory and practice. *Methods Mol Med* 136, 269-282 (2007).
27. K. Redlich et al., Osteoclasts are essential for TNF-alpha-mediated joint destruction. *J Clin Invest* 110, 1419-1427 (2002).
28. G. Kollias et al., Animal models for arthritis: innovative tools for prevention and treatment. *Ann Rheum Dis* 70, 1357-1362 (2011).

29. L. Bevaart, M. J. Vervoordeldonk, P. P. Tak, Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: how does it relate to rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum* 62, 2192-2205 (2010).
30. J. Pr sumey et al., Nicotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin expression by inflammatory monocytes mediates arthritis pathogenesis. *Ann Rheum Dis* 72, 1717-1724 (2013).
31. R. W. Kinne, B. Stuhlm ller, G. R. Burmester, Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Macrophages. *Arthritis Res Ther* 9, 224 (2007).
32. J. J. Haringman et al., Synovial tissue macrophages: a sensitive biomarker for response to treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 64, 834-838 (2005).
33. P. P. Tak, B. Bresnihan, The pathogenesis and prevention of joint damage in rheumatoid arthritis: advances from synovial biopsy and tissue analysis. *Arthritis Rheum* 43, 2619-2633 (2000).
34. L. Chara et al., Monocyte populations as markers of response to adalimumab plus MTX in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 14, R175 (2012).
35. P. P. Tak, J. R. Kalden, Advances in rheumatology: new targeted therapeutics. *Arthritis Res Ther* 13 Suppl 1, S5 (2011).
36. J. A. Hamilton, P. P. Tak, The dynamics of macrophage lineage populations in inflammatory and autoimmune diseases. *Arthritis Rheum* 60, 1210-1221 (2009).
37. A. Kimura, T. Naka, T. Kishimoto, IL-6-dependent and -independent pathways in the development of interleukin 17-producing T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 12099-12104 (2007).
38. K. Sato et al., Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 203, 2673-2682 (2006).
39. S. Sarkar, L. A. Cooney, D. A. Fox, The role of T helper type 17 cells in inflammatory arthritis. *Clin Exp Immunol* 159, 225-237 (2010).
40. L. A. Tesmer, S. K. Lundy, S. Sarkar, D. A. Fox, Th17 cells in human disease. *Immunol Rev* 223, 87-113 (2008).
41. R. M. Thurlings et al., Monocyte scintigraphy in rheumatoid arthritis: the dynamics of monocyte migration in immune-mediated inflammatory disease. *PLoS One* 4, e7865 (2009).
42. H. G. Evans et al., In vivo activated monocytes from the site of inflammation in humans specifically promote Th17 responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 6232-6237 (2009).
43. P. J. Egan, A. van Nieuwenhuijze, I. K. Campbell, I. P. Wicks, Promotion of the local differentiation of murine Th17 cells by synovial macrophages during acute inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 58, 3720-3729 (2008).
44. P. J. Richards, B. D. Williams, A. S. Williams, Suppression of chronic streptococcal cell wall-induced arthritis in Lewis rats by liposomal clodronate. *Rheumatology (Oxford)* 40, 978-987 (2001).
45. S. Solomon, N. Rajasekaran, E. Jeisy-Walder, S. B. Snapper, H. Illges, A crucial role for macrophages in the pathology of K/B x N serum-induced arthritis. *Eur J Immunol* 35, 3064-3073 (2005).

46. A. Ceponis et al., Effects of low-dose, noncytotoxic, intraarticular liposomal clodronate on development of erosions and proteoglycan loss in established antigen-induced arthritis in rabbits. *Arthritis Rheum* 44, 1908-1916 (2001).
47. M. Nahrendorf et al., The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 204, 3037-3047 (2007).
48. P. Panizzi et al., Impaired infarct healing in atherosclerotic mice with Ly-6C(hi) monocytosis. *J Am Coll Cardiol* 55, 1629-1638 (2010).
49. I. L. King, T. L. Dickendesher, B. M. Segal, Circulating Ly-6C<sup>+</sup> myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease. *Blood* 113, 3190-3197 (2009).
50. H. Brühl et al., Targeting of Gr-1<sup>+</sup>,CCR2<sup>+</sup> monocytes in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 56, 2975-2985 (2007).
51. A. V. Misharin et al., Nonclassical Ly6C(-) Monocytes Drive the Development of Inflammatory Arthritis in Mice. *Cell Rep* 9, 591-604 (2014).
52. N. B. Binder et al., Estrogen-dependent and C-C chemokine receptor-2-dependent pathways determine osteoclast behavior in osteoporosis. *Nat Med* 15, 417-424 (2009).
53. I. Duroux-Richard, C. Jorgensen, F. Apparailly, What do microRNAs mean for rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum* 64, 11-20 (2012).
54. M. Ammari, C. Jorgensen, F. Apparailly, Impact of microRNAs on the understanding and treatment of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 25, 225-233 (2013).
55. M. P. Boldin et al., miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *J Exp Med* 208, 1189-1201 (2011).
56. Q. Guo et al., Forced miR-146a expression causes autoimmune lymphoproliferative syndrome in mice via downregulation of Fas in germinal center B cells. *Blood* 121, 4875-4883 (2013).
57. J. L. Zhao, D. S. Rao, R. M. O'Connell, Y. Garcia-Flores, D. Baltimore, MicroRNA-146a acts as a guardian of the quality and longevity of hematopoietic stem cells in mice. *Elife* 2, e00537 (2013).
58. R. B. Lochhead et al., MicroRNA-146a provides feedback regulation of lyme arthritis but not carditis during infection with *Borrelia burgdorferi*. *PLoS Pathog* 10, e1004212 (2014).
59. T. Nakasa, H. Shibuya, Y. Nagata, T. Niimoto, M. Ochi, The inhibitory effect of microRNA-146 expression on bone destruction in arthritis. *Arthritis Rheum*, (2011).
60. M. A. Nahid, K. M. Pauley, M. Satoh, E. K. Chan, miR-146a is critical for endotoxin-induced tolerance: IMPLICATION IN INNATE IMMUNITY. *J Biol Chem* 284, 34590-34599 (2009).
61. M. El Gazzar, A. Church, T. Liu, C. E. McCall, MicroRNA-146a regulates both transcription silencing and translation disruption of TNF- $\alpha$  during TLR4-induced gene reprogramming. *J Leukoc Biol*, (2011).
62. K. M. Pauley et al., Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 10, R101 (2008).
63. L. M. Charbonnier et al., Adoptive transfer of IL-10-secreting CD4<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup> regulatory T cells suppresses ongoing arthritis. *J Autoimmun* 34, 390-399 (2010).

64. H. Brazier et al., Expression profile of RhoGTPases and RhoGEFs during RANKL-stimulated osteoclastogenesis: identification of essential genes in osteoclasts. *J Bone Miner Res* 21, 1387-1398 (2006).
65. R. Biesen et al., Sialic acid-binding Ig-like lectin 1 expression in inflammatory and resident monocytes is a potential biomarker for monitoring disease activity and success of therapy in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 58, 1136-1145 (2008).

Acknowledgments: We thank Gaelle Cres, Céline Bouclier for technical help on ovariectomy experiments, Rita Vicente and Julie Quentin for technical help during euthanasia, Anne Blangy and Claudine Blin for fruitful discussion on osteoclast biology. Expert technical assistance was provided for histology sections and stainings by the Technology facilities of the Biocampus Montpellier (RHEM), for imaging and cell sorting by the Montpellier RIO imaging –IGMM - Cytometry platform (MRI), for Affymetrix transcriptomic analyses by genomics analyses (MGX), for animal husbandry and functional investigations by Montpellier animal facility network (RAM), as well as for  $\mu$ CT scanner by the National platform eCellFrance.

Funding: This work was funded by INSERM (Institut National de la Santé et Recherche Médicale), the University of Montpellier, the Arthritis Fondation Courtin pour la Recherche sur les Rhumatismes Inflammatoires Chroniques, the European union (BeTheCure IMI 2nd call topic 6, contract no 115142), and the Fondation pour la Recherche Médicale.

#### Supplementary Materials

The first page should include a complete list of the Supplementary Materials, including those that are part of the Supplementary Materials Word file and any additional files that cannot be assembled as part of a Word file.

Include the text and files of the Supplementary Materials in a single Word .docx file where possible.

Supplementary figures should have legends directly below the figure.

The Supplementary Materials may cite references, but they must be listed only in the main references and notes list. For references cited in both the main text and Supplementary Materials, use the reference numbering from the main text reference list. For references cited only in the Supplementary Materials, add these to the main text reference list after the last reference cited in the main text (for example, if there are 25 references cited in the main text and there are 3 additional references cited in the Supplementary Materials, references 1-25 will be the main text citations and references 26-28 will be those only cited in the Supplementary Materials).

Items appropriate to include in the Supplementary Materials single Word .docx file include:

Additional author notes: For example, a complete list of group authors.

Supplementary text

Figures S1-S# (with the appropriate legend on the same page as the figure)

Tables S1-S#

Captions for additional files that cannot be embedded into the Word .docx file, but that are included with the submission. Examples include:

Movies S1-S#

Audio Files S1-S#

External Databases S1-S#

Data files S1-S#

**Manuscript 3:**

## A microRNA-146a/TRAF6 axis governs fibroblast activation and joint pathology in arthritis

Victoria Saferding<sup>1</sup>, Antonia Puchner<sup>1</sup>, Eliana Goncalves-Alves<sup>1</sup>, Melanie Hofmann<sup>1</sup>, Michael Bonelli<sup>1</sup>, Julia Brunner<sup>2</sup>, Emine Sahin<sup>2</sup>, Birgit Niederreiter<sup>1</sup>, Silvia Hayer<sup>1</sup>, Hans P. Kiener<sup>1</sup>, Elisa Einwallner<sup>3</sup>, **Ramzi Nehmar**<sup>4</sup>, Raphael Carapito<sup>4</sup>, Philippe Georgel<sup>4</sup>, Marije M. Koenders<sup>5</sup>, Mark Boldin<sup>6</sup>, Gernot Schabbauer<sup>2</sup>, Mariola Kurowska-Stolarska<sup>7</sup>, Günter Steiner<sup>1,8</sup>, Josef S. Smolen<sup>1</sup>, Kurt Redlich<sup>1</sup> and Stephan Blüml<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Division of Rheumatology, Internal Medicine III, Medical University of Vienna, Austria.

<sup>2</sup> Institute for Physiology, Center for Physiology and Pharmacology, Medical University Vienna, A-1090 Vienna, Austria.

<sup>3</sup> Department of Laboratory Medicine, Medical University of Vienna, Vienna, Austria.

<sup>4</sup> INSERM UMR\_S 1109, Fédération de Médecine Translationnelle (FMTS), Université de Strasbourg, Centre de Recherche en Immunologie et Hématologie, 1, Place de l'Hôpital 67085 Strasbourg Cedex France

<sup>5</sup> Radboud University Nijmegen Medical Center, Nijmegen, The Netherlands

<sup>6</sup> Department of Molecular and Cellular Biology, Beckman Research Institute, City of Hope, Duarte, Calif.

<sup>7</sup> Institute of Infection, Immunity and Inflammation, College of Medical, Veterinary and Life Sciences, University of Glasgow, Glasgow G12 8TA, United Kingdom

<sup>8</sup> Cluster of arthritis and Rehabilitation, Ludwig Boltzmann Society, Vienna

Address correspondence to:

Stephan Blüml, MD; Division of Rheumatology, Internal Medicine III, Medical University of Vienna, Austria. Währinger Gürtel 18-20, 1090 Vienna. Tel: +431404004301, Fax: +431404004306.

Email: [stephan.blueml@meduniwien.ac.at](mailto:stephan.blueml@meduniwien.ac.at)

The authors have declared that no conflict of interest exists

**Abstract:**

MicroRNAs (miRs) are emerging key players controlling various biological processes. However, how specific miRs affect systemic inflammatory diseases is still elusive. In this study we report, that miR-146a controls chronic inflammatory arthritis by regulating the pathogenicity of synovial fibroblasts during the course of arthritis. MiR-146a deficiency leads to deregulation of TRAF6, leading to enhanced proliferation of synovial fibroblasts *in vitro* and *in vivo*. Moreover loss of miR-146a shifts the metabolic state of fibroblasts towards glycolysis and augments the ability of fibroblast like synoviocytes (FLS) to support the generation of osteoclasts by controlling the balance of osteoclastogenic regulatory factors RANKL and OPG. This in turn leads to enhanced synovitis, osteoclast generation and bone destruction in TNF-driven arthritis. Therefore, loss of miR-146a increases local bone destruction in chronic inflammatory arthritis due to increased local activation of mesenchymal cells, which in turn facilitate synovial inflammation and osteoclast-mediated inflammatory bone damage. Our findings show a crucial role of miR-146a/TRAF6 axis in the local control of joint pathology, by controlling the pathogenicity of synovial fibroblasts in arthritis.

**Introduction:**

Inflammatory forms of arthritis, such as rheumatoid arthritis (RA) or psoriatic arthritis (PsA), are systemic autoimmune disease characterized by synovial infiltration of inflammatory cells, leading to clinical symptoms such as tender and swollen joints [1-5]. The local inflammatory milieu of the joint supports the development of bone damage by specifically equipped cells, namely osteoclasts, which are multinucleated cells derived from hematopoietic monocytic precursors and the only known cell type capable of bone resorption [1, 6]. Although intensely studied, the mechanisms controlling joint inflammation and subsequent osteoclastogenesis are yet incompletely understood. The need for a better understanding of the pathogenesis of these diseases is highlighted by the fact that in spite of a steadily growing arsenal of therapies still up to 50 percent of patients with RA or PsA are not responding well to current treatment regimens [7, 8].

Micro RNAs (miRs) are non-coding regulatory RNAs that have been shown to be important in the regulation of many aspects of biology, including cancer development and immunity [9-12]. MicroRNAs regulate gene expression at a post transcriptional level by translational



repression or degradation of target gene mRNA [11, 13]. Originally thought to be important for fine tuning of cellular responses, the generation of mice lacking specific microRNAs has demonstrated very specific functions of certain microRNAs [14-16]. MiRs have been implicated in the pathogenesis of systemic autoimmune diseases including RA, although the *in vivo* relevance of individual microRNAs, also due to their steadily increasing numbers, remains largely unknown [17-20].

MiR-146a is mainly expressed in immune cells of the innate and adaptive immune system and it is induced during their activation or maturation facilitated through activation of NF- $\kappa$ B wherefore the miR-146a promoter comprises binding sites. Functionally miR-146a regulates inflammatory responses in macrophages as well as the resolution of T cell responses and the maintenance of immunological tolerance [16, 21-23].

MiR-146a expression has been demonstrated to be differentially regulated in patients with RA compared to healthy controls, furthermore using agonistic miR-146a as a therapeutic agent in a commonly used disease model of arthritis, the collagen induced arthritis, revealed reduction of joint damage, by decreasing the capacity for osteoclastogenic differentiation of myeloid cells [24-29]. Besides by the use of *Borrelia burgdorferi* to induce Lyme arthritis it was shown that miR-146a is an important regulator of the proinflammatory NF- $\kappa$ B induced cytokines IL-6 and IL-1 $\beta$ , both playing an important role in human RA [30]. However, it is still not clear if or how miR-146a regulates inflammatory arthritis and beyond that which cell type is responsible for the increased activation of bone resorbing cells and the proinflammatory milieu in the joint of miR-146a deficient animals.

### **Materials and methods:**

#### **Mice:**

Breeding pairs of miR-146a<sup>-/-</sup> and miR-146a<sup>+/+</sup> littermates (B6.(FVB)-MIR146<sup>TM1</sup>.1BAL/J) mice were provided by Mark Boldin/David Baltimore. These mice were crossed into Tg197 human TNF transgenic mice (hTNFtg; genetic background C57BL6;[31]) to obtain miR-146a<sup>-/-</sup>/hTNFtg mice. All data were generated from littermates.

#### **Antibodies and reagents:**

The following antibodies were used: CD11c (Clone: HL3) (Armenian hamster anti-mouse; BD Pharmingen); CD11b (Clone: M1/70) (rat anti-mouse; BD Pharmingen); CD11b (Clone:

M1/70) (rat anti-mouse; eBioscience). The Flow Cytomix Pro assay for IL-6 and IL1- $\beta$  were obtained from Bender Medsystems, used in accordance with the manufacturer's protocol.

Arthritis disease model:

For the human TNF alpha transgenic mouse model of arthritis hTNFtg mice were crossed with miR-146a<sup>-/-</sup> mice.

Histological analysis was performed as described [32].

Immunohistochemistry:

Rat monoclonal F4/80 (Serotec; diluted 1:200) and polyclonal rabbit anti Ki-67 (Abcam; diluted 1:100) were used. To quantify the percentage of F4/80 or Ki-67 positive cells, staining intensity of F4/80 or Ki-67 was analysed by tissue cytometry using HistoQuest (Tissuegnostics).

Assessment of Ki-67 production in Ki-67 stained sections of tarsal joints, was done using a semi quantitative scoring system, ranging from 0 to 3 (0= no colouring detectable, 1=brown colouring on one or two spots, 2=brown colouring on more than two spots, 3=brown colouring of the whole section) .

Cell culture:

Osteoclast generation was performed as described [33].

For in vitro fibroblasts and co-culture assays, fibroblasts were isolated from hind paws of wt or miR-146a<sup>-/-</sup> mice as described [40]. Fibroblasts were seeded at a density of  $1 \times 10^5$ /ml and proliferation was assessed by <sup>3</sup>H-Thymidine incorporation after another 2-5 days of incubation. For co-culture after 24 hours of fibroblast adherence, macrophages were added to the culture and stimulated with 10ng/ml IL-1 $\beta$  [32].

Transfection:

Transfection of fibroblasts with either TRAF6 or control siRNA (Dharmacon) was done as described (Rosner et al. 2010).

Cell metabolism:

The oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) of cultured synovial fibroblasts were analysed with an XF-24 Extracellular Flux Analyser (Seahorse Bioscience).

Micromass:

Micromass cultures using mouse synovial fibroblasts were performed as previously described [34]. Followed by histological analysis of Ki-67 expression (see immunohistochemistry).

RNA Sequencing

Total RNA was prepared from approximately 1 million cells by using mirVana miRNA Isolation Kit (AM1560, ABI). 200 ng of total RNA was subsequently used to prepare RNA-seq library by using TruSeq SR RNA sample prep kit (FC-122-1001, Illumina) by following manufacturer's protocol. The libraries were sequenced for 50 cycles (single read) with a HiSeq 2000 (Illumina). Raw sequencing data were processed with CASAVA 1.8.2 to generate FastQ files. Sequence reads were mapped onto the mouse genome build mm9 using TopHat 2.0. Gene expression values (RPKM, reads per kilobase exon per million mapped reads) were calculated with Cufflinks 2.0.

Generation of radiation chimeras was done as described [32].

MiRNA quantitative RT-PCR:

Micro RNA was isolated using miRNeasy Mini Kit (Qiagen). MiR-146a expression was measured using TaqMan miRNA Assays hsa-miR-146a (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instruction using the Rotor-Gene Q PCR cyclers (Qiagen). U6snRNA (miRNA assay U6 snRNA Applied Biosystems) was used as internal control. Relative expression of miR-146a was calculated by the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method.

Messenger RNA (mRNA) quantitative RT-PCR:

Total RNA was isolated using RNeasy mini kit (Qiagen). CDNA was prepared using Omniscript RT kit (Qiagen), followed by SYBR Green-based quantitative PCR (Roche Molecular Biochemicals) using the Light cycler 480 (Roche Molecular Biochemicals). The expression of genes of interest was normalized to GAPDH. The relative expression of the mRNA of the gene of interest was calculated by the  $2\Delta\Delta CT$  method.

Flow cytometric analysis:

Blood cells were washed with PBS supplemented with 1% FCS (GIBCO), stained with indicated antibodies and analysed by flow cytometry (BD Biosciences Facsanto II, with Facsdiva software).

Elisa:

Supernatant concentration of RANKL (R&D Systems) was assessed according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis:

Statistical significance of two different groups was calculated using the unpaired two tailed Student t-test. Area under the curve was used analysing the difference of cell proliferation over the time followed by two tailed Student t-test. All analyses were performed using GraphPad Prism software. Graphs present data as mean  $\pm$  SEM. A  $p$  value less than or equal to 0.05 was considered significant ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ).

All animal studies have been approved of by an animal ethics committee.

## Results:

### Severity of arthritis is increased in hTNFtg mice lacking miR-146a

To test the effect of miR-146a in TNF-driven arthritis, we crossed miR-146a<sup>-/-</sup> mice into hTNFtg mice to obtain miR-146a<sup>-/-</sup>/hTNFtg mice. When we analysed the joints of these mice histologically, we observed a significant increase in the degree of synovial inflammation in miR-146a<sup>-/-</sup>/hTNFtg mice compared to hTNFtg mice. Moreover, local bone destruction was elevated more than twofold in miR-146a<sup>-/-</sup>/hTNFtg mice compared to their control mice. This augmented destruction was accompanied by a similar, about twofold increase in bone resorbing osteoclasts found locally in the inflamed hind paws (Figure 1A-E). Of note, in miR-146a<sup>-/-</sup>/hTNFtg mice, local osteoclastogenesis was elevated more profoundly than synovial inflammation, as the number of OCs in relation to the area of inflammation was significantly increased in these animals compared to hTNFtg mice (Figure 1F). When we analysed the kinetics of inflammatory cells in blood during the course of arthritis, we noticed increased relative numbers of CD11b<sup>+</sup> and CD11c<sup>+</sup> myeloid cells in miR-146a<sup>-/-</sup>/hTNFtg mice compared to hTNFtg mice (Figure 1G and H), suggesting enhanced mobilization of inflammatory myeloid cells from bone marrow in miR-146a<sup>-/-</sup>/hTNFtg mice compared to hTNFtg mice. Interestingly, the proportion of F4/80<sup>+</sup> macrophages, which constitute potential osteoclast

precursors, in the synovial membrane was not different between the groups (Figure 1I). These data clearly demonstrate that miR-146a deficiency causes increased synovial inflammation and even more strikingly augmented local bone destruction. Furthermore, miR-146a regulates the egress of inflammatory myeloid cells from the bone marrow into the bloodstream during TNF-driven arthritis but does not influence recruitment of specific inflammatory cell types into the inflamed synovial membrane.

### **MiR-146a does not impact local bone destruction**

In hTNFtg mice, systemic overexpression of TNF not only leads to arthritis and local bone destruction, but also to systemic bone loss. We therefore analysed the influence of miR-146a deficiency on the development of osteoporosis induced by TNF. We were not able to detect differences in wt and miR-146a<sup>-/-</sup> mice with respect to bone volume/tissue volume (bv/tv) and other variables of bone histomorphometry at 10 weeks of age (Figure 2A-F). Consistent with previous reports, overexpression of hTNF decreased bone mass by 30 percent in hTNFtg animals compared to wt animals of the same age. Interestingly, however, miR-146a<sup>-/-</sup>/hTNFtg mice did not display more systemic bone loss compared to hTNFtg animals, in spite of their markedly higher local bone destruction (Figure 2A-F). We next analysed the abundance of miR-146a in various tissues in arthritic mice. While there was no consistent regulation in both spleen and bone marrow during the course of arthritis, we found miR-146 to be highly upregulated locally in the inflamed paws (Figure 2G-I). These results suggest an important local role for miR-146a regulating joint pathology.

### **miR-146a controls activation and proliferation associated genes in synovial fibroblasts**

When we analysed the potential of wt and miR-146a<sup>-/-</sup> bone marrow cells as well as the kinetics to differentiate into osteoclasts in response to MCSF and RANKL *in vitro* we were able to detect significantly increased numbers of osteoclasts only at one time point, demonstrating that miR-146a<sup>-/-</sup> bone marrow cells have a slightly increased potential to differentiate into mature osteoclasts (Figure 3A). Thus, we next performed RNA-sequencing of myeloid bone marrow cells and synovial fibroblasts in order to analyse these cell types in more detail. While there were only marginal differences at the transcriptome levels in bone marrow cells from wt and miR-146a deficient animals (Figure 3B), we found marked differences in synovial fibroblasts between the genotypes and numerous genes significantly upregulated in miR-146 deficient synovial fibroblasts compared to wt fibroblasts (Figure 3C). Among those were many which are associated with fibroblast activation and inflammatory

responses (Figure 3D). Unsupervised pathway analysis revealed that genes controlling the proliferation of cells as well as de novo synthesis of pyrimidines were upregulated in fibroblasts deficient in miR-146a (Supplementary Figure 1A and B).

### **MiR-146a regulates synovial fibroblast proliferation by targeting TRAF6**

Therefore, we next measured proliferation of synovial fibroblasts using  $^3\text{H}$ -Thymidine incorporation, the number of synovial fibroblasts lacking miR-146a was enhanced compared to wt controls, revealing an important role of this microRNA in controlling fibroblast proliferation (Figure 4A). To further analyse synovial fibroblasts, we used an *ex vivo* three dimensional culture model, the so called micromasses [34]. MiR-146a knock out synovial fibroblasts formed a synovial lining layer like their wt controls (Figure 4B). However, Ki-67 analysis of micromasses synovial lining layer revealed increased proliferation of miR-146a deficient compared to wt synovial fibroblasts, which was accompanied by a more irregular growth pattern (Figure 4B and C). When we analysed known target genes of miR-146a in synovial fibroblasts, we found only TRAF6 to be significantly deregulated compared to wt controls, whereas other miR-146a target genes, such as IRAK1 and RelB were not different (Figure 4D and Supplementary Figure 2A and B). As TRAF6 has been implicated in regulating proliferation of lung fibroblasts recently [35], we tested, whether deregulation of TRAF6 was involved in the increased proliferative capacity of miR-146a deficient synovial fibroblasts. Indeed, upon knock-down of TRAF6, the proliferation of synovial fibroblasts was significantly reduced, suggesting a key regulatory role of TRAF6 in controlling fibroblast proliferation (Figure 4E and F).

We then tested, whether TRAF6 was also upregulated *in vivo* and indeed we detected an increased expression of TRAF6 in the paws of miR-146a<sup>-/-</sup>/hTNFtg animals compared to hTNFtg animals in arthritis. Again, other classical miR-146a regulated genes were not significantly altered (Figure 5A and Supplementary Figure 3A and B). In line with our *in vitro* data, we could show significantly elevated amounts of the proliferation marker Ki-67 expressed in the hind paws of miR-146a<sup>-/-</sup>/hTNFtg compared to hTNFtg mice, suggesting increased proliferation of synovial fibroblasts *in vivo* just as *in vitro* (Figure 5B and C).

Recently, the analysis of the metabolic activity of immune cells has been of great interest, as it has become evident that changes in the metabolic activity of cells are often directly linked to their functional properties [36]. Increased levels of proliferation are often linked with changes in metabolic activity of cells. Therefore, we examined the metabolic activity of

synovial fibroblasts using the seahorse XF analyser. The glycolytic activity (extracellular acidification rate; ECAR) was significantly augmented in synovial fibroblasts derived from miR-146a<sup>-/-</sup> compared to those derived from wt animals, moreover the mitochondrial respiration (oxygen consumption rate; OCR), which was not significantly different but by trend elevated in miR-146a deficient fibroblasts revealed a boost in metabolism and therefore a negative regulatory function of this miRNA on the metabolic activity of synovial fibroblasts (Figure 5D and E).

### **MiR-146a controls the osteoclastogenic potential of synovial fibroblasts via TRAF6**

To directly link the increased generation of osteoclasts to synovial fibroblasts, we assessed the capacity of fibroblasts to support the generation of osteoclasts from bone marrow precursors in a co-culture setup. Using IL-1 $\beta$  stimulated synovial fibroblasts of either wt or miR-146a deficient animals, we found that those fibroblasts lacking miR-146a were significantly superior to wt fibroblasts to support osteoclast differentiation (Figure 5F). Upon knock down of TRAF6, the capacity of both wt and miR-146a deficient synovial fibroblasts to support the generation of osteoclasts was greatly reduced, suggesting that TRAF6-mediated signal transduction is essential for synovial fibroblast mediated osteoclast generation in arthritis and deregulation of TRAF6 in miR-146a deficient animals is responsible for the increased generation of osteoclasts (Figure 5G). In line with the increased osteoclast generation, we detected increased amounts of RANKL in miR-146a deficient synovial fibroblasts (Figure 5H). When we measured RANKL levels by qPCR, we were also able to detect increased amounts of RANKL mRNA accompanied by reduced expression of osteoprotegerin (OPG), the decoy receptor for RANKL, in arthritic paws of miR-146a<sup>-/-</sup>/hTNFtg compared to hTNFtg mice (Figure 5I and J). These data suggest, that loss of miR-146a leads to deregulation of TRAF6, creating an environment with increased capacity to support the generation of bone resorbing osteoclasts, leading to enhanced bone destruction in miR-146a deficient mice.

### **Mesenchymal miR-146a deficiency is responsible for increased local bone destruction**

To dissect *in vivo* whether the radiosensitive hematopoietic compartment including monocytes, macrophages and osteoclasts or the radioresistant mesenchymal compartment (mainly synovial fibroblasts) are responsible for increased local bone destruction in miR-146a<sup>-/-</sup>/hTNFtg mice, we performed bone marrow transplants. We could not find significant differences in irradiated hTNFtg mice reconstituted with either wt or miR-146<sup>-/-</sup> bone marrow (Figure 6A-D). However, when we reconstituted miR-146<sup>-/-</sup>/hTNFtg hosts with wt and

miR-146<sup>-/-</sup> bone marrow, we observed significantly increased erosions as well as local generation of osteoclasts (Figure 6A-D). These data demonstrate, that in chronic arthritis, miR-146a controls local joint destruction via controlling the pathogenicity of the radio resistant compartment, whose major component are synovial fibroblasts.

### **Discussion:**

In recent years it has become evident that epigenetic regulation controls many aspects of disease, and microRNAs have been suggested as possible regulators of many pathological processes. In this study, we identify miR-146a as an important local microRNA in arthritis, which governs synovial inflammation and especially the osteoclastogenic environment provided by mesenchymal cells. We detected an upregulation of miR-146a predominantly in the arthritic joint, as it has been demonstrated for RA [26, 27].

Previous studies primarily focused on the role of miR-146a in hematopoietic cells, and in these cells miR-146a has been shown to be upregulated upon stimulation with proinflammatory stimuli, especially Ly6C<sup>high</sup> monocytes [37, 38]. Further, addition of exogenous agonistic miR-146a appears to regulate osteoclastogenesis, possibly by targeting TRAF6 in bone marrow cells [29]. However, in our experiments using wt and miR-146a deficient cells we saw only a slightly increased potential of miR-146a deficient bone marrow cells to differentiate into OCs. On the other hand, in bone marrow transfer experiments, we could clearly demonstrate that the radio resistant mesenchymal compartment is the major driver of arthritis severity in these animals. Of note, in contrast to the marked increase in local bone destruction, we did not detect differences in systemic bone loss between hTNFtg mice deficient or sufficient for miR-146a, further suggesting that increased joint destruction in arthritis in miR146a deficient mice is predominantly driven by the local environment, especially synovial fibroblasts. In our experiments, we indeed found that miR-146a controls various aspects of synovial fibroblast biology. We detected overexpression of RANKL, the major factor for terminal differentiation of osteoclasts, and decreased amounts of OPG, a decoy receptor for RANKL and inhibitor of osteoclastogenesis, in the joints of miR-146a<sup>-/-</sup>/hTNFtg mice. Synovial fibroblasts have recently been demonstrated to be the essential source of RANKL for osteoclast generation in arthritis [39]. In addition we observed an overexpression of TRAF6 locally in the paw as well as in cultured synovial fibroblasts of miR-146a deficient mice. TRAF6 is well recognized to be essential for osteoclastogenesis in myeloid cells, but has also been shown to regulate proinflammatory signaling in fibroblasts,



as well as the proliferation of lung fibroblasts [35, 40-42]. In our experiments, we find TRAF6 also controls the proliferation of synovial fibroblasts, furthermore miR-146a acts as a key regulatory element inhibiting this proliferation, by the regulation of TRAF6 expression. MiR-146a also restricts the metabolic activity of synovial fibroblasts, as evidenced by an increased glycolytic activity in fibroblasts lacking miR-146a. This enhanced activation state, in combination with increased production of RANKL and decreased OPG of fibroblasts are the drivers of the increased bone destruction in TNF-mediated arthritis in miR-146a deficient animals (See supplementary Figure 4 for a graphical summary).

In summary, we propose that miR-146a constitutes an important part of a local negative feedback loop preventing excessive inflammation, especially inflammatory tissue damage and joint destruction by restricting fibroblast pathogenicity in chronic inflammatory arthritis.

#### **Acknowledgements:**

The authors thank Roman Ferdinand Stemberger, Tetyana Shvets, Karolina von Dalwigk and Carl-Walter Steiner for expert technical assistance.

This research has received support from the Innovative Medicines Initiative Joint Undertaking under *grant agreement* n°115142 (BTCure), resources of which are composed of financial contribution from the European Union's Seventh Framework Programme and EFPIA companies' in kind contribution and by a grant from the Austrian science fund (FWF), number P23730.

#### **Author contributions:**

VS, GS, ES, MK, MMK, SH, HPC, EE, RC WB, PG, JS, GüS, MB, KR and SB designed research. VS, AP, EA, MH, ES, RC, JB, BN, RC PG, SH, GS performed experiments. PG, MK, MB provided reagents. VS, AP, EA, ES, BN, MB; RC, EE, PG, SH, GS analysed data. SB, EA, AP, MB, RC, EE, VS performed statistical analyses. VS, GüS, JS, KR, SB wrote the paper.

All authors read and approved the final manuscript.

**References:**

1. Bluml S, Redlich K, Smolen JS. Mechanisms of tissue damage in arthritis. *Seminars in immunopathology*. 2014 Sep; 36(5):531-540.
2. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*. 2007 Jun; 7(6):429-442.
3. Scott DL, Smith C, Kingsley G. Joint damage and disability in rheumatoid arthritis: an updated systematic review. *Clin Exp Rheumatol*. 2003 Sep-Oct; 21(5 Suppl 31):S20-27.
4. Tak PP, Breedveld FC. Current perspectives on synovitis. *Arthritis Res*. 1999; 1(1):11-16.
5. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2011 Dec 8; 365(23):2205-2219.
6. Redlich K, Smolen JS. Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. *Nature reviews Drug discovery*. 2012 Mar; 11(3):234-250.
7. Scheinecker C, Redlich K, Smolen JS. Cytokines as therapeutic targets: advances and limitations. *Immunity*. 2008 Apr; 28(4):440-444.
8. Redlich K, Schett G, Steiner G, Hayer S, Wagner EF, Smolen JS. Rheumatoid arthritis therapy after tumor necrosis factor and interleukin-1 blockade. *Arthritis Rheum*. 2003 Dec; 48(12):3308-3319.
9. Bartel DP, Chen CZ. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat Rev Genet*. 2004 May; 5(5):396-400.
10. Lodish HF, Zhou B, Liu G, Chen CZ. Micromanagement of the immune system by microRNAs. *Nat Rev Immunol*. 2008 Feb; 8(2):120-130.
11. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009 Feb 20; 136(4):642-655.
12. Wang Y, Belloch R. Cell cycle regulation by MicroRNAs in embryonic stem cells. *Cancer Res*. 2009 May 15; 69(10):4093-4096.
13. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*. 2009 Mar; 11(3):228-234.
14. Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science*. 2007 Apr 27; 316(5824):608-611.
15. Thai TH, Calado DP, Casola S, Ansel KM, Xiao C, Xue Y, et al. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science*. 2007 Apr 27; 316(5824):604-608.
16. Boldin MP, Taganov KD, Rao DS, Yang L, Zhao JL, Kalwani M, et al. miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *The Journal of experimental medicine*. 2011 Jun 6; 208(6):1189-1201.
17. O'Connell RM, Kahn D, Gibson WS, Round JL, Scholz RL, Chaudhuri AA, et al. MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. *Immunity*. 2010 Oct 29; 33(4):607-619.
18. Bluml S, Bonelli M, Niederreiter B, Puchner A, Mayr G, Hayer S, et al. Essential role of microRNA-155 in the pathogenesis of autoimmune arthritis in mice. *Arthritis Rheum*. 2011 May; 63(5):1281-1288.

19. Kurowska-Stolarska M, Alivernini S, Ballantine LE, Asquith DL, Millar NL, Gilchrist DS, et al. MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jul 5; 108(27):11193-11198.
20. Chatzikyriakidou A, Voulgari PV, Georgiou I, Drosos AA. miRNAs and related polymorphisms in rheumatoid arthritis susceptibility. *Autoimmunity reviews*. 2012 Jul; 11(9):636-641.
21. Lu LF, Boldin MP, Chaudhry A, Lin LL, Taganov KD, Hanada T, et al. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell*. 2010 Sep 17; 142(6):914-929.
22. Yang L, Boldin MP, Yu Y, Liu CS, Ea CK, Ramakrishnan P, et al. miR-146a controls the resolution of T cell responses in mice. *The Journal of experimental medicine*. 2012 Aug 27; 209(9):1655-1670.
23. Zhao JL, Rao DS, O'Connell RM, Garcia-Flores Y, Baltimore D. MicroRNA-146a acts as a guardian of the quality and longevity of hematopoietic stem cells in mice. *eLife*. 2013; 2:e00537.
24. Filkova M, Aradi B, Senolt L, Ospelt C, Vettori S, Mann H, et al. Association of circulating miR-223 and miR-16 with disease activity in patients with early rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2014 Oct; 73(10):1898-1904.
25. Pauley KM, Satoh M, Chan AL, Bubb MR, Reeves WH, Chan EK. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther*. 2008; 10(4):R101.
26. Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, Hashimoto M, Nishida K, Ochi M, et al. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum*. 2008 May; 58(5):1284-1292.
27. Stanczyk J, Pedrioli DM, Brentano F, Sanchez-Pernaute O, Kolling C, Gay RE, et al. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008 Apr; 58(4):1001-1009.
28. Abou-Zeid A, Saad M, Soliman E. MicroRNA 146a expression in rheumatoid arthritis: association with tumor necrosis factor-alpha and disease activity. *Genetic testing and molecular biomarkers*. 2011 Nov; 15(11):807-812.
29. Nakasa T, Shibuya H, Nagata Y, Niimoto T, Ochi M. The inhibitory effect of microRNA-146a expression on bone destruction in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2011 Jun; 63(6):1582-1590.
30. Lochhead RB, Ma Y, Zachary JF, Baltimore D, Zhao JL, Weis JH, et al. MicroRNA-146a provides feedback regulation of lyme arthritis but not carditis during infection with *Borrelia burgdorferi*. *PLoS pathogens*. 2014 Jun; 10(6):e1004212.
31. Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, et al. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *The EMBO journal*. 1991 Dec; 10(13):4025-4031.
32. Bluml S, Binder NB, Niederreiter B, Polzer K, Hayer S, Tauber S, et al. Antiinflammatory effects of tumor necrosis factor on hematopoietic cells in a murine model of erosive arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010 Jun; 62(6):1608-1619.
33. Bluml S, Friedrich M, Lohmeyer T, Sahin E, Saferding V, Brunner J, et al. Loss of phosphatase and tensin homolog (PTEN) in myeloid cells controls inflammatory bone

destruction by regulating the osteoclastogenic potential of myeloid cells. *Annals of the rheumatic diseases*. 2013 Dec 10.

34. Kiener HP, Watts GF, Cui Y, Wright J, Thornhill TS, Skold M, et al. Synovial fibroblasts self-direct multicellular lining architecture and synthetic function in three-dimensional organ culture. *Arthritis Rheum*. 2010 Mar; 62(3):742-752.
35. Starczynowski DT, Lockwood WW, Delehouzee S, Chari R, Wegrzyn J, Fuller M, et al. TRAF6 is an amplified oncogene bridging the RAS and NF-kappaB pathways in human lung cancer. *J Clin Invest*. 2011 Oct; 121(10):4095-4105.
36. Assmann N, Finlay DK. Metabolic regulation of immune responses: therapeutic opportunities. *J Clin Invest*. 2016 Jun 1; 126(6):2031-2039.
37. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Aug 15; 103(33):12481-12486.
38. Etzrodt M, Cortez-Retamozo V, Newton A, Zhao J, Ng A, Wildgruber M, et al. Regulation of monocyte functional heterogeneity by miR-146a and Relb. *Cell reports*. 2012 Apr 19; 1(4):317-324.
39. Danks L, Komatsu N, Guerrini MM, Sawa S, Armaka M, Kollias G, et al. RANKL expressed on synovial fibroblasts is primarily responsible for bone erosions during joint inflammation. *Annals of the rheumatic diseases*. 2016 Jun; 75(6):1187-1195.
40. Walsh MC, Kim GK, Maurizio PL, Molnar EE, Choi Y. TRAF6 autoubiquitination-independent activation of the NFkappaB and MAPK pathways in response to IL-1 and RANKL. *PLoS One*. 2008; 3(12):e4064.
41. Yamada T, Fujieda S, Yanagi S, Yamamura H, Inatome R, Yamamoto H, et al. IL-1 induced chemokine production through the association of Syk with TNF receptor-associated factor-6 in nasal fibroblast lines. *J Immunol*. 2001 Jul 1; 167(1):283-288.
42. Lomaga MA, Yeh WC, Sarosi I, Duncan GS, Furlonger C, Ho A, et al. TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes & development*. 1999 Apr 15; 13(8):1015-1024.

### Figure legends:

**Figure 1: Human TNF transgenic mice lacking miR-146a (miR-146a<sup>-</sup>/hTNFtg) show more severe bone destruction compared to hTNFtg mice.**

Histological sections of the hind paws of hTNFtg and miR-146a<sup>-</sup>/hTNFtg mice obtained at 10 weeks of age stained with A, Hematoxylin and eosin (H&E) and B, Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) (bars 500µm, magnification x 5). Osteoclasts are displayed as purple-stained cells. C-F, Histomorphometric analysis of the extent of inflammation, bone erosion, number of osteoclasts and number of osteoclasts per inflammation area; in the tarsal area of the hind paws of hTNFtg and miR-146a<sup>-</sup>/hTNFtg mice. H and I, FACS analysis of CD11c<sup>+</sup> (G) and CD11b<sup>+</sup> (H) blood cells from hTNFtg and miR-146a<sup>-</sup>/hTNFtg mice at the indicated

age, using anti-CD11c and –CD11b antibodies. I, Quantification of F4/80<sup>+</sup> cells among total synovial cells, from immunohistochemically stained sections of hind paws from hTNFtg and miR-146a<sup>-/-</sup>/hTNFtg mice using anti-F4/80 antibody. \*p<0,05 , \*\*p<0,01 Data are from experiments with at least 10 mice per group. Results are shown as mean ± SEM.

**Figure 2: Loss of miR-146a in hTNFtg mice does not have an impact on the development of osteoporosis but miR-146a is important in regulating joint pathology.**

A-F, Quantitative histological analysis of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) stained sections of the tibiae from wt, miR-146a<sup>-/-</sup>, hTNFtg and miR-146a<sup>-/-</sup>/hTNFtg mice. A, Bone volume per tissue volume B, Trabecular number C, Trabecular thickness D, Trabecular separation E, Number of Osteoclasts per bone perimeter and F, Number of Osteoblasts per bone perimeter (n≥4). G-I, Quantitative real time PCR analysis of miR-146a expression in spleen- (G), bone marrow- (H) and paw cells (I). Cells were isolated at the indicated age (weeks) of hTNFtg mice (n≥11). \*p<0,05 , \*\*p<0,01 , \*\*\*p<0,001 as indicated or versus the control. Results are shown as mean ± SEM.

**Figure 3: Gene expression vary significantly in miR-146a deficient fibroblasts but not in bone marrow cells.**

A, Bone marrow isolated from wt or miR-146a<sup>-/-</sup> mice was stimulated with MCSF (d0) and MCSF+RANKL (d3) to induce osteoclastogenesis. The number of OCs/well among TRAP positive stained multinucleated cells in wt and miR-146a<sup>-/-</sup> mice (7, 8 and 9 days after bone marrow isolation) was analyzed. Results are shown from 4 independent experiments. B and C, Volcano plots showing differentially expressed genes from wt versus miR-146a<sup>-/-</sup> bone marrow cells (B) and fibroblasts (C). D, Heat map showing differentially expressed genes involved in proliferation and metabolism between wt and miR-146a deficient fibroblasts.

**Figure 4: MiR-146a deficiency leads to increased proliferation of synovial fibroblasts.**

A, In vitro proliferation of wt and miR-146a<sup>-/-</sup> synovial fibroblasts, measured by <sup>3</sup>[H]thymidine incorporation. B, Hematoxylin and eosin staining from histological sections of wt and miR-146a<sup>-/-</sup> synovial fibroblasts cultured in micromasses (bars 500µm, magnification x 5). C, Quantification of Ki-67<sup>+</sup> synovial fibroblast cells among total synovial lining cells, from immunohistochemically stained sections of micromasses from wt and miR-146a<sup>-/-</sup> mice using anti Ki-67 antibody. D, Expression level of TRAF6 in synovial fibroblasts from wt and miR-146a<sup>-/-</sup> animals were analysed using quantitative real time PCR. E and F, Synovial

fibroblasts from wt or miR-146a deficient animals were transfected with either control (Ctrl) or TRAF6 siRNA, proliferation analysis was performed using  $^3\text{[H]}$ thymidine incorporation. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  Data are representative of 3-5 independent experiments ( $n \geq 4$ ). Results are shown as mean  $\pm$  SEM.

**Figure 5: TRAF6 and consequential RANKL expression is controlled by miR-146a in synovial fibroblasts.**

A, Expression level of TRAF6 mRNA in hind paws of hTNFtg and miR-146a<sup>-/-</sup>/hTNFtg animals was measured using quantitative real time PCR. B, Synovial tissue of hTNFtg and miR-146a<sup>-/-</sup>/hTNFtg mice was analysed for Ki-67 expression, by staining of histological sections from hind paws with Ki-67 antibody (bars 100 $\mu\text{m}$ , magnification x 20). C, Ki-67 positive cells among total synovial cells in the inflamed tissue were quantified. D and E, extracellular acidification rate (ECAR) and oxygen consumption rate (OCR) from wt and miR-146a deficient synovial fibroblasts were analysed using seahorse flux analyser. F, Synovial fibroblasts from either wt or miR-146a<sup>-/-</sup> animals were co-cultured with wt bone marrow derived macrophages (BMDM) supplemented with IL-1 $\beta$ , number of osteoclasts per well was analysed. G, Number of osteoclasts was calculated after transfection of wt or miR-146a<sup>-/-</sup> synovial fibroblasts with control or TRAF6 siRNA following co-culture with wt BMDM supplemented with IL-1 $\beta$ . H, RANKL production of synovial fibroblasts from wt and miR-146a deficient animals cultured for 24h with IL-1 $\beta$  was analysed using Elisa. I and J, Expression level of RANKL and OPG mRNA in hind paws of hTNFtg and miR-146a<sup>-/-</sup>/hTNFtg animals were measured using quantitative real time PCR. \* $p < 0,05$  Data are from experiments using at least 5 mice per group. Results are shown as mean  $\pm$  SEM.

**Figure 6: Chimeric mice reveal an important regulatory function of miR-146a in mesenchymal cells, by controlling osteoclast development and bone destruction in arthritis.**

A-D, hTNFtg or miR-146a<sup>-/-</sup>/hTNFtg recipient mice were irradiated and challenged with either wt or miR-146a<sup>-/-</sup> bone marrow cells. A, TRAP stained sections of the hind paws of recipient mice obtained at 10 weeks of age (bars 500 $\mu\text{m}$ , magnification x 5). B-D, Histomorphometric analysis of the extent of B, Inflammation C, Bone erosion and D, Number of Osteoclasts in the tarsal area of the hind paws of recipient mice. \* $p < 0,05$  , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  Data are from experiments with at least 5 mice per group. Results are shown as mean  $\pm$  SEM.

**Supplementary Figure 1: MiR-146a deficient fibroblasts show increased expression of genes involved in proliferation and pyrimidine synthesis.**

A and B, Pathways affected by loss of miR-146a as detected by ingenuity pathway analysis (IPA)

**Supplementary Figure 2: MiR-146a target gene expression in synovial fibroblasts.**

A and B, Expression level of IRAK1 (A) and RelB (B) in synovial fibroblasts from wt and miR-146a<sup>-/-</sup> animals were analysed using quantitative real time PCR (n≥6). Results are shown as mean ± SEM.

**Supplementary Figure 3: MiR-146a target gene expression in hind paws of hTNFtg and miR-146a<sup>-/-</sup>/TNFtg mice.**

A and B, Expression level of IRAK1 (A) and RelB (B) in hind paws from hTNFtg and miR-146a<sup>-/-</sup>/hTNFtg animals were analysed using quantitative real time PCR (n≥5). Results are shown as mean ± SEM.

**Supplementary Figure 4: Schematically illustration of miR-146a regulatory function in synovial fibroblasts.**

MiR-146a acts as a negative regulator of proliferation and RANKL production in synovial fibroblasts, through controlling the target TRAF6 in the NF-κB signalling pathway.

**Supplementary Table 1: Primers used for real time PCR**

Figure 1

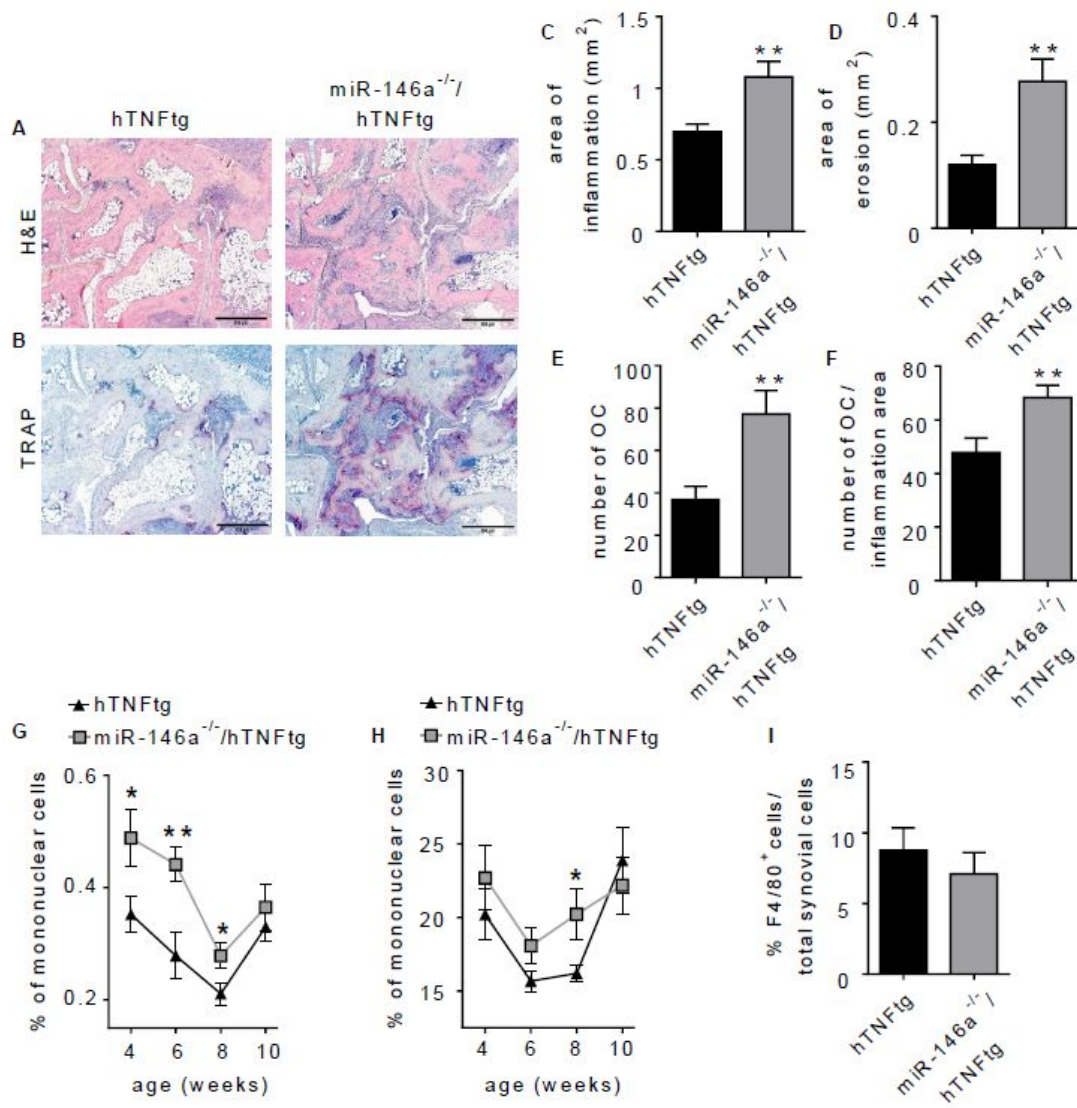




Figure 2

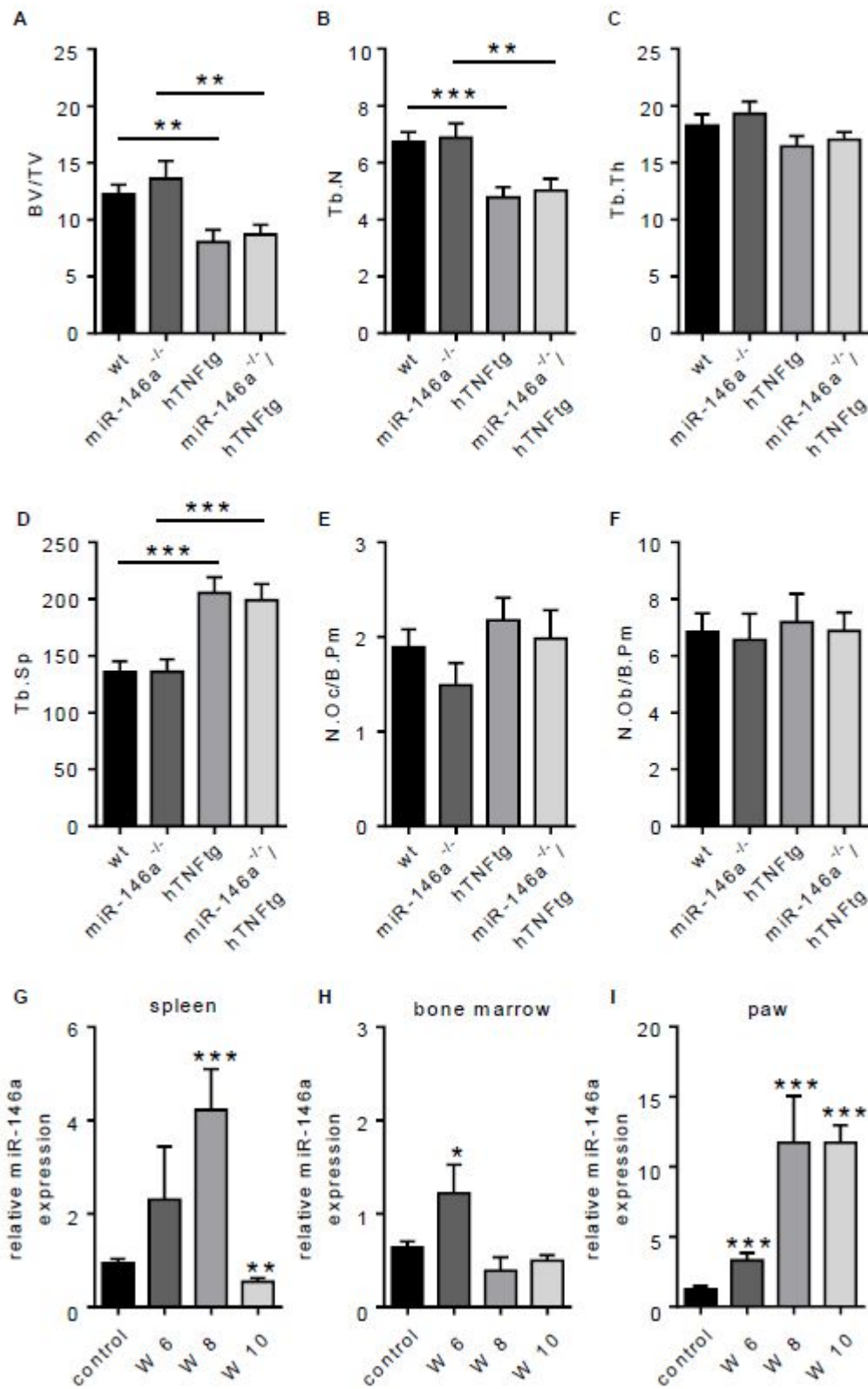


Figure 3

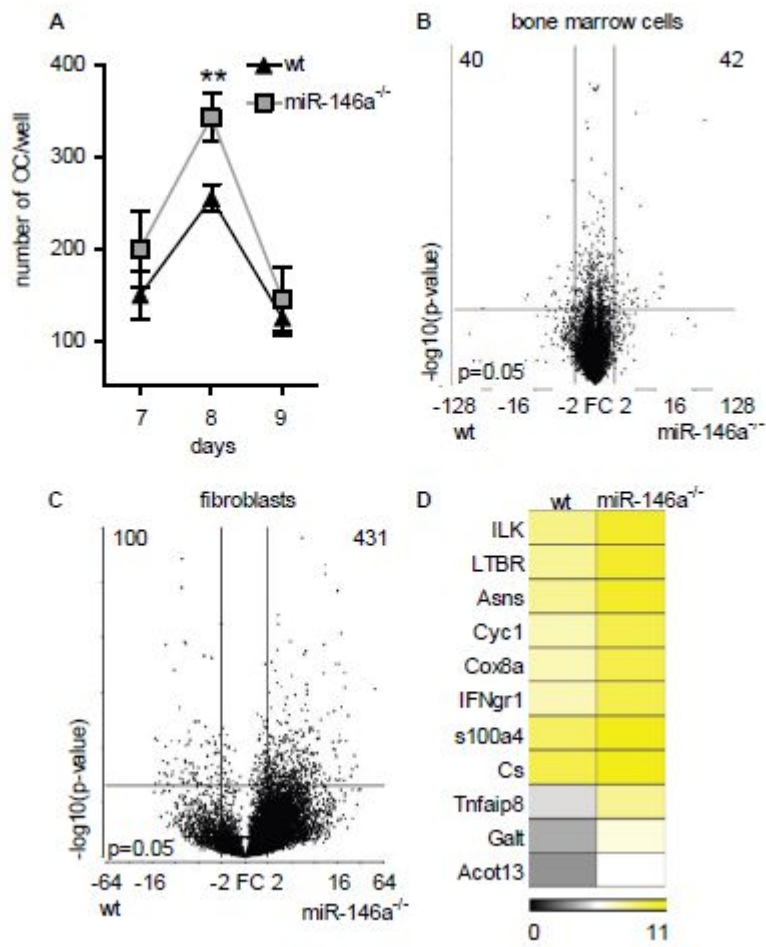


Figure 4

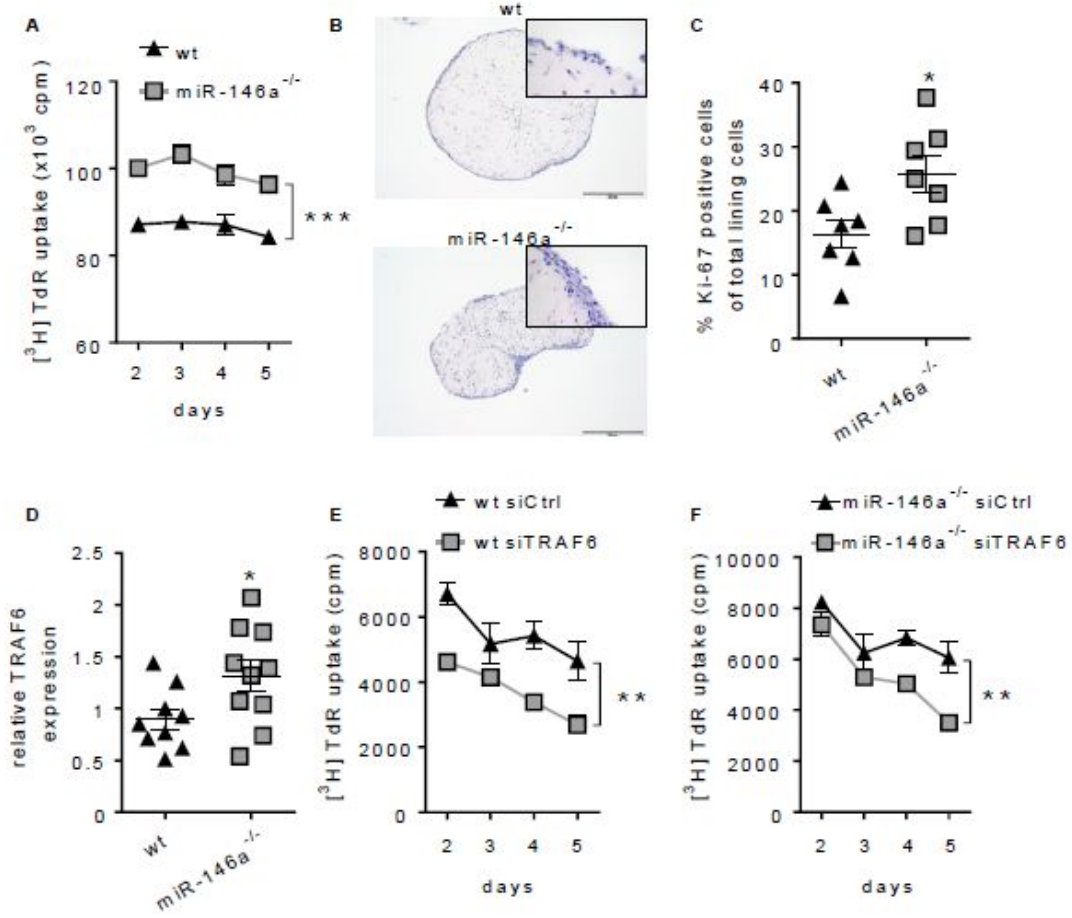


Figure 5

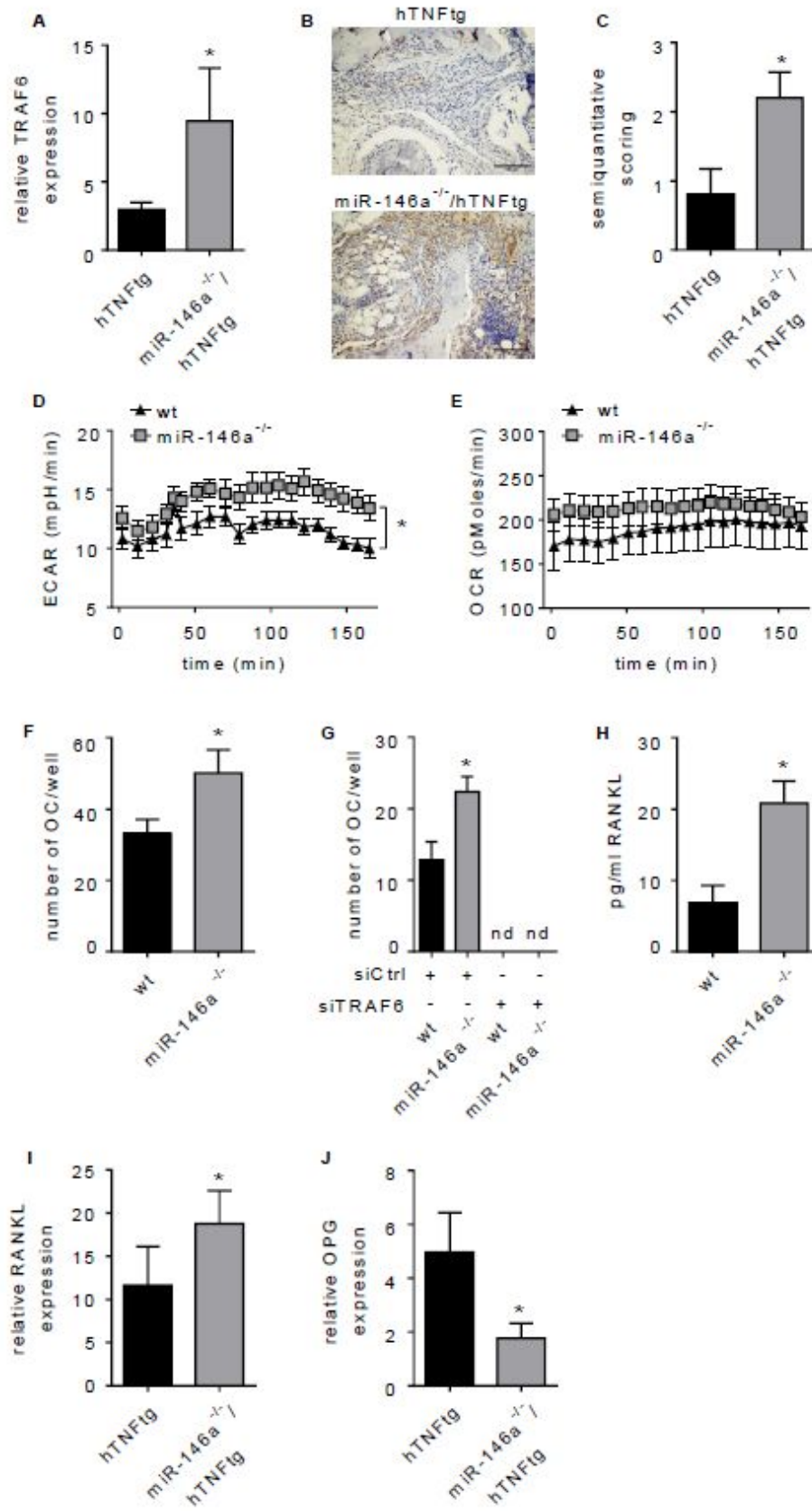
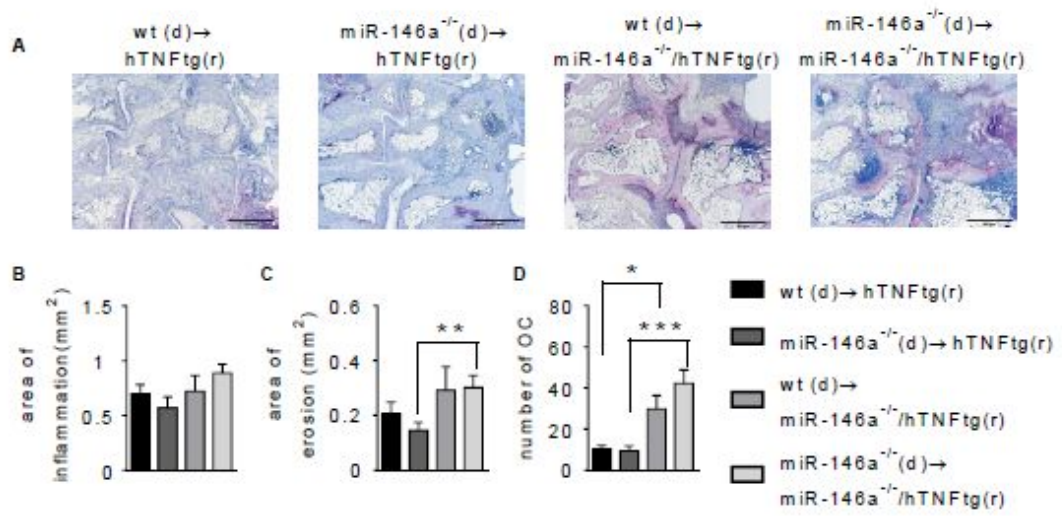
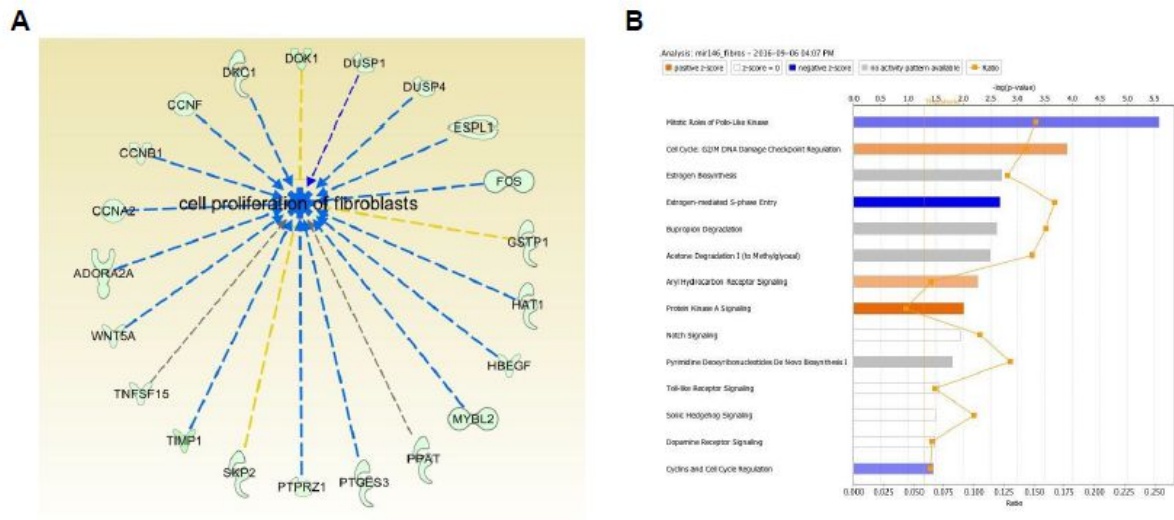


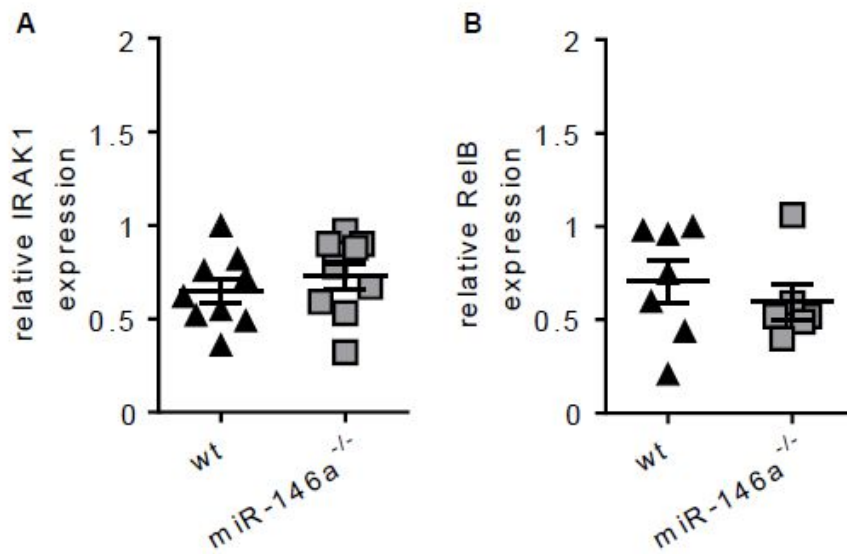
Figure 6



Supplementary Figure 1

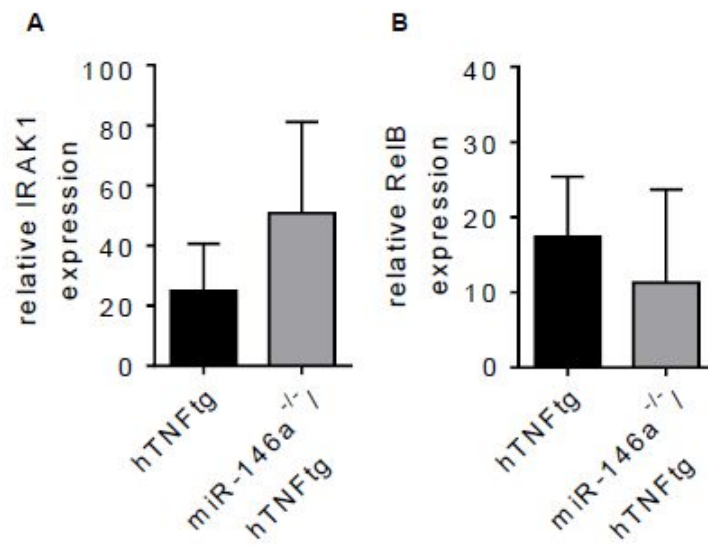


Supplementary Figure 2

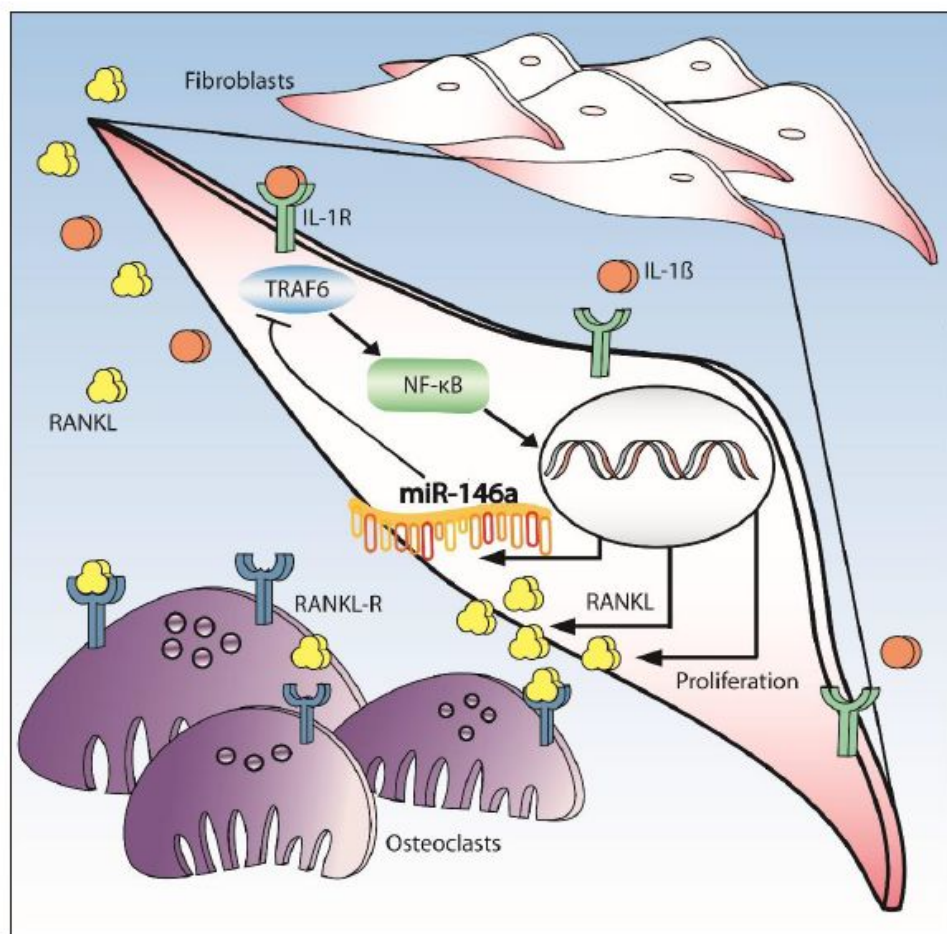




Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4



Supplementary Table 1

Gene	Sequence
TRAF8	5'-AAAGCGAGAGATTCTTTCOCCTG-3 5'-ACTGGGGACAATTCAGTAGAGC-3
IRAK1	5'-GACCAAGTATTTGAAAGACCTG-3 5'-GTAGTGCCTCCCTGGGTACA-3
RelB	5'-GCTGGGAATTGACCCCTACA-3 5'-CATGTCGACCTCCTGATGGTT-3
OPG	5'-TACCTGGAGATCGAATTCTGCTT-3 5'-CCATCTGGACATTTTTTGCAA-3
RANKL	5'-TCGTGGAACATTAGCATGGA-3 5'-CCTCTCCCAATCTGGTTCAA-3
GAPDH	5'-TGGCATTGTGGAAGGGCTCATGAC-3 5'-ATGCCAGTGAGCTTGCCGTTGAGC-3





# Bibliographie



## Bibliographie

- Abrahamsen, T.G., Froland, S.S., Natvig, J.B., and Pahle, J. (1975). Elution and characterization of lymphocytes from rheumatoid inflammatory tissue. *Scand. J. Immunol.* *4*, 823–830.
- Adriaansen, J., Kuhlman, R.R., Holten, J.V., Kaynor, C., Vervoordeldonk, M.J.B.M., and Tak, D.P.P. (2006). Intraarticular Interferon- $\beta$  Gene Therapy Ameliorates Adjuvant Arthritis in Rats. *Hum. Gene Ther.* *17*, 985–996.
- Akbari, O., Freeman, G.J., Meyer, E.H., Greenfield, E.A., Chang, T.T., Sharpe, A.H., Berry, G., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. (2002). Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS–ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat. Med.* *8*, 1024–1032.
- Alexandre, Y.O., Cocita, C.D., Ghilas, S., and Dalod, M. (2014). Deciphering the role of DC subsets in MCMV infection to better understand immune protection against viral infections. *Virology* *5*, 378.
- Allman, D., Dalod, M., Asselin-Paturel, C., Delale, T., Robbins, S.H., Trinchieri, G., Biron, C.A., Kastner, P., and Chan, S. (2006a). Ikaros is required for plasmacytoid dendritic cell differentiation. *Blood* *108*, 4025–4034.
- Allman, D., Dalod, M., Asselin-Paturel, C., Delale, T., Robbins, S.H., Trinchieri, G., Biron, C.A., Kastner, P., and Chan, S. (2006b). Ikaros is required for plasmacytoid dendritic cell differentiation. *Blood* *108*, 4025–4034.
- Al-Okla, S., Chatenay-Rivauday, C., Klein, J.P., and Wachsmann, D. (1999). Involvement of  $\alpha 5\beta 1$  integrins in interleukin 8 production induced by oral viridans streptococcal protein I/II<sub>f</sub> in cultured endothelial cells. *Cell. Microbiol.* *1*, 157–168.
- Alsaleh, G., Suffert, G., Semaan, N., Juncker, T., Frenzel, L., Gottenberg, J.-E., Sibilia, J., Pfeffer, S., and Wachsmann, D. (2009a). Bruton's Tyrosine Kinase Is Involved in miR-346-Related Regulation of IL-18 Release by Lipopolysaccharide-Activated Rheumatoid Fibroblast-Like Synoviocytes. *J. Immunol.* *182*, 5088–5097.
- Alsaleh, G., Suffert, G., Semaan, N., Juncker, T., Frenzel, L., Gottenberg, J.-E., Sibilia, J., Pfeffer, S., and Wachsmann, D. (2009b). Bruton's tyrosine kinase is involved in miR-346-related regulation of IL-18 release by lipopolysaccharide-activated rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 5088–5097.
- Ammari, M., Jorgensen, C., and Apparailly, F. (2013). Impact of microRNAs on the understanding and treatment of rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* *25*, 225–233.
- Baarsen, L.G. van, Wijbrandts, C.A., Rustenburg, F., Cantaert, T., Kraan, T.C. van der P., Baeten, D.L., Dijkmans, B.A., Tak, P.P., and Verweij, C.L. (2010). Regulation of IFN response gene activity during infliximab treatment in rheumatoid arthritis is associated with clinical response to treatment. *Arthritis Res. Ther.* *12*, R11.
- Bailey-Bucktrout, S.L., Caulkins, S.C., Goings, G., Fischer, J.A.A., Dzionek, A., and Miller, S.D. (2008). Cutting Edge: Central Nervous System Plasmacytoid Dendritic Cells Regulate the Severity of Relapsing Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* *180*, 6457–6461.
- Bar-On, L., Birnberg, T., Lewis, K.L., Edelson, B.T., Bruder, D., Hildner, K., Buer, J., Murphy, K.M., Reizis, B., and Jung, S. (2010). CX3CR1<sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells are a steady-state population related to plasmacytoid dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 14745–14750.

- Barton, G.M., Kagan, J.C., and Medzhitov, R. (2006). Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat. Immunol.* 7, 49–56.
- Bell, G.M., Anderson, A.E., Diboll, J., Reece, R., Eltherington, O., Harry, R.A., Fouweather, T., MacDonald, C., Chadwick, T., McColl, E., et al. (2016). Autologous tolerogenic dendritic cells for rheumatoid and inflammatory arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*
- Benucci, M., Li Gobbi, F., Meacci, F., Manfredi, M., Infantino, M., Severino, M., Testi, S., Sarzi-Puttini, P., Ricci, C., and Atzeni, F. (2015). Antidrug antibodies against TNF-blocking agents: correlations between disease activity, hypersensitivity reactions, and different classes of immunoglobulins. *Biol. Targets Ther.* 9, 7–12.
- Bessis, N., Boissier, M.-C., Ferrara, P., Blankenstein, T., Fradelizi, D., and Fournier, C. (1996). Attenuation of collagen-induced arthritis in mice by treatment with vector cells engineered to secrete interleukin-13. *Eur. J. Immunol.* 26, 2399–2403.
- Blazek, K., Eames, H.L., Weiss, M., Byrne, A.J., Perocheau, D., Pease, J.E., Doyle, S., McCann, F., Williams, R.O., and Udalova, I.A. (2015). IFN- $\lambda$  resolves inflammation via suppression of neutrophil infiltration and IL-1 $\beta$  production. *J. Exp. Med.* jem.20140995.
- Blüml, S., Bonelli, M., Niederreiter, B., Puchner, A., Mayr, G., Hayer, S., Koenders, M.I., van den Berg, W.B., Smolen, J., and Redlich, K. (2011). Essential role of microRNA-155 in the pathogenesis of autoimmune arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 63, 1281–1288.
- Bokarewa, M., Tarkowski, A., Lind, M., Dahlberg, L., and Magnusson, M. (2008). Arthritogenic dsRNA is present in synovial fluid from rheumatoid arthritis patients with an erosive disease course. *Eur. J. Immunol.* 38, 3237–3244.
- Bombardieri, M., Kam, N.-W., Brentano, F., Choi, K., Filer, A., Kyburz, D., McInnes, I.B., Gay, S., Buckley, C., and Pitzalis, C. (2011). A BAFF/APRIL-dependent TLR3-stimulated pathway enhances the capacity of rheumatoid synovial fibroblasts to induce AID expression and Ig class-switching in B cells. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 1857–1865.
- Bonaccorsi, I., Morandi, B., Antsiferova, O., Costa, G., Oliveri, D., Conte, R., Pezzino, G., Vermiglio, G., Anastasi, G.P., Navarra, G., et al. (2014). Membrane transfer from tumor cells overcomes deficient phagocytic ability of plasmacytoid dendritic cells for the acquisition and presentation of tumor antigens. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 192, 824–832.
- Brand, D.D., Latham, K.A., and Rosloniec, E.F. (2007). Collagen-induced arthritis. *Nat. Protoc.* 2, 1269–1275.
- Cacopardo, B., Benanti, F., Pinzone, M.R., and Nunnari, G. (2013). Rheumatoid arthritis following PEG-interferon-alfa-2a plus ribavirin treatment for chronic hepatitis C: a case report and review of the literature. *BMC Res. Notes* 6, 437.
- Cao, D., Malmström, V., Baecher-Allan, C., Hafler, D., Klareskog, L., and Trollmo, C. (2003). Isolation and functional characterization of regulatory CD25<sup>bright</sup>CD4<sup>+</sup> T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* 33, 215–223.
- Cao, W., Manicassamy, S., Tang, H., Kasturi, S.P., Pirani, A., Murthy, N., and Pulendran, B. (2008). Toll-like receptor-mediated induction of type I interferon in plasmacytoid dendritic cells requires the rapamycin-sensitive PI(3)K-mTOR-p70S6K pathway. *Nat. Immunol.* 9, 1157–1164.

- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat. Med.* *5*, 919–923.
- Cervantes-Barragan, L., Lewis, K.L., Firner, S., Thiel, V., Hugues, S., Reith, W., Ludewig, B., and Reizis, B. (2012). Plasmacytoid dendritic cells control T-cell response to chronic viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 3012–3017.
- Chan, V.S.-F., Nie, Y.-J., Shen, N., Yan, S., Mok, M.-Y., and Lau, C.-S. (2012). Distinct roles of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun. Rev.* *11*, 890–897.
- Chappell, C.P., Giltiay, N.V., Draves, K.E., Chen, C., Hayden-Ledbetter, M.S., Shlomchik, M.J., Kaplan, D.H., and Clark, E.A. (2014). Targeting Antigens through Blood Dendritic Cell Antigen 2 on Plasmacytoid Dendritic Cells Promotes Immunologic Tolerance. *J. Immunol.* *192*, 5789–5801.
- Charles, J.F., Hsu, L.-Y., Niemi, E.C., Weiss, A., Aliprantis, A.O., and Nakamura, M.C. (2012). Inflammatory arthritis increases mouse osteoclast precursors with myeloid suppressor function. *J. Clin. Invest.* *122*, 4592–4605.
- Christensen, A.D., Haase, C., Cook, A.D., and Hamilton, J.A. (2016). K/BxN Serum-Transfer Arthritis as a Model for Human Inflammatory Arthritis. *Front. Immunol.* *7*, 213.
- Cisse, B., Caton, M.L., Lehner, M., Maeda, T., Scheu, S., Locksley, R., Holmberg, D., Zweier, C., den Hollander, N.S., Kant, S.G., et al. (2008). Transcription Factor E2-2 Is an Essential and Specific Regulator of Plasmacytoid Dendritic Cell Development. *Cell* *135*, 37–48.
- Colina, R., Costa-Mattioli, M., Dowling, R.J.O., Jaramillo, M., Tai, L.-H., Breitbach, C.J., Martineau, Y., Larsson, O., Rong, L., Svitkin, Y.V., et al. (2008). Translational control of the innate immune response through IRF-7. *Nature* *452*, 323–328.
- Conigliaro, P., Perricone, C., Benson, R.A., Garside, P., Brewer, J.M., Perricone, R., and Valesini, G. (2010). The type I IFN system in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity* *43*, 220–225.
- Corr, M., Boyle, D.L., Ronacher, L., Flores, N., and Firestein, G.S. (2009). Synergistic benefit in inflammatory arthritis by targeting I $\kappa$ B kinase  $\epsilon$  and interferon  $\beta$ . *Ann. Rheum. Dis.* *68*, 257–263.
- Corsiero, E., Pitzalis, C., and Bombardieri, M. (2014). Peripheral and synovial mechanisms of humoral autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Drug Discov. Today* *19*, 1161–1165.
- Crozat, K., Guiton, R., Contreras, V., Feuillet, V., Dutertre, C.-A., Ventre, E., Manh, T.-P.V., Baranek, T., Storset, A.K., Marvel, J., et al. (2010). The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells. *J. Exp. Med.* *207*, 1283–1292.
- Dall'era, M.C., Cardarelli, P.M., Preston, B.T., Witte, A., and Davis, J.C. (2005). Type I interferon correlates with serological and clinical manifestations of SLE. *Ann. Rheum. Dis.* *64*, 1692–1697.
- D'Amico, A., and Wu, L. (2003). The Early Progenitors of Mouse Dendritic Cells and Plasmacytoid Predendritic Cells Are within the Bone Marrow Hemopoietic Precursors Expressing Flt3. *J. Exp. Med.* *198*, 293–303.
- Devulder, B., Hatron, P.-Y., Hachulla, É., and Godeau, P. (2002). *Médecine interne* (Paris: Masson).

- Diacovo, T.G., Blasius, A.L., Mak, T.W., Cella, M., and Colonna, M. (2005). Adhesive mechanisms governing interferon-producing cell recruitment into lymph nodes. *J. Exp. Med.* *202*, 687–696.
- Diana, J., Brezar, V., Beaudoin, L., Dalod, M., Mellor, A., Tafuri, A., Herrath, M. von, Boitard, C., Mallone, R., and Lehuen, A. (2011). Viral infection prevents diabetes by inducing regulatory T cells through NKT cell–plasmacytoid dendritic cell interplay. *J. Exp. Med.* *208*, 729–745.
- Diana, J., Simoni, Y., Furio, L., Beaudoin, L., Agerberth, B., Barrat, F., and Lehuen, A. (2013). Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes. *Nat. Med.* *19*, 65–73.
- Dias, C., and Isenberg, D.A. (2011). Susceptibility of patients with rheumatic diseases to B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Nat. Rev. Rheumatol.* *7*, 360–368.
- Diogo, D., Okada, Y., and Plenge, R.M. (2014). Genome-wide association studies to advance our understanding of critical cell types and pathways in rheumatoid arthritis: recent findings and challenges. [Miscellaneous Article]. *Curr. Opin. Rheumatol.* January 2014 *26*, 85–92.
- Ditzel, H.J. (2004). The K/BxN mouse: a model of human inflammatory arthritis. *Trends Mol. Med.* *10*, 40–45.
- Doncarli, A., Stasiuk, L.M., Fournier, C., and Abehsira-Amar, O. (1997). Conversion in vivo from an early dominant Th0/Th1 response to a Th2 phenotype during the development of collagen-induced arthritis. *Eur. J. Immunol.* *27*, 1451–1458.
- Dorner, B.G., Dorner, M.B., Zhou, X., Opitz, C., Mora, A., Güttler, S., Hutloff, A., Mages, H.W., Ranke, K., Schaefer, M., et al. (2009). Selective Expression of the Chemokine Receptor XCR1 on Cross-presenting Dendritic Cells Determines Cooperation with CD8+ T Cells. *Immunity* *31*, 823–833.
- Drobits, B., Holcman, M., Amberg, N., Swiecki, M., Grundtner, R., Hammer, M., Colonna, M., and Sibilica, M. (2012). Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells. *J. Clin. Invest.* *122*, 575–585.
- Duraes, F.V., Lippens, C., Steinbach, K., Dubrot, J., Brighouse, D., Bendriss-Vermare, N., Issazadeh-Navikas, S., Merkler, D., and Hugues, S. (2016). pDC therapy induces recovery from EAE by recruiting endogenous pDC to sites of CNS inflammation. *J. Autoimmun.* *67*, 8–18.
- Edwards, J.C.W., and Cambridge, G. (2001). Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes. *Rheumatology* *40*, 205–211.
- Ehrenstein, M.R., Evans, J.G., Singh, A., Moore, S., Warnes, G., Isenberg, D.A., and Mauri, C. (2004). Compromised Function of Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis and Reversal by Anti-TNF $\alpha$  Therapy. *J. Exp. Med.* *200*, 277–285.
- Emde, A., and Hornstein, E. (2014). miRNAs at the interface of cellular stress and disease. *EMBO J.* *33*, 1428–1437.
- Esashi, E., Wang, Y.-H., Perng, O., Qin, X.-F., Liu, Y.-J., and Watowich, S.S. (2008). The Signal Transducer STAT5 Inhibits Plasmacytoid Dendritic Cell Development by Suppressing Transcription Factor IRF8. *Immunity* *28*, 509–520.

- Eyre, S., Bowes, J., Diogo, D., Lee, A., Barton, A., Martin, P., Zhernakova, A., Stahl, E., Viatte, S., McAllister, K., et al. (2012). High-density genetic mapping identifies new susceptibility loci for rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.* *44*, 1336–1340.
- Filer, A., Raza, K., Salmon, M., and Buckley, C.D. (2008). The role of chemokines in leucocyte-stromal interactions in rheumatoid arthritis. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *13*, 2674–2685.
- Firestein, G.S. (2003). Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* *423*, 356–361.
- Franklin, E.C., Holman, H.R., Muller-Eberhard, H.J., and Kunkel, H.G. (1957). An unusual protein component of high molecular weight in the serum of certain patients with rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* *105*, 425–438.
- Franks, A.L., and Slansky, J.E. (2012). Multiple associations between a broad spectrum of autoimmune diseases, chronic inflammatory diseases and cancer. *Anticancer Res.* *32*, 1119–1136.
- Franz, J.K., Pap, T., Hummel, K.M., Nawrath, M., Aicher, W.K., Shigeyama, Y., Müller-Ladner, U., Gay, R.E., and Gay, S. (2000). Expression of sentrin, a novel antiapoptotic molecule, at sites of synovial invasion in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *43*, 599–607.
- García, S., Forteza, J., López-Otin, C., Gómez-Reino, J.J., González, A., and Conde, C. (2010). Matrix metalloproteinase-8 deficiency increases joint inflammation and bone erosion in the K/BxN serum-transfer arthritis model. *Arthritis Res. Ther.* *12*, R224.
- Georgopoulos, K., Bigby, M., Wang, J.-H., Molnar, A., Wu, P., Winandy, S., and Sharpe, A. (1994). The *ikaros* gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* *79*, 143–156.
- Gilliet, M., Boonstra, A., Paturel, C., Antonenko, S., Xu, X.-L., Trinchieri, G., O'Garra, A., and Liu, Y.-J. (2002). The Development of Murine Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors Is Differentially Regulated by FLT3-ligand and Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor. *J. Exp. Med.* *195*, 953–958.
- Gilliet, M., Cao, W., and Liu, Y.-J. (2008). Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 594–606.
- Gilliet M, Conrad C, Geiges M, and et al (2004). PSoriasis triggered by toll-like receptor 7 agonist imiquimod in the presence of dermal plasmacytoid dendritic cell precursors. *Arch. Dermatol.* *140*, 1490–1495.
- Goubier, A., Dubois, B., Gheit, H., Joubert, G., Villard-Truc, F., Asselin-Paturel, C., Trinchieri, G., and Kaiserlian, D. (2008). Plasmacytoid Dendritic Cells Mediate Oral Tolerance. *Immunity* *29*, 464–475.
- Grouard, G., Risoan, M.-C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J., and Liu, Y.-J. (1997). The Enigmatic Plasmacytoid T Cells Develop into Dendritic Cells with Interleukin (IL)-3 and CD40-Ligand. *J. Exp. Med.* *185*, 1101–1112.
- Guedez, Y.B., Whittington, K.B., Clayton, J.L., Joosten, L.A., van de Loo, F.A., van den Berg, W.B., and Rosloniec, E.F. (2001). Genetic ablation of interferon-gamma up-regulates interleukin-1beta expression and enables the elicitation of collagen-induced arthritis in a nonsusceptible mouse strain. *Arthritis Rheum.* *44*, 2413–2424.
- Guery, L., and Hugues, S. (2013). Tolerogenic and activatory plasmacytoid dendritic cells in autoimmunity. *Antigen Present. Cell Biol.* *4*, 59.



- Guéry, L., and Hugues, S. (2015). New role for antigen-presenting activated pDCs in promoting Th17 cells and impacting antitumor immunity. *Oncolmunology* 4, e\_988476.
- Guéry, L., Dubrot, J., Lippens, C., Brighthouse, D., Malinge, P., Irla, M., Pot, C., Reith, W., Waldburger, J.-M., and Hugues, S. (2014). Ag-Presenting CpG-Activated pDCs Prime Th17 Cells That Induce Tumor Regression. *Cancer Res.* 74, 6430–6440.
- Hadeiba, H., Sato, T., Habtezion, A., Oderup, C., Pan, J., and Butcher, E.C. (2008). CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells capable of suppressing acute graft-versus-host disease. *Nat. Immunol.* 9, 1253–1260.
- Hadeiba, H., Lahl, K., Edalati, A., Oderup, C., Habtezion, A., Pachynski, R., Nguyen, L., Ghodsi, A., Adler, S., and Butcher, E.C. (2012). Plasmacytoid Dendritic Cells Transport Peripheral Antigens to the Thymus to Promote Central Tolerance. *Immunity* 36, 438–450.
- Heer, H.J. de, Hammad, H., Soullié, T., Hijdra, D., Vos, N., Willart, M.A.M., Hoogsteden, H.C., and Lambrecht, B.N. (2004). Essential Role of Lung Plasmacytoid Dendritic Cells in Preventing Asthmatic Reactions to Harmless Inhaled Antigen. *J. Exp. Med.* 200, 89–98.
- van der Heijden, I.M., Wilbrink, B., Tchetverikov, I., Schrijver, I.A., Schouls, L.M., Hazenberg, M.P., Breedveld, F.C., and Tak, P.P. (2000). Presence of bacterial DNA and bacterial peptidoglycans in joints of patients with rheumatoid arthritis and other arthritides. *Arthritis Rheum.* 43, 593–598.
- Hirohata, S., Nagai, T., Asako, K., Tomita, T., and Yoshikawa, H. (2011). Induction of type B synoviocyte-like cells from plasmacytoid dendritic cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin. Immunol.* 140, 276–283.
- Hirohata, S., Yanagida, T., Tomita, T., and Yoshikawa, H. (2013). Increased generation of pre-plasmacytoid dendritic cells in bone marrow of rheumatoid arthritis. *Mod. Rheumatol.* 24, 443–447.
- Ho, V., Mclean, A., and Terry, S. (2008). Severe systemic lupus erythematosus induced by antiviral treatment for hepatitis C. *J. Clin. Rheumatol. Pract. Rep. Rheum. Musculoskelet. Dis.* 14, 166–168.
- Holten, J. van, Smeets, T.J.M., Blankert, P., and Tak, P.P. (2005a). Expression of interferon  $\beta$  in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis: comparison with patients with osteoarthritis and reactive arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 64, 1780–1782.
- Holten, J. van, Pavelka, K., Vencovsky, J., Stahl, H., Rozman, B., Genovese, M., Kivitz, A.J., Alvaro, J., Nuki, G., Furst, D.E., et al. (2005b). A multicentre, randomised, double blind, placebo controlled phase II study of subcutaneous interferon beta-1a in the treatment of patients with active rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 64, 64–69.
- van Holten, J., Plater-Zyberk, C., and Tak, P.P. (2002). Interferon-beta for treatment of rheumatoid arthritis? *Arthritis Res.* 4, 346–352.
- van Holten, J., Reedquist, K., Sattonet-Roche, P., Smeets, T.J.M., Plater-Zyberk, C., Vervoordeldonk, M.J., and Tak, P.P. (2004). Treatment with recombinant interferon-beta reduces inflammation and slows cartilage destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 6, R239-249.
- Honda, K., Ohba, Y., Yanai, H., Negishi, H., Mizutani, T., Takaoka, A., Taya, C., and Taniguchi, T. (2005). Spatiotemporal regulation of MyD88–IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* 434, 1035–1040.

- Hooks, J.J., Moutsopoulos, H.M., Geis, S.A., Stahl, N.I., Decker, J.L., and Notkins, A.L. (1979). Immune Interferon in the Circulation of Patients with Autoimmune Disease. *N. Engl. J. Med.* *301*, 5–8.
- Irla, M., Küpfer, N., Suter, T., Lissilaa, R., Benkhoucha, M., Skupsky, J., Lalive, P.H., Fontana, A., Reith, W., and Hugues, S. (2010). MHC class II–restricted antigen presentation by plasmacytoid dendritic cells inhibits T cell–mediated autoimmunity. *J. Exp. Med.* *207*, 1891–1905.
- Irmeler, I.M., Gajda, M., and Bräuer, R. (2007). Exacerbation of Antigen-Induced Arthritis in IFN- $\gamma$ -Deficient Mice As a Result of Unrestricted IL-17 Response. *J. Immunol.* *179*, 6228–6236.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schröter, M., Burns, K., Mattmann, C., et al. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* *388*, 190–195.
- Ito, T., Kanzler, H., Duramad, O., Cao, W., and Liu, Y.-J. (2006). Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid predendritic cells. *Blood* *107*, 2423–2431.
- Ito, T., Yang, M., Wang, Y.-H., Lande, R., Gregorio, J., Perng, O.A., Qin, X.-F., Liu, Y.-J., and Gilliet, M. (2007). Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10–producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J. Exp. Med.* *204*, 105–115.
- Itoh, T., Matsuda, H., Tanioka, M., Kuwabara, K., Itohara, S., and Suzuki, R. (2002). The role of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in antibody-induced arthritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *169*, 2643–2647.
- Iwakoshi, N.N., Pypaert, M., and Glimcher, L.H. (2007). The transcription factor XBP-1 is essential for the development and survival of dendritic cells. *J. Exp. Med.* *204*, 2267–2275.
- Izaguirre, A., Barnes, B.J., Amrute, S., Yeow, W.-S., Megjugorac, N., Dai, J., Feng, D., Chung, E., Pitha, P.M., and Fitzgerald-Bocarsly, P. (2003). Comparative analysis of IRF and IFN- $\alpha$  expression in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* *74*, 1125–1138.
- Jahrsdörfer, B., Vollmer, A., Blackwell, S.E., Maier, J., Sontheimer, K., Beyer, T., Mandel, B., Lunov, O., Tron, K., Nienhaus, G.U., et al. (2010). Granzyme B produced by human plasmacytoid dendritic cells suppresses T-cell expansion. *Blood* *115*, 1156–1165.
- Jin, O., Kavikondala, S., Mok, M.-Y., Sun, L., Gu, J., Fu, R., Chan, A., Yeung, J., Nie, Y., and Lau, C.-S. (2010). Abnormalities in circulating plasmacytoid dendritic cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* *12*, R137.
- Jongbloed, S.L., Lebre, M.C., Fraser, A.R., Gracie, J.A., Sturrock, R.D., Tak, P.P., and McInnes, I.B. (2005). Enumeration and phenotypical analysis of distinct dendritic cell subsets in psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* *8*, R15.
- Jongbloed, S.L., Benson, R.A., Nickdel, M.B., Garside, P., McInnes, I.B., and Brewer, J.M. (2009). Plasmacytoid Dendritic Cells Regulate Breach of Self-Tolerance in Autoimmune Arthritis. *J. Immunol.* *182*, 963–968.
- Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G.-I., De los Santos, K., Sparwasser, T., Wu, S., Vuthoori, S., Ko, K., Zavala, F., et al. (2002). In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* *17*, 211–220.

- Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R. de W., Kastelein, R.A., Bazan, F., and Liu, Y.-J. (2001). Subsets of Human Dendritic Cell Precursors Express Different Toll-like Receptors and Respond to Different Microbial Antigens. *J. Exp. Med.* *194*, 863–870.
- Kamogawa-Schifter, Y., Ohkawa, J., Namiki, S., Arai, N., Arai, K., and Liu, Y. (2005). Ly49Q defines 2 pDC subsets in mice. *Blood* *105*, 2787–2792.
- Kaneko, H., Dridi, S., Tarallo, V., Gelfand, B.D., Fowler, B.J., Cho, W.G., Kleinman, M.E., Ponicsan, S.L., Hauswirth, W.W., Chiodo, V.A., et al. (2011). DICER1 deficit induces Alu RNA toxicity in age-related macular degeneration. *Nature* *471*, 325–330.
- Kang, Y.M., Zhang, X., Wagner, U.G., Yang, H., Beckenbaugh, R.D., Kurtin, P.J., Goronzy, J.J., and Weyand, C.M. (2002). CD8 T Cells Are Required for the Formation of Ectopic Germinal Centers in Rheumatoid Synovitis. *J. Exp. Med.* *195*, 1325–1336.
- Kavousanaki, M., Makrigiannakis, A., Boumpas, D., and Verginis, P. (2010). Novel role of plasmacytoid dendritic cells in humans: Induction of interleukin-10-producing treg cells by plasmacytoid dendritic cells in patients with rheumatoid arthritis responding to therapy. *Arthritis Rheum.* *62*, 53–63.
- Kim, H.S., and Chung, D.H. (2012). TLR4-mediated IL-12 production enhances IFN- $\gamma$  and IL-1 $\beta$  production, which inhibits TGF- $\beta$  production and promotes antibody-induced joint inflammation. *Arthritis Res. Ther.* *14*, R210.
- Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G., and Kyewski, B. (2009). Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 833–844.
- Kleyer, A., and Schett, G. (2014). Arthritis and bone loss: a hen and egg story. *Curr. Opin. Rheumatol.* *26*, 80–84.
- Klimiuk, P.A., Yang, H., Goronzy, J.J., and Weyand, C.M. (1999). Production of Cytokines and Metalloproteinases in Rheumatoid Synovitis Is T Cell Dependent. *Clin. Immunol.* *90*, 65–78.
- Kong, Y.-Y., Feige, U., Sarosi, I., Bolon, B., Tafuri, A., Morony, S., Capparelli, C., Li, J., Elliott, R., McCabe, S., et al. (1999). Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* *402*, 304–309.
- Kraan, T.C.T.M. van der P., Wijbrandts, C.A., Baarsen, L.G.M. van, Voskuyl, A.E., Rustenburg, F., Baggen, J.M., Ibrahim, S.M., Fero, M., Dijkmans, B. a. C., Tak, P.P., et al. (2007). Rheumatoid arthritis subtypes identified by genomic profiling of peripheral blood cells: assignment of a type I interferon signature in a subpopulation of patients. *Ann. Rheum. Dis.* *66*, 1008–1014.
- Kumagai, Y., Kumar, H., Koyama, S., Kawai, T., Takeuchi, O., and Akira, S. (2009). Cutting Edge: TLR-Dependent Viral Recognition Along with Type I IFN Positive Feedback Signaling Masks the Requirement of Viral Replication for IFN- $\alpha$  Production in Plasmacytoid Dendritic Cells. *J. Immunol.* *182*, 3960–3964.
- Kurowska-Stolarska, M., Alivernini, S., Ballantine, L.E., Asquith, D.L., Millar, N.L., Gilchrist, D.S., Reilly, J., Ierna, M., Fraser, A.R., Stolarski, B., et al. (2011). MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 11193–11198.
- Kurzynska-Kokorniak, A., Koralewska, N., Pokornowska, M., Urbanowicz, A., Tworak, A., Mickiewicz, A., and Figlerowicz, M. (2015). The many faces of Dicer: the complexity of the mechanisms regulating Dicer gene expression and enzyme activities. *Nucleic Acids Res.* *43*, 4365–4380.

- Kuwana, M. (2002). Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. *Hum. Immunol.* *63*, 1156–1163.
- Labidi-Galy, S.I., Treilleux, I., Goddard-Leon, S., Combes, J.-D., Blay, J.-Y., Ray-Coquard, I., Caux, C., and Bendriss-Vermare, N. (2012). Plasmacytoid dendritic cells infiltrating ovarian cancer are associated with poor prognosis. *OncolImmunology* *1*, 380–382.
- Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V., Chatterjee, B., Wang, Y.-H., Homey, B., Cao, W., Wang, Y.-H., Su, B., Nestle, F.O., et al. (2007). Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* *449*, 564–569.
- Langerhans, P. (1868). Ueber die Nerven der menschlichen Haut. *Arch. Für Pathol. Anat. Physiol. Für Klin. Med.* *44*, 325–337.
- Laouar, Y., Welte, T., Fu, X.-Y., and Flavell, R.A. (2003). STAT3 Is Required for Flt3L-Dependent Dendritic Cell Differentiation. *Immunity* *19*, 903–912.
- Lawson, C.A., Brown, A.K., Bejarano, V., Douglas, S.H., Burgoyne, C.H., Greenstein, A.S., Boylston, A.W., Emery, P., Ponchel, F., and Isaacs, J.D. (2006). Early rheumatoid arthritis is associated with a deficit in the CD4+CD25high regulatory T cell population in peripheral blood. *Rheumatology* *45*, 1210–1217.
- Lebre, M.C., Jongbloed, S.L., Tas, S.W., Smeets, T.J.M., McInnes, I.B., and Tak, P.P. (2008). Rheumatoid Arthritis Synovium Contains Two Subsets of CD83–DC-LAMP– Dendritic Cells with Distinct Cytokine Profiles. *Am. J. Pathol.* *172*, 940–950.
- Li, H.S., Greeley, N., Sugimoto, N., Liu, Y.-J., and Watowich, S.S. (2012). miR-22 Controls Irf8 mRNA Abundance and Murine Dendritic Cell Development. *PLOS ONE* *7*, e52341.
- Li, X.L., Ménoret, S., Bezie, S., Caron, L., Chabannes, D., Hill, M., Halary, F., Angin, M., Heslan, M., Usal, C., et al. (2010). Mechanism and Localization of CD8 Regulatory T Cells in a Heart Transplant Model of Tolerance. *J. Immunol.* *185*, 823–833.
- Liou, L.-Y., Blasius, A.L., Welch, M.J., Colonna, M., Oldstone, M.B.A., and Zuniga, E.I. (2008). In vivo conversion of BM plasmacytoid DC into CD11b+ conventional DC during virus infection. *Eur. J. Immunol.* *38*, 3388–3394.
- Liu, Y.-J. (2005). IPC: Professional Type 1 Interferon-Producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 275–306.
- Liu, K., Waskow, C., Liu, X., Yao, K., Hoh, J., and Nussenzweig, M. (2007). Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice. *Nat. Immunol.* *8*, 578–583.
- López de Padilla, C.M., and Niewold, T.B. (2016). The type I interferons: Basic concepts and clinical relevance in immune-mediated inflammatory diseases. *Gene* *576*, 14–21.
- Maffia, P., Brewer, J.M., Gracie, J.A., Ianaro, A., Leung, B.P., Mitchell, P.J., Smith, K.M., McInnes, I.B., and Garside, P. (2004). Inducing Experimental Arthritis and Breaking Self-Tolerance to Joint-Specific Antigens with Trackable, Ovalbumin-Specific T Cells. *J. Immunol.* *173*, 151–156.
- Magnusson, M., Zare, F., and Tarkowski, A. (2006). Requirement of type I interferon signaling for arthritis triggered by double-stranded RNA. *Arthritis Rheum.* *54*, 148–157.

- Marcelletti, J.F., Ohara, J., and Katz, D.H. (1991). Collagen-induced arthritis in mice. Relationship of collagen-specific and total IgE synthesis to disease. *J. Immunol.* *147*, 4185–4191.
- Martín-Gayo, E., Sierra-Filardi, E., Corbí, A.L., and Toribio, M.L. (2010). Plasmacytoid dendritic cells resident in human thymus drive natural Treg cell development. *Blood* *115*, 5366–5375.
- Matsui, T., Connolly, J.E., Michnevitz, M., Chaussabel, D., Yu, C.-I., Glaser, C., Tindle, S., Pypaert, M., Freitas, H., Piqueras, B., et al. (2009). CD2 Distinguishes Two Subsets of Human Plasmacytoid Dendritic Cells with Distinct Phenotype and Functions. *J. Immunol.* *182*, 6815–6823.
- Matthys, P., Vermeire, K., Mitera, T., Heremans, H., Huang, S., and Billiau, A. (1998). Anti-IL-12 antibody prevents the development and progression of collagen-induced arthritis in IFN- $\gamma$  receptor-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* *28*, 2143–2151.
- Mavragani, C.P., Niewold, T.B., Moutsopoulos, N.M., Pillemer, S.R., Wahl, S.M., and Crow, M.K. (2007). Augmented interferon- $\alpha$  pathway activation in patients with Sjögren's syndrome treated with etanercept. *Arthritis Rheum.* *56*, 3995–4004.
- Mavragani, C.P., La, D.T., Stohl, W., and Crow, M.K. (2010). Association of the response to tumor necrosis factor antagonists with plasma type I interferon activity and interferon- $\beta/\alpha$  ratios in rheumatoid arthritis patients: A post hoc analysis of a predominantly Hispanic cohort. *Arthritis Rheum.* *62*, 392–401.
- McRae, B.L., Semnani, R.T., Hayes, M.P., and Van Severter, G.A. (1998). Type I IFNs inhibit human dendritic cell IL-12 production and Th1 cell development. *J. Immunol.* *160*, 4298–4304.
- Merad, M., Ginhoux, F., and Collin, M. (2008). Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 935–947.
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., and Mortha, A. (2013). The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annu. Rev. Immunol.* *31*.
- Messemer, T.C., Huizinga, T.W., and Kurreeman, F. (2015). Immunogenetics of rheumatoid arthritis: Understanding functional implications. *J. Autoimmun.* *64*, 74–81.
- Mikkola, I., Heavey, B., Horcher, M., and Busslinger, M. (2002). Reversion of B Cell Commitment upon Loss of Pax5 Expression. *Science* *297*, 110–113.
- Morelli, A.E., and Thomson, A.W. (2007). Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 610–621.
- Moseman, E.A., Liang, X., Dawson, A.J., Panoskaltsis-Mortari, A., Krieg, A.M., Liu, Y.-J., Blazar, B.R., and Chen, W. (2004). Human Plasmacytoid Dendritic Cells Activated by CpG Oligodeoxynucleotides Induce the Generation of CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *J. Immunol.* *173*, 4433–4442.
- Müller-Ladner, U., Kriegsmann, J., Franklin, B.N., Matsumoto, S., Geiler, T., Gay, R.E., and Gay, S. (1996). Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am. J. Pathol.* *149*, 1607–1615.
- Müller-Ladner, U., Ospelt, C., Gay, S., Distler, O., and Pap, T. (2007). Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Synovial fibroblasts. *Arthritis Res. Ther.* *9*, 223.

- Munn, D.H., Sharma, M.D., Hou, D., Baban, B., Lee, J.R., Antonia, S.J., Messina, J.L., Chandler, P., Koni, P.A., and Mellor, A.L. (2004). Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J. Clin. Invest.* *114*, 280–290.
- Muskardin, T.W., Vashisht, P., Dorschner, J.M., Jensen, M.A., Chrabot, B.S., Kern, M., Curtis, J.R., Danila, M.I., Cofield, S.S., Shadick, N., et al. (2016). Increased pretreatment serum IFN- $\beta$ / $\alpha$  ratio predicts non-response to tumour necrosis factor  $\alpha$  inhibition in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *75*, 1757–1762.
- Naik, S.H., Sathe, P., Park, H.-Y., Metcalf, D., Proietto, A.I., Dakic, A., Carotta, S., O’Keeffe, M., Bahlo, M., Papenfuss, A., et al. (2007). Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat. Immunol.* *8*, 1217–1226.
- Nakamachi, Y., Kawano, S., Takenokuchi, M., Nishimura, K., Sakai, Y., Chin, T., Saura, R., Kurosaka, M., and Kumagai, S. (2009). MicroRNA-124a is a key regulator of proliferation and monocyte chemoattractant protein 1 secretion in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *60*, 1294–1304.
- Nakasa, T., Miyaki, S., Okubo, A., Hashimoto, M., Nishida, K., Ochi, M., and Asahara, H. (2008). Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum.* *58*, 1284–1292.
- Narendra, S.C., Chalise, J.P., Höök, N., and Magnusson, M. (2014). Dendritic cells activated by double-stranded RNA induce arthritis via autocrine type I IFN signaling. *J. Leukoc. Biol.* *95*, 661–666.
- Neil, S.J.D., Zang, T., and Bieniasz, P.D. (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* *451*, 425–430.
- Nie, Y.J., Mok, M.Y., Chan, G.C.F., Chan, A.W., Jin, O.U., Kavikondala, S., Lie, A.K.W., and Lau, C.S. (2010). Phenotypic and functional abnormalities of bone marrow-derived dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* *12*, R91.
- Ohata, J., Zvaifler, N.J., Nishio, M., Boyle, D.L., Kalled, S.L., Carson, D.A., and Kipps, T.J. (2005). Fibroblast-like synoviocytes of mesenchymal origin express functional B cell-activating factor of the TNF family in response to proinflammatory cytokines. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 864–870.
- O’Keeffe, M., Hochrein, H., Vremec, D., Caminschi, I., Miller, J.L., Anders, E.M., Wu, L., Lahoud, M.H., Henri, S., Scott, B., et al. (2002). Mouse Plasmacytoid Cells Long-lived Cells, Heterogeneous in Surface Phenotype and Function, that Differentiate Into CD8+ Dendritic Cells Only after Microbial Stimulus. *J. Exp. Med.* *196*, 1307–1319.
- Omatsu, Y., Iyoda, T., Kimura, Y., Maki, A., Ishimori, M., Toyama-Sorimachi, N., and Inaba, K. (2005). Development of Murine Plasmacytoid Dendritic Cells Defined by Increased Expression of an Inhibitory NK Receptor, Ly49Q. *J. Immunol.* *174*, 6657–6662.
- Onai, N., Obata-Onai, A., Schmid, M.A., Ohteki, T., Jarrossay, D., and Manz, M.G. (2007). Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat. Immunol.* *8*, 1207–1216.
- Ostermann, E., Tuddenham, L., Macquin, C., Alsaleh, G., Schreiber-Becker, J., Tanguy, M., Bahram, S., Pfeffer, S., and Georgel, P. (2012). Deregulation of Type I IFN-Dependent Genes Correlates with Increased Susceptibility to Cytomegalovirus Acute Infection of Dicer Mutant Mice. *PLoS ONE* *7*, e43744.

- Otsuka, M., Jing, Q., Georgel, P., New, L., Chen, J., Mols, J., Kang, Y.J., Jiang, Z., Du, X., Cook, R., et al. (2007). Hypersusceptibility to vesicular stomatitis virus infection in Dicer1-deficient mice is due to impaired miR24 and miR93 expression. *Immunity* 27, 123–134.
- Palamara, F., Meindl, S., Holcman, M., Lührs, P., Stingl, G., and Sibia, M. (2004). Identification and Characterization of pDC-Like Cells in Normal Mouse Skin and Melanomas Treated with Imiquimod. *J. Immunol.* 173, 3051–3061.
- Pallotta, M.T., Orabona, C., Volpi, C., Vacca, C., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Servillo, G., Brunacci, C., Calvitti, M., Bicciato, S., et al. (2011). Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat. Immunol.* 12, 870–878.
- Palucka, A.K., Blanck, J.-P., Bennett, L., Pascual, V., and Banchereau, J. (2005). Cross-regulation of TNF and IFN- $\alpha$  in autoimmune diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 3372–3377.
- Pap, T., Aupperle, K.R., Gay, S., Firestein, G.S., and Gay, R.E. (2001). Invasiveness of synovial fibroblasts is regulated by p53 in the SCID mouse in vivo model of cartilage invasion. *Arthritis Rheum.* 44, 676–681.
- Pelayo, R., Hirose, J., Huang, J., Garrett, K.P., Delogu, A., Busslinger, M., and Kincade, P.W. (2005). Derivation of 2 categories of plasmacytoid dendritic cells in murine bone marrow. *Blood* 105, 4407–4415.
- Philippe, L., Meyer, A., Georgel, P., Sibia, J., Wachsmann, D., and Pfeffer, S. (2012). TLR2 expression is regulated by microRNA miR-19 in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 188, 454–461.
- Philippe, L., Alsaleh, G., Pichot, A., Ostermann, E., Zuber, G., Frisch, B., Sibia, J., Pfeffer, S., Bahram, S., Wachsmann, D., et al. (2013). MiR-20a regulates ASK1 expression and TLR4-dependent cytokine release in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Ann. Rheum. Dis.* 72, 1071–1079.
- Pierer, M., Rethage, J., Seibl, R., Lauener, R., Brentano, F., Wagner, U., Hantzschel, H., Michel, B.A., Gay, R.E., Gay, S., et al. (2004). Chemokine Secretion of Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts Stimulated by Toll-Like Receptor 2 Ligands. *J. Immunol.* 172, 1256–1265.
- Pisetsky, D.S., and Fairhurst, A.-M. (2007). The origin of extracellular DNA during the clearance of dead and dying cells. *Autoimmunity* 40, 281–284.
- Potter, K.N., Mockridge, C.I., Rahman, A., Buchan, S., Hamblin, T., Davidson, B., Isenberg, D.A., and Stevenson, F.K. (2002). Disturbances in peripheral blood B cell subpopulations in autoimmune patients. *Lupus* 11, 872–877.
- Pui, J.C., Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F.G., Bakkour, S., Lee, J.Y., Kadesch, T., Hardy, R.R., Aster, J.C., et al. (1999). Notch1 Expression in Early Lymphopoiesis Influences B versus T Lineage Determination. *Immunity* 11, 299–308.
- Rantapää-Dahlqvist, S., de Jong, B.A.W., Berglin, E., Hallmans, G., Wadell, G., Stenlund, H., Sundin, U., and van Venrooij, W.J. (2003). Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 48, 2741–2749.
- Redlich, K., Schett, G., Steiner, G., Hayer, S., Wagner, E.F., and Smolen, J.S. (2003). Rheumatoid arthritis therapy after tumor necrosis factor and interleukin-1 blockade. *Arthritis Rheum.* 48, 3308–3319.

- Reizis, B. (2010). Regulation of plasmacytoid dendritic cell development. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 206–211.
- Reizis, B., Bunin, A., Ghosh, H.S., Lewis, K.L., and Sisirak, V. (2011). Plasmacytoid Dendritic Cells: Recent Progress and Open Questions. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 163–183.
- Samuels, J., Ng, Y.-S., Coupillaud, C., Paget, D., and Meffre, E. (2005). Impaired early B cell tolerance in patients with rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* 201, 1659–1667.
- Sany, J. (2003). Polyarthrite rhumatoïde de l'adulte : conception actuelle (John Libbey Eurotext).
- Sathaliyawala, T., O'Gorman, W.E., Greter, M., Bogunovic, M., Konjufca, V., Hou, Z.E., Nolan, G.P., Miller, M.J., Merad, M., and Reizis, B. (2010). Mammalian Target of Rapamycin Controls Dendritic Cell Development Downstream of Flt3 Ligand Signaling. *Immunity* 33, 597–606.
- Sawai, C.M., Sisirak, V., Ghosh, H.S., Hou, E.Z., Ceribelli, M., Staudt, L.M., and Reizis, B. (2013). Transcription factor Runx2 controls the development and migration of plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 210, 2151–2159.
- Scheffler, J.M., Sparber, F., Tripp, C.H., Herrmann, C., Humenberger, A., Blitz, J., Romani, N., Stoitzner, P., and Huber, L.A. (2014). LAMTOR2 regulates dendritic cell homeostasis through FLT3-dependent mTOR signalling. *Nat. Commun.* 5, 5138.
- Schiavoni, G., Mattei, F., Sestili, P., Borghi, P., Venditti, M., Morse, H.C., Belardelli, F., and Gabriele, L. (2002). ICSBP Is Essential for the Development of Mouse Type I Interferon-producing Cells and for the Generation and Activation of CD8 $\alpha$ + Dendritic Cells. *J. Exp. Med.* 196, 1415–1425.
- Schilling, P.J., Kurzrock, R., Kantarjian, H., Gutterman, J.U., and Talpaz, M. (1991). Development of systemic lupus erythematosus after interferon therapy for chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 68, 1536–1537.
- Schlitzer, A., Heiseke, A.F., Einwächter, H., Reindl, W., Schiemann, M., Manta, C.-P., See, P., Niess, J.-H., Suter, T., Ginhoux, F., et al. (2012). Tissue-specific differentiation of a circulating CCR9– pDC-like common dendritic cell precursor. *Blood* 119, 6063–6071.
- Schotte, R., Nagasawa, M., Weijer, K., Spits, H., and Blom, B. (2004). The ETS Transcription Factor Spi-B Is Required for Human Plasmacytoid Dendritic Cell Development. *J. Exp. Med.* 200, 1503–1509.
- Schwarz, E.M., Looney, R.J., Drissi, M.H., O'keefe, R.J., Boyce, B.F., Xing, L., and Ritchlin, C.T. (2006). Autoimmunity and Bone. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1068, 275–283.
- Scott, D.L., Wolfe, F., and Huizinga, T.W. (2010). Rheumatoid arthritis. *The Lancet* 376, 1094–1108.
- Sellam, J., Rouanet, S., Hendel-Chavez, H., Abbed, K., Sibia, J., Tebib, J., Le Loët, X., Combe, B., Dougados, M., Mariette, X., et al. (2011). Blood memory B cells are disturbed and predict the response to rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 63, 3692–3701.
- Semaan, N., Frenzel, L., Alsaleh, G., Suffert, G., Gottenberg, J.-E., Sibia, J., Pfeffer, S., and Wachsmann, D. (2011). miR-346 Controls Release of TNF- $\alpha$  Protein and Stability of Its mRNA in Rheumatoid Arthritis via Tristetraprolin Stabilization. *PLoS ONE* 6, e19827.



- Shortman, K., Sathe, P., Vremec, D., Naik, S., and O’Keeffe, M. (2013). Chapter Four - Plasmacytoid Dendritic Cell Development. In *Advances in Immunology*, K.M.M. and M. Merad, ed. (Academic Press), pp. 105–126.
- Siegel, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y.-J. (1999). The Nature of the Principal Type 1 Interferon-Producing Cells in Human Blood. *Science* *284*, 1835–1837.
- Singh, A., Rajasekaran, N., Hartenstein, B., Szabowski, S., Gajda, M., Angel, P., Bräuer, R., and Illges, H. (2013). Collagenase-3 (MMP-13) deficiency protects C57BL/6 mice from antibody-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.* *15*, R222.
- Sitnicka, E., Buza-Vidas, N., Ahlenius, H., Cilio, C.M., Gekas, C., Nygren, J.M., Månsson, R., Cheng, M., Jensen, C.T., Svensson, M., et al. (2007). Critical role of FLT3 ligand in IL-7 receptor-independent T lymphopoiesis and regulation of lymphoid-primed multipotent progenitors. *Blood* *110*, 2955–2964.
- Smeets, T.J., Dayer, J.M., Kraan, M.C., Versendaal, J., Chicheportiche, R., Breedveld, F.C., and Tak, P.P. (2000). The effects of interferon-beta treatment of synovial inflammation and expression of metalloproteinases in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *43*, 270–274.
- Smolen, J.S., and Aletaha, D. (2015). Rheumatoid arthritis therapy reappraisal: strategies, opportunities and challenges. *Nat. Rev. Rheumatol.* *advance online publication*.
- Stanczyk, J., Ospelt, C., Karouzakis, E., Filer, A., Raza, K., Kolling, C., Gay, R., Buckley, C.D., Tak, P.P., Gay, S., et al. (2011). Altered expression of microRNA-203 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and its role in fibroblast activation. *Arthritis Rheum.* *63*, 373–381.
- Steinbach, F., Krause, B., and Thiele, B. (1995). Monocyte derived dendritic cells (MODC) present phenotype and functional activities of Langerhans cells/dendritic cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* *378*, 151–153.
- Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* *137*, 1142–1162.
- Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1974). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J. Exp. Med.* *139*, 380–397.
- Strand, V., Kimberly, R., and Isaacs, J.D. (2007). Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions. *Nat. Rev. Drug Discov.* *6*, 75–92.
- Sweeney, S.E., Corr, M., and Kimbler, T.B. (2012). Role of interferon regulatory factor 7 in serum-transfer arthritis: Regulation of interferon- $\beta$  production. *Arthritis Rheum.* *64*, 1046–1056.
- Swiecki, M., and Colonna, M. (2015). The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 471–485.
- Swiecki, M., Gilfillan, S., Vermi, W., Wang, Y., and Colonna, M. (2010). Plasmacytoid Dendritic Cell Ablation Impacts Early Interferon Responses and Antiviral NK and CD8+ T Cell Accrual. *Immunity* *33*, 955–966.
- Swiecki, M., Wang, Y., Gilfillan, S., and Colonna, M. (2013). Plasmacytoid Dendritic Cells Contribute to Systemic but Not Local Antiviral Responses to HSV Infections. *PLOS Pathog* *9*, e1003728.

- Tak, P. (1999). The effects of interferon beta treatment on arthritis. *Rheumatology* 38, 362–369.
- Takemura, S., Braun, A., Crowson, C., Kurtin, P.J., Cofield, R.H., O’Fallon, W.M., Goronzy, J.J., and Weyand, C.M. (2001). Lymphoid Neogenesis in Rheumatoid Synovitis. *J. Immunol.* 167, 1072–1080.
- Tarallo, V., Hirano, Y., Gelfand, B.D., Dridi, S., Kerur, N., Kim, Y., Cho, W.G., Kaneko, H., Fowler, B.J., Bogdanovich, S., et al. (2012). DICER1 loss and Alu RNA induce age-related macular degeneration via the NLRP3 inflammasome and MyD88. *Cell* 149, 847–859.
- Tel, J., Aarntzen, E.H.J.G., Baba, T., Schreibelt, G., Schulte, B.M., Benitez-Ribas, D., Boerman, O.C., Croockewit, S., Oyen, W.J.G., Rossum, M. van, et al. (2013). Natural Human Plasmacytoid Dendritic Cells Induce Antigen-Specific T-Cell Responses in Melanoma Patients. *Cancer Res.* 73, 1063–1075.
- Thordardottir, S., Hangalapura, B.N., Hutten, T., Cossu, M., Spanholtz, J., Schaap, N., Radstake, T.R.D.J., van der Voort, R., and Dolstra, H. (2014). The aryl hydrocarbon receptor antagonist StemRegenin 1 promotes human plasmacytoid and myeloid dendritic cell development from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells Dev.* 23, 955–967.
- Tolaymat, A., Leventhal, B., Sakarcan, A., Kashima, H., and Monteiro, C. (1992). Systemic lupus erythematosus in a child receiving long-term interferon therapy. *J. Pediatr.* 120, 429–432.
- Tomasello, E., Pollet, E., Vu Manh, T.-P., Uzé, G., and Dalod, M. (2014). Harnessing mechanistic knowledge on beneficial versus deleterious IFN-I effects to design innovative immunotherapies targeting cytokine activity to specific cell types. *Microb. Immunol.* 5, 526.
- Treilleux, I., Blay, J.-Y., Bendriss-Vermare, N., Ray-Coquard, I., Bachelot, T., Guastalla, J.-P., Bremond, A., Goddard, S., Pin, J.-J., Barthelemy-Dubois, C., et al. (2004). Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 10, 7466–7474.
- Udalova, I.A., Mantovani, A., and Feldmann, M. (2016). Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 12, 472–485.
- van Loosdregt, J., Fleskens, V., Tiemessen, M.M., Mokry, M., van Boxtel, R., Meerding, J., Pals, C.E.G.M., Kurek, D., Baert, M.R.M., Delemarre, E.M., et al. (2013). Canonical Wnt Signaling Negatively Modulates Regulatory T Cell Function. *Immunity* 39, 298–310.
- Vermeire, K., Heremans, H., Vandeputte, M., Huang, S., Billiau, A., and Matthys, P. (1997). Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice. *J. Immunol.* 158, 5507–5513.
- Vervoordeldonk, M.J., Aalbers, C.J., and Tak, P.P. (2009). Interferon  $\beta$  for rheumatoid arthritis: new clothes for an old kid on the block. *Ann. Rheum. Dis.* 68, 157–158.
- Vittecoq, O. (2013). Polyarthriterhumatoïde Optimiser le parcours de soins pour une prise en charge personnalisée vers la rémission. *Le Concours médical.*
- Vremec, D., O’Keeffe, M., Hochrein, H., Fuchsberger, M., Caminschi, I., Lahoud, M., and Shortman, K. (2007). Production of interferons by dendritic cells, plasmacytoid cells, natural killer cells, and interferon-producing killer dendritic cells. *Blood* 109, 1165–1173.
- Vu Manh, T.-P., and Dalod, M. (2016). Characterization of Dendritic Cell Subsets Through Gene Expression Analysis. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1423, 211–243.

- Vu Manh, T.-P., Bertho, N., Hosmalin, A., Schwartz-Cornil, I., and Dalod, M. (2015). Investigating evolutionary conservation of dendritic cell subset identity and functions. *Antigen Present. Cell Biol.* 260.
- Wang, L., Wang, F.-S., and Gershwin, M.E. (2015). Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *J. Intern. Med.* 278, 369–395.
- Wang, Y., Swiecki, M., McCartney, S.A., and Colonna, M. (2011). dsRNA sensors and plasmacytoid dendritic cells in host defense and autoimmunity. *Immunol. Rev.* 243, 74–90.
- Wang, Y., Shaked, I., Stanford, S.M., Zhou, W., Curtsinger, J.M., Mikulski, Z., Shaheen, Z.R., Cheng, G., Sawatzke, K., Campbell, A.M., et al. (2013). The autoimmunity-associated gene PTPN22 potentiates toll-like receptor-driven, type 1 interferon-dependent immunity. *Immunity* 39, 111–122.
- Waskow, C., Liu, K., Darrasse-Jèze, G., Guermonprez, P., Ginhoux, F., Merad, M., Shengelia, T., Yao, K., and Nussenzweig, M. (2008). The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nat. Immunol.* 9, 676–683.
- Wendland, M., Czeloth, N., Mach, N., Malissen, B., Kremmer, E., Pabst, O., and Förster, R. (2007). CCR9 is a homing receptor for plasmacytoid dendritic cells to the small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 6347–6352.
- Wittmann, J., and Jäck, H.-M. (2011). microRNAs in rheumatoid arthritis: midget RNAs with a giant impact. *Ann. Rheum. Dis.* 70, i92–i96.
- Wong, T., Majchrzak, B., Bogoch, E., Keystone, E.C., and Fish, E.N. (2003). Therapeutic implications for interferon-alpha in arthritis: a pilot study. *J. Rheumatol.* 30, 934–940.
- Wright, H.L., Moots, R.J., and Edwards, S.W. (2014). The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 10, 593–601.
- Wu, H.-J., Sawaya, H., Binstadt, B., Brickelmaier, M., Blasius, A., Gorelik, L., Mahmood, U., Weissleder, R., Carulli, J., Benoist, C., et al. (2007). Inflammatory arthritis can be reined in by CpG-induced DC–NK cell cross talk. *J. Exp. Med.* 204, 1911–1922.
- Wu, L., Nichogiannopoulou, A., Shortman, K., and Georgopoulos, K. (1997). Cell-Autonomous Defects in Dendritic Cell Populations of Ikaros Mutant Mice Point to a Developmental Relationship with the Lymphoid Lineage. *Immunity* 7, 483–492.
- Yagi, H., Nomura, T., Nakamura, K., Yamazaki, S., Kitawaki, T., Hori, S., Maeda, M., Onodera, M., Uchiyama, T., Fujii, S., et al. (2004). Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int. Immunol.* 16, 1643–1656.
- Yang, J.-S., Phillips, M.D., Betel, D., Mu, P., Ventura, A., Siepel, A.C., Chen, K.C., and Lai, E.C. (2011). Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA\* species. *RNA* 17, 312–326.
- Yang, J.-Y., Kim, M.-S., Kim, E., Cheon, J.H., Lee, Y.-S., Kim, Y., Lee, S.-H., Seo, S.-U., Shin, S.-H., Choi, S.S., et al. (2016). Enteric Viruses Ameliorate Gut Inflammation via Toll-like Receptor 3 and Toll-like Receptor 7-Mediated Interferon- $\beta$  Production. *Immunity* 44, 889–900.
- Yokogawa, M., Takaishi, M., Nakajima, K., Kamijima, R., Fujimoto, C., Kataoka, S., Terada, Y., and Sano, S. (2014). Epicutaneous Application of Toll-like Receptor 7 Agonists Leads to Systemic

- Autoimmunity in Wild-Type Mice: A New Model of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* Hoboken NJ 66, 694–706.
- Young, C.L., Adamson, T.C., Vaughan, J.H., and Fox, R.I. (1984). Immunohistologic characterization of synovial membrane lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 27, 32–39.
- Young, L.J., Wilson, N.S., Schnorrer, P., Proietto, A., ten Broeke, T., Matsuki, Y., Mount, A.M., Belz, G.T., O’Keeffe, M., Ohmura-Hoshino, M., et al. (2008). Differential MHC class II synthesis and ubiquitination confers distinct antigen-presenting properties on conventional and plasmacytoid dendritic cells. *Nat. Immunol.* 9, 1244–1252.
- Zeisel, M.B., Neff, L.A., Randle, J., Klein, J.-P., Sibilica, J., and Wachsmann, D. (2004). Impaired release of IL-18 from fibroblast-like synoviocytes activated with protein I/II, a pathogen-associated molecular pattern from oral streptococci, results from defective translation of IL-18 mRNA in pro-IL-18. *Cell. Microbiol.* 6, 593–598.
- Zhang, J., Raper, A., Sugita, N., Hingorani, R., Salio, M., Palmowski, M.J., Cerundolo, V., and Crocker, P.R. (2006). Characterization of Siglec-H as a novel endocytic receptor expressed on murine plasmacytoid dendritic cell precursors. *Blood* 107, 3600–3608.
- Zou, W., Machelon, V., Coulomb-L’Hermin, A., Borvak, J., Nome, F., Isaeva, T., Wei, S., Krzysiek, R., Durand-Gasselino, I., Gordon, A., et al. (2001). Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat. Med.* 7, 1339–1346.
- Zuniga, E.I., McGavern, D.B., Pruneda-Paz, J.L., Teng, C., and Oldstone, M.B.A. (2004). Bone marrow plasmacytoid dendritic cells can differentiate into myeloid dendritic cells upon virus infection. *Nat. Immunol.* 5, 1227–1234.
- Zvaifler, N.J. (1973). The immunopathology of joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Adv. Immunol.* 16, 265–336.
- (2007). On The Occurrence Of A Factor In Human Serum Activating The Specific Agglutination of Sheep Blood Corpuscles. *APMIS* 115, 422–438.

## Contribution à l'étude de la pathogénèse de la Polyarthrite Rhumatoïde

### Analyse des mécanismes régulateurs de la réponse inflammatoire

**RESUME :** Durant ce travail de thèse j'ai étudié des mécanismes de contrôle de la réponse inflammatoire qui, lorsqu'ils sont dérégulés, peuvent mener à une pathologie autoimmune/autoinflammatoire sévère, la Polyarthrite Rhumatoïde (PR). J'ai essentiellement analysé deux aspects de ces mécanismes : en premier lieu, j'ai pu participer à la démonstration de l'importance de l'endonucléase DICER (impliquée dans la biogénèse des microARNs - miRs), dans le contexte de la PR, particulièrement au niveau des synoviocytes type fibroblastique (FLS), des cellules résidentes de la cavité synoviale. J'ai aussi initié une étude visant à identifier, *in vivo*, l'intégralité des transcrits dont l'expression est régulée par des miRs dans les FLS de patients atteints de PR. En plus de fournir une vision globale de la régulation miR-dépendante dans ces cellules, ce travail permettra aussi d'identifier des cibles de miRs d'intérêt dans la PR en s'affranchissant des prédictions bio-informatiques qui peuvent s'avérer incorrectes. Un second axe de mon projet de thèse avait pour objectif de fournir une meilleure description du dialogue intercellulaire dans la cavité articulaire. Pour cela, je me suis plus particulièrement intéressé au rôle des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) dans la physiopathologie de la PR. Ainsi j'ai pu démontrer un rôle protecteur de ces cellules (initialement décrites pour leurs fonctions dans la défense antivirale), dans le contexte de l'arthrite inflammatoire dans plusieurs modèles murins. Ces travaux m'ont permis de proposer une stratégie thérapeutique innovante, basée sur le recrutement articulaire des pDCs. Cette approche, non invasive (par application topique de crème contenant 5% d'imiquimod), s'est montrée efficace aussi bien pour la réduction des symptômes cliniques de l'inflammation que pour l'amélioration des marqueurs biologiques comme l'érosion osseuse.

Mots-clés : Polyarthrite Rhumatoïde, Dicer, cellule dendritique plasmacytoïde, imiquimod.

**ABSTRACT:** During my PhD, I studied the mechanisms that control inflammation which, when disturbed, can lead to a severe autoimmune/ auto inflammatory disease, rheumatoid arthritis (RA). My work was focused on the analysis of two aspects in these mechanisms: first, I participated to an analysis of the roles of the endonuclease DICER (involved in the biogenesis of microRNAs – miRs) in the pathogenesis of RA, specifically in fibroblast-like synoviocytes (FLS), which are resident cells of the synovial cavity. I also initiated a study aiming at the identification of the FLS transcriptome which is regulated by miRs in RA patients. This approach will provide an overview of the miR-dependent regulation in these cells and enable the identification of *in vivo* validated miR-targeted mRNAs in RA. A second axis of my thesis project aimed at providing a better description of the intercellular dialogue in the joint cavity. For this, I was particularly interested in the role of plasmacytoid dendritic cells (pDCs) in the pathophysiology of RA. I demonstrated a protective role of these cells (initially described for their functions in antiviral defense) in the context of inflammatory arthritis in several mouse models. During this work, I had the opportunity to try an innovative therapeutic strategy based on the recruitment and activation of pDCs in the joints. This noninvasive and painless approach (topical application of cream containing 5% imiquimod) was effective in reducing inflammatory clinical symptoms and also improved biological markers such as bone erosion.

Key words: Rheumatoid arthritis, Dicer, plasmacytoid dendritic cell, imiquimod