



HAL
open science

Effets d'HLA-B27 sur la voie BMP/TGFbeta dans les lymphocytes T CD4+, dans le contexte de la spondyloarthrite

Marc Lauraine

► **To cite this version:**

Marc Lauraine. Effets d'HLA-B27 sur la voie BMP/TGFbeta dans les lymphocytes T CD4+, dans le contexte de la spondyloarthrite. Immunité adaptative. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT: 2023UPASL130 . tel-04555274

HAL Id: tel-04555274

<https://theses.hal.science/tel-04555274>

Submitted on 22 Apr 2024

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.

Effets d'HLA-B27 sur la voie BMP/TGF β dans les lymphocytes T CD4⁺, dans le contexte de la spondyloarthrite

HLA-B27 effects on the BMP/TGF β pathway in CD4⁺ T cells in the context of
spondyloarthritis

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 577, Structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)

Spécialité de doctorat : Biologie moléculaire et cellulaire

Graduate School: Life Sciences and Health. Référent : Université de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Infection et Inflammation**,

(Université Paris-Saclay, UVSQ, Inserm)

sous la direction de **Maxime BREBAN**, PU-PH,

et la co-direction de **Luiza ARAUJO-KRAUSE**, IR

Thèse soutenue à Montigny-le-Bretonneux, le 18 décembre 2023, par

Marc LAURINE

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Sabine BAILLY

DR, CEA Grenoble, INSERM, Université de Grenoble-
Alpes Présidente

Julien MARIE

DR, CRCL, Université Claude Bernard Lyon 1 Rapporteur & Examineur

Corinne MICELI

PU-PH, Université Paris-Cité, Hôpital Cochin Rapportrice & Examinatrice

Jérôme AVOUAC

PU-PH, Université de Paris, Hôpital Cochin Examineur

François LEGOUX

CR, Institut Curie, Université de Rennes 1 Examineur

Titre : Effets d'HLA-B27 sur la voie BMP/TGF β dans les lymphocytes T CD4⁺, dans le contexte de la spondyloarthrite

Mots clés : signalisation BMP/TGF β ; spondyloarthrite ; HLA-B27 ; lymphocytes T CD4⁺

Résumé : La spondyloarthrite (SpA) est une maladie inflammatoire chronique fréquente. Chez l'Homme, l'association entre l'allèle HLA-B27 du complexe majeur d'histocompatibilité de classe-I (CMH-I) et le développement de la maladie a été démontrée il y a 50 ans, 70 à 90% des patients atteints de SpA étant porteurs de cet allèle. Cependant, le rôle exact du HLA-B27 dans la physiopathologie de la SpA reste inconnu. Le modèle du rat transgénique pour le HLA-B27 et la β 2-microglobuline humaine (h β 2m) (rat B27), qui développe des manifestations similaires à la maladie humaine, a permis d'éclaircir certains aspects de la question. Notamment, l'implication des lymphocytes T (LT) CD4⁺ dans la SpA a pu être mise en évidence. Chez le rat B27, les LT CD4⁺ régulateurs (Treg) présentent un déséquilibre de la balance interleukine-10/interleukine-17 (IL-10/IL-17), respectivement anti- et pro- inflammatoires. D'autre part, une expansion de la sous-population des LT CD4⁺ helper 17 (Th17) pro-inflammatoires, producteurs d'IL-17 est observée aussi bien chez le rat B27 que chez les patients. Dans le but d'étudier les effets non-canoniques du HLA-B27, un modèle de *Drosophila melanogaster* transgénique pour le HLA-B27 et la h β 2m a été développé et a permis de mettre en évidence qu'une interaction entre le HLA-B27 et des récepteurs de type I de la voie BMP/TGF β (BMPRI) altérait la formation des veines transversales de l'aile. Dans ce modèle, il a précédemment été montré une interaction entre le HLA-B27 et le récepteur Saxophone (Sax) conduisant à l'augmentation de la signalisation BMP. Notre étude a complété ces résultats en montrant qu'une signalisation aberrante passant par le BMPRI Baboon (Babo) de la voie de l'activine/TGF β participait aussi au phénotype anormal induit par l'expression du HLA-B27. Pour tenter d'extrapoler ces résultats à un mécanisme de pathogénicité du HLA-B27 au cours de la SpA, nous avons tout d'abord démontré qu'il existait une interaction spécifique entre HLA-B27 et l'activin receptor-like kinase 2 (ALK2), orthologue de Sax d'une part, mais aussi avec ALK5, le récepteur de type 1 au TGF β orthologue de Babo dans les lymphocytes de rat B27. L'étude de SMAD2/3, le principal transducteur du signal TGF β , dans les LT de rats B27 et non transgéniques révèle une phosphorylation basale plus faible et une amplitude de phosphorylation plus forte après stimulation par le TGF β 1. De façon concordante, nous avons observé que certains gènes induits par la signalisation TGF β et impliqués dans la différenciation des Treg et Th17 (Foxp3, Rorc, Runx1) avaient une expression augmentée dans les LT CD4⁺ naïfs (Tn) de rat B27. Ensemble, ces résultats indiquent une possible activation précoce de la voie TGF β dans les Tn des rats B27 suivie d'une boucle de rétrocontrôle négatif. De façon intéressante, le gène *Tgfb1* lui-même était diminué. Compte tenu de l'importance du TGF β 1 autocrine produit par les LT pour prévenir l'inflammation chronique, ces observations ouvrent des perspectives pour mieux comprendre le rôle du HLA-B27 dans le développement de la SpA. Nous pourrions en particulier, étudier de façon plus approfondie la réponse des Tn de rats B27 au TGF β 1 par des méthodes multi-omiques (transcriptomique, phosphoprotéomique, protéomique...). Enfin, compte tenu du rôle essentiel du TGF β 1 autocrine dans le maintien des profils Treg et Th17, une étude de la plasticité des Treg et Th17 des rats B27 serait pertinentes pour mieux comprendre la physiopathologie de la SpA.

Title : HLA-B27 effects on the BMP/TGF β pathway in CD4⁺ T cells in the context of spondyloarthritis.

Keywords : BMP/TGF β pathway; spondyloarthritis ; HLA-B27; CD4⁺ T cells

Abstract : Spondyloarthritis (SpA) is a common chronic inflammatory disease. In human, the association between the HLA-B27 allele of the class-I major histocompatibility complex (MHC-I) and the development of this disease was demonstrated 50 years ago, with 70-90% of SpA patients carrying this allele. However, the exact role of HLA-B27 in the pathophysiology of SpA remains unknown. The model of rat transgenic for HLA-B27 and the human β 2-microglobulin (h β 2m) (B27 rat), which develops manifestations similar to the human disease, has shed light on certain aspects of the question. In particular, the involvement of CD4⁺ T lymphocytes in SpA has been demonstrated. In the B27 rat, regulatory CD4⁺ T lymphocytes (Treg) exhibit an imbalance of the interleukin-10/interleukin-17 (IL-10/IL-17) ratio, which are anti-inflammatory and pro-inflammatory, respectively. On the other hand, an expansion of the sub-population of pro-inflammatory CD4⁺ T helper 17 (lymphocytes Th17), which produce IL-17, was observed in both B27 rats and SpA patients. To study the non-canonical effects of HLA-B27, a *Drosophila melanogaster* model transgenic for HLA-B27 and h β 2m was developed and demonstrated that an interaction between HLA-B27 and type I receptors of the BMP/TGF β pathway (BMPRI1s) altered the formation of the wing transverse veins. In this model, an interaction between HLA-B27 and the Saxophone (Sax) receptor has previously been shown to lead to increased BMP signaling. Our study complemented these results by showing that aberrant signaling via the BMPRI1 Baboon (Babo) of the activin/TGF β pathway also contributed to the abnormal phenotype induced by HLA-B27 expression. In an attempt to extrapolate these results to a mechanism of HLA-B27 pathogenicity in SpA, we first demonstrated that there was a specific interaction between HLA-B27 and activin receptor-like kinase 2 (ALK2), the orthologue of Sax, and also with ALK5, the type 1 receptor for TGF β orthologue of Babo, in rat B27 lymphocytes. Study of SMAD2/3, the main transducer of the TGF β signal, in T lymphocytes from B27 and nontransgenic rats revealed a lower basal phosphorylation and a higher amplitude of phosphorylation after stimulation by TGF β 1. Concordantly, we observed that several genes induced by TGF β signaling and involved in Treg and Th17 differentiation (Foxp3, Rorc, Runx1) had increased expression in naive CD4⁺ T lymphocytes (Tn) from B27 rats. Taken together, these results indicate a possible early activation of the TGF β pathway in B27 rat Tn followed by a negative feedback loop. Interestingly, the *Tgfb1* gene itself was decreased. Given the importance of autocrine TGF β 1 produced by T lymphocytes in preventing chronic inflammation, these observations open up prospects for a better understanding of the role of HLA-B27 in the development of SpA. In particular, we propose to study in greater depth the response of Tn from B27 rats to TGF β 1 using multi-omics methods (transcriptomic, phosphoproteomic, proteomic). Finally, given the essential role of autocrine TGF β 1 in the maintenance of Treg and Th17 profiles, a study of the plasticity of Treg and Th17 in B27 rat would be relevant to a better understanding of the pathophysiology of SpA.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier **Pr. Corinne Miceli** et **Dr. Julien Marie** d'avoir accepté d'être mes rapporteurs de thèse. Je tiens également à remercier les membres de mon jury, **Dr. Sabine Bailly**, **Dr. François Legoux** et **Pr. Jérôme Avouac**. Un grand merci à vous de prendre le temps d'évaluer mes travaux de thèse.

Merci également à **Dr. Loredana Saveanu**, **Dr. Carole Bougault** et **Pr. Helge Amthor** d'avoir été présents à tous mes comités de thèse.

Je tiens ensuite à remercier chaleureusement **Pr. Maxime Breban** et **Dr. Luiza Araujo-Krause** pour leur encadrement tout au long de cette thèse.

Merci à vous **Maxime** de prendre le temps de discuter avec chacun des thésards du laboratoire, de nous conseiller et de nous faire partager votre expertise sur ce sujet complexe et passionnant qu'est la spondyloarthrite. Merci également de nous donner les ressources nécessaires pour nos expérimentations. Merci de m'avoir donné l'opportunité de présenter mes travaux. Enfin, merci pour toutes vos relectures et corrections.

Merci à toi **Luiza** pour ta disponibilité, ta patience et ton optimisme en toute circonstance. J'ai eu beaucoup de chance de t'avoir comme co-directrice de thèse. Tu as toujours pris le temps de m'expliquer et parfois (vraiment à de très rares occasions !)... de me réexpliquer certaines choses. Merci pour ton esprit d'équipe et de m'avoir aidé lors des expériences. Merci également pour toutes tes relectures et corrections, que ce soient de mes diapos, de mes posters, de mes abstracts ou encore de ma thèse. Je n'aurais pas pu espérer mieux comme encadrante et ce fut un plaisir de partager ton bureau durant ces 4 années.

D'ailleurs, merci à notre ancien colocataire de bureau **Bibi** pour ta bonne humeur sans faille et tes playlists musicales de l'après-midi. Et également à **Eneida**, notre nouvelle colocataire de bureau, c'était très agréable de travailler avec toi. J'espère que tu auras apprécié ton passage chez Iris.

Merci **Simon** pour tes nombreux conseils et tes remarques scientifiques pertinentes. Mais merci aussi pour les verres au BDT, le semi-marathon et le trail ! Et de façon générale d'être l'instigateur d'activités de groupe. J'espère que tu ne m'en voudras pas de ne jamais t'avoir fait de gâteau au chocolat.

Merci **Aude** pour ton expertise en microscopie et cytométrie et ta disponibilité pour répondre à mes questions.

Merci **Amel** pour ta bonne humeur et tes bêtises ; **Manon** pour ton plaid qui m'a sauvé lors des longues sessions au confocal ; **Gerlando** pour la visite de Naples lors du congrès IGAS.

Je tiens à remercier chaleureusement toute **l'équipe Iris**, les permanents (**Luiza**, **Simon**, **Aude**, **Félicie**) et les non-permanents (**Amel**, **Bilade**, **Eneida**, **Hendrick**, **Manon**, **Eva**, **Gerlando**, **Alaa**, **Anne-Laure**, **Tom**, **Marie**) de rendre cette équipe si agréable et d'en faire un environnement où il fait bon travailler.

Merci à **Maxime**, **Luiza**, **Simon** et **Isabelle**, avec qui j'ai fait le premier entretien pour obtenir cette thèse il y a 4 ans, de m'avoir donné ma chance.

Merci à nos collaborateurs du LGBC: **Isabelle, Maxence, Vincent, Aurore, Emma** et **Sébastien**. En particulier **Maxence** pour tes travaux sur l'interaction génétique d'HLA-B27 avec la voie activine. J'espère que le modèle drosophile continuera de donner des résultats aussi intéressants.

Merci aussi aux autres personnes du 3^{ème} étage : **Elodie, Leila, Marion H., Amadoune, Mélanie, Christine, Delphine**. Merci aussi à nos gestionnaires successifs **Justine** puis **Emeric** pour votre efficacité.

Je voulais aussi remercier **Christophe Lefebvre** qui avait pris le temps de venir discuter avec moi lors de mon année de L3 particulièrement difficile. Ça m'a beaucoup marqué et je m'étais fait la promesse de vous remercier dans ma thèse, c'est chose faite, merci à vous.

Merci les copains de l'escalade: **Suzanne, Ivan, Solène, Pierre, Éric, Coach Gauthier Dubuduc, Jeff, Son** et **Lily, Roman** et à tous les autres. Ce moment d'évasion totale qu'est l'escalade n'était que plus agréable en votre compagnie !

Merci aux autres copains : **Romain, Adrien** et **Carole, Patou, Manon, Hugues, Mathieu** (les deux), **Yoann, Tanguy, Killian** et **Anne-So**.

Merci **Victor**, tu as rendu la période McDo plus agréable avec le MarcTor à l'efficacité implacable, les lundis soir déguisement sans oublier Funeral Bell de Black Label Society. L'air de rien ça m'a aidé à tenir. Nos soirées musiques durant lesquelles tu m'as fait découvrir des groupes de folie qui m'ont accompagné tout au long de ma thèse et de ma rédaction.

Merci aussi à vous **Tom** et **Arnaud** pour votre soutien sans faille dans les moments difficiles. C'est aussi grâce à vous que j'ai pu en arriver là aujourd'hui. Pour votre aide morale durant la fac merci à **Laura** et encore à **Victor**.

Merci **Maminou** et **Opapika** (il paraît que vous vous appelez Françoise et Michel mais je n'y crois pas) pour votre soutien indéfectible durant toutes mes études. Sans vous, j'aurais difficilement pu atteindre cet objectif. Vous avez toujours été là pour m'aider.

Merci **Suzanne** et **Jean-Loup** de nous avoir accueillis sur le plateau de Hauteville dans un cadre très agréable pour commencer ma rédaction de thèse.

Merci à tous mes cousins et ma cousine : le trio **Antoine, Nico, Denis**, et le duo **Rafaela** et **Guillaume**. Comme dirait Oma, je suis fière ! Merci aussi à **Oma, Gundula, Paul** et à mon frère **Yann** et ma sœur **Tania**.

Merci **Papa** et **Maman** de m'avoir encouragé et soutenu pendant ma thèse.

Danke **Mama**, dass du immer Deutsch mit mir gesprochen hast. Es hat mir sehr geholfen, vor allem beim Lernen der englischen Sprache, die ich in der Wissenschaft brauche, aber auch im Allgemeinen ist es ein Pluspunkt. Ich habe bei der Danksagung ein wenig geschummelt, weil ich Deutsch verstehe aber nicht schreiben kann. (Danke Suzanne für die Korrektur).

Merci à mon amoureuse **Charlotte** ! Merci à toi. C'est très simple, sans toi je n'aurais même pas postulé pour ce sujet puisqu'après les deux concours de l'ED j'avais baissé les bras. Mais tu sais à quel point j'aime la biologie à quel point je voulais faire une thèse. Tu m'as encouragé et poussé à tenter ma chance et ça a payé. Merci à toi pour tes conseils sur mes présentations mais aussi sur ma thèse. Merci pour ta patience et tes encouragements. Mais merci aussi pour toutes ces aventures inoubliables qu'on a vécu pendant nos thèses respectives : le tour des Ecrins, la traversée du Vercors en raquette, Ailefroide, les trails, toutes nos randonnées en montagne, l'Irlande, le surf... ah non... toujours pas, le paddle le long de la côte de Granite rose ducoup ! et nos ridiculement courtes sessions d'escalade. Outre la thèse, je ne sais pas trop où j'en serais sans toi, sans doute pas là donc merci à toi.

Table des matières

REMERCIEMENTS	1
TABLE DES MATIERES	5
TABLE DES ILLUSTRATIONS	9
LISTE DES ABRÉVIATIONS	10
INTRODUCTION	14
I. LA SPONDYLOARTHRITE	15
A. LES SOUS-TYPES DE SPONDYLOARTHRITE, EPIDEMIOLOGIE ET ASPECTS CLINIQUES	15
1. Spondyloarthrite axiale	15
2. Spondyloarthrite périphérique	19
3. Atteintes extra-articulaires	19
4. Prévalence des atteintes articulaires périphériques et extra-articulaires au cours de la SpA axiale	21
5. L'arthrite réactionnelle	21
6. La SpA juvénile	22
B. ETIOLOGIE	22
1. Facteurs génétiques	22
HLA-B27	22
La présentation peptidique	26
L'axe IL-23/Th17	26
La différenciation et l'activation lymphocytaire	27
La voie des récepteurs couplés aux protéines G	27
2. Facteurs environnementaux	28
Infection par <i>Klebsiella pneumoniae</i>	28
Microbiote	28
C. L'IMPLICATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE DANS LA SPA	32
D. DIAGNOSTIC	32
E. TRAITEMENT	33
II. LE COMPLEXE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITE DE CLASSE I (CMH-I) : HLA-B	36
A. STRUCTURE ET FONCTION	36
B. SYNTHÈSE, REPLIEMENT ET APPRETEMENT DES MOLECULES DU CMH-I	38
C. HLA-B27, UN ALLELE PARTICULIER ?	38
1. Un repliement laborieux	38

2. Le peptide arthritogène	42
III. LES MODELES ANIMAUX D'ETUDE DE LA SPA.....	44
A. LE RAT	44
1. Développement d'un modèle emblématique d'étude de la SpA.....	44
2. Implication des cellules myéloïdes	44
3. Implication des LT CD4 ⁺	46
4. Rôle des Treg	47
B. LA SOURIS.....	47
1. La souris SKG.....	48
2. La surexpression d'IL-23.....	48
3. TNF ^{ΔARE}	48
C. <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	50
Lien chez l'Homme	51
IV. LA DIFFERENCIATION DES LYMPHOCYTES T CD4⁺	52
A. LA SELECTION THYMIQUE	54
B. LES LYMPHOCYTES T CD4 ⁺ NAÏFS.....	54
C. LES LYMPHOCYTES TH	59
1. Les Th1 et Th2	59
2. Les Th17.....	59
D. LES LYMPHOCYTES T REGULATEURS PERIPHERIQUES (pTREG)	61
E. LA PLASTICITE DES LT	62
F. LE TGFβ ET LES LT	66
V. LA VOIE BMP/TGFβ.....	68
A. GENERALITES	68
B. LES LIGANDS : FONCTIONS, SYNTHÈSE ET MATURATION.....	70
1. Fonctions	70
2. Synthèse et sécrétion.....	74
3. Interaction avec la matrice extracellulaire.....	75
4. Interaction avec la surface extracellulaire	75
5. L'activation des formes latentes.....	76
Les intégrines	76
Les protéases.....	77
Facteurs physico-chimiques.....	77
C. LES RECEPTEURS	80
1. Organisation et signalisation	80
2. Localisation, circulation et recyclage des récepteurs	81
3. Modifications post-traductionnelles des récepteurs	84
4. Régulation post-transcriptionnelle par les micro-ARN	85
D. LES CORECEPTEURS.....	86
E. LES SMAD.....	90
1. R-SMAD et Co-SMAD.....	90

2. Les I-SMAD.....	91
3. Spécificité d'activation des R-SMAD	92
4. Le contrôle transcriptionnel	93
F. LES VOIES NON-CANONIQUES	98
1. Axe Ras/Raf/MEK1-2/ERK1-2	98
2. Axes TAK1/p38/JNK/NFκB	99
3. Axe PI3K/AKT/mTOR/p70S6K	101
4. Axe JAK-STAT	102
5. Axe Rho-like GTPases	103
<u>PROBLEMATIQUES ET OBJECTIFS</u>	<u>105</u>
<u>RÉSULTATS (ARTICLE 1).....</u>	<u>108</u>
HLA-B27 INTERFERES WITH TGF-β/ACTIVIN SIGNALING IN <i>DROSOPHILA</i> AND RAT TRANSGENIC MODELS, RESULTING IN PATHOGENIC CONSEQUENCES RELEVANT FOR SPONDYLOARTHRITIS.....	108
<u>DISCUSSION</u>	<u>149</u>
I. HLA-B27 CHEZ LA DROSOPHILE.....	149
A. LE PEPTIDOME ASSOCIE A HLA-B27	149
B. INTERACTION D'HLA-B27 AVEC LA VOIE BMP/TGFβ	150
II. HLA-B27 ET LA VOIE BMP/TGFβ.....	151
A. LA SIGNALISATION BMP	151
1. Le récepteur ALK3	151
2. Le récepteur ALK2	152
3. BMP et homéostasie lymphocytaire.....	152
B. LA SIGNALISATION ACTIVINE DANS LES TH17.....	153
C. SIGNALISATION TGFβ ET INFLAMMATION.....	154
1. Signalisation non-canonique de la β2m via ALK5/TGFβR2	154
2. Signalisation TGFβ1 autocrine et stabilité des phénotypes Treg et Th17	155
3. Le biais de différenciation Th17	157
<u>CONCLUSION.....</u>	<u>158</u>
<u>ANNEXE I: ARTICLE 2</u>	<u>160</u>
INTERLEUKIN 27 IS A NOVEL CYTOKINE WITH ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS AGAINST SPONDYLOARTHRITIS THROUGH THE SUPPRESSION OF TH17 RESPONSES.....	160
<u>ANNEXE II: ARTICLE 3</u>	<u>176</u>

STAT1 DEFICIENCY UNDERLIES A PROINFLAMMATORY IMPRINT OF NAIVE CD4⁺ T CELLS IN SPONDYLOARTHRITIS.
.....176

ANNEXE III: ARTICLE 4186

LESSONS ON SPA PATHOGENESIS FROM ANIMAL MODELS.....186

BIBLIOGRAPHIE214

Table des illustrations

Figure 1 Les sous-types de SpA _____	14
Figure 2 Atteintes axiales à la radiographie et en IRM _____	17
Figure 3 Prévalence des atteintes périphériques dans la SpA axiale _____	20
Figure 4 Inflammation de l'intestin et immunité _____	30
Figure 5 CMH-I loci, structure et variabilité _____	35
Figure 6 Chargement du peptide et adressage à la membrane du CMH-I _____	37
Figure 7 Hypothèses sur la pathogénicité du HLA-B27 _____	40
Figure 8 Phénotypes développementaux observés chez <i>Drosophila melanogaster</i> lors de la co-expression d'HLA-B27 et <i>hb2m</i> dans l'œil et dans l'aile. _____	49
Figure 9 Modèle proposé de l'interaction d'HLA-B27/ <i>hb2m</i> et de la voie BMP chez la <i>D. melanogaster</i> _____	50
Figure 10 La sélection thymique _____	53
Figure 11 La différenciation des LT CD4 ⁺ _____	56
Figure 12 Rôles du TGFβ sur les lymphocytes T dans le thymus et la périphérie _____	64
Figure 13 La voie BMP/TGFβ _____	67
Figure 14 Structure tridimensionnelle d'un homodimère de TGFβ1 humain _____	72
Figure 15 Synthèse, maturation et séquestration des ligands de la voie BMP/TGFβ _____	73
Figure 16 Les récepteurs de types I et II de la voie BMP/TGFβ _____	79
Figure 17 Structure schématique des protéines SMAD _____	88
Figure 18 Les voies non-canoniques de la signalisation BMP/TGFβ _____	96
Figure 19 Modèle proposé de l'interaction d'HLA-B27/ <i>hb2m</i> et de la voie BMP chez la <i>D. melanogaster</i> _____	105
Figure 20 p-SMAD2/3 est augmenté dans les cellules immunitaires de patients SpA HLA-B27+ en réponse à l'activine et au TGFβ _____	106
Figure 21 Résumé de l'effet de l'activine A autocrine sur le développement de Th17 pathogènes. _____	153
Figure 22 Signalisation pro-inflammatoire de la β2m dans les monocytes de souris _____	155
Figure 23 Modélisation du mécanisme de stabilisation du phénotype des Treg par le TGFβ1 autocrine (proposé par Choi et Al. 2020). _____	156
Figure 24 Modèle de la stabilisation du phénotype des Th17 induit par le TGFβ1 autocrine (proposé par Choi et Al. 2021). _____	156
Tableau 1 Loci associés à la SpA ne faisant pas partie du CMH _____	25
Tableau 2 Les principales lignées de rats transgéniques pour l'étude du rôle d'HLA-B27 dans la SpA _____	43
Tableau 3 Tableau résumé des cytokines inductrices et des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des sous-types de LT CD4 ⁺ helper _____	58
Tableau 4 Les membres de la famille de la voie BMP/TGFβ _____	69
Tableau 5 Alias des récepteurs et ligands de la voie BMP/TGFβ _____	80
Tableau 6 Liste des principaux acteurs de la voie BMP/TGFβ chez les vertébrés et chez <i>D. melanogaster</i> _____	149

Liste des abréviations

ActR-IA	Activin receptor-IA
ActR-IIB	Activin receptor-IIB
ACVR2A	Activin receptor-2A
ACVR2B	Activin receptor-2A
AINS	Anti-inflammatoire non-stéroïdien
ALK1	Activin receptor-like kinase-1
ALK2	Activin receptor-like kinase-2
ALK3	Activin receptor-like kinase-3
ALK4	Activin receptor-like kinase-4
ALK5	Activin receptor-like kinase-5
ALK6	Activin receptor-like kinase-6
ALK7	Activin receptor-like kinase-7
AMH	Anti-mullerian hormone
AMHR2	Anti-mullerian hormone receptor 2
AP1	Activator protein 1
APC	Antigen Presenting Cell
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATF3	Activating transcription factor 3
AxSpA	Spondyloarthrite axiale
β-hp	β-hairpin
BASDAI	Bath ankylosing spondylitis disease activity index
BASRI	Bath ankylosing spondylitis radiology index
BMP	Bone morphogenetic protein
BMPR2	Bone morphogenetic protein receptor 2
β₂m	Beta-2-microglobuline
CARD9	Caspase recruitment domain-containing protein 9
CCR7	C-C Chemokine Receptor 7
cDC	Conventional dendritic cell
cDC1	Conventional dendritic cell 1
cDC2	Conventional dendritic cell 2
CDK	Cyclin-dependent kinase
CMH-I	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CMH-II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CNS	Central nervous system
Co-SMAD	co-mediator SMADs
CRP	C reactive protein
DC	Dendritic cell
DEC	Domaine extracellulaire
DIC	Domaine intracellulaire
DISH	Hyperostose squelettique idiopathique diffuse
DMARD	Disease-modifying anti rheumatic drug
DN	Double négatif
DP	Double positif
DTX1	Deltex E3 ubiquitin ligase 1
EAE	Encéphalomyélite allergique expérimentale

EBV	Epstein-Barr virus
ECM	Matrice extracellulaire
ERAD	Endoplasmic reticulum-associated degradation
ERAP1	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1
ERAP2	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 2
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ESRP	Epithelial splicing regulatory factors
FOP	Fibrodisplasie ossifiante progressive
FKBP12	12-kDa FK506-binding protein
GARP	Glycoprotein A repetitions predominant
GDF	Growth and differentiation factor
GPR	G Protein-coupled Receptors
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
GWAS	Genome-wide association studies
HLA	Antigène de leucocyte humain
HLA-B07	Human leukocyte antigen-B07
HLA-B27	Human leukocyte antigen-B27
IFNγ	Interféron γ
IL-1β	Interleukine 1 isoforme β
IL-6	Interleukine-6
IL-7	Interleukine-7
IL-7R	Interleukine-7 receptor
IL-12	Interleukine-12
IL-12R	Interleukine-12 receptor
IL-17A	Interleukine-17A
IL-17	Interleukine-17
IL-23	Interleukine-23
IL-23R	Interleukine-23 receptor
IL-27	Interleukine-27
ILC	Immune lymphoid cells
iNKT	invariant natural killer T cell
JAK1	Janus associated kinase 1
JAK2	Janus associated kinase 2
JAKi	Janus associated kinase inhibitor
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LAP	Latent associated peptide
LEF	Lymphoid enhancer factor
LLC	Large latent complex
LMP2	Latent membrane protein 2
LT	Lymphocyte T
LTBP	Latent TGF β binding protein
m⁶A	N6-méthylation de l'adénosine
MAP3K7	Mitogen activated kinase kinase kinase 7
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MICI	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
miARN	micro-ARN
MKK	MAP kinase kinase
MMP	Métalloprotéinase matricielle

NEDD8	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8
NF-κB	Nuclear Factor-κB
nr-axSpA	Spondyloarthritis axiale non-radiographique
PD	Prodomaine
pGR	Glucagon receptor-derived peptide
PLC	Peptide loading complex
PP1	Protein phosphatase 1
PP2A	Protein phosphatase 2 A
PR	Polyarthrite rhumatoïde
pSpA	Spondyloarthritis périphérique
PsA	Arthrite psoriasique
pTreg	T régulateur périphérique
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Ras	Rat sarcoma virus
RE	Réticulum endoplasmique
ReA	Arthrite réactionnelle
RhoA	Ras homolog family member A
RNAi	RNA interferent
ROCK	RhoA associated kinase
RORγt	Retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma-t
ROS	Reactive oxygen species
R-SMAD	Receptor-regulated SMADs
SA	Spondyloarthritis ankylosante
SARA	Smad anchor for receptor activation
SxS	motif sérine-x-sérine
SLC	Small latent complex
SMAD	Small mothers against decapentaplegic homolog
SMURF	Smad ubiquitination regulatory factor
SOCS1	Suppressor of cytokine signaling 1
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3
SP	Signal peptide
SP	Simple positif
SpA	Spondyloarthritis
STAT	Signal transducer and activator of transcription
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
SUMO	Small ubiquitin-like modifier
T-bet	T-box expressed in T cells (équivalent à TBX21)
TAK1	TGFβ Activated Kinase 1
TBX21	T-box transcription factor 21 (équivalent à T-bet)
TCF	T cell factor
TCR	T-cell receptor
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TGFβ	Transforming growth factor-beta
TGFβ1	Transforming growth factor-beta 1
TGFβ2	Transforming growth factor-beta 2
TGFβ3	Transforming growth factor-beta 3
TGFβR2	Transforming growth factor-beta receptor 2
Th₁₇	T helper 17 cell

TLR7	Toll like receptor 7
TNFα	Tumor necrosis factor α
TRAF4	Tumor necrosis factor receptor-associated factor 4
TRAF6	Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6
T_{reg}	Lymphocyte T régulateur
Trim33	Tripartite motif-containing 33
tTreg	T régulateur dérivé du thymus
TYK2	Non-receptor tyrosine-protein kinase 2
UC	Colite ulcérate
USP4	Ubiquitine-specific protease
UPR	Unfolded protein response
VIPR1	Vasoactive intestinal polypeptide receptor 1
VS	Vitesse de sédimentation

Introduction

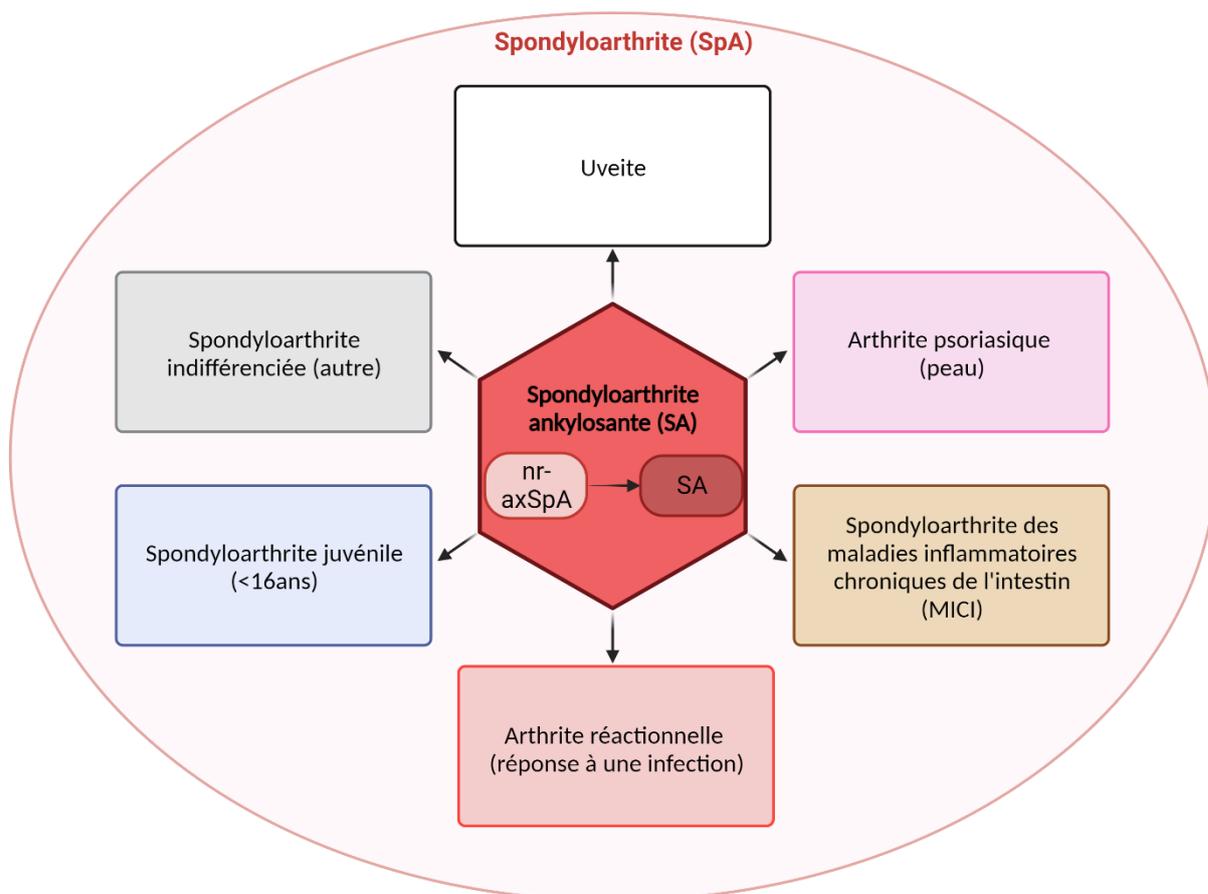


Figure 1 | Les sous-types de SpA

La SpA est une maladie multifactorielle dont les frontières sont difficiles à définir. Centrées autour de la forme axiale de la pathologie axSpA (de la forme non-radiographique nr-axSpA à la forme radiographique SA), différentes formes périphériques de SpA existent de façon dépendante ou indépendante de la forme axiale

I. La spondyloarthrite

La spondyloarthrite (**SpA**) est un **rhumatisme inflammatoire chronique**. C'est une pathologie qui affecte les articulations, les tendons et les ligaments au niveau du squelette axial (colonne vertébrale, articulations sacro-iliaques, cage thoracique) et/ou au niveau du squelette périphérique (genoux, talons, doigts). Le terme « inflammatoire » souligne l'implication du système immunitaire dans la maladie et désigne plus généralement une douleur, raideur, rougeur ou enflure. Cette pathologie est dite chronique, car maintenue dans le temps, avec des phases d'accalmie et de recrudescence des symptômes.

A. Les sous-types de spondyloarthrite, épidémiologie et aspects cliniques

Il s'agit d'une maladie complexe qui regroupe plusieurs pathologies interdépendantes qui sont étroitement liées par des caractéristiques cliniques, radiologiques, sérologiques et génétiques communes. La SpA regroupe ainsi 6 pathologies : la **Spondylarthrite Ankylosante (SA)**¹, l'arthrite psoriasique (**PsA**), la spondyloarthrite des **Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI)**, l'**Arthrite Réactionnelle**² (**ReA**), la spondyloarthrite juvénile ainsi que les formes indifférenciées de SpA (**uSpA**) (Moll et al., 1974) (**Figure 1**). Ces différentes formes de SpA se chevauchent fréquemment et les patients sont ainsi classés en fonction d'une **prédominance axiale (axSpA), périphérique ou mixte**.

Au départ, ces maladies sont appelées **arthrites chroniques séronégatives** en raison de l'apparition d'atteintes articulaires persistantes en l'absence d'auto-anticorps circulants. Il s'agit de la deuxième maladie articulaire inflammatoire la plus fréquente après la **Polyarthrite Rhumatoïde (PR)** avec une prévalence estimée à 0,43% dans la population adulte française, soit 150 000 à 200 000 patients (Costantino et al., 2015), *versus* 0,47%, soit 320 000 patients, pour la PR (Pina Vegas et al., 2023). Cette prévalence varie grandement en fonction des origines ethniques avec des chiffres allant de 1,35% pour l'Amérique du Nord à 0,20% pour l'Asie du Sud Est en passant par 0,79% pour l'Asie de l'Est (Dougados & Baeten, 2011; Reveille et al., 2012; Stolwijk et al., 2012).

1. Spondyloarthrite axiale

La **SpA axiale (axSpA)** est la forme majoritaire de SpA. Elle se caractérise par une atteinte inflammatoire du rachis (colonne vertébrale) et du bassin. Ces atteintes se manifestent par des douleurs inflammatoires lombaires (bas du dos) et fessières. Ces douleurs surviennent souvent la nuit et tôt le matin, pouvant affecter le sommeil des patients. Elles ont également tendance à être réduites par l'activité physique et l'étirement.

Il existe une grande variabilité dans la sévérité des manifestations de l'axSpA. Du côté le moins sévère du spectre, on reconnaît les formes **non-radiographiques d'axSpA (nr-axSpA)**

¹ Qu'on retrouve parfois sous l'ancien terme « SpA radiographique »

² Autrefois appelée maladie de Reiter

caractérisées par l'absence de modification des articulations sacro-iliaques à la radiographie (Figure 2A - 1^{ère} image aux rayons X). Cependant, le recours à l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) peut parfois révéler un état inflammatoire de ces articulations (Figure 2A - 1^{ère} image IRM).

Les nr-axSpA peuvent évoluer vers une forme radiographique de SpA, qu'on nomme plus communément Spondylarthrite Ankylosante (SA), et qui représente entre 30 et 50% des cas de SpA (Sieper & Poddubnyy, 2017). La SA est dite radiographique car, des atteintes de l'articulation sacro-iliaque et/ou de la colonne vertébrale sont visibles chez les patients à la radiographie (Figure 2B). C'est d'ailleurs l'outil principal pour la pose de diagnostic de la maladie.

A l'extrémité la plus sévère du spectre de l'axSpA, lorsque l'ankylose³ progresse fortement entre les vertèbres, celles-ci finissent par fusionner entre elles, formant des ponts osseux appelés syndesmophytes et aboutissant à l'aspect dit de « colonne en bambou », observable à la radiographie (Figure 2B - Score BASRI Spine 4). L'IRM est également utilisée et permet de mettre en évidence une inflammation précoce des articulations sacro-iliaques, parfois non-visible à la radiographie (Figure 2B - 1^{ère} image de la dernière série de photo). Enfin les atteintes axiales peuvent concerner la cage thoracique, pouvant occasionner une gêne respiratoire (Robinson et al., 2021; Taurog et al., 2016).

³ Perte de la mobilité des articulations par ossification des ligaments.

Spondyloarthrite axiale

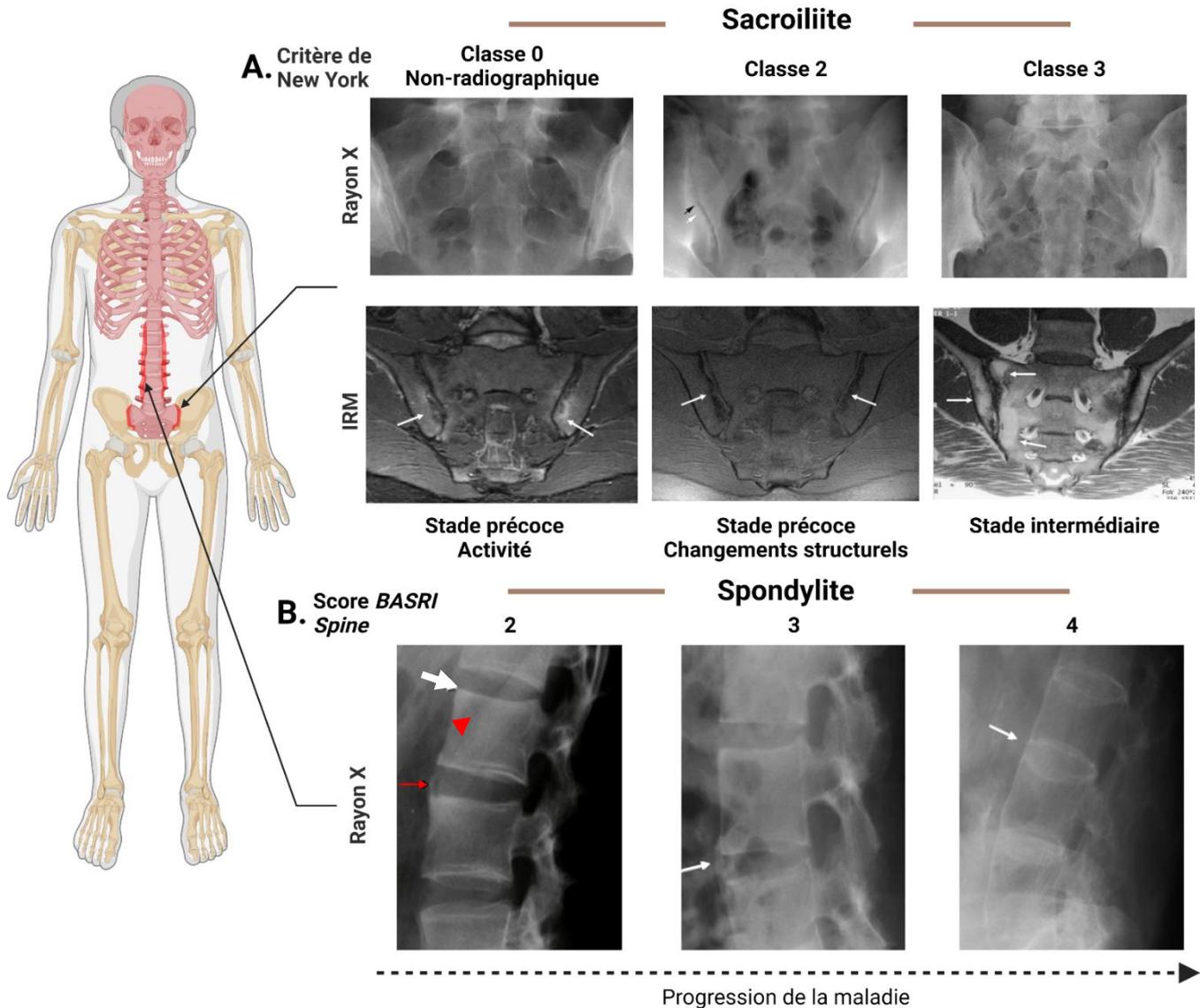


Figure 2 | Atteintes axiales à la radiographie et en IRM

Les images sont ordonnées de gauche à droite par degré de sévérité/d'avancement de la SA.
 A. Images radiographiques (1ère ligne) et IRM (2ième ligne) montrant les articulations sacro-iliaques à différents stade de la SA. Au-dessus des images radiographiques figure le grade de la sacroiliite selon les critères de New York (détaillés dans le texte). Sous les images en IRM figure le stade d'avancement de la maladie.

1ère ligne : la flèche noire pointe une légère érosion et la flèche blanche, une sclérose.

2ème ligne : de gauche à droite ; Image Semi-coronal STIR montrant des signes d'activité de la maladie sous-forme d'œdèmes (signal plus intense= plus blanc) de la moëlle osseuse en position distale des articulations, particulièrement prononcés en regard des flèches.

Image semi-coronale T1 FS (Focal Stack=empilements d'images) montrant une érosion des articulations sacro-iliaques (flèches blanches)

Image T1-weighted semi-coronale montrant des dépôts de gras dans la moëlle osseuse sous-jacente aux articulations (flèches blanches), conséquence d'une inflammation chronique. De plus, les interlignes articulaires sont irréguliers.

*B. Images radiographiques du rachis lombaire en vue latérale à différents stades de l'atteinte axiale. Le score **BASRI** (**B**ath **A**nkylosing **S**pondylitis **R**adiology **I**ndex) rachidien est indiqué au-dessus de l'image. Ce score est attribué en fonction du degré de l'atteinte radiologique des sacroiliaques, du rachis lombaire, du rachis cervical et des hanches. De gauche à droite, la flèche blanche indique: une sclérose (condensation osseuse) du bord supérieur de la première lombaire (L1) (Score 2)/la progression d'un syndesmophyte entre les vertèbres (Score 3)/la fusion de deux corps vertébraux entre eux par un syndesmophyte complet(Score 4).*

La flèche rouge montre le début de formation d'un syndesmophyte et la tête de flèche rouge indique une condensation osseuse du corps vertébral de la première lombaire.

Toutes les images proviennent de SPA-Imaging.org

2. Spondyloarthrite périphérique

La SpA périphérique (**pSpA**) regroupe les différentes pathologies de la SpA affectant principalement le squelette périphérique. Les symptômes périphériques sont :

- **L'arthrite** : inflammation d'une articulation et particulièrement du genou dans le cas de la pSpA.
- **L'enthésite** : Inflammation de l'enthèse, qui correspond à la zone d'ancrage des tendons, ligaments et capsules articulaires dans l'os.
- **La dactylite** : inflammation globale d'un doigt

(Carron et al., 2020).

Selon les cohortes, la prévalence relative de la pSpA, parmi les patients remplissant les critères de classification définis par le groupe "ASAS"⁴, varie de 22,8% dans la cohorte espagnole Esperanza (del Río-Martínez et al., 2016) à 28,5% dans la cohorte Belge Be-Giant (Varkas et al., 2014), en passant par 26,8% dans une cohorte Néerlandaise (de Winter et al., 2016).

3. Atteintes extra-articulaires

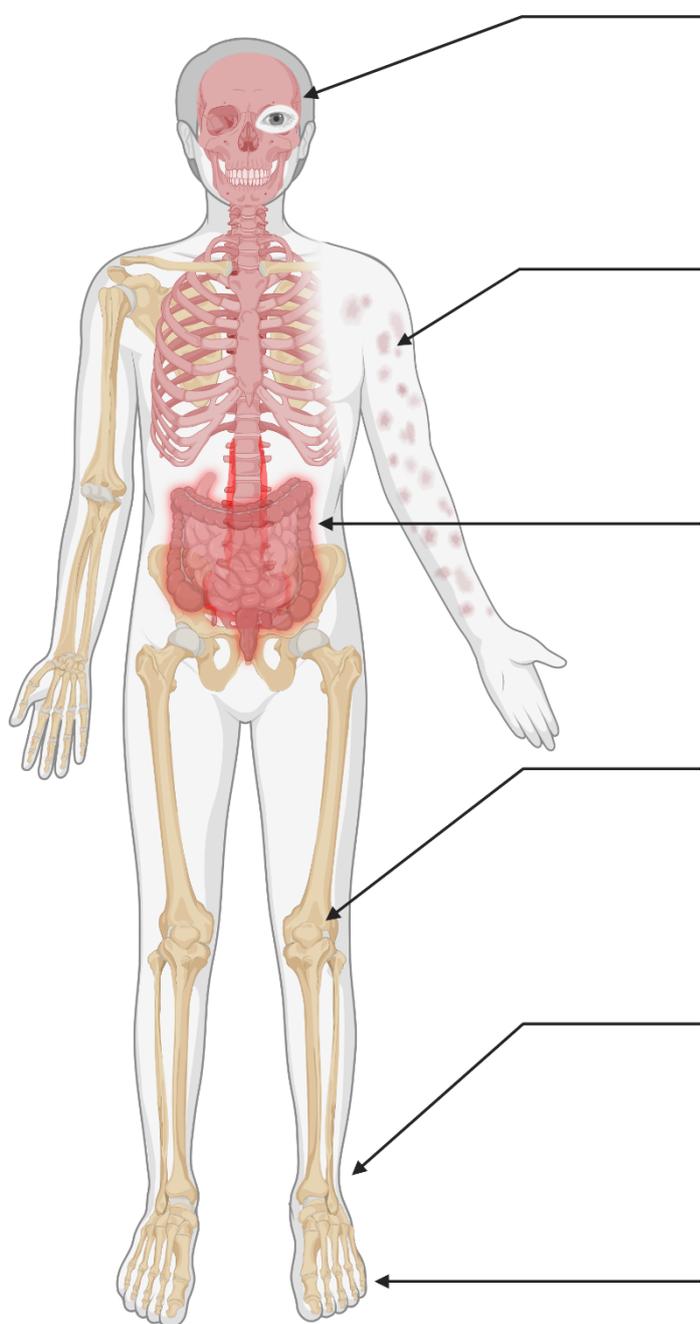
De manière concomitante ou indépendante des atteintes squelettiques axiales et/ou périphériques décrites dans les deux parties précédentes, certains patients développent **des manifestations extra-articulaires**. Ces dernières peuvent toucher :

- Les yeux : avec survenue d'**uvéites antérieures** caractérisées par un œil rouge et douloureux avec baisse de la vue.
- La peau : avec survenue **de lésions psoriasiques**.
- Le tube digestif : avec l'apparition **de MICI** caractérisées par des diarrhées, des douleurs abdominales, la présence éventuelle de sang et de glaires dans les selles.

En considérant la SpA dans son ensemble, **l'uvéite antérieure** est la plus fréquente des manifestations extra-articulaires (25-30%) suivie par **le psoriasis** (10-25%) et par **les MICI** (3-10%) (de Winter et al., 2016; Stolwijk et al., 2015; Zeboulon et al., 2008). On note cependant qu'environ 60% des patients atteints de SpA ont en fait des microlésions intestinales inflammatoires histologiques sans pour autant présenter des symptômes gastro-intestinaux majeurs (Jacques et al., 2012). Bien que dans le système de classification de l'ASAS, l'axSpA et la pSpA soient distinctes, les patients atteints d'axSpA ont fréquemment des symptômes de pSpA.

⁴ Qui sont donc reconnus comme atteint de SpA

Spondyloarthrite axiale



Uvéite antérieure

- Inflammation de l'iris et/ou du corps ciliaire antérieur
- Prévalence: SA 23% ; nr-axSpA 15,9%

Psoriasis

- Pathologie inflammatoire de la peau
- Prévalence: SA 10,2% ; nr-axSpA 10,8%

MICI

- Colite, recto-colite hémorragique, maladie de Crohn
- Prévalence: SA 4,1% ; nr-axSpA 6,4%

Arthrite périphérique

- Souvent au niveau des membres inférieurs
- Prévalence: SA 29,7% ; nr-axSpA 27,9%

Enthèse périphérique

- Inflammation des tendons d'Achille,
- Prévalence: SA 28,8% ; nr-axSpA 35,4%

Dactilite

- Inflammation d'un doigt ou d'un orteil
- Prévalence: SA 6% ; nr-axSpA 6%

Figure 3 | Prévalence des atteintes périphériques dans la SpA axiale

4. Prévalence des atteintes articulaires périphériques et extra-articulaires au cours de la SpA axiale.

En 2016, de Winter et al. ont comparé la prévalence des atteintes articulaires périphériques et extra-articulaires de la SpA entre les patients atteints de SA⁵ et de nr-axSpA à partir de 8 études indépendantes (de Winter et al., 2016).

Les résultats de cette méta-analyse résumés dans la Figure 3 adaptée de (Robinson et al., 2021) ont montré que 29,7% des patients atteints de SA développent des arthrites périphériques *versus* 27,9% des patients atteints de nr-axSpA. Ces pourcentages sont respectivement de 28,8% *versus* 35,4% pour l'enthésite et de 6,0% dans les deux cas pour la dactylite. En ce qui concerne les symptômes extra-articulaires, 10,2% des patients atteints de SA présentent des lésions psoriasiques *versus* 10,8% des patients atteints de nr-axSpA. Les MICI ont respectivement une prévalence de 4,1% et de 6,4%. Pour finir, l'**uvéïte** est la seule manifestation pour laquelle une différence significative a pu être mise en évidence entre **SA et nr-axSpA avec respectivement 23% et 15,9% des patients atteints**.

Cette étude montre que la prévalence des formes périphériques et extra-articulaires est équivalente entre SA et nr-axSpA à l'exception de l'uvéïte qui a une prévalence plus forte chez les patients atteints de SA comparés à ceux atteints de nr-axSpA. Les auteurs concluent en soulignant la fréquence très similaire des symptômes articulaires périphériques et extra-articulaires entre SA et nr-axSpA, ce qui devrait être pris en considération, notamment pour ce qui est de la recherche et des traitements où il serait préférable de combiner SA et nr-axSpA en un seul groupe. La même équipe a publié en 2019 que **la moitié des patients classés « SA » ont également des symptômes articulaires périphériques** (118 sur 230 dans une cohorte des Pays-Bas) (de Winter et al., 2019). Ils ajoutent que ces patients ont souvent une activité de la maladie plus forte que ceux ne présentant que des symptômes axiaux.

5. L'arthrite réactionnelle

La ReA est une arthrite rare développée à la suite **d'une infection bactérienne**. Cette infection bactérienne peut-être :

- **Gastrointestinale** : notamment causée par certaines souches de *Yersinia*, *Salmonella*, *Campylobacter* ou encore *Shigella*.
- **Urogénitale** : causée par *Chlamydia trachomatis*
- **Respiratoire** : causée par *Chlamydia pneumoniae* (Zeidler & Hudson, 2021)

La ReA met en exergue l'implication possible des micro-organismes dans le développement de maladies inflammatoires.

⁵ C'est-à-dire la forme axiale radiographique

6. La SpA juvénile

La SpA juvénile est une forme de SpA développée avant 16 ans. Elle se distingue de la forme adulte par une atteinte plus importante du squelette périphérique et une atteinte axiale moins marquée qui persiste avec l'évolution de la maladie (Boel et al., 2022; H.-A. Chen et al., 2012).

B. Etiologie

1. Facteurs génétiques

HLA-B27

Le facteur génétique principal influençant le développement de la maladie est l'**allèle HLA-B27 du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I (CMH-I)**. On estime qu'être porteur de l'allèle HLA-B27 augmente le risque de développer la SpA d'un facteur 39, passant de 0,13% chez un individu non-porteur à un risque de 5% chez un porteur de l'allèle (Costantino et al., 2015).

La part héréditaire de la SpA commença à être décrite dans les années 50 dans des études de ségrégation familiale (De Blecourt et al., 1961; Graham & Uchida, 1957; Hersh et al., 1950; Jacobs & Rose, 1954; O'connell & London, 1959; STECHER & HERSH, 1955). Auparavant, des descriptions de cas familiaux avaient également été rapportées sous forme de cas isolés. L'hypothèse qu'un facteur génétique autosomal à transmission dominante serait en cause dans le développement de la pathologie au sein de ces familles a été émise. Mais en 1967, une nouvelle étude approfondie réfuta cette thèse car la pénétrance de la maladie paraissait trop faible. En effet, la pénétrance chez un parent du 1^{er} degré n'était alors estimée qu'à 4% (Emery & Lawrence, 1967). L'association claire de l'allèle HLA-B27 avec la pathologie a été établie en 1973, de manière indépendante, par deux laboratoires (Brewerton et al., 1973; Schlosstein et al., 1973).

70 à 90% des patients atteints de SA sont ainsi porteurs de l'allèle HLA-B27, alors même que la prévalence de cet allèle dans la population française est **estimée à 7%** (Costantino et al., 2015). On note qu'il existe plus de 100 variants de l'allèle HLA-B27 qui ne sont pas tous associés de manière équivalente à la SpA et dont la distribution est très hétérogène à travers le monde. Celui auquel il est généralement fait référence est l'allèle HLA-B*2705 qui est le plus fréquent dans la population générale et qui est positivement associé à la SpA (Mathieu et al., 2009). La prévalence et l'incidence mondiale de la SpA est difficile à estimer car elle est variable d'une population à l'autre. Cependant, l'incidence de la SpA varie parallèlement à la prévalence de HLA-B27. A titre d'exemple, au Japon, la prévalence d'HLA-B27 est inférieure à 0,5% et celle de la SpA inférieure à 0,0095% (Hukuda et al., 2001).

Bien qu'étant le facteur de susceptibilité majeur de la SpA, HLA-B27 n'est pas suffisant pour expliquer à lui seul la forte ségrégation familiale observée. En effet, on estime qu'HLA-

B27 compte pour environ 20,5% de l'héritabilité de la SpA (Ellinghaus et al., 2016). Les études d'association couvrant le génome entier (**GWAS** pour « **G**enome-**W**ide **A**ssociation **S**tudies ») ont permis de mettre en évidence d'autres *loci* associés à la SpA. Notamment, la première étude GWAS conduite en 2007 a révélé une association de la maladie avec les gènes *Endoplasmic Reticulum AminoPeptidase 1 (ERAP1)* et *IL23R* (Burton et al., 2007), qui sont respectivement impliqués dans la présentation antigénique et dans les immunités innée et adaptative (axe IL-23/IL-17). Mais depuis, d'autres études ont étendu la liste des *loci* associés à une quarantaine de *loci* indépendant du CMH (résumés dans Tableau 1 extrait de (O'Rielly et al., 2016)).

Relevance to disease pathogenesis	Gene/locus	Encoded protein	Chr. location	Ethnicity
Interferon, TNF α /NF κ B activation and signaling	<i>IL-1R1/2^ψ</i>	Interleukin 1 receptor 2	2q12	European
	<i>LTBR</i>	Lymphotoxin β -receptor (TNFR superfamily, member 3)	12p13	European
	<i>UBE2E3</i>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2E3	2q32.1	European
	<i>PTGER4^ψ</i>	Prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)	5p13.1	European
	<i>CARD9</i>	Caspase recruitment-domain family member 9	9q34.3	European
	<i>TRADD^ψ</i>	TNFRSF1A-associated via death domain	16q22	European
	<i>TNFRSF1A</i>	Tumor-necrosis factor-receptor superfamily member 1A	12p13.2	European
	<i>TBKBP1</i>	TNFR-associated factor family member-associated nuclear factor- κ B-binding kinase 1-binding protein	17q21.32	European
	<i>TBX21</i>	T-box 21	17q21.32	European
	<i>TYK2</i>	Tyrosine kinase 2	19p13.2	European
Th-17 differentiation and signaling	<i>IL-23R</i>	Interleukin 23 receptor	1p31.3	European
	<i>IL-12RB2</i>	Interleukin 12 receptor, β 2	1p31.3-p31.2	European
	<i>IL-6R</i>	Interleukin 6 receptor	1q21	European
	<i>PTGER4^ψ</i>	Prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)	5p13.1	European
	<i>IL-12B</i>	Interleukin 12B	5q31.1-q33.1	European
	<i>IL-27</i>	Interleukin 27	16p11	European
	<i>TYK2</i>	Tyrosine kinase 2	19p13.2	European
Th-1 differentiation and signaling	<i>TBX21</i>	T-box 21	17q21.32	European
CD8 ⁺ T-cell differentiation and signaling	<i>RUNX3</i>	Runt-related transcription factor 3	1p36	European
	<i>EOMES^ψ</i>	Eomesodermin	3p24.1	European
	<i>IL-7R^ψ</i>	Interleukin 7 receptor	5p13	European
	<i>ZMIZ1</i>	Zinc finger, MIZ type-containing 1	10q22.3	European
CD4 ⁺ T-cell differentiation and signaling	<i>BACH2</i>	BTB and CNC homology 1, basic leucine-zipper transcription-factor 2	6q15	European
	<i>SH2B3</i>	Src homology 2B adaptor protein 3	12q24	European
	<i>ICOSLG</i>	Inducible T-cell costimulator ligand	21q22.3	European
Antigen presentation and binding	<i>UBE2E3</i>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2E3	2q32.1	European
	<i>IL-7R^ψ</i>	Interleukin 7 receptor	5p13	European
	<i>ERAP1</i>	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1	5q15	European
	<i>ERAP2</i>	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 2	5q15	European
	<i>LNPEP</i>	Leucyl/cystinyl aminopeptidase	5q15	European
	<i>NPEPPS</i>	Aminopeptidase puromycin-sensitive	17q21	European
	<i>UBE2L3^ψ</i>	Ubiquitin conjugating enzyme E2L3	22q11.21	European

Macrophage-mediated phagocytosis	<i>FCGR2A</i>	Fc fragment of immunoglobulin G, low-affinity IIa, receptor (CD32)	1q23	European
Unknown	<i>KIF21B</i>	Kinesin family member 21B	1q32.1	European
	<i>GPR25</i>	G-protein-coupled receptor 25	1q32.1	European
	<i>HHAT^u</i>	Hedgehog acyltransferase	1q32	European
	Unknown	Unknown	2p15	European Han Chinese
	<i>GPR35</i>	G-protein-coupled receptor 35	2q37.3	European
	<i>NKX2-3</i>	NK2 homeobox 3	10q24.2	European
	<i>GPR65</i>	G-protein-coupled receptor 65	14q31-q32.1	European
	<i>GPR37^u</i>	G protein-coupled receptor 37	7q31	European
	<i>SULT1A1</i>	Sulfotransferase family cytosolic 1A	16p12.1	European
	Unknown	Unknown	21q22	European

Tableau 1 | *Loci* associés à la SpA ne faisant pas partie du CMH

En gras figurent des gènes impliqués dans de nombreux processus biologiques et voies de signalisation pertinents dans la pathogénèse de la SpA.

La présentation peptidique

Parmi la liste de *loci* présentée dans le **Tableau 1** se trouvent les gènes **ERAP1**, **Endoplasmic Réticulum Amino Peptidase 2 (ERAP2)** et **NPEPPS** qui codent pour des aminopeptidases du Réticulum Endoplasmique (RE) responsables du clivage des peptides à la longueur adéquate pour leur chargement sur le CMH-I (tel qu'HLA-B27). L'« aminopeptidase sensible à la puromycine » codée par **NPEPPS** est aussi décrite comme limitant la présentation antigénique du CMH-I par les Cellules Dendritiques (DC) (Towne et al., 2008). L'association de la SpA avec ces aminopeptidases soutient d'une part la thèse de la présentation peptidique comme un des mécanismes physiopathologiques et d'autre part, ouvre une piste thérapeutique. En effet, des études préliminaires conduites *ex-vivo* montrent que l'inhibition d'ERAP1 dans des cellules présentatrices d'antigènes supprime l'expansion des Lymphocytes T CD4⁺ helper 17 (Th17), un sous-type de Lymphocytes T CD4⁺ (LT CD4⁺) impliqué dans l'inflammation chronique (L. Chen et al., 2016).

Par ailleurs, deux gènes codant pour des ubiquitines ligases ont été mis en évidence. Ces gènes sont particulièrement intéressants puisque l'ubiquitinylation est un processus induisant, entre autres, la dégradation des protéines et par conséquent la génération de peptides pris en charge dans le RE par les aminopeptidases puis potentiellement chargés sur le CMH. Ces gènes sont d'autant plus remarquables que depuis une dizaine d'années, l'ubiquitinylation comme moteur dans la régulation de la signalisation cellulaire prend de l'importance. **L'E3 ubiquitine ligase Arkadia joue un rôle dans la dégradation induite par le Transforming Growth Factor beta (TGFβ) de Ski et SKIL/SnoN**, deux régulateurs négatifs de la signalisation TGFβ (Laigle et al., 2021). De façon plus générale, l'implication de l'ubiquitinylation et de la désubiquitinylation dans le développement des thymocytes est de plus en plus étudiée (Zhong et al., 2022). D'ailleurs, des données de séquençage ARN sur des LT CD4⁺ naïfs de rats révèlent que le gène **Deltex E3 ubiquitin ligase 1 (Dtx1)** est le gène dont l'expression est la plus augmentée dans ces lymphocytes chez le rat modèle de la SpA comparé à des rats témoins, suggérant un rôle important de l'ubiquitinylation dans la SpA (Cherqaoui et al., 2023).

L'axe IL-23/Th17

Le gène **IL23R** codant pour le récepteur à l'Interleukine-23 (IL-23) a été démontré comme associé à la SpA dans plusieurs études. L'IL-23 est une cytokine pro-inflammatoire essentielle pour la différenciation des LT CD4⁺ en Th17. D'autres travaux ont étendu cette observation en mettant en évidence l'association d'autres gènes impliqués dans la différenciation Th17 avec la SpA. C'est le cas de gènes : **IL6R**, **IL27**, **STAT3**, **CARD9**, **JAK2** et **TYK2** codant respectivement pour le récepteur à l'Interleukine-6 (IL-6); l'Interleukine-27A (IL-27A) ; **STAT3** (« Signal Transducers and Activators of Transcription 3 »); **CARD9** (« CAspase Recruitment Domain-containing protein 9 ») ; **JAK2** (JAnus Kinase 2) et **TYK2** (« Non-receptor TYrosine-protein Kinase 2) (Cortes et al., 2013; Costantino et al., 2018; O'Rielly et al., 2016).

JAK2 est un transducteur du signal induit, entre autres, par l'Interferon- γ (IFN- γ), l'IL-6, l'IL-10 et l'Interleukine-12 (IL-12). Il est associé à la maladie de Crohn⁶ et au psoriasis (Genetic Analysis of Psoriasis Consortium & the Wellcome Trust Case Control Consortium 2 et al., 2010; K. Sato et al., 2009). Il est d'ailleurs intéressant de noter que l'Interleukine-27 (IL-27), une cytokine anti-inflammatoire favorisant le développement des Treg producteurs d'IL-10, est moins exprimée dans les DC du rat B27, modèle de la SpA, comparé à celle des rats témoins non transgéniques (Fert et al., 2014).

Pour appuyer l'importance de l'axe IL-23/Th17 dans la SpA, il peut être noté qu'une surexpression d'IL-23 chez la souris induit des manifestations similaires à celles de la SpA humaine avec des enthésites et la formation d'os au niveau des enthèses (Sherlock et al., 2012). De plus, un inhibiteur de la sous-unité A de l'Interleukine-17 (IL-17A) est approuvé pour le traitement de la SpA depuis 2015 (Baeten et al., 2015).

La différenciation et l'activation lymphocytaire

Outre l'axe IL-23/Th17, les études GWAS ont permis de mettre en évidence de nombreux autres gènes associés à la SpA impliqués dans la différenciation et l'activation lymphocytaire. Il s'agit notamment de *TBX21* qui code la protéine T-box transcription factor 21 (TBX21) (aussi appelée T-box expressed in T cells (T-bet)), le facteur de transcription caractéristique des Lymphocytes T CD4⁺ helper 1 (Th1). Les gènes *Interleukine-12B (IL12B)* et *Interleukine 12 Receptor (IL-12R)* également impliqués dans la différenciation Th1 ont également été identifiés dans ces études GWAS.

Enfin le gène *Runt-related transcription factor 3 (RUNX3)* est l'un des plus étudiés pour son association avec la SpA (avec *IL23R* et *ERAP1*). Des polymorphismes nucléotidiques du gène codant ce facteur de transcription, qui est critique pour la différenciation des Lymphocytes T CD8⁺ (LT CD8⁺), ont été associés à une diminution de la proportion de ces cellules (Ferreira et al., 2010).

On peut enfin citer le gène *Interleukine-7 Receptor (IL7R)* dont l'expression permet la survie des LT CD4⁺ et CD8⁺ en réponse à l'Interleukine-7 (IL-7).

La voie des récepteurs couplés aux protéines G

La dernière catégorie de gènes associés à la SpA que je souhaite évoquer concerne les gènes codant pour les récepteurs : *GPR25*, *GPR35* et *GPR65* (pour « G Protein-coupled Receptors » 25, 35 et 65) (Cortes et al., 2015). Ces gènes, encore peu étudiés, peuvent cependant s'avérer pertinents dans le cadre du développement de la SpA. En effet, si on prend l'exemple de *GPR65*, certains variants sont décrits comme associés à la sclérose en plaques et à la maladie de Crohn (Franke et al., 2010; Sawcer et al., 2011).

⁶ Maladie inflammatoire chronique de l'intestin provoquant des diarrhées chroniques, parfois sanglantes.

Pour conclure, la SpA est un rhumatisme inflammatoire avec une forte composante héréditaire. *HLA-B27* compte pour environ 20% de cette héritabilité et l'ensemble des autres *loci* identifiés à ce jour n'expliquent que 7% de l'héritabilité (Ellinghaus et al., 2016). Il y a donc une large héritabilité inexpliquée dans la SpA qui pourrait être expliquée par des variants rares ou structuraux (délétions, duplications et inversions) qui n'ont pas encore été explorés de façon systématique, des phénomènes d'épistasie génétique (interaction gène-gène) ou encore l'interaction gène-environnement (Eichler et al., 2010).

2. Facteurs environnementaux

Infection par *Klebsiella pneumoniae*

Il est maintenant admis que la ReA peut être déclenchée à la suite d'une infection bactérienne. En revanche, cette association entre infection et développement de la maladie est bien moins claire pour la SA. Ainsi, l'implication de la bactérie GRAM-négatif *Klebsiella pneumoniae* a été suspectée il y a de nombreuses années comme potentiel élément déclencheur de la maladie avec des résultats souvent contradictoires qui n'ont pas permis de confirmer cette hypothèse. Une des théories expliquant la potentielle pathogénicité de cette bactérie serait le mimétisme moléculaire de certaines protéines bactériennes avec HLA-B27. Ainsi, HLA-B27 favoriserait une réponse immunitaire croisée pathogène (Ebringer, 1989).

Microbiote

De façon plus générale, il est maintenant bien établi que les patients atteints de SpA ont un microbiote modifié par rapport à des sujets sains, c'est à dire une dysbiose. Les avancées technologiques dans le domaine du séquençage génétique depuis les années 2000 ont permis des avancées significatives dans l'identification de bactéries potentiellement impliquées dans le développement de pathologies. Les études métagénomiques du microbiote des patients atteints de SA ont généralement mis en évidence une **diminution de la diversité bactérienne** ainsi qu'un **enrichissement de certaines espèces bactériennes**, telle que *Ruminococcus gnavus*, apparaissant **spécifique de la SpA** car, non observée dans les selles de patients atteints de PR (Breban et al. 2017). Notamment, cette bactérie commensale du tractus digestif est capable de dégrader le mucus protégeant l'épithélium intestinal. Ainsi, en cas de surabondance, elle pourrait favoriser l'inflammation de l'épithélium intestinal en induisant une dégradation trop importante du mucus. Ce mécanisme pourrait non seulement être la cause initiale de la dysbiose observée mais également favoriser les enthésites et arthrites du fait d'une augmentation de la perméabilité de l'épithélium intestinal (Figure 4). Il faut cependant rester prudent car ces observations pourraient également n'être qu'une conséquence de l'inflammation. Cependant, l'absence totale de symptômes développés par le rat modèle de la SpA en l'absence de colonisation microbienne (rat transgénique pour HLA-

B27 sur lequel je reviendrai plus tard) soutient le rôle indispensable joué par le microbiote dans le développement de la maladie (Taurog et al., 1994).

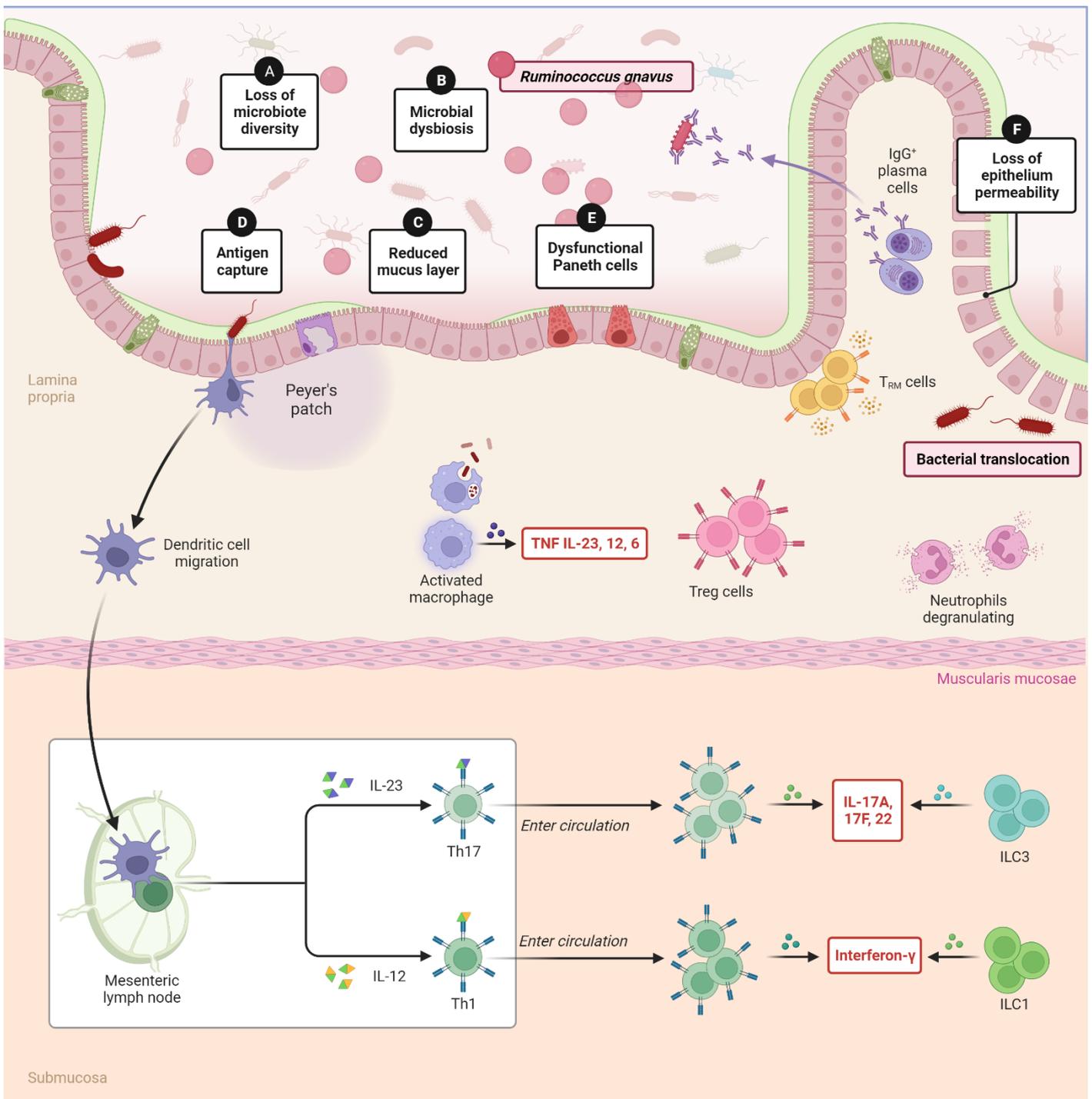


Figure 4 | Inflammation de l'intestin et immunité

Dans la SpA, (A) une diminution de la diversité de la flore intestinale est observée (B) ainsi qu'une dysbiose de la flore avec une augmentation de certaines espèces bactériennes dont *Ruminococcus gnavus*. (C) Certaines de ces bactéries (dont *R. gnavus*) sont capables d'altérer la couche de mucus intestinale. (D) Dans l'inflammation intestinale, l'altération du mucus peut favoriser la capture de peptides antigéniques bactériens par les cellules dendritiques au niveau des plaques de Peyer. Les cellules dendritiques activent alors les LT CD4⁺ naïfs dans le ganglion mésentérique qui vont se différencier en Th1 et Th17 producteurs des cytokines pro-inflammatoires IL-17 et IFN γ respectivement. (E) Plusieurs études montrent un dysfonctionnement des cellules de Paneth (cellules sécrétrices de peptides antimicrobiens de l'intestin grêle) dans des MICI comme la maladie de Crohn fréquemment associées à la SpA.

(F) L'inflammation peut affecter l'intégrité de l'épithélium intestinal, favorisant la translocation bactérienne, accentuant encore d'avantage l'état inflammatoire. Parmi les cellules impliquées dans l'inflammation intestinale, les macrophages, les neutrophiles, les LT résidents mémoires (Trm) et les plasmocytes producteurs d'IgG tiennent un rôle important.

ILC : innate lymphoid cell

C. L'implication du système immunitaire dans la SpA

Bien qu'aujourd'hui de nombreux facteurs de prédisposition ou favorisant le développement de la SpA soient connus, le mécanisme physiopathologique exact de la maladie reste à élucider. Cependant, il est su que les atteintes articulaires sont dues à une inflammation incontrôlée avec un excès d'ostéoformation, conduisant notamment à l'ankylose. Les acteurs pouvant être responsables de cette inflammation excessive appartiennent aussi bien à l'immunité innée qu'adaptative. Beaucoup des connaissances actuelles sur l'implication des cellules immunitaires dans le développement de la SpA découlent directement de la recherche sur le rat transgénique pour HLA-B27, modèle animal que je détaillerai plus loin dans le chapitre III de l'introduction consacré aux modèles d'étude de la SpA.

Ainsi, concernant l'immunité innée, les DC, macrophages et lymphocytes Natural-Killer (NK) seraient impliqués dans le développement de la SpA. Les DC participent à la différenciation des LT notamment en Th1, Th2 et Th17 qui produisent des cytokines pro-inflammatoires. Les macrophages sont quant à eux essentiels à l'homéostasie de la membrane synoviale et produisent notamment du TGF β et de l'IL-10 en condition physiologique. En condition d'inflammation, des macrophages producteurs d'IL-23 sont détectés dans les enthèses (Rezaïmanesh et al., 2017). Par ailleurs, les patients atteints de SA ont une distribution altérée des sous-populations de NK, première barrière de défense contre les bactéries et virus intracellulaires (Mousavi et al. 2009).

D. Diagnostic

Si la forme juvénile de la SpA survient avant 16 ans, la SpA débute généralement entre 20 et 40 ans avec une errance diagnostique moyenne de 8 à 10 ans après les premiers symptômes (Feldtkeller et al., 2003).

L'hétérogénéité des formes cliniques de la SpA ainsi que l'absence de biomarqueurs suffisant expliquent les difficultés rencontrées pour établir avec certitude le diagnostic. La mise en évidence d'une inflammation biologique systémique caractérisée par l'augmentation de la Vitesse de Sédimentation (VS) et/ou par l'élévation de la Protéine C réactive (CRP pour « C Reactive Protein ») est un premier élément de présomption, cependant, inconstant. Un deuxième argument en cas de présomption de SpA est la présence de l'antigène HLA-B27 ainsi que la présence éventuelle d'antécédents familiaux, là encore inconstants. Il est généralement nécessaire d'avoir recours à l'imagerie (radiographie et/ou IRM) pour poser un diagnostic définitif (Figure 2).

La recherche de biomarqueur(s) spécifique(s) de la SpA fait l'objet d'une recherche intensive comme en témoigne les nombreux articles et revues sur la question : (Danve & O'Dell, 2015; S. Liu et al., 2020; Maksymowych, 2015; Na et al., 2006; Reveille, 2022; Romand et al., 2017; Turina et al., 2017).

Le score **BASDAI** (pour « **Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index** ») est un outil important pour le suivi des patients (Garrett et al., 1994). Il s'agit d'un questionnaire en 6 points auquel le patient répond en donnant un score de 1 à 10 à chaque question. Ces 6 questions prennent en compte :

- La fatigue générale
- La douleur au niveau du cou, dos et des hanches
- La douleur et/ou les gonflements en dehors du cou, dos et des hanches
- La douleur au niveau de zones sensibles au toucher ou à la pression
- L'intensité de la raideur matinale
- La durée de cette raideur matinale

E. Traitement

Enfin, comment traite-t-on la SpA ?

La première chose à savoir est qu'il n'existe à ce jour aucun traitement curatif de cette maladie. Seuls des traitements symptomatiques existent. Ils ont pour objectifs de diminuer la douleur et la raideur, de prévenir les dommages osseux irréversibles, de limiter la progression de la maladie et d'aider les patients à poursuivre une activité normale.

Dans tous les cas de SpA, l'activité physique est vivement conseillée et, le cas échéant, l'arrêt de la cigarette.

La kinésithérapie comme traitement non-médicamenteux peut parfois être suffisante. Si elle ne l'est pas, la première ligne de traitement médicamenteux est basée sur **les Anti-Inflammatoires Non-Stéroïdiens (AINS)**⁷ qui limitent la douleur et l'inflammation. Les corticostéroïdes peuvent également être injectés localement dans les articulations douloureuses, notamment dans le cas de la pSpA. Les AINS peuvent cependant entraîner des effets secondaires indésirables tels que des ulcères gastriques ou intestinaux. Dans le cas de la pSpA, en cas d'efficacité insuffisante des AINS un traitement par **DMARD** (pour « **Disease-Modifying Anti Rheumatic Drug** ») (Méthotrexate, Salazopyrine) peut-être ajouté. Il s'agit de traitements non-spécifiques, généralement utilisés dans pour traiter la PR, qui peuvent améliorer dans certains cas les atteintes périphériques de la SpA.

En cas d'atteinte axiale et de persistance des symptômes malgré la prise d'AINS, **des biothérapies** sont proposées aux patients. Il s'agit d'anticorps monoclonaux injectables qui visent à inhiber spécifiquement certaines voies de l'inflammation. Dans le cas de la SpA, il s'agit **des anti-TNF α et anti-IL-17A et/ou d'anti-IL-17F**. Plus récemment, **des inhibiteurs de JAnus Kinase (JAKi)** ont été développés et utilisés. Cependant, les biothérapies restent insuffisantes dans 35 à 40% des cas. De plus, ces biothérapies augmentent le risque d'infection et dans le cas des JAKi, du recul est nécessaire pour en estimer les effets secondaires car ils pourraient augmenter les risques de cancer et de pathologies cardio-vasculaires (Cherqaoui et al., 2021; Proft & Poddubnyy, 2018; Sari et al., 2015; Zhu et al., 2019).

⁷ Tel que l'ibuprofène.

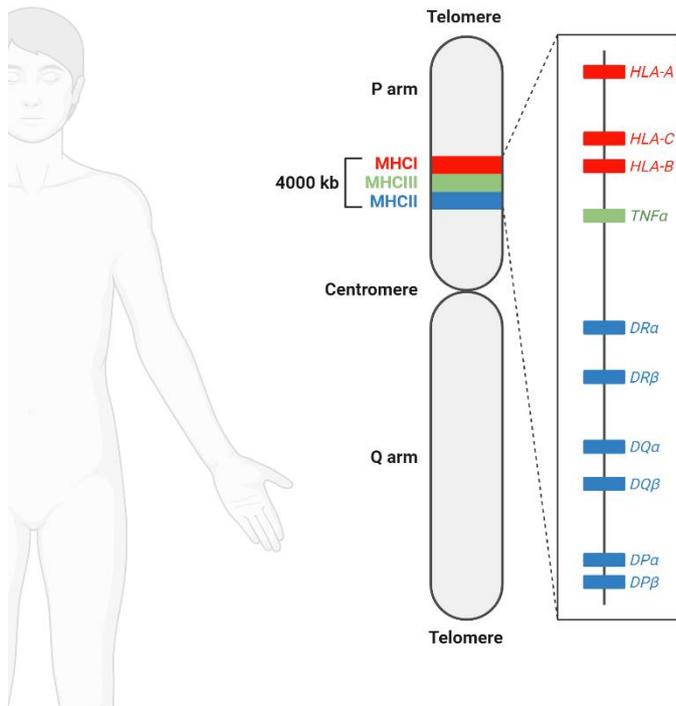
Dans les cas de déformation et/ou destruction du squelette axial ou périphérique, des opérations chirurgicales peuvent être nécessaires afin de les corriger.

Les efforts de recherche ont permis l'émergence de nouvelles molécules pour le traitement de l'inflammation. Cependant, l'efficacité incomplète des traitements et leurs effets secondaires soulignent l'importance de continuer l'étude de cette maladie et le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Pour conclure, la SpA est une maladie inflammatoire chronique complexe dont la physiopathologie exacte reste encore inconnue. Cette pathologie présente une forte composante génétique avec un rôle central de l'allèle *HLA-B27*, décelé il y a maintenant 50 ans, et de nombreux autres *loci*, découverts plus récemment, impliqués dans les immunités innée et adaptative (*ERAP1*, *IL23R*). Le traitement de la maladie évolue grâce la recherche, notamment avec l'augmentation du nombre de cibles biologiques (TNF α , IL-17 et voie JAK/STAT) et de molécules disponibles.

Bien qu'aucun mécanisme n'ait été clairement identifié, plusieurs hypothèses ont été formulées concernant le rôle d'HLA-B27 dans la physiopathologie de la SpA. Une de ces hypothèses concerne la propriété intrinsèque de la molécule HLA-B27 dont le repliement lent entrainerait un stress cellulaire. L'autre hypothèse est liée au rôle classique du CMH-I impliquant la présentation d'un peptide arthritogène par HLA-B27 aux LT CD8⁺. Dans le chapitre suivant je vais présenter la structure, les fonctions et le repliement du CMH-I avant d'aborder les deux hypothèses citées précédemment.

A. Human Chromosome: HLA (6p21)



B. CMH-I Structure



C. MHC Class I Variability

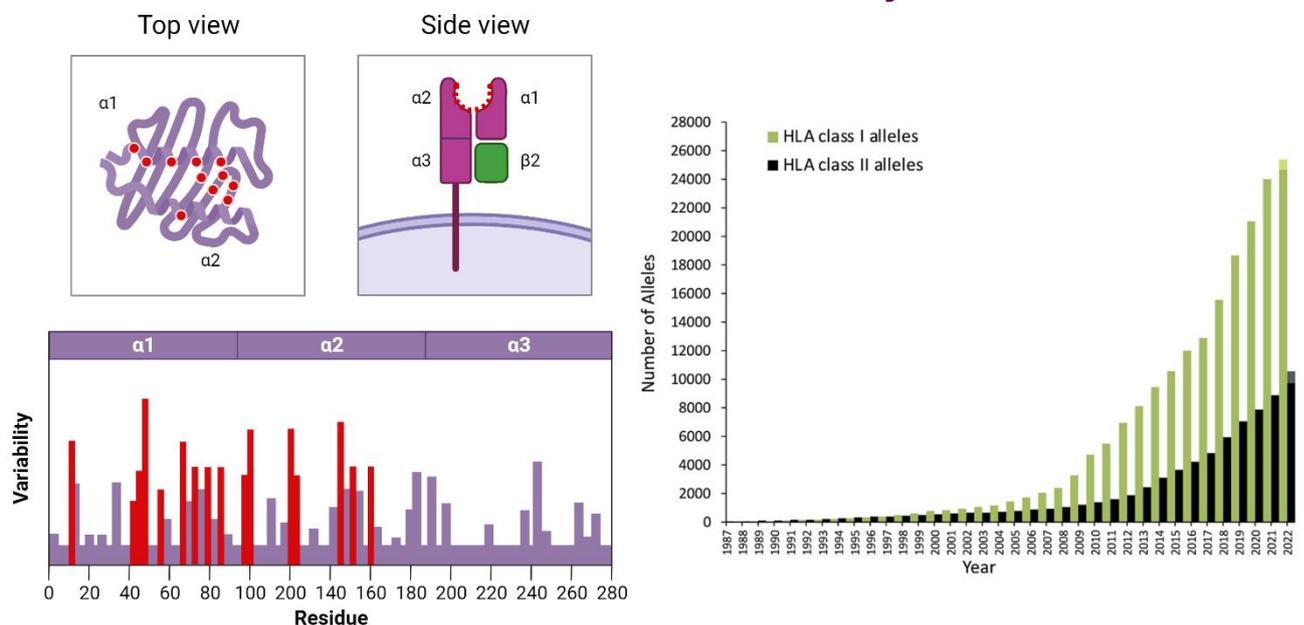


Figure 5 | CMH-I loci, structure et variabilité

(A) Représentation schématique des loci du CMH-I sur le bras court du chromosome 6. (B) Structure d'HLA-B27 (CMH-I) (en fushia) en association avec la $\beta 2m$ (en vert) et un peptide (en bleu) (structure PDB 6Y28). (C) Schéma des points fréquents de mutation de la chaîne lourde du CMH-I (domaine $\alpha 1/2$ et 3) en fonction de la position des résidus par rapport au sillon de fixation peptidique. Graphique représentant l'évolution dans le temps du nombre de variants connus des CMH-I et CMH-II depuis 1987.

II. Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I (CMH-I) : HLA-B

A. Structure et fonction

Le CMH est un ensemble de gènes situés sur le bras court du chromosome 6 (Figure 5A). Il contient 6 *loci* codant pour les principaux Antigènes de Leucocyte Humain (HLA), dits classiques : HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DQ et HLA-DP. Les 3 premiers appartiennent au CMH-I et les 3 suivants constituent le CMH-II. Les molécules du CMH-I sont présentes à la surface de toutes les cellules nucléées de l'organisme. Elles permettent la présentation de peptides intracellulaires dégradés par le protéasome aux Lymphocytes T CD8⁺ (LT CD8⁺) cytotoxiques. En cas d'infection par un pathogène intra-cellulaire, les peptides étrangers présentés par le CMH-I sont reconnus par le « T-Cell Receptor » (TCR) du LT CD8⁺ qui prolifère, s'active et induit la mort des cellules infectées. Il existe cependant un mécanisme de présentation alternatif appelé présentation-transverse (« cross-presentation ») qui permet aux Cellules Présentatrices d'Antigènes (APC) dites « professionnelles » de présenter des peptides extracellulaires via le CMH-I. Ce processus est notamment important pour la lutte contre les tumeurs (Heath & Carbone, 2001; Sánchez-Paulete et al., 2017).

Les molécules du CMH-I sont constituées de 2 sous-unités protéiques : une chaîne lourde α variable et la β 2microglobuline (β 2m) constante. A cela s'ajoute un peptide antigénique de 8 à 12 acides aminés qui interagit avec la chaîne lourde α (Figure 5B) (contre 13 à 25 acides aminés pour le CMH-II).

La chaîne lourde α est composée de 3 domaines extra-cellulaires, d'une portion transmembranaire et d'une queue intracytoplasmique. Le domaine extra-cellulaire α 3 juxta-membranaire est relativement conservé et interagit avec la molécule de costimulation CD8 des LT CD8⁺. Les domaines α 1 et α 2, extrêmement polymorphes, forment le sillon dans lequel se fixe le peptide antigénique.

Le CMH-I est l'une des régions les plus polymorphes du génome humain avec plus de 25000 allèles comptabilisés à ce jour dont plus de 9000 seulement pour le *locus* HLA-B (Barker et al., 2023). Ce polymorphisme concerne surtout les acides aminés formant le sillon peptidique, avec la présence de points chauds de mutation. Cette grande variabilité permet d'augmenter le répertoire peptidique présenté par le CMH-I (Figure 5C).

Très succinctement, le CMH-II est, quant à lui, essentiellement présent à la surface des APC et permet de présenter des peptides extracellulaires au Lymphocytes T CD4⁺ (LT CD4⁺). En cas de reconnaissance d'un antigène étranger les LT CD4⁺ se différencient en Lymphocytes T auxiliaires (Th1, Th2, Th17...) afin de lutter contre l'infection, notamment par la production de cytokines pro-inflammatoires. La présentation de peptides du soi entraîne au contraire la différenciation de Lymphocytes T CD4⁺ régulateurs (Treg) qui empêchent l'auto-immunité.

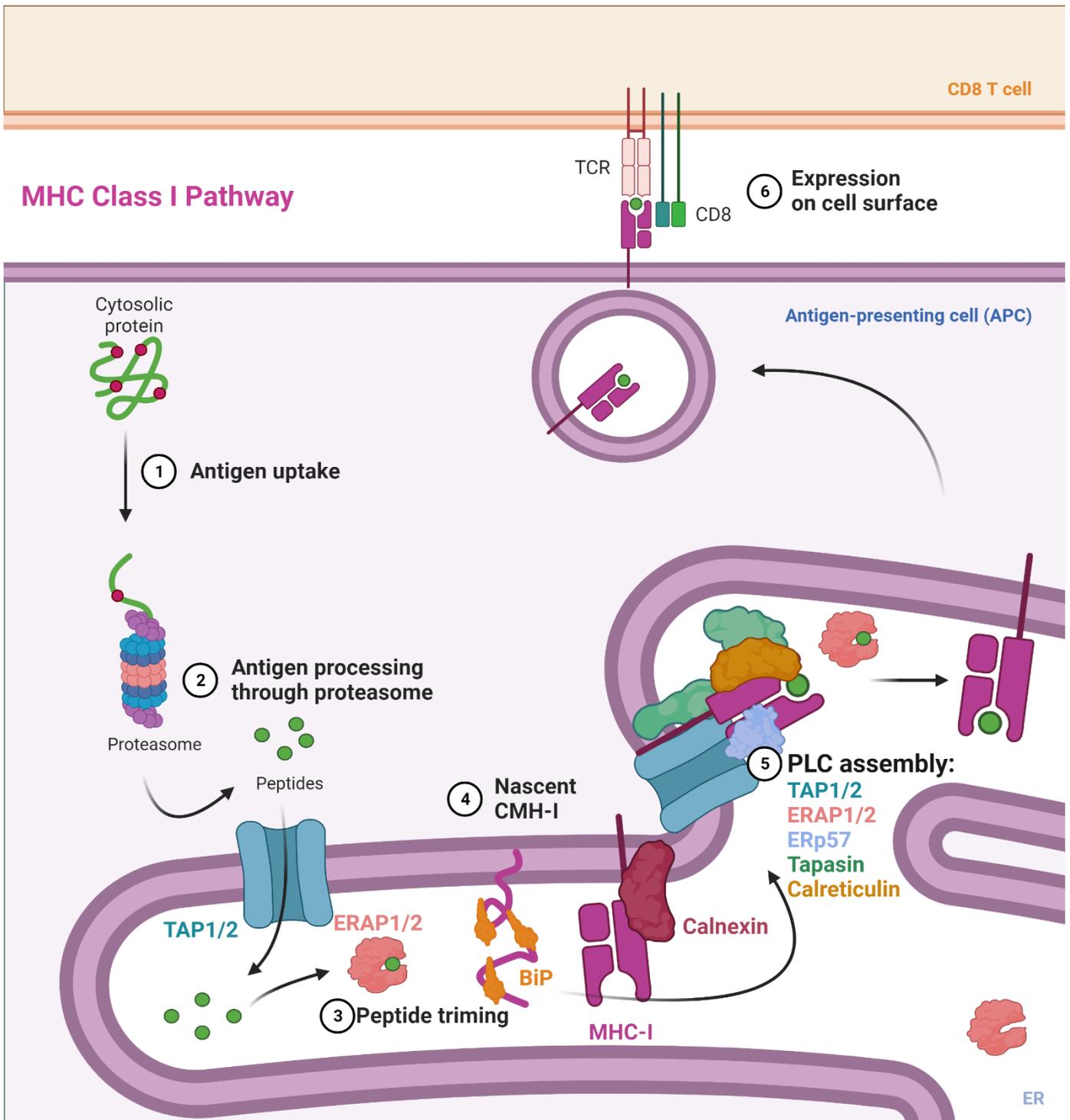


Figure 6 | Chargement du peptide et adressage à la membrane du CMH-I

(1-2) Les protéines cytosoliques sont dégradées par le protéasome en peptides dont certains sont transportés vers la lumière du RE via **TAP1/2** puis (3) raccourcis par **ERAP1** à la taille adéquate pour leur chargement sur le CMH-I (idéalement 8 à 12 acides aminés). (4) La chaîne lourde du CMH-I naissante est prise en charge par des protéines chaperonnes dont **BiP** et la **Calnexine**. (5) L'association de la chaîne légère $\beta 2m$ à la chaîne lourde stabilise la structure et entraîne le remplacement de la **Calnexine** par son homologue soluble, la **Calreticuline** ainsi que l'association d'**ERp57** et de la **Tapasine**. L'ensemble **TAP1/2-ERAP1- ERp57- Tapasine- Calreticuline** forme le complexe de chargement du peptide (PLC). Une fois correctement replié et chargé d'un peptide, le CMH-I est véhiculé vers la membrane, via l'appareil de Golgi, pour y présenter l'antigène au **LT CD8+**.

B. Synthèse, repliement et apprêtement des molécules du CMH-I

Le CMH-I nouvellement synthétisé est transloqué du cytoplasme vers le **RE** rugueux. La chaîne lourde α s'y associe à la protéine chaperonne **Binding immunoglobulin Protein (BiP)**⁸ puis aux chaperonnes Calnexine et ERp57. Après l'association de la chaîne légère β 2m, la Calnexine est remplacée par la Calréticuline (version soluble de la Calnexine) et **un ensemble multiprotéique appelé complexe de chargement du peptide** se forme (**PLC** pour « **Peptide Loading Complex** ») (**Figure 6**). Le PLC assure l'apprêtement d'un peptide sur le CMH-I et le bon repliement du CMH-I trimérique formé d'une chaîne lourde α , de la β 2m et d'un peptide. Le PLC est formé des 6 protéines suivantes (**les chaperonnes figurent en bleu**) :

- CMH-I (chaîne lourde α et β 2m)
- **TAP1/2** (pour «**T**ransporter **A**ssociated with antigen **P**rocessing» 1 et 2)
- ERAP1/2
- ERp57
- Calreticuline
- Tapasine

La tapasine favorise l'interaction du CMH-I avec TAP et donc le chargement du peptide. ERp57 et la tapasine stabilisent le complexe (Garbi et al., 2007).

Après formation d'un complexe CMH-I/peptide stable, il est adressé à la membrane pour la présentation antigénique (Hulpke & Tampé, 2013).

C. HLA-B27, un allèle particulier ?

Se pose alors la question du rôle d'HLA-B27 dans la pathogénèse de la maladie ? Qu'a-t-il de si particulier ? (**Figure 7**)

1. Un repliement laborieux

Une des particularités de HLA-B27 est la lenteur de son repliement par rapport aux autres allèles HLA-B, conduisant à la dégradation d'une partie des molécules nouvellement synthétisées par **la voie ER-Associated Degradation (ERAD)** (Mear et al., 1999). De plus, HLA-B27 a tendance à former des oligomères de chaînes lourdes (Dangoria et al., 2002). Notamment, la protéine chaperonne BiP s'associe généralement de façon transitoire au CMH-I en cours de repliement, dans le cas d'HLA-B27, cette interaction est prolongée à tel point qu'il est possible de purifier des complexes HLA-B27/BiP stables, témoignant des problèmes de repliement et de la formation d'oligomères de chaînes lourdes (Nössner & Parham, 1995). De plus, des homodimères de chaînes lourdes sont également présents à la surface des leucocytes de patients et du rat transgénique pour HLA-B27 (Santos et al., 2008). Ces

⁸ Il ne s'agit pas d'une association spécifique pour le CMH-I. BiP s'associe à toutes les protéines transloquées dans le RE.

homodimères de surface peuvent interagir avec des récepteurs « Killer Immunoglobulin Receptor » (**KIR**) présents à la surface de certains lymphocytes NK et LT CD4⁺ (KIR3DL2⁺) induisant une expansion de ces cellules et une augmentation de leur survie. Ces cellules sont ainsi retrouvées à une fréquence plus élevée dans le sang et dans les articulations de patients (Chan et al., 2005). De plus, les LT CD4⁺ KIR3DL2⁺ sont des producteurs majoritaires d'IL-17 chez les patients.

Outre l'interaction des formes mal repliées d'HLA-B27 avec des récepteurs immunitaires, l'accumulation de ces formes peut entraîner des conséquences sur les cellules tel qu'un stress du RE. Le stress du RE peut activer l'autophagie⁹, l'UPR (pour « **Unfolded Protein Response** ») voire l'apoptose (Colbert et al., 2014). De façon intéressante, l'UPR peut entraîner la production des cytokines pro-inflammatoires IL-23, TNF β et IL-1 β , notamment par l'activation de la voie **Nuclear Factor- κ B (Nf- κ B)**, suggérant un rôle potentiel de l'UPR dans la physiopathologie de la SpA.

⁹ Processus d'autodigestion qui consiste en une dégradation de composants intra-cellulaires par le lysosome.

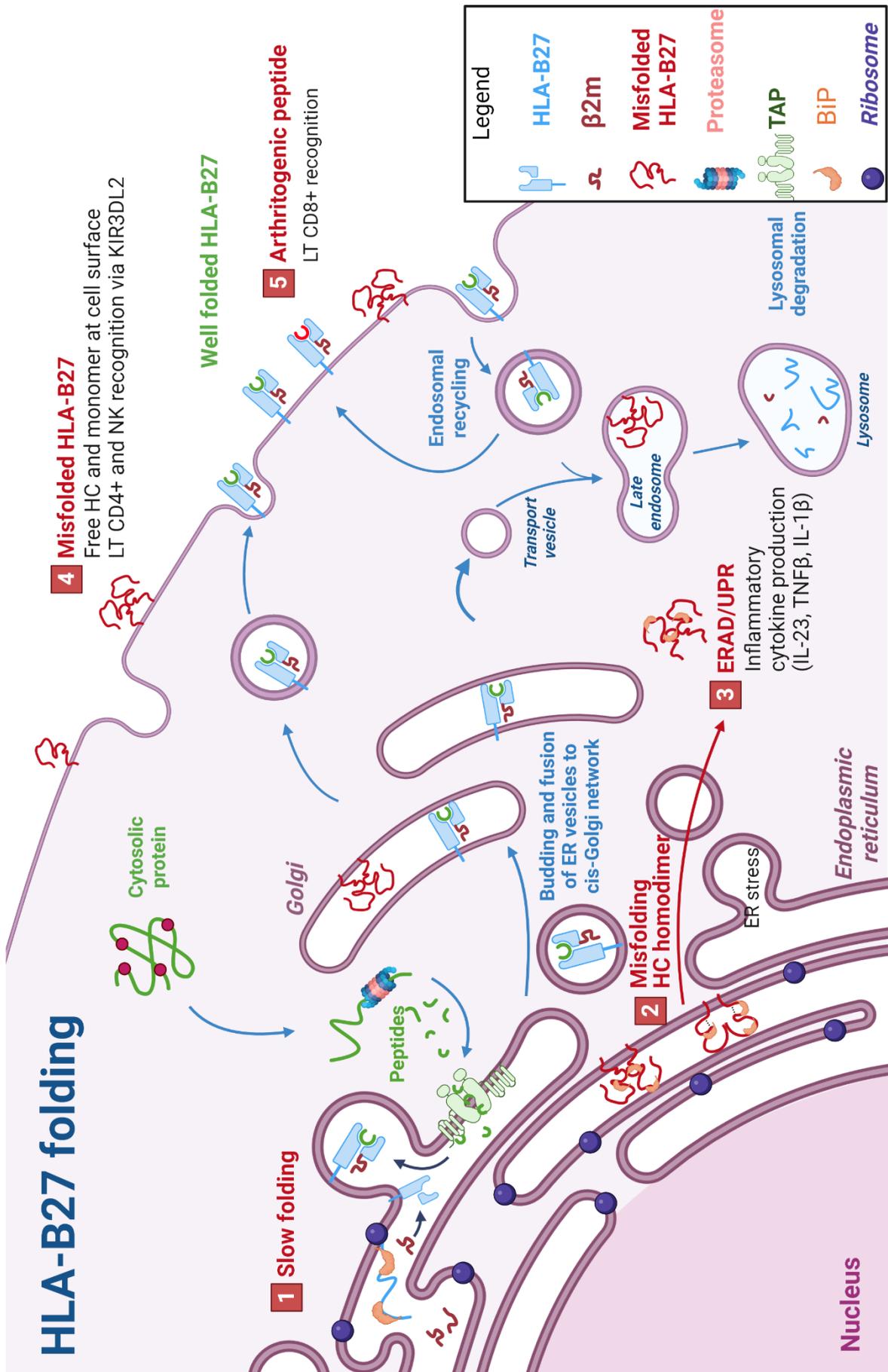


Figure 7 | Hypothèses sur la pathogénicité du HLA-B27

(1) Le repliement lent d'HLA-B27 et (2) l'accumulation d'homodimères de chaînes lourdes dans le RE entraînent une activation des voies de dégradation ERAD et UPR, pouvant entraîner un stress du RE et la production de cytokines pro inflammatoires. (4) Des dimères aberrants de chaînes lourdes peuvent être adressés à la membrane et activer les LT CD4⁺ et les lymphocytes NK exprimant KIR3DL2. (5) Enfin, HLA-B27 pourrait présenter des peptides arthritogènes aux LT CD8⁺.

2. Le peptide arthritogène

Une autre théorie pour expliquer le rôle pathogène du HLA-B27 dans la SpA est en lien avec sa fonction canonique de présentation antigénique. La reconnaissance d'un peptide du soi, présenté par HLA-B27 au LT CD8⁺, et reconnu de façon aberrante comme étranger déclencherait l'inflammation de la SpA. Ce peptide antigénique pourrait être spécifique de l'articulation et d'autres organes cibles comme l'uvée, expliquant les atteintes observées. Notamment, le collagène de type II a été identifié comme capable de stimuler les LT CD8⁺ de patients (Atagunduz et al., 2005). Très récemment un peptide issu de la protéine **GPER1** (pour « **G** Protein-coupled **E**strogen **R**eceptor **1** ») a été identifié comme capable de se lier à HLA-B27 et de stimuler le TCR de cellules de patients atteints de SpA. Le gène codant cette protéine est largement exprimée dans le cartilage, les os et les yeux. De plus, détail très intéressant, son expression dans l'œil est limitée à l'iris et au corps ciliaire, cibles de l'inflammation lors de l'uvéite antérieure développée par les patients atteints de SpA (X. Yang et al., 2022).

Le « **mimétisme moléculaire** » faisant appel à une homologie de séquence potentielle entre peptide du soi et antigène microbien présentés par le HLA-B27 complète l'hypothèse du peptide arthritogène (López-Larrea et al., 1998). Un tel mimétisme pourrait conduire à une réponse inappropriée des LT CD8⁺ contre le soi après son activation par un agent microbien. Un exemple de ce mécanisme a été mis en évidence avec un peptide du soi dérivé de la protéine **VIPR1** (pour « **V**asoactive **I**ntestinal **P**olypeptide **R**eceptor **1** ») qui est présenté par HLA-B27 dans une conformation semblable à un peptide dérivé de **LMP2** (pour « **L**atent **M**embrane **P**rotein **2** ») provenant du **Virus Epstein-Barr (EBV)** (Brooks et al., 1993). D'autres analyses structurales montrent que le peptide **pGR** (pour « **G**lucagon **R**eceptor-derived **p**eptide ») est lui aussi présenté par HLA-B27 dans une conformation semblable à **LMP2** (Rückert et al., 2006). De plus, une étude de 2004 montre que le peptide VIPR1 se lie au HLA-B*2705 associé à la SpA et au HLA-B*2709, non associé à la SpA, dans des conformations différentes (Hülsmeier et al., 2004). Les auteurs de ce travail suggèrent que cette différence structurale influe la sélection thymique et engendre des répertoires de LT CD8⁺ différents entre porteurs du HLA-B*2705 et du HLA-B*2709, ce qui pourrait expliquer la différence de susceptibilité à la SpA conférée par ces deux allotypes.

Cependant, si ces études étayaient l'hypothèse d'un peptide arthritogène présenté par HLA-B27, il n'existe à ce jour aucune preuve formelle de son rôle dans le développement de la SpA.

Ainsi, poursuivre l'étude du mécanisme physiopathologique de la SpA et du rôle du HLA-B27 dans celui-ci est nécessaire. C'est notamment l'utilisation de modèles animaux qui permet des avancées majeures dans la compréhension de cette pathologie. Dans le chapitre suivant, je vais décrire les principaux modèles d'études de la SpA en détaillant certaines avancées qu'ils ont permis. Je vais ainsi parler du rat transgénique pour HLA-B27 et la **β2m humaine (hβ2m)**, de différentes lignées de souris et du modèle prometteur pour comprendre les effets moléculaires d'HLA-B27, *Drosophila melanogaster*.

Lignée	Transgène	Hémi/Homo	Fond génétique	Copies d'HLA-B27	Copies de hβ2m	Maladie
33-3	HLA-B27/hβ2m	Hémi	F344	55	28	Oui
21-4H	HLA-B27/hβ2m	Hémi	Lewis	120	90	Oui
21-L	HLA-B27/hβ2m	Hémi	Lewis	12	12	Non
21-3	HLA-B27/hβ2m	Homo	Lewis	40	30	Oui

21-3	HLA-B27/hβ2m	Hémi	Lewis	20	15	Non
283-2	hβ2m	Hémi	Lewis	0	35	Non
21-3 x 283-2	HLA-B27/hβ2m	Hémi	Lewis	20	50	Oui

F344 120-4	HLA-B07/hβ2m	Hémi	F344	52	26	Non
120-4	HLA-B07/hβ2m	Hémi	Lewis	52	10	Non

Tableau 2 | Les principales lignées de rats transgéniques pour l'étude du rôle d'HLA-B27 dans la SpA

La première ligne correspond à la lignée utilisée dans mon travail de laboratoire
 21-3 x 283-2 est le croisement de la lignée transgénique 21-3 exprimant 20 copies d'HLA-B27 et 15 copies de hβ2m avec la lignée 283-2 exprimant 35 copies de hβ2m (*en bleu*)
 Les deux dernières lignes (*en vert*) sont les lignées témoins transgéniques pour le HLA-B07 et la hβ2m.
 « Hemi »: Hemizygote; « Homo»: Homozygote

III. Les modèles animaux d'étude de la SpA

Les animaux modèles occupent une place importante dans la recherche scientifique et médicale depuis la deuxième moitié du 20^{ème} siècle, notamment grâce à l'émergence des techniques de génie génétique. L'étude de la SpA a, elle aussi, bénéficié de ces nouvelles techniques (Breban et al. 2021).

A. Le rat

1. Développement d'un modèle emblématique d'étude de la SpA

C'est en 1990 qu'Hammer et al. ont généré des rats transgéniques pour le HLA-B27 et la h β 2m par micro-injection d'ovules de rats fécondés. Ces animaux développent spontanément des manifestations analogues à la SpA humaine, et ce, sur divers fonds génétiques, lorsque qu'HLA-B27 et h β 2m sont exprimés en quantité suffisante. Par la suite, je nommerai ces rats transgéniques, **rats B27**. Ce modèle constitue encore aujourd'hui l'indice le plus solide en faveur de l'implication directe du HLA-B27 dans le développement de la SpA. La spécificité de la pathologie décrite dans ce modèle pour l'allèle HLA-B27 est prouvée par l'absence de phénotype morbide chez les rats transgéniques pour l'allèle HLA-B07, allèle négativement associé à la SpA, et la h β 2m (**rat B07**) (Taurog 1994).

Par ailleurs, la sévérité des manifestations de SpA chez le rat B27 dépend du nombre de copies de chacun des deux transgènes. Plus le nombre de copies d'HLA-B27 est élevé, plus les symptômes développés sont sévères, touchant alors mâles et femelles et associant aux arthrites périphériques, une colite proche de la rectocolite hémorragique humaine et un psoriasis (Taurog et al. 1993). Il est à noter que l'insertion des copies du transgène s'est faite par « bloc » dans un site aléatoire unique, ce qui permet de conserver ces copies au fur et à mesure des générations. L'augmentation du nombre de copies de h β 2m est corrélée avec une augmentation de la prévalence et de la sévérité des arthrites. Une quantité relativement modérée de copies d'HLA-B27 combiné à un nombre élevé de copies de h β 2m a pour effet, dans certaines lignées, d'entraîner un phénotype plus caractéristique de l'axSpA purement articulaire associant une inflammation des articulations rachidiennes et sacro-iliaques à celles des pattes (T. M. Tran et al., 2006). Ce travail a mis en évidence que la colite n'était pas nécessaire au développement de l'arthrite induite par le HLA-B27 dans le modèle du rat B27. Les différentes lignées de rats produites sont résumées dans le **Tableau 2** (adapté de (Jouhault, 2017)).

2. Implication des cellules myéloïdes

Ce modèle a non-seulement permis de conforter la preuve de l'implication directe de l'allèle HLA-B27 dans le développement de la SpA, mais il a aussi permis plusieurs avancées dans la compréhension de la physiopathologie de la maladie depuis maintenant 30 ans. L'un

des premiers travaux conduits dans ce modèle démontra l'implication des cellules souches hématopoïétiques¹⁰ dans le développement de la SpA du rat (Breban et al. 1993). En effet, le transfert des cellules souches hématopoïétiques présentes dans la moelle osseuse ou le foie fœtal d'un rat B27 à un rat **Non-TransGénique (NTG)** irradié, et donc dépourvu de ces mêmes cellules, induit le développement de la SpA du rat. Au contraire, le transfert des cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse d'un rat NTG à un rat B27 malade irradié conduit à la disparition de la SpA chez ce rat. Enfin, le transfert des lymphocytes déjà différenciés, provenant des ganglions ou de la rate d'un rat B27 à un rat NTG irradié n'induit pas le développement de la SpA. Cette dernière expérience souligne l'importance des cellules myéloïdes dans le développement de la SpA du rat.

L'implication des cellules myéloïdes dans le développement de la maladie dans ce modèle conduisit à s'intéresser aux **Cellules Présentatrices d'Antigènes (APC-Antigen Presenting Cells)** et plus particulièrement aux **Cellules Dendritiques conventionnelles (cDC – conventional Dendritic Cells)** en tant qu'APC professionnelle jouant un rôle central dans la réponse immunitaire. Une altération fonctionnelle des cDC fut d'abord rapportée (Stagg et al. 1995) dans deux lignées de rats B27 distinctes (sur fonds Lewis et F344 – toutes deux sujettes à la SpA du rat) dans lesquelles les auteurs démontrèrent la réduction de la capacité des cDC B27 à induire la prolifération des LT par rapport aux cDC NTG. Ces premières observations furent confirmées et approfondies dans une étude de 2004 (Hacquard-Bouder et al., 2004). Cette dernière démontre que la fonction de costimulation des APCs vis à vis des LT est altérée chez les rats B27, suggérant une possible perte de tolérance envers leur propre microbiote intestinal. Il a été prouvé par les mêmes auteurs que la présence de la molécule HLA-B27 dans les DC perturbait la formation de la synapse immunologique avec les LT CD4⁺ en interférant avec le recrutement des molécules de costimulation (Hacquard-Bouder et al., 2007). Ce mécanisme pourrait perturber le maintien et/ou la différenciation des **Treg** et participer à l'expansion des LT CD4⁺ T pathogènes qui sera détaillée ultérieurement (dans la partie : I.A.3). Ces observations ont été confirmées et étendues par la démonstration que les DC des lignées de rat développant les manifestations les plus sévères avaient une capacité d'activation des LT CD4⁺ T plus affectée que celle des lignées aux manifestations moins sévères (Fert et al., 2008).

En corrélation avec ces observations, la mobilité des DC B27 ainsi que leur morphologie sont altérées par la présence du HLA-B27, potentiellement par une perturbation du cytosquelette, ce qui participe très probablement aux altérations de la formation de la synapse immunologique. De plus, la sous-population des **DC conventionnelles de type 1 (cDC1)** (CD103⁺CD4⁻), souvent décrite comme tolérogène, a une viabilité altérée chez les rats B27, ce qui pourrait participer au déclenchement de la SpA du rat (Dhaenens et al., 2009).

En complément de ces observations, une autre équipe a décrit en 2012 la disparition de cette population cDC1 dans la lymphe afférente et dans les ganglions mésentériques des rats B27, suggérant une altération de la capacité de migration de ces cellules à partir de la muqueuse intestinale et/ou une mortalité accrue (Utriainen et al., 2012). Un travail plus

¹⁰ Cellules souches à l'origine de toutes les cellules sanguines (plaquettes, globules blancs, globules rouges...).

récent a permis de préciser que la sous-population cDC1 XCR1⁺¹¹ CD4⁻ des rats B27 avait une capacité altérée à migrer vers les ganglions drainant après activation du récepteur Toll Like Receptor 7 (TLR-7) par rapport aux rats NTG (Ermoza et al., 2019). Dans un contexte physiologique, les cDC1 migratoires présentent aux LT CD4⁺ T naïfs des peptides antigéniques provenant de la lumière intestinale *via* le CMH-II. Ces cellules jouant un rôle tolérogène, induiraient dans ce contexte une tolérance envers les antigènes exogènes, notamment ceux provenant du microbiote intestinal, inactivant les LT auto-réactifs. Ainsi, il est aisément compréhensible qu'une altération fonctionnelle de cette population pourrait entraîner une perte de tolérance envers son propre microbiote et une réaction inflammatoire inappropriée.

Parallèlement à ces études de la sous-population cDC1, une étude transcriptomique des cDC2 (CD103⁺CD4⁺) a mis en évidence une diminution de la signalisation IFN γ chez les rats B27, et ce, avant même l'apparition des premiers symptômes et dans deux lignées différentes (Fert et al., 2014). Une diminution analogue avait été précédemment rapportée dans les macrophages dérivés de monocytes de patients atteints de SpA, soulignant là encore la pertinence du modèle murin vis à vis de la maladie humaine. Dans ce même travail, les auteurs ont par ailleurs observé une diminution de l'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL-27, inductrice de l'IFN γ , dans les cDC2 de rats B27 comparées à celle de rats témoins. Cette observation est particulièrement intéressante car l'IL-27, produit par les DC en réponse à l'IFN de type I et II, induit la différenciation de Treg anti-inflammatoires producteurs d'IL-10 et inhibiteurs de la différenciation Th17 (Wang et al., 2012). Ces données suggèrent qu'un défaut de signalisation IFN γ pourrait participer à la différenciation des LT CD4⁺ en Th17 pathogéniques.

3. Implication des LT CD4⁺

L'implication des LT¹² a été suggéré par l'étude de rats B27 athymiques, protégés du développement des manifestations de la SpA du rat. Le transfert de LT CD4⁺ purifiés à partir de rat B27 dans ces rats B27 athymiques suffit à induire la SpA du rat soulignant leur importance dans la physiopathologie (Brebant et al., 1996).

Au contraire, l'injection de la fraction CD8⁺ n'induisait que peu ou pas de symptômes. La preuve que les LT CD8⁺ ne sont pas nécessaires à l'induction de la SpA chez le rat a été apportée par le fait que la délétion des cellules CD8 $\alpha\beta$ chez les rats B27 n'avait aucun effet protecteur sur le développement de la pathologie (May et al., 2003). Ces différentes expériences montrent que la fonction canonique de présentation peptidique par le CMH-I, et donc par le HLA-B27, aux LT CD8⁺ n'est pas impliquée dans le développement de la SpA dans ce modèle. Il s'agit-là d'un argument de poids en défaveur de la théorie du peptide arthrogène.

¹¹ Il s'agit du récepteur de la chimiokine XCL1 qui induit la migration des cDC1 après activation.

¹² Cellules immunitaires dérivées du thymus (CD8⁺ et CD4⁺) – Voir la partie sur la sélection thymique

Comme décrit précédemment, les cDC de rats B27 induisent **un biais de différenciation des LT CD4⁺ en lymphocytes Th17¹³** ainsi qu'une accumulation de ces derniers dans les ganglions mésentériques et poplités (Glatigny et al., 2012). Dans cette même étude, des cellules IL-17 positives ont été détectées dans des articulations arthritiques de rats B27. Les auteurs suggèrent le rôle potentiel de l'induction des Th17 comme mécanisme pathologique de la SpA du rat. Il a été montré la même année que les LT CD4⁺ stimulés par des DCs B27 produisaient d'avantage d'IL-17 (Utraiainen et al., 2012). De façon très intéressante, les Th17 sont impliqués dans la réponse immunitaire muqueuse, tout particulièrement au niveau du tractus digestif. Les rats B27 élevés en condition stériles ne développent d'ailleurs ni la colite ni les arthrites caractéristiques de la SpA du rat (Taurog et al. 1994), ce qui est cohérent avec l'implication des Th17 en lien avec l'environnement microbien digestif dans la SpA.

4. Rôle des Treg

Les Treg, qui sont d'une importance capitale pour le contrôle de la prolifération des lymphocytes **T effecteurs (Teff)** et le maintien de l'homéostasie des cellules immunitaires, **ont un profil cytokinique déséquilibré chez les rats B27**. En effet, chez ces rats, les Treg **produisent plus d'IL-17** que chez les rats témoins. **A l'inverse, la cytokine anti-inflammatoire IL-10 est produite en moindre quantité par les Treg B27**. En revanche, la capacité inhibitrice de ces Treg sur les Teff n'est pas altérée (Araujo et al., 2014). Il est admis aujourd'hui qu'une perturbation de la balance Treg/Th17 est impliquée dans certaines maladies auto-immunes (Jadidi-Niaragh & Mirshafiey, 2012). Il est alors concevable que ce déséquilibre de la balance IL-10/IL-17 dans les Treg des rats B27 peut jouer un rôle important dans le développement ou le maintien de l'inflammation.

Récemment, notre équipe a montré que l'addition d'IL-27 dans des conditions de différenciation Treg et Th17 *in vitro* réduisait la proportion des cellules productrices d'IL-17, la quantité d'IL-17 produite et augmentait la quantité d'IL-10 produite dans les deux cas. Une diminution de la proportion de LT CD4⁺ IL-17⁺ en réponse à l'IL-27 a également été observée *in vitro* chez les patients atteints de SpA (incluant notamment des patients réfractaires aux biothérapies usuelles). Finalement, dans cette étude, l'injection d'IL-27 aux rats B27 a permis de réduire la colite, l'inflammation intestinale histologique et les arthrites ainsi que la population de Teff producteurs d'IL-17 et de TNF α dans les ganglions mésentériques et la concentration d'IL-17 dans le sérum des rats B27 traités (Jouhault et al., 2023).

B. La Souris

A la recherche d'un modèle pour la SpA, plusieurs lignées de souris transgéniques pour le HLA-B27 ont été générées. Cependant, aucune n'a développé de phénotype à l'exception d'une lignée croisée avec des souris déficientes pour la β 2m murine qui ont développé des

¹³ Lymphocytes T helper producteurs d'interleukine-17A (IL-17A) et de TNF α ayant des effets pro-inflammatoires.

arthrites (Khare et al., 1995). Mais il a été découvert quelques années plus tard que ce phénotype était indépendant d'HLA-B27 et plutôt causé par l'absence du CMH-I dans certains fonds génétiques, invalidant alors le modèle (Kingsbury et al., 2000).

1. La souris SKG

Certains modèles de souris ont permis de mieux comprendre le rôle de l'axe IL-23/IL-17 dans la SpA. C'est notamment le cas de la souris SKG, un modèle particulièrement intéressant car fortement lié au développement de Th17, à une réduction de la population des Treg ainsi que de leur capacité inhibitrice, le tout accompagné d'une augmentation de la production d'IL-23 (Benham et al., 2014). La souris SKG porte une mutation du gène *Zap-70*, codant la protéine ZAP-70, un membre de la cascade d'activation du TCR. Cette mutation rend l'activation du TCR moins efficace, affectant notamment la sélection négative des LT auto-réactifs dans le thymus (Sakaguchi et al. 2003). Ces souris, lorsqu'elles sont élevées en condition dépourvue de pathogène microbien dite "specific-pathogen free" puis injectées avec du Curdlan, un polysaccharide de la paroi des bactéries et levures, développe un phénotype similaire à la SpA, associant manifestations ostéo-articulaires (dactylite, enthésite du talon d'Achille, arthrite, spondylite, sacro-illite) et extra-articulaires (uvéite et iléite) (Rahman & Thomas, 2017). Ce modèle met à nouveau en lumière le rôle du microbiote dans le développement de la SpA puisqu'en condition d'élevage axénique, les souris ne développent aucun symptôme (Rehaume et al., 2014).

2. La surexpression d'IL-23

Un autre modèle dépendant de l'axe IL-23/IL-17 a été obtenu chez la souris en délivrant une dose continue d'IL-23 par l'intermédiaire d'un plasmide intégré dans le foie (Adamopoulos et al., 2011; Sherlock et al., 2012). Ces souris développent des enthésites avec formation osseuse. Des LT γ/δ CD4⁻ CD8⁻ IL-23R⁺ Retinoic acid receptor-related Orphan nuclear-Receptor **gamma-t (ROR γ t)** ont été détectés dans les enthèses de ces souris. Il s'agit d'une observation particulièrement pertinente puisque ce type de cellules a été détecté dans les enthèses humaines et un enrichissement en lymphocytes **T Natural Killer invariants (iNKT)** ROR γ t⁺ ainsi qu'en Th17 est observé dans les articulations de patients atteints de SpA (Cuthbert et al. 2019 ; Venken et al. 2019).

3. *TNF^{ΔARE}*

Le dernier modèle murin que je souhaite évoquer est le celui obtenu par la surexpression du gène *TNFSF2* codant pour le TNF- α . Ces souris développent spontanément des manifestations ressemblant à la SpA comprenant polyarthrite destructive, sacroiliite, enthésite et iléite de type maladie de Crohn (Armaka et al. 2008 ; Kontoyiannis et al. 1999). Ce modèle est particulièrement intéressant car il met en évidence le rôle important joué par

le TNF α dans la SpA, comme en témoigne l'efficacité des biothérapies anti-TNF α dans cette maladie (Braun et al., 2002).

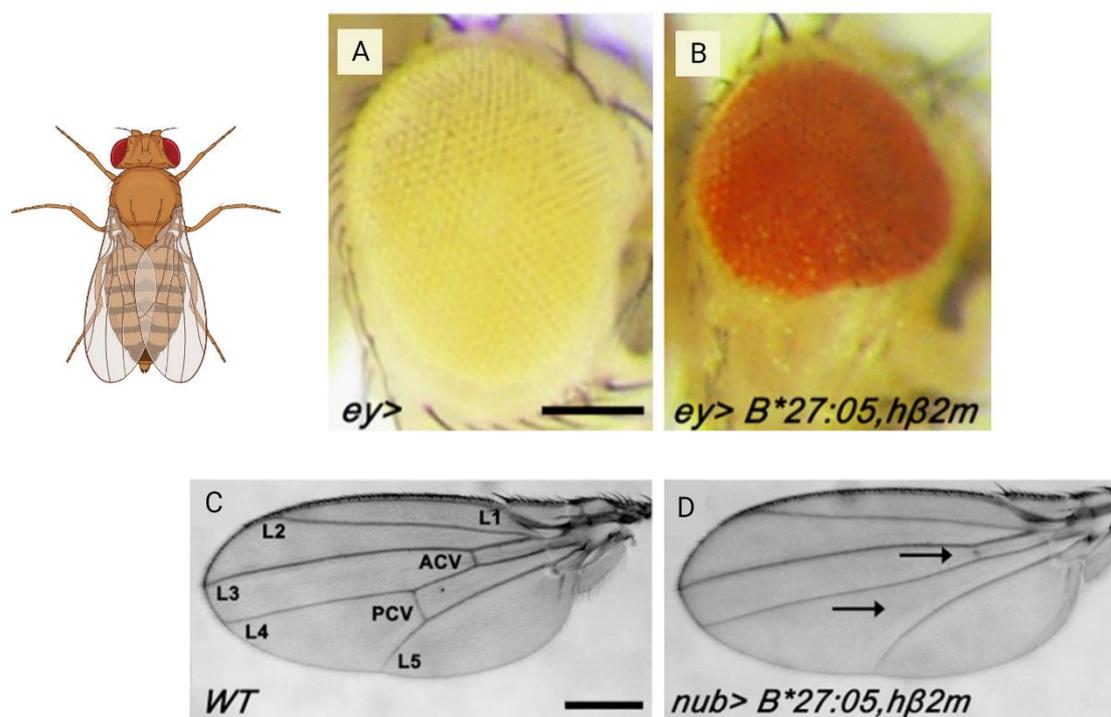


Figure 8 | Phénotypes développementaux observés chez *Drosophila melanogaster* lors de la co-expression d'HLA-B27 et hβ2m dans l'œil et dans l'aile.

(A) Œil de drosophile témoin et (B) Œil de taille réduit chez la drosophile exprimant HLA-B27 et hβ2m. La couleur rouge de l'œil n'est qu'un indicateur de la présence du transgène.
 (C) Aile sauvage de drosophile et (D) phénotype de perte des veines transversales antérieure et postérieure (ACV et PCV) observé chez la drosophile exprimant HLA-B27 et la hβ2m au cours du développement larvaire dans la structure à l'origine de la formation de l'aile, le disque imaginal de l'aile.

C. *Drosophila melanogaster*

Dernièrement, un nouveau modèle d'étude du rôle du HLA-B27 dans la SpA a été généré (Grandon et al., 2019). Il s'agit de la drosophile transgénique pour le HLA-B27 et la h β 2m (HLA-B*2705 et HLA-B*2704, deux sous-types de HLA-B27 associés au risque de SpA ont été testés en parallèle avec des résultats comparables). Lorsque qu'HLA-B27 et h β 2m sont coexprimés au cours du développement des yeux et des ailes des drosophiles, ils induisent des défauts de formation de ces structures (respectivement une taille réduite de l'œil et la perte des veines transversales de l'aile **Figure 8**). B. Grandon, dont la thèse portait sur le développement de ce modèle, a démontré une association entre **l'expression des transgènes et une perturbation de la voie Bone Morphogenic Proteins (BMP)/TGF β conduisant à l'apparition de ces phénotypes**. Ces phénotypes sont spécifiques d'HLA-B27 puisqu'ils ne sont pas observés chez les drosophiles HLA-B07/h β 2m. Il a été proposé qu'HLA-B27 influençait l'apparition de ces phénotypes par un effet dominant négatif sur le récepteur de type I aux BMP, **Saxophone (Sax)**, résultant d'une interaction physique avec ce récepteur. Chez les vertébrés, les orthologues de Sax, **Activin receptor-Like Kinase (ALK)1 et ALK2** sont activés par des ligands de type BMP. Cependant, il a été démontré qu'ALK1 et ALK2 étaient respectivement capable de réguler la signalisation TGF β et d'antagoniser la signalisation activine (Oh et al., 2000; Renlund et al., 2007). Chez la drosophile, l'expression d'HLA-B27 induit une perte de l'effet antagoniste de Sax sur la signalisation BMP, conduisant à une suractivation de cette voie BMP selon le modèle proposé ci-dessous (**Figure 9**):

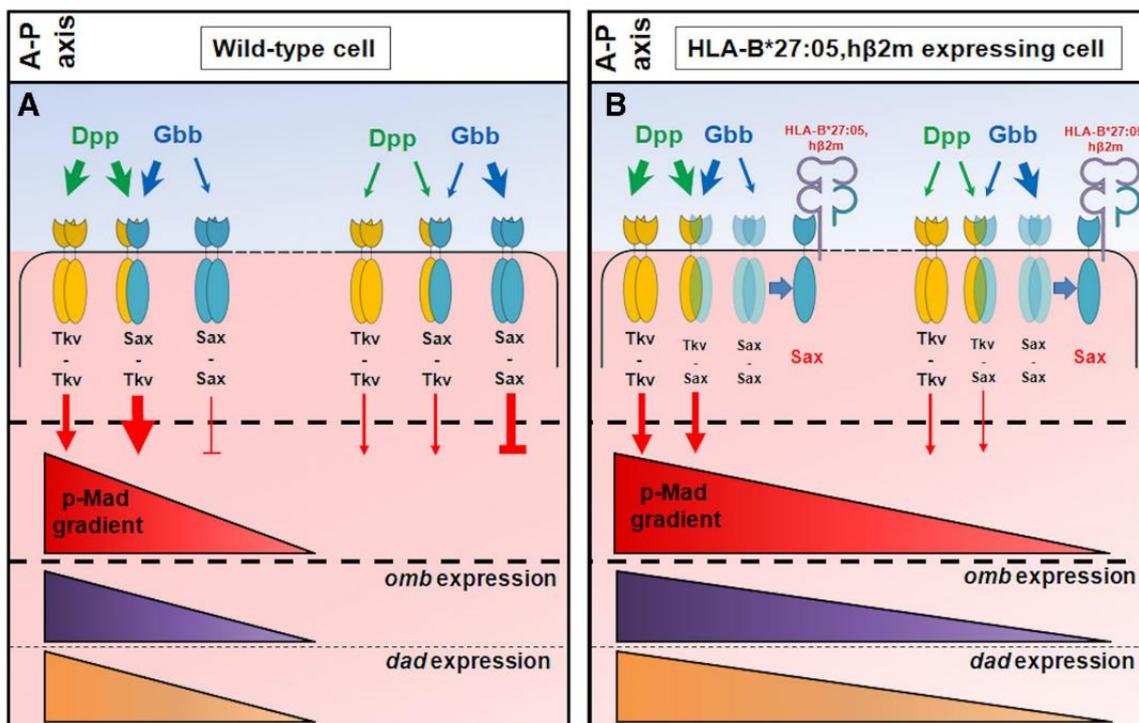


Figure 9 | Modèle proposé de l'interaction d'HLA-B27/hb2m et de la voie BMP chez la *D. melanogaster*

La drosophile a ainsi permis de mettre en évidence de nouveaux mécanismes moléculaires potentiellement impliqués dans le développement de la SpA. Chez les vertébrés,

un effet dominant négatif d'HLA-B27 sur les récepteurs ALK1 et/ou ALK2 pourrait entraîner une perturbation de la signalisation BMP, activine et/ou TGF β pertinente dans le cadre de la SpA. En effet, des perturbations de cette signalisation sont associés à des pathologies graves chez l'Homme tel que la **Fibrodysplasie Ossifiante Progressive (FOP)**.

Lien chez l'Homme

Le mutant d'ALK2 conduisant à la FOP est un cas particulièrement intéressant puisqu'il s'agit d'une maladie rare entraînant l'ossification ectopique des muscles, des ligaments et des tendons (Hatsell et al., 2015). Cette maladie est causée par une hypersensibilité du récepteur ALK2 conduisant à une suractivation de la signalisation SMAD1/5/8 en réponse aux ligands BMP classiques, mais également en réponse à l'activine qui est généralement inhibitrice de la signalisation BMP lorsqu'elle fixe ce récepteur (Valer et al., 2019). En effet, l'activine possédant deux récepteurs de type II en commun avec les BMP, elle est habituellement capable d'antagoniser la signalisation BMP par compétition (Olsen et al., 2015).

Les observations faites chez la drosophile ont conduit à une étude de l'interaction d'HLA-B27 avec ALK2 chez l'Homme. Cette étude révèle que l'interaction observé chez la drosophile entre HLA-B27 et Sax s'avère transposable à l'Homme avec une interaction d'ALK2 avec HLA-B27 dans les LT de patients atteints de SpA. De même, la mesure de la réponse des LT de patients atteints de SpA à l'activation par l'activine A ou par le TGF β 1 révèle une activation exacerbée de la voie en réponses à ces deux ligands par rapport aux LT de témoins sains (Grandon et al., 2019).

L'étude de la drosophile HLA-B27 se poursuit dans le laboratoire LGBC, nos collaborateurs travaillant sur ce modèle, et offre de nouvelles observations particulièrement intéressantes. En effet, la co-expression d'HLA-B27 et de la h β 2m dans les plasmocytes¹⁴ ou dans l'intestin des drosophiles altère leur longévité et/ou leur résistance à une infection bactérienne. Parmi les pistes explorées pour expliquer ces résultats, une prolifération accrue des cellules du tube digestif et une implication potentielle de la kinase **TAK1 (TGF β Activated Kinase 1)** sont observées (Rincheval et de Taffin, données non publiées).

Pour conclure, le rat a permis de mettre en évidence l'implication des LT CD4⁺ et des cellules myéloïdes dans le développement de la SpA. Plus précisément, les LT CD4⁺ sont nécessaire au développement de la pathologie et une prolifération des Th17 est constatée ainsi qu'un phénotype altéré des Treg. La drosophile a quant à elle permis de mettre en évidence une voie de signalisation encore inexplorée dans la SpA, la voie BMP/TGF β . De façon très intéressante, la voie BMP/TGF β est importante à toutes les étapes de vie des LT CD4⁺, du développement à la régulation de l'homéostasie des sous-types Th. Ainsi, ce chapitre s'intéressera à la genèse des lymphocytes Th, de la cellule souche à la cellule mature en

¹⁴ Il n'y a pas d'immunité adaptative chez la drosophile, seulement une immunité innée.

terminant par mettre en lumière le rôle plus particulier du TGF β aux différentes étapes de cette différenciation.

IV. La différenciation des lymphocytes T CD4⁺

Le système immunitaire des vertébrés est composé de deux systèmes complémentaires et interconnectés. **Le système immunitaire inné**, qui permet une réponse rapide mais non spécifique contre un pathogène. En complément de ce système de défense, les vertébrés possèdent **un système immunitaire adaptatif**. Ce dernier met plus de temps à se mettre en place, mais en contrepartie, il possède une grande efficacité et spécificité d'action et possède également une mémoire des pathogènes rencontrés¹⁵. De plus, il nécessite l'intervention de cellules du système immunitaire innée pour monter une réponse. Les rôles du système immunitaire sont d'éliminer les antigènes étrangers, d'assurer la mémoire immunitaire et de développer une tolérance au « soi ». Ils possèdent d'ailleurs des mécanismes et fonctions communes.

L'immunité adaptative est opérée par : **les lymphocytes dérivés du thymus (LT)** qui assurent l'immunité cellulaire et **les lymphocytes dérivés de la moelle osseuse (LB)** qui, eux, assurent l'immunité humorale (Luckheeram et al., 2012).

¹⁵ Il existe également une forme de mémoire de l'infection du système immunitaire innée qu'on appelle « trained immunity ». C'est un sujet relativement récent dont la première revue date de 2011.

Développement des LT dans le thymus

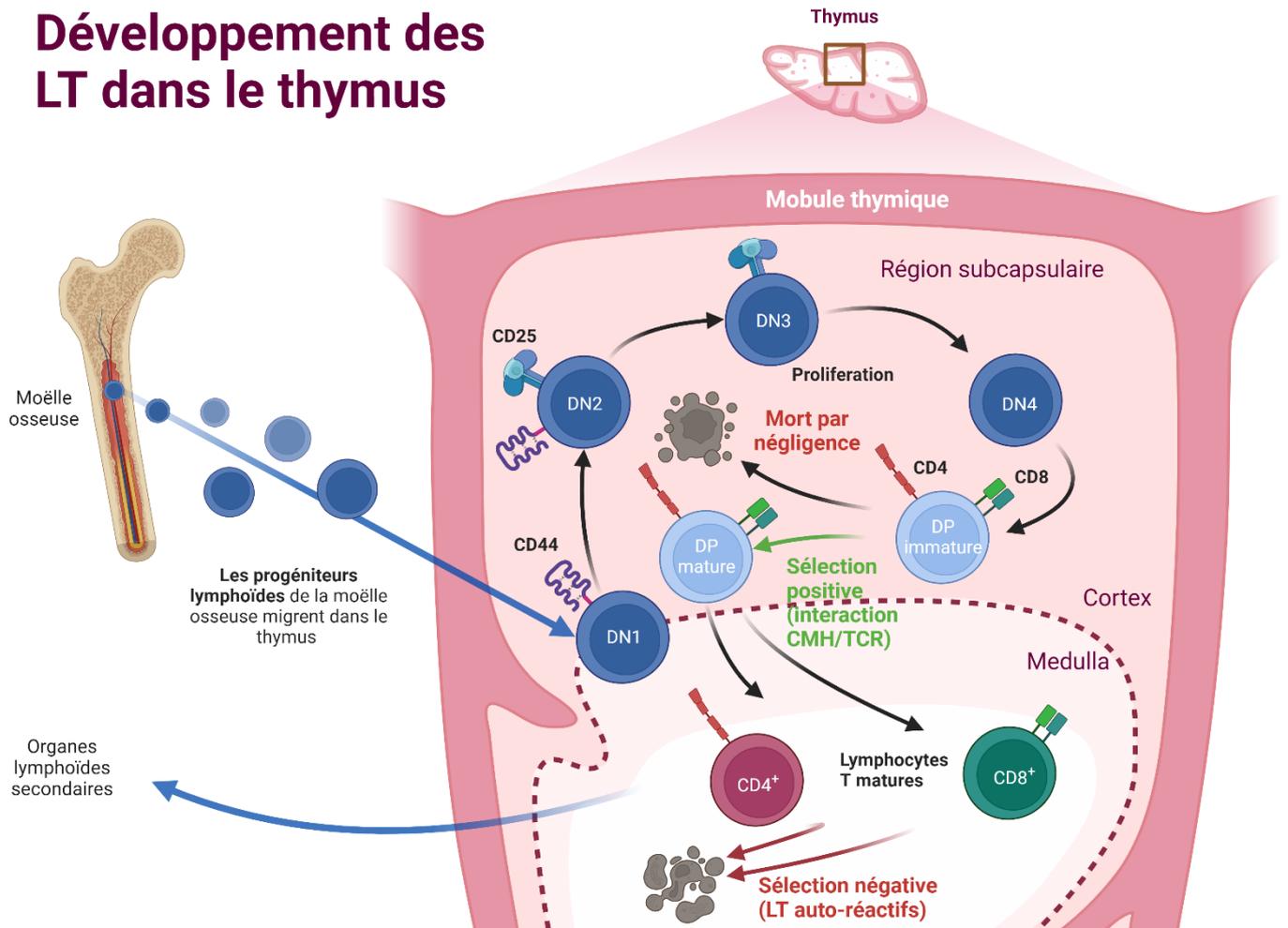


Figure 10 | La sélection thymique

Les progéniteurs des lymphocytes T quittent la moelle osseuse et rejoignent le thymus par la circulation sanguine. Les thymocytes n'exprimant aucun corécepteur du TCR (CD4 ou CD8), alors appelés **DN** pour **double-négatifs**, passent par différents stades de maturation de DN1 à DN4. Ils vont, au cours de cette maturation, exprimer un pré-TCR $\alpha\beta$ (ou $\gamma\delta$) puis les corécepteurs CD4 et CD8 devenant alors des thymocytes **double-positifs (DP)**. Les thymocytes DP sont soumis à une sélection positive si leur TCR est capable d'interagir avec le CMH-I ou -II des APC thymiques et si cette interaction n'est pas trop forte. Les thymocytes DP dont le TCR n'interagit pas avec le CMH-I ou -II des APC thymiques meurent par négligence. Ceux qui ont été sélectionnés positivement perdent alors l'expression de l'un des deux corécepteurs CD4 ou CD8, selon que l'interaction s'est faite respectivement avec le CMH-II ou le CMH-I, devenant des thymocytes simple-positifs (SP). Une fois dans la médulla, les SP subissent une sélection négative des clones auto-réactifs. Les thymocytes SP non-autoréactifs vont maturer et migrer en périphérie vers les organes lymphoïdes secondaires (ganglions, rate, muqueuses).

A. La sélection thymique

Les LB et les LT dérivent tous deux de **cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse**, mais certaines vont migrer dans **le thymus**, *via* la circulation sanguine, pour subir une étape de maturation et de sélection afin de donner des LT fonctionnels. C'est-à-dire des LT capables de reconnaître une grande diversité d'antigènes grâce à une énorme variété de **TCR** (pour **T-Cell Receptor**) tout en n'ayant que peu d'affinité pour les antigènes du **Soi**. Le thymus est l'organe lymphoïde primaire qui réunit les conditions nécessaires à ces processus de maturation et de sélection.

Les **thymocytes**, c'est-à-dire les LT en développement, passent par plusieurs étapes de maturation successives : d'abord **Double-Négatifs (DN)** $CD4^-CD8^-$, puis **Double-Positifs (DP)** $CD4^+CD8^+$ et finissant comme **Simple-Positifs (SP)** $CD4^+CD8^-$ ou $CD4^-CD8^+$ (Figure 10) en référence à l'état d'expression des **corécepteurs CD4** et **CD8** (CD pour « Cluster de différenciation ») à la surface des thymocytes. Ce sont les thymocytes DN qui initient le réarrangement du $TCR\alpha\beta$ (ou $\gamma\delta^{16}$). Ils vont alors exprimer les corécepteurs CD4 et CD8, devenant des thymocytes DP. Les thymocytes DP vont subir une première étape **sélection thymique** dans le cortex :

- Une **sélection positive** des thymocytes DP exprimant un TCR capable d'interagir modérément avec le CMH-I ou -II des APC thymiques ou cellules épithéliales thymiques.
- Une **mort par négligence** des thymocytes dont le TCR n'a pas interagi avec le CMH des APC thymiques.

Les thymocytes DP vont alors maturer en thymocytes simples positifs $CD4^+CD8^-$ ou $CD4^-CD8^+$ selon que l'interaction se soit faite respectivement avec le CMH-II ou le CMH-I (Luckheeram et al., 2012). Un fois dans la médulla du thymus, une nouvelle étape de sélection thymique est opérée :

- Une **sélection négative** des thymocytes exprimant un TCR interagissant avec une **forte affinité** avec les antigènes du Soi présenté par le CMH des APC thymiques, afin de prévenir l'immunogénicité dirigée contre des peptides du Soi et l'émergence de LT **auto-réactifs**.

B. Les lymphocytes T $CD4^+$ naïfs

À la suite de leur développement dans le thymus, les LT $CD4^+$ naïfs gagnent le sang et émigrent vers les organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques et la rate. Cette émigration est finement régulée et c'est notamment le rôle des récepteurs **L-selectine CD62L** et **CCR7** (pour **C-C Chemokine Receptor 7**) de permettre l'adhésion à l'endothélium vasculaire et l'entrée de ces cellules dans le tissu lymphoïde (Gallatin,

¹⁶ 95% des LT ont un $TCR\alpha\beta$, ils sont appelés LT conventionnels *versus* 5% avec un $TCR\gamma\delta$, qui sont appelés LT non-conventionnels. Les LT non-conventionnels sont notamment impliqués dans l'immunité des muqueuses et présentent à la fois des caractéristiques de cellules des immunités innée et adaptative.

Weissman, and Butcher 1983 ; Yoshida et al. 1997). Une fois dans les ganglions, les T CD4⁺ naïfs interagissent avec le CMH-II des **DC** à la recherche **d'un peptide reconnaissable**. Au vu de la grande diversité du répertoire des TCR, la probabilité de rencontre avec un antigène spécifique semble *a priori* assez faible. Mais en réalité, une étude s'intéressant à la dynamique de cette recherche de peptide a montré qu'une DC pouvait entrer en contact avec environ 5000 LT par heure, soit près de 250 LT en simultané avec un temps d'interaction d'environ 3 minutes (Miller et al., 2004). Un autre détail intéressant de cette étude est que ces chiffres correspondent à la limite de disponibilité de la surface de la DC. Grâce à cette dynamique extraordinaire, la recherche d'antigènes est d'une très grande efficacité. Dans la majorité des cas, la rencontre entre l'antigène étranger **présenté par le CMH-II de l'APC et le TCRαβ du LT CD4⁺ naïf complémentaire** se passe dans les ganglions périphériques. Cette interaction, ainsi que l'interaction de molécules de costimulation, telle que CD28 (Lesslauer et al., 1986), entraîne **l'activation du LT naïf**. De nombreux changements s'opèrent alors dans ces cellules avec notamment l'expression de récepteurs qui contrôlent leur prolifération. C'est le cas de la sous-unité α du récepteur de l'IL-2, CD25, qui sert de marqueur des LT activés. Selon **le contexte cytokinique** (cytokine produite par la DC, par le LT lui-même et/ou présente dans le milieu), **la concentration antigénique, le type d'APC et les molécules de costimulation**, les LT CD4⁺ naïfs peuvent se différencier en plusieurs lignages de LT CD4⁺ effecteurs (**Figure 11**) :

- Les lymphocytes **T helper (Th)** dont les plus étudiés sont les Th1, 2 et 17
- Les lymphocytes **Treg périphériques (pTreg)** qui contrôlent la tolérance immunologique et régulent la réponse inflammatoire
- Les lymphocytes **T helper folliculaires (Tfh)** qui participent à l'immunité humorale par activation direct des LB cytotoxiques (Yin et al., 2021)

De façon très intéressante, la signalisation TGFβ est décrite comme impliquée dans la quiescence des LT CD4⁺ naïfs. La signalisation TGFβ est maintenue dans ces cellules par une expression des récepteurs de type I et II aux TGFβ. L'activation de la signalisation TCR permet la régulation négative du récepteur de type I aux TGFβ, ALK5 (ou TGFBR1) abolissant la signalisation TGFβ nécessaire à l'activation des cellules (Tu et al., 2018).

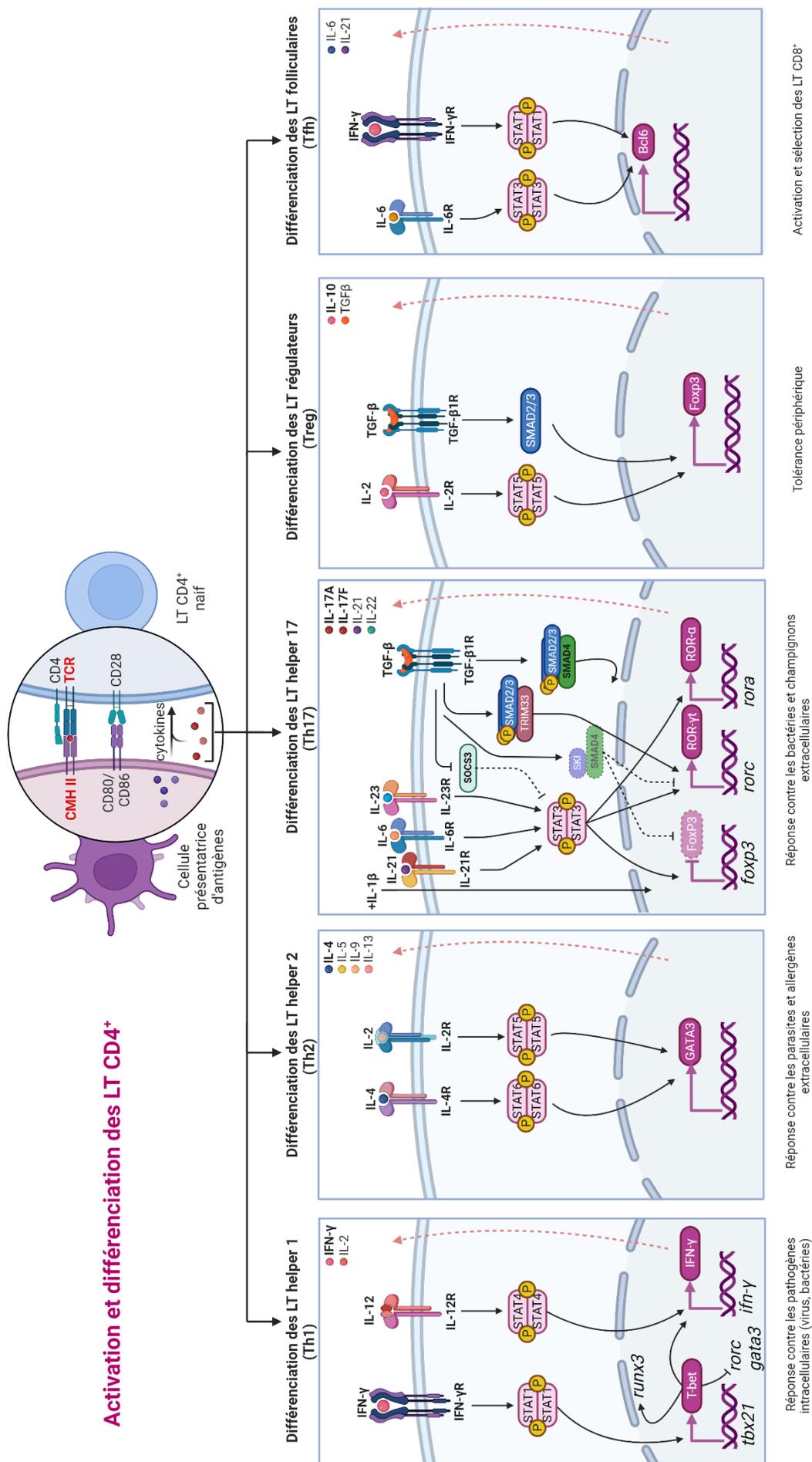


Figure 11 | La différenciation des LT CD4⁺

Une fois dans la périphérie, les LT naïfs sont scannés par les APC. Après interaction entre le peptide présenté par le CMH-II et le TCR du LT CD4⁺ naïf, selon les cytokines présentes dans le microenvironnement ou produites par l'APC, le LT peut se différencier en 5 sous-types (de gauche à droite) : les Th1, les Th2, les Th17, les Treg et les Tfh.

Les Th1 se différencient après exposition à l'IL-12 et à l'IFN- γ qui induisent respectivement la phosphorylation de STAT4 et STAT1. Ensemble, STAT4 et STAT1 activent la transcription du facteur de transcription T-bet, caractéristique de Th1. Ce facteur de transcription induit alors la production et sécrétion d'IFN- γ et d'IL-2. Il va également induire l'expression de runx3 et l'inhibition de rosc et gata3. Les Th1 sont principalement impliqués dans la réponse immunitaire aux pathogènes intracellulaires.

Les Th2 se différencient après exposition à l'IL-4 et à l'IL-2 qui induisent respectivement la phosphorylation de STAT6 et STAT5. Ensemble, STAT6 et STAT5 activent la transcription du facteur de transcription GATA3, caractéristique de Th2. Ce facteur de transcription induit alors la production et sécrétion d'IL-4, d'IL-5, d'IL-9 et d'IL-13. Les Th2 sont principalement impliqués dans la réponse immunitaire aux parasites extracellulaires et aux allergènes.

Les Th17 se différencient en présence d'IL-6, d'IL-21, d'IL-23, d'IL-1 β et de TGF β . L'IL-6, l'IL-21 et l'IL-23 induisent la phosphorylation de STAT3 alors que le TGF β permet la phosphorylation de SMAD2/3. Ensemble, STAT3 et SMAD2/3 activent la transcription du facteur de transcription ROR γ t, caractéristique des Th17. Ce facteur de transcription induit alors la production et sécrétion d'IL-17A et -F, d'IL-21, d'IL-22 et de TNF- α . Les Th17 sont principalement impliqués dans la réponse immunitaire des muqueuses aux bactéries extra-cellulaires et aux champignons.

Les pTreg se différencient en présence d'IL-10 et de TGF β qui induisent respectivement la phosphorylation de STAT5 et SMAD2/3. Ensemble, STAT5 et SMAD2/3 favorisent la transcription du facteur de transcription Foxp3, caractéristique des Treg. Ce facteur de transcription induit alors la production et sécrétion d'IL-10 et de TGF β . Les pTreg sont principalement impliqués dans la tolérance périphérique.

Les Tfh se différencient en présence d'IL-6 et d'IFN- γ qui induisent respectivement la phosphorylation de STAT3 et STAT1. Ensemble, STAT3 et STAT1 favorisent la transcription du facteur de transcription Bcl6, caractéristique de Tfh. Ce facteur de transcription induit alors la production et sécrétion d'IL-4 et d'IL-21. Les Tfh sont principalement impliqués dans l'activation et la sélection

Type de CD4 ⁺	Cytokine inductrice	Facteurs de transcription	Facteurs de transcription inhibiteurs
Th1	IL-12, IFN- γ	T-bet , STAT1, STAT4, Runx3, Eomes, Hlx	GATA3
Th2	IL-4 , IL-2	GATA3 , STAT6, STAT5, STAT3, Gfi-1, c-Maf, IRF4	T-bet, Runx3
Th17	IL-6, IL-21 , IL-23, TGF β	Roryt , STAT3, ROR α , Runx1, Batf, IRF4, AHR	T-bet+Runx1, Smad3, Runx1+FOXP3
Treg	TGF β , IL-2	FOXP3 , Smad2, Smad3, STAT5, NFAT	
Tfh	IL-6, IL-21	Bcl6 , STAT3	

Tableau 3 | Tableau résumé des cytokines inductrices et des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des sous-types de LT CD4⁺ helper

C. Les lymphocytes Th

1. Les Th1 et Th2

C'est en 1986 que l'existence de différents types de LT CD4⁺ différenciés a commencé à être comprise, grâce à l'analyse de clones de LT CD4⁺ chez la souris (Mosmann et al., 1986). Les deux catégories alors décrites, Th1 et Th2, se distinguent par l'expression de cytokines distinctes.

Les lymphocytes Th1 sont induits par l'**IFN-γ** (pour InterFeroN **gamma**) et l'**IL-12** avec pour signature la production d'**IFN-γ** et de **TNF-α** (Figure 11, Tableau 3 adapté de (Luckheeram et al., 2012)). L'IFN-γ est une cytokine pro-inflammatoire activatrice des macrophages qui favorise également la réponse des LT CD8⁺ cytotoxiques. C'est elle qui est critique dans la différenciation de ce lignage. L'IL-12 et l'IFN-γ induisent l'expression du **facteur de transcription T-bet** (pour **T-box expressed in T cells**) caractéristique de ce type cellulaire qui va non-seulement induire l'expression de gènes définissant ce lignage mais également inhiber le développement des autres lignages (Afkarian et al. 2002 ; Szabo et al. 2000, 2002). Les Th1 sont impliqués dans la réponse aux virus et autres pathogènes intracellulaires (champignons, bactéries).

Les Th2 sont-eux induits par le l'**IL-4** et l'**IL-2** qui vont respectivement activer STAT6 et STAT5. STAT6 permet l'expression du **facteur de transcription GATA3¹⁷**, caractéristique de ce lignage. STAT5 est quant à lui particulièrement important dans la détermination du lignage. Ce lignage produit principalement de l'IL-4, mais également l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13 (Mosmann & Coffman, 1989). Les Th2 sont impliqués dans la réponse à des parasites extracellulaires et des allergènes.

C'est un peu plus de 15 ans plus tard, en 2005, que les lymphocytes Th17 ont été décrits pour la première fois comme un lignage Th à part entière, qui pourrait être responsable d'une réponse auto-immunitaire exacerbée (Harrington et al., 2005).

2. Les Th17

Les **lymphocytes Th17**, producteurs de l'**interleukine pro-inflammatoire IL-17** font l'objet d'un intérêt croissant depuis presque 20 ans. Participant normalement à l'**immunité des muqueuses** contre des **pathogènes extracellulaires fongiques et bactériens**, ce lignage est fortement impliqué dans **des pathologies inflammatoires et auto-immunes** telles que la sclérose en plaques, la PR, la SpA, les MICI, le psoriasis et le cancer (Harrington et al. 2005 ; B. Li et al. 2020 ; Park et al. 2005 ; Wendling 2015 ; Yasuda, Takeuchi, and Hirota 2019). C'est le type cellulaire principalement impliqué dans le modèle murin de l'Encéphalomyélite Allergique Expérimentale (EAE) (Langrish et al., 2005).

L'induction des Th17 est initiée par une action synergique entre le TGFβ, l'IL-6 et l'IL-1β (Bettelli et al. 2006 ; Chung et al. 2009 ; Mangan et al. 2006 ; McGeachy et al. 2007 ;

¹⁷ GATA est le motif reconnu sur l'ADN par cette famille de protéine

Veldhoen et al. 2006) (Figure 11). Dans cette initiation, le TGF β permet de lever l'inhibition induite par le complexe SKI/SMAD4 sur les *loci Rorc* et *Rora* en induisant la dégradation de la protéine Ski, permettant ainsi l'expression des facteurs de transcription ROR γ t et ROR α (Zhang et al., 2017). Le TGF β favorise la formation du complexe **Tripartite motif-containing 33 (Trim33)/SMAD2** qui favorise l'expression de *Rorc* et la fonction pro-inflammatoire des Th17 (He et al., 2006; Tanaka et al., 2018). L'IL-6, lui, induit l'activation de STAT3 qui va réprimer *Foxp3* ainsi induire l'expression de *Rorc* et *Rora*. De même, le TGF β permet de renforcer l'action de STAT3 en réprimant **SOCS3** (pour **Suppressors Of Cytokine Signaling 3**), un régulateur négatif de STAT3 (Qin et al., 2009).

L'IL-6 contribue, entre autres, à induire l'expression de l'**IL-21** qui, de façon autocrine, renforce l'engagement dans la différenciation Th17, entraîne leur prolifération et participe au maintien de ce lignage une fois différencié (Korn et al. 2007 ; Nurieva et al. 2007 ; Zhou et al. 2007).

Toutes ces cytokines permettent l'expression du **récepteur à l'IL-23, l'IL-23R**, qui renforce l'engagement dans la différenciation Th17 et peut aussi être responsable de la pathogénicité de ces cellules (Ahern et al. 2010 ; Cua et al. 2003 ; El-Behi et al. 2011 ; Gocke et al. 2007). Le TGF β possède d'ailleurs un effet inhibiteur sur l'expression de l'IL-23R et il contrôle la pathogénicité des Th17. En effet, **la différenciation de lymphocytes Th17 en l'absence de TGF β (avec une combinaison d'IL-6, IL-1 β et IL-23) génère des lymphocytes Th17 hautement pathogènes** (Ghoreschi et al., 2010).

Outre l'IL-23, la différenciation des Th17 et, plus particulièrement leur pathogénicité, peut être influencée par **des facteurs endogènes** et/ou **exogènes**. Par exemple, la signalisation **IL-24** autocrine, dont l'expression est elle-même régulée par l'IL-17A autocrine *via* NF- κ B, exerce un rétrocontrôle négatif sur la pathogénicité des Th17. En effet, IL-24 permet d'inhiber le programme Th17 par l'expression de **Suppressor of Cytokine Signaling 1 (SOCS1)** et SOCS3 (Chong et al., 2020).

Le **récepteur d'hydrocarbures aryliques** est, quant à lui, inducteur de la différenciation Treg ou de la différenciation Th17 selon le ligand en présence (Quintana et al. 2008 ; Veldhoen et al. 2008 ; Wei et al. 2014).

Les **récepteurs aux facteurs de croissance de type Insuline (IGF** pour « Insulin-like Growth Factor ») sont décrits comme **pro-Th17 pathogènes** (DiToro et al., 2020). En effet, la signalisation *via* le récepteur 1 à l'IGF augmente la glycolyse aérobie et favorise la différenciation Th17 contre la différenciation Treg.

Le **stress physique, chimique ou métabolique** (température, salinité, oxygène faible, faible métabolisme du glucose, cholestérol, acides aminés) peuvent tous favoriser la différenciation Th17 et contribuer à l'auto-immunité dans le modèle de la souris EAE (Brucklacher-Waldert et al. 2017 ; Karmaus et al. 2019 ; Matthias et al. 2020 ; Wagner et al. 2021 ; Wang et al. 2020).

Enfin, la **protéine amyloïde A du sérum (SAA – Serum amyloid A)**, une famille de protéines impliquées dans la réponse immunitaire aiguë, **induit la différenciation de Th17 pathogènes** avec l'IL-6 dans les modèles EAE et IBD (J.-Y. Lee et al., 2020).

Roryt est le facteur de transcription caractéristique de ce type cellulaire. Sa transcription est régulée par la protéine **STAT3** dont la phosphorylation est médiée par l'IL-6, l'IL-23 et l'IL-21. Ce facteur de transcription permet l'expression de l'IL-23R et, surtout, il est responsable de l'induction de l'expression de l'**IL-17** (Ivanov et al. 2006 ; X. O. Yang et al. 2008). STAT3 est d'ailleurs nécessaire à la différenciation Th17 puisque des souris mutante **STAT3^{-/-}** sont déficientes en Th17 (Zhou et al., 2007).

D. Les lymphocytes T régulateurs périphériques (pTreg)

Les lymphocytes **pTreg** se distinguent des **Treg** dérivés du thymus (**tTreg**) par le fait qu'ils se différencient dans les organes lymphoïdes secondaires après activation par un antigène alors que les tTreg sortent du thymus comme un lignage à part entière. Les pTreg sont primordiaux pour **la maintenance de la tolérance aux antigènes du Soi, la prévention des maladies auto-immunes et le contrôle de l'inflammation.**

Ce lignage de LT est induit par le **TGFβ¹⁸** qui permet l'expression du facteur de transcription **Foxp3** (W. J. Chen et al. 2003 ; Huber et al. 2004). Foxp3 étant un inhibiteur transcriptionnel du gène *SMAD7*, l'un des inhibiteurs de la signalisation TGFβ, les cellules exprimant le facteur Foxp3 sont plus sensibles aux effets du TGFβ (Fantini et al., 2004). Une perte de fonction expérimentale de *Foxp3* est suivie d'une immunopathologie fatale résultant de l'incapacité à générer des pTreg (Fontenot et al., 2003). Une maladie humaine rare, l'IPEX (pour « Syndrome de dérèglement immunitaire-polyendocrinopathie-enthéropathie lié à l'X ») est d'ailleurs causée par une mutation du gène *FOXP3* (Bennett et al., 2001). De façon intéressante, il a également été montré que l'activine A est capable d'induire les pTreg (Huber et al., 2009). L'activine A étant sécrétée en contexte inflammatoire elle pourrait, elle aussi, jouer un rôle dans le contrôle de l'inflammation par ce mécanisme. Enfin, **l'induction de Foxp3 par le TGFβ antagonise RORγt, inhibant ainsi la différenciation Th17 en l'absence de cytokines pro-inflammatoires** (Zhou et al., 2008). De plus, Foxp3 est capable d'interagir avec le facteur de transcription Runx1, ce qui bloque l'expression d'IL-17 (F. Zhang et al., 2008).

Les propriétés anti-inflammatoires des pTreg proviennent notamment de **l'IL-10 et du TGFβ** qu'elles produisent. **L'IL-10**, une cytokine inhibitrice de la réponse inflammatoire qui permet de limiter les lésions tissulaires (Asseman et al., 1999; Couper et al., 2008; Ouyang et al., 2011). **Le TGFβ** est lui aussi indispensable au contrôle de l'inflammation comme le montre l'immunopathologie rapide et violente développée par les souris mutantes pour *Tgfb1* (Kulkarni et al., 1993; Shull et al., 1992). La délétion spécifique de *Tgfb1* dans les LT entraîne une augmentation de la prolifération, de l'activation et de la différenciation des lymphocytes T en Th1 et Th2 (M. O. Li et al., 2007). Le TGFβ est en effet important pour le contrôle de l'activation du programme Th1, comme le montre la suractivation TCR des Th1 après la suppression de la signalisation TGFβ (par perte de fonction du récepteur TGFBRII) dans les lymphocytes T (Marie et al., 2006). Dans les LT matures, le TGFβ a été décrit comme maintenant la fonction suppressive des pTreg notamment par le maintien de l'expression de

¹⁸ Pour rappel, le TGFβ seul n'induit pas Foxp3, ce qui requiert aussi la signalisation par le TCR.

Foxp3 (Marie et al., 2005). Plus récemment, il a été montré que le TGFβ1 produit par les Treg est critique pour le maintien de la tolérance périphérique et empêcher l'autoimmunité. En effet, une perte d'expression de *Tgfb1* dans les Treg entraîne, de façon dose dépendante, une dérégulation des DC, une activation des Tfh et une expansion des mastocytes entraînant des manifestations allant d'une réaction allergique à une réaction auto-immune forte (Turner et al., 2020).

Le TGFβ est également important au niveau des tTreg. En effet une étude montre qu'une empreinte épigénétique est apposée sur *Foxp3* dans les tTreg au niveau du thymus (Ohkura et al., 2012) et une autre étude montre que l'apoptose de cellules dans le thymus entraîne la production de TGFβ par les autres cellules thymiques (macrophages, DC et cellules épithéliales) favorisant la génération de tTreg¹⁹ (Konkel et al., 2014). On peut enfin citer une étude publiée en 2020 qui démontre l'importance du TGFβ1 autocrine produit par les Treg pour maintenir leur capacité inhibitrice et leur stabilité *via* la régulation négative d'un des récepteurs à l'IL-12²⁰ (Choi et al., 2020).

La compréhension précise du double rôle du TGFβ dans la différenciation Th17 et Treg est un défi pour la recherche depuis 20 ans. A haute concentration, le TGFβ favorise la différenciation pTreg via l'expression de *Foxp3* (W. J. Chen et al., 2003; Zhou et al., 2008). Mais, à faible concentration et en présence d'IL-6, il favorise la différenciation Th17 notamment par l'augmentation de l'expression d'*Il21* et d'*Il23r* (Bettelli et al., 2006; Mangan et al., 2006; Veldhoen et al., 2006; Zhou et al., 2008). Cette dualité en fait une cytokine d'intérêt particulier dans la recherche sur les maladies auto-immunes.

De façon très intéressante, SMAD2/3 et STAT3, les transducteurs respectifs des signaux TGFβ et IL-6, coopèrent dans la différenciation Th17 par rapport à celle des Treg. Une stimulation du TCR en présence de TGFβ induit l'expression de *Foxp3*. En cas d'activation de STAT3 par l'IL-6, STAT3 se fixe sur le promoteur de *Foxp3* et inhibe sa transcription en limitant le recrutement de SMAD3 (Xu et al., 2010). Dans le cas du gène *Rorc* codant RORγt, caractéristique des Th17, STAT3 est recruté au niveau de son promoteur par Smad2 lorsqu'il est phosphorylé dans la région « linker » par ERK où il joue le rôle de coactivateur. Au contraire Smad3 non-phosphorylé recrute STAT3 sur ce même promoteur et joue un rôle répresser (Yoon et al., 2015). Lorsque STAT3 et SMAD3 sont activés par l'IL-6 et le TGFβ respectivement, ils coopèrent pour induire l'expression de TAZ qui d'une part induit l'expression de RORγt et d'autre part dégrade *Foxp3* (Geng et al., 2017). Ces exemples permettent d'illustrer la proximité des voies de signalisation impliquées dans les différenciations Th17 et Treg.

E. La plasticité des LT

Une fois différenciés, il est nécessaire que les lymphocytes Th s'adaptent au contexte pour assurer une réponse immunitaire correcte. En effet, l'organisme est un milieu hautement dynamique qui nécessite un ajustement constant et il paraît de plus en plus évident que le

¹⁹ Pour être plus précis, ce phénomène se produit dans la médulla du thymus.

²⁰ Pour rappel, l'IL-12 induit la production d'IFN-γ caractéristique des Th1.

phénotype des LT CD4⁺, et particulièrement des pTreg et des Th17, est modulable. Pour préciser le propos, la plasticité est ici définie comme la capacité d'un LT CD4⁺ à arborer des caractéristiques de plusieurs lignages simultanément ou à différents moments de son cycle de vie.

Ainsi, des cellules coexprimant *Foxp3* et *RORγt*²¹ ont été identifiées *in vivo* chez l'Homme et la souris (Voo et al., 2009; Zhou et al., 2008). Par des expériences de lignage, Zhou et al. ont montré qu'un quart des lymphocytes IL-17⁺ de l'intestin grêle de souris ont exprimé *Foxp3* au cours de leur existence (Zhou et al., 2008). Ces observations soulignent que les différenciations Th17 et pTreg pourraient être étroitement liées.

De plus, dans des conditions inflammatoires, des LT producteurs à la fois d'IL-17 et d'IFN-γ²² sont fréquemment observés laissant penser qu'il existe une étroite relation entre les différenciations Th17 et Th1.

L'importance du TGFβ1 autocrine produit par les Treg a précédemment été évoquée (Choi et al., 2020). La même équipe s'est ensuite intéressée à l'importance du TGFβ1 produit par les lymphocytes Th17. Ils ont montré que le TGFβ1 autocrine produit par les Th17 régule leur stabilité et inhibe leur conversion pathogène en Th17 producteurs d'IFN-γ (« Th1-like exTh17 ») via la répression du récepteur β2 à l'IL-12 (*IL12Rβ2*) et le récepteur α à l'IL-27 (*IL-27Rα*) (Choi et al., 2021).

Enfin, après la résolution de l'inflammation, les Th17 peuvent se trans-différencier en Treg, et ce, en présence de TGFβ1 (Gagliani et al., 2015).

La compréhension précise des limites de la plasticité des LT ainsi que des mécanismes sous-jacents permet de mieux appréhender la complexité des maladies auto-immunes et potentiellement de développer de nouvelles thérapies.

²¹ Respectivement les facteurs de transcription des Treg et des Th17.

²² Respectivement la cytokine majoritairement produite par les Th17 et par les Th1.

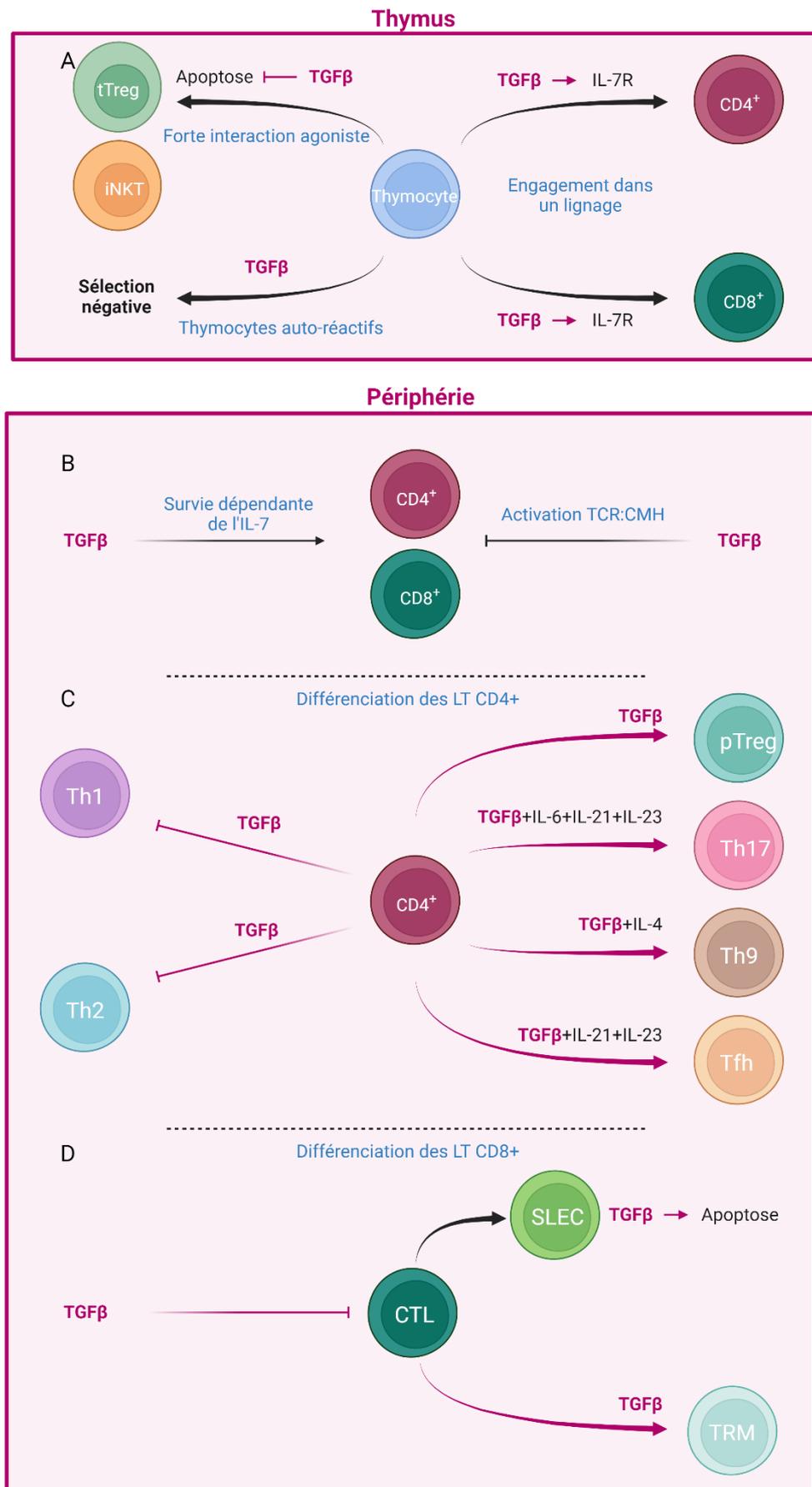


Figure 12 | Rôles du TGFβ sur les lymphocytes T dans le thymus et la périphérie

(A) Dans le thymus, le TGF β permet le développement des tTreg et des iNKT (pour « invariant Natural Killer ») qui sont des populations induites par une forte interaction agoniste avec le peptide reconnu par le TCR. Le TGF β promeut le développement des LT CD4⁺ et CD8⁺ par l'augmentation de l'expression du récepteur à l'IL-7, cytokine importante pour la survie, le développement et l'homéostasie de ces cellules. Il est également nécessaire à la sélection négative thymocytes auto-réactifs.

(B) Dans la périphérie, le TGF β permet la survie des LT CD4⁺ et CD8⁺ de faible affinité et il inhibe l'activation du TCR des LT CD4⁺ et CD8⁺ auto-réactifs ou de haute affinité.

(C) Le TGF β inhibe la différenciation des Th1 et des Th2 et promeut, en fonction des autres cytokines en présence, la différenciation des pTreg, Th17, Th9 et Tfh. Les Th9 sont principalement impliqués dans la lutte antiparasitaire.

(D) Enfin, le TGF β inhibe le développement de **Lymphocytes T Cytotoxiques (LTC)** impliqué dans la destruction des cellules infectées par un pathogène intracellulaire et la lutte antitumorale. Il favorise l'apoptose des SLEC (pour « Short-lived effector cells ») et le développement des TRM (pour « T resident memory »).

F. Le TGF β et les LT

Le TGF β est un acteur omniprésent dans la vie d'un LT. De la sélection thymique à la différenciation en lymphocytes Teff, le TGF β joue un rôle essentiel (Figure 12 – schéma adapté de (Li & Flavell, 2008; Sanjabi et al., 2017)). Au cours de la sélection thymique, en l'absence de TGF β , la sélection négative est fortement affectée. En effet, des thymocytes hautement auto-réactifs qui mûrissent et migrent en périphérie et induisent des lésions auto-immunes de multiples organes sont observés (McCarron et al., 2019). De plus, en l'absence de signalisation TGF β une diminution des populations de tTreg et iNKT (pour invariable Natural Killer)²³ est observée (Marie, Liggitt, and Rudensky 2006). Le TGF β permet également d'augmenter la sensibilité des Tfh à l'apoptose prévenant l'émergence de LB auto-réactifs (McCarron & Marie, 2014). D'autres effets du TGF β sur les LT sont détaillés dans la Figure 12.

Comme décrit précédemment, le TGF β est nécessaire à la différenciation des pTreg et des Th17. En particulier, dans la différenciation Th17, le TGF β joue un rôle important dans l'initiation de la différenciation. Dans les Treg et Th17 différenciés, le TGF β autocrine permet le maintien d'un phénotype stable par l'inhibition de l'expression du récepteur IL12RB2 inhibant indirectement la production d'IFN γ (Choi et al., 2020, 2021).

Pour conclure, les Tn CD4⁺ émergent du thymus après maturation et sélection à partir de progéniteurs issus de la moëlle osseuse. La reconnaissance d'un peptide étranger, présenté par le CMH-II, par le TCR des Tn CD4⁺ entraîne leur différenciation en différents sous-types de Th selon le contexte cytokinique. Une perturbation de la signalisation TGF β dans les LT CD4⁺ entraîne généralement des pathologies immunitaires sévères. L'étude des possibles perturbations engendrées par HLA-B27 sur la signalisation BMP/TGF β dans le rat B27 paraît alors particulièrement pertinente. Afin d'étudier cet aspect, il est nécessaire de comprendre le fonctionnement précis de cette voie de signalisation chez les vertébrés. Ainsi, dans le prochain chapitre, je vais détailler la voie BMP/TGF β tout en illustrant les effets délétères de perturbations de cette voie de signalisation.

²³ Une population de NKT, dont le TCR n'est pas complètement variable, qui reconnaît des lipides présentés par le récepteur de type CMH-I, CD1d. Cette population présente à la fois des caractéristiques des systèmes immunitaires inné et adaptatif.

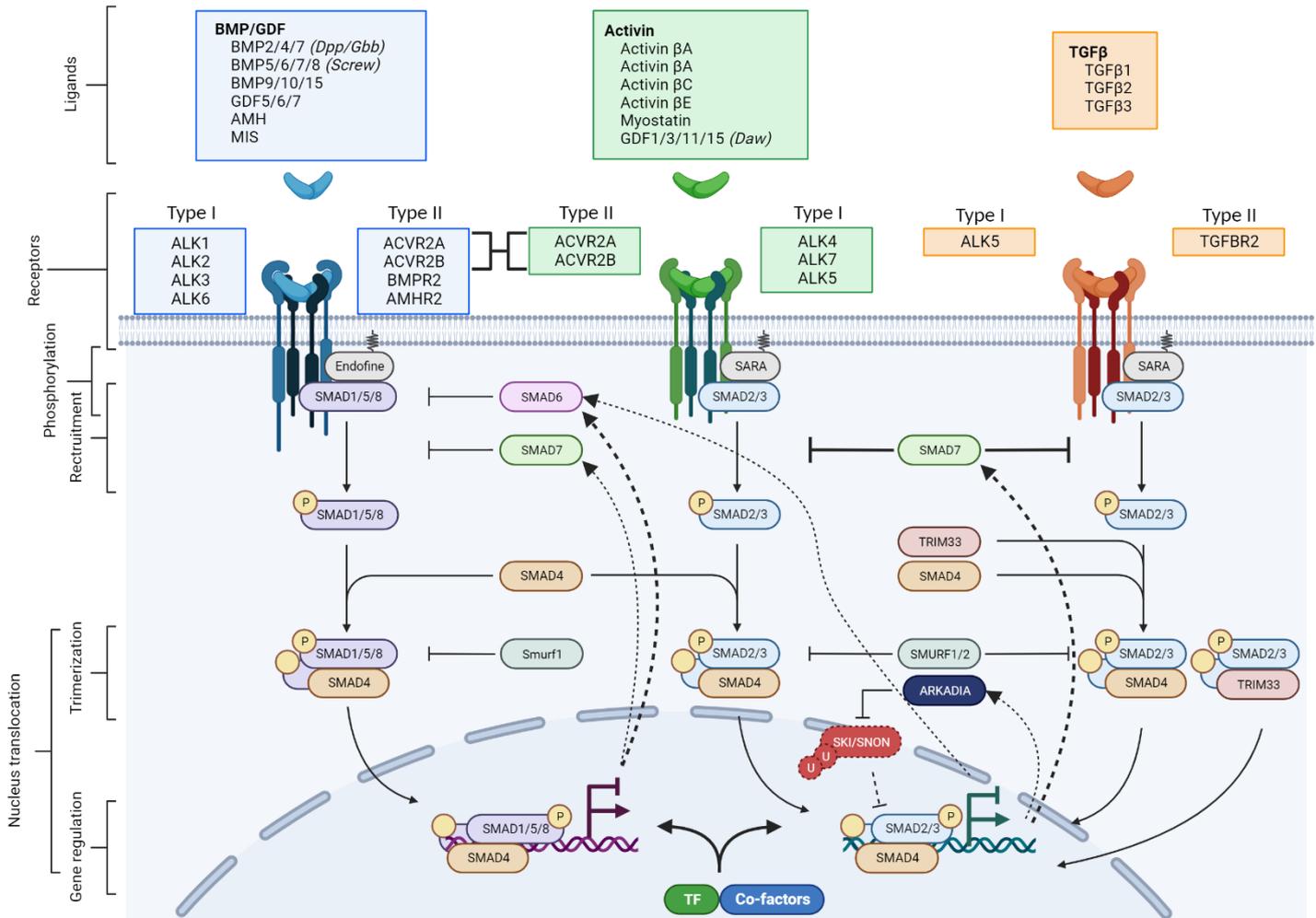


Figure 13 | La voie BMP/TGFβ

Schéma de la voie BMP/TGFβ chez les vertébrés présentant, de haut en bas, les ligands, les récepteurs et les facteurs de transcription. A ce jour 33 ligands, 12 récepteurs, 5 R-SMAD et 1 Co-SMAD ont été répertoriés. De haut en bas, un dimère de ligands se fixe à un dimère de récepteurs de type II qui à son tour recrute un dimère de récepteurs de type I et induit la phosphorylation du R-SMAD. S'en suit un recrutement de Co-SMAD et la formation d'un trimère 2R-SMAD/1Co-SMAD qui est transloqué dans le noyau où il active la transcription de gènes cibles, ce qui dépend aussi d'interactions avec d'autres facteurs de transcription (TF) et des corégulateurs (Co-factors).

V. La voie BMP/TGF β

A. Généralités

La voie **BMP/ Transforming Growth Factor beta (TGF β)** est une voie de signalisation particulièrement complexe. En effet, bien que ses mécanismes de transduction du signal soient assez simples, cette voie est impliquée dans de multiples phénomènes biologiques tout au long de la vie de l'organisme, de l'embryon à l'adulte. Ainsi, la voie de signalisation est impliquée dans des phénomènes aussi variés que le développement embryonnaire, la prolifération, la différenciation, la communication, l'adhésion, la migration, le métabolisme et la mort cellulaire, et ce, dans différents types cellulaires (Massagué, 2000). En fait, presque toutes les cellules peuvent percevoir et répondre à un signal de la voie BMP/TGF β .

Cette grande variété d'effets, s'explique notamment par l'apparition précoce de cette voie chez les métazoaires²⁴, qui s'est alors diversifiée et complexifiée en même temps que ces organismes (Humniecki et al., 2009) (Schmierer & Hill, 2007).

Malgré ses rôles divers, le mécanisme général de la voie de signalisation est un « cas d'école » de signalisation membrane-noyau médiée par l'activation d'un récepteur membranaire. Succinctement, un homodimère du ligand va se fixer spécifiquement à son **récepteur de type II**, lui aussi sous forme homodimérique. Cette fixation va permettre l'interaction avec un homodimère du **récepteur de type I**, formant ainsi un complexe hétérotétramérique de récepteurs associés au ligand. Les récepteurs de types II vont catalyser la phosphorylation des récepteurs de type I qui, à leur tour, vont phosphoryler une protéine cytosolique nommée **Receptor-regulated Small Mother Against Decapentaplegic (R-SMAD – SMAD2/3 et SMAD1/5/8 chez l'Homme)**. Deux R-SMAD phosphorylés vont s'associer à un **Common mediator SMAD (Co-SMAD – SMAD7 chez l'Homme)** formant ainsi un hétérotrimère qui s'accumule dans le noyau après translocation et régule directement l'expression d'un nombre important de gènes, aussi bien positivement que négativement (Figure 13). Je reviendrai plus en détails sur les différents composants et sur les mécanismes de cette machinerie dans les parties suivantes.

Chez les vertébrés, la voie BMP/TGF β comprend 33 ligands décrits, 7 récepteurs de type I, 5 récepteurs de type II et 5 R-SMAD.

²⁴ De manière général, les animaux, c'est-à-dire les organismes pluricellulaires, eucaryotes, hétérotrophes

Sous-famille	Ligands	Récepteurs de type II	Récepteurs de type I	R-Smad	Co-recepteur	
TGFβ	TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3	TGFBR2	ALK5	SMAD2/3	Betaglycan	
	ActivinA, ActivinB	ACVR2A, ACVR2B	ALK2, ALK4, ALK7		Cripto, Cryptic	
	Nodal		ALK4, ALK7			
	GDF1, GDF3					
	Myostatin (GDF8)		ALK4, ALK5			
	GDF9	BMPR2	ALK4			
	GDF11	ACVR2A, ACVR2B	ALK4, ALK5			
	ActivinC	-	-		-	
	ActivinE	-	-		-	
	InhibinA, InhibinB	ACVR2A, ACVR2B	-		-	Betaglycan
Lefty1, Lefty2	ACVR2A/2B	-	-	Cripto, Cryptic		
BMP	BMP2, BMP4	ACVR2A, ACVR2B, BMPR2	ALK3, ALK6	SMAD1/5	RGM pour BMP4 et 6	
	BMP5, BMP6, BMP7, BMP8		ALK2, ALK3, ALK6			
	BMP 9, BMP10	ACVR2A, BMPR2	ALK1		Endoglin	
	BMP15	BMPR2	ALK6			
	GDF5, GDF6, GDF7	ACVR2A, ACVR2B, BMPR2	ALK3, ALK6			
	AMH	AMHR 2	ALK2, ALK3			
	BMP 3	ACVR2B	-		-	
	GDF10	-	-		-	
Particulier	GDF15	-	-	-		

Tableau 4 | Les membres de la famille de la voie BMP/TGFβ

B. Les ligands : fonctions, synthèse et maturation

Sur la base de leurs structures et de leurs fonctions, 2 grandes sous-familles de ligands sont distinguées: celle des BMP et celle des TGF β . La sous-famille des BMP est la plus grande et regroupe une vingtaine de ligands, dont les plus étudiés sont les BMP 2, 4, 6, 7, 9 et 15, les **Growth and Differentiation Factors (GDF)** 5 et 9 et l'**Anti-Mullerian Hormone (AMH)**. La sous-famille des TGF β regroupe, quant à elle une douzaine de ligands, dont les TGF β 1, β 2 et β 3, l'activine A et B, ainsi que Nodal, la Myostatine (=GDF8) et les autres GDF (David & Massagué, 2018) (Tableau 4).

Parfois 4 sous-familles sont distinguées si les activines/inhibines des ligands TGF β sont séparées et que la sous-famille des exceptions est ajoutée. Sur la base des alignements de séquences, les différents BMP et GDF peuvent encore être subdivisés en sous-catégories que je ne vais pas détailler ici.

1. Fonctions

Cette voie de signalisation a des effets fonctionnels divers et variés. Les TGF β sont pléiotropes et contrôlent la prolifération et la différenciation dans de nombreux types cellulaires. Ils sont également actifs lors du développement embryonnaire puisque des mutations perte de fonction entraînent des malformations osseuses et des défauts cardiaques, pulmonaires ainsi qu'au niveau des yeux (Karttinen et al., 1995; Pelton et al., 1991). Chez l'adulte, le TGF β est impliqué dans l'homéostasie cellulaire. Sa fonction la plus intéressante, dans le cadre de cette thèse, est le rôle du TGF β 1 dans l'immunité comme inducteur de la **différenciation de lymphocytes Treg** (Huber et al., 2004) et également de la **différenciation Th17**. Le TGF β est aussi impliqué dans la cicatrisation et la fibrose, favorisant la production de composants de la **Matrice ExtraCellulaire (ECM – ExtraCellular Matrix)** (Pakyari et al., 2013). De plus, il joue un rôle important dans la **Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM)**. Tous ces rôles du TGF β lui confèrent un intérêt particulier en cancérologie car il promeut l'angiogenèse, la métastase et la suppression de la réponse immunitaire de l'hôte dans le micro-environnement tumoral (Jakowlew, 2006; Neuzillet et al., 2015). L'inhibition du TGF β est ainsi l'objet de nombreuses recherches et tests cliniques. Cependant, son rôle ambivalent de contrôle de la prolifération fait craindre des effets néfastes pro-prolifératifs. Néanmoins, le premier essai clinique de phase II conduit en 2013 n'a pas confirmé de telles craintes (Faivre et al., 2013).

Les activines/inhibines sont importantes dans la folliculogenèse et la spermatogenèse ainsi que dans la régulation inflammatoire et immunitaire. Elles ont également un effet sur l'organogenèse des yeux, du cœur, des reins et du pancréas (Yadin et al., 2016).

Pour finir, les BMP sont très importantes pendant le développement. De nombreuses expériences de mutations perte de fonction chez la souris ont permis de décortiquer le rôle de chacune d'entre elles (Zhao, 2003). Par exemples, BMP2 et BMP4 sont impliqués dans la formation des membres et le développement du cœur. BMP4 est aussi nécessaire à la

formation du mésoderme pendant la gastrulation. Une perte de BMP7 induit des altérations de l'organogénèse des yeux, des reins et du cœur. BMP5 favorise la formation osseuse alors que BMP3, lui, est plutôt inhibiteur.

Tous ces ligands fonctionnent sous-formes homodimériques, les deux sous-unités étant liées entre elles par un pont disulfure²⁵ (Figure 14 - Hinck et al. 1996). Cependant, certains ligands peuvent former des hétérodimères, augmentant encore la complexité de cette voie de signalisation. Certains des hétérodimères décrits n'ont pas de fonction biologique connue. C'est le cas pour l'hétérodimère TGFβ1/TGFβ2 décrit en 1987 (Cheifetz et al., 1987) ou encore de celui formé par les activines A et B décrit en 1986 (Ling et al., 1986). D'autres, ont une fonction biologique dans le développement embryonnaire des organismes modèles : drosophile, xénope et poisson zèbre (Zinski et al., 2018). Les hétérodimères BMP4/BMP7 et BMP2/BMP7, par exemple, induisent la formation du mésoderme chez le xénope et le poisson zèbre (Morikawa et al., 2016). BMP7/GDF7, lui, est impliqué dans le développement du **Système Nerveux Central (CNS)** du rat et de la souris (Butler & Dodd, 2003). Pour finir avec les exemples de fonction des ligands hétérodimériques, il a été démontré plus récemment que l'hétérodimère BMP9/BMP10 était la forme active majoritaire circulante dans le sang chez la souris et l'Homme et qu'elle pourrait jouer un rôle dans l'homéostasie vasculaire (Tillet et al., 2018).

Le ligand contient généralement 7 cystéines pour les BMP et 9 pour les TGFβ, dont respectivement 6 et 8 sont impliquées dans la formation de ponts disulfures intramoléculaires (structure secondaire du ligand). Le dernier résidu cystéine est celui engagé dans le pont disulfure intermoléculaire permettant la formation des -homo -hétérodimères de ligands mentionnés précédemment.

²⁵ Sauf 5 ligands (GDF3, GDF9, BMP15, Lefty A et Lefty B) qui ne possèdent pas la cystéine engagée dans le complexe homo-, hétéro- dimérique. Elles interagiraient donc par un autre moyen.

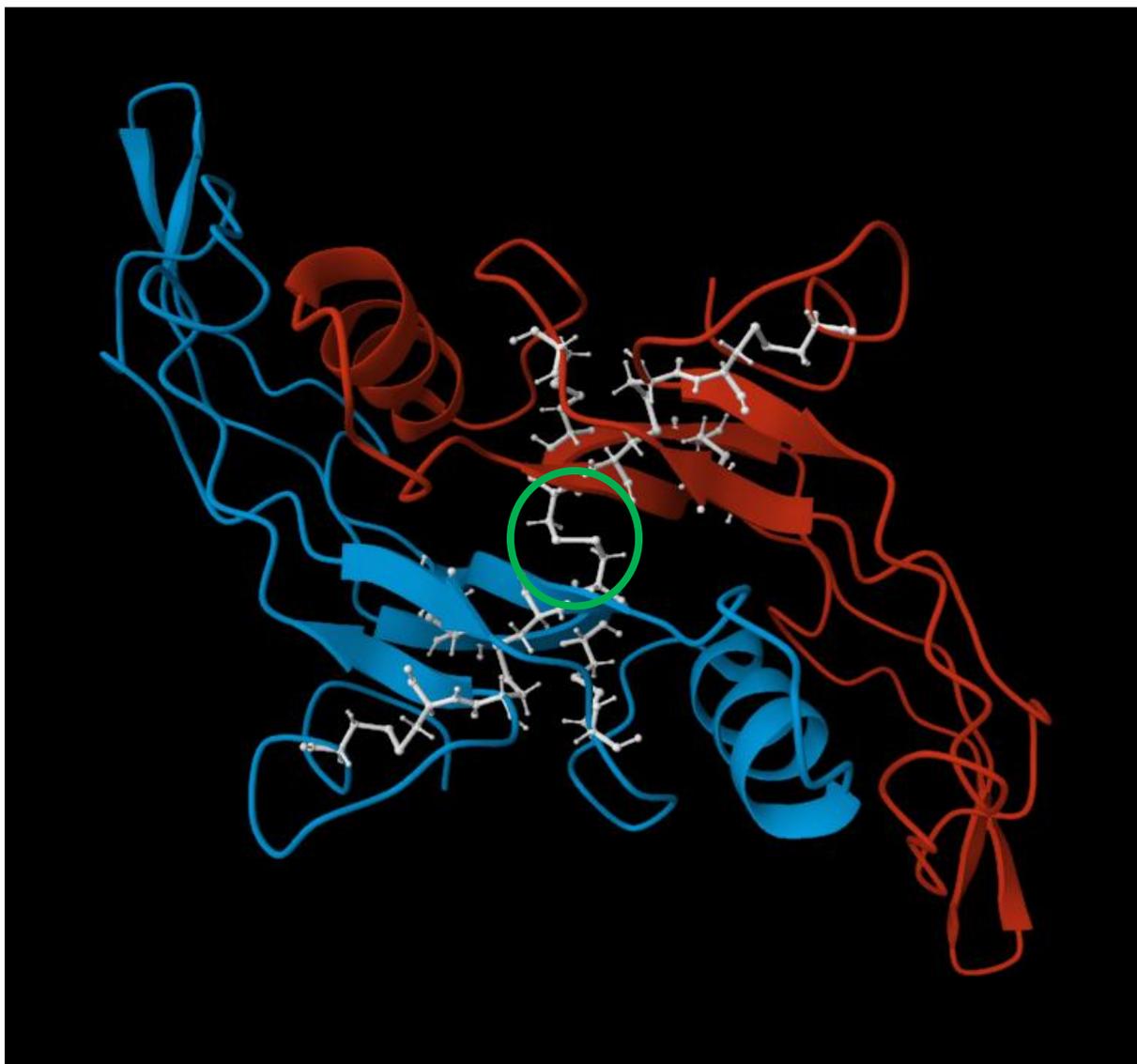


Figure 14 | Structure tridimensionnelle d'un homodimère de TGFβ1 humain

La structure tridimensionnelle d'un homodimère de TGFβ1 humain résolue par spectrométrie à Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) (entrée 1KLC dans la base PDB) à une résolution d'1,1 Angström. Un monomère est représenté en **bleu** et l'autre en **rouge**. Les ponts disulfures sont représentés en blanc et celui liant les deux monomères est mis en évidence par un **cercle vert**. 7 résidus cystéines sont présents par monomère, 6 sont impliqués dans la formation de ponts disulfures au sein d'un même monomère de TGFβ1 et 1 résidu est impliqué dans la formation du pont disulfure avec l'autre monomère.

2. Synthèse et sécrétion

Les ligands de la famille BMP/TGF β sont d'abord synthétisés sous forme de grands précurseurs inactifs (pré-pro-peptide) [1-390]²⁶ composés d'un domaine N-terminal, appelé **ProDomaine (PD)** ou, dans le cas de certains ligands de la sous-famille TGF β , « **Latency Associated Peptide** » (**LAP**) [30-278] et d'un domaine C-terminal qui constituera le ligand [279-390] (**Figure 15** d'après (Lafyatis, 2014)) (Derynck & Budi, 2019; Maeda et al., 2013; Robertson & Rifkin, 2013). Ils possèdent également un **Peptide Signal** (« **Signal Peptide** » - **SP**) en N-terminal [1-29], primordial pour la sécrétion du ligand. Le SP est rapidement clivé donnant naissance au propeptide [30-390] (Pro-BMP/Pro-TGF β **Figure 15.1.B et 2.B**). Dans le trans-Golgi, la furine convertase assure la protéolyse de la jonction PD-ligand (Dubois et al., 1995). Le PD et le ligand restent en interaction non-covalente et sous forme d'homodimères (**Figure 15.1.C et 2.C**). **Les ligands de type BMP sont alors excrétés sous forme d'un complexe actif**, car, plus affins pour leurs récepteurs que pour leur PD (Walton et al., 2010).

La présence du PD est nécessaire au bon repliement des homodimères et facilite leur transit et l'export du ligand (Gray & Mason, 1990). De façon très intéressante, seuls les **TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3, myostatine et le GDF11** ont suffisamment d'affinité pour leur PD pour induire une latence après sécrétion par la cellule, d'où le nom de « LAP ». Il existe d'ailleurs une maladie rare, le syndrome de Camurati-Engelmann, causée par une mutation dans le domaine LAP ou le SP du TGF β 1 qui entraîne une sécrétion accrue de TGF β 1 sous forme active (Janssens et al., 2003; Saito et al., 2001). Cette augmentation du TGF β 1 actif pourrait être à l'origine du phénotype observé d'hyperostose²⁷ des os longs, du crâne, de la colonne vertébrale et du pelvis chez les patients porteurs de cette maladie. Ceci souligne l'importance du contrôle de l'activation du TGF β 1.

Ainsi, les ligands de la sous-famille TGF β cités ci-dessus forment un complexe latent nommé « **Small Latent Complex** » (**SLC**) (**Figure 15.2.C**).

En terme structural, le PD contient 3 résidus cystéines critiques. Deux résidus situés du côté C-terminal permettent la formation de ponts disulfures entre les deux monomères de PD. Pour les PD spécifiques aux ligands latents, les LAP, le troisième résidu situé en N-terminal, est engagé dans la formation d'une liaison covalente avec une autre protéine importante dans la maturation de ces ligands particuliers : la protéine « **Latent TGF β Binding Protein** » (**LTBP**) (Saharinen et al., 1996).

Dans le cas des ligands latents (pour rappel : TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3, myostatine (GDF8) et GDF11), c'est le complexe final, composé du **SLC** et de la **LTBP**, nommé « **Large Latent Complex** » (**LLC**) (**Figure 15.2.D**), qui est excrété dans le milieu extracellulaire. De façon très intéressante, des souris ayant une substitution de la cystéine du LAP du TGF β 1 impliqué dans la liaison avec la LTBP présentent un phénotype similaire à une mutation perte de fonction du

²⁶ Les chiffres entre crochets correspondent aux acides aminés de la séquence pour le TGF β 1, il s'agit d'un exemple pour donner une idée des ordres de grandeur abordés dans cette section.

²⁷ Production excessive de tissu osseux.

TGF β 1, associant inflammation et tumorigenèse, soulignant l'importance de LTBP dans la fonction du TGF β 1 (Yoshinaga et al., 2008).

3. Interaction avec la matrice extracellulaire

La protéine LTBP est capable de former des liaisons covalentes avec les fibrillines²⁸ de l'ECM, elle joue alors un rôle fondamental dans la localisation et la disponibilité du ligand (Massam-Wu et al., 2010; Taipale et al., 1994, 1996). Chez l'Homme, il existe 4 isoformes de cette protéine : LTBP 1 à 4. Il a été démontré que LTBP-1 et -3 interagissent avec les 3 isoformes de pro-TGF β alors que LTBP 4 interagit seulement avec le pro-TGF β 1, et ce inefficacement (Robertson et al., 2015). Une interaction de LTBP-2 avec GDF11 et de LTBP-3 avec la myostatine et GDF11 a également été démontrée (Anderson et al., 2008; Sun et al., 2011).

4. Interaction avec la surface extracellulaire

Il a également été démontré que le SLC formé par le TGF β se lie covalamment à la protéine transmembranaire « **Glycoprotein A Repetitions Predominant** » (GARP) présente à la surface des Treg activés et des plaquettes (Macaulay et al., 2007; Stockis et al., 2009; D. Q. Tran et al., 2009; R. Wang et al., 2008, 2012). Cette association permet alors une régulation locale de la disponibilité du TGF β et dans le cas des Treg un potentiel rôle sur leur fonction immuno-régulatrice qui n'est pas encore complètement démontré à ce jour. Mais on peut souligner que le blocage de l'activation du TGF β 1 par les Treg avec l'utilisation d'un anticorps dirigé contre le complexe GARP:TGF- β 1 inhibe l'immunosuppression exercée par ces Treg (Cuende et al., 2015).

En résumé, les ligands de la sous-famille des BMP sont sécrétés par la cellule dans un complexe dimérique actif (PD-ligand) alors que ceux de la sous-famille des TGF β (TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3, myostatine et GDF11) sont sécrétés sous forme d'un complexe latent en association avec la protéine libre LTBP ou la protéine transmembranaire GARP à la surface des Treg et plaquettes. Les premiers peuvent interagir directement avec les fibrillines de l'ECM via leur PD (Sengle et al., 2008) et ne nécessitent pas d'activation ultérieure. Les deuxièmes interagissent respectivement avec l'ECM ou la membrane cellulaire, via la protéine LTBP du complexe LLC ou la protéine GARP, et ont besoin d'une étape supplémentaire d'activation.

De façon très intéressante, les PD des BMP peuvent avoir des affinités différentes pour les domaines des fibrillines. Ceci peut avoir un impact important pour induire différentes fonctions pendant le développement, la croissance et pour l'homéostasie (Zimmermann et al., 2021). En effet, la structure de l'ECM évolue et mature durant le développement et la vie adulte d'un organisme, rendant plus ou moins accessible et affins certains sites de fixations,

²⁸ Il s'agit des protéines principales composant les microfibrilles de la matrice extracellulaire.

ce qui, en retour, rend plus ou moins accessible les ligands de la voie BMP/TGF β pour leurs récepteurs.

5. L'activation des formes latentes

L'activation des ligands sécrétés sous forme latente LLC peut être effectuée par une **modification du contexte physicochimique, par des protéases mais surtout par les intégrines** (Robertson & Rifkin, 2016). Il s'agit encore d'un niveau dans la régulation de la disponibilité du ligand.

Les intégrines

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires permettant l'interaction cellule-cellule ou cellule-ECM. Il s'agit des activateurs les mieux décrits des formes latentes du TGF β . Ces protéines membranaires ont une expression tissu/cellule spécifique qui permet notamment à l'organisme de contrôler le lieu d'activation de chaque ligand latent. Les intégrines les mieux décrites dans l'activation des TGF β 1 et TGF β 3 sont **les intégrines α_v** , en particulier les hétérodimères $\alpha_v\beta_6$ et $\alpha_v\beta_8$.

a. Intégrines $\alpha_v\beta_6$

C'est là que le **motif RGD** du LAP entre en jeu (**Figure 15.2.A Pré-proTGF β**) puisque c'est lui qui est reconnu par les intégrines. Les intégrines $\alpha_v\beta_6$ se trouvant dans la membrane cellulaire et le LLC étant fixé à l'ECM, les forces de tractions exercées permettent la libération du TGF β actif (Annes et al., 2004; Munger et al., 1999). De même, ces intégrines permettent l'activation de GARP:TGF β 1 (Dong et al., 2017; R. Wang et al., 2012).

En l'absence du motif RGD dans LAP-TGF β 1 chez la souris, ces dernières présentent un phénotype similaire aux souris mutantes perte de fonction de *Tgfb1* (défaut de vasculogénèse, inflammation multi-organes et absence de cellules de Langerhans) (Z. Yang et al., 2007). Cependant LAP-TGF β 2 étant dépourvu de ce motif RGD, il semblerait que les intégrines peuvent reconnaître d'autres motifs.

b. Intégrines $\alpha_v\beta_8$

Les intégrines $\alpha_v\beta_8$ ont un mécanisme d'activation du TGF β latent moins clair, bien que ce rôle ait été démontré dans la libération de TGF β 1 actif du complexe GARP:TGF β 1 (Edwards et al., 2014). Plutôt que des forces physiques mis à l'œuvre, ce serait le recrutement de **MétalloProtéinases Matricielles (MMP)** par les intégrines qui permettrait le clivage du LAP et la libération du TGF β actif (D. Mu et al., 2002; Sotgia et al., 2006; Yu & Stamenkovic, 2000). Cependant le rôle des MMP n'est pas clairement établi. Les intégrines $\alpha_v\beta_8$ sont

particulièrement exprimées par les Treg et sont capables d'activer le TGF β 1 de façon autocrine (Stockis et al., 2009; R. Wang et al., 2012).

Un détail très intéressant dans le cadre de nos études sur la SpA est le phénotype engendré par une délétion de $\alpha_v\beta_8$ spécifiquement dans les DC de souris. En effet, ces souris développent un phénotype associant colite et maladie auto-immune par la production d'anticorps anti-ADN et une adénopathie²⁹ (Travis et al., 2007).

Les protéases

In vitro, de nombreuses protéases sont capables d'activer les formes latentes du TGF β . Cependant, aucun mutant perte de fonction pour les différentes protéases testées n'entraînent de phénotype ressemblant aux mutants perte de fonction du TGF β probablement à cause de la redondance fonctionnelle de ces protéines (Jenkins, 2008; Robertson & Rifkin, 2016). Afin d'approfondir les connaissances sur le rôle des protéases dans l'activation du TGF β latent, il serait important d'identifier des sites de clivage au niveau du LAP ou de LTBP (Robertson & Rifkin, 2016).

Facteurs physico-chimiques

Les formes latentes du TGF β peuvent également être activés par des facteurs physiques ou chimiques : forces de cisaillement (Ahamed et al., 2008), Espèces Réactives de l'Oxygène (**ROS** – **R**eactive **O**xygene **S**pecies) (Barcellos-Hoff & Dix, 1996). Pour finir, une diminution du pH engendre également une activation des formes latentes du TGF β (Lyons et al., 1988). Il est donc important de tenir compte du contexte physiologique dans lequel se trouve le TGF β pour comprendre sa régulation. Pour donner un exemple, les ostéoclastes sont capables de faire diminuer le pH à environ 4,5 pendant la résorption osseuse (Teitelbaum, 2000), ce qui pourrait jouer un rôle dans l'activation du TGF β latent présent.

Pour conclure sur les ligands, qu'il s'agisse de formes latentes avec les TGF β ou de formes actives avec les BMP, ils peuvent circuler librement mais dans l'immense majorité, ils sont séquestrés par l'ECM (cartilage, os, membrane basale). L'ECM joue ainsi un rôle de réservoir, mais surtout, elle permet un contrôle strict, local et spécifique des ligands de la voie BMP/TGF β pour éviter toute signalisation ectopique dont les conséquences peuvent être désastreuses pour un organisme.

Une fois libéré de l'ECM, le ligand poursuit son périple jusqu'à la rencontre avec son récepteur qui va engendrer une réponse cellulaire adaptée au contexte. Le chapitre suivant porte sur l'organisation structurale de ces récepteurs et sur leur régulation.

²⁹ Augmentation anormale de la taille d'un ganglion qui devient dur et parfois enflammé.

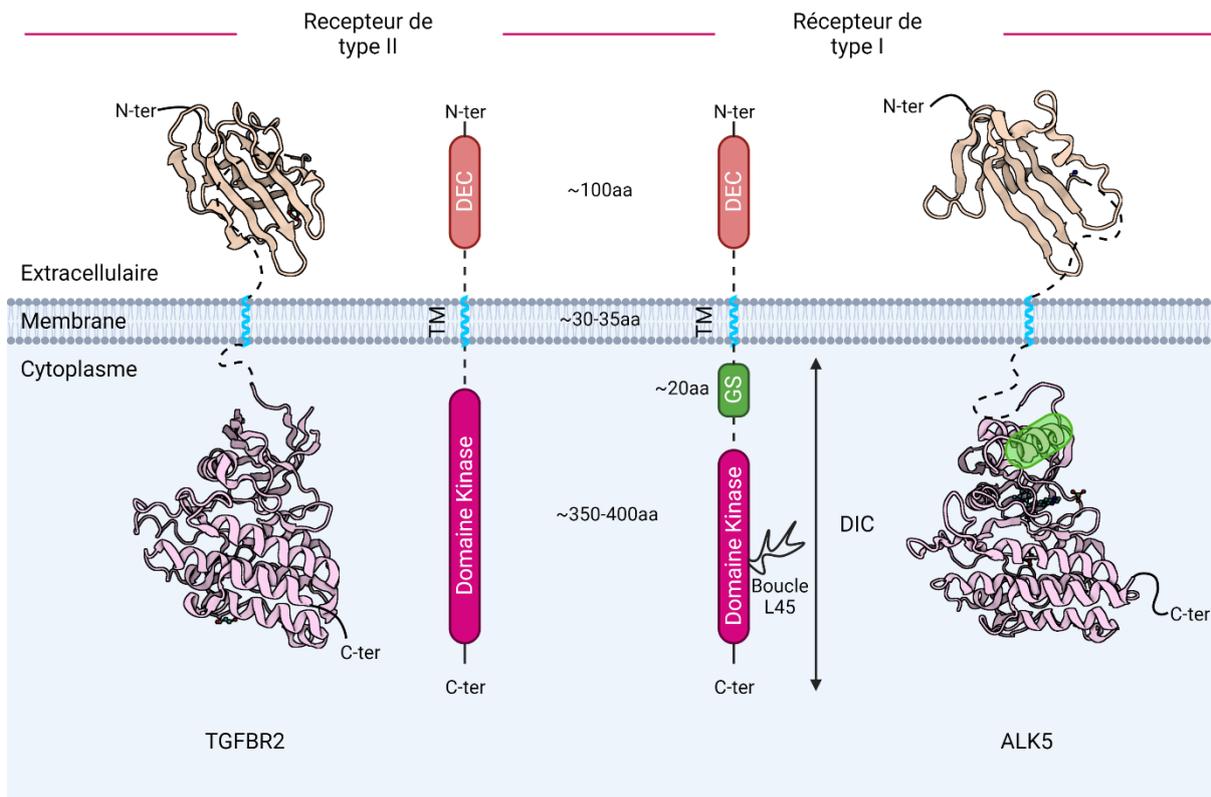


Figure 16 | Les récepteurs de types I et II de la voie BMP/TGFβ

Représentation schématique des récepteurs de types I et II de la voie BMP/TGFβ avec les structures résolues des différents domaines du récepteur de type II TGFBR2 (à gauche) et du récepteur de type I TGFBR1 (à droite). Ces récepteurs sont composés d'un petit **Domaine ExtraCellulaire (DEC, en beige sur la structure/orange sur le schéma)** (~100 acides aminés), d'une hélice alpha **TransMembranaire (TM, en bleu)** (~30-35 acides aminés) et d'un grand **Domaine IntraCellulaire (DIC)** (~350-400 acides aminés). Le DIC contient le domaine kinase (en rose sur la structure/violet sur le schéma) qui constitue le cœur catalytique du récepteur. En plus de ce domaine kinase, juxtaposé à la membrane, les récepteurs de type I possèdent un domaine riche en glycines et sérines (GS, en vert) (~20 acides aminés). La représentation des structures DEC TGFBR2 (en haut à gauche), DIC TGFBR2 (en bas à gauche), DEC TGFBR1 (en haut à droite) et DIC TGFBR1 (en bas à droite) a été extraite de la base de données PDB avec les codes qui sont respectivement : 1M9Z, 5E8V, 2L5S, 3FAA.

C. Les récepteurs

1. Organisation et signalisation

Comme mentionné précédemment, la voie BMP/TGF β est composée de 12 récepteurs avec 7 récepteurs de type I et 5 de type II (indiqués dans la **Figure 13** et listés dans le Tableau 4)³⁰(Massagué, 1985). Ces récepteurs sont des protéines transmembranaires classiques possédant un **Domaine ExtraCellulaire (DEC)** (~100 acides aminés), une **hélice alpha TransMembranaire (TM)** (~30-35 acides aminés) et un **grand Domaine IntraCellulaire (DIC)** (~350-400 acides aminés) (Figure 16 d'après (Hinck, 2012)). Ces récepteurs ont des caractéristiques de type serine/thréonine kinase et tyrosine kinase (Heldin & Moustakas, 2016). Le domaine cytoplasmique assure ces fonctions enzymatiques grâce à son **domaine kinase**. Les récepteurs de cette voie de signalisation possédant différents noms, je les résume dans le Tableau 5.

Gène	Protéine	Alias
Récepteurs		
<i>ACVRL1</i>	ALK1	ALK1/AcrRL1
<i>ACVR1</i>	ALK2	ALK2/ActRIA/ ACVR1A
<i>BMPRIA</i>	ALK3	ALK3
<i>ACVR1B</i>	ALK4	ALK4/ActRIB
<i>TGFBR1</i>	ALK5	ALK5
<i>BMPR1B</i>	ALK6	ALK6
<i>ACVR1C</i>	ALK7	ALK7/ActRIC
<i>ACVR2A</i>	ACVR2A	ACVR2/ACT-RII
<i>ACVR2B</i>	ACVR2B	Act-RIIB
<i>BMPR2</i>	BMPR2	BMR2/BMPR3/BMPR-II
<i>AMHR2</i>	AMHR2	AMHR
<i>TGFBR2</i>	TGFBR2	TGFR-2/TBRII
Ligands		
<i>Myostatin</i>	Myostatin	GDF8
<i>GDF5</i>	GDF5	BMP14
<i>BMP3b</i>	BMP3b	GDF10
<i>BMP15</i>	BMP15	GDF9b

Tableau 5 | Alias des récepteurs et ligands de la voie BMP/TGF β

Les récepteurs de type I et II existent sous formes monomériques, homodimériques et hétérodimériques à la membrane cellulaire, mais après **fixation spécifique** d'un dimère de ligand sur le DEC d'un dimère de récepteurs de type I ou II, l'association du complexe hétérotétramérique est favorisée et stabilisée. Une fois le complexe stabilisé, les récepteurs

³⁰ Pour l'anecdote, leurs noms : « type I » et « type II » viennent de l'ordre de migration dans un gel de polyacrylamide en présence de TGF β marqué avec un isotope radioactif.

de type II, qui ont une activité constitutive d'autophosphorylation (Lawler et al., 1997), vont pouvoir phosphoryler les récepteurs de type I au niveau de leur domaine **riche en Glycines et Sérines (GS)** qui est juxtaposé à la membrane (Souchelnytskyi et al., 1996). Ce récepteur de type I peut alors propager le signal et phosphoryler R-SMAD. Les mécanismes exacts ne sont pas complètement connus et font l'objet de nombreuses études encore aujourd'hui.

Chaque ligand de la voie BMP/TGF β a une spécificité quant aux combinaisons possibles de récepteurs de type I et II (résumé dans le Tableau 4) mais la stœchiométrie ligands:récepteurs de type I:récepteurs type II est toujours de 2:2:2. En revanche, l'affinité des ligands pour les récepteurs de type I ou II varie fortement (Ehrlich et al., 2012). En effet, les ligands de la famille TGF β ont une affinité plus forte pour leur récepteur de type II que pour celui de type I, alors que, ceux de la famille des BMP ont tendance à être plus affins pour ceux de type I. La forte affinité du TGF β pour son récepteur de type II a permis d'établir le modèle d'activation séquentielle impliquant d'abord la formation du complexe TGF β :Récepteur de type II suivi du recrutement du récepteur de type I (Laiho et al., 1991). Mais ce modèle n'est pas la règle puisque les ligands de la famille BMP, en particulier BMP2 et GDF5 ont 10 à 50 fois plus d'affinité pour leurs récepteurs de type I : ALK3 et ALK6 que pour leurs récepteurs de type II : BMPR2, ACVR2A et ACVR2B (Kirsch, 2000). Il est intéressant de noter d'une part que l'amplitude de la différence d'affinité pour le type de récepteur est plus faible pour les ligands de la famille des BMPs et que, d'autre part, il semble que cette différence soit plus variable puisque certaines expériences ont montré que BMP7 avait une affinité intermédiaire pour ACVR2A, ACVR2B et ALK6 et une affinité faible pour BMPR2 et ALK3 (Greenwald et al., 2003). De plus, les ligands de la famille BMP ont une affinité moindre pour le complexe hétérotétramérique que ceux de la famille des TGF β , ce qui explique la plus grande flexibilité dans les combinaisons possibles de récepteurs pour induire la signalisation (Sebald et al., 2004).

Pour terminer, les structures cristallographiques du DEC des récepteurs en interaction avec leurs ligands montrent que dans le cas des TGF β , les DEC des récepteurs sont en interaction directe alors que pour les BMP (BMP2 et GDF5), ces récepteurs n'entrent pas en contact. Ceci suggère, comme pour les récepteurs aux TGF β , une participation du DIC des récepteurs dans la formation des complexes hétérotétramériques pour les récepteurs des BMP (Nohe et al., 2002). De plus, il a été démontré que l'interaction entre les DEC des récepteurs des TGF β était nécessaire à la signalisation. En conclusion, malgré des points communs, les ligands de la famille des TGF β et ceux de la famille des BMP diffèrent dans leur association avec leurs récepteurs et dans la conformation des complexes de signalisation (Hinck, 2012).

2. Localisation, circulation et recyclage des récepteurs

Comme mentionné précédemment, les ligands de la famille BMP ont globalement moins d'affinité pour leurs hétéromères de récepteurs que ceux de la famille des TGF β . De façon très intéressante, en contrepartie, la concentration des récepteurs aux BMP est généralement bien

plus importante à la surface cellulaire (souvent d'un facteur 10) que celle des récepteurs aux TGF β . Dans le cas du TGF β , cette faible concentration de récepteur en combinaison avec la haute affinité pour le ligand est un moyen de contrôler précisément la réponse à des stimuli intra- ou extracellulaires (Derynck & Budi, 2019).

Un point intéressant que j'aimerais aborder est l'expression, la maturation et l'adressage à la membrane des récepteurs. Ces questions ont fait l'objet de recherches détaillées spécifiquement pour les deux récepteurs aux TGF β (TGFBR1 et TGFBR2), notamment dans des lignées cellulaires issues de l'épithélium pulmonaire du vison (Koli & Arteaga, 1997; Wells et al., 1997). Dans ces études, les auteurs ont analysé le temps de transit des récepteurs TGFBR1 et TGFBR2, néosynthétisés dans le RE et dans le Golgi ainsi que leur temps de renouvellement à la membrane cellulaire. Le point particulièrement intéressant est que le temps de transit des deux types de récepteurs est différent. En effet, le récepteur de type I reste environ 6 fois plus longtemps dans le RE que celui de type II (respectivement \sim 30 minutes contre \sim 3 heures), et seulement 50% des récepteurs de type I atteignent le Golgi contre 90% pour ceux de type II. Ces études révèlent un processus de repliement et de maturation moins efficace pour le récepteur de type I, qui peut être un moyen pour la cellule de contrôler le nombre de récepteurs à la membrane.

Une étude plus récente a permis de dévoiler l'implication des microtubules dans le transport des vésicules contenant le récepteur TGFBR2, à la membrane, montrant qu'il s'agit d'un transport actif. De plus, la formation de ces vésicules de transport est inhibée par l'autophosphorylation du récepteur ou un défaut de N-glycosylation du récepteur ou encore une concentration trop forte de potassium dans le milieu extracellulaire (Luo et al. 2014). Ces exemples d'inhibition illustrent une fois de plus la complexité de la régulation de cette voie de signalisation.

Une fois à la membrane, les récepteurs de la voie BMP/TGF β n'y sont pas répartis de la même manière selon le type cellulaire. Par exemple, dans les cellules épithéliales polarisées, les récepteurs au TGF β sont localisés en basolatéral au niveau des contacts cellule-cellule rendant les cellules insensibles à une stimulation apicale (Murphy et al., 2004). Dans les autres cas les récepteurs sont répartis de façon plus homogène avec une concentration au niveau du front de migration des cellules en mouvement ou encore à l'extrémité des filopodes et cytonèmes³¹ (Derynck & Budi, 2019).

En descendant plus bas dans l'échelle de taille, la capacité des récepteurs à se mouvoir latéralement dans la membrane, couplée à leur affinité pour des molécules présentes dans certains microdomaines membranaires, entraîne leur accumulation dans ces derniers. Plus spécifiquement, une concentration plus élevée des récepteurs est observée aux niveaux des microdomaines membranaires que sont les puits à clathrine (cholestérol indépendants) et les cavéoles (riches en cholestérols et sphingolipides) par lesquelles ils peuvent être internalisés (Ehrlich, 2016). Ainsi, la répartition des récepteurs à la membrane est régulée par la composition chimique de celle-ci (cholestérol...), l'expression de protéines auxiliaires

³¹ Il s'agit de projections cytoplasmiques spécialisées dans l'échange de protéines de signalisation entre les cellules.

(ADAM12, CD109, Dab2...), des stimulations extracellulaires (IL-6, hyaluronane...) ou des modifications post-traductionnelles des récepteurs eux-mêmes (Ehrlich, 2016).

Dans le cas du TGF β , le complexe hétérotétramérique de récepteurs est internalisé via des vésicules d'endocytose dépendantes de la clathrine après reconnaissance du ligand (Yakymovych et al., 2018). Beaucoup d'études s'intéressent d'ailleurs au rôle de cette internalisation dans la signalisation du TGF β mais il n'existe à l'heure actuelle aucun consensus.

À la suite de l'internalisation des récepteurs, de manière clathrine-dépendante ou cavéoline-dépendante, et de leur passage par l'endosome précoce, trois options s'offrent à eux : (a) le recyclage vers la membrane plasmique, (b) la dégradation par le lysosome ou (c) la relocalisation vers d'autres domaines intracellulaires (Ehrlich, 2016). Le choix de telle ou telle destinée est, encore une fois, régulé et dépendant du contexte (type cellulaire, environnement, signaux extracellulaires, modifications post-traductionnelles des récepteurs...).

De plus, certains résultats suggèrent que la localisation des récepteurs à la membrane influence l'effet de la signalisation. Les récepteurs se trouvant dans des radeaux lipidiques sembleraient plutôt induire des voies non-canoniques (indépendante des SMADs) : **Mitogen Associated Protein Kinase (MAPK)** ou **c-Jun N-terminal Kinase (JNK)** dans le cas des TGFBR (Shapira et al., 2014; Zuo & Chen, 2009). Les résultats obtenus pour les BMPR vont dans le même sens mais sont moins tranchés, avec des résultats parfois contradictoires suggérant un effet du contexte cellulaire (Ehrlich, 2016). La signalisation canonique, quant à elle, est principalement initiée au niveau des puits à clathrine qui sont enrichis en **Smad Anchor for Receptor Activation (SARA)**, une protéine ancrée à la membrane qui favorise l'interaction de SMAD2/3 avec son récepteur et par ce biais, la signalisation canonique (Di Guglielmo et al., 2003).

Un détail intéressant est la tendance de certains inhibiteurs de la signalisation TGF β (SMAD7 et **SMad Ubiquitination Regulatory Factor (SMURF)** qui seront abordés plus tard) à, eux aussi, se localiser dans les radeaux lipiques, ce qui corrobore l'idée d'une internalisation clathrine-indépendante comme moyen d'atténuer la signalisation canonique du TGF β (Ehrlich, 2016).

Pour conclure, les récepteurs de la voie BMP/TGF β ne sont pas tous équivalents en termes de synthèse, de maturation et d'adressage à la membrane. Certains ont un repliement lent et peu efficace, alors que d'autres sont maturés efficacement et sont rapidement adressés à la membrane. Une fois à la membrane, ces récepteurs sont libres de circuler latéralement mais peuvent s'agréger dans des microdomaines contenant des molécules pour lesquels ils ont une affinité plus ou moins grande. Ainsi, la composition chimique de la membrane va directement influencer la signalisation car la localisation des récepteurs et donc la voie d'internalisation empruntée va favoriser une signalisation canonique (SMAD-dépendante) ou non-canonique (non SMAD-dépendante). Je reviendrai d'ailleurs plus loin en détail sur la voie canonique et certaines voies non-canoniques de la signalisation BMP/TGF β .

Tous ces mécanismes complexes abordés sont le fruit d'une évolution de la voie de signalisation avec les organismes dans lesquelles elle opère. Elle a diversifié ses fonctions nécessitant des systèmes de régulation fins afin d'adapter la réponse aux contextes. Si on s'intéresse aux récepteurs en tant que protéines, un autre système de régulation que l'on peut explorer concerne les modifications post-traductionnelles.

3. Modifications post-traductionnelles des récepteurs

Comme la majorité des protéines, les récepteurs de la voie BMP/TGF β subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles. En particulier, la phosphorylation est celle qui régule l'activité des récepteurs de type I et II. Les faits exposés ici sont surtout établis pour les récepteurs ALK5 et TGFBR2 qui sont les plus étudiés, et donc, les mieux décrits. L'étude des récepteurs aux BMP s'avère plus difficile et moins avancée.

Au niveau du domaine kinase, les récepteurs de type II, il existe plusieurs sites d'autophosphorylation sur des sérines qui peuvent être activateurs ou inhibiteurs de la signalisation (Luo and Lodish 1997). Des résidus tyrosines peuvent également s'autophosphoryler et pourraient participer à la régulation de l'activité kinase de ces récepteurs (Lawler et al., 1997).

L'activation du récepteur de type I nécessite la phosphorylation de plusieurs résidus sérines et thréonines dans le domaine GS (Figure 16). Au-delà d'un certain seuil de phosphorylation de ce domaine, un changement conformationnel entraîne la libération de la protéine inhibitrice « **12-kDa FK506-Binding Protein** » (**FKBP12**) jusqu'alors associée au récepteur de type I. La phosphorylation du domaine GS augmente son interaction avec R-SMAD et promeut son activation. Le domaine kinase du récepteur de type I, qui possède une boucle protubérante d'activation, appelée « **L45 loop** », peut alors activer R-SMAD (Huse et al., 1999, 2001). Si la phosphorylation des récepteurs est primordiale dans cette voie de signalisation, la déphosphorylation l'est tout autant pour moduler la réponse. Ainsi différentes phosphatases ont été identifiées comme les holoenzymes³² **Protein Phosphatase 1 (PP1)** (W. Shi et al., 2004) et **Protein Phosphatase 2A (PP2A)** qui déphosphorylent les sérines et thréonines du récepteur de type I ALK5 (Heldin & Moustakas, 2016). La protéine « **T-Cell Protein Tyrosine kinase Phosphatase** » (**TCPTP**) a quant à elle un rôle dans la déphosphorylation des résidus tyrosines du récepteur de type II TGFBR2 dans des cellules épithéliales de rein (Chen et al., 2014).

FKBP12 peut également interagir avec SMAD7, un inhibiteur de la signalisation BMP/TGF β et pourrait ainsi servir de protéine adaptatrice aux complexes SMAD7-SMURF1³³ pour promouvoir l'**ubiquitylation** du récepteur de type I (Ebisawa et al., 2001; Yamaguchi et al., 2006). En effet, la poly-ubiquitylation d'une protéine permet son adressage au protéasome et sa dégradation, constituant ainsi un mécanisme essentiel de la régulation post-

³² Enzyme fonctionnelle formée par une ou plusieurs protéine(s) en association avec un cofacteur comme des ions métalliques ou des molécules organiques (flavine, hème).

³³ Une E3 ubiquitine ligase.

traductionnelle. Les récepteurs de type I peuvent également être ubiquitinylés par l'ubiquitine ligase SMURF2, elle aussi en association avec SMAD7 (Kavsak et al., 2000). Un point important en termes de rétrocontrôle négatif est que SMAD7 et SMURF2 sont tous deux induits par le TGF β . Les résidus ubiquitinylés précis sont encore inconnus à ce jour. Le récepteur de type II, TGFBR2, peut lui aussi subir une poly-ubiquitinylation mais les enzymes responsables de cette modification n'ont pas été identifiées (Heldin & Moustakas, 2016). Un point particulièrement intéressant est la capacité de Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 6 (TRAF6) à induire le clivage de TGFBR1, libérant le domaine intracellulaire de ce récepteur qui va alors s'associer au régulateur transcriptionnel P300 et induire l'expression de gènes responsables de l'invasion tumorale (Y. Mu et al., 2011).

Si ces récepteurs peuvent être ubiquitinylés, il existe également des protéases ubiquitine-spécifiques capables de les désubiquitinyler. Par exemple « l'Ubiquitine-Specific Protease » 4 (USP4) est induite par la phospho-AKT et agit directement sur TGFBR1 régulant ainsi son accumulation à la membrane plasmique (Zhang et al., 2012).

La régulation de cette voie de signalisation passe également par deux autres modifications post-traductionnelles agonistes de la signalisation que sont la **sumoylation**³⁴ du récepteur de type I et la **neddylation**³⁵ du récepteur de type II. Succinctement, la sumoylation de TGFBR1 facilite le recrutement de SMAD3, ce qui promeut la signalisation (J. S. Kang et al., 2008) et la neddylation du récepteur de type II par Casitas B-lineage lymphoma (c-Cbl) favorise son endocytose dans des endosomes précoces cavéoline-indépendants prévenant son ubiquitinylation et sa dégradation (Zuo et al., 2013).

Ainsi, les modifications post-traductionnelles constituent un élément majeur de la régulation des récepteurs de la voie TGF β . Elles peuvent avoir un effet agoniste (phosphorylation, désubiquitinylation, sumoylation, neddylation) ou antagoniste (déphosphorylation, poly-ubiquitinylation) sur la signalisation. Comme indiqué plus haut, ces études se sont majoritairement concentrées sur les deux récepteurs aux TGF β , TGFBR1 (ALK5) et TGFBR2 car la recherche sur les récepteurs aux BMP s'avère plus complexe. Cependant les études sur BMPRII révèlent qu'après phosphorylation, celui-ci est poly-ubiquitinylé et dégradé dans une lignée épithéliale pulmonaire humaine et pendant la neurulation chez le Xénope (Durrington et al., 2010; Satow et al., 2006). De plus, il a été démontré que le récepteur ALK3 était ubiquitinylé par SMURF1 qui est recrutée, cette fois-ci, par SMAD6 (Murakami et al., 2003). Enfin une autre étude révèle que la désubiquitinylation de ALK3 par USP15 augmente la signalisation BMP (Herhaus et al., 2014). Ces observations soulignent le fait qu'au même titre que les récepteurs aux TGF β , les récepteurs aux BMP subissent des modifications post-traductionnelles importantes pour la signalisation.

4. Régulation post-transcriptionnelle par les micro-ARN

³⁴ Ajout d'une protéine appelée « Small Ubiquitin-Like Modifier » (SUMO) sur une lysine d'une protéine

³⁵ Ajout d'une protéine appelée « Neural precursor cell Expressed, Developmentally Down-regulated 8 » (NEDD8) sur une protéine.

Le dernier point qui sera abordé à propos des récepteurs est leur régulation post-transcriptionnelle par les **micro-ARN (miARN)**. Les miARN sont de courts ARN non-codants d'une vingtaine de nucléotides qui ciblent les **ARN messagers (ARNm)** et induisent leur dégradation ou bloquent leur traduction (Loh et al., 2023). Plus qu'une liste des miARN identifiés, je souhaiterais ici donner quelques exemples particulièrement intéressants.

miR-302, un miARN qui réprime l'expression du récepteur BMPRII (et également celle de TGFBR2) est lui-même réprimé par BMP4, augmentant ainsi l'expression de BMPRII dans les cellules musculaires lisses vasculaires (Kang et al., 2012). Au contraire, BMP2 induit des miARN de la famille miR-17 qui vont réprimer l'expression de BMPRII dans les neurones en développement (Sun et al., 2013). Les miARN peuvent également être acteurs de régulations transverses entre différentes voies de signalisation. En effet, la protéine **STAT3**, activée par l'**IL-6**, induit miR-17 et donc la répression de l'expression de BMPRII (Brock et al., 2009). Ces trois exemples de régulation d'un récepteur par des miARN, respectivement : un rétrocontrôle positif, un rétrocontrôle négatif et un contrôle négatif transverse entre deux voies de signalisation, ne représentent qu'une partie de ceux connus. Outre la régulation des récepteurs, les miARN régulent également les Co-SMAD ou encore des protéines régulatrices telle que la furine évoquée précédemment (Xu et al., 2021).

Chez l'Homme, de nombreux miARN ont été identifiés comme dérégulés ou, plus directement, dérégulant la signalisation BMP/TGF β dans le cancer ainsi que dans la fibrose de différents organes (reins, foie, poumons et cœur) (Suzuki, 2018; Xu et al., 2021). Les miARN ciblant les acteurs de la voie BMP/TGF β sont alors une source d'espoir dans le développement de biomarqueurs mais aussi de thérapies (Suzuki, 2018).

D. Les Corécepteurs

Le dernier système contrôlant la signalisation BMP/TGF β que je vais exposer est celui assuré par des protéines ancrées ou transmembranaires qui aident, de façon sélective, les ligands à se fixer à leurs récepteurs. Parmi ces protéines, appelées corécepteurs, les mieux décrites sont le **betaglycane** et l'**endogline** toutes deux ancrées à la membrane. Les corécepteurs connus, ainsi que les couples ligands/récepteurs auxquelles ils sont associés, sont résumés dans le Tableau 4 colonne « corécepteurs ».

Le **betaglycane**, parfois appelé TGF β RIII, possède une affinité pour les trois isoformes du TGF β (1, 2 et 3) et potentialise leur signalisation (S. K. Kim et al., 2019). En particulier pour le TGF β 2, qui est moins affin pour ses récepteurs, la présence du betaglycane à la surface cellulaire augmente d'un facteur 100 à 500 la signalisation (López-Casillas et al., 1993). Les données biochimiques et structurales ont permis l'élaboration du modèle selon lequel le betaglycane capture le TGF β et favorise son interaction avec son récepteur de type II.

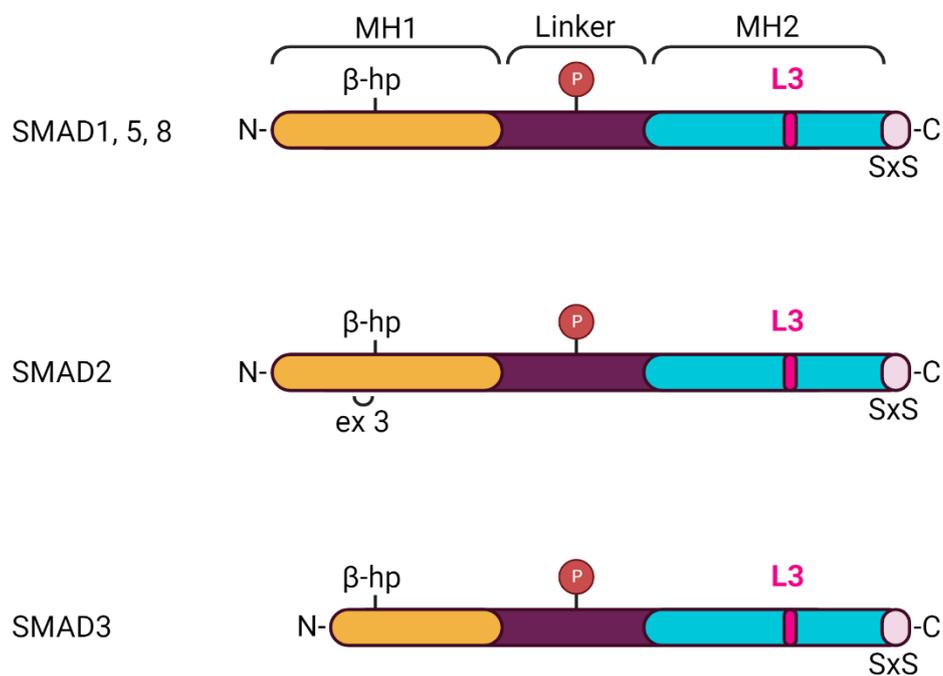
L'**endogline**, quant à elle, est affine pour BMP9 et BMP10 et fonctionne sous forme dimérique. Le modèle actuel suggère que l'endogline capture les molécules BMP9 et BMP10 circulante dans le sang et permet leur présentation au récepteur ALK1. L'association des récepteurs de type II ACVR2A, ACVR2B ou BMPRII dissocierait l'endogline du complexe. De

façon très intéressante, chez des patients atteints d'une maladie génétique rare, la télangiectasie hémorragique héréditaire³⁶, la plupart possèdent une mutation soit dans le récepteur ALK1, soit dans l'endogline, soulignant l'importance de cette dernière dans le fonctionnement de la voie de signalisation (Johnson et al., 1996; McAllister et al., 1994).

Cette partie m'a permis de présenter une partie des phénomènes liés à la signalisation BMP/TGF β , explorant le devenir des ligands, de leur synthèse à leur sécrétion, jusqu'à leur présentation aux récepteurs. J'ai également laissé percevoir la complexité de la dynamique des récepteurs de cette voie. Je vais maintenant vous faire entrer dans la cellule et voyager jusqu'au noyau en présentant les SMAD, les effecteurs canoniques intracellulaires de la signalisation BMP/TGF β . De plus, je vais aborder les voies non-canoniques qui jouent, elles aussi, un rôle primordial.

³⁶ Dérégulation de l'angiogenèse qui se caractérise par une malformation des vaisseaux sanguins pouvant entraîner des saignements de nez et des télangiectasies (dilatations permanentes des vaisseaux sanguins) cutanées ou muqueuses.

A. SMAD activés par les récepteurs (R-SMAD, Receptor-activated SMADs)



B. Mediateur commun des SMAD (Co-SMAD, Common-mediator SMAD)



C. Inhibiteurs de SMAD

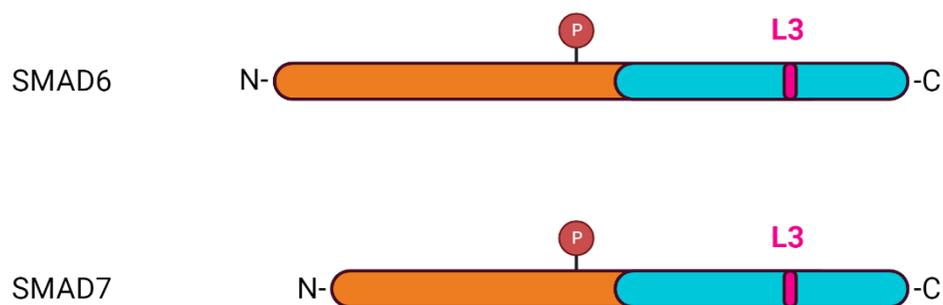


Figure 17 | Structure schématique des protéines SMAD

(A) Les R-SMAD et Co-SMAD sont composés d'un domaine N-terminal et d'un domaine C-terminal invariables nommés respectivement MH1 (**jaune**) et MH2 (**bleu clair**). Ces domaines sont reliés entre eux par un domaine variable, riche en sérines et prolines (**violet**), et dont la phosphorylation (**P**) par diverses kinases module la stabilité et la fonction de la protéine. Le domaine **MH1** contient une structure tige-boucle formée par un feuillet β (β -hp pour β -hairpin) qui permet l'interaction des SMAD avec l'ADN. Dans SMAD2, cette β -hp est interrompue par l'exon 3 (ex 3) empêchant l'interaction avec l'ADN. Le domaine **MH2** contient lui la boucle L3 d'interaction avec le récepteur de type I et le motif C terminal SxS d'activation.

(B) Co-SMAD, avec son seul représentant SMAD4, diffère des R-SMAD par l'absence du motif C terminal SxS.

(C) La séquence des inhibiteurs de SMAD ne contient pas le domaine MH1, remplacé par un long domaine variable (**orange**).

Tous les SMAD possèdent un domaine MH2 contenant une boucle L3.

E. Les SMAD

Le génome des vertébrés code pour 8 protéines SMAD. Sont ainsi distingués :

- 5 **R-SMAD**: SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 et SMAD8
- 1 **Co-SMAD**: SMAD4
- 2 **Inhibiteurs de SMAD (I-SMAD)**: SMAD6 et SMAD7

1. R-SMAD et Co-SMAD

Les R-SMAD sont constitués d'un domaine de fixation à l'ADN en N-terminal et d'un domaine d'activation en C-terminal appelés respectivement **Mad Homology 1 (MH1)** et **Mad Homology 2 (MH2)** (Figure 17 d'après (Derynck & Budi, 2019)).

Dans le domaine MH1 se trouve un motif en tige boucle, formé par un feuillet β , nommé **tige-boucle- β (β -hp β -hairpin)** et qui permet l'interaction des R-SMAD et de Co-SMAD avec l'ADN par reconnaissance de certains motifs (Shi et al., 1998). SMAD2 est une exception parmi les R-SMAD car la formation de la β -hp, entravée par la présence en amont de la séquence péptidique codée par l'exon 3, empêche son interaction directe avec l'ADN (Dennler et al., 1999). Il existe cependant une isoforme minoritaire appelée SMAD2 β , dans laquelle un épissage alternatif retire cet exon et donne naissance à une forme capable de se fixer à l'ADN (Yagi et al., 1999). Le domaine MH1 contient également une séquence d'adressage au noyau, d'une importance capitale pour la signalisation.

Le domaine MH2, en C-terminal de la protéine, contient lui aussi une structure protubérante, **la boucle L3**, qui permet l'interaction avec le récepteur de type I au niveau de sa boucle L45, décrite précédemment (Lo et al., 1998). Cette boucle L3 entre également en jeu dans la formation du trimère R-SMAD/R-SMAD/Co-SMAD après activation des R-SMAD par le récepteur de type I (Chacko et al., 2001). Le domaine MH2 de SMAD2 et SMAD3 interagit aussi avec une protéine importante de la signalisation TGF β , la protéine **SARA** (Tsukazaki et al., 1998) déjà mentionnée précédemment. Cette protéine ancrée à la membrane favorise la présentation de ces deux SMAD à leur récepteur de type I et contrôle leur localisation cellulaire. Après phosphorylation de SMAD2 et/ou SMAD3, la formation du complexe hétérotrimérique avec SMAD4 est favorisée, entraînant leur dissociation de SARA et de leurs récepteurs (Kawabata et al., 1998). Ce n'est que 9 ans plus tard, en 2007, qu'un équivalent de SARA a été découvert pour SMAD1 avec l'**endofine** (W. Shi et al., 2007), qui illustre encore la difficulté de l'étude de la voie BMP. Cette phosphorylation activatrice des R-SMAD, réalisée par le récepteur de type I, a lieu dans le domaine MH2, sur un **motif Sérine-x-Sérine (SxS)** à l'extrémité C-terminale de la protéine (Abdollah et al., 1997; Souchelnytskyi et al., 1997).

Enfin, les domaines MH1 et MH2 sont joints par une région variable (dite « Linker » Figure 17). A l'état de base, cette région favorise la rétention des SMAD dans le cytoplasme et leur adressage au protéasome à la suite d'une polyubiquitinylation. Mais plusieurs sites de phosphorylation, régulés notamment par des enzymes d'autres voies de signalisation (**Cyclin-Dependent Kinases – CDK ; Mitogen-Activated Protein Kinases – MAPK et Glycogen Synthase**

Kinase 3 – GSK3), sont présents dans cette région. Leur phosphorylation permet la fixation de protéines régulant positivement ou négativement la signalisation (Massagué, 2012). Par exemples, CDK8 et CDK9 phosphorylent cette région et favorisent la transcription de gènes cibles jouant alors un rôle agoniste sur la signalisation (Alarcón et al., 2009). Pour SMAD1, il a été démontré que la phosphorylation agoniste par CDK8/9 facilite une seconde phosphorylation par la protéine GSK3, qui cette fois ci a un effet antagoniste favorisant la dégradation de SMAD³⁷ (Fuentealba et al., 2007). C'est l'ubiquitine ligase NEDD4L qui reconnaît la région « linker » phosphorylée et la polyubiquitinyne afin d'induire sa dégradation (Gao et al., 2009).

La protéine SMAD4, seule représentante de la famille Co-SMAD, possède une structure similaire aux R-SMAD à l'exception du motif SxS d'activation absent chez cette dernière (Figure 17.B).

2. Les I-SMAD

Les deux I-SMAD, SMAD6 et SMAD7 possèdent eux aussi un domaine MH2 mais pas de domaine MH1. Toute la partie N-terminale de la protéine est une région variable encline à subir des modifications post-traductionnelles et interagissant avec diverses protéines (Figure 17.C) (Derynck & Budi, 2019). Par leur domaine MH2, SMAD6 et SMAD7 sont capable d'interagir, de façon plus stable que les R-SMAD, avec le récepteur de type I activé et entrent alors en **compétition pour l'accès à ces derniers**, ce qui constitue leur mécanisme principal d'inhibition (Hayashi et al., 1997; Imamura et al., 1997; Nakao et al., 1997). Les I-SMAD sont induits par le TGF β , l'activine et les BMP (Afrakhte et al., 1998; Ishisaki et al., 1998; Miyazono, 2000). Cependant, il existe quelques différences entre ces voies de signalisation. SMAD6 est induit majoritairement par la signalisation BMP via SMAD1 et SMAD5 (Ishida et al., 2000) alors que SMAD7 est préférentiellement induit par la signalisation TGF β via SMAD3 (Nagarajan et al., 1999). En termes d'inhibition, SMAD6 inhibe sélectivement la signalisation BMP alors que SMAD7 antagonise la voie BMP et surtout la voie TGF β (Figure 17.C) (Miyazono, 2000).

Un autre mécanisme antagoniste des I-SMAD a été rapporté par Hata et al. en 1998 sous la forme d'une interaction entre SMAD1 déjà activé et SMAD6, qui bloquent la formation du complexe transcriptionnel SMAD1/SMAD4 (Hata et al., 1998). Aucune interaction de la sorte n'a été démontrée pour SMAD7 et le modèle dominant reste l'inhibition par compétition pour l'accès au récepteur.

Le dernier mécanisme d'inhibition des I-SMAD, déjà évoqué dans la partie « Modifications post-traductionnelles des récepteurs », est le recrutement des E3 ubiquitine ligases SMURF1 et SMURF2 par SMAD7 ou SMURF1 par SMAD6 pour l'ubiquitinylation et la dégradation du récepteur de type I (Ebisawa et al., 2001; Kavsak et al., 2000; Murakami et al., 2003).

Ainsi, par les trois mécanismes décrits dans cette partie, les I-SMAD constituent un élément majeur du rétrocontrôle négatif de la voie BMP/TGF β mais ils sont aussi impliqués dans des phénomènes de régulation négative provenant d'autres voies de signalisation. En effet, SMAD7 est induit par la signalisation InterFeroN- γ / **JANus Kinase 1/ Signal Transducer and Activator of Transcription proteins (IFN γ /JAK1/STAT1)** (Ulloa et al., 1999) et par le LipoPolySaccharide bactérien (**LPS**) ou les cytokines proinflammatoires IL-1 β et TNF- α via la voie **NF- κ B** (Bitzer et al., 2000). Ces mécanismes de régulation transverses permettent d'adapter la réponse cellulaire à un contexte complexe et multifactoriel. D'ailleurs, SMAD6 et SMAD7 ont été découverts en 1997 dans des cellules endothéliales soumises à un stress de cisaillement, soulignant bien le côté multifactoriel de cette signalisation (Topper et al., 1997).

3. Spécificité d'activation des R-SMAD

Sans inhibition par les I-SMAD, les récepteurs de type I de la voie BMP/TGF β peuvent donc induire la phosphorylation des R-SMAD déjà décrite. Je vais ici décrire comment un récepteur de type I reconnaît le R-SMAD à activer pour intégrer le signal et cibler les gènes adéquats.

La spécificité d'expression des gènes, à la suite de l'induction de la voie, est dépendante du recrutement et de l'activation précise des R-SMAD par le récepteur de type I. Ainsi, SMAD1, SMAD5 et SMAD8 sont les effecteurs de la signalisation induite par les ligands de la sous-famille des BMP (Figure 13-Partie gauche). Ils sont activés par les récepteurs de type I : ALK1, ALK2, BMPRIA (ALK3) et BMPRIB (ALK6). SMAD2 et SMAD3 sont eux les médiateurs de la signalisation induite par les ligands de la sous-famille des TGF β et sont activés par les récepteurs ALK4, TGFBR1 (ALK5) et ALK7 (Figure 13-Partie centrale et droite) (Miyazawa et al., 2002).

Cette spécificité d'activation est déterminée principalement par l'interaction de la boucle L45 du domaine kinase du récepteur de type I (Figure 16) avec la boucle L3 du domaine MH2 des R-SMAD (Figure 17) (Chen et al., 1998; Feng & Derynck, 1997). Cependant, le domaine GS du récepteur de type I joue également un rôle dans la reconnaissance du R-SMAD au niveau du domaine MH2 de ce dernier (J.-W. Wu et al., 2001). La sélectivité des récepteurs pour leurs R-SMAD a été déterminée par de très belles expériences de remplacements de la boucle L45 d'un récepteur à l'autre et de la boucle L3 d'un R-SMAD à l'autre. Par exemple, le remplacement de la boucle L45 du récepteur ALK2 par celle du récepteur TGFBR1 entraîne une signalisation de type TGF β et non plus une signalisation de type BMP (Feng & Derynck, 1997). Le même type d'expérience avec la boucle L3 des R-SMAD révèle que le remplacement de la boucle L3 dans SMAD2 par celle de SMAD1 permet sa phosphorylation par BMP. A l'inverse, la boucle L3 de SMAD2 dans SMAD1 permet la phosphorylation de SMAD1 par le TGF β (Lo et al., 1998).

Une fois activé par son récepteur de type I, un dimère de R-SMAD va s'associer au Co-SMAD SMAD4, s'accumuler dans le noyau et activer ou inhiber la transcription de gènes cibles.

4. Le contrôle transcriptionnel

Comme décrit dans la partie « R-SMAD et Co-SMAD », les R-SMAD et SMAD4 interagissent avec certains motifs de l'ADN via leur boucle β hp du domaine MH1, à l'exception de l'isoforme majoritaire de SMAD2 (Figure 17). Les premiers motifs de fixation des SMAD à l'ADN découverts sont spécifiques à chaque SMAD. SMAD3 et SMAD4 reconnaissent le motif 5'-GTCT-3' et son reverse complément 5'-AGAC-3' (Y. Shi et al., 1998; Zawel et al., 1998). C'est seulement en 2011 qu'une séquence d'appariement pour SMAD1 et SMAD5 est trouvée par Chip-seq, le motif riche en GC : 5'-GGCGCC-3' (Morikawa et al., 2011). Ces séquences semblent en partie expliquer la divergence du contrôle transcriptionnel des SMAD. Cependant, de plus en plus d'indices tendent à démontrer que SMAD3 pourrait également interagir avec des séquences riches en GC. En 2017, Martin-Malpartida et al. ont mis en lumière l'existence d'un motif GGCGC ou GGCCG reconnu par tous les R-SMAD ainsi que SMAD4. Ce nouvel élément contredit l'idée de séquences spécifiques à chaque SMAD (Martin-Malpartida et al., 2017).

L'activité transcriptionnelle du complexe SMAD nécessite l'interaction avec des facteurs de transcription et des corégulateurs. Cette interaction permet non-seulement de déterminer la spécificité de fixation au promoteur d'un gène mais aussi de stabiliser le complexe avec l'ADN. Comme présenté précédemment, les R-SMAD peuvent interagir avec d'autres facteurs de transcription via les domaines MH1 et/ou MH2. De plus, l'activité des facteurs de transcription avec lesquels ils interagissent sont, eux même, régulés par d'autres voies de signalisation. Il existe un grand nombre et une grande diversité de facteurs de transcription avec lesquels les SMAD interagissent. Cette complexité explique la variabilité des gènes transcrits, en fonction du type cellulaire et du contexte, en réponse aux ligands BMP et TGF β (Derynck & Budi, 2019).

Deux exemples particulièrement pertinents dans le contexte de l'immunité et de l'inflammation sont la capacité du complexe SMAD3-SMAD4 à interagir avec les complexes transcriptionnels **Activator Protein 1 (AP1)** (c-Jun et c-Fos) (Y. Zhang et al., 1998) et **Activating Transcription Factor 3 (ATF3)** (Y. Kang et al., 2003) tous deux activés en réponse à des cytokines, des stress ou des facteurs de croissance *via* d'autres voies de signalisation et notamment la voie MAPK/Extracellular signal-Regulated Kinases (**ERK**). L'autre exemple, est la capacité de SMAD3 à interagir avec les facteurs de transcription **T Cell Factor (TCF)** et **Lymphoid Enhancer Factor (LEF)** impliqués en aval de la signalisation **Wnt** (contraction de « wingless » et « integration site ») pour agir en synergie sur les gènes cibles de TCF/LEF (Labbé et al., 2000).

Les SMAD sont également capables d'interagir avec des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation cellulaire tel que Sox, GATA et Runx. Le cas de la différenciation des ostéoblastes en est un bel exemple. SMAD3, activé par le TGF β , s'associe à Runx2, lui permettant de recruter une histone désacétylase qui bloque la transcription des gènes du lignage des ostéoblastes induits par Runx2 (J. S. Kang et al., 2005).

Cet exemple permet d'introduire la régulation épigénétique opérée par les SMAD. Certains des coactivateurs ou corépresseurs auxquels les SMAD s'associent sont des enzymes

modificatrices des histones. Ainsi, les SMAD sont par exemple capables de s'associer avec l'acétyltransférase P300 dont l'activité enzymatique est nécessaire à l'activation de la transcription (Ross et al., 2006). Ce recrutement s'élargit à d'autres enzymes telles que des méthyltransférases, qui posent des marques activatrices ou inhibitrices sur les histones. De plus, le recrutement direct ou indirect, *via* des corégulateurs, d'histones désacétylases va encore augmenter les effets possibles des SMAD sur les marques épigénétiques des promoteurs (Derynck & Budi, 2019).

Dans le cas de la régulation transcriptionnelle, SMAD4 joue le rôle de coactivateur. En l'absence de SMAD4, beaucoup de gènes induit par les SMAD ne sont plus exprimés ou encore exprimés mais à des niveaux souvent plus faible (Levy & Hill, 2005).

Les SMAD peuvent également jouer un rôle direct ou indirect sur l'épissage de l'ARN. Le rôle indirect correspond à la régulation de gènes codant pour des régulateurs de l'épissage comme « **Epithelial Splicing Regulatory Factors** » 1 et 2 (ESRP) que le TGF β réprime dans le cadre de la TEM (Horiguchi et al., 2012). Le rôle plus direct est médié par l'interaction entre SMAD3 et une protéine interagissant avec l'ARN qui vont conjointement se fixer sur un exon de l'ARN pré-messager du gène CD44, bloquant l'assemblage du spliceosome. Ceci a pour effet de favoriser l'expression d'une isoforme mésenchymateuse aux dépens de l'isoforme épithéliale de CD44, favorisant donc la TEM (Tripathi et al., 2016).

Dans une même idée, les SMAD peuvent activer/réprimer directement ou indirectement la synthèse de miRNA par leur association à certains facteurs de transcription ou en régulant des gènes eux-mêmes impliqués dans la régulation des miARN (Janakiraman et al., 2018).

La dernière régulation transcriptionnelle opérée par les SMAD, découverte en 2018, est un effet direct sur la dégradation de l'ARN messager par N6-méthylation de l'Adénosine (**m⁶A**) de l'ARN pré-messager en cours de synthèse, via l'interaction de SMAD3 avec un complexe méthyltransférase, dans des cellules pluripotentes humaines³⁸ (Bertero et al., 2018).

Pour conclure, définir clairement les gènes contrôlés par les ligands de la voie BMP/TGF β est d'une grande complexité. Les gènes qui seront régulés, aussi bien positivement que négativement, dépendent du type cellulaire mais aussi de l'état de la cellule à un instant donné. La signalisation transverse joue un rôle important dans la signalisation BMP/TGF β car l'état d'activation de certains facteurs de transcriptions qui s'associent au complexe SMAD est dépendant d'autres voies de signalisations. Dans cette partie, nous avons vu que l'effet des SMAD est très fortement lié aux facteurs de transcription et corégulateurs auxquels ils vont pouvoir s'associer. Sont ainsi distingués **5 effets du complexe SMAD/Facteur de transcription/Corégulateur sur la régulation transcriptionnelle** : la régulation de la transcription, le remodelage épigénétique de la chromatine, la modification de l'épissage des pré-ARN messagers, la régulation des miARN et enfin, la méthylation de l'ARN pré-messager.

³⁸ Je tiens à préciser que la méthylation de l'ARN pré-messager n'induit pas forcément sa dégradation mais peut aussi induire sa stabilisation et augmenter la traduction de cet ARN. En réalité, tout dépend des facteurs qui sont recrutés par ce marquage de l'ARN.

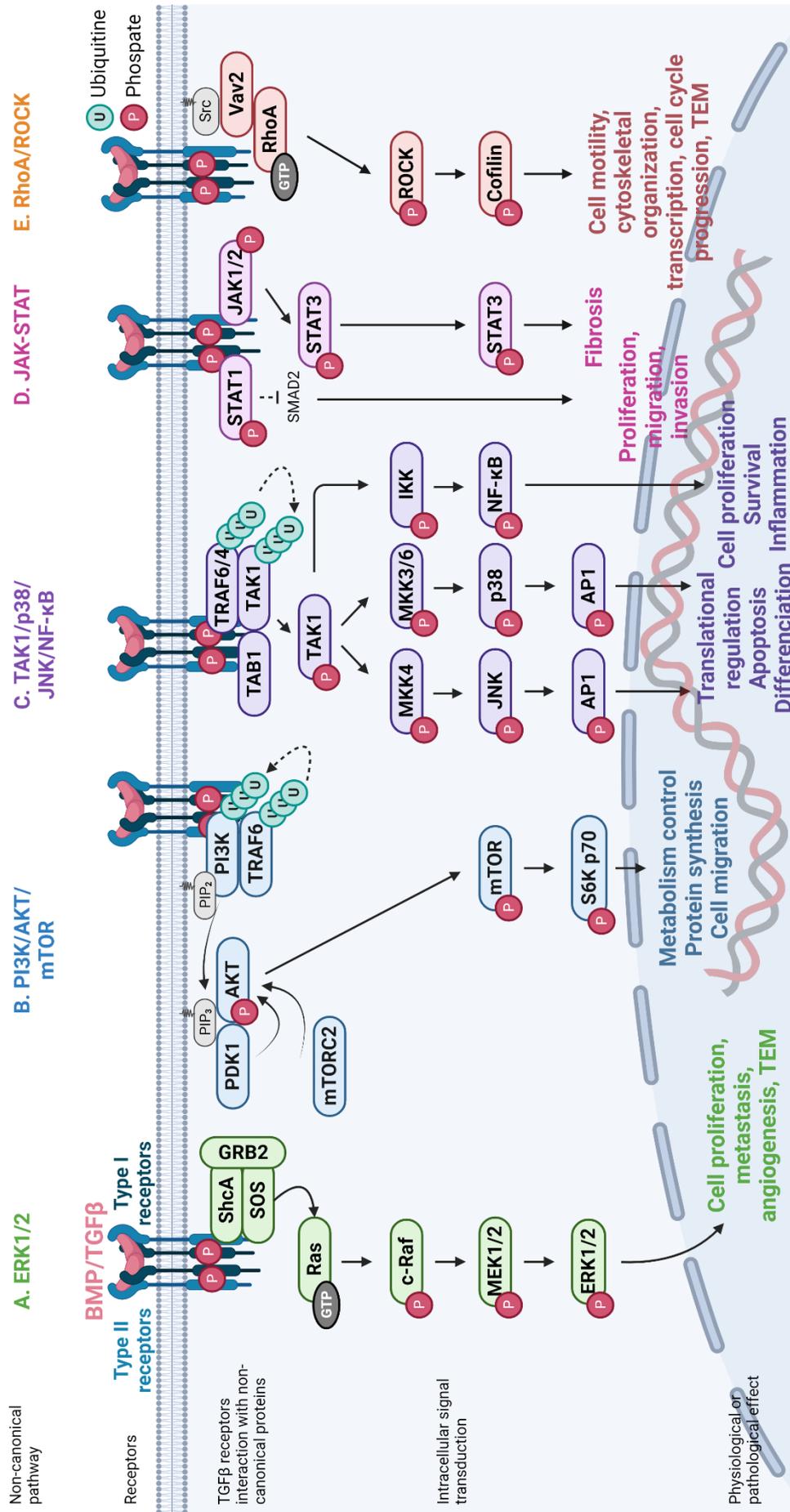


Figure 18 | Les voies non-canoniques de la signalisation BMP/TGFβ

- A. Induction non-canonique de la signalisation ERK1/2. Après fixation du ligand sur les récepteurs, un complexe composé de ShcA/SOS et GRB2 peut s'assembler et induire l'activation de la GTPase Ras. La transduction du signal sera effectuée par phosphorylation successive de c-Raf, MEK1/2 et ERK1/2 avec des effets sur la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et la TEM.*
- B. La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR peut être activée par le TGF β . La fixation du TGF β sur le récepteur TGFBR1 entraîne l'ubiquitinylation de PI3K par TRAF6. PI3K active la protéine **PIP** (« **Prolactin Inducible Protein** ») qui à son tour active l'enzyme **PK1** (**Pyruvate Deshydrogénase Kinase 1**) puis AKT (parfois avec l'aide de mTORC2). La transduction du signal est ensuite assurée par la phosphorylation de mTOR puis p70S6K qui permet le contrôle du métabolisme, de la synthèse de protéines et de la migration cellulaire.*
- C. Après fixation du TGF β sur leurs récepteurs, TRAF4 et TRAF6 peuvent s'auto-ubiquitinyler puis ubiquitinyler TAK1 entraînant sa phosphorylation par TAB1. Les 3 signalisations intracellulaires suivantes sont alors possibles : MKK4/JNK/AP1 ; MKK3/6/p38/AP1 et/ou IKK/Nf- κ B. Les deux premières régulent la traduction, l'apoptose et la différenciation alors que la dernière contrôle la prolifération cellulaire, la survie et **l'inflammation**.*
- D. Non seulement la signalisation canonique du TGF β interagit étroitement avec la signalisation JAK/STAT (interaction STAT3/Smad2/3 décrite dans la partie V.F.4. Axe JAK-STAT) mais en plus, dans certains contextes, le TGF β peut induire différents médiateurs de la voie JAK/STAT. Ainsi, le TGF β peut induire STAT3 via JAK1 ou JAK2 dans un contexte de fibrose. Dans des cas de cancer, le TGF β peut induire STAT1 qui inhibe l'activation de Smad2, favorisant la prolifération, la migration et l'invasion tumorale.*
- E. Enfin le TGF β est capable de modifier l'organisation du cytosquelette, la mobilité cellulaire, la transcription, le cycle cellulaire via l'activation successive de Src/Vav2/RhoA/ROCK/Cofilin.*

F. Les voies non-canoniques

Nous avons déjà exploré la complexité de l'intégration du signal BMP/TGF β du ligand aux gènes régulés, en passant par les récepteurs et les SMAD, ainsi que l'interaction avec d'autres voies de signalisation *via* l'interaction des complexes SMAD avec des facteurs de transcription et des corégulateurs. Mais en réalité, les récepteurs de type I sont capables d'activer d'autres voies de signalisation par phosphorylation ou interaction directe. Cette signalisation ne passant pas par les SMAD est dite « non-canonique » (Figure 18). La signalisation SMAD dite « canonique » commence souvent dans des endosomes en formation recouverts de clathrine, notamment grâce à la forte concentration de la protéine d'ancrage SARA (Di Guglielmo et al., 2003). La signalisation non-canonique est, quant à elle, plutôt initiée soit au niveau de radeaux lipidiques riches en cavéoline, soit sans association identifiée avec un domaine membranaire en particulier. La signalisation ERK et AKT³⁹, par exemple, est initiée au niveau des cavéoles, comme la signalisation initiée par les **Récepteurs Tyrosines Kinases (RTK)** en réponse à des facteurs de croissances (Meyer et al., 2011; Zuo & Chen, 2009). L'amplitude de la signalisation induite par les ligands BMP/TGF β sur les voies non-canoniques est généralement plus faible que lorsqu'elle est induite par les facteurs de croissance usuels. Deux hypothèses sont proposées pour expliquer ce phénomène : d'une part les récepteurs de la voie BMP/TGF β sont beaucoup moins nombreux à la membrane cellulaire que les RTK et, d'autre part, ils sont moins efficaces pour phosphoryler les résidus tyrosines en raison de leur dualité fonctionnelle tyrosine et serine/thréonine kinase (Derynck & Budi, 2019).

L'objectif est ici de décrire les différentes voies non-canoniques induites par la signalisation BMP/TGF β et leurs conséquences sur le devenir cellulaire puis de se concentrer succinctement sur le rôle de ces voies dans la différenciation des lymphocytes T CD4⁺.

1. Axe Ras/Raf/MEK1-2/ERK1-2

La voie de signalisation ERK est une voie de signalisation MAPK classique avec une cascade de phosphorylation enclenchée au niveau du récepteur **RTK** et qui se propage via des MAPKKK, MAPKK et MAPK jusqu'au noyau, où différents gènes seront régulés. La voie ERK contrôle 6 grands processus cellulaires : **la prolifération, la survie, la croissance, le métabolisme, la migration et la différenciation** (Lavoie et al., 2020).

Historiquement, le premier rapporteur de la transduction du signal TGF β décrit est **Ras** en 1992 (pour « **Rat Sarcoma virus** ») (Mulder & Morris, 1992) alors que les R-SMAD ne sont découverts qu'en 1996. Ainsi, le TGF β est capable d'induire la voie ERK via la phosphorylation directe de ShcA par le récepteur de type I sur un résidu sérine et un résidu tyrosine grâce à sa double activité de sérine/thréonine et tyrosine kinase (Lee et al., 2007). La phosphorylation tyrosine de ShcA permet le recrutement des protéines GRB2 et SOS qui, conjointement, initient la signalisation ERK classique comprenant l'activation de Ras, c-Raf, MEK1/2 puis ERK1/2 (Figure 18). Cette activation bien décrite pour le TGF β l'est moins pour les BMP. Il a

³⁹ Il ne s'agit pas d'un acronyme mais d'un nom lié à l'histoire de sa découverte.

cependant été démontré que la signalisation ShcA/ERK2 était impliquée dans la différenciation des ostéoblastes induite par BMP4 (Chang et al., 2009) et que BMP2 induisait également ERK (et P38) dans des ostéoblastes (Lai & Cheng, 2002). La réponse à l'activation d'ERK par le TGF β semblerait être la même qu'une activation classique de la voie (bien que potentiellement moins forte comme discuté en introduction de cette partie) avec des cinétiques d'activation similaires entre 5 et 10 minutes (Yan et al., 1994).

Une étude récente a permis de montrer que ShcA entrait directement en compétition avec R-SMAD pour l'accès au récepteur de type I. Une surexpression de ShcA induit une augmentation de la localisation des récepteurs dans les micro-domaines membranaires riches en cavéoline et augmente la signalisation ERK (ainsi qu'AKT) et réprime la TEM. Au contraire, une répression de ShcA augmente la localisation des récepteurs au niveau des domaines riches en clathrine, augmente la signalisation SMAD et favorise la TEM (Muthusamy et al., 2015). Ainsi, l'expression de ShcA, dans le contexte de la TEM, permet une balance entre les signalisations canonique et non-canonique.

Les voies non-canoniques induites par la signalisation BMP/TGF β sont complémentaires de la signalisation canonique et elles agissent de concert pour induire une réponse physiologique adaptée au contexte. De plus, la voie ERK contrôle l'activation de certains facteurs de transcription qui interagissent directement avec les SMAD pour contrôler l'expression génique (Derynck & Budi, 2019).

Dans un contexte de différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs (CD4⁺CD25⁻) en Treg, il a été démontré que la régulation épigénétique de *Foxp3* opérée par la signalisation TGF β serait médiée par une inactivation de ERK. En effet, l'activation de lymphocytes T naïfs en présence de TGF β induit une inhibition transitoire de la phosphorylation de ERK suivie de l'expression de *Foxp3*. De façon concordante, la présence d'un inhibiteur de ERK lors de l'activation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs induit l'expression de *Foxp3* et les cellules *Foxp3*⁺ résultantes possèdent une activité régulatrice (Luo et al., 2008).

De façon très intéressante, il a été démontré une augmentation de la signalisation ERK dans les cellules CD4⁺ et CD8⁺ naïves et mémoires de patients atteints de PR. Une observation similaire a également été faite dans un des modèles de PR (et de SpA), la souris SKG. Un traitement par des inhibiteurs de MEK1/2 chez ces souris a permis de retarder l'apparition des arthrites ainsi que de diminuer leur sévérité. Les auteurs de cette étude suggèrent qu'une boucle d'amplification de ERK modifie le seuil d'activation du TCR et pourrait contribuer à l'initiation et la progression de la maladie (Pauff & Miller, 2009).

2. Axes TAK1/p38/JNK/NF κ B

La voie BMP/TGF β peut induire d'autres voies de signalisation MAPK et notamment les voies c-Jun N-terminal Kinase (JNK), p38 et Nuclear Factor- κ B (NF- κ B). Toutes ces voies passent par la protéine TAK1 aussi appelée Mitogen Activated Kinase Kinase Kinase 7 (MAP3K7), initialement identifiée comme effectrice de la signalisation P38 induite par le TGF β (Yamaguchi et al., 1995). Mécanistiquement, l'E3 ubiquitine ligase TRAF6 ou Tumor necrosis

factor **Receptor-Associated Factor 4 (TRAF4)** est associée au récepteur TGFBR1 par reconnaissance d'un motif. La protéine TAK1 serait elle aussi associée au récepteur de type I avec TRAF6 ou TRAF4. L'induction par le TGF β renforce l'interaction de TRAF6 ou TRAF4 avec le récepteur et entraîne l'auto-ubiquitinylation de TRAF, qui va ensuite polyubiquitinyler TAK1, et ce, indépendamment de l'activité enzymatique du récepteur. TAK1 va alors se décrocher du complexe et être activée par phosphorylation par **TAK1 Binding protein 1 (TAB-1)**. TAK1 va ensuite phosphoryler les **MAP Kinase Kinase MKK3** et/ou MKK6 qui vont à leur tour activer P38, JNK et NF- κ B (Hamidi et al. 2012; S. Il Kim et al. 2009; Sorrentino et al. 2008; Yamashita et al. 2008; Long Zhang et al. 2013). Comme la voie ERK, le TGF β induit généralement ces voies de façon rapide, en 5 à 10 minutes, et de façon transitoire. Il a également été décrit une activation de la voie TAK1 par BMP2 et BMP4 dans des stades précoces de l'embryogénèse du *Xénope* (Shibuya, 1998).

P38 et JNK sont impliquées dans **la prolifération, le métabolisme, la différenciation, le développement, le cycle cellulaire (apoptose/survie) et l'inflammation**. Il s'agit donc, ici encore, de voies de signalisation très importantes et complexes car impliquées dans de multiples processus, et ce, dans divers types cellulaires (Lavoie et al., 2020). NF- κ B est également impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que **la réponse immunitaire et l'inflammation, la prolifération et le contrôle du cycle cellulaire (apoptose, survie)** (Oeckinghaus & Ghosh, 2009). Ces voies sont induites en réponse aux cytokines IL-1 et TNF α , à la stimulation du TCR et du **B-Cell receptor (BCR)**, à une infection virale ou bactérienne ou encore à des stress mécaniques, radiologiques ou oxydatifs.

Dans le contexte immunitaire, la signalisation P38 est capitale dans la régulation transcriptionnelle et traductionnelle de cytokines pro-inflammatoires. En particulier, l'**InterLeukine-1 β (IL-1 β)**, l'IL-6 et le **Tumor Necrosis Factor α (TNF α)**, toutes régulées entre autres par P38, sont impliquées dans des maladies inflammatoires auto-immunes telles que la maladie de Crohn, le psoriasis, la SpA et l'asthme chronique. Ainsi, des groupes pharmaceutiques ont développé des drogues ciblant P38 et des tests cliniques chez l'Homme ont été menés. Cependant, aucune de ces molécules n'a réellement percé en clinique, notamment à cause d'effets secondaires indésirables (Cuenda & Rousseau, 2007). Dans la PR, P38, JNK mais aussi ERK sont toutes détectées dans le tissu synovial avec une phosphorylation accrue par rapport à un tissu sain (Hammaker, 2003).

Dans les lymphocytes T, la stimulation du TCR active la signalisation NF- κ B qui participe au contrôle de leur activation, leur différenciation et leur prolifération (Lobry & Weil, 2007). Dans ce contexte, NF- κ B possède un rôle paradoxal, à la fois promoteur de l'activation des LT et de leur différenciation en T_{eff} mais aussi nécessaire à la génération de T_{reg} immunosuppresseurs ainsi qu'à la contre sélection thymique des LT auto-réactifs (Liu et al., 2017). De ce fait, chez la souris, la perte de fonction d'un précurseur de NF- κ B entraîne une activation aberrante de NF- κ B et le développement d'une colite due à une sensibilité moindre des lymphocytes T CD4⁺ à l'inhibition par les T_{reg} et à une expansion des Th17 (M. Chang et al., 2009). D'autre part, un mutant perte de fonction d'un activateur de NF- κ B possède moins de

T_{reg} alors qu'un mutant gain de fonction d'un activateur de NF- κ B promeut la différenciation ou la survie des T_{reg} (Shi & Sun, 2015).

Depuis plus de 10 ans, l'axe TAK1 fait l'objet de recherches intensives dans différents domaines de la biologie. Il est une cible potentielle dans les maladies inflammatoires chroniques mais aussi en cancérologie. Une étude de 2006 montre que, chez la souris, la perte d'expression de TAK1 dans les lymphocytes T entraîne le développement d'une colite en raison de l'absence de lymphocytes T_{reg}, avec une accumulation de T_{mem} et T_{act} (S. Sato et al., 2006). Similairement, P38 est nécessaire à la conversion des LT CD4⁺ en lymphocytes T_{reg} CD4⁺ induite par le TGF β *in vitro* (Huber et al., 2008). Dans la sclérose en plaque, P38 a été décrit comme modulant la différenciation et la réponse Th17, en faisant une potentiellement cible thérapeutique (Di Mitri & Battistini, 2015).

3. Axe PI3K/AKT/mTOR/p70S6K

Les ligands de la voie BMP/TGF β sont également capables d'activer rapidement la voie PI3K/AKT/mTOR, notamment dans un contexte de migration cellulaire (Gamell et al., 2008; Zuo & Chen, 2009). La voie PI3K/AKT/mTOR est elle aussi impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que la survie, l'apoptose, la prolifération, le métabolisme, le contrôle de la synthèse protéique et lipidique. Dans un contexte inflammatoire, la production de cytokines, le remodelage tissulaire et la prolifération cellulaire sont des processus nécessitant des régulateurs du métabolisme comme la voie AKT/mTOR (Suto & Karonitsch, 2020).

Une interaction physique constitutive entre TGFBR2 et PI3K a été décrite ainsi qu'une interaction induite par le TGF β entre TGFBR1 et PI3K, conduisant à l'activation de la voie (Yi et al., 2005). De plus, comme pour TAK1, TRAF6 est capable d'ubiquitinyler AKT, induisant son activation par phosphorylation (Yang et al., 2009). En 2017, le mécanisme a été d'avantage décortiqué en démontrant que l'activation de TRAF6 par le TGF β induit la polyubiquitinylation d'une sous-unité régulatrice de PI3K, favorisant la formation d'un complexe TGFBR1/PI3K, suivie de l'activation de ce dernier et de AKT, conduisant à la migration cellulaire de cellules tumorales (Hamidi et al., 2017). Cette étude qui s'intéresse au cancer de la prostate montre bien l'intérêt de l'étude des voies de signalisation non-canoniques de la voie BMP/TGF β dans le cadre des pathologies. Ici, comme pour la signalisation non-canonique de ERK par le TGF β , la voie AKT est induite au niveau de microdomaines membranaires riches en lipides, les cavéoles (Zuo & Chen, 2009).

Encore une fois, peu de choses sont décrites concernant l'induction par les BMP, si ce n'est que BMP2 induit la voie PI3K/AKT, favorisant le remodelage du cytosquelette d'actine et la migration cellulaire (Gamell et al., 2008). La migration cellulaire étant particulièrement impliquée dans un contexte physiologique et pathologique pour contrôler la réparation tissulaire, la régénération, l'angiogenèse mais également dans la formation de métastases, il est pertinent de souligner l'importance de mieux comprendre l'induction de cette voie par les BMP.

Dans un contexte immunitaire, des expériences de gain de fonction ont montré qu'AKT est un répresseur fort de la différenciation T_{reg} induite par le TGFβ (Haxhinasto et al., 2008). De plus un faisceau de preuves montre que l'axe PI3K-AKT-mTORC1 est positivement associé à la différenciation Th17 (Nagai et al., 2013).

4. Axe JAK-STAT

Une autre voie pouvant être induite par les récepteurs BMP/TGFβ est la voie JAK-STAT. En termes de complexité, cette voie de signalisation n'a rien à envier à la voie BMP/TGFβ puisqu'elle ne compte pas moins de 60 ligands (cytokines et facteurs de croissance) pour plus de 40 récepteurs chez les vertébrés. Cependant, en intracellulaire, les acteurs de la voie se limitent à 4 JAK (JAK1 à 3 et **TYrosine Kinase 2 (TYK2)**) et 7 STAT (STAT1 à 6, dont deux variants pour STAT5, STAT5a et STAT5b). Succinctement, la fixation du ligand sur son récepteur entraîne son homo- ou hétéro- dimérisation avec un autre récepteur de la voie. La particularité de cette voie est que les récepteurs ne possèdent pas de domaine à activité tyrosine kinase, nécessitant l'intervention d'intermédiaires, les kinases JAK. À la suite de la dimérisation des récepteurs, les JAK se transphosphorylent et phosphorylent le récepteur. Le récepteur pourra alors recruter la protéine STAT, qui va être phosphorylée par JAK puis libérée dans le cytoplasme et s'associer en homo- ou hétéro- dimères pour finalement aller réguler l'expression de gènes spécifiques dans le noyau en interagissant avec d'autres facteurs de transcription. La voie JAK-STAT est elle aussi impliquée dans de nombreux processus biologiques tels que l'homéostasie cellulaire, le maintien des cellules souches intestinales, le développement, l'immunité, la migration cellulaire (Hu et al., 2021; Mallart, 2022).

Ici encore, des cas dans lesquels le TGFβ est capable d'induire cette voie de signalisation ont été décrits. Dans un contexte de fibrose hépatique, il a été rapporté une interaction constitutive de JAK1 avec le récepteur ALK5, avec une activation rapide de STAT3 par JAK1 à la suite de l'induction par le TGFβ. Cette primo-activation de STAT3 par le TGFβ est suivie d'une activation secondaire plus forte de STAT3, dépendante cette fois-ci de SMAD. De façon intéressante, cette activation de STAT3 par le TGFβ a été observée dans des cellules stellaires hépatiques (HSC) et dans des fibroblastes mais pas dans des hépatocytes classiques, montrant le caractère contexte spécifique du phénomène (Liu et al., 2013; Tang et al., 2017). Le TGFβ peut également induire la phosphorylation de JAK2, qui va à son tour activer STAT3 dans des fibroblastes de patients atteints de sclérodémie systémique (Dees et al., 2012).

Dans un autre contexte, celui du cancer ovarien, l'induction de cellules cancéreuses ovariennes épithéliales par le TGFβ entraîne l'interaction de STAT1 avec les récepteurs ALK1/ALK5 et TGFBRII et sa conséquente phosphorylation (celle de STAT1). Dans ce cas particulier, non seulement le TGFβ induit une phosphorylation non-canonique mais cette dernière réduit la phosphorylation de SMAD2. Ainsi, une surexpression de STAT1 entraîne la prolifération, la migration et l'invasion des cellules tumorales ovariennes alors qu'au contraire, son inhibition entraîne une augmentation de la phosphorylation de SMAD2 par le TGFβ, supprimant la prolifération, la migration et l'invasion (Tian et al., 2018).

5. Axe Rho-like GTPases

Les voies des enzymes Rho-like Guanosine Triphosphate (GTP) hydrolases (GTPases), constituées de **RhoA**, **RAC1** et **Cdc42** (respectivement : « Ras homolog family member A » ; « RAs-related C3 botulinum toxin substrate 1 » ; « Cell Division Control protein 42 homolog ») sont primordiales dans la dynamique et la mobilité cellulaire, l'organisation du cytosquelette, la transcription et la progression du cycle cellulaire (Jaffe & Hall, 2005; Sander & Collard, 1999). Le TGF β est capable d'activer RhoA de façon rapide et transitoire puisque l'activation apparaît à 5 minutes et s'atténue dès 15 minutes dans des cellules épithéliales et des kératinocytes primaires (Bhowmick et al., 2001; Edlund et al., 2002). Cependant, pendant la dissolution des jonctions serrées épithéliales induites par le TGF β au cours de la TEM, ce dernier est, au contraire, capable d'induire la dégradation de RhoA par activation de Par6/Smurf1 alors même que RhoA est nécessaire à la TEM (Ozdamar et al., 2005). RhoA est donc très probablement régulée différemment en fonction de sa localisation subcellulaire et du contexte physiologique de la cellule (Derynck & Budi, 2019).

Les BMP sont quant à elles capables d'activer presque instantanément RhoA et **RhOA** assoCiated Kinase (**ROCK**) dans les cellules épithéliales du colon, favorisant la migration cellulaire et l'invasion dans un contexte de cancer colorectal avec perte d'expression de SMAD4 (Voorneveld et al., 2014). En 2019, toujours dans le modèle du cancer colorectal, il a été montré que le TGF β pouvait activer la voie RhoA-cofiline-1, modifiant la répartition des formes totales et phosphorylées de la cofiline-1⁴⁰, favorisant la polymérisation de l'actine et la TEM (Sousa-Squiavinato et al., 2019).

Dans des lignées de fibroblastes, TGF β 1 et BMP7 sont tous deux capables d'activer la voie Rho-like GTPase (RhoA et RhoB)/ROCK/Cofiline induisant également une réorganisation du cytosquelette d'actine, bien que, de façon très intéressante, les voies induites ne soient pas complètement identiques, pouvant indiquer des fonctions distinctes des deux ligands (Konstantinidis et al., 2011; Vardouli et al., 2005).

En termes de mécanistique, Papadimitriou et al. ont montré en 2011 que l'activation rapide de RhoA induite par le TGF β est médiée par la protéine de la famille « non-récepteur tyrosine kinase » : Src⁴¹ qui active Vav2 puis RhoA (Papadimitriou et al., 2011).

Il est intéressant de souligner que les voies Rho-like GTPases sont capables d'activer les voies P38 et JNK par interaction directe mais qu'il n'existe à l'heure actuelle aucune preuve que l'induction des voies Rho par les BMP et le TGF β permette cette activation (Aashaq et al., 2022).

Enfin, le TGF β est capable d'induire les GTPases Cdc42/Rac1 (Wilkes et al., 2003) qui ici aussi favorise la dissolution des jonctions serrées et la TEM (Barrios-Rodiles et al., 2005).

⁴⁰ Pour information, la cofiline est une protéine cytosolique liée à l'actine et qui favorise sa polymérisation. Sa forme phosphorylé n'en est plus capable et favorise la dépolymérisation de l'actine.

⁴¹ Prononcé « sarc » pour sarcome

Dans un contexte immunitaire, l'importance des voies GTPases, et particulièrement RhoA, a largement été démontrée. En effet, elles sont impliquées aussi bien dans l'immunité innée qu'adaptative, et ce, à tous les niveaux. Elles sont retrouvées dans la formation des synapses immunologiques DC/LT, dans la migration de toutes les cellules immunitaires, dans leur recrutement au site inflammatoire ou encore, dans la sélection thymique des LT (Bros et al., 2019).

Pour conclure, la voie BMP/TGF β est une voie impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que la différenciation, la survie, l'apoptose, la prolifération mais aussi l'autophagie. Bien que très linéaire en apparence, une arborescence incroyablement complexe se dévoile lorsqu'on approfondit son étude. Cette voie de signalisation forme un grand réseau avec de nombreuses autres voies. Non seulement elle est elle-même capable d'induire directement certaines voies de signalisation (ERK1/2 ; TAK1/P38, JNK, NF- κ B ; PI3K/AKT/mTOR ; JAK/STAT ; Rho-like GTPase) mais elle est également capable d'interagir physiquement avec des acteurs d'autres voies de signalisation comme l'illustre l'interaction de SMAD2 et SMAD3 avec STAT3. Notamment, SMAD3 et STAT3 coopèrent parfois alors qu'ils s'antagonisent l'un l'autre dans d'autres cas (Itoh et al., 2018). Il est ainsi très difficile de prédire l'issue d'une induction tant elle est dépendante du type cellulaire, de l'état physiologique de la cellule ainsi que de l'environnement cellulaire.

Cependant, malgré le travail immense encore nécessaire, la compréhension de cette voie progresse énormément. L'intérêt de ces recherches est aisément compréhensible étant donné l'implication de la voie dans de nombreuses pathologies telles que les cancers (ovarien, de la prostate, du sein ou colorectal) et la fibrose (reins, foie, poumons, cœur).

La SpA est une maladie complexe dont la physiopathologie exacte est encore inconnue et pour laquelle aucun traitement curatif n'existe à ce jour. Cependant, la forte association de la maladie avec l'allèle HLA-B27 du CMH-I a permis le développement du modèle du rat B27 qui développe spontanément des symptômes proches de la pathologie humaine. Le rat B27 a permis de mettre en évidence l'implication des cellules myéloïdes et des LT CD4⁺ dans la physiopathologie de la SpA. En particulier, une expansion des Th17 pro-inflammatoires et une altération de la balance IL-10/IL-17 dans les Treg sont constatées. L'utilisation récente de la drosophile révèle une perturbation de la voie BMP/TGF β également constatée dans des LT de patients SpA. C'est dans ce cadre que s'inscrivent mes travaux de thèse.

Problématiques et objectifs

Ma thèse s'inscrit donc dans la continuité du travail de Benjamin Grandon qui a décrit une perturbation de la voie BMP/TGF β dans le développement de l'aile et de l'œil chez la drosophile transgénique pour HLA-B27 et la h β 2m. Dans un contexte sauvage, lors de la formation des ailes, un gradient de phosphorylation de Mad est observé (p-Mad). La formation de ce gradient est notamment permise par l'antagonisme des homodimères de Sax sur l'activation de Mad. L'interaction d'HLA-B27 avec le récepteur Sax pourrait supprimer son effet antagoniste, augmentant ainsi le gradient de p-Mad, conduisant au phénotype observé de perte des veines transversales (Figure 19 extraite de (Grandon et al., 2019)).

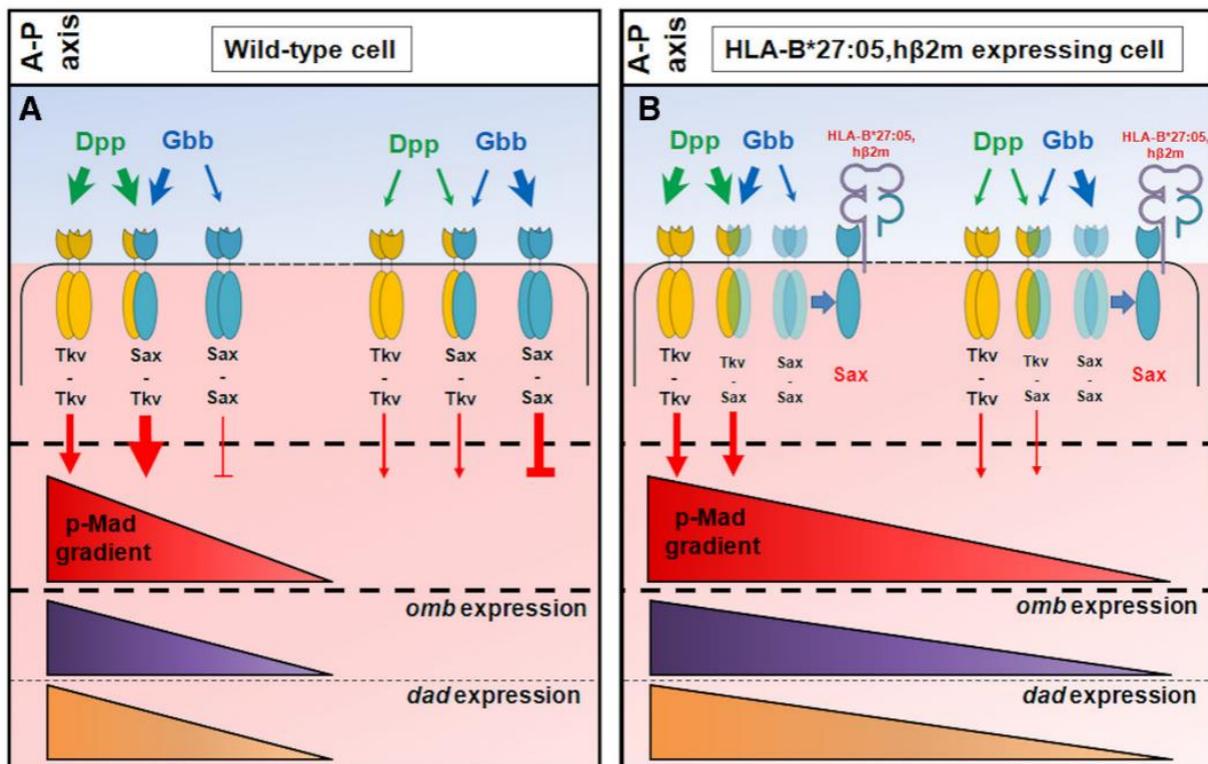


Figure 19| Modèle proposé de l'interaction d'HLA-B27/h β 2m et de la voie BMP chez la *D. melanogaster*

Benjamin Grandon a également démontré que l'interaction entre HLA-B27 et ALK2 (orthologue de Sax) existait dans des lignées cellulaires de patients et qu'elle était spécifique d'HLA-B27 puisqu'absente chez les témoins HLA-B7. Pour finir, il a observé une phosphorylation de Smad2/3 plus forte dans les lymphocytes sanguins de patients atteints de SpA que dans ceux de témoins sains avec une réponse exacerbée à l'activine et au TGF β chez les patients (Figure 20 extraite de (Grandon et al., 2019)).

Par ailleurs, notre équipe a montré que les Treg des rats B27 produisaient moins d'IL-10 et plus d'IL-17 que ceux de rats témoins (Araujo et al., 2014) et qu'il existait une expansion des Th17 dans les ganglions poplités et mésentériques des rats B27 (Glatigny et al., 2012). Etant donné le rôle central du TGF β dans la maturation des thymocytes et dans la différenciation des Treg et des Th17 e, l'étude de cette voie de signalisation dans le contexte de la SpA présente un intérêt certain. D'autant plus que cette voie est impliquée dans les différents processus au cœur de la physiopathologie de la SpA, à savoir l'inflammation, la réponse

immunitaire, l'homéostasie intestinale et la formation osseuse et que sa perturbation pourrait donc expliquer les différentes atteintes observées chez les patients atteints de SpA.

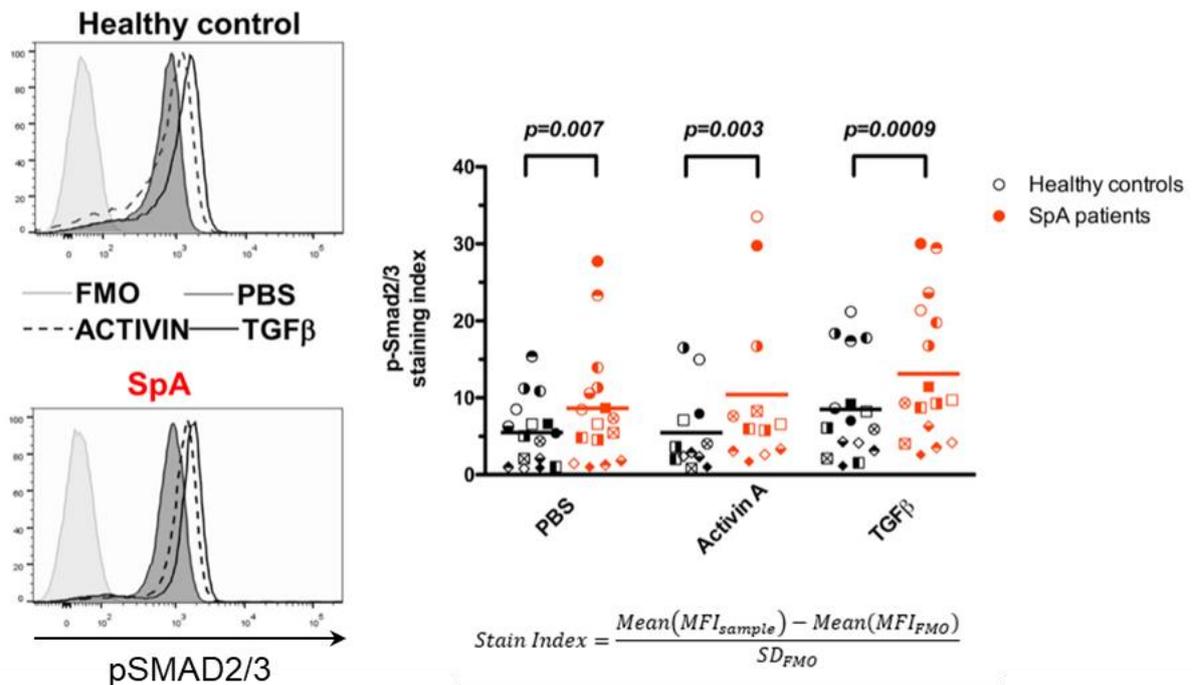


Figure 20 | p-SMAD2/3 est augmenté dans les cellules immunitaires de patients SpA HLA-B27+ en réponse à l'activine et au TGFβ

Ma thèse avait plusieurs objectifs :

- Identifier le peptidome associé au HLA-B27 chez la drosophile et le comparer à celui de l'Homme et du rat.
- Etudier la réponse des LT CD4⁺ de rats B27 aux ligands de la voie BMP/TGFβ, potentiellement en lien avec l'expansion Th17 ou l'altération des Treg.

Ces études vont permettre la publication prochaine d'un article dans lequel je serai premier auteur et qui est présenté dans la section suivante : Résultats.

Par ailleurs, pendant ma thèse j'ai pu prendre part à d'autres travaux de l'équipe ayant donné lieu à deux articles et une revue publiés présentés en Annexe I, Annexe II et Annexe III dans lesquels je figure parmi les auteurs.

L'article en **Annexe I : « Interleukin 27 is a novel cytokine with anti-inflammatory effects against spondyloarthritis through the suppression of Th17 responses »** démontre l'effet anti-inflammatoire de l'IL-27 dans un contexte de SpA chez le rat B27. *In vitro*, l'addition d'IL-27 lors de la différenciation Treg et Th17 à partir de lymphocytes Tn de rats B27 réduit l'excès de cellules IL-17⁺ et la quantité d'IL-17 produite tout en augmentant la production d'IL-10. Chez les patients atteints de SpA, la culture de LT CD4⁺ isolés à partir du sang périphérique en présence d'IL-27 a également permis de réduire le pourcentage et la production d'IL-17 mais n'a pas eu d'effet sur l'IL-10. *In vivo*, l'administration d'IL-27 a permis de réduire la

sévérité de la SpA du rat. L'ensemble des résultats de cette étude offre la perspective d'un nouveau traitement pour la SpA dans le futur.

L'article en **Annexe II : «STAT1 deficiency underlies a proinflammatory imprint of naive CD4⁺ T cells in spondyloarthritis»** démontre par des approches épigénétique et transcriptomique la prédisposition qu'ont les Tn de rats B27 à devenir Th17. Dans cet article, l'équipe a montré que les Tn de rat B27 surexprimaient des gènes liés à la différenciation Th17 (*Il1r1, Il6st, Jak3, Rora, Socs3, Stat3...*) alors qu'ils sous-expriment des gènes liés à la voie IFN/Th1 (*Ifi27, Cxcr3, Tbx21, Usp18...*). Ces résultats transcriptomique ont été renforcés par l'étude épigénétique des marques d'histone activatrice H3K4Me3 et H3K27Ac. Ces marques sont enrichies au niveau de gènes liés à la différenciation Th17 (*Il6st, Runx1, Smad7...*) dans les Tn de rats B27 alors qu'elles sont réduites au niveau de gènes liés à la voie IFN/Th1 (*Ifi27, Irf1...*). Ces travaux se concluent par l'étude de l'expression de *Stat1* dans les thymocytes SP CD4⁺, révélant une diminution d'expression de *Stat1* chez les rats B27. Cet article met en lumière que la prédisposition des Tn de rats B27 à se différencier en Th17 est vraisemblablement secondaire à une inhibition de la voie Th1 et notamment des facteurs transcriptionnels majeurs de la voie tels que Stat1 et T-bet.

La revue en **Annexe III : «Lessons on SpA pathogenesis from animal models»**, écrite par le professeur Maxime Breban, permet de faire le point sur les apports des différents animaux modèles de la SpA dans notre compréhension du mécanisme physiopathologique de la maladie ainsi que dans l'exploration de nouvelles cibles thérapeutiques.

Enfin, j'ai largement participé à une étude de séquençage ARN sur des Tn CD4⁺ de patients SpA. Cette étude a consisté à isoler les Tn CD4⁺ du sang de 20 patients SpA HLA-B27⁺ et 20 témoins sains HLA-B27⁻ puis à stimuler ou non le TCR (billes α -CD3/ α -CD28) de ces lymphocytes pendant 6 heures. Nous avons alors collecté ces lymphocytes et en avons extrait l'ARN. L'ARN a été envoyé à la plateforme de génomique de l'Institut Cochin afin de le séquencer. Dans cette étude, j'ai réalisé la majorité des isolations de Tn à partir du sang, des stimulations et des extractions d'ARN. Les résultats sont en cours d'analyse par d'autres membres de notre équipe et permettront certainement une publication dans laquelle je figurerai parmi les auteurs.

Résultats (Article 1)

HLA-B27 interferences with TGF- β /activin signaling in *Drosophila* and rat transgenic models, resulting in pathogenic consequences relevant for spondyloarthritis.

TGF β signaling pathway is altered by HLA-B27 expression, resulting in pathogenic consequences relevant for spondyloarthritis.

Marc Lauraine^{1,2}, Maxence de Taffin de Tilques³, Dganit Melamed-Kadosh⁴, Bilade Cherqaoui^{1,2,5}, , Vincent Rincheval³, Erwan Prevost³, Aurore Rincheval-Arnold³, Eneida Cela^{1,2,6}, Arie Admon⁴, Isabelle Guéna³, Luiza Araujo^{1,2}, Maxime Breban^{1,2,7*}

*Correspondence : maxime.breban@aphp.fr

¹Infection & Inflammation, UMR 1173, Inserm, UVSQ/Université Paris Saclay, 2 avenue de la Source de la Bièvre, 78180 Montigny-le-Bretonneux, France

²Laboratoire d'Excellence Inflammex, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

³ Université Paris-Saclay, UVSQ, LGBC, 78000, Versailles, France

⁴Department of Biology, Technion-Israel Institute of Technology, Haifa 32000, Israel

⁵ Service de pédiatre, Hôpital Ambroise Paré, AP-HP, Boulogne-Billancourt, France

⁶Rheumatology, allergology and clinical immunology, University of Rome "Tor Vergata", ROME, Italy

⁷Service de rhumatologie, Hôpital Ambroise Paré, AP-HP, 9 avenue Charles de Gaulle, 92100, Boulogne, France

Abstract

Background Association of HLA-B27 with spondyloarthritis (SpA) has been known for 50 years, but still remains unexplained. We recently showed that HLA-B27 expressed in wing imaginal disc from HLA-B27/human- β 2 microglobulin (h β 2m) transgenic *Drosophila* deregulated bone morphogenetic protein (BMP) pathway by interacting physically with type I BMP receptor (BMPRI) Saxophone (Sax), leading to crossveinless phenotype.

Methods Genetic interaction was studied between activin/transforming growth factor β (TGF β) pathway and HLA-B27/h β 2m in transgenic *Drosophila* wings. The HLA-B27-bound peptidome was characterized in wing imaginal discs. In mesenteric lymph node (mLN) T cells from HLA-B27/h β 2m

rat (B27 rat), physical interaction between HLA-B27 and activin receptor-like kinase-2 (ALK2), ALK3 and ALK5 BMPRI1s, phosphorylation of small mothers against decapentaplegic (SMADs) and proteins of the non-canonical BMP/TGF β pathways induced by its ligands, and the transcript level of target genes of the TGF β pathway, were evaluated.

Results In HLA-B27/h β 2m transgenic *Drosophila*, inappropriate signalling through the activin/TGF β pathway, involving Baboon (Babo), the type I activin/TGF β receptor, contributed to the crossveinless phenotype, in addition to deregulated BMP pathway. We identified peptides bound to HLA-B27 with the canonical binding motif in HLA-B27/h β 2m transgenic *Drosophila* wing imaginal disc. We demonstrated specific physical interaction, between HLA-B27/h β 2m and mammalian orthologs of Sax and Babo, i.e. ALK2 and ALK5 (i.e. TGF β receptor I), in the mLN cells from B27 rat. The magnitude of phosphorylation of SMAD2/3 in response to TGF β 1 was increased in T cells from B27 rats, showing evidence for deregulated TGF β pathway. Accordingly, expression of several target genes of the pathway was increased in T cells from B27 rats, in basal conditions and/or after TGF β exposure, including *Foxp3*, *Rorc*, *Runx1* and *Maf*. Interestingly, *Tgfb1* expression was reduced in naïve T cells from B27 rats, even premonitory, an observation consistent with a pro-inflammatory pattern.

Conclusions This study shows that HLA-B27 alters the TGF β pathways in *Drosophila* and B27 rat. Given the importance of this pathway in CD4⁺ T cells differentiation and regulation, its disturbance could contribute to the abnormal expansion of pro-inflammatory T helper 17 cells and altered regulatory T cell phenotype observed in B27 rats.

Keywords Spondyloarthritis; BMP/TGF β pathway; HLA-B27; CD4⁺ T cells; peptidome; rat; *Drosophila*

Introduction

Spondyloarthritis (Spa) is a chronic inflammatory rheumatism that can affect axial and/or peripheral skeleton. It typically combines sacroiliitis with spondylitis, which can progress into bone fusion. It may also comprise peripheral arthritis and enthesitis, dactylitis, and extra-articular features, including uveitis, psoriasis, and inflammatory bowel disease (IBD). The HLA-B27 allele of the major Class-I

histocompatibility complex (MHC-I) is the genetic factor most strongly associated with SpA, being present in 70% to 90% of the patients (1).

This striking association was first described 50 years ago but its underlying mechanisms remain incompletely understood (2). Several lines of rats transgenic for HLA-B27 and human β 2-microglobulin (h β 2m) (B27 rat) were developed to investigate the implication of HLA-B27 in the pathogenesis of SpA. The B27 rats develop spontaneously multisystem inflammatory disorder that resembles human SpA by combining arthritis with IBD and psoriasis and is specific for HLA-B27 as HLA-B7/h β 2m transgenic rats remain healthy. Among other advances, this model highlighted the critical role of myeloid derived cells expressing HLA-B27 and CD4+ T cells in disease development (3). In particular, an uncontrolled expansion of pro-inflammatory T helper 17 (Th17) cells and an altered regulatory T cell (Treg) phenotype, depending on deregulated antigen-presenting cells function were evidenced in this model (4–6). In contrast, CD8+ T cells appeared dispensable, arguing against the "arthritogenic" peptide hypothesis, which implicated the canonical antigen-presentation function of the MHC-I molecule.

Recently, we produced a transgenic *Drosophila* expressing HLA-B27 to identify HLA-B27 non-canonical properties that could explain its pathogenicity (3). In this new model, we reported the unexpected interference of HLA-B27 with the bone morphogenetic proteins (BMP)/transforming growth factor beta (TGF β) pathway. Indeed, when HLA-B27 (but not HLA-B7) was expressed in combination with h β 2m in the *Drosophila* wing imaginal discs, it was shown to physically interact as well-folded conformer (recognized by w6/32 antibody (Ab)) with the type I BMP receptor (BMPRI) Saxophone (Sax) and to antagonize its inhibitory function thereby enhancing BMP signaling and leading to a loss of crossveins. Likewise, physical interaction was specifically observed between well-folded conformers of HLA-B27 (recognized by ME1 and w6/32 Abs) and activin receptor-like kinase-2 (ALK2, the Sax mammalian ortholog) in B-lymphoblastoid cell lines (B-LCL) from SpA patients. Moreover, stimulation of T cells from HLA-B27+ SpA patients with both TGF β and activin-A led to an exacerbated response (7).

The BMP/TGF β pathway is one of the most pleiotropic signaling pathways. It is involved in embryonic development as well as in adult organisms in various phenomena such as homeostasis, cell

migration, and cell proliferation. It is notably implicated in ossification and immune response, two complementary facets of SpA pathology (8). TGF β 1 exerts major effects on the differentiation of naïve CD4⁺ T cell (T_n), by promoting their differentiation into Treg and Th17 cells (9–11). The right balance between these two subsets of CD4⁺ T cells appears critical to prevent several autoimmune/inflammatory diseases including SpA (12). Given the excessive Th17 expansion and altered Treg phenotype that were observed in B27 rats and the critical role of activin/TGF β signaling in Treg/Th17 differentiation (4,5), here, we investigated whether activin/TGF β pathway was altered in HLA-B27 transgenic *Drosophila* and in CD4⁺ T cells from B27 rats.

Materials and methods

Drosophila crossing and wings preparation.

Fly strains were grown in standard corn/agar medium. Crosses were performed at 25°C. The different fly stocks employed in this study are listed in Supplementary Table 1. Wings were dissected and placed in a glycerol/ethanol drop on a glass slide and imaged at 4X magnification using an Olympus SZX16 stereomicroscope and an Olympus Infinity3 camera. Veins length and wing area were measured with FIJI pixel length and area functions (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

Drosophila wing imaginal discs collection.

Drosophila wing imaginal discs were collected as described in (13). Briefly, this protocol enables the recovery of many wing imaginal discs by grinding a large quantity of *Drosophila* larvae followed by organs separation using filtration and a density gradient. To ensure sufficient HLA-B27 recovery after affinity purification for high-quality bound-peptides analysis, we determined that approximately 2x10⁸ cells expressing HLA-B27 were necessary. As imaginal wing disc contains 50,000 cells and 60% of imaginal wing disc cells express HLA-B27 (7), 7,000 nub>HLA-B27 and 4,000 wild-type *Drosophila* wing imaginal discs were collected. Collected wing imaginal discs were frozen at -80°C and sent to the Technion-Israel Institute of Technology for HLA-B27-bound peptidome identification.

Affinity purification of the HLA molecules and analysis of the bound peptides.

Total proteins were extracted from wing imaginal discs and the HLA molecules were immunoaffinity-purified using the w6/32 mAb, which recognizes HLA-A, B, and C well-folded heavy chain- covalently

linked to AminoLink-agarose resin (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) as described previously (14). The HLA molecules with their bound peptides were eluted from the beads with 1% trifluoroacetic acid (TFA), which also induces dissociation of the HLA- β 2m peptide complexes. The released peptides were separated from the HLA heavy subunit, the β 2m, and from other bound proteins using disposable reversed-phase MicroTip C18 columns (Harvard Apparatus, Holliston, MA) and eluted with 30% acetonitrile and 0.1% TFA, as described previously (15) while the HLA heavy chain, β 2m, and other bound proteins were recovered with 30% acetonitrile and 0.1% TFA. The peptides were partially resolved by a capillary high-performance liquid chromatography (HPLC) on pulled capillaries of 0.075-mm inner diameter and about 20 cm long (16) packed with C18 reversed-phase 3.5- μ m beads (Reprosil-C18-Aqua, Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen, Germany). Chromatography was performed with the UltiMate 3000 RSLC nano-capillary UHPLC system (Thermo Fisher Scientific), which was coupled by electrospray to tandem mass spectrometry (MS) on Q-Exactive-Plus (Thermo Fisher Scientific), using the same parameters as in Bourdetsky et al., 2014). The HLA peptides were eluted with a linear gradient over 2 hours from 5 to 28% acetonitrile with 0.1% formic acid at a flow rate of 0.15 μ l/min. Data were acquired using a data-dependent ‘top 10’ method, fragmenting the peptides by higher energy collisional dissociation (HCD). The full scan MS spectra were acquired at a resolution of 70,000 at 200 m/z with a target value of 3×10^6 ions. Ions were accumulated to AGC target value of 10^5 with a maximum injection time of 100 millisecond. No fragmentation was performed for peptides with unassigned precursor ion charge states or charge states of four and above. The peptide match option was set to Preferred. Normalized collision energy was set to 25%, and MS/MS resolution was set to 17,500 at 200 m/z. Fragmented masses were dynamically excluded from further selection for fragmentation for 20 s.

The protein fraction eluted from the affinity column was eluted from the same reversed-phase column with 80% acetonitrile. The eluted protein fractions were dried by vacuum centrifugation, dissolved 8 M urea (Sigma-Aldrich), 400 mM ammonium bicarbonate (Sigma-Aldrich) and 10 mM dithiothreitol (Sigma-Aldrich). Half of the sample was reduced at 60°C for 30 min. Carbamidomethylation was performed in the dark for 30 min by 40 mM iodoacetamide (IAA, Sigma-Aldrich). Next, three volumes of HPLC water were added, followed by 0.2 μ g trypsin (Promega,

Madison, Wisconsin, USA) and an overnight incubation at 37°C. Another aliquot of 0.2 µg trypsin was added and incubated for 3 hours at 37°C. The digested samples were acidified to a final concentration of 0.1% TFA and desalted on C18 StageTips prior to MS analysis. The tryptic peptides from the 80% acetonitrile fraction described above were analyzed in liquid chromatography (LC)-MS/MS using Q Exactive HF mass spectrometer (Thermo) fitted with a capillary HPLC easy nLC 1200 (Thermo-Fisher Scientific). The peptides were loaded in solvent A (0.1% formic acid in water) on a homemade capillary column (30 cm, 75-micron ID) packed with Reprosil C18-Aqua (Dr. Maisch GmbH, Germany). The peptides mixture was resolved with a 5 to 28% linear gradient of solvent B (80% acetonitrile with 0.1% formic acid) for 120 minutes followed by a gradient of 15 minutes of 28 to 95% and 15 minutes at 95% acetonitrile with 0.1% formic acid in water at flow rates of 0.15 µl/min. Mass spectrometry was performed in a positive mode (m/z 300–1800, resolution 60,000 for MS1 and 15,000 for MS2) using repetitively full MS scan followed by HCD fragmentation at 27 normalized collision energy of the 10 most dominant ions with two and above charges selected from the first MS scan. The AGC settings were 3×10^6 for the full MS and 1×10^5 for the MS/MS scans. The intensity threshold for triggering MS/MS analysis was 1×10^4 . A dynamic exclusion list was enabled with an exclusion duration of 20 seconds.

Peptidome data analysis.

Peptides were identified and quantified using the MaxQuant software tool (18) version 1.6.17.0 with the Andromeda (19) search engine using the *Drosophila melanogaster* section of the UniProt/Swiss-Prot database (release Jan 29, 2021, containing 22,114 entries, 13,821 genes). HLA peptides were identified in the database assuming no specific enzyme proteolysis. Methionine oxidation and N-acetylation were accepted as variable modifications. The peptide precursors and fragment mass tolerances were set at 6 and 20 ppm, respectively. The minimal peptide length was set to eight amino acid residues. The false discovery rate (FDR) was set, separately, for 0.05 for HLA peptides. The ‘match between runs’ subroutine was used in the analysis. MaxQuant quantifies the relative signal intensities of the peptides using their LC-MS peak volumes. Graphical and statistical analyses of the results were performed with Perseus (20). Assignment of HLA scores to the different identified peptides was done by NetMHC, which ranks the peptides according to their fitness to one of the HLA allomorphs, with peptides ranking

below 2% relative to 400,000 different peptides in the NetMHC database considered as intermediate affinity ligands of the particular HLA (21,22).

The raw MS files of the trypsin-digested protein (80% acetonitrile) fractions were also analyzed by MaxQuant version 1.6.3.4 and searched with the Andromeda search engine using the HLA-B27 and human $\beta 2m$ sequences added to the Drosophila melanogaster section of the UniProt/Swiss-Prot database. The search settings were trypsin-specific, with FDR set to 0.01 and decoy mode Revert. Methionine oxidation and N-acetylation were accepted as variable modifications, while carbamidomethylation of cysteines was accepted as a fixed modification. Intensity-based absolute quantification (iBAQ) was used to quantify the levels of purified HLA-peptide complexes.

The MS peptidomics and proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium (23) (<http://proteomecentral.proteomexchange.org>) via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD047119.

Rats.

The SpA-prone B27 rats of the 33-3 line bearing 55 copies of HLA-B*2705 and 28 copies of h $\beta 2m$ and the healthy B7 rats of the 120-4 line bearing 52 copies of HLA-B*0702 and 26 copies of h $\beta 2m$, all on a Fisher (F344) background, were bred under conventional conditions (24). Age-matched nontransgenic (NTG) littermates were used as controls. Rats were used at 2 distinct ages: (i) 3-5 wk, asymptomatic, so-called pre-morbid; (ii) 1,5-12 mo, adults presenting disease symptoms. Study procedures were approved by the Institutional Animal Experimentation Ethical Committee from the Faculty of Health Simone Veil (APAFIS-8910).

Rat cells preparation.

Single-cell suspensions were prepared from mesenteric lymph nodes (mLN), stained with appropriate Abs and analyzed by flow cytometry with BD LSR Fortessa. In some experiments, total T cell population was gated using anti-CD3 antibody (Ab) (Fig. S1C). In other experiments, appropriate combinations of Abs were used to identify and/or sort Tn (CD4+CD25-CD62L^{high}) and effector CD4+ T cells (Teff; CD4+CD25-CD62L-) (Fig. S1D).

Proximity ligation assay.

Proximity ligation assay (PLA) was performed using Duolink In Situ PLA reagents from Merck (Red detection reagent duo 92008/Probe Anti-Rabbit PLUS 92002/Probe Anti-Mouse MINUS 92004) following the manufacturer's protocol. For each experiment, 3×10^5 total mLN cells were used. Primary Abs w6.32 (Abcam) and CD45RC (Bio-rad) are produced in mice, anti- ALK2 (Sigma-Aldrich), anti- ALK3 (Invitrogen) and anti- ALK5 (Sigma-Aldrich) are produced in rabbit. They were all used at 1:100 except for ALK5 that was used at 1:150. Whole volume of approximately 10 random fields of view were acquired with 63x oil immersion objective of Leica SP8 confocal microscope using the DAPI (blue nuclei) and TexasRed (Red PLA signal) filters. PLA signal was manually counted in each individual cell and for each Z field using LasX software.

Cell culture reagents and monoclonal Abs (mAbs). Recombinant human TGF β 1(rhTGF β 1), rhBMP-4 and rhBMP-6 were purchased from Mitenyi Biotec. Recombinant human/mouse/rat r(h/m/r) activin A was obtained from R&D Systems. Mouse anti-rat CD3 and mouse anti-rat CD28 Ab were from BD pharmingen. For surface staining, fluorochrome conjugated anti-rat CD3 and anti-rat CD4 were from BD Pharmingen; anti-rat CD4, anti-rat CD25 were obtained from eBioscience and anti-rat CD62L was from Invitrogen. For intracellular staining, fluorochrome conjugated anti-pSMAD2/3 and anti-pSMAD1/8 were from BD Bioscience; anti-pAKT and anti-pNF- κ B from Cell Signaling; anti-pERK1/2 and anti-pp38 from Invitrogen. All reagents and Abs used are listed in Supplementary Table 2.

RT-qPCR. Tn and Teff from NTG and B27 rats were collected in TRIzol RNA Isolation Reagents (ThermoFisher), then RNA was extracted using classic chloroform/isopropyl alcohol extraction protocol. cDNA was synthesized by reverse transcription using RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher) with polyA primers, then real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed using SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (BioRad) and CFX384 (Touch Real-Time PCR Detection System). Duplicates were run for each sample; *Gapdh* was used as endogenous reference gene for mRNA abundance normalization. Primer sequences are provided in Supplementary Table 3.

Cell stimulation. Single-cell suspensions (10^6 cells) from mLN were stimulated with TGF β 1 (5ng/ml) or PBS for 1 hour at 37°C/5% CO₂. In experiments using sorted-cells, the stimulation was performed on single-cell suspension ($5 \cdot 10^5$ or 10^6 cells) after 1 hour of cell resting. When sorted, cells were left to rest at 37°C/5% CO₂ for 1 hour.

SMAD2/3, p38, AKT, ERK, mTOR, NF κ B phosphorylation assessment by flow cytometry. Single-cell suspension or sorted CD4+ T cell subsets isolated from NTG or B27 rats mLN, were stimulated or not with TGF β 1 for 1 hour as described previously. After stimulation, the cells were fixed for 20 minutes in Fix Buffer I (BD Bioscience) and then permeabilized for 20 minutes in Perm Buffer III (BD Bioscience) at -20°C. Intracellular staining with specific Abs was performed for 1 hour in Perm Wash 1x according to the manufacturer's instructions (BD Bioscience). Unstimulated and unsorted, cells were fixed immediately after isolation. Results were expressed as staining index (SI) calculated as the ratio between samples and fluorescence-minus-one staining control.

Statistical analysis. Data are expressed as the mean \pm SEM. Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's multiple comparisons tests comparing each condition to its control was used to analyse *Drosophila* experiments. Chi-2 test was used to compare the second position residue between peptides specific for B27 drosophila and those non-specific. Paired t-tests or Fischer's LSD tests were used to analyse flow-cytometry experiments. Unpaired t-tests were used for qPCR experiments. Analyse of variance (ANOVA) followed by unpaired t-test after Bonferroni correction was used for PLA experiment. Results were considered significant when p value was ≤ 0.05 .

Results

HLA-B27 interacts genetically with the activin/TGF β pathway in *Drosophila*. We previously reported that HLA-B27, when expressed in combination with h β 2m in *Drosophila* wing imaginal disc, physically interacted with BMPR1 saxophone (Sax) leading to an increased BMP signaling and a loss of crossveins (7). Given the possible interplay between BMP and activin/TGF β pathways that signal *via* Thickveins (Tkv)/Sax and baboon (Babo) BMPR1s, respectively, we further investigated the involvement of the latter pathway in the loss of crossveins induced by HLA-B27/h β 2m expression. Down regulation of the ligand of the pathway, *activin*, or its BMPR1, *Babo*, or its signal transducer

Smox using RNA interference (RNAi) do not affect wing formation in wild-type *Drosophila* (Fig. 1A,C,E,G). However, in B27/h β 2m *Drosophila*, it leads to a full or partial rescue of the crossveins, confirming a genetic interaction between HLA-B27 and the activin pathway in addition to the BMP pathway (Fig. 1B,D,F,H,I). Altogether, this indicates that in the presence of HLA-B27, inappropriate activin/TGF β signaling participated to the loss of crossveins.

Well-folded conformers of HLA-B27/h β 2m loaded with canonical peptides are expressed in transgenic *Drosophila* wing imaginal disc. In our previous work, we showed that HLA-B27 folded and localized to the cell membrane in *Drosophila* wing imaginal disc. Its recognition by ME1 Ab suggested that the HLA-B27 peptide-binding groove was not empty (7). To further address this question, we collected wing imaginal discs from *Drosophila* expressing HLA-B27/h β 2m. Wild-type wing imaginal discs were used as control. Immunoaffinity purification of HLA-B27 molecule was performed with w6/32 antibody, followed by large scale quantitative MS to identify HLA-B27-specific peptide ligands. In this assay, both HLA-B27 and h β 2m molecules were purified from the HLA-B27/h β 2m *Drosophila* wing disc and absent from the wild-type condition (according to the proteome analysis of the 80% acetonitrile fraction, showing clear identification and quantification of both proteins). Furthermore, peptidome analysis identified 50 peptides specific for HLA-B27 (Fig. 1J, left panel) with 56% presenting an arginine (50%) or a glutamine (6%) at the anchor position 2, a hallmark of HLA-B27 peptide-binding motif (Fig. 1J, right panel). These peptides are longer on average than those usually purified from mammalian cells with a majority spanning 10 to 11 amino acid residues (61%) and < 1% having the canonical 9 amino acids in length. Altogether these findings indicate that HLA-B27 associates with both h β 2m and specific peptides in *Drosophila* despite the lack of the peptide loading complex and ERAP aminopeptidase, which might explain the longer than usual length of those peptides, as previously shown (25). The *Drosophila* proteins and functions corresponding to these peptides are shown in Table 1. Noteworthy, a comparison of HLA-B27-bound *Drosophila* peptides with previously reported HLA-B27 peptidome from human or B27 rat cells revealed only one rat peptide overlapping with one of the *Drosophila* peptides (TEAPLNPKAN), both derived from actin. However, in the rat, it was not specific for the HLA-B27-bound peptidome (25,26).

HLA-B27 interacts with ALK2 and ALK5 in B27 rat. The mammalian orthologs of the three *Drosophila* BMPR1s, Sax, Tkv and Babo are ALK2, ALK3 and ALK5, respectively. They are primarily involved in BMP (ALK2 and ALK3) and Activin/TGF β (ALK5, also known as TGF β R1) signaling, respectively. We have previously shown a specific physical interaction between HLA-B27 and ALK2 in B-LCLs derived from SpA patients. Here, we wished to investigate the physical interaction between HLA-B27 and ALK2, ALK3 and ALK5 in B27 rat mLN cells, using PLA and HLA-B7 transgenic rats as control. This assay revealed a significantly greater interaction of ALK2 and ALK5 with HLA-B27 than HLA-B7 (Fig. 2B,D,F,H,I). In contrast, the level of interaction of ALK3 with both HLA-B molecules was similar (Fig. 2C,G,I). The PLA signal between ALKs and irrelevant CD45RC protein was comparable to background (Fig. 2A,E,I). These PLA results could not be explained by variations in the levels of expression of HLA-B27 and HLA-B7 which were similar in both lines of rats (27). Moreover, the levels of expression of the different BMPRs were similar between B27 and control rats, except for a decreased expression of *Bmpr1a* that codes for ALK3 in Tn and an increase of *Bmpr2* in Teff from B27 rat (Fig. 3).

TGF β induces heightened phosphorylation of SMAD2/3 in T cells from B27 rat.

To test whether the BMP/TGF β pathway was affected by expression of HLA-B27 in adult rat, we stimulated bulk mLN cells or sorted CD4⁺ T cell subsets with BMPs (2, 4 or 6), activin A or TGF β 1. BMPs failed to induce the phosphorylation of SMAD1/5/8 in rat T cells after different doses and timing of exposure (Supplementary Fig. 1A). Likewise, activin A had a very little or no effect on rat T cells (Supplementary Fig. 1B). In contrast, TGF β 1 increased SMAD2/3 phosphorylation in all mLN T cell subsets. The phosphorylation of SMAD2/3 in CD3⁺ T cells was significantly lower in unstimulated mLN cells from adult B27 rats and higher after TGF β 1 treatment (Fig. 4A; Supplementary Fig. 1C,F), an observation similar to what we already reported in peripheral blood T cells from SpA patients (7). In sorted Tn, the level of SMAD2/3 phosphorylation was also lower in unstimulated cells from adult B27 rats than in NTG rat, but after TGF β 1 treatment, phosphorylation reached comparable levels between NTG and B27 rats (Fig. 4B; Supplementary Fig. 1D). In B27 Teff, SMAD2/3 phosphorylation after stimulation with TGF β 1 almost reached significant difference compared to NTG Teff ($p=0.06$)

(Supplementary Fig. 1D). Thus, the pSMAD2/3-fold change (i.e. TGF β /PBS ratio) was higher in both Tn and Teff from B27 rats (Fig. 4C and Supplementary Fig. 1F).

We next examined the effect of TGF β 1 on SMAD2/3 phosphorylation in mLN T cell subsets from 3 weeks-old pre-morbid rats to eliminate the impact of chronic inflammation on this response. Again, in medium control conditions, a lower level of SMAD2/3 phosphorylation was observed in Tn but also in Teff from B27 rats compared to their NTG littermates (Fig. 4D, Supplementary Fig. 1E). The level of pSMAD2/3 achieved after TGF β 1 exposure in Tn and Teff was similar between B27 and NTG rat but, as for adult rats, the fold-change was greater in B27 rat (Fig. 4D and Supplementary Fig. 1G).

Besides canonical SMAD2/3 phosphorylation, TGF β may signal through non-canonical pathways. To address the effect of TGF β on these pathways, we tested the phosphorylation of p38, AKT, mTOR, ERK1/2 and NF- κ B after TGF β 1 treatment, in gated or sorted mLN T cell subsets from adult and pre-morbid B27 rats, in comparison with NTG control rats. Whatever the time of exposure, TGF β 1 failed to induce phosphorylation of any of these proteins (Supplementary Fig. 2A). However, basal phosphorylation of some of them was significantly decreased in several pre-morbid B27 rat T cell subsets. Thus, the basal levels of p-p38, pAKT, pmTOR, and pERK were significantly lower in Tn and/or Teff from pre-morbid B27 rats than in NTG littermates (Supplementary Fig. 2B). This was generally not the case in T cells from adult rats.

Differential expression of TGF β 1 target genes in Tn from NTG and B27 rats.

We next addressed whether higher SMAD2/3 phosphorylation amplitude observed after TGF β 1 exposure in several T cell subsets from B27 rats translated into differential target genes induction. Kinetic of target genes transcripts level was quantified in sorted Tn from adult B27 rats and NTG littermates, after exposure to TGF β 1 over 6-hrs. In Tn from adult B27 rats, expression of *Foxp3* and *Rorc*, which are characteristic TGF β target genes, was increased in basal condition but not modified by TGF β 1 treatment (Fig. 5A). *Runx1* that codes for a transcription factor implicated in Th17 cell differentiation, in combination with ROR γ t and FOXP3, reached a significantly higher level of expression in B27 rat, after 1 hr of TGF β 1 exposure, coincident with its peak of expression (Fig. 5A). Expression of *Maf* that is also implicated in Th17 cell differentiation was also higher in Tn from B27

than NTG rats with a noticeable peak of expression in B27 Tn after 6 hrs induction. In contrast, two other TGF β target genes, *Smad7*, which codes for an inhibitor of the pathway and *Tgfb1* itself were less induced by TGF β , in B27 than in NTG rat Tn after 1 hr of TGF β 1 exposure but reached comparable levels thereafter, which indicates slightly different kinetics of stimulation (Fig. 5A). Given the importance of TGF β itself in controlling inflammation, we investigated the *Tgfb1* expression in *ex-vivo* sorted Tn and revealed a lower expression in both adult and premorbid rats B27 rats compared to NTG rats (Fig. 5B).

Discussion

Using a new model of HLA-B27/h β 2m transgenic *Drosophila* to explore non-canonical effects of HLA-B27 that might explain its pathogenicity, we previously reported an interaction between HLA-B27 and Sax, one of three *Drosophila* BMPR1s. Our previous study showed that HLA-B27 expressed in wing imaginal disc exerted a dominant negative effect on Sax function, limiting BMP signaling during crossveins formation, resulting in a loss of crossveins by enhanced BMP signaling (7). Moreover, HLA-B27 conformers recognized by w6/32 and ME1 Abs were shown to interact physically with Sax in wing imaginal disc and also with its mammalian orthologue ALK2 in B-LCLs from SpA patients.

In the present follow-up study, we first evidenced that the loss of crossveins induced by expression of HLA-B27/h β 2m in *Drosophila* wings implicates a deregulated activin/TGF β pathway. Hence, the ligand activin, its BMPR1 receptor Babo and their down-stream transcription factor Smox were all required for the crossveinless phenotype, indicating inappropriate signaling through the activin/TGF β pathway in the presence of HLA-B27/h β 2m. This suggests a complex interplay between HLA-B27 and the BMPR1s, which are known to form different combinations of homo or heterodimers with variable outcome (28). In addition, we evidenced that at least some of the HLA-B27/h β 2m conformers purified from the wing imaginal disc with w6/32 Ab were loaded with peptides enriched in canonical B27-binding motif. This may support the conclusion that well-folded HLA-B27 conformers are involved in the wing phenotype. However, the identified peptides did not overlap with previously characterized B27-specific peptidome from human or B27 rat cells. Thus, if the mechanism by which

HLA-B27 alters wing formation in *Drosophila* is related to its role in SpA pathogenesis, this is unlikely to involve the binding of defined peptides.

We next turned to the B27 rat to examine the possible implication of BMP/TGF β pathway in SpA pathogenesis. This murine model is characterized by an uncontrolled expansion of pathogenic Th17 cells and a deregulated phenotype of Treg (4,5). We have recently shown that Tn from B27 rats were prone to develop a pro-inflammatory Th17 phenotype and that this happened even before disease development (29). One of the key mechanisms behind the biased differentiation of B27 rat Tn relied on decreased expression of interferon/Th1-related genes, including *Stat1* and *Tbx21*, that was already apparent in CD4⁺ single-positive thymocytes from premorbid B27 rats (29). This could account for heightened Th17 differentiation since transcription factors from both pathways cross-regulate each other.

Thus, given the known implication of the BMP/TGF β pathway and particularly of TGF β in the differentiation of CD4⁺ T cells into Th17 cells, by inhibiting expression of the master transcription factors of Th1 differentiation, including *Tbx21* (9,30–33) it was interesting to determine if inappropriate signaling *via* this pathway could be the molecular event linking HLA-B27 to the foregoing signature. Possible relevance of such hypothesis was first supported by PLA showing close physical interaction of ALK2 and ALK5, the respective orthologs of Sax and Babo, with HLA-B27/h β 2m at the membrane of rat lymph node cells, superior to that with HLA-B7/h β 2m, whereas interaction of ALK3 with both HLA-B alleles was comparable. However, despite the expression of their type 1 and type 2 receptors at the RNA and/or protein levels in rat T cells, neither BMPs nor activin A induced detectable phosphorylation of SMAD1/5/8 or SMAD2/3, respectively. In contrast, TGF β induced canonical SMAD2/3 phosphorylation in rat T cells. We observed consistent decreased basal phosphorylation in B27 rat T cell subsets, whereas phosphorylation increased to a greater extent, reaching at least comparable or greater levels after TGF β 1 treatment. Overall, this is suggestive of enhanced TGF β signaling in T cells from B27 rats.

We next examined the putative consequences of these findings on several TGF β target genes and made several interesting observations: two key target genes, i.e. *Foxp3* and *Rorc* were increased in

Tn from B27 rats without stimulation but were not further modified until 6 hrs following TGF β exposure, whereas two other genes, *Runx1* and *Maf* were induced to higher levels in Tn from B27 rats with TGF β . This is all the most interesting that the combination of those 4 gene products is critical to determine the fate of Tn, particularly regarding Th17 and Treg differentiation (34,35). The increased basal levels of the first two could be a consequence of *in vivo* exposure of Tn from B27 rats to TGF β . This interpretation is consistent with our previous epigenomic study of Tn from B27 rats that evidenced *de novo* binding motifs for transcription factors including SMAD3 and SMAD4, that were predicted to preferentially bind to B27 rat-specific superenhancer regions (29). Moreover, ingenuity pathway analysis of RNAseq data from adult and premorbid B27 Tn cells predicted TGF β 1 as an upregulator of genes differentially expressed as compared to NTG Tn cells ((29) and unpublished data). In turn, the decreased basal phosphorylated state of SMAD2/3 in T cells from B27 rats could be interpreted as the consequence of negative feedback following increased signaling and induction of phosphatases (8,36). This basal difference could potentially explain delayed induction of *Smad7* and *Tgfb1* in B27 rat T cells after exposure to TGF β . It could possibly also explain that *Tgfb1* transcripts were decreased in *ex vivo* sorted Tn, which could bear direct consequences on the development of SpA, given the critical importance of T cell-produced TGF β 1 to prevent chronic inflammation (37).

The precise molecular mechanism by which HLA-B27 may impact BMP/TGF β signaling both in *Drosophila* and mammalian cells is still unknown. However, it is noticeable that h β 2m plays a critical role in the development of abnormal phenotype in both animal models that we studied, i.e. the HLA-B27 transgenic *Drosophila* and the B27 rat (3,7). Interestingly, β 2m has been shown to bind and signal through TGF β receptors inducing proinflammatory pathway (38). Thus, it is possible that the propensity of HLA-B27 molecule to interact physically with BMPR1s, including ALK5 could favor signaling by β 2m through TGF β receptor.

Abbreviations

SpA	Spondyloarthritis
h β 2m	Human β -2-microglobulin

B27 rat	Rat transgenic for HLA-B27 and h β 2m
BMP	Bone morphogenetic protein
BMPR1	Type 1 bone morphogenetic protein receptor
Sax	Saxophone
TGF β	Transforming growth factor β
mLN	Mesenteric lymph nodes
ALK	Activin receptor-like kinase
SMAD	Small mothers against decapentaplegic
Babo	Baboon
IBD	Inflammatory bowel disease
MHC-I	Class I major histocompatibility complex
Th17	T helper 17
Treg	Regulatory T cell
Ab	Antibody
B-LCL	B-lymphoblastoid cell line
Tn	Naive CD4+ T cell
TFA	Trifluoroacetic acid
HPLC	High-performance liquid chromatography
MS	Mass spectrometry
HCD	Higher energy collisional dissociation
LC	Liquid chromatography

FDR	False discovery rate
iBAQ	Intensity-based absolute quantification
NTG	Nontransgenic
Teff	Effector CD4+ T cell
PLA	Proximity ligation assay
mAb	Monoclonal antibody
rh	Recombinant human
rm	Recombinant mouse
rr	Recombinant rat
RT-qPCR	Real-time quantitative polymerase chain reaction
PBS	Phosphate buffer saline
SI	Stain index
ANOVA	Analysis of variance
Tkv	Thickveins
RNAi	RNA interference
UAS	Upstream activating sequence

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Study procedures were approved by the Institutional Animal Experimentation Ethical Committee from the Faculty of Health Simone Veil (APAFIS-8910).

Consent for publication

Informed consent was obtained from all participants for publication.

Availability of data and materials

The datasets generated and/or analyzed in this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Funding

This study was funded by the Agence National de la Recherche (ANR) with the project reference ANR-19-CE14-0032.

Authors' contributions

ML, MTT, ARA, AA, IG, LA, and MB designed the study. MTT, EP, VR performed the Activin RNAi experiments in *Drosophila* and the related figure and analyses. ML collected *Drosophila* imaginal wing discs, then DMK and AA resolved HLA-B27-associated peptides and analysed the results. ML performed the major part of the rat experiments, analyses and figures. BC, LA and EC helped in some rat experiments. ML, LA and MB wrote the manuscript. All authors have made an intellectual contribution to the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

References

1. Taurog JD, Chhabra A, Colbert RA. Ankylosing Spondylitis and Axial Spondyloarthritis. Longo DL, editor. *N Engl J Med*. 2016 Jun 30;374(26):2563–74.
2. Breban M, Costantino F, André C, Chiocchia G, Garchon HJ. Revisiting MHC Genes in Spondyloarthritis. *Curr Rheumatol Rep*. 2015 Jun 23;17(6):40.
3. Breban M, Glatigny S, Cherqaoui B, Beaufrère M, Lauraine M, Rincheval-Arnold A, et al. Lessons on SpA pathogenesis from animal models. *Semin Immunopathol*. 2021 Apr 15;43(2):207–19. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00281-020-00832-x>
4. Araujo LM, Fert I, Jouhault Q, Labroquère K, Andrieu M, Chiocchia G, et al. Increased production of interleukin-17 over interleukin-10 by treg cells implicates inducible costimulator molecule in experimental spondyloarthritis. *Arthritis and Rheumatology*. 2014;66(9):2412–22.

5. Glatigny S, Fert I, Blaton MA, Lories RJ, Araujo LM, Chiocchia G, et al. Proinflammatory Th17 cells are expanded and induced by dendritic cells in spondylarthritis-prone HLA-B27-transgenic rats. *Arthritis Rheum.* 2012 Jan;64(1):110–20. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.33321>
6. Beaufrère M, Jacoutot M, Ait Ali Said A, Said-Nahal R, Cosentino G, Rizzo C, et al. Pathogenicity of IL-17 Producing Cells in HLA-B27 Transgenic Rat Model of Spondyloarthritis. *American college of rheumatism.* 2022; Available from: <https://acrabstracts.org/abstract/pathogenicity-of-il-17-producing-cells-in-hla-b27-transgenic-rat-model-of-spondyloarthritis/>
7. Grandon B, Rincheval-Arnold A, Jah N, Corsi JM, Araujo LM, Glatigny S, et al. HLA-B27 alters BMP/TGF β signalling in *Drosophila*, revealing putative pathogenic mechanism for spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2019;1–10.
8. Massagué J. TGF β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 Oct 20;13(10):616–30. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrm3434>
9. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* 2006 Feb;24(2):179–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16473830>
10. Huber S, Schramm C, Lehr HA, Mann A, Schmitt S, Becker C, et al. Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. *J Immunol.* 2004 Dec 1;173(11):6526–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15557141>
11. Wang J, Zhao X, Wan YY. Intricacies of TGF- β signaling in Treg and Th17 cell biology. *Cell Mol Immunol.* 2023 May 23; Available from: <https://www.nature.com/articles/s41423-023-01036-7>
12. Lee GR. The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity. *Int J Mol Sci.* 2018 Mar 3;19(3). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29510522>

13. Hoareau M, de Noiron J, Colin J, Guénal I. Mass Purification Protocol for *Drosophila melanogaster* Wing Imaginal Discs: An Alternative to Dissection to Obtain Large Numbers of Disc Cells. *Biology (Basel)*. 2022 Sep 22;11(10):1384. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-7737/11/10/1384>
14. Bassani-Stenberg M, Barnea E, Beer I, Avivi I, Katz T, Admon A. Soluble plasma HLA peptidome as a potential source for cancer biomarkers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010 Nov 2;107(44):18769–76. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1008501107>
15. Milner E, Gutter-Kapon L, Bassani-Stenberg M, Barnea E, Beer I, Admon A. The Effect of Proteasome Inhibition on the Generation of the Human Leukocyte Antigen (HLA) Peptidome. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2013 Jul;12(7):1853–64. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S153594762032555X>
16. Ishihama Y, Rappsilber J, Andersen JS, Mann M. Microcolumns with self-assembled particle frits for proteomics. *J Chromatogr A*. 2002 Dec;979(1–2):233–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967302014024>
17. Bourdetsky D, Schmelzer CEH, Admon A. The nature and extent of contributions by defective ribosome products to the HLA peptidome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014 Apr 22;111(16). Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1321902111>
18. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol*. 2008 Dec 30;26(12):1367–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19029910>
19. Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen J V, Mann M. Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J Proteome Res*. 2011 Apr 1;10(4):1794–805. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21254760>
20. Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods*. 2016 Sep 27;13(9):731–40. Available from: <https://www.nature.com/articles/nmeth.3901>

21. Andreatta M, Nielsen M. Gapped sequence alignment using artificial neural networks: application to the MHC class I system. *Bioinformatics*. 2016 Feb 15;32(4):511–7. Available from: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/32/4/511/1744469>
22. Nielsen M, Lundegaard C, Worning P, Lauemøller SL, Lamberth K, Buus S, et al. Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. *Protein Sci*. 2003 May;12(5):1007–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12717023>
23. Vizcaino JA, Csordas A, del-Toro N, Dianas JA, Griss J, Lavidas I, et al. 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jan 4;44(D1):D447–56. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkv1145>
24. Fert I, Cagnard N, Glatigny S, Letourneur F, Jacques S, Smith JA, et al. Reverse interferon signature is characteristic of antigen-presenting cells in human and rat spondyloarthritis. *Arthritis and Rheumatology*. 2014;66(4):841–51.
25. Barnea E, Kadosh DM, Haimovich Y, Satumtira N, Dorris ML, Nguyen MT, et al. The human leukocyte antigen (HLA)-B27 peptidome in vivo, in spondyloarthritis-susceptible HLA-B27 transgenic rats and the effect of Erap1 deletion. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2017;16(4):642–62.
26. Ben Dror L, Barnea E, Beer I, Mann M, Admon A. The HLA-B*2705 peptidome. *Arthritis Rheum*. 2010 Feb 28;62(2):420–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.27257>
27. Hacquard-Bouder C, Falgarone G, Bosquet A, Smaoui F, Monnet D, Ittah M, et al. Defective Costimulatory Function Is a Striking Feature of Antigen-Presenting Cells in an HLA-B27-Transgenic Rat Model of Spondylarthropathy. *Arthritis Rheum*. 2004;50(5):1624–35.
28. Massagué J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:753–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9759503>
29. Cherqaoui B, Crémazy F, Lauraine M, Shammas G, Said-Nahal R, Mambu Mambuani H, et al. STAT1 deficiency underlies a proinflammatory imprint of naive CD4+ T cells in spondyloarthritis. *Front Immunol*. 2023 Oct 18;14. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1227281/full>

30. Gorelik L, Constant S, Flavell RA. Mechanism of Transforming Growth Factor β -induced Inhibition of T Helper Type 1 Differentiation. *J Exp Med*. 2002 Jun 3;195(11):1499–505. Available from: <https://rupress.org/jem/article/195/11/1499/39416/Mechanism-of-Transforming-Growth-Factor-induced>
31. Wu B, Zhang S, Guo Z, Bi Y, Zhou M, Li P, et al. The TGF- β superfamily cytokine Activin-A is induced during autoimmune neuroinflammation and drives pathogenic Th17 cell differentiation. *Immunity*. 2021;1–16. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.12.010>
32. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human TH-17 cells requires transforming growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ t. *Nat Immunol*. 2008 Jun 4;9(6):641–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/ni.1610>
33. Browning LM, Pietrzak M, Kuczma M, Simms CP, Kurczewska A, Refugia JM, et al. TGF- β -mediated enhancement of T H 17 cell generation is inhibited by bone morphogenetic protein receptor 1 α signaling. *Sci Signal*. 2018 Aug 28;11(545):1–16. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/scisignal.aar2125>
34. Zhang F, Meng G, Strober W. Interactions among the transcription factors Runx1, ROR γ t and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol*. 2008 Nov 12;9(11):1297–306. Available from: <https://www.nature.com/articles/ni.1663>
35. Imbratta C, Hussein H, Andris F, Verdeil G. c-MAF, a Swiss Army Knife for Tolerance in Lymphocytes. *Front Immunol*. 2020 Feb 14;11. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.00206/full>
36. Bruce DL, Sapkota GP. Phosphatases in SMAD regulation. Vol. 586, *FEBS Letters*. 2012. p. 1897–905.
37. Li MO, Wan YY, Flavell RA. T Cell-Produced Transforming Growth Factor- β 1 Controls T Cell Tolerance and Regulates Th1- and Th17-Cell Differentiation. *Immunity*. 2007 May 25;26(5):579–91.
38. Hilt ZT, Maurya P, Tesoro L, Pariser DN, Ture SK, Cleary SJ, et al. β 2M Signals Monocytes Through Non-Canonical TGF β Receptor Signal Transduction. *Circ Res*. 2021

Mar 5;128(5):655–69. Available from:

<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.120.317119>

Table 1: HLA-B27-specific peptides in *Drosophila* with their corresponding protein and implication in biological process.

Peptide	Protein	Biological process
APGSGAPG	Trailer hitch, isoform E	Cytoskeleton
EEQAEVDEN	Tubulin beta-1 chain	
GRPLVTMSTY	Uncharacterized protein, isoform E	
LEELQQENCR	Augmin complex subunit dgt3	
TEAPLNPKAN*	Actin-5C	
NRLMYSVIGATEY; VQYDPRNSETY	Z band alternatively spliced PDZ-motif protein 66, isoform I	
VRYQQQQQQQQY	Z band alternatively spliced PDZ-motif protein 52, isoform R	
AQGDFNEFIEK	Neuropeptide-like 2	Immunity
ARNDPQDDAE; ARNDPQDDAEVIK	GH02216p	
GRITTNQDR; QRAMNPVMSI	Fat-body protein 1, isoform D	
SRMEYSFSNGVVTQ	Sidestep III, isoform O	
SRLTYGSNA; SRLTYGSNAASTF; SSRLTYGSNAASTF	Fondue, isoform A	
ARAEINFEGPSP; ARAEINFEGPSPA	BcDNA.GH11973	DNA/RNA
ARPYQPDGYQY	RE50839p	
NGEFGNELPQRQ	Vig2, isoform B	

STITSREIQ	Histone H2B	
SVNQSKTQTVSN	Protein lingerer, isoform L	
AAKQTGPVIVIS	40S ribosomal protein S19a (Ribosomal protein S19a, isoform C)	Translation
AGDSKANPPKGAA; EEIKKEVSS; GQIANGYTPV	Elongation factor 1-alpha	
NPNQQSERP	Eukaryotic translation initiation factor 4H1, isoform A	
VRIGQPIMSV	60S ribosomal protein L10	
DGSVGPVGP; DGSVGPVGPAGP	Nicotinic acetylcholine receptor alpha7, isoform A	Ion transport
HTNNVQEPK	Calsyntenin-1	
TVSGVNGP	V-type proton ATPase subunit B (Vacuolar proton pump subunit B)	
YSKTKSAAPNFDE	GEO09626p1	
EGVEGIEHQE	Protein GDAP2 homolog	Stress response
IEQAGKDATEN	Cytochrome b5	
TEDASHMEEVD	Heat shock protein 83	
ERNQNGEDVVK	FI19426p1	Membrane receptor
QRVGITAEDL	Msr-110, isoform D	
YRNAGLYNGNT; YRNAGLYNGNTL; YRNAGLYNGNTLVD	GM18993p	
GRSNISFATSP	Nucleoporin NUP53	Nuclear membrane
APSGGPAG	HECT-type E3 ubiquitin transferase	Ubiquitylation
GRGNIGQTNV	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	Fatty acid metabolism

SRAPGGAGTGGM	Protein transport protein Sec61 subunit beta	Autophagy/ Intracellular protein transport
GPGAGPGQRP	FI16123p1	Unknown
MRVPPYYLLM; MRVPPYYLLMQ	Uncharacterized protein, isoform A	
YRIIESNEVPK	Uncharacterized protein	

Flybase website was used to determine the corresponding proteins and biological process (flybase.org).

*This peptide was shared with the HLA-B27-bound peptidome isolated from B27-rats spleen but was not specific for HLA-B27 (25).

Fig 1: HLA-B*27:05/h β 2m expressed in *Drosophila* wing genetically interacts with the activin pathway and binds specific peptidome. (A-H) Nubbin-GAL4 (nub-GAL4) was used to drive transgenes expression in the pouch of imaginal wing disc. Scale bar: 500 μ m. eGFP and luciferase were used as controls and have no effect on wing formation. Adult fly wings expressing genotypes: (A) nub>enhanced Green fluorescent protein (eGFP)>luciferase (luc) (nub-GAL4/+; UAS-eGFP/UAS-luc), (B) nub>HLA-B27>h β 2m>luc (nub-GAL4/+; UAS-HLA-B*27:05, UAS-h β 2m/UAS-luc), (C) nub>eGFP>activin β (act β) RNA interference (RNAi) (nub-GAL4/+; UAS-eGFP/UAS-act β RNAi), (D) nub>HLA-B27>h β 2m>act β RNAi (nub-GAL4/+; UAS-HLA-B*27:05, UAS-h β 2m/UAS-act β RNAi), (E) nub>eGFP>baboon (babo)RNAi (nub-GAL4/+; UAS-eGFP/UAS-baboRNAi), (F) nub>HLA-B27>h β 2m>baboRNAi (nub-GAL4/+; UAS-HLA-B*27:05, UAS-h β 2m/UAS-baboRNAi), (G) nub>eGFP>smoxRNAi (nub-GAL4/+; UAS-eGFP/UAS-smoxRNAi), (H) nub>HLA-B27>h β 2m>smoxRNAi (nub-GAL4/+; UAS-HLA-B*27:05, UAS-h β 2m/UAS-smoxRNAi), (I) *Drosophila* wing : longitudinal veins (L I to L V), ACV Anterior CrossVein (black arrow), PCV Posterior CrossVein (green arrow), Scatter plot with bar analysis of PCV/LII length ratio, n>80, Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparisons test showing only a difference between the control and B*27:05/h β 2m conditions (****: p<0.0001). Vertical error bars represent SD. (J) HLA-B*27:05 from

duplicate samples of *Drosophila* wing imaginal discs was retained on immunoaffinity column, using w6/32 Ab. Analysis of the peptides eluted from the column, revealed 50 peptides considered as specifically bound to HLA-B27, as present in both B27 *Drosophila* duplicates and absent from wild-type *Drosophila* wing imaginal disc (left panel). The logo motif (created with GibbsCluster; right panel) shows a high proportion of peptides carrying an Arginine, R or Glutamine, Q in second position that is characteristic of HLA-B27 peptidome (28/50, 56%). A significantly lower proportion of peptides shared between wild-type imaginal discs and B27 duplicates exhibited similar characteristic (28/721, 3.8%; $p < 0.0001$) (figures created with BioRender).

Figure 2: HLA-B27 interacts with ALK2 and ALK5 in mLN lymphocytes from B27 rats. PLA was performed on lymphocytes isolated from (A-D) B7 or (E-H) B27 rats mLN, using w6.32 pan MHC-I Ab or anti-CD45RC as control and anti-ALK2, -ALK3 or -ALK5. Images show representative field for each condition. Cells were stained for nuclei (Blue, DAPI) and PLA signal dots (RedHot, PLA kit probes). Scale bar: 10µm. Images were treated with Fiji software. An unspecific PLA signal was homogeneously observed in all conditions. (I) Average number of PLA staining dots/cell in 2 to 4 independent experiments, showing a greater interaction between ALK2 or ALK5 and HLA-B27 than HLA-B7, whereas interaction was similar for ALK3 with both alleles. The background signal using single Abs was similar to the signal observed by combining anti-ALK Abs with anti-CD45RC. In conditions combining two Abs, approximately 300 to 400 cells per experiment were manually counted, whereas 150 to 250 cells per experiment were manually counted in single Ab conditions. Two-way ANOVA (factors: Ab and rat strain) followed by Bonferroni's multiple-comparisons test was performed (*: $p < 0.05$ ***: $p < 0.001$). Vertical error bars show SEM.

Figure 3: BMP/TGFβ pathway receptors expression in Tn and Teff from B27 and NTG rats. The mRNA expression of TGFβ and activin receptor genes was assessed by RT-qPCR in *ex-vivo* sorted Tn and Teff from NTG (grey bar – white dots) and B27 (red bar – red dots) adult rat mLNs. Scattered dot plot with bars represents the mean of mRNA relative expression in arbitrary units (A.U) out of 8 to 11 experiments. Differences between NTG and B27 expression levels for each receptor were tested by unpaired t-tests with Welch's correction (**: $p < 0.01$). Error bars show SEM. On the first row *Acrv1*,

Bmpr1a, *Acvr1b*, *Tgfb1* and *Acvr1c* genes coding for ALK2, ALK3, ALK4, ALK5 and ALK7 BMPR1s respectively. On the second row *Acvr2a*, *Acvr2b*, *Bmpr2* and *Tgfb2* represent type 2 BMP receptor genes.

Figure 4: Basal pSMAD2/3 is reduced in B27 rat T cells but increases more after TGFβ1 stimulation. (A) Left: Representative histograms of pSMAD2/3 expression in mLN T cells from NTG and B27 rats after 1 hour exposure to medium alone (PBS) or TGFβ1 at 37°C. Right: Intracellular pSMAD2/3 was quantified in mLN T cells from B27 and NTG adult rats after exposure to TGFβ1 or medium alone. Scatter dot plots with bars representing the mean of the SI of 8 experiments. Similar symbols indicate paired conditions. Vertical error bars show the SEM. Paired t-test $*=p<0.05$. (B,C) Intracellular pSMAD2/3 was quantified in Tn from B27 and NTG adult rats after exposure to medium (PBS) or TGFβ1 in 9 independent experiments. Similar symbols indicate paired conditions. (B) Bars height shows the SI mean values. Vertical error bars show the SEM. Paired t-test $*=p<0.05$. (C) Mean of pSMAD2/3-fold change after exposure to TGFβ expressed as the ratio of pSMAD2/3 SI after TGFβ1 stimulation over the SI without exposure from (B). Paired t-test $***: p<0.001$, (D) Intracellular pSMAD2/3 was quantified after TGFβ1 stimulation or no stimulation by gating on Tn or Teff from premorbid NTG and B27 rats. Scatter dot plots with bar show the pSMAD2/3 SI. Similar symbols indicate paired conditions. Bars height show the SI mean values (n=7-9 independent experiments). Vertical error bars show the SEM. Paired t-test $*: p<0.05$.

Figure 5: TGFβ target genes are differentially expressed between NTG and B27 rat Tn. (A) mRNA relative expression in mLN-sorted Tn from NTG (grey bar – white dots) or B27 (red bar – red dots) adult rats immediately after sorting (T0) or after 1h, 3h and 6h of incubation, without (PBS) or with TGFβ1, assessed by RT-qPCR. Scattered dot plots with bars show the mean of the mRNA relative expression out of 6 NTG and 8 B27 experiments. (B) *Tgfb1* mRNA relative expression in *ex-vivo* sorted Tn from NTG and B27 adult (left panel) and premorbid (right panel) rats was assessed by RT-qPCR. Scattered dot plot with bars show the mean of mRNA relative expression out of 10 experiments for adult rats and 8 experiments for premorbid rats. In all graphics, differences between NTG and B27 expression level was tested by Welch's t-tests, $*: p<0.05$; $***: p<0.001$.

Supplementary Fig. 1: TGF β , not BMP nor activin, induced pSMAD, with heightened change in B27 rat T cells. (A) Intracellular pSMAD1/5/8 was quantified in CD3⁺ T cells from B7 rat after exposure to BMP2/6 mixture (200ng/mL each) for 1h to 24h (left panel) or different concentration of BMP2 or BMP6 (250 to 1000ng/mL) for 1h (right panel). (B) Intracellular pSMAD2/3 was quantified in (from left to right) bulk CD3⁺ T cells, sorted Tn cells and sorted Teff cells from NTG or B27 adult rats after 1h treatment with activin. Scattered dot plots with bars showing the fold change mean out of 5 to 7 experiments calculated as the ratio between stimulated (activin) and unstimulated (PBS) conditions. Similar symbols indicate paired conditions. Vertical error bars show SEM. The horizontal dashed line corresponds to a ratio of 1. Ratio above this line means that SMAD2/3 phosphorylation was induced by activin treatment. (C) Gating strategy in experiments using bulk CD3⁺ T cells. (D) Intracellular pSMAD2/3 was quantified after exposure to PBS or TGF β in sorted Teff from B27 and NTG adult rats. Scatter dot plots graphic with bars show SI mean out of 8 independent experiments. Similar symbols indicate paired conditions. Vertical error bars show the SEM. (E) Gating strategy to analyse Tn and Teff. (F) Fold change of SMAD2/3 phosphorylation after exposure to TGF β 1 in bulk CD3⁺ mLN T cells (left panel) and sorted Teff (right panel) from adult rats. Scattered dot plots with bars show the mean of the fold change out of 8 independent experiments. Similar symbols indicate paired conditions. (G) Fold change of SMAD2/3 phosphorylation after exposure to TGF β 1 in gated Tn and Teff from pre-morbid rats. Scattered dot plots with bars show the mean of the fold change out of 7 independent experiments. Similar symbols indicate paired conditions. Vertical error bars show the SEM. Paired t-test were performed. *: p<0.05; **: p<0.01.

Supplementary Fig. 2: TGF β 1 failed to induce phosphorylation of non-canonical pathways in rat CD4⁺ T cell subsets. (A) Intracellular p-p38, p-AKT or p-ERK was assessed after 5 or 30 min of TGF β 1 exposure in sorted Tn from NTG and B27 adult rats. Scattered dot plots with bars show the mean of the fold change from 2 to 3 independent experiments. The red dashed line indicates a ratio = 1 showing that the treatment had no effect on phosphorylation levels. (B) *Ex-vivo* intracellular staining of p-p38, p-AKT, p-ERK, p-mTOR and p-NF-kB was evaluated in CD4⁺ T cells subpopulations (Tn and Teff) from pre-morbid NTG and B27 rats. Scattered dot plots with bars show the mean of the SI from 5 to 11

independent experiments. 2-way ANOVA with Geisser-Greenhouse correction (factors: cell type, rat strain) followed by Fischer's multiple comparison was performed. *: p<0.05; **: p<0.01.

Supplementary Table 1: *Drosophila* genotypes.

Genotype	Provenance
<i>w¹¹¹⁸</i> : control strain	Provided by M. Hoareau
<i>nub-Gal4 ; UAS-eGFP</i>	Provided by M. Hoareau
<i>nub-Gal4 ; UAS HLAB2705 (2M), β2m (3M)</i>	This study
<i>UAS-LUC</i>	BDSC BL-35788
<i>UAS-Actβ RNAi</i>	BDSC BL-29597
<i>UAS-babo RNAi</i>	BDSC BL-25933
<i>UAS-Medea RNAi</i>	BDSC BL-31928
<i>UAS-Smox RNAi</i>	BDSC BL-26756

The yeast GAL4 transcription factor is placed under the control of *Drosophila* nubbin (*nub*) gene promoter, allowing the transcriptional activation of different transgenes placed under the control of upstream activating sequence (UAS), specifically in the *nub* gene expression domain (i.e. the larval imaginal wing disc pouch, a structure that gives rise to the adult wing mainly)

LUC : luciferase. Luciferase and GFP are used as controls and have no effects on wing formation

Actβ : activin beta ligand of the activin/TGF beta pathway

Babo : Baboon type I receptor of the activin/TGF beta pathway, the *Drosophila* ortholog of ALK5

Medea : co-Smad involved in both BMP and activin/TGF beta pathways, the *Drosophila* ortholog of SMAD4

Smox : Smad on X, the *Drosophila* ortholog of SMAD2

BDSC : Bloomington *Drosophila* Stock Center

Supplementary Table 2: Reagents and Ab.

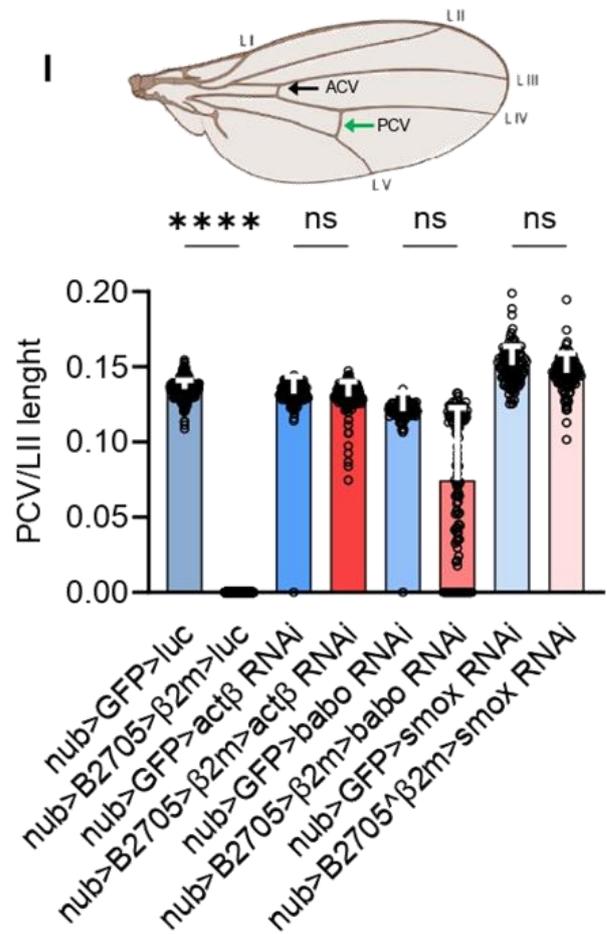
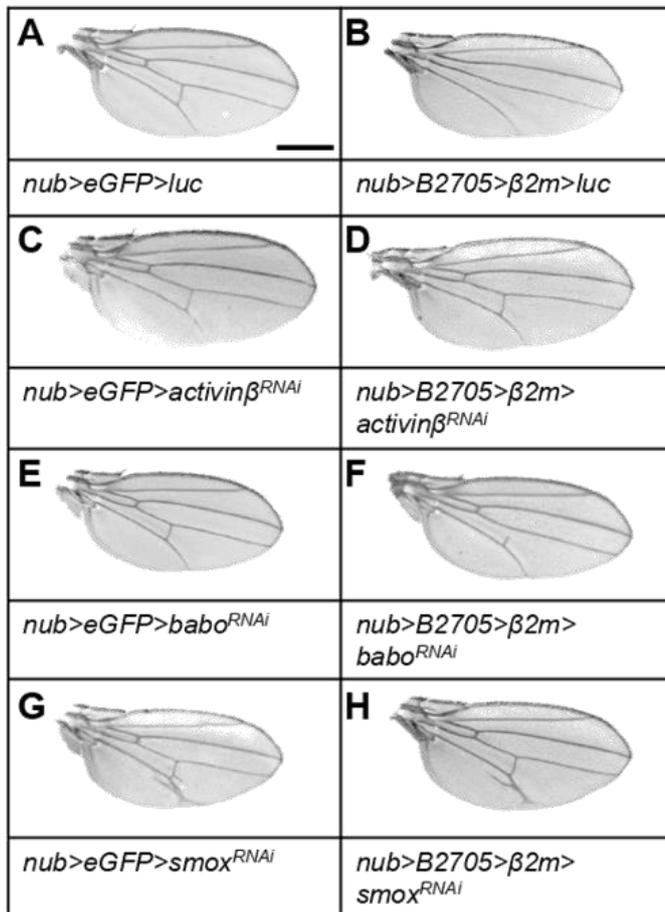
Medium	Catalog No.	Provider
Recombinant cytokines		

TGF- β 1 (hr)	130-095-066	Miltenyi Biotec
Activin A (h/r/m)	338-AC-010	Biotechne
BMP-4 (hr)	130-111-164	Miltenyi Biotec
BMP-6 (hr)	130-112-951	Miltenyi Biotec
BMP-2 (hr)	PHC7145	Thermo Fisher
Purified Antibodies		
Anti-ACVRL1 (ALK1)	AB4531	Antibodies
Anti-ACVR1 (ALK2)	SAB2108587	Sigma-Aldrich
Anti-BMPRI1A (ALK3)	38-6000	Invitrogen
Anti-TGFBRI (ALK5)	SAB5700651	Sigma-Aldrich
Anti MHC-I (w6.32)	ab22432	Abcam
Conjugated Antibodies		
Anti-Smad2/3 PE	72255	Cell Signaling
Anti-rat CD4 V450	561579	BD Biosciences
Anti-rat CD62L APC	50-0623-82	Thermo Fisher
Anti-rat CD25 PE	12-0390-82	Thermo Fisher
Anti-rat CD25 FITC	MA5-17573	Thermo Fisher
Anti-rat CD4 FITC	11-0040-85	Thermo Fisher
Phospho Conjugated Antibodies		
Anti-Smad2 (pS465/pS425) and Smad3 (pS423/pS425) PE	562586	BD Biosciences
Anti-Smad1 pS463/pS465 and Smad8 (pS465/pS467) PE	562509	BD Biosciences
Anti-AKT (pS473) AF488	4071	Cell Signaling
Anti-ERK1/2 (pT202/pT204) Pe-eF610	61-9109-42	Invitrogen

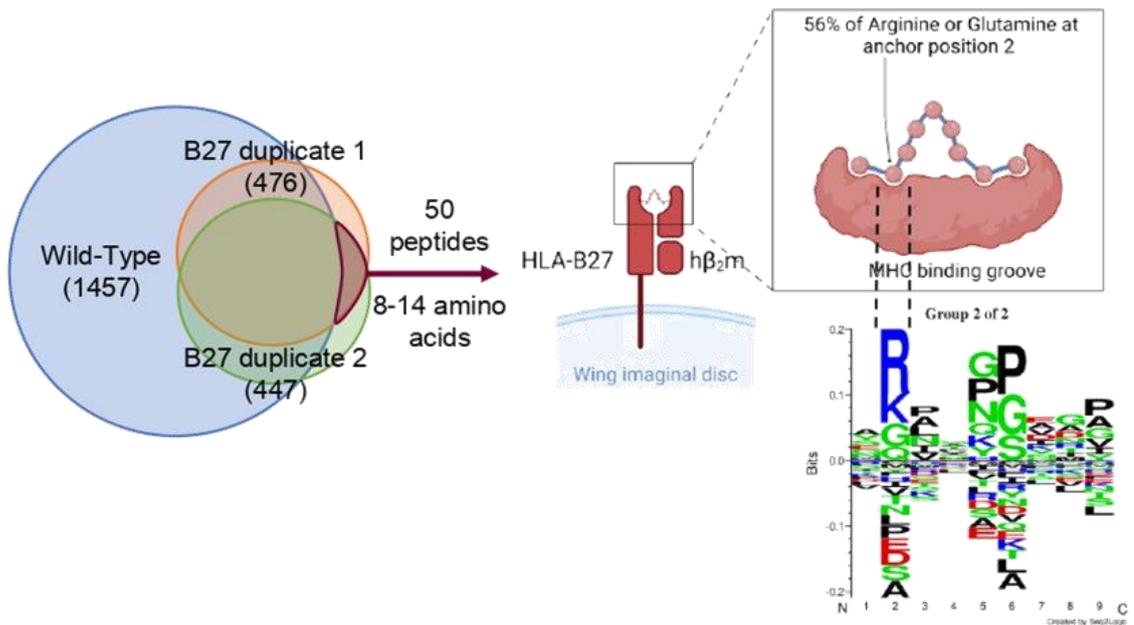
Anti p38 MAPK (pT180/pT182) PE-Cy7	25-9078-42	Invitrogen
Anti-phospho NF-κB p65 (pS536) PE	5733	Cell Signaling
Other Reagents		
FICOLL 400	F4375	Sigma-Aldrich
Fix Buffer I	557870	BD Biosciences
Fix Buffer III		
Perm Wash 10X	554723	BD Biosciences
Foxp3 / Transcription Factor Fix/Perm Diluent (1X)	TNB-1022-L160	Thermo Fisher
Foxp3 / Transcription Factor Fix/Perm Concentrate (4X)	TNB-1020-L050	Thermo Fisher
PLA reagents		
Anti-rabbit probe PLUS	DUO92002	MERCK
Anti-mouse probe MINUS	DUO92004	MERCK
Detection reagents	DUO92008	MERCK
ProLong Diamond antifade mountants with DAPI	P36971	Thermo Fisher
RT-qPCR		
Reverse Aid	K1622	Thermo Fischer
TRIzol	12034977	Thermo Fischer
SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix	1725274	Bio-rad

Supplementary Table 3 : Primers sequence

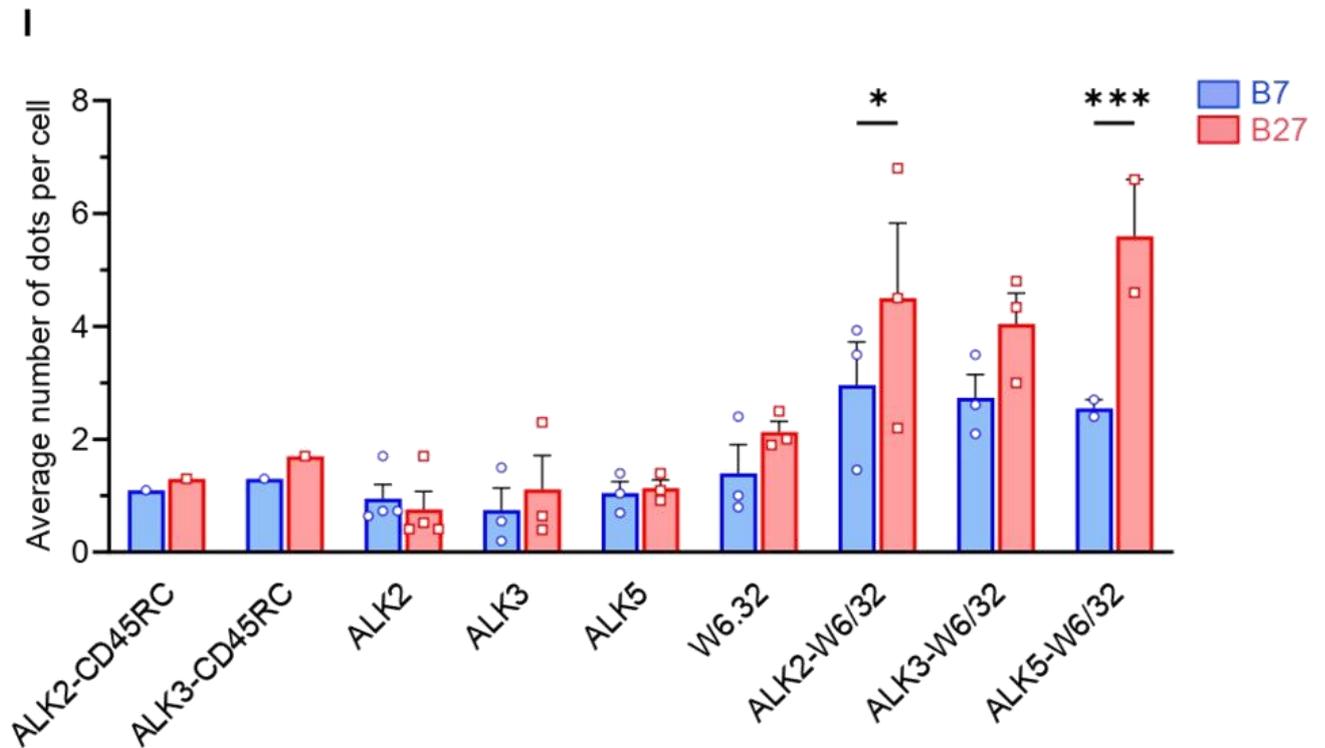
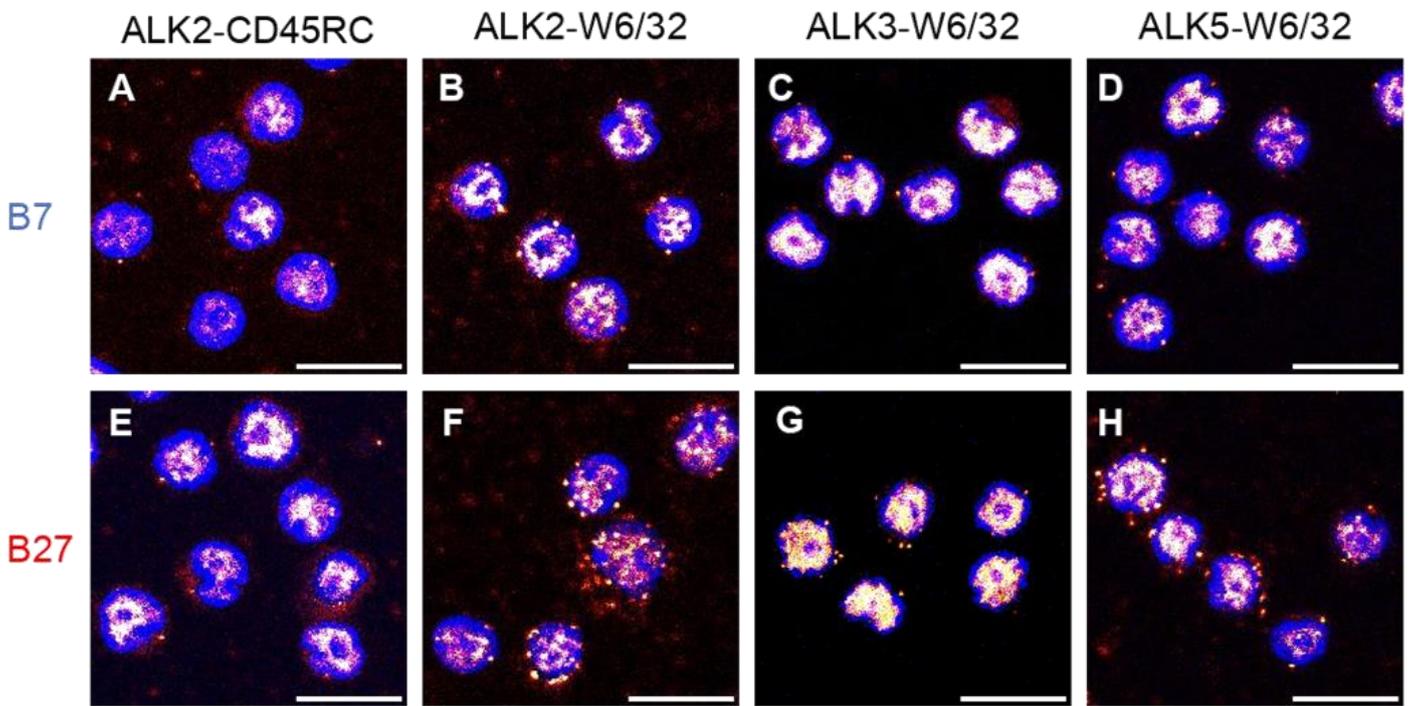
Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Gapdh</i>	AGCCCAGCAAGGATACTGAG	GGATGGAATTGTGAGGGAGA
<i>Acvr1</i>	GAACGGACAGTGCTGCATAG	AAGGCCCAAATATCGACCCT
<i>Bmpr1a</i>	CCAGACGGTGTTAATGCGTC	CCACAGGCAGCAGAATAAGC
<i>Acvr1b</i>	CTGCGCCATGAAAACATCCT	CAATGGTCACTGTGTAGCGG
<i>Tgfb1</i>	GAGAAGTTTGGCGAGGCAAA	CAACCACAGCTGAGTCCATG
<i>Acvr1c</i>	TGTGGAGAAGATGTGGCTGT	AAAGCGCCAACCTGACCATT
<i>Acvr2a</i>	TCAGACTGGTGTGAGCCTT	GTGTGACTTCCATCTCCGGA
<i>Acvr2b</i>	AGTTGCTGGAGATCAAGGCT	TGAAGATCTCCCGCTCACTC
<i>Bmpr2</i>	GGTGGCACGTGTGTTATCAG	TCACAGTCCCTCAGGTTTAC
<i>Runx1</i>	CCCTCAGCCTCAAAGTCAGA	GAAAGTTCCGCTGAGAGGCT
<i>Foxp3</i>	CTCTGGGGAAGCCATGGAAA	ATCGGATGAGGGTGGCATAG
<i>Rorc</i>	TACACGGCCTTGGTTCTCAT	GCAGATGCTCCACTCTCCTC
<i>Maf</i>	GAGAAGTTGGTGTGAGCAGCG	TCACAGATGTAGAAGAGTCCCT
<i>Smad7</i>	TCCAGACGCTGTACCTTCCT	CAGGCTCCAGAAGAAGTTGG
<i>Tgfb1</i>	GACTCTCCACCTGCAAGACC	CGAGCCTTAGTTTGGACAGG

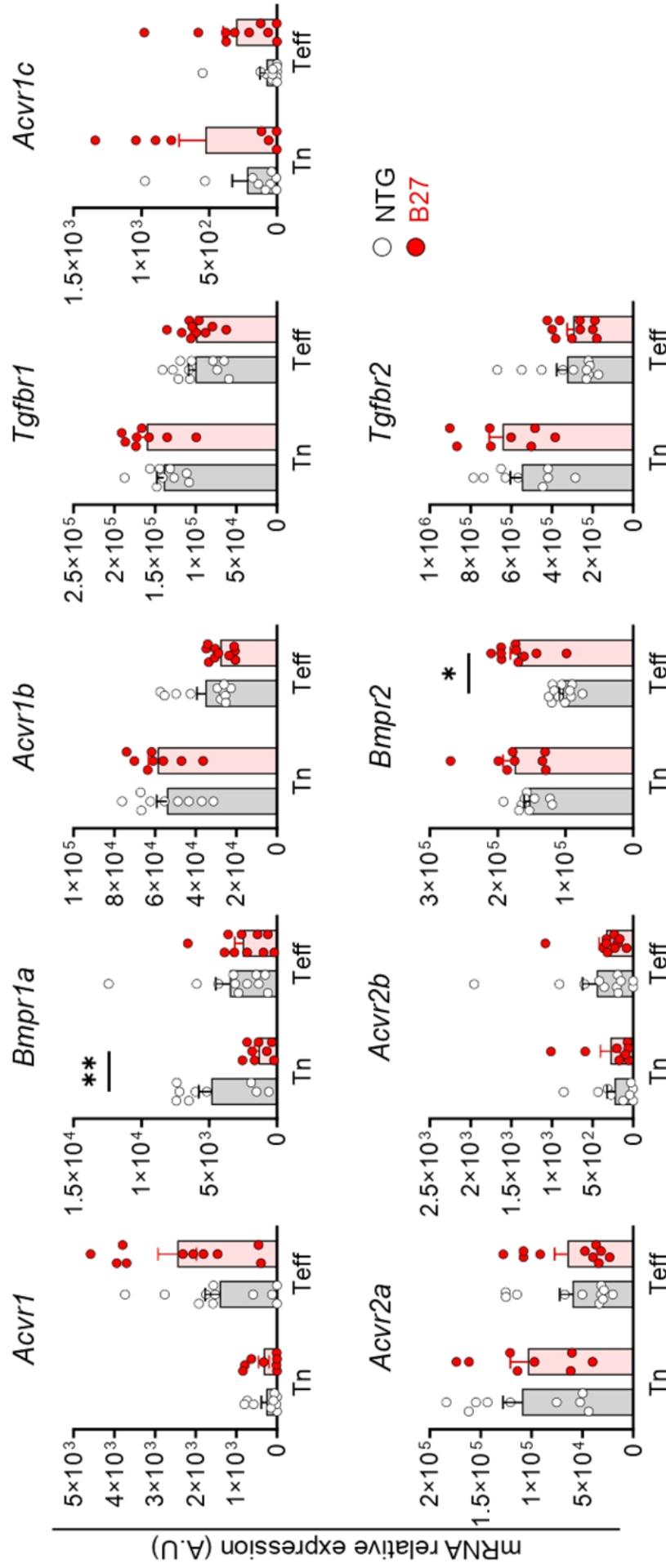


J

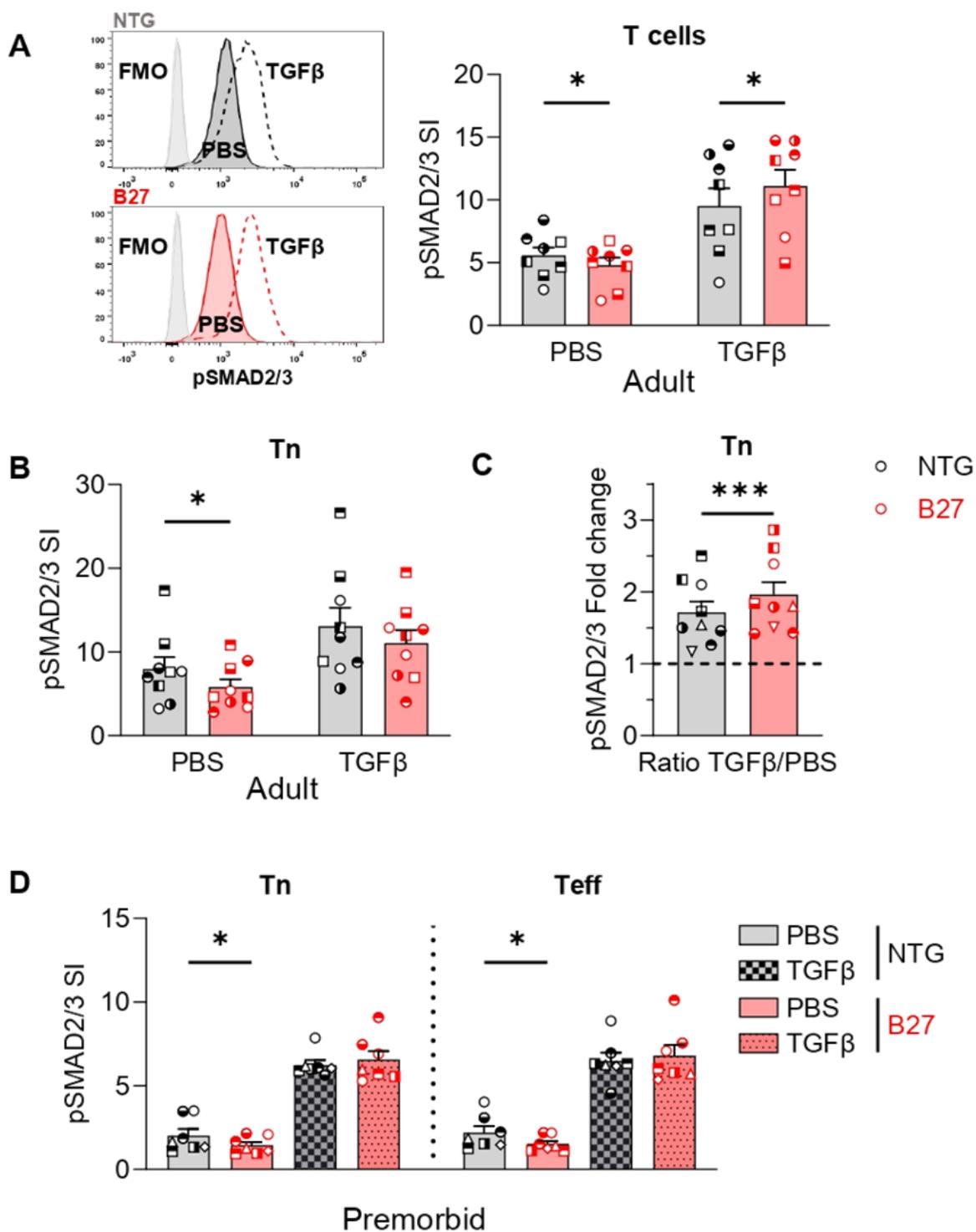


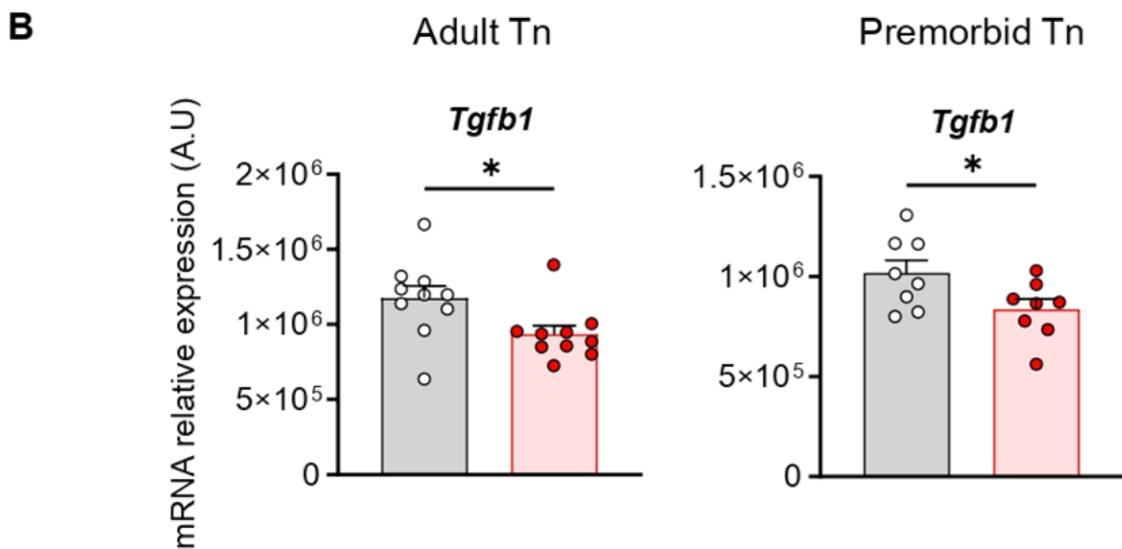
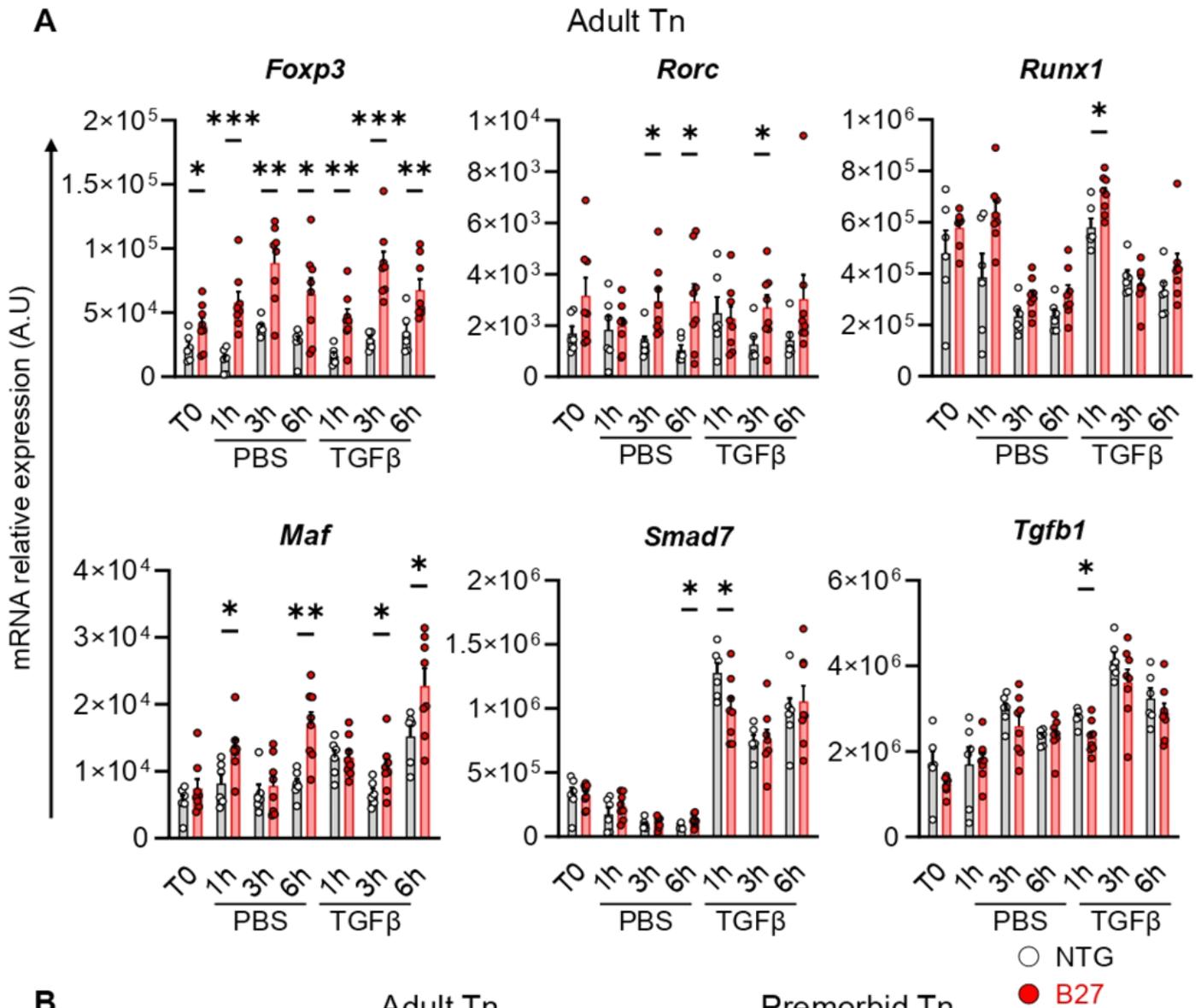
Lauraine et al., Figure 1

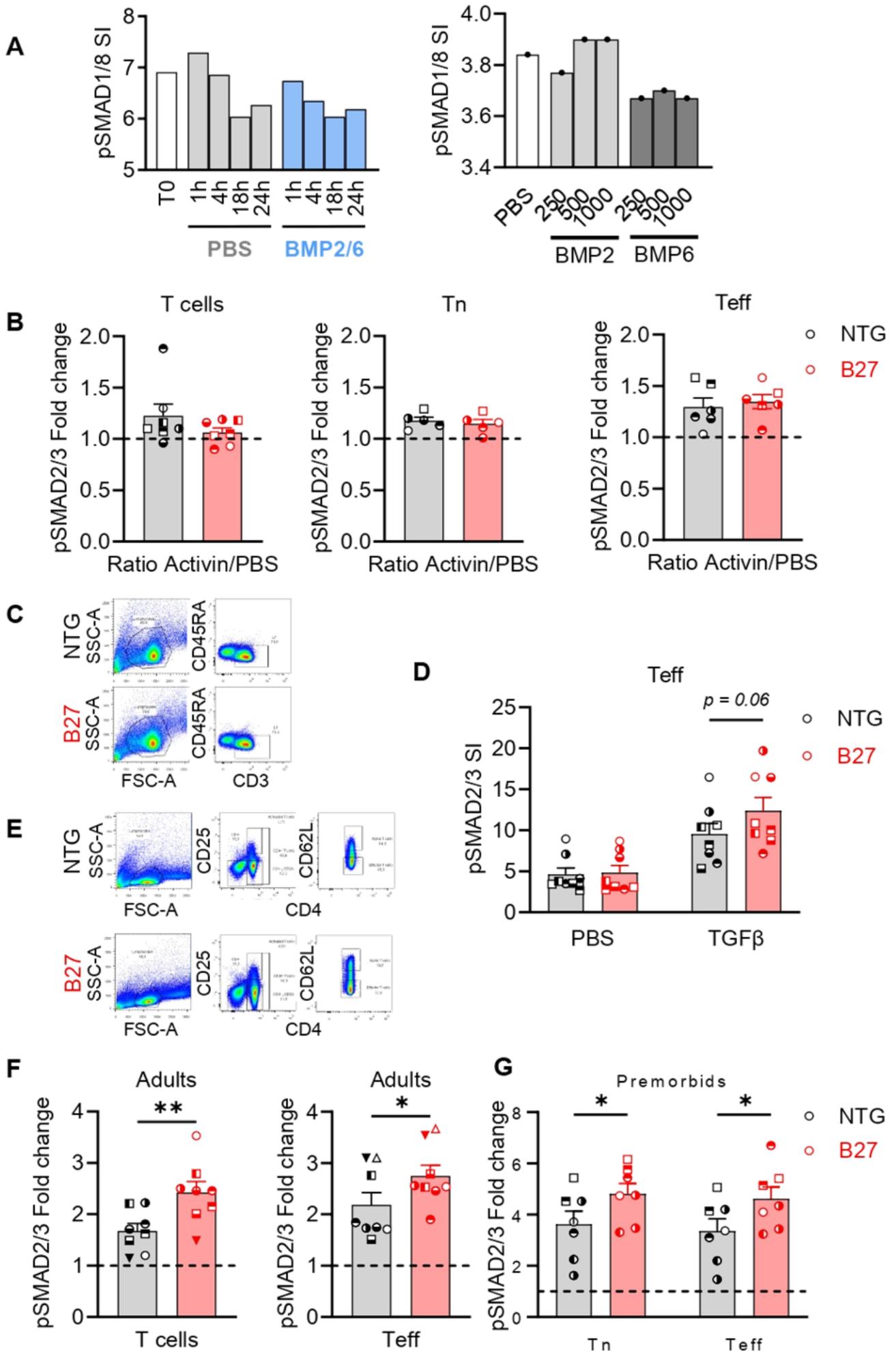


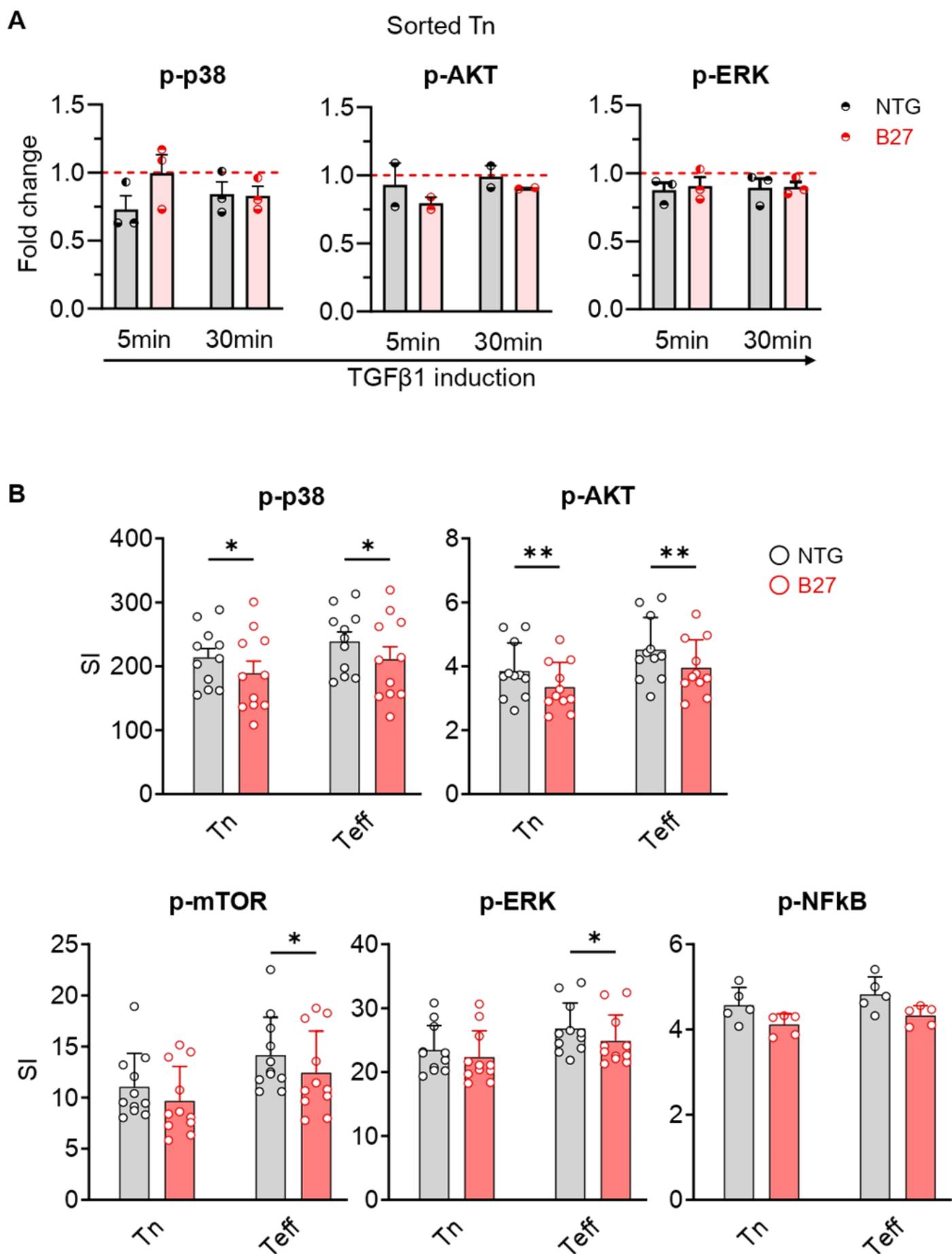


Lauraine et al., Figure 3









Discussion

L'association entre l'allèle HLA-B27 et la SpA a été mise en évidence il y a 50 ans (Brewerton et al., 1973; Schlosstein et al., 1973). Depuis, les études s'évertuent à décrypter les mécanismes physiopathologiques de cette association et de nombreuses avancées en ont découlé. Cela a permis d'améliorer de façon concrète, le quotidien des patients atteints de SpA, notamment grâce aux différentes thérapies ciblées atténuant l'inflammation (anti-TNF α , anti-IL-17 et plus récemment JAKi). Les animaux modèles tiennent une part très importante dans ces recherches. Bien que particulièrement pertinent, le modèle du rat B27 possède certaines limites, particulièrement lorsque l'on veut étudier les effets moléculaires de HLA-B27 hors du contexte de l'immunité adaptative. Pour cela, une collaboration de notre laboratoire avec un laboratoire travaillant sur la drosophile a permis de révéler une interaction génétique et physique du HLA-B27 avec certains acteurs de la voie de signalisation BMP/TGF β .

I. HLA-B27 chez la drosophile

Pour faciliter la lecture, le Tableau 6 ci-dessous reprend le nom des différents acteurs de la signalisation BMP/TGF β chez les vertébrés et *D. melanogaster*.

Vertébrés	<i>D. melanogaster</i>
Récepteurs	
ALK1/2	Sax
ALK3/6	Tkv
ALK4/5/7	Babo
ACVR2A/B	Punt
BMPR2	Wit
Ligands	
Activin/TGF β	Activin
BMP2/4/7	Dpp/Gbb
Transducteurs du signal	
SMAD1/5/8	Mad
SMAD2/3	Smox
SMAD4	Medea

Tableau 6 | Liste des principaux acteurs de la voie BMP/TGF β chez les vertébrés et chez *D. melanogaster*

A. Le peptidome associé à HLA-B27

L'un des objectifs de ma thèse était de caractériser le peptidome associé au HLA-B27 chez la drosophile transgénique. J'ai ainsi collecté les disques imaginaux d'aile de larves de drosophile exprimant HLA-B27 et la $h\beta 2m$ dans ce tissu. HLA-B27 étant correctement replié et n'induisant pas de stress du RE chez la drosophile, il était probable que des peptides lui soient associés, même si la drosophile ne possède pas le PLC -associant le transporteur TAP, les chaperones tapasine et calréticuline et l'oxydo-réductase ERp57- propre aux organismes exprimant le CMH-I. L'analyse du peptidome réalisée par le laboratoire du Pr. Arie Admon (Faculté de Biologie, Institut de Technologie, Technion, Israel) a, en effet, permis de mettre en évidence 54 peptides spécifiquement associés au HLA-B27, dont une majorité (53%) possédaient l'un des deux résidus caractéristiques du motif de fixation au HLA-B27, à savoir une arginine ou une glutamine en position 2. La comparaison de ce peptidome avec ceux obtenus à partir de cellules humaines exprimant le HLA-B27 ou du rat B27 n'a pas permis de mettre en évidence de recoupement entre les séquences peptidiques. Cependant, certains des peptides de drosophile liés spécifiquement au HLA-B27 proviennent de protéines impliquées dans des processus très généraux ou des structures cellulaires très communes, ce qui est partagé avec le peptidome de l'Homme et celui du rat. C'est notamment le cas de peptides de l'actine, de la tubuline ou encore de peptides provenant de la dégradation des ribosomes (Barnea et al., 2017; Ben Dror et al., 2010). De façon intéressante, il a été rapporté que chez la drosophile, HLA-B27 avait une meilleure capacité de repliement qu'HLA-B7 et était ainsi d'avantage exprimé à la membrane plasmique (Grandon et al., 2019; Jackson et al., 1992). De fait, le travail de collecte des disques imaginaux d'aile qui aurait été nécessaire pour caractériser le peptidome de drosophile associé au HLA-B7 n'était pas envisageable. Mais cela nous aurait permis de déterminer si un repliement et un adressage à la membrane plasmique moins efficaces étaient associés à une plus grande stringence d'HLA-B7 à vis à vis du chargement en peptides en l'absence du PLC.

B. Interaction d'HLA-B27 avec la voie BMP/TGF β .

En parallèle de ma thèse, Maxence De Taffin De Tilques, un post-doctorant du laboratoire LGBC (nos collaborateurs drosophilistes), a démontré une interaction génétique entre HLA-B27 et la signalisation activine chez la drosophile (qui correspond aux voies activine et TGF β chez les mammifères). L'hypothèse avancée étant qu'une suractivation de la voie activine pourrait participer au phénotype « crossveinless » chez la drosophile HLA-B27, Maxence a testé l'effet d'ARN interférents (RNAi), ciblant les différents acteurs de la voie, sur le phénotype de perte des veines transversales. Alors que l'inhibition de la voie de l'activine n'a pas eu d'effet particulier chez la drosophile sauvage, la co-expression avec HLA-B27/ $h\beta 2m$ des RNAi dirigés contre l'activine (le ligand), Babo (le récepteur, orthologue d'ALK5) ou Smox (le transducteur intracellulaire du signal, orthologue de SMAD2/3) a permis de restaurer dans les trois cas les veines transversales lors du développement de l'aile. Les résultats sont ceux des Figures 1B et C de l'article principal. Ces expériences de sauvetage confirment une activation inappropriée de la voie de l'activine dans les disques imaginaux de l'aile de

drosophile en présence du HLA-B27 et de la $\beta 2m$. Il aurait été particulièrement intéressant de tester une potentielle interaction physique du HLA-B27 avec le récepteur BMPR1 à l'activine, Babo. Cependant, aucun anticorps efficace n'était disponible pour permettre cela.

II. HLA-B27 et la voie BMP/TGF β

Un autre objectif important de ma thèse était de vérifier si l'interaction d'HLA-B27 avec ALK2 (orthologue de Sax) précédemment mise en évidence dans les lignées lymphoblastoïdes (EBV) de patients était également observée dans les lymphocytes de rat B27 et d'étendre cette étude à d'autres récepteurs de type I (ALK3 et ALK5, orthologues respectifs de Sax et Babo). Dans un premier temps j'ai confirmé la présence de chacun de ces récepteurs par Western-blot dans les LT CD4⁺ de rat B27. J'ai ensuite pu confirmer qu'il existait bien une interaction d'HLA-B27 avec ALK2 mais également avec ALK5 dans les lymphocytes de rats B27 significativement supérieure à celle observée dans les cellules de rats B7. L'interaction du HLA-B27 avec ALK3 n'était pas significativement différente de celle observée avec le HLA-B7, témoignant d'une spécificité de cette interaction préférentielle pour ALK2 et ALK5. Ayant établi qu'il existait une interaction physique entre HLA-B27 et les deux BMPR1 orthologues de Sax et Babo dans les lymphocytes de rats B27, nous avons voulu savoir si les voies de signalisation correspondantes étaient affectées par ces interactions. Nous avons donc étudié la réponse des LT CD4⁺ à différents ligands des voies BMP, activine et TGF β . Nous n'avons toutefois observé de réponse qu'avec la stimulation par le TGF β 1 et nous avons montré que l'amplitude de cette réponse était plus forte chez les rats B27, ce d'autant que le niveau de phosphorylation basal de SMAD2/3 y était plus bas. Il est cependant intrigant qu'aucune réponse aux BMP n'ait été observée alors même que les récepteurs de la voie étaient présents dans les lymphocytes (en PCR et/ou en Western blot pour ALK2 et ALK3). De même, nous n'avons observé qu'une réponse très faible ou inexistante à l'activine dans les LT CD4⁺. C'est pourquoi nous nous sommes concentrés sur l'étude de la réponse au TGF β 1.

A. La signalisation BMP

Malgré l'absence de réponse des LT CD4⁺ de rat aux BMP et à l'activine dans nos conditions expérimentales, il est connu que ces ligands jouent un rôle important dans le développement et l'homéostasie des LT.

1. Le récepteur ALK3

Si l'on prend le cas du récepteur ALK3, son inactivation dans les LT entraîne un défaut de développement des tTreg du thymus ainsi qu'une perte de la différenciation pTreg en périphérie (Kuczma et al., 2014). De façon intéressante, l'étude des conséquences de la perte d'ALK3 dans les Treg a révélé une augmentation des transcrits codant pour des cytokines ou facteurs de transcription pro-inflammatoires tels que l'IFN- γ , l'IL-17, l'IL-6 et RORC,

caractéristiques des Th1 ou Th17. Ces données mettent en lumière que l'absence de signalisation BMP affecte la stabilité du phénotype des Treg et augmente leur plasticité (souvent rapportée comme pathogène) (Browning et al., 2020). Poursuivant son travail, la même équipe a ensuite montré que la signalisation BMP *via* ALK3 exerçait un effet inhibiteur sur la différenciation Th17 (Browning et al., 2018). En effet, dans des conditions de différenciation Th17 *in vitro*, l'ajout de BMP (2,4 et 7) réduit fortement la production d'IL-17 et ce *via* la réduction de l'activation de STAT3 par l'IL-6. De plus, cette étude a révélé une augmentation des transcrits codant pour le récepteur à l'IL-1 (*IL1R1*) dans les lymphocytes T CD4⁺ activés déficients pour ALK3. Chez le rat B27, on aurait pu s'attendre à ce que l'interaction d'HLA-B27 avec la voie BMP puisse perturber ses effets inhibiteurs sur l'activation de STAT3 et facilite la différenciation Th17, ce d'autant que les transcrits codant pour l'IL-1R1 sont plus élevés dans les Tn de rats B27 que dans ceux de rats NTG (Cherqaoui et al., 2023).

2. Le récepteur ALK2

En ce qui concerne le récepteur ALK2 (ACVR1), plusieurs mutants sont impliqués dans différentes pathologies dont les deux plus intéressantes dans le cadre de la SpA sont la **Fibrodisplasie Ossifiante Progressive (FOP)** et l'**Hyperostose Squelettique Idiopathique Diffuse (DISH)**. La première est caractérisée par la formation ectopique d'os dans des tissus mous (muscles squelettiques, ligaments et tendons) et la deuxième est caractérisée par la calcification et l'ossification des ligaments spinaux et des sites enthésitiques. Ces deux pathologies sont associées à une hypersensibilité de la voie BMP et dans le cas de la FOP, l'activine A est en plus capable d'induire la signalisation de type BMP *via* ALK2. Ce dernier point pourrait expliquer la formation osseuse ectopique dans la FOP qui n'est pas observé dans la DISH (Katagiri et al., 2021). La SpA étant elle aussi associée à une ossification aberrante de certaines articulations, il est plausible qu'elle partage certains mécanismes, impliquant les voies de signalisation BMP/TGFβ avec ces pathologies.

3. BMP et homéostasie lymphocytaire

Dans des maladies inflammatoires autres que la SpA, il a été rapporté que l'inhibition de la signalisation BMP augmentait l'inflammation induite par l'IL-17 dans la PR et, qu'au contraire, les BMP amélioreraient l'inflammation intestinale et rénale (Maric et al., 2012; Takabayashi et al., 2014; Varas et al., 2015; Zeisberg et al., 2003). L'importance de la voie BMP dans l'activation et l'homéostasie des LT a par ailleurs été démontrée dans les cellules humaines. Après stimulation du TCR des Tn CD4⁺, la production de BMP est augmentée et, agissant de façon autocrine, régule la prolifération induite par l'IL-2. On note aussi que l'IL-7 (cytokine importante pour la survie des LT) induit la signalisation BMP (Martínez et al., 2015).

Etant donné l'implication plausible d'une perturbation de la voie BMP dans la SpA et mes résultats de PLA montrant une interaction entre HLA-B27 et ALK2 dans les lymphocytes de rat B27, il est possible que les conditions expérimentales adéquates pour en étudier les

conséquences n'aient pas été trouvées au cours de mon travail (temps d'induction, dose, rapporteur d'activation...). De plus, il est possible que l'effet d'HLA-B27 sur la signalisation BMP soit plus nuancé que celui observé chez la drosophile notamment du fait d'une plus grande diversité des récepteurs.

Enfin, si l'interaction d'HLA-B27 avec les récepteurs de la voie BMP/TGF β était généralisable à d'autres types cellulaires, il serait intéressant d'en étudier les effets dans d'autres types cellulaires répondant davantage aux ligands BMP, tels que les chondrocytes. En effet, il a été montré dans des biopsies d'excroissance osseuse d'enthèse de patients atteints de SpA, une activation de la signalisation BMP avec détection de la phosphorylation de SMAD1/5 (Lories et al., 2005).

Pour en finir avec la signalisation BMP, une publication a montré que la signalisation BMP4 passait par p38 plutôt que par SMAD dans les LT (Fiori et al., 2006). Il serait intéressant d'explorer cette voie en mesurant la phosphorylation de p38 après induction par BMP4.

B. La signalisation active dans les Th17

Dans les conditions expérimentales testées dans mon travail, l'activine n'a pas ou peu induit de phosphorylation de SMAD2/3 dans le LT CD4⁺ de rat. Cependant, une telle réponse, d'amplitude toutefois inférieure à celle induite par le TGF β 1 a été précédemment observée dans les lymphocytes sanguins de patients atteints de SpA et de témoins sains. Récemment, un article a montré le rôle pro-inflammatoire pathogène de l'activine A autocrine dans un modèle d'EAE chez la souris (Figure 21 extraite de (Wu et al. 2021)).

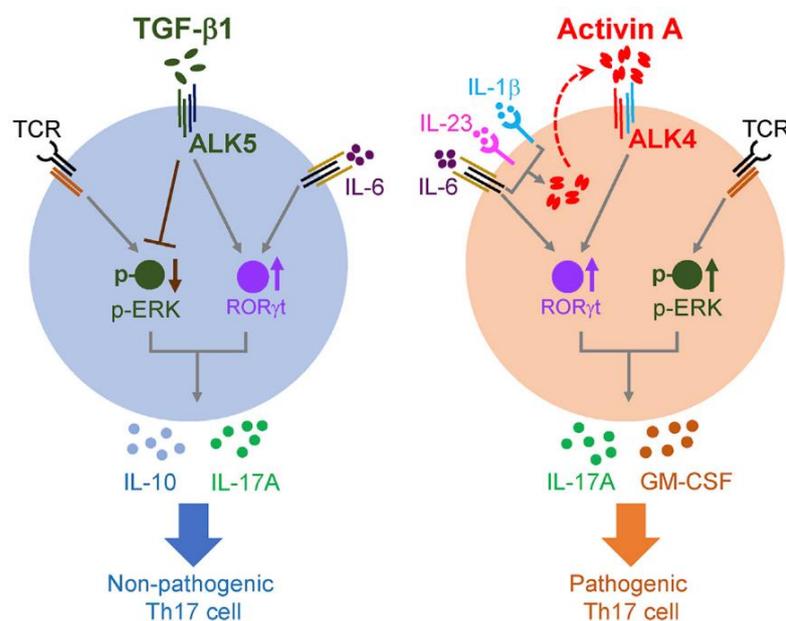


Figure 21 | Résumé de l'effet de l'activine A autocrine sur le développement de Th17 pathogènes.

Dans cet article, par des approches gains et pertes de fonction, les auteurs démontrent que, dans un contexte inflammatoire, l'activine A endogène induit la différenciation de Th17 pathogène *via* le récepteur ALK4 alors que le TGF β 1 induit la différenciation de Th17 non-

pathogène via ALK5⁴² et la déphosphorylation de ERK1/2. Les auteurs soulignent qu'une autre étude montre au contraire un effet protecteur de l'activine A, mais cette fois ci exogène, sur la pathogénicité des Th17, tout en favorisant la différenciation Treg (Morianos et al., 2020). L'activine A est par ailleurs été déjà décrite comme favorisant la différenciation Treg induite par le TGFβ (Huber et al., 2009).

L'activine A est donc impliquée dans la différenciation des LT CD4⁺, c'est pourquoi j'ai mesuré par RT-qPCR les transcrits du gène *Inhba* codant pour l'activine A dans les lymphocytes Tn et Teff de rat NTG et B27 mais n'ai observé aucune différence. Cependant, étant donné l'observation du rôle autocrine de l'activine A, estimer ce taux directement dans les Treg ou Th17 différenciés serait intéressant. Concernant la diminution de p-ERK en réponse au TGFβ1 dans des conditions de différenciation Th17 mentionné ci-dessus (Figure 21), il se trouve que j'ai étudié par Western blot p-ERK dans des LT CD4⁺ après stimulation à l'activine A et au TGFβ1 mais n'ai constaté aucune modulation. De même j'ai mesuré la phosphorylation de ERK, p38 et AKT en réponse aux cocktails de différenciation Th17 ou Treg sans voir d'effet sur l'activation de ces protéines.

Cependant la diminution de p-ERK en réponse à la différenciation Th17 (induite en présence d'IL-6, IL-1β, IL-23 et TGFβ1) décrite dans l'article, cité plus haut (Morianos et al., 2020), était observée après 2 jours de culture. Dans le cadre de ma thèse, nous avons voulu étudier les éventuelles perturbations de la voie BMP/TGFβ pendant des durées d'incubation courtes afin de pouvoir les relier de façon aussi directe que possible aux effets des ligands utilisés en présence du HLA-B27.

C. Signalisation TGFβ et inflammation

Comme décrit précédemment dans mon manuscrit, dans les lymphocytes de patients, la phosphorylation de SMAD2/3 était augmentée à l'état de base et exacerbée en réponse aux ligands activine A et TGFβ1 (Figure 20). L'étude de la réponse au TGFβ1 des lymphocytes de rat B27 a également révélé une phosphorylation exacerbée (Figure 4A de la section résultats).

1. Signalisation non-canonique de la β2m via ALK5/TGFBR2

Un article récent démontre que la β2m issue des plaquettes peut signaler via ALK5/TGFBR2 et induire les voies non-canoniques JNK et NFκB l'activation de TAK1 ainsi que l'ubiquitinylation de SMAD2/3 et de SMAD4 dans des monocytes murins (Hilt et al., 2021). Les résultats de cette étude sont résumés dans la Figure 22 ci-dessous, qui provient de l'article :

⁴² La pathogénicité des Th17 est mesurée par leur capacité à induire une inflammation lorsqu'elles sont transférées dans des souris irradiées

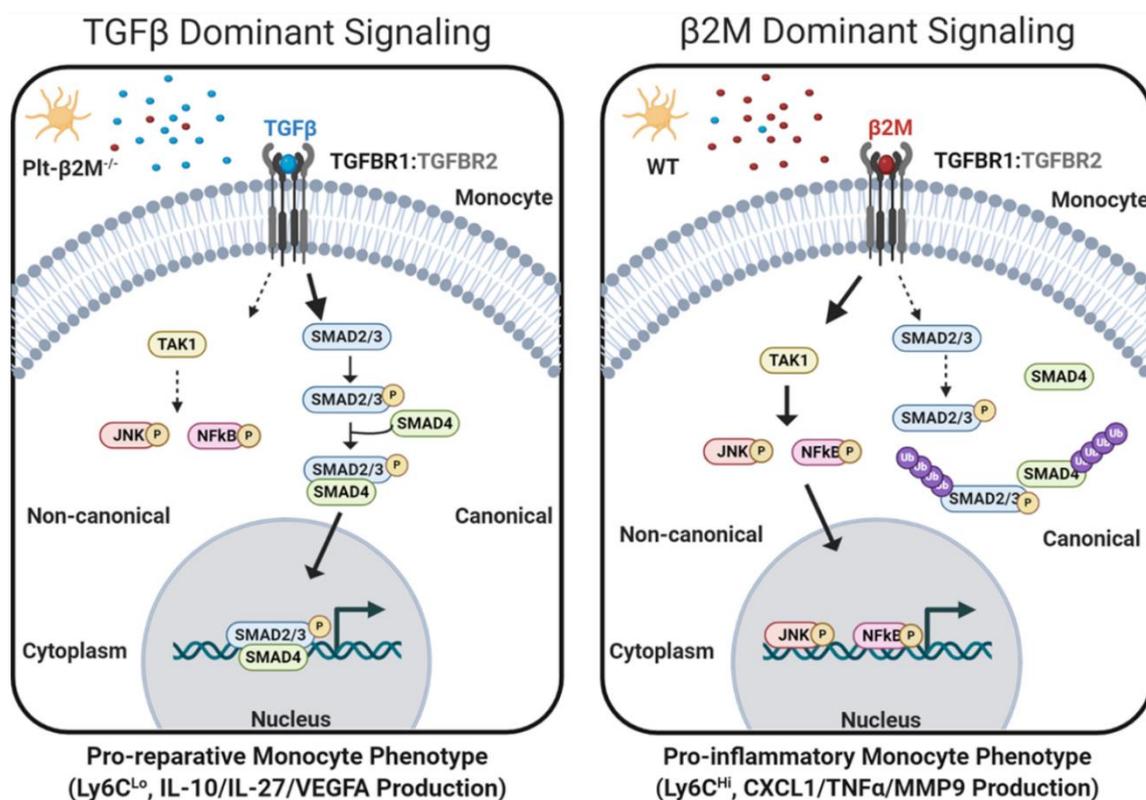


Figure 22 | Signalisation pro-inflammatoire de la $\beta 2m$ dans les monocytes de souris

L'induction de la voie TGF β par la $\beta 2m$ dans les monocytes est décrite comme pro-inflammatoire alors que celle induite par le TGF β est plutôt pro-réparative. Ces résultats sont particulièrement intéressants car ils mettent en lumière une balance entre signalisation canonique et non-canonique ainsi que l'importance de l'ubiquitinylation des SMAD dans la régulation de la voie du TGF β . De fait, la proximité physique mise en évidence par le PLA entre HLA-B27 et ALK5 pourrait contribuer à favoriser la signalisation non-canonique de la voie du TGF β par la $\beta 2m$ et ainsi induire un signal pro-inflammatoire dans les LT. Dans cette perspective, il est intéressant de noter que l'interaction d'HLA-B27 avec la $\beta 2m$ est plus forte que celle d'autres allèles du CMH-I (T. M. Tran et al., 2000). Par curiosité, j'ai mesuré la phosphorylation de NF- κ B en réponse à la h $\beta 2m$ exogène dans des LT CD4⁺ de rats mais n'ai toutefois constaté aucune activation dans mes conditions expérimentales.

2. Signalisation TGF $\beta 1$ autocrine et stabilité des phénotypes Treg et Th17

J'ai comparé le taux de transcrite de différents gènes d'intérêts, connus comme modulés par le TGF β et impliqués dans la différenciation des Treg et Th17, sans et après exposition au TGF β des Tn de rats. Les gènes *Foxp3*, *Rorc* et *Runx1* étaient plus exprimés chez les rats B27, sans et/ou après exposition au TGF β , ce qui pourrait indiquer une réponse accrue au TGF β . Les produits de ces 3 gènes étant essentiels pour la différenciation des Tn en Treg et Th17, cette observation est particulièrement intéressante (F. Zhang et al., 2008). J'ai par ailleurs mis en évidence une diminution de la phosphorylation basale de SMAD2/3, ce qui pourrait être la conséquence d'une plus forte activation par le TGF β et d'un rétrocontrôle négatif de la voie par l'induction de phosphatases. Ce résultat intéressant m'a poussé à évaluer le taux de transcrits du *Tgfb1*, lui-même induit par la voie dans les Tn et Teff. Les résultats montrent un

taux de transcrits de *Tgfb1* plus bas chez les rats B27 que chez les rats NTG dans les deux types cellulaires. Cette observation est particulièrement intéressante si on la met en parallèle des études montrant que le TGF β autocrine est primordial pour le maintien du profil Treg mais également pour limiter la pathogénicité des Th17 (Choi et al., 2020, 2021). Les modèles proposés dans ces deux articles sont présentés ci-dessous (Figure 23, Figure 24):

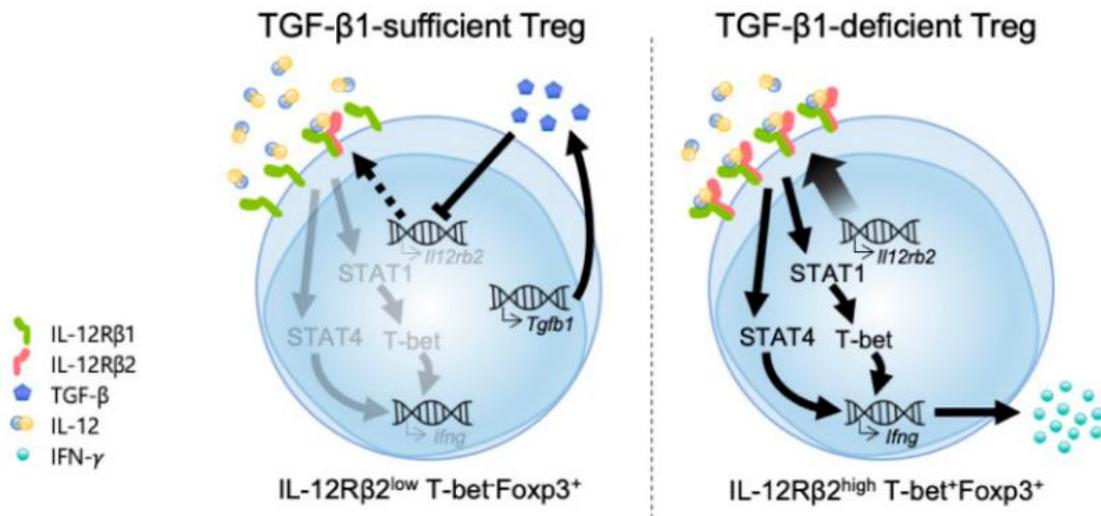


Figure 23 | Modélisation du mécanisme de stabilisation du phénotype des Treg par le TGF β 1 autocrine (proposé par Choi et Al. 2020).

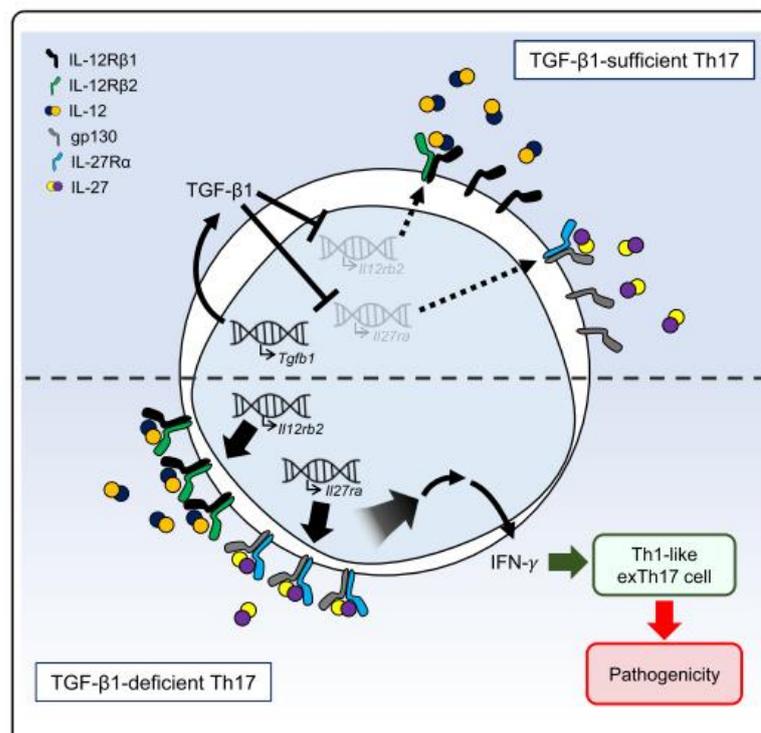


Figure 24 | Modèle de la stabilisation du phénotype des Th17 induit par le TGF β 1 autocrine (proposé par Choi et Al. 2021).

Ces deux études ont été menées grâce à l'utilisation du système Cre-Lox chez la souris combinée au suivi du lignage cellulaire. Dans le cas de l'étude des Treg, le système permet d'induire une perte de fonction de *Tgfb1* lorsque les lymphocytes expriment *Foxp3* alors que dans l'étude des Th17, la perte de fonction de *Tgfb1* est activée lorsque les lymphocytes expriment *Il17a*. Dans les deux cas, la perte d'expression de *Tgfb1* s'accompagne d'une augmentation de l'expression du gène *Il12rb2* codant pour le récepteur IL-12 β R2. La signalisation *via* ce récepteur induit l'expression du gène *Ifng* et la sécrétion d'IFN- γ , caractéristique des Th1.

Il serait intéressant de mesurer le taux de TGF β 1 *in vivo* dans les ganglions de rats B27 ou *in vitro* dans le surnageant de culture après une différenciation Treg et Th17 et de le comparer à celui observé chez les rats NTG.

Cependant, dans le cadre de ma thèse, mon but étant de déceler des perturbations de la signalisation BMP/TGF β pouvant induire le biais de différenciation Th17, je me suis particulièrement intéressé aux Tn et non pas aux Teff. Notamment, notre équipe a récemment montré une empreinte épigénétique en faveur de la différenciation Th17 dans les Tn de rats B27 (Cherqaoui et al., 2023) (Annexe II : Article 3, Figure 3).

3. Le biais de différenciation Th17

Toujours dans le but de découvrir les événements précoces conduisant au biais de différenciation Th17 observé dans la SpA, notre équipe s'est intéressée aux précurseurs des Tn CD4⁺, les thymocytes CD4⁺CD8⁺ DP et CD4⁺ SP. Nos résultats ont révélé une expression diminuée de *Stat1* dans les CD4⁺ SP des rats B27 prémorbides (moins de 3 semaines) et nouveau-nés (10 jours). Cette observation était corroborée par une plus faible expression protéique de STAT1 dans les Tn de rats B27 prémorbides et adultes. De plus, en réponse à l'IL-27, le niveau de phosphorylation de STAT1 était diminué chez les rats B27 prémorbides et adultes par rapport aux rats NTG (Annexe II : Article 3, Figure 4). Cette phosphorylation abaissée de STAT1 en réponse à l'IL-27 est particulièrement intéressante puisque l'IL-27 est connue pour inhiber la différenciation Th17. En revanche, contrairement à ce qui a été observé dans les Treg et Th17 par Choi et al, en cas de déficience de production de TGF β autocrine, nous n'avons observé aucune augmentation de l'expression des gènes *Il27ra* ou *Il12rb2*.

Dans le cadre du cancer épithélial ovarien, il a été démontré que STAT1 bloque l'activation de SMAD2 induite par le TGF β 1 par une interaction avec les récepteurs ALK5 et TGFBR2 (Tian et al., 2018). Il est alors possible de penser que la baisse de STAT1 observée chez les rats B27 pourrait affecter la signalisation TGF β 1 dans certains contextes.

Durant ma thèse, je n'ai pas pu faire le lien direct entre le biais de différenciation Th17 des Tn de rats B27 prémorbides et signalisation TGF β mais d'autres travaux du laboratoire confirment l'existence de ce biais de différenciation à la suite d'une stimulation du TCR (Cherqaoui et al., 2023). De plus, des résultats très récents de RNAseq sur des Tn de patients SpA et de témoins sains, dont le TCR a été stimulé ou non, révèlent d'ores et déjà que beaucoup de gènes liés à la différenciation Th17 sont surexprimés chez les patients SpA par rapport aux témoins sains.

Conclusion

La drosophile a permis de mettre en évidence une interaction insoupçonnée d'HLA-B27 avec la voie BMP/TGF β . Dans ce modèle, par son interaction avec le récepteur Sax, HLA-B27 entraîne une suractivation de la voie BMP. Depuis, nous avons pu démontrer une interaction génétique d'HLA-B27 avec la voie activine puisque l'inactivation du ligand, du récepteur ou du transducteur du signal, lors du développement de l'aile, restaure son phénotype sauvage. Nous avons également mis en évidence qu'HLA-B27 était porteur d'un peptide dans les disques imaginaires d'ailes de drosophile malgré l'absence du PLC. Dans les lymphocytes de rats B27, l'interaction physique de la forme bien repliée d'HLA-B27 avec ALK2 et ALK5 a pu être établie. Une perturbation de la voie de signalisation du TGF β entraînée par cette interaction est particulièrement pertinente puisque le TGF β est impliqué à la fois dans la différenciation des Treg et des Th17. Or, le modèle du rat B27 se caractérise par un phénotype altéré des Treg, d'une part, marqué par une surproduction d'IL-17 et un défaut de production d'IL-10 et, d'autre part, par une expansion exagérée des Th17. Dans le but de comprendre le lien entre une perturbation de la voie BMP/TGF β et le phénotype altéré des Treg ainsi que l'expansion des Th17, j'ai étudié la réponse de leurs précurseurs, les Tn, à différents ligands de la voie BMP/TGF β chez les rats B27 en comparaison avec le rat NTG. Afin d'établir un lien direct entre la signalisation induite et les événements précoces de la différenciation, la réponse a toujours été étudiée après des temps de stimulation courts. Dans les conditions expérimentales testées, ni l'activine, ni le TGF β n'ont permis d'induire les voies non-canoniques (P38, ERK1/2, AKT et cofiline). Parmi les 3 ligands BMP testés (BMP2, BMP4, BMP6) aucun n'a entraîné de phosphorylation des protéines canoniques SMAD1/5/8. De l'activine A et du TGF β 1, seul le TGF β 1 a induit une phosphorylation significative de SMAD2/3. Aussi, nous sommes-nous concentrés sur l'étude de la réponse au TGF β 1 et avons constaté des différences basales de phosphorylation de SMAD2/3 ainsi que des différences dans l'expression de certains gènes (*Foxp3*, *Rorc*, *Runx1*, *Tgfb1*). Ces différences pourraient être la conséquence d'une activation préalable de la voie TGF β dans les Tn qui pourrait avoir induit une régulation négative (phosphatase, marques épigénétiques). Ces observations pourraient rendre compte du biais de différenciation Th17 des Tn de rats B27 consécutif à une inhibition de la voie Th1. En effet, le TGF β favorise la différenciation Th17 en inhibant l'antagonisme des facteurs transcriptionnels de la voie Th1 et notamment T-bet. De plus, le *Tgfb1* qui est lui-même moins exprimé par les lymphocytes T des rats B27 joue un rôle capital dans la différenciation Treg. Si l'expression de ce gène est affectée dans les Treg et les Th17, la diminution de la signalisation TGF β 1 pourrait avoir de lourdes conséquences sur la stabilité et la fonction de ces types cellulaires favorisant leur pathogénicité. Notamment avec la transdifférenciation des Treg en exTreg pathogénique producteurs d'IFN γ ou d'IL-17 ainsi que de Th1-like exTh17 pathogéniques.

Ainsi, mes travaux apportent des éléments d'explication sur l'effet d'HLA-B27 sur la signalisation BMP/TGF β dans les Tn CD4⁺ des rats B27. Une caractérisation précise des Th17 différenciées à partir de Tn B27 en comparaison à celles différenciées à partir de Tn NTG

apporterait très certainement des pistes intéressantes. Une caractérisation protéomique et transcriptomique approfondis des Treg et Th17 de rats NTG et B27, ainsi qu'un étude de la stabilité de leur phénotype pourraient également apporter des informations précieuses. Le plus intéressant serait un suivie des lignages Treg et Th17, malheureusement, les outils nécessaires ne sont pas disponibles chez le rat. Enfin, dans les Tn, l'étude des différences de modifications post-traductionnelles (phosphorylation et ubiquitinylation) entre rats NTG et B27 seraient intéressantes. En effet, les résultats de transcriptomique récents effectuée sur les Tn de rats prémorbides et adultes montrent une modulation importante des ARN codants pour des phosphatases ou des ubiquitines ligases entre rats NTG et B27.

Annexe I: Article 2

Interleukin 27 is a novel cytokine with anti-inflammatory effects against spondyloarthritis through the suppression of Th17 responses.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Li-Tung Huang,
Kaohsiung Chang Gung Memorial
Hospital, Taiwan

REVIEWED BY

Philippe Saas,
U1098 Interactions Hôte-Greffon-
Tumeur & Ingénierie Cellulaire et
Génique (INSERM),
France
Maria Margarida Souto-Carneiro,
Heidelberg University Hospital,
Germany
Kai Kisand,
University of Tartu, Estonia

*CORRESPONDENCE

Luiza M. Araujo
✉ luiza.krause@inserm.fr

†These authors have contributed
equally to this work

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to
Autoimmune and Autoinflammatory
Disorders: Autoinflammatory
Disorders,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

RECEIVED 17 October 2022

ACCEPTED 19 December 2022

PUBLISHED 02 February 2023

CITATION

Jouhault Q, Cherqaoui B,
Jobart-Malfait A, Glatigny S,
Lauraine M, Hulot A, Morelle G,
Hagege B, Ermoza K, El Marjou A,
Izac B, Saintpierre B, Letourneur F,
Rémy S, Anegon I, Boissier M-C,
Chiocchia G, Breban M and
Araujo LM (2023) Interleukin
27 is a novel cytokine with anti-
inflammatory effects against
spondyloarthritis through the
suppression of Th17 responses.
Front. Immunol. 13:1072420.
doi: 10.3389/fimmu.2022.1072420

Interleukin 27 is a novel cytokine with anti-inflammatory effects against spondyloarthritis through the suppression of Th17 responses

Quentin Jouhault^{1,2†}, Bilade Cherqaoui^{1,2†},
Aude Jobart-Malfait^{1,2}, Simon Glatigny^{1,2}, Marc Lauraine^{1,2},
Audrey Hulot^{1,2}, Guillaume Morelle^{1,2}, Benjamin Hagege^{1,2},
Kétia Ermoza^{1,2}, Ahmed El Marjou³, Brigitte Izac⁴,
Benjamin Saintpierre⁴, Franck Letourneur⁴, Séverine Rémy⁵,
Ignacio Anegon⁵, Marie-Christophe Boissier⁶,
Gilles Chiocchia^{1,2,7}, Maxime Breban^{1,2,8†}
and Luiza M. Araujo^{1,2*†}

¹Infection & Inflammation, UMR 1173, Inserm, UVSQ/Université Paris Saclay, Montigny-le-Bretonneux, France, ²Laboratoire d'Excellence Inflamex, Université Paris-Centre, Paris, France, ³Plateforme de production d'anticorps et de protéines recombinantes-Institut Curie/CNRS UMR144, Paris, France, ⁴Plateforme GenomIC- Université de Paris, Institut Cochin, INSERM-CNRS, Paris, France, ⁵Platform Transgenic Rats and ImmunoPhenomics, INSERM UMR 1064-CRTI, Nantes, France, ⁶Inserm UMR1125-Université Sorbonne Paris Nord, Rheumatology Division, Avicenne Hospital (AP-HP), Bobigny, France, ⁷Haematology-Immunology Division, Ambroise Paré Hospital (AP-HP), Boulogne-Billancourt, France, ⁸Rheumatology Division, Ambroise Paré Hospital (AP-HP), Boulogne-Billancourt, France

Introduction: Spondylarthritis (SpA) development in HLA-B27/human β 2-microglobulin transgenic rat (B27-rat) is correlated with altered conventional dendritic cell (cDC) function that promotes an inflammatory pattern of CD4⁺T cells, including a biased expansion of pro-inflammatory Th₁₇ population and imbalance of regulatory T cells cytokine profile. Transcriptomic analysis revealed that cDCs from B27-rats under express IL-27, an anti-inflammatory cytokine which induces the differentiation of IL-10⁺ regulatory T cells and inhibits Th₁₇ cells.

Methods: Here, we first investigated whether *in vitro* addition of exogenous IL-27 could reverse the inflammatory pattern observed in CD4⁺ T cells. Next, we performed preclinical assay using IL-27 to investigate whether *in vivo* treatment could prevent SpA development in B27-rats.

Results: *in vitro* addition of IL-27 to cocultures of cDCs and CD4⁺ T cell subsets from B27-rats reduced IL-17 and enhanced IL-10 production by T cells. Likewise, IL-27 inhibited the production of IL-17 by CD4⁺ T cells from SpA

patients. Interestingly, *in vivo* treatment with recombinant IL-27 starting before SpA onset, inhibited SpA development in B27-rats through the suppression of IL-17/TNF producing CD4⁺ T cells.

Discussion: Overall, our results reveal a potent inhibitory effect of IL-27 and highlight this cytokine as a promising new therapeutic target in SpA, especially for SpA patients non responders to currently approved biotherapies.

KEYWORDS

spondyloarthritis, dendritic cell, HLA-B27, JAK, IL-27, IL-17, IL-10, animal models

Introduction

Spondyloarthritis (SpA) is a group of chronic inflammatory disorders that primarily affect axial skeleton (i.e. spine and sacroiliac joints). This cardinal feature often combines with peripheral joint arthritis, enthesitis, dactylitis and specific extra-articular manifestations, i.e. uveitis, psoriasis or inflammatory bowel disease (1). It affects between 0.2% and 1.61%, of the population worldwide and is strongly associated with the class I major histocompatibility complex (MHC) antigen HLA-B27 (2, 3). This association was described almost 50 years ago but the mechanisms underlying induction of SpA by HLA-B27 still remain largely unexplained (4).

The 33-3 line of HLA-B27/human β 2-microglobulin (h β 2m) transgenic rats (B27-rat) has proven to be a thorough model of SpA since it develops a spontaneous inflammatory disorder combining arthritis with ulcerative colitis and psoriatic skin and nail lesions, in the presence of regular microbiota (5). In this animal model, cell transfer experiments have demonstrated a fundamental role of bone-marrow derived myeloid cells expressing the HLA-B27/h β 2m transgene and CD4⁺ T cells in disease development (6, 7). Thus, further studies revealed a correlation between conventional dendritic cells (cDCs) dysfunctions and SpA susceptibility (8–10).

We previously showed that cDCs from B27-rat promoted a biased expansion of pro-inflammatory T helper 17 (Th₁₇) cells, which presumably participate to disease development (11). We also reported altered DC–T cell interaction, which resulted in a decreased production of interleukin (IL)-10 and heightened production of IL-17 by regulatory CD4⁺ T cells (Treg) (12). Altered conventional type 2 DC (cDC2) functions from B27-rat were notably characterized by a defect in interferon (IFN) signaling and decreased IL-10 and IL-27 production, all of which could contribute to biased T cell stimulation and differentiation (13).

IL-27 is a heterodimeric member of the IL-12/IL-23 family of cytokines composed of two subunits: IL-27p28 (also known as

IL-27a or IL-30) and Epstein-Barr virus induced gene 3 (EBI3 also known as IL-27b) (14). It is mainly produced by activated antigen presenting cells (APCs), including DCs, and signals through IL-27R receptor also composed of two subunits: WSX-1 (alternatively named IL-27R α or TCCR) and gp130 (IL-6R β). IL-27R is expressed by numerous cell populations such as T and B cells, DCs, monocytes and endothelial cells (15, 16). IL-27 binding to its receptor induces activation of the Janus kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcription (STAT) and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways (17).

Early studies showed that IL-27 may act as a pro-inflammatory cytokine by inducing Th₁ responses (14). Hence, IL-27 increased T-bet expression, a Th₁-specific transcription factor, and induced IFN- γ production by naïve T cells (18). However subsequent studies revealed a more complex role of IL-27 in the regulation of T cell responses. Hence, it was shown that IL-27 could inhibit the differentiation of Th₁₇ cells by antagonizing the expression of the Th₁₇ master transcription factor, retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t (ROR γ t) (19, 20). IL-27 was also able to induce the differentiation of type 1 Treg (Tr₁) producing IL-10 and exerting immunosuppressive properties on Th₁₇ cells (21, 22).

Thus, we speculated that a reduced production of IL-27 by DCs from B27-rat could be a key element in the emergence of Th₁₇-driven inflammatory disease in this model. Hence, several factors induced by IL-27 in Tregs and directly involved in IL-10 production by those cells, such as c-Maf, aryl hydrocarbon receptor and IL-21, were down-regulated in Treg from B27-rat, consistent with such interpretation (12). Noteworthy, polymorphisms of the *IL27A* gene coding for the p28 subunit of IL-27 have been associated with SpA predisposition (23). In this study our objective was to investigate the effect of IL-27 on SpA, using the B27-rat model, to determine if this cytokine would be a suitable therapy target for SpA.

Materials and methods

Rats

The 33-3 B27-rats bearing 55 copies of HLA-B*2705 and 28 copies of $h\beta_2m$ on a Fisher (F344) background were bred and maintained under conventional conditions, as previously described. Nontransgenic (NTG) F344 littermates were used as controls. Inducible costimulatory molecule (ICOS) knockout (ICOS^{-/-}) Sprague-Dawley (SD) rats were produced by Dr. Ignacio Anegón, using the Talen technology (24) ICOS^{-/-} B27-rats were obtained by back-crossing ICOS^{-/-} SD rats onto 33-3 rats for four generations. Age- and sex-matched rats (1-8 months) were used in each experiment.

Rat cells preparation

Single-cell suspensions were prepared from mesenteric or popliteal lymph nodes (LN), followed by flow cytometric analysis using a FACSAria cell sorter. Appropriate combinations of antibodies were used to identify Treg (CD4⁺ CD25^{high}), resting T effector (Teff) cells (CD4⁺ CD25⁻ CD62L⁻), activated Teff cells (CD4⁺ CD25^{low} CD62L⁻), activated T cells (CD4⁺ CD25⁺) and naïve T cells (CD4⁺ CD25⁻ CD62L⁺) as shown in [Supplementary Figure S1](#). Forkhead box P3 (Foxp3) staining using Alexa700 anti-mouse Foxp3 was performed according to manufacturer's instructions (eBioscience) and the proportion of Foxp3⁺ Treg among CD4⁺ CD25^{high} T cells was assessed by flow cytometry, showing that the majority (>90%) of them were Foxp3⁺ ([Supplementary Figure S2B](#)). CD103⁺ cDCs were obtained from spleen as previously described (25, 26). Briefly, spleens were digested with Collagenase D (2mg/mL; Roche Diagnostics). After centrifugation on a 14.5% Nycodenz gradient (Nycomed), positive selection was performed by magnetic cell sorting with anti-rat CD103 microbeads with an AutoMacs Pro Separator (Miltenyi Biotec). The cDC2 were sorted from the purified CD103⁺ DCs based on CD4⁺ staining, on a FACSAria III sorter (BD Biosciences).

Culture of rat CD4⁺ T cells

Flow cytometry-sorted activated CD4⁺ CD25⁺ T cells or resting CD4⁺ CD25⁻ CD62L⁻ Teff cells were cultured (10⁵ cells/well) in anti-CD3-coated (2 µg/mL) plates in the presence or not of anti-CD28 (1µg/mL) and rIL-27 (5ng/mL). In some experiments, flow cytometry-sorted activated CD4⁺ CD25⁺ T cells were stimulated with coated-anti-CD3 (2 µg/mL) in the presence of JAK inhibitor (tofacitinib -anti-JAK1/3- 60 mM/mL or AG490 -anti-JAK2- 10 µg/mL). After 3 days, supernatants

were collected to analyze cytokines levels by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) and cells were restimulated for 4 hours with PMA (10 ng/mL), ionomycin (1 µg/mL) in the presence of BFA (2 µg/mL) (Sigma) for intracellular cytokine and RORγt staining assay performed according to manufacturer's instructions (BD pharmingen) ([Supplementary Figure S2A](#)). Stained cells were analyzed with a BD LSR Fortessa cell analyzer (BD Biosciences) using FlowJo software (TreeStar). All reagents and antibodies used in cell cultures are listed in [Supplementary Table S1](#).

Coculture of rat CD4⁺ T cells with DCs

Flow cytometry-sorted CD4⁺ CD25^{high} Treg or resting CD4⁺ CD25⁻ CD62L⁻ Teff cells were cultured (10⁵ cells/well) with sorted CD103⁺ splenic DCs (0.4 x 10⁵ cells/well) pre-treated with mitomycin C (0.5 mg/mL) in anti-CD3-coated plates (2 µg/mL) in the presence or not of rIL-27 (5ng/mL). After 3 days, supernatants were collected to analyze cytokine levels by ELISA and cells were restimulated for 4 hours with PMA (10 ng/mL), ionomycin (1 µg/mL) in the presence of BFA (2 µg/mL) for intracellular cytokine staining assay ([Supplementary Figure S3](#)). Stained cells were analyzed as above. For RNAseq analysis, flow cytometry-sorted CD4⁺ CD25⁻ CD62L⁺ naïve T cells were cultured (10⁵ cells/well) with sorted splenic cDC2s (CD103⁺ CD4⁺; 10⁴ cells/well) and stimulated with coated-anti-CD3 (2 µg/mL) in the presence or not of rIL-27 (5 ng/mL), AG490 (10 µg/mL) or tofacitinib (60 mM/mL). After 24 h of culture T cells were sorted by flow cytometry for RNA extraction.

Rat CD4⁺ T cell differentiation assays

For Treg differentiation experiments, flow cytometry-sorted naïve CD4⁺ T cells (CD25⁻ CD62L⁺) were cultured (5 x 10⁵ cells/well) with CD103⁺ splenic DCs (10⁵ cells/well) pre-treated with mitomycin C at 0.5 mg/ml, in the presence of coated-anti-CD3 (2 µg/ml), rhTGF-β (2 ng/ml) and neutralizing anti-IFN-γ and anti-IL-4 antibodies (each at 10 µg/mL). For Th₁₇ differentiation experiments, rIL-6, rIL-1β and rIL-23 (each at 20 ng/mL) were added to the coculture. In some experiments, rIL-27 (5 ng/mL) was also added to the coculture. At day 3, the medium was replaced by fresh medium supplemented with rIL-2 (20 ng/mL). At day 6, supernatants were harvested for analysis of cytokine production by ELISA and cells were stimulated with PMA/ionomycin/BFA for intracellular cytokine and RORγt staining. In some experiments, 6 days after Th₁₇ differentiation, T cells were sorted by flow cytometry for RNA extraction and RNAseq analysis.

Human cells preparation and culture

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from healthy controls and HLA-B27⁺ SpA patients (all fulfilling Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial SpA (27)) by Ficoll (GE Healthcare) density gradient centrifugation. The characteristics of patients and controls (unmatched for age) are shown in [Supplementary Table SII](#). Patients were considered as resistant to conventional treatment if they had a Bath Ankylosing Spondylitis disease activity score > 3/10 despite non-steroidal anti-inflammatory drug and biotherapy usage. CD14⁺ cells were first removed from PBMC by positive magnetic selection, using anti-human CD14 microbeads and AutoMacs Pro Separator (Miltenyi). Then, CD4⁺ T cells were magnetically sorted from the CD14⁻ fraction using anti-human CD4 microbeads and AutoMacs Pro Separator (Miltenyi) and cultured during 6 days with rhIL-2 (10 ng/mL), soluble anti-CD28 (2 µg/mL) and coated-anti-CD3 (10 µg/mL) in the presence or absence of rhIL-27 (40 ng/mL) in complete medium. At day 6, supernatants were harvested for measure of cytokine levels by ELISA and cells were stimulated with PMA (10ng/mL), ionomycin (1µg/mL) and BFA (2µg/mL) for 6 hours for intracellular cytokine staining.

Analysis of STAT1 and 3 phosphorylation by flow cytometry

Single-cell suspensions of rat mesenteric LN (10⁶ cells/tube) were stimulated with rIL-27 (5 ng/mL) or PBS for 10 minutes at 37°C. After fixation during 10 minutes with Fix I Buffer (BD Biosciences) and permeabilization with Perm III buffer (BD Biosciences) for 30 minutes, cells were washed and stained with BD PhosFlow antibodies to pSTAT1 (pY701) and pSTAT3 (pY705) according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences)

Determination of STAT1 and 3 intracellular content by flow cytometry

Total STAT content was determined with anti-STAT1 and anti-STAT3 (BD Biosciences) according to manufacturer's instructions. Briefly, cells were stained using appropriate combinations of antibodies to identify Treg, T_H17, and activated CD4⁺ T cells as described above. After fixation in Fix I Buffer (BD Biosciences) for 10 min and permeabilization with Perm III buffer (BD Biosciences) for 30 min, cells were washed and incubated with anti-STAT1 and STAT3 antibodies or isotypes control ([Supplementary Figure S4](#)) for 1h. After extensive

washing, the fluorescence was quantified by BD LSR Fortessa cell analyzer.

Determination of cytokine levels by ELISA

Rat and human IL-17, IL-10 and IFN-γ levels were determined in culture supernatants or serum by sandwich ELISA (IL-17: eBioscience; IL-10 and IFN-γ: R&D Systems) according to the manufacturer's instructions. Concentrations were calculated according to calibration curves established from serial dilutions of recombinant standards in each assay. The sensitivity threshold of each cytokine assay was 10 pg/mL. Multiplex ELISA assay was performed using Bio-Plex Pro Rat Cytokine Panel (Biorad) according to the manufacturer's instructions.

Rat IL-27 recombinant production

The rIL27 was prepared using a pTT3-IL-27 construction with 6 histidine signal peptide sequence. For the production the rIL27, CHO cells were cultured in « FreeStyle™ CHO Expression Medium » (Life Technologies). Cells were thawed and subcultured three times prior to transfection. The transfection was performed using 1 µg of DNA per mL of cells culture. A volume of 2L was transfected. Cell density and viability were monitored regularly using Vi-CELL™ XR automatic cell counter and samples of supernatant collected and stored at 4°C for expression analysis by Western blot in denaturing and reducing conditions on precast Bis-Tris SDS-PAGE 4-12% (Life Technologies). Once the viability had dropped below 75% or 8 days after transfection, cell cultures were stopped. The supernatant was collected by centrifugation, filtered on 0.2 µm filter (Pall; PES) and loaded on 5 mL Ni Sepharose Excel prepacked column (GE Healthcare). The protein was eluted in step with PBS + 250 mM imidazole. The pool obtained from Ni Sepharose was dialyzed against sodium phosphate-NaCl buffer. The total protein concentration was determined using Bradford protocol with bovine serum albumin as a standard BCA assay (Pierce) and IL-27-specific ELISA assay. To produce sufficient quantities of rIL-27 for the preclinical assay, we requested the service of a specialized company (PX-therapeutics).

Preclinical assay

Sex-matched B27-rats and NTG F344 littermates (6-8 animals/group) aged of 4-6 weeks were randomized three days before initiation of the treatment, with a permutation table (each

cage contained at least one rat from each experimental group). RrIL-27 (5 µg/rat/injection) or vehicle (PBS) were administered intraperitoneally 3 days per week for 10 consecutive weeks (experiment 1) or every day for 12 consecutive weeks (experiment 2). The rats were examined three times per week for clinical symptoms of colitis (loose stools and/or frank diarrhea) and arthritis and were assigned for each of these symptoms a score on a scale ranging from 0 (normal) to 4, as previously described (28). After 10 or 12 weeks of treatment, the rats were sacrificed. Colonic tissues were fixed in 4% phosphate-buffered formalin embedded in paraffin. Sections (4µm) were prepared and stained with hematoxylin-eosin (H&E). Tissues damages were semi-quantitatively scored blindly, following microscopic scoring criteria as previously described (28). The hindpaws of rats were excised and fixed in 4% phosphate-buffered formalin. After 24 h of fixation they were immersed for 3 weeks in Decal solution (Serva). After decalcification they were sectioned and stained with H&E. Sections were semi-quantitatively graded based on the degree of inflammation and joint destruction. Histologic findings were evaluated using modified grading scales, as previously described (29). Briefly, a 0–3 scale was used for gradation (where 0 is normal and 3 severe involvement) of synovitis and cartilage or bone structural modifications. Both ankle and tarsus were analyzed. The intracytoplasmic cytokines production was determined by flow cytometry in CD4⁺ T cells after PMA/ionomycin/BFA treatment

RNA preparation, sequencing, and RNA-seq differential expression analysis

RNA was extracted from 10⁵ – 2 x 10⁵ Th₁₇-polarizing or naïve CD4⁺ T cells cocultured with cDC2s, using the RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen). RNA concentrations were obtained using a fluorometric Qubit RNA assay (Life Technologies). The quality of the RNA integrity number (RIN) was determined on the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) as per the manufacturer's instructions. To construct the libraries, 1 µg of high-quality total RNA sample (RIN > 8) was processed using TruSeq Stranded mRNA kit (Illumina) according to manufacturer instructions. Library Quantification Kit for Illumina Libraries (KapaBiosystems) and library profiles were assessed using the DNA High Sensitivity LabChip kit on an Agilent Bioanalyzer. Libraries were sequenced on an Illumina Nextseq 500 instrument using 75 base-lengths read V2 chemistry in a paired-end mode. After sequencing, a primary analysis based on AOZAN software (Ecole Normale Supérieure, Paris) was applied to demultiplex and control the quality of the raw data (based of FastQC modules/version 0.11.5). Obtained fastq files were then aligned using STAR (30) algorithm (version 2.5.2b). Reads were then counted using RSEM (31) (v1.2.28) and

the statistical analyses on the read counts were performed with the R package DESeq2 (32) (v1.22.1) to determine the proportion of differentially expressed genes between two conditions. Differentially expressed genes identified by DESeq2 were submitted to Ingenuity Pathway Analysis (IPA) for pathway analysis using the Ingenuity Knowledge Base (Qiagen Bioinformatics)

Statistical analysis

Data are expressed as the mean ± SEM. Statistical comparisons between groups were determined by a two-tailed paired Student's *t* test, the Mann-Whitney or Wilcoxon nonparametric U test. *P* values < 0.05 were considered significant

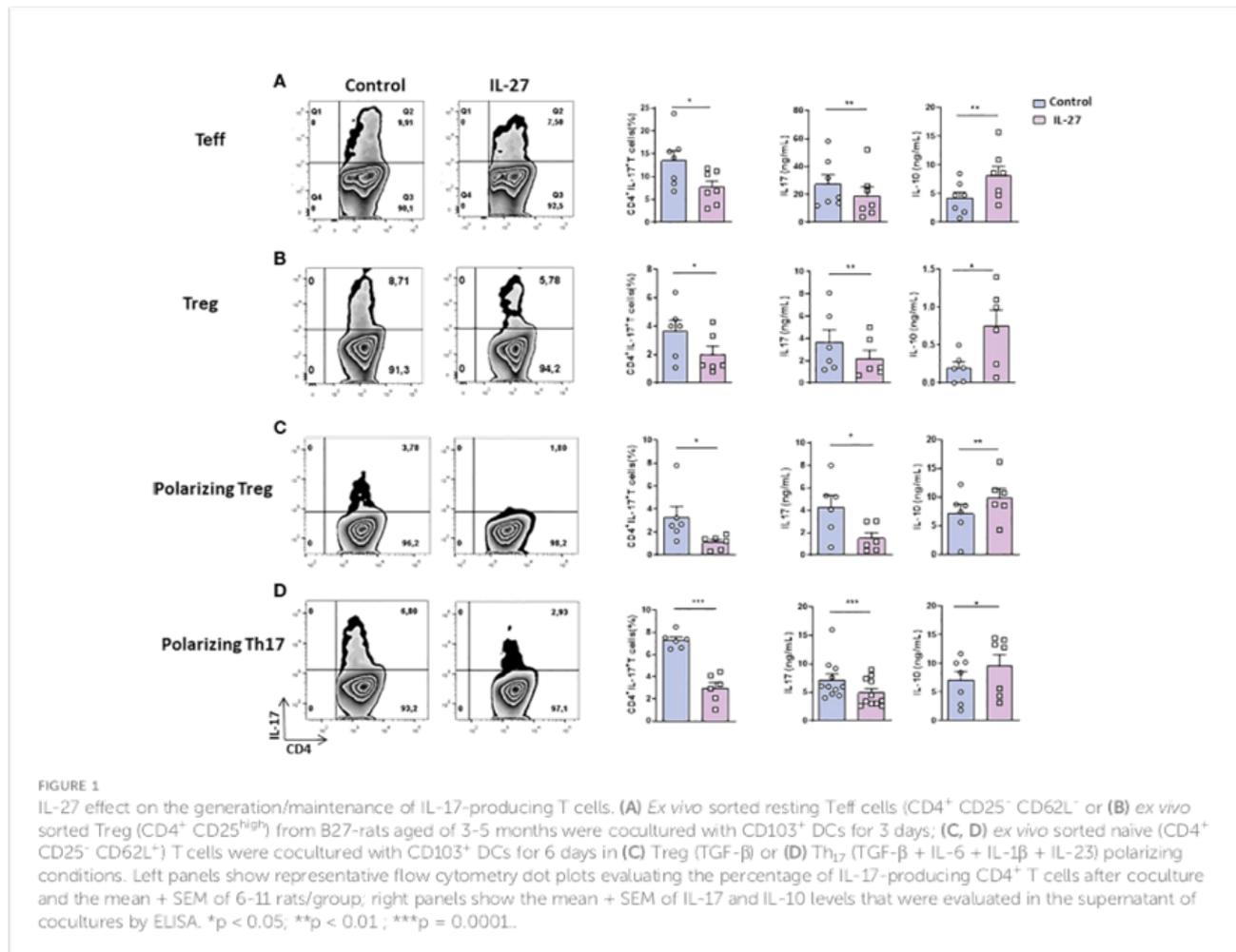
Study approval

Study procedures in rats were approved by the institutional animal experimentation ethical committee (APAFIS-8910) and Written informed consent was obtained from all subjects before study which was approved by the local ethical committee (AOR10006-NI09031).

Results

IL-27 reverses imbalanced production of IL-17 and IL-10 by CD4⁺ T cell subsets from B27 rats

Given that CD4⁺ T cells are induced to produce heightened levels of IL-17 (9) in contact with cDCs and that cDCs exhibit decreased production of IL-27 (13) in B27-rat, we sought to determine whether exogenous IL-27 could exert antagonistic effect on such T cell bias. Indeed, coculture of resting T_H17 cells (CD4⁺ CD25⁻ CD62L⁻) with CD103⁺ DCs from B27-rat in the presence of rmIL-27 resulted in reduced IL-17 production (Figure 1A). Increased IL-10 level was also detected in supernatants of those cocultures (Figure 1A). To investigate next the effect of IL-27 on imbalanced production of IL-17 and IL-10 by T_H17 from B27-rat (12), we performed cocultures of T_H17 (CD4⁺ CD25^{high}) with CD103⁺ DCs from B27-rat. Hence, IL-27 addition decreased the frequency of IL-17 producing T_H17 and IL-17 levels produced in supernatant (Figure 1B). In parallel, we observed a significant increase of IL-10 production by T_H17 from B27-rats in the presence of IL-27 (Figure 1B). Analysis by multiplex ELISA assay revealed that IL-17 and IL-10 were the only cytokines significantly modulated by IL-27 among a panel of 11 cytokines of interest (Supplementary Figure S5).



IL-27 decreases IL-17⁺ T cells generation from B27-rat naïve CD4⁺ T cells

It was previously described that IL-27 can influence T cell differentiation by supporting Th₁ and Tr₁ differentiation and inhibiting Th₁₇ commitment (16). Given that cDCs from B27-rat favor IL-17 production by Treg (12) and Th₁₇ expansion (11) we tested if IL-27 could also inhibit *in vitro* differentiation of IL-17 producing-Treg from naïve CD4⁺ T cells. A decreased proportion of IL-17⁺ T cells was observed in the presence of rmIL-27, after coculture of naïve CD4⁺ T cells with CD103⁺ DCs under Treg polarizing condition (Figure 1C). Furthermore, a decreased production of IL-17 and an increased production of IL-10 were observed in coculture supernatants in the presence of IL-27 (Figure 1C). We also observed decreased frequency of RORγt⁺ T cells and increased frequency of IFN-γ-producing T cells and higher levels of IFN-γ in the supernatant (Supplementary Figure S6B), in the presence of IL-27. This confirmed an inhibitory effect of IL-27 on Th₁₇ differentiation of naïve CD4⁺ T cells and conversely, a pro-Th₁ role. Similarly, when naïve CD4⁺ T cells were cocultured with CD103⁺ DCs

under Th₁₇-polarizing conditions, addition of rmIL-27 reduced the proportion of IL-17 producing T cells and IL-17 production in supernatant, increasing significantly IL-10 levels (Figure 1D). In the latter conditions IL-27 also reduced the frequency of RORγt⁺ T cells (Supplementary Figure S6C) and increased IFN-γ production in culture supernatants (Supplementary Figure S6D).

Given that both cDC and CD4⁺ T cells express a functional IL-27R, we next examined which cell population(s) mediated IL-27 effects. Interestingly, we observed a direct inhibitory effect of IL-27 addition on the frequency of RORγt⁺ cells and on the production of IL-17 by effector T cells isolated from mesenteric LN of B27-rats, whether in an activated CD4⁺ CD25^{low} (Supplementary Figure S7A) or resting CD4⁺ CD25⁻ CD62L⁻ (Supplementary Figure S7B) state, in the absence of DCs. Alike the foregoing results observed for cocultures in the presence of cDCs, IL-10 production was also increased in the presence of IL-27 in those conditions, whereas IFN-γ production was decreased (Supplementary Figure S7A, B). Activated T cells from NTG rats produce little IL-17, as compared to those from B27-rats, however addition of IL-27 to cultures of those cells led also to a significant decrease of this cytokine in culture supernatants

(data not shown). Conversely, IL-27 treatment of DCs before coculture had no effect on their expression of co-stimulatory (CD40, CD86) or MHC (class I and II) molecules nor on the capacity of those cells to expand IL-17⁺ T cells (data not shown).

Anti-IL-17 effect of IL-27 on B27-rat CD4⁺ T cells is independent of IL-10 or ICOS

Given that IL-27 may induce the differentiation of IL-10-producing Tr₁ and inhibit Th₁₇ cells generation and that increased IL-10 production preceded inhibition of IL-17 in the foregoing *in vitro* studies (Supplementary Figure S8A), decreased IL-17 production by CD4⁺ T cells from B27-rat could be due to a negative feedback loop induced by IL-10. To test this hypothesis, we studied IL-27 effect on activated CD4⁺ CD25⁺ T cells from B27-rat (because these cells produce quickly high levels of IL-17 after stimulation) cultured in the presence of IL-10-neutralizing antibody. The presence of anti-IL-10 antibody did not prevent the inhibitory effect of IL-27 on IL-17 production (Figure 2A). Moreover, IL-27 inhibited the generation of IL-17⁺ T cells from naïve CD4⁺ T cells under Th₁₇ polarizing conditions to a similar extent when IL-10 was blocked (Supplementary Figure S8B). Hence, the inhibitory effect of IL-27 on IL-17 production and Th₁₇ cells

differentiation is IL-10-independent. We previously showed that blockade of ICOS/ICOSL pathway resulted in increased IL-10 and decreased IL-17 productions by CD4⁺ T cells from B27-rats (12). Interestingly, in the presence of IL-27, we observed *in vitro* a decreased expression of ICOS on activated CD4⁺CD25⁺ T cells and on naïve CD4⁺ T cells cultured in Treg or Th₁₇ polarizing conditions (Supplementary Figure S8C). Therefore, we cultured sorted CD4⁺ CD25⁺ T cells from B27-rats bearing ICOS deletion (ICOS^{-/-}) in the presence of IL-27, to test if IL-27 effect could be secondary to ICOS down-regulation. Addition of IL-27 reduced the proportion of IL-17⁺ cells and IL-17 production after 3 days of culture, in CD4⁺ CD25⁺ cells from both ICOS^{+/+} and ICOS^{-/-} B27-rats to similar extent (Figure 2B). Thus, the absence of ICOS on CD4⁺ T cells from B27-rat did not influence the effect of IL-27 on those cells.

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

It has been shown that IL-27 induced the phosphorylation of STAT1 and STAT3 after binding to IL-27R and that activation of those STATs was required for inhibition of Th₁₇ differentiation and induction of IL-10 production (22). To examine if such

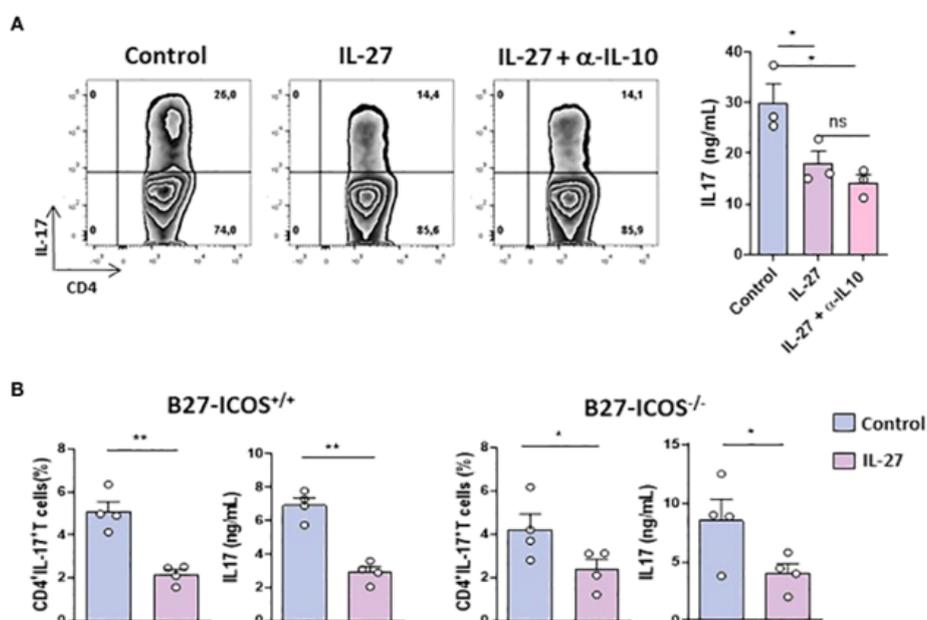


FIGURE 2

IL-27 inhibitory effect on B27-T cells is IL-10/ICOS independent. (A) Left: Representative dot-plot of IL-17⁺ cells among activated CD4⁺ CD25⁺ T cells from B27-rat aged of 5 months cultured for 3 days with coated anti-CD3 in the presence or absence of IL-27 and anti-IL-10 blocking antibody. Right panel: level of IL-17 in culture supernatants (3 rats/group). (B) CD4⁺ CD25⁺ T cells from ICOS^{+/+} or ICOS^{-/-} B27-rats (aged of 9-11 months) cultured for 3 days with coated anti-CD3 in the presence or not of rIL-27. Histograms represent the mean + SEM of 3-4 rats/group. IL-17 and IL-10 concentrations were evaluated by ELISA. *p < 0.05; **p < 0.01. ns, not significant.

mechanism applied to IL-27 effect on B27-rat CD4⁺ T cells, we studied the phosphorylation of STAT1 and STAT3 by flow cytometry after IL-27 stimulation in several T cells subsets. IL-27 induced the phosphorylation of STAT1 and STAT3 in approximately 60% and 30% of activated CD4⁺ T cells, respectively, without difference between NTG and B27-rat (Figures 3A, B). Similar results were observed with Treg and T_H17 cells (Supplementary Figure S9A). These results indicate that IL-27 stimulation has a similar capacity to induce pSTAT1/3 in CD4⁺ T cell subsets from NTG and B27-rats. Interestingly however, when we analyzed total STAT1/3 levels in CD4⁺ T cells we observed an increased level of STAT3 in activated T cells (Figure 3C), Treg and T_H17 cells (Supplementary Figure S9B) from B27-rats which may contribute to the increased IL-17 production.

JAK-STAT signaling mediates IL-10 increase induced by IL-27 in activated CD4⁺ T cells from B27-rat

To define potential mechanisms by which IL-27 priming inhibited Th₁₇ cell differentiation we performed RNA-sequencing (RNA-seq) in naïve CD4⁺ T cells cocultured with

CD103⁺ DCs under Th₁₇-polarizing condition in the presence or not of IL-27. We found that 109 genes were down-regulated and 68 were upregulated in Th₁₇-differentiated cells in the presence of IL-27, as compared to control condition (Figure 3D). Interestingly, IL-27 negatively modulated several genes which have been described to be involved in the pathogenesis of SpA and/or the STAT3 pathway, a transcription factor which is increased in CD4⁺ T cells from B27-rat (Figure 3C and Supplementary Figure S9A, B) and plays a major role in the differentiation of Th₁₇ cells, including *Il1r1*, *Il1r2*, *Pdgfb* and *Tgfb1* (33), (Figure 3D). On the other hand, we observed an increased expression of *Maf* gene (Figure 3D), which is downregulated in B27-rat Treg (12). Interestingly, this gene codes for c-maf, a positive regulator of IL-10 production and may thereby inhibit Th₁₇ response (34). STAT3 dysfunction has been described in various chronic inflammatory diseases and JAK-STAT inhibitors are effective in treating several of these disorders, including SpA (35, 36). The foregoing RNAseq analysis suggested that the inhibitory effect of IL-27 on IL-17 production was associated with STAT3 pathway down-regulation. To test this hypothesis, we performed cultures of activated CD4⁺ T cells in the presence of IL-27 and/or JAK-STAT inhibitors. Given that IL-27 induces the dimerization of gp130 and IL-27Ra that engages JAK1 and JAK2,

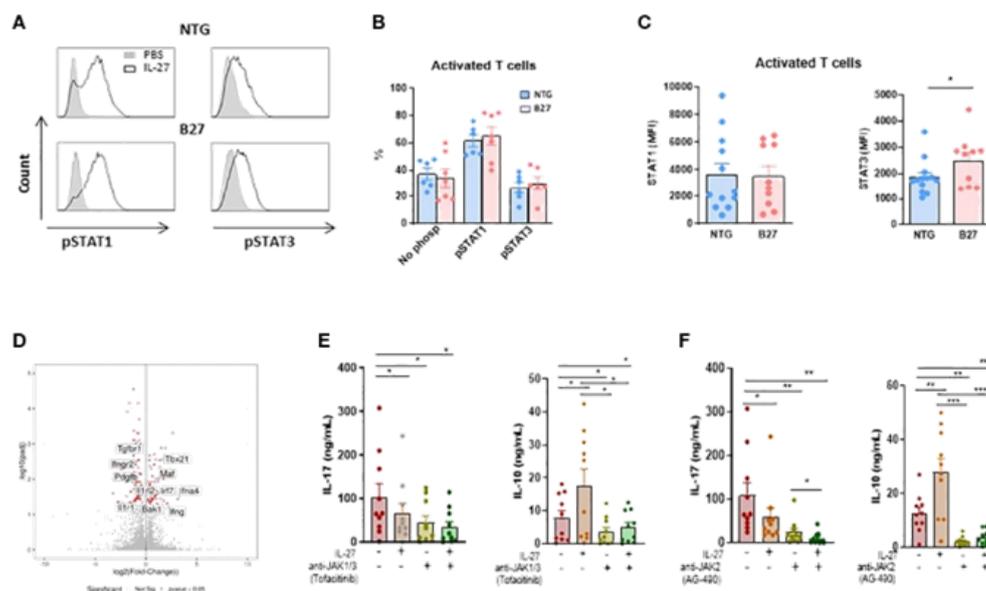


FIGURE 3
JAK-STAT signaling is involved in IL-27 modulatory effect. (A) Representative histogram of mesenteric LN cells stimulated by IL-27 and stained intracellularly for phosphorylated STAT1 and STAT3 gated on CD4⁺ CD25⁺ activated T cells. (B) The percentage of pSTAT1 and pSTAT3 was analyzed in gated CD4⁺ CD25⁺ activated T cells from mesenteric LN of NTG and B27-rat aged of 4–5 months. (C) STAT1 and STAT3 levels were analyzed by flow cytometry in gated CD4⁺ CD25⁺ activated T cells from mesenteric LN of NTG and B27 rat. Values are the mean + SEM of 6–13 rats/group. **p* < 0.05. (D) Volcano plot representing the results of RNAseq analysis of differentiated Th₁₇ cells in the presence of IL-27, as compared to medium control. The data for all genes are represented by log₂ (fold change) vs. log₁₀ of adjusted *p*-value. The significant different genes are highlighted in red. Values represent results from 5 rats/group. (E, F) IL-17 and IL-10 levels were determined by ELISA in supernatants from CD4⁺ CD25⁺ activated T cells after 3 days of stimulation with coated anti-CD3 in the presence of IL-27 and/or anti-JAK1/3-tofacitinib (E) and/or anti-JAK2-AG490 (F). Values are the mean + SEM of 10 rats/group. **p* < 0.05; ***p* = 0.001; ****p* = 0.0005.

thereby activating both STAT1 and STAT3, we performed experiments with tofacitinib, JAK1/3-STAT1 and AG490, JAK2-STAT3 inhibitors, respectively. IL-17 production was reduced in the presence of IL-27 but also in the presence of both JAK-inhibitors alone (Figures 3E, F). Interestingly, we observed an additive effect between IL-27 and AG490, suggesting that factor(s) independent of STAT3 likely contributed to the decreased production of IL-17 induced by IL-27 (Figure 3F). In contrast, the ability of IL-27 to induce IL-10 appeared fully dependent on JAK-STAT activation because IL-10 production induced by IL-27 was abolished in the presence of JAK-STAT inhibitors (Figures 3E, F).

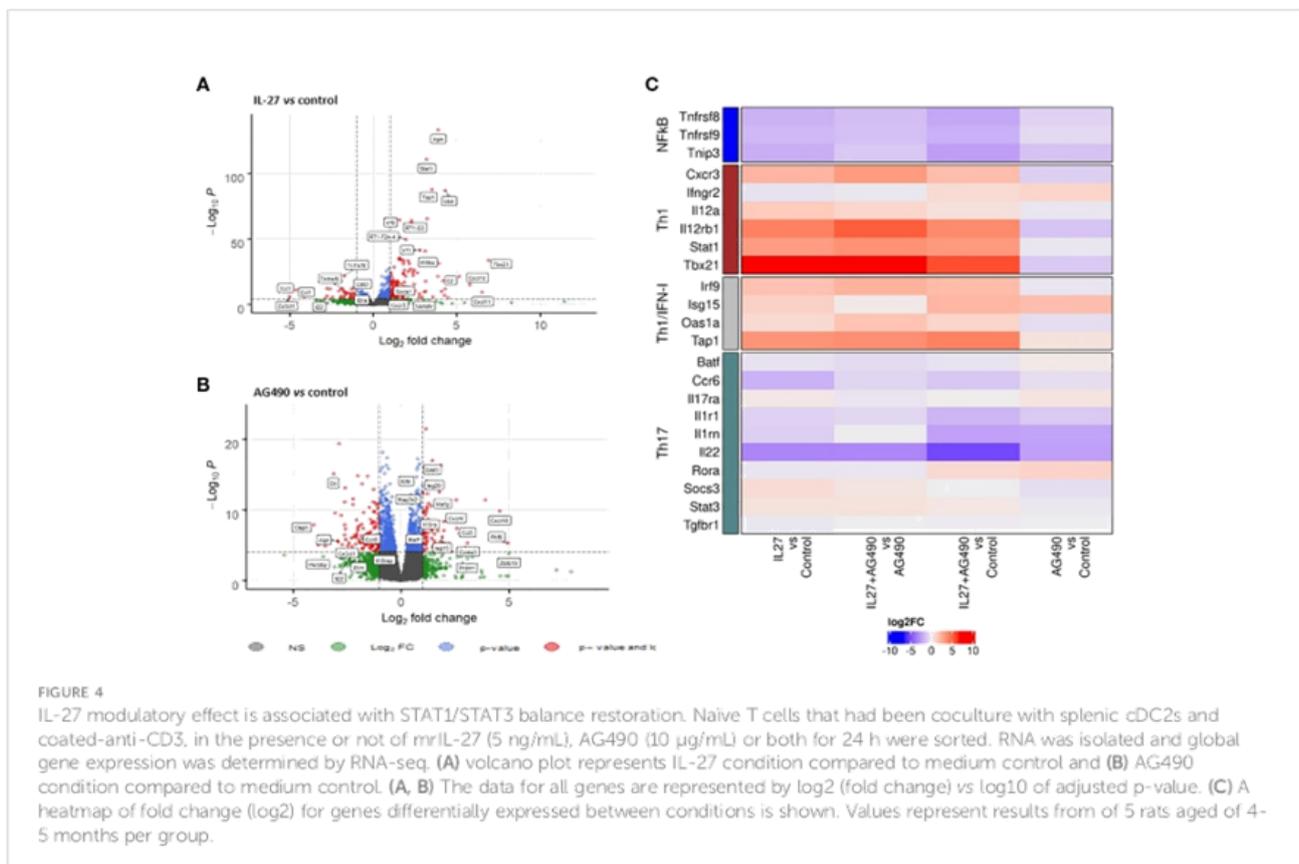
IL-27 modulatory effect is associated with STAT1/STAT3 balance restoration

Interestingly, we observed by RNAseq analysis of naïve CD4⁺ T cells cocultures that cDC2 from B27-rat promoted an inflammatory bias, as compared to NTG rat cDC2, independently of the addition of polarizing cytokines (i.e. TGF- β , IL-6, IL-1 and IL-23) (Supplementary Figure. S10A). This coculture system allowed us to study the modulatory effect of both IL-27 and AG490 on naïve CD4⁺ T cells developing without the possible confounding effect of exogenous cytokines

in addition. We observed that IL-27 downregulated some genes involved in Th₁₇ response or nuclear factor-kappa B (NF κ B) pathway, such as *Il22*, *Tnfrsf8*, *Tnfrsf9*, *Ccr6*, *Il1r1*. Conversely, IL-27 upregulated several genes known to promote Th₁ response, including *Stat1*, *Tbx21*, *Irf1*, *Irf9*, *Cxcr3*, *Cxcl10*, *Cxcl11* and of *Socs1*, a negative regulator of cytokines signaling. These data indicate that IL-27 modulated the proinflammatory program instructed by B27-rat cDC2 to naïve CD4⁺ T cells by downregulation of genes associated to STAT3 pathway and upregulation of genes associated to Th₁ responses (Figures 4A, C and Supplementary Figure S10B). The presence of AG490 in cocultures also negatively modulated *Il22* gene implicated in Th₁₇ response and *Il1rn* and *Il18rap* (37) genes (Figure 4B). We also observed a downregulation of NF κ B-associated genes only when AG490 was combined with IL-27. In this condition, the presence of IL-27 favored an upregulation of Th₁-associated genes (*Stat1*, *Tbx21*, *Irf1* and *Irf9*), not observed in cells cultured only in the presence of AG490 (Figure 4C).

IL-27 decreases IL-17 production by CD4⁺ T cells from SpA patients

Given that IL-27 reversed heightened production of IL-17 by several CD4⁺ T cell subsets in the B27-rat and that increased



production of IL-17 appears to be characteristic of SpA patients (38), we wished to determine if IL-27 could exert similar effects on human T cells. Thus, we cultured purified CD4⁺ T cells isolated from the peripheral blood of SpA patients and healthy controls in the presence of rhIL-27 for 6 days. Similarly, to the results observed in B27-rat, the addition of rhIL-27 reduced the proportion of IL-17⁺ CD4⁺ human T cells in all 15 patients and 8/11 (73%) healthy controls (Figure 5A) and reduced the level of IL-17 in culture supernatant in 16/18 patients (89%) and 10/11 (91%) healthy controls (Figure 5B). Interestingly, the inhibitory effect of IL-27 was greater in SpA patients than healthy controls (Figure 5C), in such a way that the production of IL-17 was equivalent between both groups after exposure to IL-27 (Figure 5B). Remarkably, this anti-inflammatory effect of IL-27 was equally observed on CD4⁺ T cells from several SpA patients resistant to conventional treatment with non-steroidal anti-inflammatory drug and biotherapy. IL-27 reduced the percentage of IL-17⁺ T cells in all and the IL-17 levels in 5/6 treatment-resistant SpA patients (Figure 5C). However, in contrast to the results observed in B27-rat, no change of IL-10 or IFN- γ levels in supernatant was observed in the presence of IL-27 in cultures of SpA patients cells (Supplementary Figure S11A, B), suggesting that the effect of IL-27 on human CD4⁺ T cells display some differences compared to those observed in rat.

RrIL-27 reduces SpA severity in B27-rat

To evaluate *in vivo* the effect of rrIL-27 on SpA development, we treated premonitory B27-rats and control NTG rats in two consecutive experiments with rrIL-27 or vehicle. In the first experiment, rats were treated three times per week for 10 weeks whereas they were treated daily for 12 weeks in the second experiment. NTG rats, whether treated or not with IL-27, remained healthy clinically and by histology, thereby indicating that IL-27 administration was well-tolerated. As expected, vehicle-treated B27-rats developed colitis symptoms characterized by chronic diarrhea that started at 6-7 weeks of age and progressively worsened over the treatment period. In both experiments, clinical score of colitis was reduced in the IL-27-treated B27-rats (Figure 6A and Supplementary Figure S12A). Histological examination of distal colon confirmed reduced inflammation in the IL-27-treated B27-rats (Figure 6A and Supplementary Figure S12D). In the first experiment, arthritis course was not significantly affected by IL-27 treatment (Supplementary Figure S12B), whereas the second more intense regimen of rrIL-27 administration was associated with inhibition of arthritis development (Figure 6B and Supplementary Figure S12C). Histological study of hindpaws exhibited significant inflammation and joint destruction only in

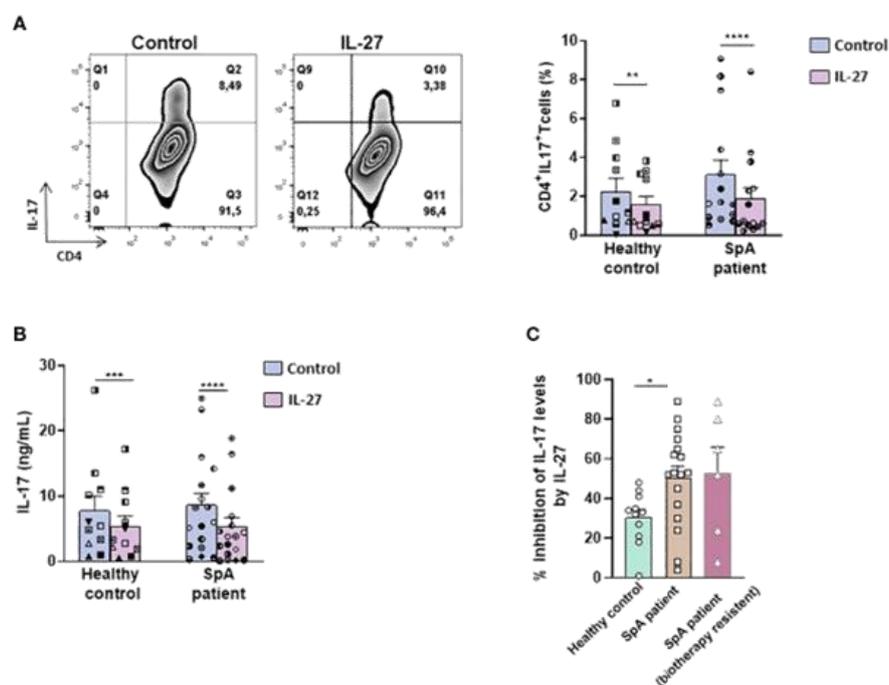


FIGURE 5
IL-27 decreases IL-17 production by T cells from SpA patients. (A) Left panel: representative dot-plot and right panel: percentage of IL-17 producing-CD4⁺ T cells from SpA patients cultured during 6 days with IL-2 in the presence or absence of IL-27 and determined after PMA/ionomycin stimulation. (B) IL-17 production was measured in culture supernatants by ELISA. (C) Percentage of inhibition of IL-17 production induced by IL-27 presence in cultures of CD4⁺T cells from healthy controls and SpA patients. *p < 0.05 **p<0.005 ****p<0.0001/ *****p=0.001.

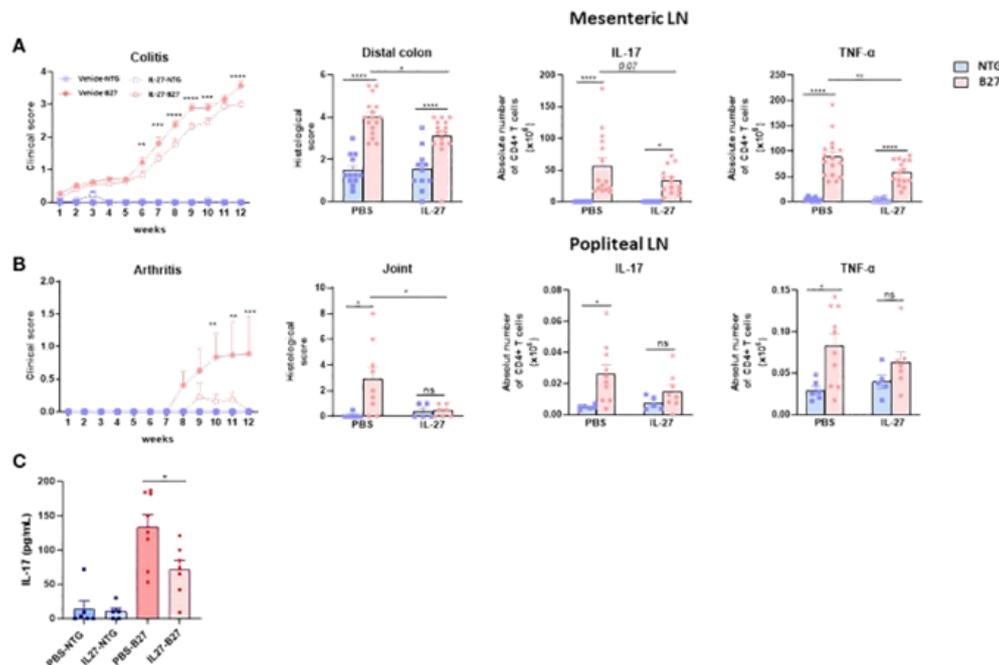


FIGURE 6

RrIL-27 reduces SpA severity in B27-rat. (A) Clinical score of colitis (experiment 2), histological score of distal colon inflammation and absolute number of cytokines producing T cells (pooled experiments 1 and 2) were determined in mesenteric LN from NTG and B27-rats aged of 4-6 weeks treated with vehicle or rIL-27 for 12 weeks. (B) Clinical score of arthritis, histological score of hindpaws and the absolute number of cytokines producing T cells in popliteal LN were determined in NTG and B27-rats treated with vehicle or rIL-27 for 12 weeks (experiment 2). (C) IL-17 levels in serum from NTG and B27 treated with PBS or IL-27. Values are the mean \pm SEM of 6-8 rats/group. * $p < 0.05$ *** $p < 0.0005$ **** $p < 0.0001$ ** $p = 0.002$. ns, not significant.

the vehicle-treated B27-rats (Figure 6B and Supplementary Figure S12E). Interestingly, IL-27 treatment was associated with a striking reduction of the number of CD4⁺ T cells producing IL-17 or TNF- α in the mesenteric LN from B27-rats (Figure 6A). In the popliteal LN, the numbers of IL-17⁺ and TNF- α ⁺ CD4⁺ T cells were significantly increased in the vehicle-treated but not in the IL-27-treated B27-rats, as compared to NTG controls. Furthermore, serum IL-17 levels were reduced in IL-27-treated, compared to control B27 rats (Figure 6C). Altogether, those data show a beneficial effect of IL-27 treatment on hallmark manifestations of SpA in the B27-rat model, most likely by reducing IL-17 and/or TNF α production.

Discussion

Therapeutic options to treat SpA, a disabling chronic inflammatory disorder of the joint, are still limited despite recent advances that include the development of TNF- α , IL-17 and JAK inhibitory agents (36, 39). This is why B27-rat, considered as the most faithful animal model of SpA, is highly valuable in understanding the mechanisms of SpA and identifying new therapeutic targets (5, 40). This model was instrumental in highlighting CD4⁺ Th₁₇ cells and heightened IL-17 production as major components of SpA pathophysiology

(11, 36, 41). Moreover, B27-rat DCs exhibit aberrant features, including a decreased production of IFN- γ , IL-10 and IL-27, that could contribute to such deregulated CD4⁺ T cells phenotype (13). IL-10 treatment alone failed to improve rat SpA (28). Thus, we speculated that IL-27, a cytokine known to inhibit the differentiation of Th₁₇ and induce the differentiation of IL-10 producing Tr₁ could be a more suitable target (14).

Here, we first showed that IL-27 selectively opposed IL-17 and stimulated IL-10 production by several subsets of B27-rat CD4⁺ T cells, including *ex vivo* sorted resting and activated effector cells, Treg and *in vitro* polarized Th₁₇ cells and Treg, and that this effect was independent of coculture with DCs. This effect on cytokines was associated with reduced frequency of T cells expressing ROR γ ⁺, the master transcriptional factor of Th₁₇ cells, that is increased in B27-rat CD4⁺ T cells (11). Those results indicated that in addition to reduce IL-17 production by CD4⁺ T cells, IL-27 could reverse aberrant proinflammatory pattern of Treg by inhibiting excessive IL-17 and restoring IL-10 productions (12). Importantly, IL-27 also reduced the production of IL-17 by CD4⁺ T cells from SpA patients in culture, including those who were non-responders to currently approved biotherapies, indicating that IL-27 could be a promising therapy by opposing Th₁₇ cells, even in case of conventional treatment failure.

Previous works demonstrated either a crucial role of IL-10 for the anti-inflammatory effect of IL-27 in a model of colitis or that IL-10 was not required for the suppression of Th₁₇ cells in the context of experimental autoimmune encephalomyelitis (42, 43). Here, we found that IL-10 secretion was not mediating the modulatory effect of IL-27 on Th₁₇ cells. It was also previously shown that the induction of Tr₁ cells by IL-27 relied on the induction of three components: c-maf, IL-21 and ICOS (44). Here, IL-27 decreased ICOS expression on CD4⁺ T cells from B27 rats that exhibited increased ICOS expression, a feature that could participate to Th₁₇ bias (12, 45). Nevertheless, using ICOS^{-/-} B27-rats, we observed that the modulatory effect of IL-27 was independent of ICOS.

To dissect further the mechanisms by which IL-27 may oppose Th₁₇ differentiation bias favored by B27-rat DCs, we studied the effect of IL-27 on the transcriptome of naïve CD4⁺ T cells having been differentiated in contact with B27-rat DCs in Th₁₇-polarizing conditions. Interestingly, IL-27 modulated negatively genes associated to STAT3 signaling that are likely to control the inflammatory response involved in the pathogenesis of SpA. Conversely, *Maf* and several *Ifng*-associated genes, including *Tbx21*, antagonizing Th₁₇ response were up-regulated (34, 46). This is consistent with STAT1 phosphorylation induced by IL-27 and enhanced production of IFN- γ that was observed in this culture condition, albeit the inhibitory effect of IL-27 on Th₁₇ pathway was not mediated by IFN- γ itself, given the presence of anti-IFN- γ in the culture. Noteworthy, in contrast to increased production in Treg or Th₁₇ polarizing conditions, IFN- γ production was decreased by IL-27 in differentiated CD4⁺ T cells which is consistent with the capacity of IL-27 to limit excessive Th₁ response by induction of IL-10 expression (47).

To examine whether JAK-STAT signaling transduced IL-27 effects in this model, we added inhibitors of JAK1/3 (tofacitinib, a molecule approved for SpA treatment) or JAK2 (AG490) that preferentially target STAT1 and STAT3, respectively. Both inhibitors reduced IL-17 and IL-10 production by activated CD4⁺ effector T cells from B27-rat, as a likely consequence of STAT3 inhibition. This precluded us to determine if IL-27 inhibited IL-17 production through STAT signaling. However, increased production of IL-10 by IL-27 was abolished in the presence of both STAT inhibitors, showing that it was dependent on STAT signaling. Moreover, there was an additive effect of IL-27 and JAK2 inhibition on IL-17 inhibition, which might reflect the combination of STAT1 phosphorylation by IL-27 and STAT3 inhibition by AG490. Altogether, those results indicate that IL-27 exerted more thorough anti-inflammatory effect on CD4⁺ T cells from B27-rat than JAK inhibitors, by combining IL-17 inhibition to IL-10 up-regulation.

We then analyzed the effect of IL-27 and/or AG490 in a simplified coculture system where cDC2 from B27-rat drives a

Th₁₇ bias in naïve CD4⁺ T cells without exogenously added cytokines, which may underly the pathophysiology of B27-rat SpA. Using again RNAseq, we interrogated the early transcriptional events occurring after 24h of naïve CD4⁺ T cell stimulation. This confirmed that IL-27 upregulated STAT1-IFN-pathway associated genes and downregulated genes associated to Th₁₇ program, consistent with a mechanism involving a greater phosphorylation of STAT1 than STAT3 by IL-27 (48) (Figure 3A). This effect of IL-27 resulted in NF κ B pathway inhibition. AG490 also inhibited Th₁₇ pathway and NF κ B but to a lesser degree than IL-27 and was rather inhibitory on genes of the STAT1-IFN pathway.

Given the striking *in vitro* anti-IL-17 and pro-IL-10 effect of IL-27 on CD4⁺ T cells from B27 rats, IL-27 appeared a promising therapeutic agent in SpA. Indeed, *in vivo* treatment of B27-rats with exogenous IL-27 was able to inhibit SpA development and the expansion of IL-17 and TNF- α producing T_H17 cells in a dose-dependent manner. Hence, a high dose of IL-27 administered daily could effectively inhibit both intestinal inflammation and arthritis, the two main pathologic features in this rat model of SpA. This result is consistent with a beneficial effect of IL-27 previously reported in others experimental models of arthritis or colitis involving Th₁₇ cells (49, 50). However, it is all the more remarkable that neither administration of anti-IL-17 antibody (11), rIL-10 (28) nor low dose of rhIL-2 to stimulate Treg (29) were sufficient to counter the development of rat SpA.

Conventional Th₁₇ corresponding to CD4⁺T cells are a major source of IL-17. However, other cellular types may also produce this inflammatory cytokine, and most of them belong to the innate like-immune system. Recently, a number of specialized cells, such as innate-like T-cells, innate lymphoid cells (ILCs), mucosal-associated invariant T cell (MAIT) and natural killer receptor (NKR)- expressing T cells, have been marked to be involved in SpA pathology (51). Thus, it will be interesting to assess the effect of IL-27 on these cells in further studies.

In summary we demonstrated for the first time that exogenous IL-27 reversed the pro-Th₁₇ phenotype characteristic of the B27-rat model of SpA. Such effect was demonstrated both on the developing and differentiated IL-17 producing CD4⁺ T cells *in vitro*. Moreover, similar modulatory effect was also observed in CD4⁺ T cells from SpA patients. Finally, *in vivo* administration of rIL-27 inhibited the development of SpA in B27-rat, in which DCs exhibit deficient IL-27 production (13). Taken together, these results highlight a critical modulatory role of IL-27 on the emergence of Th₁₇-driven inflammatory disease in B27 rats and offer a novel therapeutic perspective for SpA patients, including those who are refractory to currently available treatments.

Data availability statement

The data presented in the study are deposited in the European Nucleotide Archive repository, accession number PRJEB56819.

Ethics statement

Written informed consent was obtained from all subjects before study which was approved by the local ethical committee (AOR10006-NI09031). Study procedures in rats were approved by the institutional animal experimentation ethical committee (APAFIS-8910).

Author contributions

QJ and LA designed research studies, conducted experiments, acquired data, analyzed data and wrote the manuscript, BC, AJ-M, GM, BH, and FL conducted experiments, acquired data and analyzed data. SG, ML, KE, and BI conducted experiments and acquired data, BS, analyzed data, SR and IA provided Icos KO rats, AE provided IL-27rr batch, M-CB, analyzed data, GC, designed research studies, MB designed research studies and wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This work was supported in part by grants from Inflammex Laboratory of Excellence and SATT-Paris-Saclay University and by Pfizer institutional financial support. The funder was not involved in the study design, collection, analysis, interpretation

References

- Ashrafi M, Ermann J, Weisman MH. Spondyloarthritis evolution: what is in your history? *Curr Opin Rheumatol* (2020) 32:321–9. doi: 10.1097/BOR.0000000000000712
- Stolwijk C, van Onna M, Boonen A, van Tubergen A. Global prevalence of spondyloarthritis: A systematic review and meta-regression analysis. *Arthritis Care Res* (2016) 68:1320–31. doi: 10.1002/acr.22831
- Costantino F, Talpin A, Said-Nahal R, Goldberg M, Henny J, Chiochia G, et al. Prevalence of spondyloarthritis in reference to HLA-B27 in the French population: results of the GAZEL cohort. *Ann Rheum Dis* (2015) 74:689–93. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204436
- Navid F, Holt V, Colbert RA. The enigmatic role of HLA-B*27 in spondyloarthritis pathogenesis. *Semin Immunopathol* (2021) 43:235–43. doi: 10.1007/s00281-021-00838-z
- Breban M, Glatigny S, Cherqaoui B, Beaufrère M, Lauraine M, Rincheval-Arnold A, et al. Lessons on SpA pathogenesis from animal models. *Semin Immunopathol* (2021) 43:207–19. doi: 10.1007/s00281-020-00832-x
- Breban M, Hammer RE, Richardson JA, Taugog JD. Transfer of the inflammatory disease of HLA-B27 transgenic rats by bone marrow engraftment. *J Exp Med* (1993) 178:1607–16. doi: 10.1084/jem.178.5.1607
- Breban M, Fernández-Sueiro JL, Richardson JA, Hadavand RR, Maika SD, Hammer RE, et al. T Cells, but not thymic exposure to HLA-B27, are required for the inflammatory disease of HLA-B27 transgenic rats. *J Immunol* (1996) 156:794–803. doi: 10.4049/jimmunol.156.2.794
- Dhaenens M, Fert I, Glatigny S, Haerincx S, Poulain C, Donnadieu E, et al. Dendritic cells from spondylarthritis-prone HLA-B27-transgenic rats display altered cytoskeletal dynamics, class II major histocompatibility complex expression, and viability. *Arthritis Rheum* (2009) 60:2622–32. doi: 10.1002/art.24780
- Utraiainen L, Firmin D, Wright P, Cerovic V, Breban M, McInnes I, et al. Expression of HLA-B27 causes loss of migratory dendritic cells in a rat model of spondylarthritis. *Arthritis Rheum* (2012) 64:3199–209. doi: 10.1002/art.34561
- Fert I, Glatigny S, Poulain C, Satumtira N, Dorris ML, Taugog JD, et al. Correlation between dendritic cell functional defect and spondylarthritis phenotypes in HLA-B27/HUMAN β 2-microglobulin-transgenic rat lines. *Arthritis Rheum* (2008) 58:3425–9. doi: 10.1002/art.24023
- Glatigny S, Fert I, Blaton MA, Lories RJ, Araujo LM, Chiochia G, et al. Proinflammatory Th17 cells are expanded and induced by dendritic cells in

of data, the writing of this article, or the decision to submit it for publication. BC's work was supported by a grant from the Société Française de Rhumatologie (SFR).

Acknowledgments

We are indebted to volunteers who contributed to this study. We acknowledge the contribution of Aude Robert and Pravina Muthan from Pelvipharm for managing the rat colonies and Roxane Herve for histology technical support.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.1072420/full#supplementary-material>

- spondylarthritis-prone HLA-B27-transgenic rats. *Arthritis Rheum* (2012) 64:110–20. doi: 10.1002/art.33321
12. Araujo LM, Fert I, Jouhault Q, Labroquère K, Andrieu M, Chiochia G, et al. Increased production of interleukin-17 over interleukin-10 by treg cells implicates inducible costimulator molecule in experimental spondylarthritis. *Arthritis Rheumatol* (2014) 66:2412–22. doi: 10.1002/art.38737
13. Fert I, Cagnard N, Glatigny S, Letourneur F, Jacques S, Smith JA, et al. Reverse interferon signature is characteristic of antigen-presenting cells in human and rat spondylarthritis. *Arthritis Rheumatol* (2014) 66:841–51. doi: 10.1002/art.38318
14. Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, et al. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EB13 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4+ T cells. *Immunity* (2002) 16:779–90. doi: 10.1016/S1074-7613(02)00324-2
15. Yoshida H, Hunter CA. The immunobiology of interleukin-27. *Annu Rev Immunol* (2015) 33:417–43. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112134
16. Iwasaki Y, Fujio K, Okamura T, Yamamoto K. Interleukin-27 in T cell immunity. *Int J Mol Sci* (2015) 16:2851–63. doi: 10.3390/ijms16022851
17. Jankowski M, Wandtke T. *Interleukin-27: Biological properties and clinical application*. Springer (2016). p. 91.
18. Owaki T, Asakawa M, Fukai F, Mizuguchi J, Yoshimoto T. IL-27 induces Th1 differentiation via p38 MAPK/T-bet- and intercellular adhesion molecule-1/LFA-1/ERK1/2-dependent pathways. *J Immunol Baltim Md 1950* (2006) 177:7579–87. doi: 10.4049/jimmunol.177.11.7579
19. Batten M, Li J, Yi S, Kljavin NM, Danilenko DM, Lucas S, et al. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol* (2006) 7:929–36. doi: 10.1038/ni1375
20. Khan D, Dai R, Karpuzoglu E, Ahmed SA. Estrogen increases, whereas IL-27 and IFN-gamma decrease, splenocyte IL-17 production in WT mice. *Eur J Immunol* (2010) 40:2549–56. doi: 10.1002/eji.201040303
21. Apetoh L, Quintana FJ, Pot C, Joller N, Xiao S, Kumar D, et al. The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat Immunol* (2010) 11:854–61. doi: 10.1038/ni.1912
22. Pot C, Apetoh L, Awasthi A, Kuchroo VK. Induction of regulatory Tr1 cells and inhibition of TH17 cells by IL-27. *Semin Immunol* (2011) 23:438–45. doi: 10.1016/j.smim.2011.08.003
23. International Genetics of Ankylosing Spondylitis Consortium (IGAS), Cortes A, Hadler J, Pointon JP, Robinson PC, Karaderi T, et al. Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nat Genet* (2013) 45:730–8. doi: 10.1038/ng.2667
24. Tesson L, Remy S, Ménoret S, Usal C, Thinar D, Savignard C, et al. Genome editing in rats using TALE nucleases. *Methods Mol Biol Clifton NJ* (2016) 1338:245–59. doi: 10.1007/978-1-4939-2932-0_18
25. Hacquard-Bouder C, Falgarone G, Bosquet A, Smaoui F, Monnet D, Ittah M, et al. Defective costimulatory function is a striking feature of antigen-presenting cells in an HLA-B27-transgenic rat model of spondylarthropathy. *Arthritis Rheum* (2004) 50:1624–35. doi: 10.1002/art.20211
26. Hacquard-Bouder C, Chimenti M-S, Giquel B, Donnadieu E, Fert I, Schmitt A, et al. Alteration of antigen-independent immunologic synapse formation between dendritic cells from HLA-B27-transgenic rats and CD4+ T cells: Selective impairment of costimulatory molecule engagement by mature HLA-B27. *Arthritis Rheum* (2007) 56:1478–89. doi: 10.1002/art.22572
27. Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewé R, Listing J, Akkoc N, Brandt J, et al. The development of assessment of SpondyloArthritis international society classification criteria for axial spondylarthritis (part II): validation and final selection. *Ann Rheum Dis* (2009) 68:777–83. doi: 10.1136/ard.2009.108233
28. Bertrand V, Quéré S, Guimbaud R, Sogni P, Chauvelot-Moachon L, Tulliez M, et al. Effects of murine recombinant interleukin-10 on the inflammatory disease of rats transgenic for HLA-B27 and human 2-microglobulin. *Eur Cytokine Netw* (1998) 9:161–70.
29. Araujo LM, Jouhault Q, Fert I, Bouiller I, Chiochia G, Breban M. Effects of a low-dose IL-2 treatment in HLA-B27 transgenic rat model of spondylarthritis. *Arthritis Res Ther* (2021) 23:193. doi: 10.1186/s13075-021-02559-y
30. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinforma Oxf Engl* (2013) 29:15–21. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635
31. Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinf* (2011) 12:323. doi: 10.1186/1471-2105-12-323
32. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* (2014) 15:550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8
33. Yoon J-H, Sudo K, Kuroda M, Kato M, Lee I-K, Han JS, et al. Phosphorylation status determines the opposing functions of Smad2/Smad3 as STAT3 cofactors in TH17 differentiation. *Nat Commun* (2015) 6:7600. doi: 10.1038/ncomms8600
34. Imbratta C, Leblond MM, Bouzourène H, Speiser DE, Velin D, Verdeil G. Maf deficiency in T cells dysregulates treg - TH17 balance leading to spontaneous colitis. *Sci Rep* (2019) 9:6135. doi: 10.1038/s41598-019-42486-2
35. Vogel TP, Milner JD, Cooper MA. The ying and yang of STAT3 in human disease. *J Clin Immunol* (2015) 35:615–23. doi: 10.1007/s10875-015-0187-8
36. Cherqaoui B, Araujo LM, Glatigny S, Breban M. Axial spondylarthritis: emerging drug targets. *Expert Opin Ther Targets* (2021) 25:633–44. doi: 10.1080/14728222.2021.1973429
37. Bsat M, Chapuy L, Rubio M, Wassef R, Richard C, Schwenter F, et al. Differential pathogenic Th17 profile in mesenteric lymph nodes of crohn's disease and ulcerative colitis patients. *Front Immunol* (2019) 10:1177. doi: 10.3389/fimmu.2019.01177
38. Paine A, Ritchlin C. Targeting the IL-23/IL-17 axis in axial spondylarthritis. *Curr Opin Rheumatol* (2016) 28:359–67. doi: 10.1097/BOR.0000000000000301
39. Danve A, Deodhar A. Treatment of axial spondylarthritis: an update. *Nat Rev Rheumatol* (2022) 18:205–16. doi: 10.1038/s41584-022-00761-z
40. Breban M, Araujo LM, Chiochia G. Animal models of spondylarthritis: do they faithfully mirror human disease? *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ* (2014) 66:1689–92. doi: 10.1002/art.38636
41. Baeten D, Sieper J, Braun J, Baraliakos X, Dougados M, Emery P, et al. Secukinumab, an interleukin-17A inhibitor, in ankylosing spondylitis. *N Engl J Med* (2015) 373:2534–48. doi: 10.1056/NEJMoal505066
42. Hanson ML, Hixon JA, Li W, Felber BK, Anver MR, Stewart CA, et al. Oral delivery of IL-27 recombinant bacteria attenuates immune colitis in mice. *Gastroenterology* (2014) 146:210–221.e13. doi: 10.1053/j.gastro.2013.09.060
43. Fitzgerald DC, Fonseca-Kelly Z, Cullimore ML, Safabakhsh P, Saris CJM, Zhang G-X, et al. Independent and interdependent immunoregulatory effects of IL-27, IFN- β , and IL-10 in the suppression of human Th17 cells and murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol Baltim Md 1950* (2013) 190:3225–34. doi: 10.4049/jimmunol.1200141
44. Pot C, Jin H, Awasthi A, Liu SM, Lai C-Y, Madan R, et al. Cutting edge: IL-27 induces the transcription factor c-maf, cytokine IL-21, and the costimulatory receptor ICOS that coordinately act together to promote differentiation of IL-10-producing Tr1 cells. *J Immunol Baltim Md 1950* (2009) 183:797–801. doi: 10.4049/jimmunol.0901233
45. Paulos CM, Carpenito C, Plesa G, Suhoski MM, Varela-Rohena A, Golovina TN, et al. The inducible costimulator (ICOS) is critical for the development of human T(H)17 cells. *Sci Transl Med* (2010) 2:55ra78. doi: 10.1126/scitranslmed.3000448
46. Lazarevic V, Chen X, Shim J-H, Hwang E-S, Jang E, Bolm AN, et al. T-Bet represses T(H)17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding ROR γ t. *Nat Immunol* (2011) 12:96–104. doi: 10.1038/ni.1969
47. Batten M, Kljavin NM, Li J, Walter MJ, de Sauvage FJ, Ghilardi N. Cutting edge: IL-27 is a potent inducer of IL-10 but not Foxp3 in murine T cells. *J Immunol* (2008) 180:2752–6. doi: 10.4049/jimmunol.180.5.2752
48. Peters A, Fowler KD, Chalmin F, Merkle D, Kuchroo VK, Pot C. IL-27 induces Th17 differentiation in the absence of STAT1 signaling. *J Immunol Baltim Md 1950* (2015) 195:4144–53. doi: 10.4049/jimmunol.1302246
49. Niedbala W, Cai B, Wei X, Patakas A, Leung BP, McInnes IB, et al. Interleukin 27 attenuates collagen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis* (2008) 67:1474–9. doi: 10.1136/ard.2007.083360
50. McLean MH, Andrews C, Hanson ML, Baseler WA, Anver MR, Senkevitch E, et al. Interleukin-27 is a potential rescue therapy for acute severe colitis through interleukin-10-Dependent, T-Cell-Independent attenuation of colonic mucosal innate immune responses. *Inflammation Bowel Dis* (2017) 23:1983–95. doi: 10.1097/MIB.0000000000001274
51. Venken K, Elewaut D. New immune cells in spondylarthritis: Key players or innocent bystanders? *Best Pract Res Clin Rheumatol* (2015) 29:706–14. doi: 10.1016/j.berh.2016.02.002

COPYRIGHT

© 2023 Jouhault, Cherqaoui, Jobart-Malfait, Glatigny, Lauraine, Hulot, Morelle, Hagege, Ermoza, El Marjou, Izac, Saintpierre, Letourneur, Rémy, Anegon, Boissier, Chiochia, Breban and Araujo. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Annexe II: Article 3

STAT1 deficiency underlies a proinflammatory imprint of naive CD4⁺ T cells in spondyloarthritis.



OPEN ACCESS

EDITED BY
 Murugaiyan Gopal,
 Harvard Medical School, United States

REVIEWED BY
 Rosalba Salcedo,
 National Institutes of Health (NIH),
 United States
 Guenter Steiner,
 Medical University of Vienna, Austria
 Eric Gracey,
 Ghent University, Belgium

*CORRESPONDENCE
 Maxime Breban
 ✉ maxime.breban@aphp.fr

†These authors share last authorship

RECEIVED 23 May 2023
 ACCEPTED 07 September 2023
 PUBLISHED 18 October 2023

CITATION
 Cherqaoui B, Crémazy F, Lauraine M,
 Shammas G, Said-Nahal R,
 Mambu Mambu H, Costantino F,
 Fourmont M, Hulot A, Garchon H-J,
 Glatigny S, Araujo LM and Breban M (2023)
 STAT1 deficiency underlies a
 proinflammatory imprint of naive CD4⁺
 T cells in spondyloarthritis.
Front. Immunol. 14:1227281.
 doi: 10.3389/fimmu.2023.1227281

COPYRIGHT
 © 2023 Cherqaoui, Crémazy, Lauraine,
 Shammas, Said-Nahal, Mambu Mambu,
 Costantino, Fourmont, Hulot, Garchon,
 Glatigny, Araujo and Breban. This is an open-
 access article distributed under the terms of
 the [Creative Commons Attribution License
 \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
 reproduction in other forums is permitted,
 provided the original author(s) and the
 copyright owner(s) are credited and that
 the original publication in this journal is
 cited, in accordance with accepted
 academic practice. No use, distribution or
 reproduction is permitted which does not
 comply with these terms.

STAT1 deficiency underlies a proinflammatory imprint of naive CD4⁺ T cells in spondyloarthritis

Bilade Cherqaoui^{1,2}, Frédéric Crémazy^{1,2}, Marc Lauraine^{1,2},
 Ghazal Shammas^{1,2}, Roula Said-Nahal³,
 Hendrick Mambu Mambu^{1,2,4}, Félicie Costantino^{1,2,3},
 Marine Fourmont^{1,2}, Audrey Hulot^{1,2}, Henri-Jean Garchon^{1,2,4},
 Simon Glatigny^{1,2}, Luiza M. Araujo^{1,2†} and Maxime Breban^{1,2,3*†}

¹Infection & Inflammation, UMR 1173, Inserm, UVSQ/Université Paris Saclay, Montigny-le-Bretonneux, France, ²Laboratoire d'Excellence Inflammex, Université Paris-Centre, Paris, France, ³Rheumatology Division, Ambroise Paré Hospital, AP-HP, Boulogne-Billancourt, France, ⁴Genomic Platform of Faculty of Health Simone Veil, UVSQ/Université Paris Saclay, Montigny-le-Bretonneux, France

Introduction: In spondyloarthritis (SpA), an increased type 3 immune response, including T helper cells (Th) 17 excess, is observed in both human and SpA animal models, such as the HLA-B27/human β 2-microglobulin transgenic rat (B27-rat).

Methods: To investigate this unexplained Th17-biased differentiation, we focused on understanding the immunobiology of B27-rat naive CD4⁺ T cells (Tn).

Results: We observed that neutrally stimulated B27-rat Tn developed heightened Th17 profile even before disease onset, suggesting an intrinsic proinflammatory predisposition. In parallel with this observation, transcriptomic and epigenomic analyses showed that B27-rat Tn exhibited a decreased expression of Interferon/Th1- and increased expression of Th17-related genes. This molecular signature was predicted to be related to an imbalance of STAT1/STAT3 transcription factors activity. *Stat1* mRNA and STAT1 protein expression were decreased before disease onset in Tn, even in their thymic precursors, whereas *Stat3*/STAT3 expression increased upon disease establishment. Confirming the relevance of these results, *STAT1* mRNA expression was also decreased in Tn from SpA patients, as compared with healthy controls and rheumatoid arthritis patients. Finally, stimulation of B27-rat Tn with a selective STAT1 activator abolished this preferential IL-17A expression, suggesting that STAT1-altered activity in B27-rats allows Th17 differentiation.

Discussion: Altogether, B27-rat Tn harbor a STAT1 deficiency preceding disease onset, which may occur during their thymic differentiation, secondarily associated with a persistent Th17 bias, which is imprinted at the epigenomic level. This early molecular phenomenon might lead to the persistent proinflammatory skew of CD4⁺ T cells in SpA patients, thus offering new clues to better understand and treat SpA.

KEYWORDS

ankylosing spondylitis, dendritic cells, epigenomic, HLA-B27, naive CD4⁺ T cells, STAT1, spondyloarthritis, T helper 17

Introduction

Spondyloarthritis (SpA) is a frequent chronic inflammatory rheumatism that primarily affects the axial skeleton and, frequently, the peripheral joints and extra-articular tissues, including psoriasis, anterior uveitis, and inflammatory bowel disease (IBD) (1). Its striking association with the human leukocyte antigen (HLA)-B27 remains incompletely understood (2).

Several lines of rats transgenic for HLA-B27 and human β 2-microglobulin (h β 2m) (B27-rat) spontaneously develop inflammatory manifestations recapitulating the main SpA features (rat-SpA) in a specific way since HLA-B7/h β 2m-transgenic rats (B7-rats) remain healthy (3). Thus, B27-rat represents a faithful model to study the pathogenicity of HLA-B27 in SpA (4). Contrary to expectation for a class I major histocompatibility complex-associated disease, previous studies evidenced extensively that CD8⁺ T cells were dispensable, but that CD4⁺ T cells were critical in mediating disease manifestations (3). Further characterization of effector CD4⁺ T cells showed a selective expansion of proinflammatory CD4⁺ T cells exhibiting a T helper 17 (Th17) phenotype (5).

Furthermore, antigen-presenting cells (APCs), including dendritic cells (DCs), from disease-prone B27-rats were shown to drive CD4⁺ T-cell polarization toward Th17 bias, supporting the hypothesis that the expression of HLA-B27 in APC plays a critical role in triggering the inflammatory process (5, 6). Moreover, several defective functions of DCs have been identified in the B27-rat, which may promote skewed T-cell differentiation (7, 8).

In the present study, our objective was to decipher the molecular mechanisms favoring an altered differentiation of naive CD4⁺ T cells (Tn) from B27-rat. We first studied the influence of DCs on Tn fate, then focused on intrinsic predisposition of Tn to differentiate into Th17 cells, using transcriptomic, epigenomic, and functional approaches. This allowed us to identify decreased expression of *STAT1* in Tn from B27-rat as an early molecular event underlying Th17 differentiation bias. We finally identified that decreased *STAT1* gene expression was also present in Tn from SpA patients, strengthening the relevance of our finding for SpA.

Materials and methods

Rats

The SpA-prone B27-rats of the 33-3 line bearing 55 copies of HLA-B*2705 and 28 copies of h β 2m and the healthy B7-rats of the 120-4 line bearing 52 copies of HLA-B*0702 and 26 copies of h β 2m, all on a Fisher (F344) background, were bred under conventional conditions (5). Age-matched nontransgenic (NTG) littermates were used as controls. B27-rats were used at three distinct ages: (i) \leq 10 days, asymptomatic, so-called newborn; (ii) 3–4 weeks, asymptomatic, so-called premonitory; and (iii) 2–12 months, sick. Study procedures were approved by the Institutional Animal Experimentation Ethical Committee from the Faculty of Health Simone Veil (APAFIS-8910).

Rat cells preparation

Single-cell suspensions were prepared mechanically either from mesenteric lymph nodes (mLN), cervical LN (cLN), or thymus. Subsets of CD4⁺ T cells were purified by flow cytometry (ARIA-III). TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD25⁻CD62L^{high} mature Tn were isolated from LNs (Supplementary Figure S1A). The sorted T cells were uniformly CD44^{low}, confirming that they corresponded to Tn, rather than central memory T cells (data not shown). TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD8⁻ and TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD8⁺ thymocytes were isolated from the thymus. Conventional type-2 DCs (cDC2) were obtained from the spleen, digested with collagenase-D (2 mg/mL, Roche, Mannheim - Germany) (9). Low-density cells were collected after centrifugation on a 14.5% Nycodenz gradient (Nycomed, Oslo - Norway), magnetically enriched for CD103⁺ subset (anti-rat microbeads, Miltenyi—autoMACS Pro Separator, Bergisch Gladbach - Germany) and sorted by flow cytometry as TCR $\alpha\beta$ ⁻CD45RA⁻CD4⁺CD103⁺ cells. Fluorochrome-conjugated mouse anti-rat TCR $\alpha\beta$, CD103 were from BioLegend; mouse anti-rat CD4, CD45RA from BD (San Jose - California/US); mouse anti-rat CD62L, CD25, mouse anti-rat CD8 from Thermo Fisher Scientific (Eugene - Oregon/US).

Culture of rat Tn

Tn were labeled with fluorochrome-conjugated CellTraceViolet (CTV, Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions, then cultured (10^5 per well) with soluble anti-rat CD28 (1 μ g/mL, BD) in round-bottom 96 wells plate coated with mouse anti-rat CD3 (2 μ g/mL, BD), in complete medium was RPMI-1640 with Glutamax I (Life Technologies, Paisley - United Kingdom), 10% fetal calf serum, streptomycin/penicillin (100 μ g/mL), 2% sodium pyruvate, 0.05 mM β -mercaptoethanol and 10 mM HEPES (complete RPMI), during 3 or 6 days. In some experiments, rat recombinant (rr) IL-1 β (20 ng/mL, R&D Systems, Minneapolis - Minnesota/US), rrIFN- γ (10 ng/mL, Miltenyi), STAT1 transcriptional activator, 2-(1,8-Naphthyridin-2-yl)phenol [2NP] (50 μ M, Abcam, Cambridge - United Kingdom) were added at the beginning of culture (10, 11). 2NP concentration was optimized in preliminary experiment, confirming a significant increase of pSTAT1 expression level in Tn, from 51.1% to 68.7% at 50 μ M dose (Supplementary Figure S1B). Th1 differentiation was induced by adding rrIL-12 (10 ng/mL, R&D Systems), Ab neutralizing rat IL-4 (1 μ g/ml, Miltenyi), and rrIL-2 (5 ng/ml, ImmunoTools, Friesoythe - Germany) at the beginning of a 4-day culture.

Coculture of rat Tn and cDC2

After overnight maturation of cDC2 (37°C) with rr granulocyte macrophage colony stimulating factor (100 ng/mL, BioLegend, San Diego - California/US), 10^5 mLN Tn labeled with CTV were added to 10^4 cDC2 in complete RPMI, in the presence of soluble anti-TCR $\alpha\beta$ (1 μ g/mL, BioLegend), during 3 or 6 days.

Rat T-cell immunophenotyping

After culture, T cells were stimulated with phorbol myristate acetate (10 ng/mL, Sigma-Aldrich, Saint-Louis - Missouri/US), ionomycin (1 µg/mL, Sigma-Aldrich) for 4h, in the presence of brefeldin A (2 µg/mL, Sigma-Aldrich). Live-Dead and CTV staining identified live cells that had divided. Cell surface activation markers (CD25, ICOS)—fixed before permeabilization (buffers from Tonbo, San Diego - California/US)—or intra-cellular cytokines (IL-17A, TNFα, and IFNγ) expression was evaluated by flow cytometry (Fortessa). We then analyzed T-cell immunophenotyping using FlowJo (version 10, BD), gating on live CD4⁺ T cells. Isotypes were used to define gating strategy for CD25, ICOS, IL-17A, and TNFα staining (Supplementary Figure S1C). Mouse anti-rat IFN-γ was from BD; mouse anti-rat ICOS, IL-17A, and hamster anti-rat TNFα, IL-17A enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit from Thermo Fisher Scientific.

Human T-cell preparation

Axial SpA patients -fulfilling the Assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria (12)-, age/sex-matched healthy controls (HCs) and rheumatoid arthritis (RA) patients -fulfilling the American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria (13)- were recruited in the department of rheumatology of Ambroise Pare hospital. Clinical data are summarized in Supplementary Table S1. Peripheral venous blood peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll (GE Healthcare, Chicago - Illinois/US) density gradient centrifugation. CD14⁺ cells were removed by positive magnetic selection (AutoMacs) using human anti-human CD14 microbeads (Miltenyi). Total CD14⁻ PBMC were used for *ex-vivo* (p)STAT1/3 assay. CD4⁺CD45RA^{high}CD45RO^{low}CCR7⁺ Tn were sorted by flow cytometry (Supplementary Figure S1D) for quantitative real-time polymerase chain reaction (q-RT-PCR). Anti-human CD4, CD45RA, CD45RO, and mouse anti-human CCR7 were from BD. Written informed consent was obtained before study, approved by the local ethical committee (Comité de Protection des Personnes Ile-de-France XI, AOR10006-NI09031).

Total STAT1 and STAT3 intra-cellular content

Single-cell suspensions of rat mLN were marked to identify CD4⁺CD25⁻CD62L⁺ Tn. After fixation, permeabilization (buffers from BD) and staining with anti-total STAT1 and STAT3 Abs (BD), the mean fluorescent intensity (MFI) was quantified by flow cytometry (Fortessa).

STAT1 and STAT3 phosphorylation

Single-cell suspensions of rat mLN were stained to identify CD4⁺CD25⁻CD62L⁺ Tn. Then, they were stimulated with mouse rIL-27 (5 ng/mL, R&D Systems) or rIL-6 (10 ng/mL, R&D Systems) for 10 min at 37°C. After fixation, permeabilization (buffers from BD) and staining with mouse anti-human/mouse STAT1 phosphorylated at tyrosine 701 and STAT3 phosphorylated at tyrosine 705 Abs (BD), the MFI was quantified by flow cytometry (Fortessa).

RNA sequencing

Total RNA was purified from mLN Tn sorted from 4-week- (Monarch Total RNA Miniprep Kit, NEB, Ipswich, Massachusetts/US) or 3-month-old rats (RNeasy Micro Kit, QIAGEN, Hilden - Germany). Samples with RNA integrity number > 7 were sequenced. Libraries were prepared using NEBNext Low Input RNA Library Prep Kit (3-month-old) or NEBNext rRNA Depletion Kit and NEBNext Ultra II Directional RN Library Prep Kit (4-week-old), and sequenced on an Illumina HiSeq 2000 (3-month-old) or NextSeq 500/550 (4-week-old), paired-end 75 bases. Sequencing was performed at the genomic platforms of Cochin Institute—Paris Centre University, or Faculty of Health Simone Veil—Versailles-Saint-Quentin/Paris-Saclay University. Volcano plots were designed with EnhancedVolcano. Transcripts were aligned to the rat genome Rnr_6.0 using STAR version 2.7.1 then reads were counted using featureCount (14, 15). Differential analysis was performed with DESeq2 including batch effect (16). Pathways analysis was performed using QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (17, 18). Upstream transcription regulators were retrieved using IPA, computing an overlap *p*-value (overlap between the dataset genes and the genes regulated by a transcription regulator) and an activation *z*-score, which infers the predicted activation state of the transcription regulator.

q-RT-PCR

Tn and thymocyte pellets were collected in TRIzol RNA Isolation Reagents (Thermo Fisher Scientific), then RNA was extracted using chloroform/ethanol (rat) or Monarch Total RNA Miniprep Kit (human). cDNA was synthesized using RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific), then q-RT-PCR was performed using SsoAdvancedTM Universal SYBR Green Supermix (BioRad, Hercules - California/US) and CFX384 (Touch Real-Time PCR Detection System). Duplicates were run for each sample; *Gapdh/GADPH* and *Actin/ACTIN* were used as endogenous reference genes for mRNA abundance normalization (8). Primer sequences are provided in Supplementary Table S2.

Chromatin immunoprecipitation followed by whole-genome sequencing

mLN Tn ($2\text{--}7 \times 10^5$ cells) were sorted from 4-week- or 3-month-old rats, fixed using 1% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, Dresden - Germany) for 8 min. After cell nuclei lysis, chromatin was fragmented (Bioruptor PICO/Diagenode, Seraing - Belgium), immunoprecipitated overnight at 4°C using rabbit polyclonal Abs: IgG (Diagenode, 1 µg), m/r anti-H3K4Me3 (Diagenode, 1 µg), m/r anti-H3K27Ac Abs (Active Motif, 5 µg, Carlsbad California/US), then tagmented using the ChIP-mentation Kit for Histones (Diagenode). Libraries were prepared according to the ChIP-mentation Kit guidelines and sequenced using the NextSeq 500 (Illumina). Sequencing was performed at the genomic platforms of Integrative Institute of Cellular Biology - Paris-Saclay University, or Faculty of Health Simone Veil-Versailles-Saint-Quentin/Paris-Saclay University. Reads were trimmed with fastp and aligned to the rat genome Rnr_6.0 using Bowtie2 (19, 20). The peak calling was performed with MACS2, normalized on IgG signal (21). Peaks were visualized using IGV software (22). Distribution across the different genomic features was performed using the R package ChIPseeker (23). Differential peaks enrichment analysis was performed using DiffBind (24). Superenhancers (SEs) were retrieved using ROSE, after enhancers ranking depending on H3K27Ac signal (25). Transcription factors binding motif were scanned using Hypergeometric Optimization of Motif EnRichment (HOMER) (26, 27). Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome (KEGG) pathways analysis was performed using g:Profiler. Upstream transcription regulators were retrieved using IPA, as previously described (18).

Statistical analysis

Flow cytometry and q-RT-PCR data were analyzed using GraphPad-Prism 9. Significance was determined by paired or unpaired Student's t-test; Wilcoxon test; one- or two-way analysis of variance followed by Tukey's multiple comparisons test; simple linear regression. *p*-values were adjusted with Benjamini-Hochberg process for RNA/ChIP-seq data. *p*-values were considered significant if < 0.05 .

Results

B27-rat DCs and Tn jointly contribute to CD4⁺ T-cell proinflammatory skew

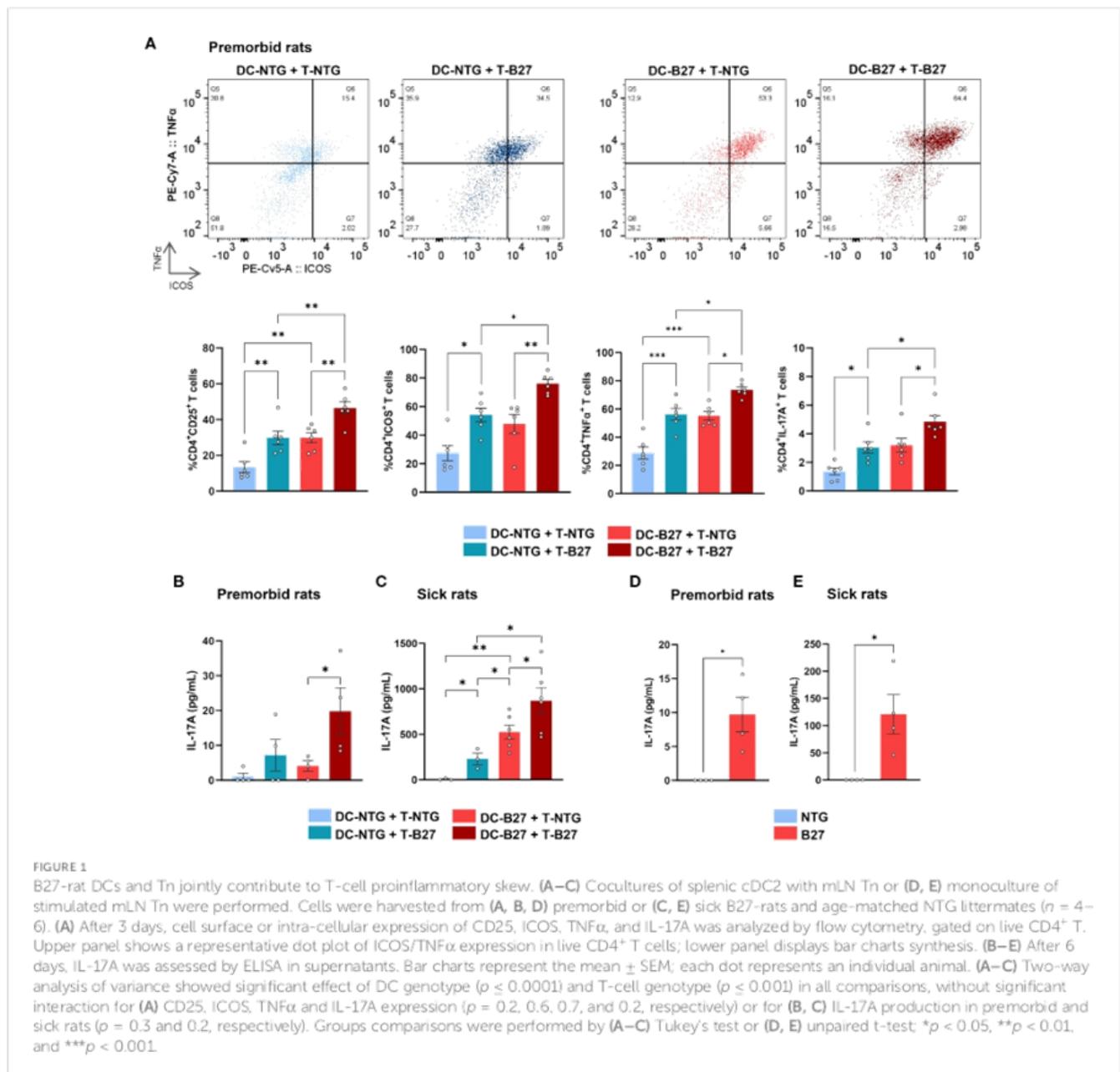
To examine the respective influence of Tn and DCs in the previously described Th17 differentiation bias (5), we performed cross-cultures of Tn with cDC2 from B27-rats or NTG littermates and analyzed CD4⁺ T-cell phenotype at the end of culture (Figure 1A). Both cDC2 and Tn from B27-rats contributed

additively to the proinflammatory Th17-like profile of CD4⁺ T cells, characterized by heightened expression of activation markers such as CD25 and ICOS—the latest known to be critical for Th17 differentiation (28)—and inflammatory cytokines such as TNFα and IL-17A, even before disease onset. This was also confirmed by an increased production of IL-17A in culture supernatant (Figure 1B). Absolute numbers of Tn and effector CD4⁺ T cells were similar in the mLN of premonitory B27-rats and NTG littermates, showing that they had not undergone *in-vivo* pre-activation (Supplementary Figure S2A). Even stronger Th17-like profile of CD4⁺ T cells was observed after cocultures of cDC2 and Tn from sick B27-rats, showing that this phenomenon was amplified upon disease establishment (Figure 1C, Supplementary Figure S2B).

B27-rat Tn are prone to Th17 differentiation

We next examined B27-rat Tn responses after *in vitro* activation in the absence of cDC2. Consistent with the foregoing results, stimulated Tn from both premonitory (Figure 1D, Supplementary Figure S2C) and sick B27-rats (Figure 1E, Supplementary Figure S2D) overexpressed activation markers and harbored a Th17-like phenotype. In contrast, Tn from healthy transgenic B7-rats behaved like NTG rats T cells (Supplementary Figure S2E).

To determine the factors driving the propensity of B27-rat Tn to develop a proinflammatory phenotype upon stimulation, we compared the whole-transcriptome of mLN Tn between premonitory B27-rats and NTG littermates. Principal components analysis highlighted a clear-cut difference between B27-rats and NTG Tn (Supplementary Figure S3/upper panel). Ninety-nine genes were upregulated and 128 were downregulated in B27-rats (Supplementary Table S3). Among the pathways significantly enriched in differentially expressed genes (DEGs), we extracted the top 5 predicted to be activated and the top 5 predicted to be inhibited. Corroborating our previous results *in vitro*, the Th17 pathway was one of the most activated in B27-rats, whereas IFN/Th1 pathway (including anti-viral responses) was the most inhibited (Figures 2A, B, Supplementary Table S4), consistent with the fact that both lineages counter-regulate each other (29). In Tn from sick B27-rats, we observed a similar profile of Th17 pathway activation and IFN/Th1 pathway inhibition compared to NTG littermates (Figures 2C, D, Supplementary Figure S3/lower panel, and Supplementary Table S5). By mapping the top DEG related to Th17 and IFN/Th1 pathways, we confirmed such signature before disease onset, which intensified upon disease establishment (Figure 2E). Four upstream transcription factors were predicted to account for this transcriptomic signature in both premonitory and sick rats (Figure 2F). In B27-rat Tn, STAT1 was predicted to be less active and STAT3 more active, consistently with these cross-regulated transcription factors being critical for Th1 and Th17 differentiation, respectively (Figure 2F, Supplementary Table S6) (30, 31).



Th17 imprint of B27-rat Tn is epigenetically determined

We next asked whether this transcriptomic signature of B27-rat Tn was reflected in their chromatin structure. We performed ChIP-seq to profile the enrichment of two activating histone marks in Tn from B27-rats and NTG littermates: H3K4Me3 and H3K27Ac, which are preferentially located on promoters and enhancers, respectively, to profile the epigenomic factors that might be involved in B27-rat Tn skewed differentiation (Figure 3A). Histone marks distribution across the different genomic features was comparable overall between B27-rats and NTG littermates (data not shown). The foregoing RNA-seq data evidenced that differential enrichment profile of histone marks between B27-rats and NTG littermates was not due to an alteration of histone modifiers expression (data not shown).

H3K4Me3 and H3K27Ac were differentially more enriched in Tn from sick B27-rats than in NTG in 26 and 126 sites, respectively (Supplementary Figure S4A, Supplementary Table S7). We next identified genes at proximity to these promoters and enhancers and pooled them to increase the power of KEGG pathways analysis. These genes were related to Th17 differentiation (Figure 3B), including *Il1r1* (Figure 3C, Supplementary Figure S4C), *Socs3*, *Ahr*, and *Trem2*, which were also upregulated at the transcriptomic level in B27-rat (Figures 2D, E). In NTG rat Tn, H3K4Me3 was more enriched only in six sites, including the *Usp18* (Figure 3C, Supplementary Figure S4C), *Olah* and *Oasl* genes, all related to the IFN pathway, which were also downregulated at the transcriptomic level in B27-rat (Figures 2D, E). B27-rat Tn harbored a biased epigenome including increased enrichment for H3K4Me3 histone marks at the *Il1r1* promoter, even before disease

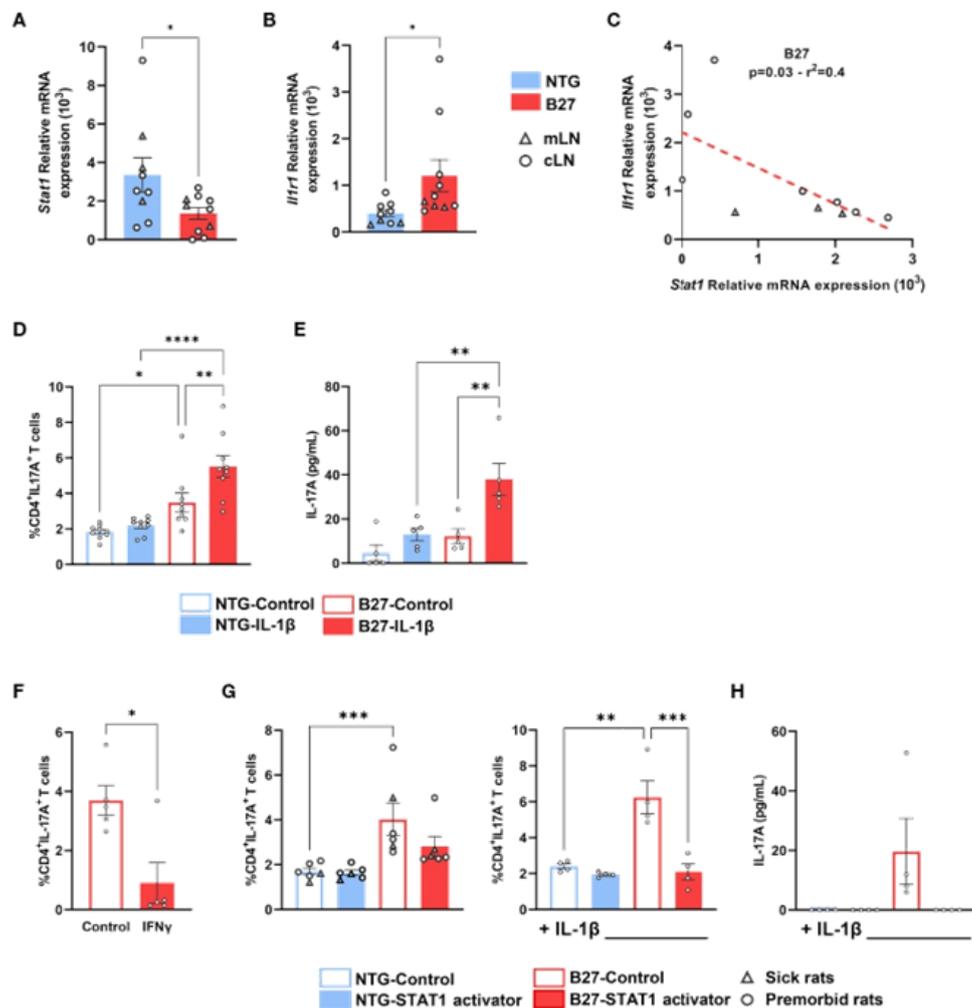


FIGURE 6

Stat1 deficiency is associated with *Il1r1* upregulation, favoring a Th17 differentiation bias, that is inhibited by STAT1 signaling stimulation. Tn from (A–C) cLN and mLN or (D–H) mLN from (A–E, G, H) pre-morbid or sick (F) B27-rats and NTG age-matched littermates ($n = 6–8$). (A–C) *Stat1* and *Il1r1* mRNA expression assessed by q-RT-PCR. (C) Correlation between *Stat1* and *Il1r1* mRNA expression assessed by q-RT-PCR in B27-rat Tn. (D–H) Tn cultured in anti-CD3 coated wells in the presence of soluble anti-CD28 mAb. (D, E, G, H) with or without IL-1 β . (F) with or without IFN γ . (G, H) with or without STAT1 transcriptional activator (2NP; 50 μ M), for 3 days. (D, F, G) Intra-cellular expression of IL-17A was analyzed by flow cytometry, gated on live CD4⁺ T cells. (E, H) After 3 days, IL-17A was assessed by ELISA in supernatants. Bar charts represent the mean \pm SEM; each dot represents an individual animal. (D, E, G, H) Two-way analysis of variance showed significant effect of genotype ($p < 0.01$) and treatment condition ($p < 0.01$) in all comparisons, without significant interaction. Groups comparisons were performed by (A, B, F) unpaired t-test or (C) linear regression or (D, E, G, H) Tukey's test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Interestingly, the addition of IFN γ , which signals through STAT1, induced a decrease of IL-17A production (Figure 6F). The addition of 2NP, a selective STAT1 transcriptional activator, during Tn activation specifically reversed the increased IL-17A expression and production in pre-morbid and sick B27-rat T cells (Figure 6F), even more strikingly in the presence of IL-1 β (Figures 6G, H). We thus confirmed that activation of STAT1 signaling could reverse the Th17 bias imprinted in B27-rat Tn.

Discussion

Rat-SpA that develops spontaneously in the 33-3 line of B27-rats appears dependent on CD4⁺ T cells and is associated with abnormal expansion of proinflammatory Th17 cells producing

TNF α and IL-17A, favored by abnormal signals delivered by APC (3, 5, 38). Consistently, B27-rat DCs exhibit altered functions participating to rat-SpA susceptibility and shared with SpA patients, including reverse-IFN signature and decreased IL-27 and IL-10 expression that could contribute to Th17 expansion (7, 8, 39).

Here, we highlighted the critical role of a precocious DCs/Tn abnormal cross-talk, as pre-morbid B27-rats cDC2 induced heightened activation and Th17-like profile in cocultured Tn. Moreover, we revealed that B27-rat Tn were prone to develop a proinflammatory profile before rat-SpA onset. The analysis of the B27-rat Tn transcriptome showed two opposite signatures: defective Th1/IFN and heightened Th17 patterns, notably involving key transcription factors of both pathways, that is, STAT1 and STAT3, respectively. This appears particularly compelling, since transcription factor from both pathways cross-regulate each other 182

(29, 40–43). This imbalanced transcriptomic signature between both pathways was present in premorbid rats and exacerbated in sick B27-rats, providing further confirmation of its relevance to the rat-SpA disease process.

Epigenomic study of histone marks associated with active promoters, enhancers, and SE regions consistently revealed that B27-rat Tn were imprinted at the chromatin level to differentiate preferentially into Th17 cells. Corroborating this observation, IRF4 and BATF—pioneer transcription factors favoring STAT3 binding and transcriptional activity—were predicted to bind to the SE specific of B27-rat Tn (44). In mirror, a decreased binding of STAT1 was predicted on the SE of B27-rat Tn, which also probably reinforced Th17-skewed differentiation of B27-rat Tn (43).

We next examined the earliest stage of CD4⁺ T cell development in B27-rat and found that several of the IFN pathway-related genes (*Stat1*, *Usp18*, *Tbx21*, and *Ifi2*) were already downregulated in the developing thymocytes from premorbid and/or even newborn B27-rats, in particular in the CD4SP. This could suggest a specific role of early biased signals delivered by DC during thymic selection, inducing epigenetic imprinting (45). In contrast, this was not the case for the Th17 pathway-related genes, to the exception of *Il1r1*. Thus, it suggests that the primary alteration in B27-rat Tn most likely resides in the reverse-IFN signature and particularly in decreased *Stat1* expression. This could promote a secondary increase in STAT3/Th17 response which is a hallmark of established rat-SpA (5). This interpretation is consistent with the decrease of STAT1 protein and phosphorylation in premorbid B27-rat Tn, whereas increased STAT3 was only detected in sick B27-rat Tn. It is also supported by the negative regulation of IL-17 production induced *in vitro* by addition of IFN γ or a transcriptional activator of STAT1 during stimulation of B27-rat Tn. Noteworthy, Th17 expansion was also inhibited by addition of IL-27, a pro-Th1 cytokine, in B27-rat CD4⁺ T cultures, restoring the balance between STAT1 and STAT3 activation and *in vivo*, allowing to prevent rat-SpA development (36).

Concerning *Il1r1* upregulation detected in B27-rat thymocytes, it was possibly a consequence of *Stat1* downregulation as suggested by the negative correlation observed between both genes expression in our model, and the already known mutual antagonism between IFN and IL-1 signaling pathways (46). Increased expression of this cytokine receptor gene could contribute to enhance the differentiation of proinflammatory Th17 cells in sites where IL-1 is produced, notably in the gut upon exposure to microbiota, which is a required trigger of rat-SpA in the 33-3 line (47–49).

As in the B27-rat, SpA patients display a Th17 bias that appears to be of critically importance, as confirmed by the efficacy of anti-IL-17 antibodies treatment in a significant number of patients (50, 51). Thus, our observation of a similarly decreased *STAT1* expression and *STAT1/STAT3* imbalance in Tn from HLA-B27⁺ SpA patients supports the relevance of this observation to human SpA development. Indeed, STAT1 deficiency could favor a Th17 bias in patients but other factors might contribute to the complex pathophysiology of SpA. Consistently, decreased T cell IFN γ

response as well as an expansion of EBV- and CMV-specific CD8⁺ T-cell clonotypes have previously been reported in SpA patients that could indicate a defective control of endogenous viruses (52, 53), as a result of altered *STAT1* expression.

In addition to Tn, it is striking that other types of immune cells from B27-rat, that is, cDC2 (8) and cDC1 (Fert I, Araujo LM, Breban M, unpublished observation) as well as monocytes-derived macrophages from SpA patients (8, 54) share a similar reverse-IFN signature, including the downregulation of *Stat1/STAT1*, *Isg15*, *Irf7*, *Oasl*, and *Usp18*. Given that reverse-IFN signature is observed very precociously in thymocytes and similarly in myeloid lineages from B27-rats and SpA patients, it probably occurs as a cellular consequence of HLA-B27 expression. The molecular events linking HLA-B27 to this signature remains to be determined, but we have previously evidenced non-canonical behaviors of the HLA-B27 molecule, including intracellular trafficking alteration (55) and interaction with BMP/TGF β receptor family signaling-pathways (56) that could potentially result in reshaping immune cells function/differentiation. In turn, STAT1 deficiency could favor Th17 differentiation either directly by altering the cellular response to stimulation (40), and/or indirectly by affecting the control of gut microbiota, which is consistent with the gut dysbiosis that is present both in B27-rat and SpA patients (57, 58).

The causal role of STAT1/STAT3 transcription factors imbalance in Th17-biased differentiation of B27-rat Tn is supported by the anti-IL17 effect of transcriptional activator of STAT1 during Tn stimulation, and by our recently published work showing that IL-27 presents anti-inflammatory effects during rat-SpA via the activation of STAT1 and the suppression of Th17 responses (36). Altogether, these data offer the innovative perspective that reshaping the differentiation of Tn early on during the disease process, could prevent an accumulation of pathogenic Th17 population during the course of SpA.

In summary, B27-rat Tn harbor a STAT1 deficiency preceding disease onset, secondarily associated with a persistent Th17 bias, imprinted at the epigenomic level, and probably related to HLA-B27 expression. This early molecular phenomenon may contribute to the persistent proinflammatory skew of CD4⁺ T cells in SpA patients and provide insights for a better understanding and treatment of SpA.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding author. The data presented in the study are deposited in the GEO repository, accession number GSE245067.

Ethics statement

The studies involving humans were approved by Local ethical committee (Comité de Protection des Personnes Ile-de-France XI, AOR10006-NI09031). The studies were conducted in accordance

with the local legislation and institutional requirements. The participants provided their written informed consent to participate in this study. The animal study was approved by Institutional Animal Experimentation Ethical Committee from the Faculty of Health Simone Veil (APAFIS-8910). The study was conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements.

Author contributions

Conceptualization: BC, FCr, LMA, MB; Methodology: BC, FC, ML, GS, RS-N, HM, FCo, MF, AH, H-JG, SG, LMA, MB; Investigation: BC, FC, ML, GS, RS-N, HM, FCo, MF, SG, LMA, MB; Visualization: BC, FCr, ML, GS, RS-N, HM, FCo, MF, SG, LMA, MB; Funding acquisition: BC, FCr, LMA, MB; Project administration: FCr, LMA, MB; Supervision: FCr, LMA, MB; Writing – original draft: BC; Writing – review & editing: BC, FCr, LMA, MB. All authors agree to be accountable for the content of the work. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This work was supported in part by grants from Inflammex Laboratory of Excellence (INFLAMEX G11003LH), unrestricted grant from Novartis Pharma (19DON039). BC's work was supported by a grant from the Société Française de Rhumatologie (SFR). The funders were not involved in the study design, collection, analysis, interpretation of data, the writing of this article or the decision to submit it for publication.

References

1. Taurog JD, Chhabra A, Colbert RA. Ankylosing spondylitis and axial spondyloarthritis. *N Engl J Med* (2016) 374:2563–74. doi: 10.1056/NEJMr1406182
2. Navid F, Holt V, Colbert RA. The enigmatic role of HLA-B*27 in spondyloarthritis pathogenesis. *Semin Immunopathol* (2021) 43:235–43. doi: 10.1007/s00281-021-00838-z
3. Breban M, Glatigny S, Cherqaoui B, Beaufrère M, Lauraine M, Rincheval-Arnold A, et al. Lessons on SpA pathogenesis from animal models. *Semin Immunopathol* (2021) 43:207–19. doi: 10.1007/s00281-020-00832-x
4. Breban M, Araujo LM, Chiochia G. Animal models of spondyloarthritis: do they faithfully mirror human disease? *Arthritis Rheumatol (Hoboken NJ)* (2014) 66:1689–92. doi: 10.1002/art.38636
5. Glatigny S, Fert I, Blaton MA, Lories RJ, Araujo LM, Chiochia G, et al. Proinflammatory Th17 cells are expanded and induced by dendritic cells in spondylarthritis-prone HLA-B27-transgenic rats. *Arthritis Rheum* (2012) 64:110–20. doi: 10.1002/art.33321
6. Araujo LM, Fert I, Joughault Q, Labroquère K, Andrieu M, Chiochia G, et al. Increased production of interleukin-17 over interleukin-10 by treg cells implicates inducible costimulator molecule in experimental spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol (Hoboken NJ)* (2014) 66:2412–22. doi: 10.1002/art.38737
7. Fert I, Glatigny S, Poulain C, Satumtira N, Dorris ML, Taurog JD, et al. Correlation between dendritic cell functional defect and spondylarthritis phenotypes in HLA-B27/HUMAN beta2-microglobulin-transgenic rat lines. *Arthritis Rheum* (2008) 58:3425–9. doi: 10.1002/art.24023
8. Fert I, Cagnard N, Glatigny S, Letourneur F, Jacques S, Smith JA, et al. Reverse interferon signature is characteristic of antigen-presenting cells in human and rat spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol* (2014) 66:841–51. doi: 10.1002/art.38318

Acknowledgments

We are indebted to volunteers who contributed to this study, nurses and Gina Cosentino who participated to blood collection. We acknowledge the contribution of Aude Robert and Pravina Muthan from Pelvipharm® for managing the rat colonies. We also thank the genomic platform of Institute for Integrative Biology of the Cell and Cochin Institute, and Morgane Le Gall from the proteomic platform of Cochin Institute.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1227281/full#supplementary-material>

9. Ermoza K, Glatigny S, Jah N, Camilo V, Mambu Mambuani H, Araujo LM, et al. Tolerogenic XCR1+ dendritic cell population is dysregulated in HLA-B27 transgenic rat model of spondyloarthritis. *Arthritis Res Ther* (2019) 21:46. doi: 10.1186/s13075-019-1827-9
10. Lynch RA, Etchin J, Battle TE, Frank DA. A small-molecule enhancer of signal transducer and activator of transcription 1 transcriptional activity accentuates the antiproliferative effects of IFN-gamma in human cancer cells. *Cancer Res* (2007) 67:1254–61. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2439
11. Bolf EL, Gillis NE, Davidson CD, Rodriguez PD, Cozzens L, Tomczak JA, et al. Thyroid hormone receptor beta induces a tumor-suppressive program in anaplastic thyroid cancer. *Mol Cancer Res* (2020) 18:1443–52. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-20-0282
12. Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewé R, Listing J, Akkoc N, Brandt J, et al. The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. *Ann Rheum Dis* (2009) 68:777–83. doi: 10.1136/ard.2009.108233
13. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheumatic Dis* (2010) 69:1580–8. doi: 10.1136/ard.2010.138461
14. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* (2013) 29:15–21. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635
15. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* (2014) 30:923–30. doi: 10.1093/bioinformatics/btt656

16. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* (2014) 15:550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8
17. Raudvere U, Kolberg L, Kuzmin I, Arak T, Adler P, Peterson H, et al. gProfiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res* (2019) 47:W191–8. doi: 10.1093/nar/gkz369
18. Krämer A, Green J, Pollard J, Tugendreich S. Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinformatics* (2014) 30:523–30. doi: 10.1093/bioinformatics/btt703
19. Langmead B, Wilks C, Antonescu V, Charles R. Scaling read aligners to hundreds of threads on general-purpose processors. *Bioinformatics* (2019) 35:421–32. doi: 10.1093/bioinformatics/bty648
20. Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* (2018) 34:i884–90. doi: 10.1093/bioinformatics/bty560
21. Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoutte J, Johnson DS, Bernstein BE, et al. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol* (2008) 9:R137. doi: 10.1186/gb-2008-9-9-r137
22. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* (2011) 29:24–6. doi: 10.1038/nbt1754
23. Yu G, Wang L-G, He Q-Y. ChIPseeker: an R/Bioconductor package for ChIP peak annotation, comparison and visualization. *Bioinformatics* (2015) 31:2382–3. doi: 10.1093/bioinformatics/btv145
24. Ross-Innes CS, Stark R, Teschendorff AE, Holmes KA, Ali HR, Dunning MJ, et al. Differential oestrogen receptor binding is associated with clinical outcome in breast cancer. *Nature* (2012) 481:389–93. doi: 10.1038/nature10730
25. Whyte WA, Orlando DA, Hnisz D, Abraham BJ, Lin CY, Kagey MH, et al. Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell* (2013) 153:307–19. doi: 10.1016/j.cell.2013.03.035
26. Duttke SH, Chang MW, Heinz S, Benner C. Identification and dynamic quantification of regulatory elements using total RNA. *Genome Res* (2019) 29:1836–46. doi: 10.1101/gr.253492.119
27. Heinz S, Benner C, Spann N, Bertolino E, Lin YC, Laslo P, et al. Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Mol Cell* (2010) 38:576–89. doi: 10.1016/j.molcel.2010.05.004
28. Paulos CM, Carpenito C, Plesa G, Suhoski MM, Varela-Rohena A, Golovina TN, et al. The inducible costimulator (ICOS) is critical for the development of human T(H)17 cells. *Sci Transl Med* (2010) 2:55ra78. doi: 10.1126/scitranslmed.3000448
29. Damsker JM, Hansen AM, Caspi RR. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Ann N Y Acad Sci* (2010) 1183:211–21. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05133.x
30. Tsai M-H, Pai L-M, Lee C-K. Fine-tuning of type I interferon response by STAT3. *Front Immunol* (2019) 10:1448. doi: 10.3389/fimmu.2019.01448
31. Liu L, Okada S, Kong X-F, Kreins AY, Cypowyj S, Abhyankar A, et al. Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *J Exp Med* (2011) 208:1635–48. doi: 10.1084/jem.20110958
32. Hnisz D, Abraham BJ, Lee TI, Lau A, Saint-André V, Sigova AA, et al. Super-enhancers in the control of cell identity and disease. *Cell* (2013) 155:934–47. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.053
33. Farh KK-H, Marson A, Zhu J, Kleinewietfeld M, Housley WJ, Beik S, et al. Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants. *Nature* (2015) 518:337–43. doi: 10.1038/nature13835
34. Béziat V, Li J, Lin J-X, Ma CS, Li P, Bousfiha A, et al. A recessive form of hyper-IgE syndrome by disruption of ZNF341-dependent STAT3 transcription and activity. *Sci Immunol* (2018) 3:eaat4956. doi: 10.1126/sciimmunol.aat4956
35. Yoshida H, Hunter CA. The immunobiology of interleukin-27. *Annu Rev Immunol* (2015) 33:417–43. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112134
36. Jouhault Q, Cherqaoui B, Jobart-Malfait A, Glatigny S, Lauraine M, Hulot A, et al. Interleukin 27 is a novel cytokine with anti-inflammatory effects against spondyloarthritis through the suppression of Th17 responses. *Front Immunol* (2022) 13:1072420. doi: 10.3389/fimmu.2022.1072420
37. Dinarello CA. The IL-1 family of cytokines and receptors in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* (2019) 15:612–32. doi: 10.1038/s41584-019-0277-8
38. Breban M, Hammer RE, Richardson JA, Taurog JD. Transfer of the inflammatory disease of HLA-B27 transgenic rats by bone marrow engraftment. *J Exp Med* (1993) 178:1607–16. doi: 10.1084/jem.178.5.1607
39. Talpin A, Costantino F, Bonilla N, Leboime A, Letourneur F, Jacques S, et al. Monocyte-derived dendritic cells from HLA-B27+ axial spondyloarthritis (SpA) patients display altered functional capacity and deregulated gene expression. *Arthritis Res Ther* (2014) 16:417. doi: 10.1186/s13075-014-0417-0
40. Villarino AV, Gallo E, Abbas AK. STAT1-activating cytokines limit Th17 responses through both T-bet-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol* (2010) 185:6461–71. doi: 10.4049/jimmunol.1001343
41. Yokosawa M, Kondo Y, Tahara M, Iizuka-Koga M, Segawa S, Kaneko S, et al. T-bet over-expression regulates aryl hydrocarbon receptor-mediated T helper type 17 differentiation through an interferon (IFN) γ -independent pathway. *Clin Exp Immunol* (2017) 188:22–35. doi: 10.1111/cei.12912
42. Cypowyj S, Picard C, Marodi L, Casanova J-L, Puel A. Immunity to infection in IL-17-deficient mice and humans. *Eur J Immunol* (2012) 42:2246–54. doi: 10.1002/eji.201242605
43. Okada S, Asano T, Moriya K, Boisson-Dupuis S, Kobayashi M, Casanova J-L, et al. Human STAT1 gain-of-function heterozygous mutations: chronic mucocutaneous candidiasis and type I interferonopathy. *J Clin Immunol* (2020) 40:1065–81. doi: 10.1007/s10875-020-00847-x
44. Ciofani M, Madar A, Galan C, Sellars M, Mace K, Pauli F, et al. A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell* (2012) 151:289–303. doi: 10.1016/j.cell.2012.09.016
45. Zegarra-Ruiz DF, Kim DV, Norwood K, Kim M, Wu W-JH, Saldana-Morales FB, et al. Thymic development of gut-microbiota-specific T cells. *Nature* (2021) 594:413–7. doi: 10.1038/s41586-021-03531-1
46. Mayer-Barber KD, Yan B. Clash of the Cytokine Titans: counter-regulation of interleukin-1 and type I interferon-mediated inflammatory responses. *Cell Mol Immunol* (2017) 14:22–35. doi: 10.1038/cmi.2016.25
47. Whitley SK, Balasubramani A, Zindl CL, Sen R, Shibata Y, Crawford GE, et al. IL-1R signaling promotes STAT3 and NF- κ B factor recruitment to distal cis-regulatory elements that regulate *Il17a/f* transcription. *J Biol Chem* (2018) 293:15790–800. doi: 10.1074/jbc.RA118.002721
48. Taurog JD, Richardson JA, Croft JT, Simmons WA, Zhou M, Fernández-Sueiro JL, et al. The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Exp Med* (1994) 180:2359–64. doi: 10.1084/jem.180.6.2359
49. McEntee CP, Finlay CM, Lavelle EC. Divergent roles for the IL-1 family in gastrointestinal homeostasis and inflammation. *Front Immunol* (2019) 10:1266. doi: 10.3389/fimmu.2019.01266
50. Reinhardt A, Prinz I. Whodunit? The contribution of interleukin (IL)-17/IL-22-producing $\gamma\delta$ T cells, $\alpha\beta$ T cells, and innate lymphoid cells to the pathogenesis of spondyloarthritis. *Front Immunol* (2018) 9:885. doi: 10.3389/fimmu.2018.00885
51. Cherqaoui B, Araujo LM, Glatigny S, Breban M. Axial spondyloarthritis: emerging drug targets. *Expert Opin Ther Targets* (2021) 25:633–44. doi: 10.1080/1472822.2021.1973429
52. Hanson AL, Nel HJ, Bradbury L, Phipps J, Thomas R, Cao K-AL, et al. Altered repertoire diversity and disease-associated clonal expansions revealed by T cell receptor immunosequencing in ankylosing spondylitis patients. *Arthritis Rheumatol* (2020) 72:1289–302. doi: 10.1002/art.41252
53. Robinson S, Panayi GS. Deficient control of *in vitro* Epstein-Barr virus infection in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* (1986) 45:974–7. doi: 10.1136/ard.45.12.974
54. Smith JA, Barnes MD, Hong D, DeLay ML, Inman RD, Colbert RA. Gene expression analysis of macrophages derived from ankylosing spondylitis patients reveals interferon- γ dysregulation. *Arthritis Rheum* (2008) 58:1640–9. doi: 10.1002/art.23512
55. Jah N, Jobart-Malfait A, Ermoza K, Noteuil A, Chiochia G, Breban M, et al. HLA-B27 subtypes predisposing to ankylosing spondylitis accumulate in an endoplasmic reticulum-derived compartment apart from the peptide-loading complex. *Arthritis Rheumatol* (2020) 72:1534–46. doi: 10.1002/art.41281
56. Grandon B, Rincheval-Arnold A, Jah N, Corsi J-M, Araujo LM, Glatigny S, et al. HLA-B27 alters BMP/TGF β signalling in *Drosophila*, revealing putative pathogenic mechanism for spondyloarthritis. *Ann Rheumatic Dis* (2019) 78:1653–62. doi: 10.1136/annrheumdis-2019-215832
57. Marié IJ, Brambilla L, Azzouz D, Chen Z, Baracho GV, Arnett A, et al. Tonic interferon restricts pathogenic IL-17-driven inflammatory disease via balancing the microbiome. *eLife* (2021) 10:e68371. doi: 10.7554/eLife.68371
58. Breban M, Beaufrière M, Glatigny S. The microbiome in spondyloarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* (2019) 33:101495. doi: 10.1016/j.berh.2020.101495

Annexe III: Article 4

Lessons on SpA pathogenesis from animal models

Abstract

Understanding the complex mechanisms underlying a disorder such as spondyloarthritis (SpA) may benefit from studying animal models. Several suitable models have been developed, in particular to investigate the role of genetic factors predisposing to SpA, including HLA-B27, *ERAP1* and genes related to the interleukin (IL)-23/IL-17 axis. One of the best examples of such research is the HLA-B27 transgenic rat model that fostered the emergence of original theories regarding HLA-B27 pathogenicity, including dysregulation of innate immunity, contribution of the adaptive immune system to chronic inflammation and influence of the microbiota on disease development. Very recently, a new model of HLA-B27 transgenic *Drosophila* helped to expand further some of those theories in an unexpected direction involving the TGF β /BMP family of mediators. On the other hand, several spontaneous, inducible and/or genetically modified mouse models - including SKG mouse, TNF^{Δare} mouse and IL-23-inducible mouse model of SpA- have highlighted the importance of TNF α and IL-23/IL-17 axis in the development of SpA manifestations. Altogether, those animal models afford not only to study disease mechanism but also to investigate putative therapeutic targets.

Keywords: Ankylosing spondylitis, spondyloarthritis, animal models, HLA-B27, TNF α ; Interleukin-23; Interleukin-17.

Declarations:

Funding: Maxime Breban's laboratory work on animal models of spondyloarthritis is currently supported by grants from FOREUM, ANR (French National Agency for Research), SATT-Paris-Saclay, PFIZER and NOVARTIS.

Conflicts of interest/Competing interests: There are no conflicts of interest pertaining to this work

Ethics approval: not applicable

Consent to participate: not applicable

Consent for publication: not applicable

Availability of data and material: not applicable

Code availability: not applicable

Lessons on SpA Pathogenesis from Animal Models

Maxime Breban, M.D., Ph.D. ^{1,2,3}

Simon Glatigny, Ph.D. ^{1,2}

Bilade Cherqaoui, M.D. ^{1,2}

Marie Beaufrère, M.D. ^{1,2}

Marc Lauraine, M.Sc. ^{1,2}

Aurore Rincheval-Arnold, Ph.D. ⁴

Sébastien Gaumer, Ph. D. ⁴

Isabelle Guénal, Ph. D. ⁴

Luiza M. Araujo, Ph.D. ^{1,2}

*1- Infection & Inflammation, UMR 1173, Inserm, UVSQ/Université Paris Saclay,
2 ave de la Source de la Bièvre, 78180 Montigny-le-Bretonneux, France*

*2-Laboratoire d'Excellence Inflamex, Université Paris Descartes, Sorbonne-Paris-Cité,
Paris, France*

*3- Service de Rhumatologie, Hôpital Ambroise Paré, AP-HP,
9 ave Charles de Gaulle, 92100 Boulogne, France*

*4- LGBC, EA4589, UVSQ/Université Paris-Saclay, EPHE/PSL Research University,
2 ave de la Source de la Bièvre, 78180 Montigny-le-Bretonneux, France*

Corresponding author: Maxime Breban, M.D., Ph.D.

Phone number: 33-1490945672

Fax number: 33-149095865

Email: maxime.breban@aphp.fr

ORCID ID: 0000-0002-6932-9395

Word count: 5,441 words (excluding ref) or 8,377 words (including 102 ref) + 1 Table

Abstract

Understanding the complex mechanisms underlying a disorder such as spondyloarthritis (SpA) may benefit from studying animal models. Several suitable models have been developed, in particular to investigate the role of genetic factors predisposing to SpA, including HLA-B27, *ERAP1* and genes related to the interleukin (IL)-23/IL-17 axis. One of the best examples of such research is the HLA-B27 transgenic rat model that fostered the emergence of original theories regarding HLA-B27 pathogenicity, including dysregulation of innate immunity, contribution of the adaptive immune system to chronic inflammation and influence of the microbiota on disease development. Very recently, a new model of HLA-B27 transgenic *Drosophila* helped to expand further some of those theories in an unexpected direction involving the TGF β /BMP family of mediators. On the other hand, several spontaneous, inducible and/or genetically modified mouse models - including SKG mouse, TNF ^{Δ are} mouse and IL-23-inducible mouse model of SpA- have highlighted the importance of TNF α and IL-23/IL-17 axis in the development of SpA manifestations. Altogether, those animal models afford not only to study disease mechanism but also to investigate putative therapeutic targets.

Keywords: Ankylosing spondylitis, spondyloarthritis, animal models, HLA-B27, TNF α ; Interleukin-23; Interleukin-17.

Declarations:

Funding: Maxime Breban's laboratory work on animal models of spondyloarthritis is currently supported by grants from FOREUM, ANR (French National Agency for Research), SATT-Paris-Saclay, PFIZER and NOVARTIS.

Conflicts of interest/Competing interests: There are no conflicts of interest pertaining to this work

Ethics approval: not applicable

Consent to participate: not applicable

Consent for publication: not applicable

Availability of data and material: not applicable

Code availability: not applicable

Introduction

Spondyloarthritis (SpA) is one of the most common groups of chronic inflammatory joint disorders, affecting between 0.2% and 1.61% of the general adult population [1, 2]. The hallmark of SpA is articular inflammation which may affect both axial (i.e. spinal, pelvic and thoracic wall joints) and peripheral skeleton structures, including arthritis, enthesitis and dactylitis. In addition, the spectrum of SpA comprises frequent extra-articular features, including anterior uveitis, psoriasis, and inflammatory bowel disease (IBD, i.e. Crohn's disease (CD) or ulcerative colitis (UC)). A major characteristic of SpA is the variability of its clinical presentation. This led initially to the recognition of distinct entities which were separated altogether from rheumatoid arthritis as "seronegative" spondylarthritides, given their lack of association with autoantibodies, such as rheumatoid factor or anti-citrullinated peptides antibodies. They comprise ankylosing spondylitis (AS), psoriatic arthritis (PsA), reactive arthritis (ReA) and arthritis associated with idiopathic inflammatory bowel diseases (AIBD). Their grouping as SpA was further proposed, based on the observation of frequent overlap between these disorders, that may arise consecutively in the same patient (e.g. AS "secondary" to PsA, ReA, or AIBD), be virtually indistinguishable from each other or affect different individuals within a same family [3, 4]. Classification criteria were then developed to account for the unified concept of SpA [4].

Another well-established characteristic of SpA is its strong heritability that is in large part explained by its association with the major histocompatibility (MHC) antigen HLA-B27, discovered 47 years ago [5, 6]. However, the MHC region itself has been estimated to account for merely half of the whole genetic predisposition [7]. Indeed, over the last decade, multiple polymorphisms associated with increased disease susceptibility have been identified in genes outside of the MHC [8]. Among them, two closely related endoplasmic reticulum (ER) aminopeptidases genes, *ERAP1* and *ERAP2* are of particular interest, as they may influence HLA-B27 effect [9]. Such interpretation is supported by the evidence for genetic interaction between *ERAP1* and *HLAB* loci in determining disease susceptibility [10]. Moreover, several other disease-associated genes code for cytokines, their receptors or downstream effectors that are involved in the type 3 immune response, including *IL12B*, *IL27A*, *IL1R2*, *IL6R*, *IL23R*, *JAK2*, *TYK2*, *STAT3* and *CARD9* [8]. Thus, such wealth of recent findings opened new tracks for mechanistic research on SpA pathophysiology. Noteworthy however, the contribution of each of these new *loci* to the whole genetic susceptibility is relatively sparse, especially as

compared to that of HLA-B27. Therefore, trying to explain the predisposing role of HLA-B27 in SpA has remained a major focus of research in the field for decades.

Animal models have improved our understanding of HLA-B27 implication in SpA

The association between HLA-B27 and SpA is one of the first described between an MHC allele and a human disorder. However, despite its remarkable strength and consistency across populations, there is currently no consensus on its significance and the role played by this HLA molecule in disease pathogenesis remains largely unexplained.

HLA-B27 is a protein encoded by the most polymorphic human gene., i.e. the *HLAB* locus. As for other classical class I MHC molecule, its main function is to bind short peptides spanning 8 to 10 amino acids in large in and to present them in combination with the non-covalently-associated invariant light chain, β 2-microglobulin (β 2m), at the cell surface, where the trimolecular complex is specifically recognized by CD8+ T cells. The allelic diversity of HLA-B molecules mainly concerns their peptide-binding groove, resulting in distinctive capacities to bind defined peptides. Thus, the collection of peptides that a given HLA-B molecule could bind and present -the peptidome- is dictated by its particular structure. This has been clearly shown in the case of HLA-B27, which selectively presents peptides bearing an Arg residue as a second anchor position, a quite unique property among class I MHC alleles [11]. Thus, the specificity of its antigen-presenting function is at the origin of one of the earliest theories regarding HLA-B27 pathogenicity, the "arthritogenic peptide" hypothesis which speculates on an auto-immune attack driven by cytotoxic CD8+ T cells and targeting a self-peptide exquisitely presented by HLA-B27 [12]. Complementary to the foregoing, as a possible explanation for breaking of tolerance, immune response initiated against an infectious agent could secondarily shift to self-antigen attack by virtue of molecular mimicry. This could notably explain occurrence of ReA in the weeks following an intestinal or uro-genital bacterial infection [13]. Several arguments indirectly support those theories, including evidence for recurrent CD8+ T cell clonotypes and for cytotoxic CD8+ T cell lines displaying cross-reactivity for Epstein-Barr viral epitope and vasointestinal peptide receptor-derived self-peptide, in HLA-B27+ SpA patients [14, 15]. Nevertheless, the pathogenicity of such CD8+ T cells remains to be demonstrated. The lack of proof for a direct implication of the canonical antigen-presenting function of HLA-B27 in its pathogenicity fostered the emergence of alternative theories based on peculiar biochemical behaviors of the molecule. The most popular alternate hypotheses proposed over the last two decades speculated either on a remarkable propension of the HLA-

B27 heavy chain to misfold during its synthesis in the endoplasmic reticulum (ER) and to trigger an unfolded protein response (UPR) or on the formation of aberrant heavy chains homodimers expressed at the surface of the cell where they may interact with killer immunoglobulin-like receptors (KIR) expressed by natural killer (NK) cells and CD4⁺ T cells, both of which could trigger an inflammatory response [16, 17].

HLA-B27 transgenic rat model of SpA

Several lines of HLA-B27 transgenic mice were initially produced that remained healthy, except for the development of arthritis when crossed with β 2m-deficient mice [18]. However, such phenotype appeared later not to be specific for the HLA-B27 transgene but rather for the mouse genetic background [19].

In contrast, several lines of HLA-B27/human β 2m (h β 2m) double transgenic lines of rats develop a spontaneous phenotype that resembles SpA (rat-SpA). This striking observation established in the early 90's has remained until now the strongest argument supporting a direct implication of HLA-B27 itself -rather than nearby genetic factor- in the pathogenesis of SpA [20]. The effect of HLA-B27 is overwhelming since it is observed on several genetic backgrounds and in different lines of rats harboring distinct HLA-B27/h β 2m transgenic *loci* (each *locus* consisting in various copy numbers of both transgenes inserted in a unique genomic site). It is also specific since it is not observed in a rat line transgenic for HLA-B7/h β 2m control allele, structurally close to HLA-B27 and negatively associated with SpA [10]. Importantly, it is dependent on a large number of copies of both HLA-B27 and h β 2m transgenes. Hence, the respective numbers of each transgene -dictating the amount of the corresponding transcript/protein that is produced- condition the phenotypic expression of rat-SpA [21]. In lines bearing the highest numbers of copies of HLA-B27 transgene, the phenotype affects both sexes and mimics severe form of AIBD, by combining peripheral arthritis -more prevalent in males- with UC and psoriatic skin changes. Moreover, increasing the number of h β 2m transgene copies resulted in heightened prevalence and severity of arthritis [22, 23]. Other line with fewer copies of HLA-B27 but a high number of h β 2m transgene copies develop a phenotype more reminiscent of AS, restricted to males and to osteo-articular tissue, including spinal and sacroiliac joint inflammation with osteoproliferation, in addition to peripheral arthritis [23, 24]. In both cases, males uniformly develop early epididymo-orchitis that seems to be a critical event, at least for the second phenotype since orchiectomy prevents its development [25].

Several key experiments have allowed to identify major factors driving spontaneous SpA development in this HLA-B27 transgenic rat model and their conclusions have significantly influenced our understanding of HLA-B27 pathogenicity.

a- The critical implication of myeloid-derived antigen-presenting cells in rat-SpA

Rat-SpA could be induced in irradiated wild-type rats by the transfer of immature haematopoietic stem cells originating from the bone marrow or fetal liver from disease-prone HLA-B27 transgenic donor rats, but not by mature lymphocytes contained in lymph nodes or spleen. Reciprocally, HLA-B27 transgenic rats were cured from established disease by irradiation followed by transplantation of bone marrow cells from wild-type donor [26]. This indicated that expression of the HLA-B27/h β 2m transgene in myeloid-derived cell -suspected to be an antigen-presenting cell (APC)- was necessary and sufficient to induce rat-SpA. This observation fostered an extensive characterization of APCs -with a particular interest for conventional dendritic cells (cDCs), which are potent professional APCs bridging innate to adaptive immunity- evidencing functional alterations that could contribute to disease pathogenesis. First of all, APCs from disease-prone HLA-B27 transgenic rats showed a decreased capacity to stimulate T cells -even in antigen-independent assays- and this correlated strongly with disease susceptibility in a wide variety of transgenic lines [27–29]. Contrasting with such functional impairment, cDCs from HLA-B27 transgenic rats are prone to drive a T-helper 17 (Th17) bias during CD4⁺ T cell differentiation and/or activation, an observation consistent with the accumulation of Th17 cells seen in this model [29–31]. A consistent biased impact was also observed on regulatory T cells (Treg) that produced more IL-17A and less IL-10 when activated with DCs from HLA-B27 transgenic rat [32]. At the molecular level, HLA-B27 transgenic DCs displayed altered cytoskeleton dynamic and were impaired in their capacity to engage costimulatory molecules -in particular CD28- and to form a functional immunological synapse with T cells [27, 33, 34]. This could contribute to both the stimulatory inefficacy and the Th17 bias -given that CD86-CD28 signaling impairment seems to favor Th17 bias [35].

Looking in more details at cDC subpopulations, an imbalance was found between the cDC2 subset -implicated in T cell activation and cytokines production- and cDC1 -critical for tolerance induction- marked by a decreased proportion of the latter in the spleen, the mesenteric lymph nodes and the lymph draining the gut [29, 36]. This could at least in part be related to the defective migration of cDC1 from the colonic mucosa to mesenteric lymph nodes, possibly

due to cytoskeleton alteration [36]. Of particular interest was a relative decrease in all the organs studied and an altered capacity to support *in vitro* Treg differentiation, of the XCR1+ cDC1 subset, known to promote the induction of peripheral Treg by the production of transforming growth factor- β 1 (TGF β 1) and retinoic acid from vitamin A [36, 37]. Besides, the cDC2 subset from disease-prone HLA-B27 transgenic lines displayed a down-regulation of *Interferon gamma (Ifng)* and IFN-regulated genes at the transcriptomic level that could be secondary to an induction of *suppressor of cytokine signaling (Socs)3* gene. Interestingly, such "reverse" IFN signature appeared to be shared with APCs from AS patients [38, 39]. As predicted, down-regulation of the IFN γ pathway in B27 transgenic rat cDC2 was associated with a decreased expression of IL-27, a cytokine belonging to the IL-12 family and known to oppose IL-17 and to favor IL-10 production from T cells, as well as Treg activation [38, 40]. IL-10 expression by cDC2 was concomitantly decreased, potentially contributing to a pro-inflammatory profile [38].

b- The pathogenic role of CD4+ T cells in rat-SpA

Rat-SpA fails to develop in athymic nude HLA-B27 transgenic rats, unless reconstituted with T cells. This indicated that thymically-derived T cells are required for disease expression [41]. The transfer of purified CD4+ T cells to nude B27 rats, even from disease-resistant donors, was associated with vigorous disease induction, whereas CD8+ T cells were relatively inefficient [41]. Importantly, rat-SpA was unaffected by CD8+ T cells depletion [42]. The foregoing results obtained in lines developing the AIBD phenotype are consistent with the observation that both phenotypes of rat-SpA remained unchanged in rats lacking the CD8 molecule, despite a profound alteration of their capacity to raise a cytotoxic CD8+ T cell-mediated response [43]. Additionally, HLA-B27 transgenic rats were shown as defective in their capacity to mount a CD8+ T cell-mediated cytotoxic response [44 and Breban M., unpublished observation], an observation possibly related to altered XCR1+ cDC1 subset. Altogether, those observations do not support the implication of canonical antigen-presenting function of HLA-B27 to CD8+ T cells as the mechanism of its pathogenicity and appear therefore inconsistent with the "arthritogenic peptide" hypothesis.

Concerning the nature of pathogenic CD4+ T cells, Th17 cells are the most likely involved, considering the selective expansion of those cells concomitant with disease development, as mentioned above [30]. Nevertheless, anti-IL-17 antibody treatment was inefficient at preventing disease onset in a rat line developing the AIBD phenotype [30]. This suggests the critical involvement of other pro-inflammatory mediator(s) among which TNF α is a compelling

candidate, since APCs from HLA-B27 transgenic rat boost its production by CD4⁺ T cells and it is co-expressed by Th17 cells [30]. Consistently, anti-TNF treatment was effective in reducing gut and joint manifestations in HLA-B27 transgenic rat [45].

c- Gut and joint inflammation are dependent on the gut microbiota

The role of gut microbiota in HLA-B27 transgenic rat has recently been reviewed elsewhere and will only be summarized herein [46]. When raised under germ-free conditions, HLA-B27 transgenic rats from the lines developing an AIBD phenotype in conventional conditions, were protected from gut and joint inflammation, both of which were triggered upon recolonization with commensal microbiota. This showed the dependence of SpA manifestations on the presence of regular microbiota. Selective recolonization of the germ-free rats showed that strictly anaerobic bacteria, especially *Bacteroides spp.* (and particularly *B. vulgatus*) were the most pro-inflammatory but without absolute specificity [47]. The triggering of gut inflammation in germ-free HLA-B27 transgenic rats mono-associated with distinct commensal bacteria indicated that expression of HLA-B27 was facilitating an aberrant pro-inflammatory response to various resident bacteria. In line with such interpretation, APCs from HLA-B27 transgenic rats exhibited decreased IL-10 production in response to Toll-like receptor (TLR) stimuli, that could contribute to exaggerate the immune response to bacterial components. Indeed, CD4⁺ T cells from those rats were overproducing IFN- γ in response to antigens derived from commensal enteric micro-organisms, suggesting a loss of tolerance towards regular microbiota [48–50]. Additionally, dysregulated immune response in HLA-B27 transgenic rats could contribute to disease predisposition by favoring an imbalance between pro-inflammatory and anti-inflammatory microbiota. In favor of such possibility, microbiota composition is altered in the gut from HLA-B27 transgenic rats -a situation referred to as dysbiosis. However, the implication of this finding remains difficult to interpret, since the nature of dysbiosis appears fairly variable, depending on the rat genetic background and/or the animal facility, with little overlap between different disease-prone strains [51, 52].

The foregoing results were obtained in rat lines developing an AIBD phenotype in which gut inflammation may strongly influence dysbiosis and reciprocally, but the influence of gut microbiota has not been directly examined in the line developing an isolated articular phenotype. However, splenocytes from the latter line were shown to overproduce pro-inflammatory cytokines -i.e. TNF α , IL-1, and IL-6- in response to TLR and/or dectin-1 ligands. Furthermore, in this line, arthritis and spondylitis could be triggered by using suboptimal dose

of Freund's adjuvant -an emulsion of heat-killed *Mycobacterium tuberculosis*-, showing again that HLA-B27 expression amplifies the immune response towards stimuli of microbial origin [53].

d- Involvement of non-canonical molecular behavior of HLA-B27 in rat-SpA

The above results indicate that HLA-B27/h β 2m expression may drive rat-SpA by dysregulating APCs function, resulting in biased CD4⁺ T cell response to stimuli, such as microbial components. This happens in conditions of high expression levels of both transgenes. However, the precise molecular mechanism by which HLA-B27 expression may affect APC biology remains an unsolved issue.

The tendency of HLA-B27 to misfold in the ER could be a critical event, by triggering a UPR, leading to type 3 immune response driven by IL-23 production [54]. Indeed, such consequences have been shown to happen in bone marrow-derived macrophages from HLA-B27 transgenic rats, upon LPS activation [31, 55]. Other experiments carried with mature cDCs revealed also some possible consequences of a UPR, such as increased expression of ER Protein-disulfide isomerases A3, A4 and A6 [33, 38]. Therefore, experiments were carried out to functionally test UPR implication. Their principle was to facilitate HLA-B27 folding by increasing h β 2m expression, using genetic cross with a line carrying a multicopy h β 2m transgenic *locus*. As expected, the result was a decrease of UPR markers, but contrary to the prediction that UPR was a triggering event in rat-SpA, disease was not attenuated. Even more, both severity and frequency of arthritis worsened -as already mentioned above [23, 38]. Therefore, UPR may not be the critical molecular mechanism by which HLA-B27 triggers rat-SpA.

One of the remarkable non-canonical features of HLA-B27 is its propensity to form homodimers/oligomers of heavy chain [56]. Intriguingly, despite reducing UPR, increasing h β 2m level in HLA-B27 transgenic rats favored an intracellular accumulation of misfolded HLA-B27 heavy chain in combination with h β 2m and ER chaperones, i.e. BiP and Glucose regulated protein-94, in ER-derived vesicles [57]. Similar phenomenon was observed in human cell line transfected with HLA-B27 subtypes differently associated with AS predisposition, the extent of which correlated positively with disease predisposition. It was also observed in lymphoid cells from SpA patients in greater amount than in cells from control individuals [57]. Such accumulation could possibly be due to an impaired ubiquitination of HLA-B27 heavy chain dimers/oligomers, a process that facilitates the disposal of misfolded protein [58]. How

such phenomenon could contribute to cellular disturbance is still unclear. However, it indicates that the pathogenicity of HLA-B27 may be due to an accumulation of unusual conformers, likely devoid of canonical peptide, in conjunction with β 2m and ER chaperones. With this regard, it is interesting that the peptidome of HLA-B27 transgenic rats did not differ between disease-susceptible and healthy lines and that a deletion of Erp1 -an ER aminopeptidase involved in generating peptides suitable for class I MHC loading- did not affect rat-SpA expression despite a marked impact on HLA-B27 peptidome [59]. This fits with the hypothesis that well-folded HLA-B27 molecules bound to canonical peptides are not involved in disease pathogenesis.

Homodimers/oligomers of HLA-B27 heavy chain have also been detected at the surface of human or HLA-B27 transgenic rat cells [56, 60, 61]. These non-canonical conformers could bind to innate immune receptors that include KIRs on human cells and paired immunoglobulin receptors expressed by rodent APCs, with putative pro-inflammatory consequences, including TNF α production [16, 60]. However, the relevance of this phenomenon to HLA-B27 pathogenicity has recently been challenged, given its lack of correlation with disease susceptibility among HLA-B27 subtypes [62].

HLA-B27 transgenic Drosophila, a new model to study HLA-B27 pathogenicity

Deciphering the non-canonical consequences of HLA-B27 expression could benefit from a simplified model. This was the major reason to use *Drosophila*, an organism originally devoid of MHC molecule and of several key elements of the class I MHC peptide-loading complex, to further address such issue [63]. Several HLA-B transgenes were inserted as single copy in a predefined *Drosophila* genomic site. They were expressed either alone or in combination with h β 2m, using tissue-specific drivers. Two distinct SpA-associated HLA-B27 subtypes, i.e. HLA-B*27:04 and HLA-B*27:05 were studied in comparison with the SpA-negatively-associated HLA-B*07:02 allele.

Remarkably, when expressed in the wing or eye, both SpA-associated HLA-B27 transgenes induced striking phenotypes, i.e. a loss of the crossveins and a small-eye, respectively [63]. Those phenotypes required the presence of h β 2m and were absent in the HLA-B*07:02 transgenic *Drosophila*. Noteworthy, in the presence of h β 2m, HLA-B27 conformers, presumably loaded with peptides (as recognized by ME1 antibody, a murine monoclonal antibody specific for well-folded HLA-B27 and B7 molecules) were expressed at the cell

surface despite the lack of peptide-loading complex, consistently with previous observation made in *Drosophila* cell line [63, 64].

Crossing the HLA-B27 transgenic *Drosophila* line with mutant flies or flies which misexpress specific gene, then analyzing phenotypes of offspring, allowed to pinpoint affected signaling pathway responsible for the observed phenotypes. They showed that HLA-B27 expression interfered with bone morphogenetic protein (BMP) signaling, a developmental pathway involved in the formation of *Drosophila* wing and eye. More specifically, HLA-B27 exerted a dominant negative effect on the type I BMP receptor (BMPRI) Saxophone. Saxophone, like its mammalian orthologs, activin receptor-like kinase 1 (ALK1) and ALK2 associates with other BMPRI and type II BMP receptors to form heterotetramer. In this complex, they can exert either agonistic or antagonistic effect on signaling, depending on the context [65]. In *Drosophila*, expression of the HLA-B27/h β 2m transgenes, resulted in a loss of the antagonistic function of Saxophone on BMP signaling. Consistently, physical interaction was shown at the cell surface between folded HLA-B27/h β 2m complexes and Saxophone [63].

Thus, the HLA-B27 transgenic *Drosophila* model unraveled a novel molecular mechanism that could explain HLA-B27 pathogenicity. Accordingly, HLA-B27 may exert a dominant negative effect on ALK1 and/or ALK2, that could be relevant to human SpA. Those receptors are involved in the negative regulation of BMP and Activin//transforming growth factor β (TGF β) signaling in mammals and their inhibition may result in excessive ossification and inflammation, two hallmarks of SpA. Indeed, excessive ossification in response to Activin is characteristic of *fibrodysplasia ossificans progressiva*, a rare autosomal dominant mendelian disorder due to mutations of *ALK2* that reverse its inhibitory function [66].

Those intriguing results prompted us to examine whether they could be extrapolated to cells from SpA patients. Indeed, a close physical interaction was evidenced between well-folded HLA-B27 molecules and ALK2 at the surface of B-lymphoblastoid cell lines from AS patients, that was not detected with other HLA-B molecules in control lines [63]. Moreover, increased signaling in response to Activin-A and TGF β -two ligands that may be antagonized by ALK1 or ALK2- was shown in T cells from HLA-B27+ SpA patients, as compared to control subjects [63].

How ERAPs polymorphisms may influence SpA susceptibility

Several polymorphisms of *ERAP1* and *ERAP2* genes affect SpA susceptibility [10, 67, 68]. The products of these two neighboring genes are structurally related aminopeptidases located in the ER, where they trim peptides to an optimal length for binding to class I MHC molecules [69, 70]. The association of *ERAP1* with SpA is conditional on HLA-B allele, principally HLA-B27, whereas this is not the case for *ERAP2* which is disease-associated independently of HLA-B27 status [10, 68]. Functionally, the *ERAP1* disease-associated alleles confer increased enzymatic activity, generating peptides with lower affinity for HLA-B27, which could favor their dissociation and contribute to the accumulation of misfolded HLA-B heavy chain in the ER-derived vesicles described above [59, 71]. As for *ERAP1*, SpA risk is favored by *ERAP2* polymorphisms conferring increased enzymatic activity, albeit their role may not be identical, given the lack of interaction with HLA-B27 [70].

An implication of ERAP1 in SpA, independent of HLA-B27, was suggested by recent study of an *ERAP1*^{-/-} mouse model -of note, mouse is devoid of ERAP2- that develops several features of AS, including inflammation of spine, bony ankylosis of the lumbo-sacral joint, erosions of the sacroiliac joint, osteoporosis, dysbiosis and increased susceptibility to colitis [72]. This phenotype could be related to a decrease of tolerogenic DC and CD3+CD4+Foxp3-IL10+ Tr1-like cells, an inducible regulatory T cell population. Noteworthy, this observation does not corroborate the increased aminopeptidase activity conferred by ERAP1 polymorphisms associated with SpA in human, nor their interaction with HLA-B27. It could rather be linked to a decreased expression by tolerogenic DC and macrophages of Qa-2, the murine ortholog of HLA-G, a non-classical class I MHC molecule, thought to be important for Tr1 induction *via* its interaction with Ig-like transcript 2 (ILT-2) and ILT-4 receptors on naïve CD4+ T cells.

Animal models addressing the role of cytokine signaling pathways in SpA

TNF α , a key cytokine in SpA

The tremendous efficacy of anti-TNF α therapies established the critical role of this pro-inflammatory cytokine in SpA [73]. Its cellular source and targets in the context of SpA need to be characterized. Mouse models of deregulated TNF α production helped to clarify those questions, in addition to the HLA-B27 transgenic rat model discussed above, in which CD4+ T cells were shown to over-produce TNF α .

a- The TNF ^{Δ ARE} mouse

Deletion of the adenylate-uridylylate-rich elements in the murine TNF α locus (TNF Δ ARE mice) leads to spontaneous and inducible overexpression of mouse TNF α by stromal cells and hemopoietic cells, including macrophages, T and B cells [74]. Those mice develop a spontaneous phenotype reminiscent of SpA by combining a destructive polyarthritis with sacroiliitis, enthesitis and a CD-like ileitis [74, 75]. Joint and gut inflammation exhibited both common and distinct requirements [75, 76]. Regarding IBD, TNF α produced by myeloid cells or T cells -but not B cell, nor stromal cells- exhibited pathogenic capacity and both hematopoietic and tissue stromal cells were equally important and sufficient targets for pathogenic TNF α . Ultimately, IBD resulted from an IL-12- and IFN- γ -driven Th1-like response and on the activation of pathogenic CD8+ T cell, whereas CD4+ T cells were protective [76]. In contrast, adaptive immunity was dispensable for the induction of arthritis whereas tissue stroma-residing cells were required TNF α targets [74, 76, 77].

b- The tmTNF-overexpressing mouse

Biologically active TNF α exists either in a secreted form or as a transmembrane (tm)-bound cytokine, the former being released upon cleavage of the latter by ADAM17 (A disintegrin and metalloproteinase 17, also known as TNF converting enzyme, TACE). In SpA, tmTNF appears to be more expressed in the synovial membrane than in rheumatoid arthritis, and this could be related to lower ADAM17 activity, raising the intriguing possibility that tmTNF could be specially involved in SpA [78]. Indeed, the *Tg486* mouse that overexpresses tmTNF -due to defective ADAM17- develops axial and peripheral joint synovitis, enthesitis, and osteitis, with endochondral new bone formation ultimately leading to complete axial and peripheral joint ankylosis, typical of SpA [78, 79]. In this model, tmTNF expression by stromal cells appears critical, being required for peripheral arthritis and more pathogenic than tmTNF expressed by hematopoietic cells as for spondylitis. Moreover, as in the TNF Δ ARE model, joint inflammation required the ubiquitous TNF receptor I, whereas TNF receptor II, specifically expressed by hematopoietic cells, appeared to play a secondary role, notably in new bone formation.

Implication of the IL-23/IL-17 cytokines axis

IL-23 is a heterodimeric cytokine of the IL-12/IL-6 family, consisting of IL-23p19 and IL-12/23p40 subunits. Produced by APCs, it exerts an essential role in driving type 3 immune response involving Th17 cells and other sources of IL-17, including γ/δ T cells, innate lymphoid cells 3, mucosal associated invariant T cells and invariant natural killer T cells (iNKT) as

effector cells. Several animal models have implicated the IL-23/IL-17 signaling cascade in SpA, along with other experimental evidence, including numerous polymorphisms affecting genes within this axis that have been associated with SpA susceptibility, as mentioned above.

a- IL-23 expression triggers SpA in mouse

Sustained expression of IL-23 in mouse was achieved by the delivery of a minicircle DNA construct. This resulted in the development of enthesitis and enthesal new bone formation of the paws as well as the axial skeleton at the sites of attachment of the spinal ligaments to bone and the sacroiliac joint. Characteristic anatomic/clinical features of SpA also included psoriasis and inflammation in the aortic root and valve [80]. In this model, mouse entheses and aortic root were shown to contain a subset of resident IL-23 receptor-positive, retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor (ROR) γ t+ CD4- CD8- T cells that belong mainly to the γ/δ T cells population. These cells could respond to IL-23 by producing IL-22 and IL-17 that mediated enthesal inflammation and osteoproliferation [80, 81]. Silencing SOCS3, a negative regulator of cytokine/signal transducers and activators of transcription signaling potentiated IL-23-inducible SpA development [82]. The relevance of this model to the human context has been reinforced by the detection of comparable γ/δ T cells residing in human entheses and the evidence for an enrichment of ROR γ t+ iNKT and γ/δ T cells exhibiting skewed Th17 phenotype in the joint of SpA patients [83, 84].

This model relies on an artificial source of IL-23, but other murine models have also highlighted the importance of the IL-23/IL-17 axis in more physiological situation. This is the case of the SKG strain variant of the BALB/c mouse which harbors a W163C mutation of ZAP-70, an adaptor protein signaling downstream of the T cell receptor, that results in weakened signal. This mutation affects thymic selection, enriching the peripheral repertoire with IL-17-skewed autoreactive T cells and also altering the function of Foxp3+ Tregs that are inefficient to suppress arthritis development [85]. Intraperitoneal injection of β -glucan-containing products such as curdlan in this mouse raised in specific pathogen-free conditions, was shown to induce a phenotype similar to SpA, consisting of dactylitis, Achilles tendon enthesitis, plantar fasciitis, destructive arthritis of ankles and wrists, spondylitis and sacroiliitis. Extra-articular features comprised uveitis and ileitis resembling CD [85]. The β -glucan is a molecular pattern that is present in plants, fungal cell walls and bacteria. It mimics a microbial stimulation by binding to the dectin-1 receptor that signals through CARD9 in APCs and activates the production of IL-12 and IL-23. The development of this inflammatory disease was shown to be dependent on

IL-23 production in the ileum, acting through IL-17, and the production of those cytokines was dependent on microbiota because it was absent in germ-free mice [85]. Thus the production of IL-23 that can take place in the gut or even in the entheses appears as an essential cytokine in the development of SpA in some circumstances [86, 87].

b- Murine model of SpA implicates IL-17 production independent of IL-23

In patients, inhibition of IL-23 appeared not to be efficacious in all situations, with striking differences between PsA that responds well to anti-IL-23 treatment and axial SpA that does not [88, 89]. This observation differs from the broader success of IL-17 inhibitors in SpA which is consistent with experimental evidence in HLA-B27 transgenic rat and with the existence of IL-23-independent pathways of IL-17 production [90–92].

A model of SpA driven by IL-23-independent production of IL-17 was obtained by injecting intra-peritoneally in inbred mouse strains, mannan, a cell wall polysaccharide from the fungus *Saccharomyces cerevisiae*. It induced an acute inflammation resembling human PsA by combining hyperkeratinous skin predominantly on the ears and paws with arthritis in the articular joints, enthesitis and periostitis. In this model, adaptive immunity was not implicated. Mannan injection stimulated macrophages to produce TNF- α , which triggered $\gamma\delta$ T cell activation and IL-17A production, which, in turn, were involved in recruiting neutrophils to the joints and skin, leading to disease phenotypes [93].

c- The protective role of IL-27 in mouse model of SpA

IL-27 belongs to the same family of cytokines as IL-12 and IL-23 [94]. It is active as a heterodimer consisting of the IL-27p28 α -subunit, coded by the *IL27A* gene, and the Epstein-Barr virus-induced protein 3 β -subunit. Like IL-12 and IL-23, it is produced by APCs. It was initially reported to play a critical role in promotion of Th1 differentiation and IFN γ production. However, subsequent studies revealed that IL-27 has broader stimulatory and inhibitory roles by inducing IL-10-producing Treg cells and opposing Th17 differentiation [40]. Interestingly, *IL27A* gene polymorphisms are associated with SpA predisposition and IL-27 production by DCs was altered in the HLA-B27 transgenic rat model, as described above. Genetic ablation of IL-27 receptor α in mouse leads to axial bone changes reminiscent of AS by combining bone loss with ossification of the intervertebral disks. A small proportion of those mice developed neutrophilic dermatitis in the tail that progressed into the subcutaneous tissues and vertebral body of the tail, resulting in neutrophilic periostitis and osteitis [95]. This complex model also

required a heterozygous deletion of P53 and was not associated with inflammation. However, it highlights the putative role of IL-27 to antagonize the bone consequences of SpA, i.e. osteoporosis and excessive ossification.

Spontaneous ankylosing enthesitis (ANKENT), a mouse model of PsA

Aging male DBA/1 mice develop spontaneous dactylitis and nail disease, which sometimes develops into onychoperiostitis, reminiscent of PsA [96, 97]. Interestingly, occurrence of this ANKENT is increased by stress, a feature similar to SpA [98, 99]. By histology, the affected paws exhibit dactylitis and enthesitis with infiltration by polymorphonuclear cells and mononuclear cells in the subcutaneous tissue, tendon sheath and enthesis, as well as cartilage hyperplasia at the enthesal insertion followed by endochondral bone formation leading to joint space bridging.

This disease was shown as independent of T cells and TNF inhibition did not affect its development [96, 100]. In contrast, it was strongly inhibited by forcing the expression of *noggin*, a broad BMP antagonist. This therapeutic efficacy highlights the critical involvement of BMP signaling in the process, including the inflammatory changes, which may implicate Activin signaling antagonism as well as BMPs [101, 102].

Conclusions

- Studies of the HLA-B27/h β 2m transgenic rat model of SpA have linked the pathogenicity of HLA-B27 to non-canonical properties of this molecule resulting in deregulated immune response, notably to stimuli of microbial origin.
- HLA-B27/h β 2m transgenic *Drosophila* unraveled a dominant negative interaction of HLA-B27 with BMPR1, which could account for increased signaling in response to BMP/TGF β family ligands, leading to excessive inflammation and ossification.
- Several mouse models have highlighted the prominent roles of TNF α signaling and IL-23/IL-17 axis in the development of SpA manifestations.

References:

1. Taurog JD, Chhabra A, Colbert RA (2016) Ankylosing Spondylitis and Axial Spondyloarthritis. *N Engl J Med* 374:2563–2574. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1406182>
2. Stolwijk C, van Onna M, Boonen A, van Tubergen A (2016) Global Prevalence of Spondyloarthritis: A Systematic Review and Meta-Regression Analysis: Analysis of SpA Prevalence. *Arthritis Care Res* 68:1320–1331. <https://doi.org/10.1002/acr.22831>
3. Wright V (1978) Seronegative polyarthritis: a unified concept. *Arthritis Rheum* 21:619–633. <https://doi.org/10.1002/art.1780210603>
4. Baeten D, Breban M, Lories R, et al (2013) Are spondylarthritides related but distinct conditions or a single disease with a heterogeneous phenotype? *Arthritis Rheum* 65:12–20. <https://doi.org/10.1002/art.37829>
5. Breban M, Miceli-Richard C, Zinovieva E, et al (2006) The genetics of spondyloarthropathies. *Jt Bone Spine Rev Rhum* 73:355–362. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2005.11.010>
6. Caffrey MFP, James DCO (1973) Human Lymphocyte Antigen Association in Ankylosing Spondylitis. *Nature* 242:121–121. <https://doi.org/10.1038/242121a0>
7. Demis E, Said-Nahal R, D'Agostino M-A, et al (2009) Recurrence of spondylarthropathy among first-degree relatives of patients: a systematic cross-sectional study. *Ann Rheum Dis* 68:502–507. <https://doi.org/10.1136/ard.2008.089599>
8. Costantino F, Breban M, Garchon H-J (2018) Genetics and Functional Genomics of Spondyloarthritis. *Front Immunol* 9:2933. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02933>
9. López de Castro JA, Alvarez-Navarro C, Brito A, et al (2016) Molecular and pathogenic effects of endoplasmic reticulum aminopeptidases ERAP1 and ERAP2 in MHC-I-associated inflammatory disorders: Towards a unifying view. *Mol Immunol* 77:193–204. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2016.08.005>
10. Cortes A, Pulit SL, Leo PJ, et al (2015) Major histocompatibility complex associations of ankylosing spondylitis are complex and involve further epistasis with ERAP1. *Nat Commun* 6:7146. <https://doi.org/10.1038/ncomms8146>
11. Schittenhelm RB, Sian TCCLK, Wilmann PG, et al (2015) Revisiting the Arthritogenic Peptide Theory: Quantitative Not Qualitative Changes in the Peptide Repertoire of HLA-B27 Allotypes. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ* 67:702–713. <https://doi.org/10.1002/art.38963>
12. Benjamin R, Parham P (1990) Guilt by association: HLA-B27 and ankylosing spondylitis. *Immunol Today* 11:137–142
13. Scofield RH, Warren WL, Koelsch G, Harley JB (1993) A hypothesis for the HLA-B27 immune dysregulation in spondyloarthropathy: contributions from enteric organisms, B27 structure, peptides bound by B27, and convergent evolution. *Proc Natl Acad Sci* 90:9330–9334. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.20.9330>
14. Fiorillo MT, Rückert C, Hülsmeier M, et al (2005) Allele-dependent Similarity between Viral and Self-peptide Presentation by HLA-B27 Subtypes. *J Biol Chem* 280:2962–2971. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410807200>
15. Hanson AL, Nel HJ, Bradbury L, et al (2020) T-cell receptor immunosequencing reveals altered repertoire diversity and disease-associated clonal expansions in ankylosing spondylitis patients. *Arthritis Rheumatol art.41252*. <https://doi.org/10.1002/art.41252>
16. Bowness P (2015) HLA-B27. *Annu Rev Immunol* 33:29–48. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112110>
17. Colbert RA, Tran TM, Layh-Schmitt G (2014) HLA-B27 misfolding and ankylosing spondylitis. *Mol Immunol* 57:44–51. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.07.013>
18. Khare SD, Luthra HS, David CS (1995) Spontaneous inflammatory arthritis in HLA-B27 transgenic mice lacking beta 2-microglobulin: a model of human spondyloarthropathies.

J Exp Med 182:1153–1158. <https://doi.org/10.1084/jem.182.4.1153>

19. Kingsbury DJ, Mear JP, Witte DP, et al (2000) Development of spontaneous arthritis in beta2-microglobulin-deficient mice without expression of HLA-B27: association with deficiency of endogenous major histocompatibility complex class I expression. *Arthritis Rheum* 43:2290–2296. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200010\)43:10<2290::AID-ANR17>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200010)43:10<2290::AID-ANR17>3.0.CO;2-6)
20. Hammer RE, Maika SD, Richardson JA, et al (1990) Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell* 63:1099–1112
21. Taurog JD, Maika SD, Simmons WA, et al (1993) Susceptibility to inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rat lines correlates with the level of B27 expression. *J Immunol Baltim Md 1950* 150:4168–4178
22. Taurog JD, Maika SD, Satumtira N, et al (1999) Inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *Immunol Rev* 169:209–223
23. Tran TM, Dorris ML, Satumtira N, et al (2006) Additional human β 2-microglobulin curbs HLA-B27 misfolding and promotes arthritis and spondylitis without colitis in male HLA-B27-transgenic rats. *Arthritis Rheum* 54:1317–1327. <https://doi.org/10.1002/art.21740>
24. van Duivenvoorde LM, Dorris ML, Satumtira N, et al (2012) Relationship between inflammation, bone destruction, and osteoproliferation in the HLA-B27/human β 2-microglobulin-transgenic rat model of spondylarthritis. *Arthritis Rheum* 64:3210–3219. <https://doi.org/10.1002/art.34600>
25. Taurog JD, Rival C, van Duivenvoorde LM, et al (2012) Autoimmune epididymoorchitis is essential to the pathogenesis of male-specific spondylarthritis in HLA-B27-transgenic rats. *Arthritis Rheum* 64:2518–2528. <https://doi.org/10.1002/art.34480>
26. Breban M, Hammer RE, Richardson JA, Taurog JD (1993) Transfer of the inflammatory disease of HLA-B27 transgenic rats by bone marrow engraftment. *J Exp Med* 178:1607–1616
27. Hacquard-Bouder C, Falgarone G, Bosquet A, et al (2004) Defective costimulatory function is a striking feature of antigen-presenting cells in an HLA-B27-transgenic rat model of spondylarthropathy. *Arthritis Rheum* 50:1624–1635. <https://doi.org/10.1002/art.20211>
28. Fert I, Glatigny S, Poulain C, et al (2008) Correlation between dendritic cell functional defect and spondylarthritis phenotypes in HLA-B27/human beta2-microglobulin-transgenic rat lines. *Arthritis Rheum* 58:3425–3429. <https://doi.org/10.1002/art.24023>
29. Utriainen L, Firmin D, Wright P, et al (2012) Expression of HLA-B27 causes loss of migratory dendritic cells in a rat model of spondylarthritis. *Arthritis Rheum* 64:3199–3209. <https://doi.org/10.1002/art.34561>
30. Glatigny S, Fert I, Blaton MA, et al (2012) Proinflammatory Th17 cells are expanded and induced by dendritic cells in spondylarthritis-prone HLA-B27-transgenic rats. *Arthritis Rheum* 64:110–120. <https://doi.org/10.1002/art.33321>
31. DeLay ML, Turner MJ, Klenk EI, et al (2009) HLA-B27 misfolding and the unfolded protein response augment interleukin-23 production and are associated with Th17 activation in transgenic rats. *Arthritis Rheum* 60:2633–2643. <https://doi.org/10.1002/art.24763>
32. Araujo LM, Fert I, Jouhault Q, et al (2014) Increased production of interleukin-17 over interleukin-10 by treg cells implicates inducible costimulator molecule in experimental spondylarthritis. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ* 66:2412–2422. <https://doi.org/10.1002/art.38737>
33. Dhaenens M, Fert I, Glatigny S, et al (2009) Dendritic cells from spondylarthritis-prone HLA-B27-transgenic rats display altered cytoskeletal dynamics, class II major histocompatibility complex expression, and viability. *Arthritis Rheum* 60:2622–2632. <https://doi.org/10.1002/art.24780>

34. Hacquard-Bouder C, Chimenti M-S, Giquel B, et al (2007) Alteration of antigen-independent immunologic synapse formation between dendritic cells from HLA-B27-transgenic rats and CD4+ T cells: selective impairment of costimulatory molecule engagement by mature HLA-B27. *Arthritis Rheum* 56:1478–1489. <https://doi.org/10.1002/art.22572>
35. Paulos CM, Carpenito C, Plesa G, et al (2010) The inducible costimulator (ICOS) is critical for the development of human T(H)17 cells. *Sci Transl Med* 2:55ra78. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000448>
36. Ermoza K, Glatigny S, Jah N, et al (2019) Tolerogenic XCR1+ dendritic cell population is dysregulated in HLA-B27 transgenic rat model of spondyloarthritis. *Arthritis Res Ther* 21:46. <https://doi.org/10.1186/s13075-019-1827-9>
37. Denning TL, Norris BA, Medina-Contreras O, et al (2011) Functional Specializations of Intestinal Dendritic Cell and Macrophage Subsets That Control Th17 and Regulatory T Cell Responses Are Dependent on the T Cell/APC Ratio, Source of Mouse Strain, and Regional Localization. *J Immunol* 187:733–747. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002701>
38. Fert I, Cagnard N, Glatigny S, et al (2014) Reverse interferon signature is characteristic of antigen-presenting cells in human and rat spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ* 66:841–851. <https://doi.org/10.1002/art.38318>
39. Smith JA, Barnes MD, Hong D, et al (2008) Gene expression analysis of macrophages derived from ankylosing spondylitis patients reveals interferon- γ dysregulation. *Arthritis Rheum* 58:1640–1649. <https://doi.org/10.1002/art.23512>
40. Yoshida H, Hunter CA (2015) The Immunobiology of Interleukin-27. *Annu Rev Immunol* 33:417–443. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112134>
41. Breban M, Fernández-Sueiro JL, Richardson JA, et al (1996) T cells, but not thymic exposure to HLA-B27, are required for the inflammatory disease of HLA-B27 transgenic rats. *J Immunol Baltim Md* 1950 156:794–803
42. May E, Dorris ML, Satumtira N, et al (2003) CD8 alpha beta T cells are not essential to the pathogenesis of arthritis or colitis in HLA-B27 transgenic rats. *J Immunol Baltim Md* 1950 170:1099–1105
43. Taurog JD, Dorris ML, Satumtira N, et al (2009) Spondylarthritis in HLA-B27/human beta2-microglobulin-transgenic rats is not prevented by lack of CD8. *Arthritis Rheum* 60:1977–1984. <https://doi.org/10.1002/art.24599>
44. Falgarone G, Blanchard HS, Riot B, et al (1999) Cytotoxic T-cell-mediated response against *Yersinia pseudotuberculosis* in HLA-B27 transgenic rat. *Infect Immun* 67:3773–3779
45. Milia AF, Ibba-Manneschi L, Manetti M, et al (2011) Evidence for the prevention of enthesitis in HLA-B27/h β 2m transgenic rats treated with a monoclonal antibody against TNF- α . *J Cell Mol Med* 15:270–279. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00984.x>
46. Breban M, Beaufrère M, Glatigny S (2020) The microbiome in spondyloarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 101495. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2020.101495>
47. Rath HC, Wilson KH, Sartor RB (1999) Differential induction of colitis and gastritis in HLA-B27 transgenic rats selectively colonized with *Bacteroides vulgatus* or *Escherichia coli*. *Infect Immun* 67:2969–2974
48. Qian B-F, Tonkonogy SL, Sartor BR (2008) Aberrant innate immune responses in TLR-ligand activated HLA-B27 transgenic rat cells. *Inflamm Bowel Dis* 14:1358–1365. <https://doi.org/10.1002/ibd.20502>
49. Qian B-F, Tonkonogy SL, Balfour Sartor R (2006) Luminal bacterial antigen-specific CD4+ T-cell responses in HLA-B27 transgenic rats with chronic colitis are mediated by both major histocompatibility class II and HLA-B27 molecules. *Immunology* 117:319–328. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02303.x>
50. Dieleman LA, Hoentjen F, Qian B-F, et al (2004) Reduced ratio of protective *versus*

- proinflammatory cytokine responses to commensal bacteria in HLA-B27 transgenic rats. *Clin Exp Immunol* 136:30–39. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02410.x>
51. Asquith MJ, Stauffer P, Davin S, et al (2016) Perturbed Mucosal Immunity and Dysbiosis Accompany Clinical Disease in a Rat Model of Spondyloarthritis: IMPACT OF HLA-B27 ON MUCOSAL IMMUNITY AND INTESTINAL MICROBIOTA. *Arthritis Rheumatol* 68:2151–2162. <https://doi.org/10.1002/art.39681>
 52. Gill T, Asquith M, Brooks SR, et al (2018) Effects of HLA-B27 on Gut Microbiota in Experimental Spondyloarthritis Implicate an Ecological Model of Dysbiosis. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ* 70:555–565. <https://doi.org/10.1002/art.40405>
 53. van Tok MN, Satumtira N, Dorris M, et al (2017) Innate Immune Activation Can Trigger Experimental Spondyloarthritis in HLA-B27/Hu β 2m Transgenic Rats. *Front Immunol* 8:920. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00920>
 54. Navid F, Colbert RA (2017) Causes and consequences of endoplasmic reticulum stress in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol* 13:25–40. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.192>
 55. Turner MJ, Sowders DP, DeLay ML, et al (2005) HLA-B27 Misfolding in Transgenic Rats Is Associated with Activation of the Unfolded Protein Response. *J Immunol* 175:2438–2448. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.4.2438>
 56. Jeanty C, Sourisce A, Noteuil A, et al (2014) HLA-B27 subtype oligomerization and intracellular accumulation patterns correlate with predisposition to spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ* 66:2113–2123. <https://doi.org/10.1002/art.38644>
 57. Jah N, Jobart-Malfait A, Ermoza K, et al (2020) HLA-B27 subtypes predisposing to ankylosing spondylitis accumulate in endoplasmic reticulum-derived compartment apart from the peptide-loading complex. *Arthritis Rheumatol*. <https://doi.org/10.1002/art.41281>
 58. Navid F, Layh-Schmitt G, Sikora KA, et al (2018) The Role of Autophagy in the Degradation of Misfolded HLA-B27 Heavy Chains. *Arthritis Rheumatol* 70:746–755. <https://doi.org/10.1002/art.40414>
 59. Barnea E, Melamed Kadosh D, Haimovich Y, et al (2017) The Human Leukocyte Antigen (HLA)-B27 Peptidome in Vivo, in Spondyloarthritis-susceptible HLA-B27 Transgenic Rats and the Effect of Erp1 Deletion. *Mol Cell Proteomics MCP* 16:642–662. <https://doi.org/10.1074/mcp.M116.066241>
 60. Kollnberger S, Bird LA, Roddis M, et al (2004) HLA-B27 Heavy Chain Homodimers Are Expressed in HLA-B27 Transgenic Rodent Models of Spondyloarthritis and Are Ligands for Paired Ig-Like Receptors. *J Immunol* 173:1699–1710. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.3.1699>
 61. Tran TM, Satumtira N, Dorris ML, et al (2004) HLA-B27 in Transgenic Rats Forms Disulfide-Linked Heavy Chain Oligomers and Multimers That Bind to the Chaperone BiP. *J Immunol* 172:5110–5119. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.8.5110>
 62. Lim Kam Sian TCC, Indumathy S, Halim H, et al (2019) Allelic association with ankylosing spondylitis fails to correlate with human leukocyte antigen B27 homodimer formation. *J Biol Chem* 294:20185–20195. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010257>
 63. Grandon B, Rincheval-Arnold A, Jah N, et al (2019) HLA-B27 alters BMP/TGF β signalling in *Drosophila*, revealing putative pathogenic mechanism for spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis* 78:1653–1662. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-215832>
 64. Jackson MR, Song ES, Yang Y, Peterson PA (1992) Empty and peptide-containing conformers of class I major histocompatibility complex molecules expressed in *Drosophila melanogaster* cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:12117–12121
 65. Yadin D, Knaus P, Mueller TD (2016) Structural insights into BMP receptors: Specificity, activation and inhibition. *Cytokine Growth Factor Rev* 27:13–34. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.11.005>

66. Hattell SJ, Idone V, Wolken DMA, et al (2015) ACVR1R206H receptor mutation causes fibrodysplasia ossificans progressiva by imparting responsiveness to activin. *Sci Transl Med* 7:303ra137-303ra137. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac4358>
67. Kadi A, Izac B, Said-Nahal R, et al (2013) Investigating the genetic association between ERAP1 and spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis* 72:608–613. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-201783>
68. Robinson PC, Costello M-E, Leo P, et al (2015) ERAP2 is associated with ankylosing spondylitis in HLA-B27-positive and HLA-B27-negative patients. *Ann Rheum Dis* 74:1627–1629. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-207416>
69. Paladini F, Fiorillo MT, Tedeschi V, et al (2020) The Multifaceted Nature of Aminopeptidases ERAP1, ERAP2, and LNPEP: From Evolution to Disease. *Front Immunol* 11:1576. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01576>
70. López de Castro JA (2018) How ERAP1 and ERAP2 Shape the Peptidomes of Disease-Associated MHC-I Proteins. *Front Immunol* 9:2463. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02463>
71. Costantino F, Talpin A, Evnouchidou I, et al (2015) ERAP1 Gene Expression Is Influenced by Nonsynonymous Polymorphisms Associated With Predisposition to Spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol* 67:1525–1534. <https://doi.org/10.1002/art.39072>
72. Pepelyayeva Y, Rastall DPW, Aldhamen YA, et al (2018) ERAP1 deficient mice have reduced Type 1 regulatory T cells and develop skeletal and intestinal features of Ankylosing Spondylitis. *Sci Rep* 8:12464. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30159-5>
73. Braun J, Sieper J, Breban M, et al (2002) Anti-tumour necrosis factor alpha therapy for ankylosing spondylitis: international experience. *Ann Rheum Dis* 61 Suppl 3:iii51-60. https://doi.org/10.1136/ard.61.suppl_3.iii51
74. Kontoyiannis D, Pasparakis M, Pizarro TT, et al (1999) Impaired On/Off Regulation of TNF Biosynthesis in Mice Lacking TNF AU-Rich Elements. *Immunity* 10:387–398. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80038-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80038-2)
75. Arnaka M, Apostolaki M, Jacques P, et al (2008) Mesenchymal cell targeting by TNF as a common pathogenic principle in chronic inflammatory joint and intestinal diseases. *J Exp Med* 205:331–337. <https://doi.org/10.1084/jem.20070906>
76. Kontoyiannis D, Boulougouris G, Manoloukos M, et al (2002) Genetic Dissection of the Cellular Pathways and Signaling Mechanisms in Modeled Tumor Necrosis Factor–induced Crohn’s-like Inflammatory Bowel Disease. *J Exp Med* 196:1563–1574. <https://doi.org/10.1084/jem.20020281>
77. Jacques P, Lambrecht S, Verheugen E, et al (2014) Proof of concept: enthesitis and new bone formation in spondyloarthritis are driven by mechanical strain and stromal cells. *Ann Rheum Dis* 73:437–445. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-203643>
78. Kaaij MH, van Tok MN, Blijdorp IC, et al (2020) Transmembrane TNF drives osteoproliferative joint inflammation reminiscent of human spondyloarthritis. *J Exp Med* 217:e20200288. <https://doi.org/10.1084/jem.20200288>
79. Vafeiadou EC, Geka C, Ntari L, et al (2020) Ectopic bone formation and systemic bone loss in a transmembrane TNF-driven model of human spondyloarthritis. In Review
80. Sherlock JP, Joyce-Shaikh B, Turner SP, et al (2012) IL-23 induces spondyloarthropathy by acting on ROR- γ + CD3+CD4–CD8– enthesal resident T cells. *Nat Med* 18:1069–1076. <https://doi.org/10.1038/nm.2817>
81. Reinhardt A, Yevsa T, Worbs T, et al (2016) Interleukin-23-Dependent γ/δ T Cells Produce Interleukin-17 and Accumulate in the Enthesis, Aortic Valve, and Ciliary Body in Mice: Enthesis-Resident γ/δ T Cells. *Arthritis Rheumatol* 68:2476–2486. <https://doi.org/10.1002/art.39732>
82. Chen Y, Ouyang J, Yan R, et al (2018) Silencing SOCS3 Markedly Deteriorates

- Spondyloarthritis in Mice Induced by Minicircle DNA Expressing IL23. *Front Immunol* 9:2641. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02641>
83. Cuthbert RJ, Watad A, Fragkakis EM, et al (2019) Evidence that tissue resident human enthesis $\gamma\delta$ T-cells can produce IL-17A independently of IL-23R transcript expression. *Ann Rheum Dis* 78:1559–1565. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-215210>
84. Venken K, Jacques P, Mortier C, et al (2019) ROR γ t inhibition selectively targets IL-17 producing iNKT and $\gamma\delta$ -T cells enriched in Spondyloarthritis patients. *Nat Commun* 10:9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07911-6>
85. Rahman MA, Thomas R (2017) The SKG model of spondyloarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 31:895–909. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2018.07.004>
86. Ciccia F, Bombardieri M, Principato A, et al (2009) Overexpression of interleukin-23, but not interleukin-17, as an immunologic signature of subclinical intestinal inflammation in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 60:955–965. <https://doi.org/10.1002/art.24389>
87. Bridgewood C, Watad A, Russell T, et al (2019) Identification of myeloid cells in the human enthesis as the main source of local IL-23 production. *Ann Rheum Dis* 78:929–933. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-214944>
88. Sakkas LI, Zafiriou E, Bogdanos DP (2019) Mini Review: New Treatments in Psoriatic Arthritis. Focus on the IL-23/17 Axis. *Front Pharmacol* 10:872. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00872>
89. Baeten D, Østergaard M, Wei JC-C, et al (2018) Risankizumab, an IL-23 inhibitor, for ankylosing spondylitis: results of a randomised, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept, dose-finding phase 2 study. *Ann Rheum Dis* 77:1295–1302. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-213328>
90. Tok MN, Duivenvoorde LM, Kramer I, et al (2019) Interleukin-17A Inhibition Diminishes Inflammation and New Bone Formation in Experimental Spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol* 71:612–625. <https://doi.org/10.1002/art.40770>
91. van Tok MN, Na S, Lao CR, et al (2018) The Initiation, but Not the Persistence, of Experimental Spondyloarthritis Is Dependent on Interleukin-23 Signaling. *Front Immunol* 9:1550. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01550>
92. Lee JS, Tato CM, Joyce-Shaikh B, et al (2015) Interleukin-23-Independent IL-17 Production Regulates Intestinal Epithelial Permeability. *Immunity* 43:727–738. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.09.003>
93. Khmaladze I, Kelkka T, Guerard S, et al (2014) Mannan induces ROS-regulated, IL-17A-dependent psoriasis arthritis-like disease in mice. *Proc Natl Acad Sci* 111:E3669–E3678. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405798111>
94. Hasegawa H, Mizoguchi I, Chiba Y, et al (2016) Expanding Diversity in Molecular Structures and Functions of the IL-6/IL-12 Heterodimeric Cytokine Family. *Front Immunol* 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00479>
95. Dibra D, Xia X, Gagea M, et al (2018) A spontaneous model of spondyloarthropathies that develops bone loss and pathological bone formation: A process regulated by IL27RA $^{-/-}$ and mutant-p53. *PLOS ONE* 13:e0193485. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193485>
96. Corthay A, Hansson AS, Holmdahl R (2000) T lymphocytes are not required for the spontaneous development of enthesal ossification leading to marginal ankylosis in the DBA/1 mouse. *Arthritis Rheum* 43:844–851. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200004\)43:4<844::AID-ANR15>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200004)43:4<844::AID-ANR15>3.0.CO;2-B)
97. Lories RJU (2004) Ankylosing enthesitis, dactylitis, and onychoperiostitis in male DBA/1 mice: a model of psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 63:595–598. <https://doi.org/10.1136/ard.2003.013599>
98. Holmdahl R, Jansson L, Andersson M, Jonsson R (1992) Genetic, hormonal and behavioural influence on spontaneously developing arthritis in normal mice. *Clin Exp*

Immunol 88:467–472. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1992.tb06473.x>

99. Luo G, Boelle PY, Turbelin C, et al (2019) Abrupt and unexpected stressful life events are followed with increased disease activity in spondyloarthritis: A two years web-based cohort study. *Joint Bone Spine* 86:203–209. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2018.05.009>

100. Lories RJU, Derese I, de Bari C, Luyten FP (2007) Evidence for uncoupling of inflammation and joint remodeling in a mouse model of spondylarthritis. *Arthritis Rheum* 56:489–497. <https://doi.org/10.1002/art.22372>

101. Lories RJU, Derese I, Luyten FP (2005) Modulation of bone morphogenetic protein signaling inhibits the onset and progression of ankylosing enthesitis. *J Clin Invest* 115:1571–1579. <https://doi.org/10.1172/JCI23738>

102. Bayramov AV, Eroshkin FM, Martynova NY, et al (2011) Novel functions of Noggin proteins: inhibition of Activin/Nodal and Wnt signaling. *Development* 138:5345–5356. <https://doi.org/10.1242/dev.068908>

Table 1. Major characteristics of animal models used to study SpA mechanism.*

Model	Phenotype	Triggering cells	Principle effector mechanism	Principal effector mediators	Major References
HLA-B27/hβ2m transgenic rat	Arthritis, Psoriasis, UC, Epididymoorchitis or Arthritis, Spondylitis, Sacroliliitis, Epididymoorchitis	Dysfunctional HLA-B27+ APCs	Increased Th17 Deregulated Treg	<ul style="list-style-type: none"> TNFα IL-17 	[22, 23, 26, 28, 30, 32, 45]
HLA-B27/hβ2m transgenic <i>Drosophila</i>	Crossveinless Small eye	Stromal cells	Increased BMP/TGFβ signaling	<ul style="list-style-type: none"> Activin BMP 	[63]
ERAP1 ^{-/-} mouse	Lumbar spine inflammation and ossification, Sacroliliitis, Osteoporosis, Increased susceptibility to colitis	Decreased tolerogenic DC population and decreased expression of Qa-2 (the HLA-G murine ortholog) by tolerogenic DC and macrophages	Decreased CD3+CD4+Foxp3-IL10+ inducible Treg population, possibly resulting from decreased Qa-2 expression	<ul style="list-style-type: none"> Unknown 	[72]
TNF ^{ΔARE} mouse	Polyarthritis, Enthesitis, Sacroliliitis, CD-like ileitis	Stromal cells (CD and Arthritis) Myeloid and T cells (CD)	Stromal cells (Arthritis)	<ul style="list-style-type: none"> TNFα (Arthritis) IL-12 (CD) IFNγ (CD) 	[74-77]

				Th1 and CD8+ T cells (CD)		
tmTNF overexpressing mouse (<i>Tg486</i>)	Arthritis, Enthesitis, Osteitis, Bony ankylosis (axial and peripheral joints)	Stromal cells ± haematopoietic cells	TNFR1 ± TNFR2 signaling	• tmTNF	[78, 79]	
Minicircle IL-23 DNA-inducible SpA	Enthesitis, Enteseal ossification (paw, spine, sacroiliac joint), Psoriasis, Aortic root and valve inflammation	IL-23R+ ROR γ t+ CD4- CD8- γ/δ T cells residing in entheses and aortic root	IL-23-dependent type 3 immune response	• IL-17 • IL-22	[80, 81]	
Curdlan-induced SpA in SKG mouse (ZAP-70 mutation)	Arthritis, Enthesitis, Spondylitis, Sacroiliitis, Ileitis, Uveitis	Curdlan-activated gut APCs (<i>via</i> Dectin 1 receptor)	IL-23-dependent type 3 immune response	• IL-17	[85]	
Fungus mannan inducible PSA	Arthritis, Enthesitis, Osteitis, Periostitis, Hyperkeratinous skin	TNF α -producing macrophages	γ/δ T cells-dependent type 3 immune response	• IL-17	[93]	
IL27RA ^{-/-} P53 ^{-/-} mouse	Osteoporosis,	Unknown	Unknown	• Unknown	[95]	

	Spine ossification, Neutrophilic dermatitis (rare), Osteitis and periostitis (rare)			
Ankylosing enthesitis (ANKENT) mouse	Dactylitis Onychoperiostitis	Unknown	Increased BMP signaling	<ul style="list-style-type: none"> BMP/TGFβ family ligands <p>[97, 101]</p>

* hβ2m: human β2-microglobulin; UC: ulcerative colitis; APC: antigen-presenting cell; Th17: T-helper 17 cell; Treg: regulatory T cell; TNFα: tumor necrosis factor-α; IL-17: interleukin-17; BMP: bone morphogenic protein; TGFβ: transforming growth factor β; DC: dendritic cell; CD: Crohn's disease; PsA: psoriatic arthritis; IL27RA: IL27 receptor α.

Bibliographie

- Aashaq, S., Batool, A., Mir, S. A., Beigh, M. A., Andrabi, K. I., & Shah, Z. A. (2022). TGF- β signaling: A recap of SMAD-independent and SMAD-dependent pathways. *Journal of Cellular Physiology*, 237(1), 59–85. <https://doi.org/10.1002/jcp.30529>
- Abdollah, S., Macías-Silva, M., Tsukazaki, T., Hayashi, H., Attisano, L., & Wrana, J. L. (1997). T β RI Phosphorylation of Smad2 on Ser465 and Ser467 Is Required for Smad2-Smad4 Complex Formation and Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 272(44), 27678–27685. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.44.27678>
- Adamopoulos, I. E., Tessmer, M., Chao, C.-C., Adda, S., Gorman, D., Petro, M., Chou, C.-C., Pierce, R. H., Yao, W., Lane, N. E., Laface, D., & Bowman, E. P. (2011). IL-23 Is Critical for Induction of Arthritis, Osteoclast Formation, and Maintenance of Bone Mass. *The Journal of Immunology*, 187(2), 951–959. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003986>
- Afkarian, M., Sedy, J. R., Yang, J., Jacobson, N. G., Cereb, N., Yang, S. Y., Murphy, T. L., & Murphy, K. M. (2002). T-bet is a STAT1-induced regulator for IL-12R expression in naïve CD4⁺ T cells. *Nature Immunology*, 3(6), 549–557. <https://doi.org/10.1038/ni794>
- Afrakhte, M., Morén, A., Jossan, S., Itoh, S., Sampath, K., Westermarck, B., Heldin, C.-H., Heldin, N.-E., & ten Dijke, P. (1998). Induction of Inhibitory Smad6 and Smad7 mRNA by TGF- β Family Members. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 249(2), 505–511. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9170>
- Ahamed, J., Burg, N., Yoshinaga, K., Janczak, C. A., Rifkin, D. B., & Collier, B. S. (2008). In vitro and in vivo evidence for shear-induced activation of latent transforming growth factor-21. *Blood*, 112(9), 3650–3660. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-151753>
- Ahern, P. P., Schiering, C., Buonocore, S., McGeachy, M. J., Cua, D. J., Maloy, K. J., & Powrie, F. (2010). Interleukin-23 drives intestinal inflammation through direct activity on T cells. *Immunity*, 33(2), 279–288. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.08.010>
- Alarcón, C., Zaromytidou, A. I., Xi, Q., Gao, S., Yu, J., Fujisawa, S., Barlas, A., Miller, A. N., Manova-Todorova, K., Macias, M. J., Sapkota, G., Pan, D., & Massagué, J. (2009). Nuclear CDKs Drive Smad Transcriptional Activation and Turnover in BMP and TGF- β Pathways. *Cell*, 139(4), 757–769. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.035>
- Anderson, S. B., Goldberg, A. L., & Whitman, M. (2008). Identification of a novel pool of extracellular pro-myostatin in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 283(11), 7027–7035. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706678200>
- Annes, J. P., Chen, Y., Munger, J. S., & Rifkin, D. B. (2004). Integrin α V β 6-mediated activation of latent TGF- β requires the latent TGF- β binding protein-1. *The Journal of Cell Biology*, 165(5), 723–734. <https://doi.org/10.1083/jcb.200312172>
- Araujo, L. M., Fert, I., Jouhault, Q., Labroquère, K., Andrieu, M., Chiochia, G., & Breban, M. (2014). Increased production of interleukin-17 over interleukin-10 by treg cells implicates inducible costimulator molecule in experimental spondyloarthritis. *Arthritis and Rheumatology*, 66(9), 2412–2422. <https://doi.org/10.1002/art.38737>
- Armaka, M., Apostolaki, M., Jacques, P., Kontoyiannis, D. L., Elewaut, D., & Kollias, G. (2008). Mesenchymal cell targeting by TNF as a common pathogenic principle in chronic

- inflammatory joint and intestinal diseases. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(2), 331–337. <https://doi.org/10.1084/jem.20070906>
- Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L., & Powrie, F. (1999). An Essential Role for Interleukin 10 in the Function of Regulatory T Cells That Inhibit Intestinal Inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*, 190(7), 995–1004. <https://doi.org/10.1084/jem.190.7.995>
- Atagunduz, P., Appel, H., Kuon, W., Wu, P., Thiel, A., Kloetzel, P.-M., & Sieper, J. (2005). HLA-B27-restricted CD8+ T cell response to cartilage-derived self peptides in ankylosing spondylitis. *Arthritis & Rheumatism*, 52(3), 892–901. <https://doi.org/10.1002/art.20948>
- Baeten, D., Sieper, J., Braun, J., Baraliakos, X., Dougados, M., Emery, P., Deodhar, A., Porter, B., Martin, R., Andersson, M., Mpofo, S., Richards, H. B., MEASURE 1 Study Group, & MEASURE 2 Study Group. (2015). Secukinumab, an Interleukin-17A Inhibitor, in Ankylosing Spondylitis. *The New England Journal of Medicine*, 373(26), 2534–2548. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1505066>
- Barcellos-Hoff, M. H., & Dix, T. A. (1996). Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1. *Molecular Endocrinology*, 10(9), 1077–1083. <https://doi.org/10.1210/mend.10.9.8885242>
- Barker, D. J., Maccari, G., Georgiou, X., Cooper, M. A., Flicek, P., Robinson, J., & Marsh, S. G. E. (2023). The IPD-IMGT/HLA Database. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D1053–D1060. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1011>
- Barnea, E., Kadosh, D. M., Haimovich, Y., Satumtira, N., Dorris, M. L., Nguyen, M. T., Hammer, R. E., Tran, T. M., Colbert, R. A., Taurog, J. D., & Admon, A. (2017). The human leukocyte antigen (HLA)-B27 peptidome in vivo, in spondyloarthritis-susceptible HLA-B27 transgenic rats and the effect of Erap1 deletion. *Molecular and Cellular Proteomics*, 16(4), 642–662. <https://doi.org/10.1074/mcp.M116.066241>
- Barrios-Rodiles, M., Brown, K. R., Ozdamar, B., Bose, R., Liu, Z., Donovan, R. S., Shinjo, F., Liu, Y., Dembowy, J., Taylor, I. W., Luga, V., Przulj, N., Robinson, M., Suzuki, H., Hayashizaki, Y., Jurisica, I., & Wrana, J. L. (2005). High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5715), 1621–1625. <https://doi.org/10.1126/science.1105776>
- Ben Dror, L., Barnea, E., Beer, I., Mann, M., & Admon, A. (2010). The HLA-B*2705 peptidome. *Arthritis & Rheumatism*, 62(2), 420–429. <https://doi.org/10.1002/art.27257>
- Benham, H., Rehaume, L. M., Hasnain, S. Z., Velasco, J., Baillet, A. C., Ruutu, M., Kikly, K., Wang, R., Tseng, H. W., Thomas, G. P., Brown, M. A., Strutton, G., McGuckin, M. A., & Thomas, R. (2014). Interleukin-23 mediates the intestinal response to microbial β -1,3-glucan and the development of spondyloarthritis pathology in SKG mice. *Arthritis and Rheumatology*, 66(7), 1755–1767. <https://doi.org/10.1002/art.38638>
- Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L., Kelly, T. E., Saulsbury, F. T., Chance, P. F., & Ochs, H. D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature Genetics*, 27(1), 20–21. <https://doi.org/10.1038/83713>
- Bertero, A., Brown, S., Madrigal, P., Osnato, A., Ortmann, D., Yiangou, L., Kadiwala, J., Hubner, N. C., de los Mozos, I. R., Sadée, C., Lenaerts, A.-S., Nakanoh, S., Grandy, R., Farnell, E.,

- Ule, J., Stunnenberg, H. G., Mendjan, S., & Vallier, L. (2018). The SMAD2/3 interactome reveals that TGF β controls m6A mRNA methylation in pluripotency. *Nature*, *555*(7695), 256–259. <https://doi.org/10.1038/nature25784>
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L., & Kuchroo, V. K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, *441*(7090), 235–238. <https://doi.org/10.1038/nature04753>
- Bhowmick, N. A., Ghiassi, M., Bakin, A., Aakre, M., Lundquist, C. A., Engel, M. E., Arteaga, C. L., & Moses, H. L. (2001). Transforming Growth Factor- β 1 Mediates Epithelial to Mesenchymal Transdifferentiation through a RhoA-dependent Mechanism. *Molecular Biology of the Cell*, *12*(1), 27–36. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.1.27>
- Bitzer, M., von Gersdorff, G., Liang, D., Dominguez-Rosales, A., Beg, A. A., Rojkind, M., & Böttinger, E. P. (2000). A mechanism of suppression of TGF-beta/SMAD signaling by NF-kappa B/RelA. *Genes & Development*, *14*(2), 187–197. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10652273>
- Boel, A., López-Medina, C., van der Heijde, D. M. F. M., & van Gaalen, F. A. (2022). Age at onset in axial spondyloarthritis around the world: data from the Assessment in SpondyloArthritis international Society Peripheral Involvement in Spondyloarthritis study. *Rheumatology (Oxford, England)*, *61*(4), 1468–1475. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keab544>
- Braun, J., Sieper, J., Breban, M., Collantes-Estevez, E., Davis, J., Inman, R., Marzo-Ortega, H., & Mielants, H. (2002). Anti-tumour necrosis factor therapy for ankylosing spondylitis: international experience. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *61*(Supplement 3), 51iii–60. https://doi.org/10.1136/ard.61.suppl_3.iii51
- Breban, M., Fernández-Sueiro, J. L., Richardson, J. A., Hadavand, R. R., Maika, S. D., Hammer, R. E., & Taurog, J. D. (1996). T cells, but not thymic exposure to HLA-B27, are required for the inflammatory disease of HLA-B27 transgenic rats. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *156*(2), 794–803. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8543835>
- Breban, M., Glatigny, S., Cherqaoui, B., Beaufrère, M., Lauraine, M., Rincheval-Arnold, A., Gaumer, S., Guéna, I., & Araujo, L. M. (2021). Lessons on SpA pathogenesis from animal models. *Seminars in Immunopathology*, *43*(2), 207–219. <https://doi.org/10.1007/s00281-020-00832-x>
- Breban, M., Hammer, R. E., Richardson, J. A., & Taurog, J. D. (1993). Transfer of the inflammatory disease of HLA-B27 transgenic rats by bone marrow engraftment. *Journal of Experimental Medicine*, *178*(5), 1607–1616. <https://doi.org/10.1084/jem.178.5.1607>
- Breban, M., Tap, J., Leboime, A., Said-Nahal, R., Langella, P., Chiocchia, G., Furet, J.-P., & Sokol, H. (2017). Faecal microbiota study reveals specific dysbiosis in spondyloarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *76*(9), 1614–1622. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-211064>
- Brewerton, D. A., Hart, F. D., Nicholls, A., Caffrey, M., James, D. C., & Sturrock, R. D. (1973). Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet (London, England)*, *1*(7809), 904–907. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(73\)91360-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(73)91360-3)

- Brock, M., Trenkmann, M., Gay, R. E., Michel, B. A., Gay, S., Fischler, M., Ulrich, S., Speich, R., & Huber, L. C. (2009). Interleukin-6 modulates the expression of the bone morphogenic protein receptor type ii through a novel STAT3-microRNA cluster 17/92 pathway. *Circulation Research*, *104*(10), 1184–1191. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.197491>
- Brooks, J. M., Murray, R. J., Thomas, W. A., Kurilla, M. G., & Rickinson, A. B. (1993). Different HLA-B27 subtypes present the same immunodominant Epstein-Barr virus peptide. *The Journal of Experimental Medicine*, *178*(3), 879–887. <https://doi.org/10.1084/jem.178.3.879>
- Bros, Haas, Moll, & Grabbe. (2019). RhoA as a Key Regulator of Innate and Adaptive Immunity. *Cells*, *8*(7), 733. <https://doi.org/10.3390/cells8070733>
- Browning, L. M., Miller, C., Kuczma, M., Pietrzak, M., Jing, Y., Rempala, G., Muranski, P., Ignatowicz, L., & Kraj, P. (2020). Bone Morphogenic Proteins Are Immunoregulatory Cytokines Controlling FOXP3+ Treg Cells. *Cell Reports*, *33*(1), 108219. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108219>
- Browning, L. M., Pietrzak, M., Kuczma, M., Simms, C. P., Kurczewska, A., Refugia, J. M., Lowery, D. J., Rempala, G., Gutkin, D., Ignatowicz, L., Muranski, P., & Kraj, P. (2018). TGF- β -mediated enhancement of T H 17 cell generation is inhibited by bone morphogenetic protein receptor 1 α signaling. *Science Signaling*, *11*(545), 1–16. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aar2125>
- Brucklacher-Waldert, V., Ferreira, C., Stebegg, M., Fesneau, O., Innocentin, S., Marie, J. C., & Veldhoen, M. (2017). Cellular Stress in the Context of an Inflammatory Environment Supports TGF- β -Independent T Helper-17 Differentiation. *Cell Reports*, *19*(11), 2357–2370. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.052>
- Burton, P. R., Clayton, D. G., Cardon, L. R., Craddock, N., Deloukas, P., Duncanson, A., Kwiatkowski, D. P., McCarthy, M. I., Ouwehand, W. H., Samani, N. J., Todd, J. A., Donnelly, P., Barrett, J. C., Davison, D., Easton, D., Evans, D. M., Leung, H. T., Marchini, J. L., Morris, A. P., ... Weisman, M. H. (2007). Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nature Genetics*, *39*(11), 1329–1337. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.17>
- Butler, S. J., & Dodd, J. (2003). A Role for BMP Heterodimers in Roof Plate-Mediated Repulsion of Commissural Axons. *Neuron*, *38*(3), 389–401. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00254-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00254-X)
- Carron, P., de Craemer, A. S., & van den Bosch, F. (2020). Peripheral spondyloarthritis: A neglected entity - State of the art. In *RMD Open* (Vol. 6, Issue 1). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/rmdopen-2019-001136>
- Chacko, B. M., Qin, B., Correia, J. J., Lam, S. S., de Caestecker, M. P., & Lin, K. (2001). The L3 loop and C-terminal phosphorylation jointly define Smad protein trimerization. *Nature Structural Biology*, *8*(3), 248–253. <https://doi.org/10.1038/84995>
- Chan, A. T., Kollnberger, S. D., Wedderburn, L. R., & Bowness, P. (2005). Expansion and enhanced survival of natural killer cells expressing the killer immunoglobulin-like receptor KIR3DL2 in spondylarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, *52*(11), 3586–3595. <https://doi.org/10.1002/art.21395>

- Chang, M., Lee, A. J., Fitzpatrick, L., Zhang, M., & Sun, S.-C. (2009). NF-kappa B1 p105 regulates T cell homeostasis and prevents chronic inflammation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *182*(5), 3131–3138. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803637>
- Chang, S.-F., Chang, T.-K., Peng, H.-H., Yeh, Y.-T., Lee, D.-Y., Yeh, C.-R., Zhou, J., Cheng, C.-K., Chang, C. A., & Chiu, J.-J. (2009). BMP-4 Induction of Arrest and Differentiation of Osteoblast-Like Cells via p21 CIP1 and p27 KIP1 Regulation. *Molecular Endocrinology*, *23*(11), 1827–1838. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0143>
- Cheifetz, S., Weatherbee, J. A., L-S Tsang, M., Anderson, J. K., Mole, J. E., Lucas, R., & Massagu, J. (1987). The Transforming Growth Factor-B System, a Complex Pattern of Cross-Reactive Ligands and Receptors. In *Cell* (Vol. 48).
- Chen, H.-A., Chen, C.-H., Liao, H.-T., Lin, Y.-J., Chen, P.-C., Chen, W.-S., Chien, C.-C., & Chou, C.-T. (2012). Clinical, functional, and radiographic differences among juvenile-onset, adult-onset, and late-onset ankylosing spondylitis. *The Journal of Rheumatology*, *39*(5), 1013–1018. <https://doi.org/10.3899/jrheum.111031>
- Chen, L., Ridley, A., Hammitzsch, A., Al-Mossawi, M. H., Bunting, H., Georgiadis, D., Chan, A., Kollnberger, S., & Bowness, P. (2016). Silencing or inhibition of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1) suppresses free heavy chain expression and Th17 responses in ankylosing spondylitis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *75*(5), 916–923. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-206996>
- Chen, W. J., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., & Wahl, S. M. (2003). Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. *Journal of Experimental Medicine*, *198*(12), 1875–1886. <https://doi.org/10.1084/jem.20030152>
- Chen, X., Wang, H., Liao, H.-J., Hu, W., Gewin, L., Mernaugh, G., Zhang, S., Zhang, Z.-Y., Vega-Montoto, L., Vanacore, R. M., Fässler, R., Zent, R., & Pozzi, A. (2014). Integrin-mediated type II TGF- β receptor tyrosine dephosphorylation controls SMAD-dependent profibrotic signaling. *Journal of Clinical Investigation*, *124*(8), 3295–3310. <https://doi.org/10.1172/JCI71668>
- Chen, Y.-G., Hata, A., Lo, R. S., Wotton, D., Shi, Y., Pavletich, N., & Massagué, J. (1998). Determinants of specificity in TGF- β signal transduction. *Genes & Development*, *12*(14), 2144–2152. <https://doi.org/10.1101/gad.12.14.2144>
- Cherqaoui, B., Araujo, L. M., Glatigny, S., & Breban, M. (2021). Axial spondyloarthritis: emerging drug targets. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *25*(8), 633–644. <https://doi.org/10.1080/14728222.2021.1973429>
- Cherqaoui, B., Crémazy, F., Lauraine, M., Shammas, G., Said-Nahal, R., Mambu Mambuëni, H., Costantino, F., Fourmont, M., Hulot, A., Garchon, H.-J., Glatigny, S., Araujo, L. M., & Breban, M. (2023). STAT1 deficiency underlies a proinflammatory imprint of naive CD4+ T cells in spondyloarthritis. *Frontiers in Immunology*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1227281>
- Choi, G., Na, H., Kuen, D.-S., Kim, B.-S., & Chung, Y. (2020). Autocrine TGF- β 1 Maintains the Stability of Foxp3+ Regulatory T Cells via IL-12R β 2 Downregulation. *Biomolecules*, *10*(6), 819. <https://doi.org/10.3390/biom10060819>

- Choi, G., Park, Y. J., Cho, M., Moon, H., Kim, D., Kang, C. Y., Chung, Y., & Kim, B. S. (2021). A critical role for Th17 cell-derived TGF- β 1 in regulating the stability and pathogenicity of autoimmune Th17 cells. *Experimental and Molecular Medicine*, 53(5), 993–1004. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00632-9>
- Chong, W. P., Mattapallil, M. J., Raychaudhuri, K., Bing, S. J., Wu, S., Zhong, Y., Wang, W. W., Chen, Z., Silver, P. B., Jittayasothorn, Y., Chan, C. C., Chen, J., Horai, R., & Caspi, R. R. (2020). The Cytokine IL-17A Limits Th17 Pathogenicity via a Negative Feedback Loop Driven by Autocrine Induction of IL-24. *Immunity*, 53(2), 384–397.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.06.022>
- Chung, Y., Chang, S. H., Martinez, G. J., Yang, X. O., Nurieva, R., Kang, H. S., Ma, L., Watowich, S. S., Jetten, A. M., Tian, Q., & Dong, C. (2009). Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity*, 30(4), 576–587. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.02.007>
- Colbert, R. A., Tran, T. M., & Layh-Schmitt, G. (2014). HLA-B27 misfolding and ankylosing spondylitis. *Molecular Immunology*, 57(1), 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.07.013>
- Cortes, A., Hadler, J., Pointon, J. P., Robinson, P. C., Karaderi, T., Leo, P., Cremin, K., Pryce, K., Harris, J., Lee, S., Joo, K. Bin, Shim, S. C., Weisman, M., Ward, M., Zhou, X., Garchon, H. J., Chiochia, G., Nossent, J., Lie, B. A., ... Brown, M. A. (2013). Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nature Genetics*, 45(7), 730–738. <https://doi.org/10.1038/ng.2667>
- Cortes, A., Pulit, S. L., Leo, P. J., Pointon, J. J., Robinson, P. C., Weisman, M. H., Ward, M., Gensler, L. S., Zhou, X., Garchon, H.-J., Chiochia, G., Nossent, J., Lie, B. A., Førre, Ø., Tuomilehto, J., Laiho, K., Bradbury, L. A., Elewaut, D., Burgos-Vargas, R., ... Brown, M. A. (2015). Major histocompatibility complex associations of ankylosing spondylitis are complex and involve further epistasis with ERAP1. *Nature Communications*, 6(1), 7146. <https://doi.org/10.1038/ncomms8146>
- Costantino, F., Breban, M., & Garchon, H. J. (2018). Genetics and Functional Genomics of Spondyloarthritis. *Frontiers in Immunology*, 9(December), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02933>
- Costantino, F., Talpin, A., Said-Nahal, R., Goldberg, M., Henny, J., Chiochia, G., Garchon, H. J., Zins, M., & Breban, M. (2015). Prevalence of spondyloarthritis in reference to HLA-B27 in the French population: Results of the GAZEL cohort. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 74(4), 689–693. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204436>
- Couper, K. N., Blount, D. G., & Riley, E. M. (2008). IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *The Journal of Immunology*, 180(9), 5771–5777. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.9.5771>
- Cua, D. J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C. A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., Zurawski, S., Wiekowski, M., Lira, S. A., Gorman, D., Kastelein, R. A., & Sedgwick, J. D. (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*, 421(6924), 744–748. <https://doi.org/10.1038/nature01355>

- Cuenda, A., & Rousseau, S. (2007). p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1773(8), 1358–1375. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.03.010>
- Cuende, J., Liénart, S., Dedobbeleer, O., van der Woning, B., De Boeck, G., Stockis, J., Huygens, C., Colau, D., Somja, J., Delvenne, P., Hannon, M., Baron, F., Dumoutier, L., Renaud, J.-C., De Haard, H., Saunders, M., Coulie, P. G., & Lucas, S. (2015). Monoclonal antibodies against GARP/TGF- β 1 complexes inhibit the immunosuppressive activity of human regulatory T cells in vivo. *Science Translational Medicine*, 7(284). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa1983>
- Cuthbert, R. J., Watad, A., Fragkakis, E. M., Dunsmuir, R., Loughenbury, P., Khan, A., Millner, P. A., Davison, A., Marzo-Ortega, H., Newton, D., Bridgwood, C., & McGonagle, D. G. (2019). Evidence that tissue resident human enthesis $\gamma\delta$ T-cells can produce IL-17A independently of IL-23R transcript expression. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 78(11), 1559–1565. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-215210>
- Dangoria, N. S., DeLay, M. L., Kingsbury, D. J., Mear, J. P., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A., & Colbert, R. A. (2002). HLA-B27 Misfolding Is Associated with Aberrant Intermolecular Disulfide Bond Formation (Dimerization) in the Endoplasmic Reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 277(26), 23459–23468. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110336200>
- Danve, A., & O'Dell, J. (2015). The ongoing quest for biomarkers in Ankylosing Spondylitis. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 18(8), 826–834. <https://doi.org/10.1111/1756-185X.12779>
- David, C. J., & Massagué, J. (2018). Contextual determinants of TGF β action in development, immunity and cancer. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 19(7), 419–435. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0007-0>
- De Blecourt, J. J., De Blijcourt-Meindersma, T., Erlee, T. J. D., & Drion, E. F. (1961). HEREDITARY FACTORS IN RHEUMATOID ARTHRITIS AND ANKYLOSING SPONDYLITIS WITH A STATISTICAL APPENDIX BY. *Ann. Rheum. Dis*, 215. <https://doi.org/10.1136/ard.20.3.215>
- de Winter, J. J., Paramarta, J. E., de Jong, H. M., van de Sande, M. G., & Baeten, D. L. (2019). Peripheral disease contributes significantly to the level of disease activity in axial spondyloarthritis. *RMD Open*, 5(1), e000802. <https://doi.org/10.1136/rmdopen-2018-000802>
- de Winter, J. J., van Mens, L. J., van der Heijde, D., Landewé, R., & Baeten, D. L. (2016). Prevalence of peripheral and extra-articular disease in ankylosing spondylitis versus non-radiographic axial spondyloarthritis: a meta-analysis. *Arthritis Research & Therapy*, 18(1), 196. <https://doi.org/10.1186/s13075-016-1093-z>
- Dees, C., Tomcik, M., Palumbo-Zerr, K., Distler, A., Beyer, C., Lang, V., Horn, A., Zerr, P., Zwerina, J., Gelse, K., Distler, O., Schett, G., & Distler, J. H. W. (2012). JAK-2 as a novel mediator of the profibrotic effects of transforming growth factor β in systemic sclerosis. *Arthritis and Rheumatism*, 64(9), 3006–3015. <https://doi.org/10.1002/art.34500>
- del Río-Martínez, P., Navarro-Compán, V., Díaz-Miguel, C., Almodóvar, R., Mulero, J., de Miguel, E., & Esperanza Group. (2016). Similarities and differences between patients fulfilling axial and peripheral ASAS criteria for spondyloarthritis: Results from the

- Esperanza Cohort. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 45(4), 400–403. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2015.09.001>
- Dennler, S., Huet, S., & Gauthier, J.-M. (1999). A short amino-acid sequence in MH1 domain is responsible for functional differences between Smad2 and Smad3. *Oncogene*, 18(8), 1643–1648. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202729>
- Derynck, R., & Budi, E. H. (2019). Specificity, versatility, and control of TGF- β family signaling. *Science Signaling*, 12(570). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aav5183>
- Dhaenens, M., Fert, I., Glatigny, S., Haerinck, S., Poulain, C., Donnadiou, E., Hacquard-Bouder, C., André, C., Elewaut, D., Deforce, D., & Breban, M. (2009). Dendritic cells from spondylarthritis-prone HLA-B27-transgenic rats display altered cytoskeletal dynamics, class II major histocompatibility complex expression, and viability. *Arthritis and Rheumatism*, 60(9), 2622–2632. <https://doi.org/10.1002/art.24780>
- Di Guglielmo, G. M., Le Roy, C., Goodfellow, A. F., & Wrana, J. L. (2003). Distinct endocytic pathways regulate TGF- β receptor signalling and turnover. *Nature Cell Biology*, 5(5), 410–421. <https://doi.org/10.1038/ncb975>
- Di Mitri, D., & Battistini, L. (2015). The p38 mitogen-activated protein kinase cascade modulates T helper type 17 differentiation. *Immunology*.
- DiToro, D., Harbour, S. N., Bando, J. K., Benavides, G., Witte, S., Laufer, V. A., Moseley, C., Singer, J. R., Frey, B., Turner, H., Bruning, J., Darley-Usmar, V., Gao, M., Conover, C., Hatton, R. D., Frank, S., Colonna, M., & Weaver, C. T. (2020). Insulin-Like Growth Factors Are Key Regulators of T Helper 17 Regulatory T Cell Balance in Autoimmunity. *Immunity*, 52(4), 650–667. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.03.013>
- Dong, X., Zhao, B., Iacob, R. E., Zhu, J., Koksai, A. C., Lu, C., Engen, J. R., & Springer, T. A. (2017). Force interacts with macromolecular structure in activation of TGF- β . *Nature*, 542(7639), 55–59. <https://doi.org/10.1038/nature21035>
- Dougados, M., & Baeten, D. (2011). Spondyloarthritis. *Lancet (London, England)*, 377(9783), 2127–2137. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60071-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60071-8)
- Dubois, C. M., Laprise, M. H., Blanchette, F., Gentry, L. E., & Leduc, R. (1995). Processing of transforming growth factor β 1 precursor by human furin convertase. *Journal of Biological Chemistry*, 270(18), 10618–10624. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.18.10618>
- Durrington, H. J., Upton, P. D., Hoer, S., Boname, J., Dunmore, B. J., Yang, J., Crilley, T. K., Butler, L. M., Blackbourn, D. J., Nash, G. B., Lehner, P. J., & Morrell, N. W. (2010). Identification of a lysosomal pathway regulating degradation of the bone morphogenetic protein receptor type II. *Journal of Biological Chemistry*, 285(48), 37641–37649. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.132415>
- Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T., & Miyazono, K. (2001). Smurf1 Interacts with Transforming Growth Factor- β Type I Receptor through Smad7 and Induces Receptor Degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(16), 12477–12480. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100008200>
- Ebringer, A. (1989). The relationship between Klebsiella infection and ankylosing spondylitis. *Baillière's Clinical Rheumatology*, 3(2), 321–338. [https://doi.org/10.1016/S0950-3579\(89\)80024-X](https://doi.org/10.1016/S0950-3579(89)80024-X)

- Edlund, S., Landström, M., Heldin, C.-H., & Aspenström, P. (2002). Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA. *Molecular Biology of the Cell*, 13(3), 902–914. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-08-0398>
- Edwards, J. P., Thornton, A. M., & Shevach, E. M. (2014). Release of Active TGF- β 1 from the Latent TGF- β 1/GARP Complex on T Regulatory Cells Is Mediated by Integrin β 8. *The Journal of Immunology*, 193(6), 2843–2849. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401102>
- Ehrlich, M. (2016). Endocytosis and trafficking of BMP receptors: Regulatory mechanisms for fine-tuning the signaling response in different cellular contexts. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 27, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.12.008>
- Ehrlich, M., Gutman, O., Knaus, P., & Henis, Y. I. (2012). Oligomeric interactions of TGF- β and BMP receptors. *FEBS Letters*, 586(14), 1885–1896. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.01.040>
- Eichler, E. E., Flint, J., Gibson, G., Kong, A., Leal, S. M., Moore, J. H., & Nadeau, J. H. (2010). Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease. *Nature Reviews Genetics*, 11(6), 446–450. <https://doi.org/10.1038/nrg2809>
- El-Behi, M., Ciric, B., Dai, H., Yan, Y., Cullimore, M., Safavi, F., Zhang, G.-X., Dittel, B. N., & Rostami, A. (2011). The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nature Immunology*, 12(6), 568–575. <https://doi.org/10.1038/ni.2031>
- Ellinghaus, D., Jostins, L., Spain, S. L., Cortes, A., Bethune, J., Han, B., Park, Y. R., Raychaudhuri, S., Pouget, J. G., Hübenthal, M., Folseraas, T., Wang, Y., Esko, T., Metspalu, A., Westra, H.-J., Franke, L., Pers, T. H., Weersma, R. K., Collij, V., ... Franke, A. (2016). Analysis of five chronic inflammatory diseases identifies 27 new associations and highlights disease-specific patterns at shared loci. *Nature Genetics*, 48(5), 510–518. <https://doi.org/10.1038/ng.3528>
- Emery, A. E., & Lawrence, J. S. (1967). Genetics of ankylosing spondylitis. *Journal of Medical Genetics*, 4(4), 239–244. <https://doi.org/10.1136/jmg.4.4.239>
- Ermoza, K., Glatigny, S., Jah, N., Camilo, V., Mambu Mambueni, H., Araujo, L. M., Chiochia, G., & Breban, M. (2019). Tolerogenic XCR1 + dendritic cell population is dysregulated in HLA-B27 transgenic rat model of spondyloarthritis. *Arthritis Research and Therapy*, 21(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S13075-019-1827-9/FIGURES/6>
- Faivre, S. J., Santoro, A., Kelley, R. K., Merle, P., Gane, E., Douillard, J.-Y., Waldschmidt, D., Mulcahy, M. F., Costentin, C., Minguez, B., Papappicco, P., Gueorguieva, I., Cleverly, A., Desai, D., Lahn, M. M. F., Murray, N., Benhadji, K. A., Raymond, E., & Giannelli, G. (2013). Randomized dose comparison phase II study of the oral transforming growth factor-beta (TGF- β) receptor I kinase inhibitor LY2157299 monohydrate (LY) in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC). *Journal of Clinical Oncology*, 31(15_suppl), 4118–4118. https://doi.org/10.1200/JCO.2013.31.15_SUPPL.4118
- Fantini, M. C., Becker, C., Monteleone, G., Pallone, F., Galle, P. R., & Neurath, M. F. (2004). Cutting Edge: TGF- β Induces a Regulatory Phenotype in CD4+CD25- T Cells through Foxp3

- Induction and Down-Regulation of Smad7. *The Journal of Immunology*, 172(9), 5149–5153. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.9.5149>
- Feldtkeller, E., Khan, M. A., van der Heijde, D., van der Linden, S., & Braun, J. (2003). Age at disease onset and diagnosis delay in HLA-B27 negative vs. positive patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatology International*, 23(2), 61–66. <https://doi.org/10.1007/s00296-002-0237-4>
- Feng, X.-H., & Derynck, R. (1997). A kinase subdomain of transforming growth factor- β (TGF- β) type I receptor determines the TGF- β intracellular signaling specificity. *The EMBO Journal*, 16(13), 3912–3923. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.13.3912>
- Ferreira, M. A. R., Mangino, M., Brumme, C. J., Zhao, Z. Z., Medland, S. E., Wright, M. J., Nyholt, D. R., Gordon, S., Campbell, M., McEvoy, B. P., Henders, A., Evans, D. M., Lanchbury, J. S., Pereyra, F., Walker, B. D., Haas, D. W., Soranzo, N., Spector, T. D., de Bakker, P. I. W., ... Martin, N. G. (2010). Quantitative Trait Loci for CD4:CD8 Lymphocyte Ratio Are Associated with Risk of Type 1 Diabetes and HIV-1 Immune Control. *American Journal of Human Genetics*, 86(1), 88–92. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.12.008>
- Fert, I., Cagnard, N., Glatigny, S., Letourneur, F., Jacques, S., Smith, J. A., Colbert, R. A., Taurog, J. D., Chiochia, G., Araujo, L. M., & Breban, M. (2014). Reverse interferon signature is characteristic of antigen-presenting cells in human and rat spondyloarthritis. *Arthritis and Rheumatology*, 66(4), 841–851. <https://doi.org/10.1002/art.38318>
- Fert, I., Glatigny, S., Poulain, C., Satumtira, N., Dorris, M. L., Taurog, J. D., & Breban, M. (2008). Correlation between dendritic cell functional defect and spondylarthritis phenotypes in HLA-B27/HUMAN β 2-microglobulin-transgenic rat lines. *Arthritis & Rheumatism*, 58(11), 3425–3429. <https://doi.org/10.1002/art.24023>
- Fiori, J. L., Billings, P. C., Serrano De La Peña, L., Kaplan, F. S., & Shore, E. M. (2006). Dysregulation of the BMP-p38 MAPK signaling pathway in cells from patients with fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). *Journal of Bone and Mineral Research*, 21(6), 902–909. <https://doi.org/10.1359/jbmr.060215>
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature Immunology*, 4(4), 330–336. <https://doi.org/10.1038/ni904>
- Franke, A., McGovern, D. P. B., Barrett, J. C., Wang, K., Radford-Smith, G. L., Ahmad, T., Lees, C. W., Balschun, T., Lee, J., Roberts, R., Anderson, C. A., Bis, J. C., Bumpstead, S., Ellinghaus, D., Festen, E. M., Georges, M., Green, T., Haritunians, T., Jostins, L., ... Parkes, M. (2010). Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nature Genetics*, 42(12), 1118–1125. <https://doi.org/10.1038/ng.717>
- Fuentealba, L. C., Eivers, E., Ikeda, A., Hurtado, C., Kuroda, H., Pera, E. M., & De Robertis, E. M. (2007). Integrating Patterning Signals: Wnt/GSK3 Regulates the Duration of the BMP/Smad1 Signal. *Cell*, 131(5), 980–993. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.027>
- Gagliani, N., Vesely, M. C. A., Iseppon, A., Brockmann, L., Xu, H., Palm, N. W., de Zoete, M. R., Licona-Limón, P., Paiva, R. S., Ching, T., Weaver, C., Zi, X., Pan, X., Fan, R., Garmire, L. X., Cotton, M. J., Drier, Y., Bernstein, B., Geginat, J., ... Flavell, R. A. (2015). Th17 cells

- transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature*, 523(7559), 221–225. <https://doi.org/10.1038/nature14452>
- Gallatin, W. M., Weissman, I. L., & Butcher, E. C. (1983). A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature*, 304(5921), 30–34. <https://doi.org/10.1038/304030a0>
- Gamell, C., Osses, N., Bartrons, R., Rückle, T., Camps, M., Rosa, J. L., & Ventura, F. (2008). BMP2 induction of actin cytoskeleton reorganization and cell migration requires PI3-kinase and Cdc42 activity. *Journal of Cell Science*, 121(23), 3960–3970. <https://doi.org/10.1242/jcs.031286>
- Gao, S., Alarcón, C., Sapkota, G., Rahman, S., Chen, P.-Y., Goerner, N., Macias, M. J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Massagué, J. (2009). Ubiquitin Ligase Nedd4L Targets Activated Smad2/3 to Limit TGF- β Signaling. *Molecular Cell*, 36(3), 457–468. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.043>
- Garbi, N., Hämmerling, G., & Tanaka, S. (2007). Interaction of ERp57 and tapasin in the generation of MHC class I-peptide complexes. *Current Opinion in Immunology*, 19(1), 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2006.11.013>
- Garrett, S., Jenkinson, T., Kennedy, L. G., Whitelock, H., Gaisford, P., & Calin, A. (1994). A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *The Journal of Rheumatology*, 21(12), 2286–2291. https://europepmc.org/article/med/7699630?utm_medium=email&utm_source=transaction&client=bot
- Genetic Analysis of Psoriasis Consortium & the Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Strange, A., Capon, F., Spencer, C. C. A., Knight, J., Weale, M. E., Allen, M. H., Barton, A., Band, G., Bellenguez, C., Bergboer, J. G. M., Blackwell, J. M., Bramon, E., Bumpstead, S. J., Casas, J. P., Cork, M. J., Corvin, A., Deloukas, P., Dilthey, A., ... Trembath, R. C. (2010). A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1. *Nature Genetics*, 42(11), 985–990. <https://doi.org/10.1038/ng.694>
- Geng, J., Yu, S., Zhao, H., Sun, X., Li, X., Wang, P., Xiong, X., Hong, L., Xie, C., Gao, J., Shi, Y., Peng, J., Johnson, R. L., Xiao, N., Lu, L., Han, J., Zhou, D., & Chen, L. (2017). The transcriptional coactivator TAZ regulates reciprocal differentiation of T H 17 cells and T reg cells. *Nature Immunology*, 18(7), 800–812. <https://doi.org/10.1038/ni.3748>
- Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.-P., Tato, C. M., McGeachy, M. J., Konkel, J. E., Ramos, H. L., Wei, L., Davidson, T. S., Bouladoux, N., Grainger, J. R., Chen, Q., Kanno, Y., Watford, W. T., Sun, H.-W., Eberl, G., Shevach, E. M., Belkaid, Y., Cua, D. J., ... O’Shea, J. J. (2010). Generation of pathogenic TH17 cells in the absence of TGF- β signalling. *Nature*, 467(7318), 967–971. <https://doi.org/10.1038/nature09447>
- Glatigny, S., Fert, I., Blaton, M. A., Lories, R. J., Araujo, L. M., Chiocchia, G., & Breban, M. (2012). Proinflammatory Th17 cells are expanded and induced by dendritic cells in spondylarthritis-prone HLA-B27-transgenic rats. *Arthritis and Rheumatism*, 64(1), 110–120. <https://doi.org/10.1002/art.33321>
- Gocke, A. R., Cravens, P. D., Ben, L.-H., Hussain, R. Z., Northrop, S. C., Racke, M. K., & Lovett-Racke, A. E. (2007). T-bet Regulates the Fate of Th1 and Th17 Lymphocytes in

- Autoimmunity. *The Journal of Immunology*, 178(3), 1341–1348. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.3.1341>
- Graham, W., & Uchida, I. A. (1957). HEREDITY IN ANKYLOSING SPONDYLITIS. In *Ann. rheum. Dis.*
- Grandon, B., Rincheval-Arnold, A., Jah, N., Corsi, J. M., Araujo, L. M., Glatiny, S., Prevost, E., Roche, D., Chiocchia, G., Guénal, I., Gaumer, S., & Breban, M. (2019). HLA-B27 alters BMP/TGF β signalling in *Drosophila*, revealing putative pathogenic mechanism for spondyloarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 1–10. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-215832>
- Gray, A. M., & Mason, A. J. (1990). Requirement for Activin a and Transforming Growth Factor- β 1 Pro-Regions in Homodimer Assembly. *Science*, 247(4948), 1328–1330. <https://doi.org/10.1126/science.2315700>
- Greenwald, J., Groppe, J., Gray, P., Wiater, E., Kwiatkowski, W., Vale, W., & Choe, S. (2003). The BMP7/ActRII Extracellular Domain Complex Provides New Insights into the Cooperative Nature of Receptor Assembly. *Molecular Cell*, 11(3), 605–617. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00094-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00094-7)
- Hacquard-Bouder, C., Chimenti, M. S., Giquel, B., Donnadieu, E., Fert, I., Schmitt, A., André, C., & Breban, M. (2007). Alteration of antigen-independent immunologic synapse formation between dendritic cells from HLA-B27-transgenic rats and CD4+ T cells: Selective impairment of costimulatory molecule engagement by mature HLA-B27. *Arthritis and Rheumatism*, 56(5), 1478–1489. <https://doi.org/10.1002/art.22572>
- Hacquard-Bouder, C., Falgarone, G., Bosquet, A., Smaoui, F., Monnet, D., Ittah, M., & Breban, M. (2004). Defective Costimulatory Function Is a Striking Feature of Antigen-Presenting Cells in an HLA-B27-Transgenic Rat Model of Spondylarthropathy. *Arthritis and Rheumatism*, 50(5), 1624–1635. <https://doi.org/10.1002/art.20211>
- Hamidi, A., Song, J., Thakur, N., Itoh, S., Marcusson, A., Bergh, A., Heldin, C.-H., & Landström, † Maréne. (2017). *TGF-b promotes PI3K-AKT signaling and prostate cancer cell migration through the TRAF6-mediated ubiquitylation of p85a*. <https://www.science.org>
- Hamidi, A., Von Bulow, V., Hamidi, R., Winssinger, N., Barluenga, S., Heldin, C. H., & Landström, M. (2012). Polyubiquitination of transforming growth factor β (TGF β)- associated kinase 1 mediates nuclear factor- κ B activation in response to different inflammatory stimuli. *Journal of Biological Chemistry*, 287(1), 123–133. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.285122>
- Hammaker, D. (2003). Signal transduction networks in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 62(90002), 86ii–8689. https://doi.org/10.1136/ard.62.suppl_2.ii86
- Hammer, R. E., Maika, S. D., Richardson, J. A., Tang, J. P., & Taurog, J. D. (1990). Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human β 2m: An animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell*, 63(5), 1099–1112. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90512-D](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90512-D)
- Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M., & Weaver, C. T. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology*, 6(11), 1123–1132. <https://doi.org/10.1038/ni1254>

- Hata, A., Lagna, G., Massagué, J., & Hemmati-Brivanlou, A. (1998). Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes & Development*, *12*(2), 186–197. <https://doi.org/10.1101/gad.12.2.186>
- Hatsell, S. J., Idone, V., Wolken, D. M. A., Huang, L., Kim, H. J., Wang, L., Wen, X., Nannuru, K. C., Jimenez, J., Xie, L., Das, N., Makhoul, G., Chernomorsky, R., D'Ambrosio, D., Corpina, R. A., Schoenherr, C. J., Feeley, K., Yu, P. B., Yancopoulos, G. D., ... Economides, A. N. (2015). ACVR1 R206H receptor mutation causes fibrodysplasia ossificans progressiva by imparting responsiveness to activin A. *Science Translational Medicine*, *7*(303). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac4358>
- Haxhinasto, S., Mathis, D., & Benoist, C. (2008). The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4 +Foxp3+ cells. *Journal of Experimental Medicine*, *205*(3), 565–574. <https://doi.org/10.1084/jem.20071477>
- Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y.-Y., Grinnell, B. W., Richardson, M. A., Topper, J. N., Gimbrone, M. A., Wrana, J. L., & Falb, D. (1997). The MAD-Related Protein Smad7 Associates with the TGF β Receptor and Functions as an Antagonist of TGF β Signaling. *Cell*, *89*(7), 1165–1173. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80303-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80303-7)
- He, W., Dorn, D. C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Moore, M. A. S., & Massagué, J. (2006). Hematopoiesis Controlled by Distinct TIF1 γ and Smad4 Branches of the TGF β Pathway. *Cell*, *125*(5), 929–941. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.045>
- Heath, W. R., & Carbone, F. R. (2001). Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nature Reviews Immunology*, *1*(2), 126–134. <https://doi.org/10.1038/35100512>
- Heldin, C.-H., & Moustakas, A. (2016). Signaling Receptors for TGF- β Family Members. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *8*(8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022053>
- Herhaus, L., Al-Salihi, M. A., Dingwell, K. S., Cummins, T. D., Wasmus, L., Vogt, J., Ewan, R., Bruce, D., Macartney, T., Weidlich, S., Smith, J. C., & Sapkota, G. P. (2014). USP15 targets ALK3/BMPRI1A for deubiquitylation to enhance bone morphogenetic protein signalling. *Open Biology*, *4*(MAY). <https://doi.org/10.1098/rsob.140065>
- Hersh, A. H., Stecher, R. M., Solomon, W. M., Wolpaw, R., & Hauser, H. (1950). *Heredity in Ankylosing Spondylitis A Study of Fifty Families**.
- Hilt, Z. T., Maurya, P., Tesoro, L., Pariser, D. N., Ture, S. K., Cleary, S. J., Looney, M. R., McGrath, K. E., & Morrell, C. N. (2021). β 2M Signals Monocytes Through Non-Canonical TGF β Receptor Signal Transduction. *Circulation Research*, *128*(5), 655–669. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.317119>
- Hinck, A. P. (2012). Structural studies of the TGF- β s and their receptors - insights into evolution of the TGF- β superfamily. *FEBS Letters*, *586*(14), 1860–1870. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.05.028>
- Hinck, A. P., Archer, S. J., Qian, S. W., Roberts, A. B., Sporn, M. B., Weatherbee, J. A., Tsang, M. L.-S., Lucas, R., Zhang, B.-L., Wenker, J., & Torchia, D. A. (1996). Transforming Growth Factor β 1: Three-Dimensional Structure in Solution and Comparison with the X-ray Structure of Transforming Growth Factor β 2. *Biochemistry*, *35*(26), 8517–8534. <https://doi.org/10.1021/bi9604946>

- Horiguchi, K., Sakamoto, K., Koinuma, D., Semba, K., Inoue, A., Inoue, S., Fujii, H., Yamaguchi, A., Miyazawa, K., Miyazono, K., & Saitoh, M. (2012). TGF- β drives epithelial-mesenchymal transition through δ EF1-mediated downregulation of ESRP. *Oncogene*, *31*(26), 3190–3201. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.493>
- Hu, X., Li, J., Fu, M., Zhao, X., & Wang, W. (2021). The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *6*(1), 402. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00791-1>
- Huber, S., Schrader, J., Fritz, G., Presser, K., Schmitt, S., Waisman, A., Lüth, S., Blessing, M., Herkel, J., & Schramm, C. (2008). P38 MAP kinase signaling is required for the conversion of CD4+CD25⁻ T cells into iTreg. *PLoS ONE*, *3*(10), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003302>
- Huber, S., Schramm, C., Lehr, H. A., Mann, A., Schmitt, S., Becker, C., Protschka, M., Galle, P. R., Neurath, M. F., & Blessing, M. (2004). Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *173*(11), 6526–6531. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.11.6526>
- Huber, S., Stahl, F. R., Schrader, J., Lüth, S., Presser, K., Carambia, A., Flavell, R. A., Werner, S., Blessing, M., Herkel, J., & Schramm, C. (2009). Activin a promotes the TGF-beta-induced conversion of CD4+CD25⁻ T cells into Foxp3⁺ induced regulatory T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *182*(8), 4633–4640. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803143>
- Hukuda, S., Minami, M., Saito, T., Mitsui, H., Matsui, N., Komatsubara, Y., Makino, H., Shibata, T., Shingu, M., Sakou, T., & Shichikawa, K. (2001). Spondyloarthropathies in Japan: nationwide questionnaire survey performed by the Japan Ankylosing Spondylitis Society. *The Journal of Rheumatology*, *28*(3), 554–559. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11296958>
- Hulpke, S., & Tampé, R. (2013). The MHC I loading complex: A multitasking machinery in adaptive immunity. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 38, Issue 8, pp. 412–420). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.06.003>
- Hülsmeier, M., Fiorillo, M. T., Bettosini, F., Sorrentino, R., Saenger, W., Ziegler, A., & Uchanska-Ziegler, B. (2004). Dual, HLA-B27 Subtype-dependent Conformation of a Self-peptide. *Journal of Experimental Medicine*, *199*(2), 271–281. <https://doi.org/10.1084/jem.20031690>
- Huminięcki, L., Goldovsky, L., Freilich, S., Moustakas, A., Ouzounis, C., & Heldin, C. H. (2009). Emergence, development and diversification of the TGF- signalling pathway within the animal kingdom. *BMC Evolutionary Biology*, *9*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-28>
- Huse, M., Chen, Y.-G., Massagué, J., & Kuriyan, J. (1999). Crystal Structure of the Cytoplasmic Domain of the Type I TGF β Receptor in Complex with FKBP12. *Cell*, *96*(3), 425–436. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80555-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80555-3)
- Huse, M., Muir, T. W., Xu, L., Chen, Y.-G., Kuriyan, J., & Massagué, J. (2001). The TGF β Receptor Activation Process. *Molecular Cell*, *8*(3), 671–682. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00332-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00332-X)

- Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J., Kawabata, M., & Miyazono, K. (1997). Smad6 inhibits signalling by the TGF- β superfamily. *Nature*, *389*(6651), 622–626. <https://doi.org/10.1038/39355>
- Ishida, W., Hamamoto, T., Kusanagi, K., Yagi, K., Kawabata, M., Takehara, K., Sampath, T. K., Kato, M., & Miyazono, K. (2000). Smad6 Is a Smad1/5-induced Smad Inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(9), 6075–6079. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.9.6075>
- Ishisaki, A., Yamato, K., Nakao, A., Nonaka, K., Ohguchi, M., ten Dijke, P., & Nishihara, T. (1998). Smad7 Is an Activin-inducible Inhibitor of Activin-induced Growth Arrest and Apoptosis in Mouse B Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(38), 24293–24296. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.38.24293>
- Itoh, Y., Saitoh, M., & Miyazawa, K. (2018). Smad3-STAT3 crosstalk in pathophysiological contexts. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *50*(1), 82–90. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmx118>
- Ivanov, I. I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., Cua, D. J., & Littman, D. R. (2006). The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. *Cell*, *126*(6), 1121–1133. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.035>
- Jackson, M. R., Song, E. S., Yang, Y., & Peterson, P. A. (1992). Empty and peptide-containing conformers of class I major histocompatibility complex molecules expressed in *Drosophila melanogaster* cells (antigen presentation/peptide binding/intracellular transport/cytotoxic T cell). In *Immunology* (Vol. 89).
- Jacobs, J. H., & Rose, F. C. (1954). *THE FAMILIAL OCCURRENCE OF ANKYLOSING SPONDYLITIS*.
- Jacques, P., Van Praet, L., Carron, P., Van den Bosch, F., & Elewaut, D. (2012). Pathophysiology and Role of the Gastrointestinal System in Spondyloarthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, *38*(3), 569–582. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2012.08.012>
- Jadidi-Niaragh, F., & Mirshafiey, A. (2012). The deviated balance between regulatory T cell and Th17 in autoimmunity. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, *34*(5), 727–739. <https://doi.org/10.3109/08923973.2011.619987>
- Jaffe, A. B., & Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *21*, 247–269. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721>
- Jakowlew, S. B. (2006). Transforming growth factor- β in cancer and metastasis. In *Cancer and Metastasis Reviews* (Vol. 25, Issue 3, pp. 435–457). <https://doi.org/10.1007/s10555-006-9006-2>
- Janakiraman, H., House, R. P., Gangaraju, V. K., Diehl, J. A., Howe, P. H., & Palanisamy, V. (2018). The Long (lncRNA) and Short (miRNA) of It: TGF β -Mediated Control of RNA-Binding Proteins and Noncoding RNAs. *Molecular Cancer Research*, *16*(4), 567–579. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-17-0547>
- Janssens, K., Ten Dijke, P., Ralston, S. H., Bergmann, C., & Van Hul, W. (2003). Transforming growth factor- β 1 mutations in Camurati-Engelmann disease lead to increased signaling by altering either activation or secretion of the mutant protein. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(9), 7718–7724. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208857200>

- Jenkins, G. (2008). The role of proteases in transforming growth factor-beta activation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(6–7), 1068–1078. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.11.026>
- Johnson, D. W., Berg, J. N., Baldwin, M. A., Gallione, C. J., Marondel, I., Yoon, S.-J., Stenzel, T. T., Speer, M., Pericak-Vance, M. A., Diamond, A., Guttmacher, A. E., Jackson, C. E., Attisano, L., Kucherlapati, R., Porteous, M. E. M., & Marchuk, D. A. (1996). Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nature Genetics*, 13(2), 189–195. <https://doi.org/10.1038/ng0696-189>
- Jouhault, Q. (2017). *Modulation de la balance Th17/Treg par l'IL-27 et ICOS dans un modèle animal de spondyloarthrite.*
- Jouhault, Q., Cherqaoui, B., Jobart-Malfait, A., Glatigny, S., Lauraine, M., Hulot, A., Morelle, G., Hagege, B., Ermoza, K., El Marjou, A., Izac, B., Saintpierre, B., Letourneur, F., Rémy, S., Anegon, I., Boissier, M.-C., Chiochia, G., Breban, M., & Araujo, L. M. (2023). Interleukin 27 is a novel cytokine with anti-inflammatory effects against spondyloarthritis through the suppression of Th17 responses. *Frontiers in Immunology*, 13, 1072420. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1072420>
- Kaartinen, V., Voncken, J. W., Shuler, C., Warburton, D., Bu, D., Heisterkamp, N., & Groffen, J. (1995). Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF- β 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nature Genetics*, 11(4), 415–421. <https://doi.org/10.1038/ng1295-415>
- Kang, H., Louie, J., Weisman, A., Sheu-Gruttadauria, J., Davis-Dusenbery, B. N., Lagna, G., & Hata, A. (2012). Inhibition of microRNA-302 (miR-302) by Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4) facilitates the BMP signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 287(46), 38656–38664. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.390898>
- Kang, J. S., Alliston, T., Delston, R., & Derynck, R. (2005). Repression of Runx2 function by TGF- β through recruitment of class II histone deacetylases by Smad3. *EMBO Journal*, 24(14), 2543–2555. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600729>
- Kang, J. S., Saunier, E. F., Akhurst, R. J., & Derynck, R. (2008). The type I TGF- β receptor is covalently modified and regulated by sumoylation. *Nature Cell Biology*, 10(6), 654–664. <https://doi.org/10.1038/ncb1728>
- Kang, Y., Chen, C.-R., & Massagué, J. (2003). A Self-Enabling TGF β Response Coupled to Stress Signaling. *Molecular Cell*, 11(4), 915–926. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00109-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00109-6)
- Karmaus, P. W. F., Chen, X., Lim, S. A., Herrada, A. A., Nguyen, T.-L. M., Xu, B., Dhungana, Y., Rankin, S., Chen, W., Rosencrance, C., Yang, K., Fan, Y., Cheng, Y., Easton, J., Neale, G., Vogel, P., & Chi, H. (2019). Metabolic heterogeneity underlies reciprocal fates of TH17 cell stemness and plasticity. *Nature*, 565(7737), 101–105. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0806-7>
- Katagiri, T., Tsukamoto, S., & Kuratani, M. (2021). Accumulated Knowledge of Activin Receptor-Like Kinase 2 (ALK2)/Activin A Receptor, Type 1 (ACVR1) as a Target for Human Disorders. *Biomedicines*, 9(7), 736. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9070736>
- Kavsak, P., Rasmussen, R. K., Causing, C. G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G. H., & Wrana, J. L. (2000). Smad7 Binds to Smurf2 to Form an E3 Ubiquitin Ligase that Targets the TGF β

- Receptor for Degradation. *Molecular Cell*, 6(6), 1365–1375. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00134-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00134-9)
- Kawabata, M., Inoue, H., Hanyu, A., Imamura, T., & Miyazono, K. (1998). Smad proteins exist as monomers in vivo and undergo homo- and hetero-oligomerization upon activation by serine/threonine kinase receptors. In *The EMBO Journal* (Vol. 17, Issue 14).
- Khare, S. D., Luthra, H. S., & David, C. S. (1995). *Spontaneous Inflammatory Arthritis in HLA-B27 Transgenic Mice Lacking beta-2-Microglobulin: A Model of Human Spondyloarthropathies*.
- Kim, S. Il, Kwak, J. H., Na, H.-J., Kim, J. K., Ding, Y., & Choi, M. E. (2009). Transforming growth factor-beta (TGF-beta1) activates TAK1 via TAB1-mediated autophosphorylation, independent of TGF-beta receptor kinase activity in mesangial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(33), 22285–22296. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.007146>
- Kim, S. K., Henen, M. A., & Hinck, A. P. (2019). Structural biology of betaglycan and endoglin, membrane-bound co-receptors of the TGF-beta family. *Experimental Biology and Medicine*, 244(17), 1547–1558. <https://doi.org/10.1177/1535370219881160>
- Kingsbury, D. J., Mear, J. P., Witte, D. P., Taurog, J. D., Roopenian, D. C., & Colbert, R. A. (2000). Development of spontaneous arthritis in β 2-microglobulin-deficient mice without expression of HLA-B27: Association with deficiency of endogenous major histocompatibility complex class I expression. *Arthritis & Rheumatism*, 43(10), 2290–2296. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200010\)43:10<2290::AID-ANR17>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200010)43:10<2290::AID-ANR17>3.0.CO;2-6)
- Kirsch, T. (2000). BMP-2 antagonists emerge from alterations in the low-affinity binding epitope for receptor BMPR-II. *The EMBO Journal*, 19(13), 3314–3324. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.13.3314>
- Koli, K. M., & Arteaga, C. L. (1997). Processing of the Transforming Growth Factor β Type I and II Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 272(10), 6423–6427. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.10.6423>
- Konkel, J. E., Jin, W., Abbatiello, B., Grainger, J. R., & Chen, W. (2014). Thymocyte apoptosis drives the intrathymic generation of regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(4). <https://doi.org/10.1073/pnas.1320319111>
- Konstantinidis, G., Moustakas, A., & Stournaras, C. (2011). Regulation of Myosin Light Chain Function by BMP Signaling Controls Actin Cytoskeleton Remodeling. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 28(5), 1031–1044. <https://doi.org/10.1159/000335790>
- Kontoyiannis, D., Pasparakis, M., Pizarro, T. T., Cominelli, F., & Kollias, G. (1999). Impaired On/Off Regulation of TNF Biosynthesis in Mice Lacking TNF AU-Rich Elements. *Immunity*, 10(3), 387–398. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80038-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80038-2)
- Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jäger, A., Strom, T. B., Oukka, M., & Kuchroo, V. K. (2007). IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory TH17 cells. *Nature*, 448(7152), 484–487. <https://doi.org/10.1038/nature05970>
- Kuczma, M., Kurczewska, A., & Kraj, P. (2014). Modulation of bone morphogenic protein signaling in T-cells for cancer immunotherapy. *Journal of Immunotoxicology*, 11(4), 319–327. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2013.864736>
- Kulkarni, A. B., Huh, C. G., Becker, D., Geiser, A., Lyght, M., Flanders, K. C., Roberts, A. B., Sporn, M. B., Ward, J. M., & Karlsson, S. (1993). Transforming growth factor beta 1 null mutation

- in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(2), 770–774. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.2.770>
- Labbé, E., Letamendia, A., & Attisano, L. (2000). Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor 1/T cell-specific factor mediates cooperative signaling by the transforming growth factor- β and Wnt pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(15), 8358–8363. <https://doi.org/10.1073/pnas.150152697>
- Lafyatis, R. (2014). Transforming growth factor β --at the centre of systemic sclerosis. *Nature Reviews. Rheumatology*, 10(12), 706–719. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.137>
- Lai, C.-F., & Cheng, S.-L. (2002). Signal Transductions Induced by Bone Morphogenetic Protein-2 and Transforming Growth Factor- β in Normal Human Osteoblastic Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(18), 15514–15522. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200794200>
- Laigle, V., Dingli, F., Amhaz, S., Perron, T., Chouchène, M., Colasse, S., Petit, I., Pouillet, P., Loew, D., Prunier, C., & Levy, L. (2021). Quantitative Ubiquitylome Analysis Reveals the Specificity of RNF111/Arkadia E3 Ubiquitin Ligase for its Degradative Substrates SKI and SKIL/SnoN in TGF- β Signaling Pathway. *Molecular & Cellular Proteomics*, 20, 100173. <https://doi.org/10.1016/j.mcpro.2021.100173>
- Laiho, M., Weis, F. M., Boyd, F. T., Ignatz, R. A., & Massagué, J. (1991). Responsiveness to transforming growth factor-beta (TGF-beta) restored by genetic complementation between cells defective in TGF-beta receptors I and II. *Journal of Biological Chemistry*, 266(14), 9108–9112. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)31558-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)31558-8)
- Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J. D., McClanahan, T., Kastelein, R. A., & Cua, D. J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(2), 233–240. <https://doi.org/10.1084/jem.20041257>
- Lavoie, H., Gagnon, J., & Therrien, M. (2020). ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(10), 607–632. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0255-7>
- Lawler, S., Feng, X. H., Chen, R. H., Maruoka, E. M., Turck, C. W., Griswold-Prenner, I., & Derynck, R. (1997). The type II transforming growth factor- β receptor autophosphorylates not only on serine and threonine but also on tyrosine residues. *Journal of Biological Chemistry*, 272(23), 14850–14859. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.23.14850>
- Lee, J.-Y., Hall, J. A., Kroehling, L., Wu, L., Najjar, T., Nguyen, H. H., Lin, W.-Y., Yeung, S. T., Silva, H. M., Li, D., Hine, A., Loke, P., Hudesman, D., Martin, J. C., Kenigsberg, E., Merad, M., Khanna, K. M., & Littman, D. R. (2020). Serum Amyloid A Proteins Induce Pathogenic Th17 Cells and Promote Inflammatory Disease. *Cell*, 180(1), 79-91.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.11.026>
- Lee, M. K., Pardoux, C., Hall, M. C., Lee, P. S., Warburton, D., Qing, J., Smith, S. M., & Derynck, R. (2007). TGF- β activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *The EMBO Journal*, 26(17), 3957–3967. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601818>
- Lesslauer, W., Koning, F., Ottenhoff, T., Giphart, M., Goulmy, E., & Van Rood, J. J. (1986). T90/44 (9.3 antigen). A cell surface molecule with a function in human T cell activation.

- European Journal of Immunology*, 16(10), 1289–1296.
<https://doi.org/10.1002/eji.1830161017>
- Levy, L., & Hill, C. S. (2005). Smad4 Dependency Defines Two Classes of Transforming Growth Factor β (TGF- β) Target Genes and Distinguishes TGF- β -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition from Its Antiproliferative and Migratory Responses. *Molecular and Cellular Biology*, 25(18), 8108–8125. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.18.8108-8125.2005>
- Li, B., Huang, L., Lv, P., Li, X., Liu, G., Chen, Y., Wang, Z., Qian, X., Shen, Y., Li, Y., & Fang, W. (2020). The role of Th17 cells in psoriasis. *Immunologic Research*, 68(5), 296–309. <https://doi.org/10.1007/s12026-020-09149-1>
- Li, M. O., & Flavell, R. A. (2008). TGF- β : A Master of All T Cell Trades. *Cell*, 134(3), 392–404. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.025>
- Li, M. O., Wan, Y. Y., & Flavell, R. A. (2007). T Cell-Produced Transforming Growth Factor- β 1 Controls T Cell Tolerance and Regulates Th1- and Th17-Cell Differentiation. *Immunity*, 26(5), 579–591. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.03.014>
- Ling, N., Ying, S.-Y., Ueno, N., Shimasaki, S., Esch, F., Hotta, M., & Guillemin, R. (1986). Pituitary FSH is released by a heterodimer of the β -subunits from the two forms of inhibin. *Nature*, 321(6072), 779–782. <https://doi.org/10.1038/321779a0>
- Liu, S., Ji, W., Lu, J., Tang, X., Guo, Y., Ji, M., Xu, T., Gu, W., Kong, D., Shen, Q., Wang, D., Lv, X., Wang, J., Zhu, T., Zhu, Y., Liu, P., Su, J., Wang, L., Li, Y., ... Zhou, W. (2020). Discovery of Potential Serum Protein Biomarkers in Ankylosing Spondylitis Using Tandem Mass Tag-Based Quantitative Proteomics. *Journal of Proteome Research*, 19(2), 864–872. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00676>
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S.-C. (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2(1), 17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- Liu, Y., Liu, H., Meyer, C., Li, J., Nadalin, S., Köningrainer, A., Weng, H., Dooley, S., & Ten Dijke, P. (2013). Transforming growth factor- β (TGF- β)-mediated connective tissue growth factor (CTGF) expression in hepatic stellate cells requires Stat3 signaling activation. *Journal of Biological Chemistry*, 288(42), 30708–30719. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.478685>
- Lo, R. S., Chen, Y. G., Shi, Y., Pavletich, N. P., & Massagué, J. (1998). The L3 loop: A structural motif determining specific interactions between SMAD proteins and TGF- β receptors. *EMBO Journal*, 17(4), 996–1005. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.4.996>
- Lobry, C., & Weil, R. (2007). Mécanismes régulateurs de la voie NF- κ B dans les lymphocytes T. *Médecine/Sciences*, 23(10), 857–861. <https://doi.org/10.1051/medsci/20072310857>
- Loh, H.-Y., Norman, B. P., Lai, K.-S., Cheng, W.-H., Nik Abd Rahman, N. M. A., Mohamed Alitheen, N. B., & Osman, M. A. (2023). Post-Transcriptional Regulatory Crosstalk between MicroRNAs and Canonical TGF- β /BMP Signalling Cascades on Osteoblast Lineage: A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7). <https://doi.org/10.3390/ijms24076423>
- López-Casillas, F., Wrana, J. L., & Massagué, J. (1993). Betaglycan presents ligand to the TGF β signaling receptor. *Cell*, 73(7), 1435–1444. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90368-Z](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90368-Z)

- López-Larrea, C., González, S., & Martínez-Borra, J. (1998). The role of HLA-B27 polymorphism and molecular mimicry in spondylarthropathy. *Molecular Medicine Today*, 4(12), 540–549. [https://doi.org/10.1016/S1357-4310\(98\)01375-6](https://doi.org/10.1016/S1357-4310(98)01375-6)
- Lories, R. J. U., Derese, I., & Luyten, F. P. (2005). Modulation of bone morphogenetic protein signaling inhibits the onset and progression of ankylosing enthesitis. *Journal of Clinical Investigation*, 115(6), 1571–1579. <https://doi.org/10.1172/JCI23738>
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., & Xia, B. (2012). CD4 + T Cells: Differentiation and Functions. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2012/925135>
- Luo, K., & Lodish, H. F. (1997). Positive and negative regulation of type II TGF-beta receptor signal transduction by autophosphorylation on multiple serine residues. *The EMBO Journal*, 16(8), 1970–1981. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.8.1970>
- Luo, W., Xia, T., Xu, L., Chen, Y. G., & Fang, X. (2014). Visualization of the post-Golgi vesicle-mediated transportation of TGF-β receptor II by quasi-TIRFM. *Journal of Biophotonics*, 7(10), 788–798. <https://doi.org/10.1002/jbio.201300020>
- Luo, X., Zhang, Q., Liu, V., Xia, Z., Pothoven, K. L., & Lee, C. (2008). Cutting edge: TGF-beta-induced expression of Foxp3 in T cells is mediated through inactivation of ERK. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(5), 2757–2761. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.5.2757>
- Lyons, R. M., Keski-Oja, J., & Moses, H. L. (1988). Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *Journal of Cell Biology*, 106(5), 1659–1665. <https://doi.org/10.1083/jcb.106.5.1659>
- Macaulay, I. C., Tijssen, M. R., Thijssen-Timmer, D. C., Gusnanto, A., Steward, M., Burns, P., Langford, C. F., Ellis, P. D., Dudbridge, F., Zwaginga, J.-J., Watkins, N. A., van der Schoot, C. E., & Ouwehand, W. H. (2007). Comparative gene expression profiling of in vitro differentiated megakaryocytes and erythroblasts identifies novel activatory and inhibitory platelet membrane proteins. *Blood*, 109(8), 3260–3269. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-07-036269>
- Maeda, H., Wada, N., Tomokiyo, A., Monnouchi, S., & Akamine, A. (2013). Prospective potency of TGF-β1 on maintenance and regeneration of periodontal tissue. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 304, pp. 283–367). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407696-9.00006-3>
- Maksymowych, W. P. (2015). Biomarkers in axial spondyloarthritis. *Current Opinion in Rheumatology*, 27(4), 343–348. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000180>
- Mallart, C. (2022). *Régulation et rôles de la voie JAK-STAT au cours de l'ovogenèse chez la drosophile*.
- Mangan, P. R., Harrington, L. E., O'Quinn, D. B., Helms, W. S., Bullard, D. C., Elson, C. O., Hatton, R. D., Wahl, S. M., Schoeb, T. R., & Weaver, C. T. (2006). Transforming growth factor-β induces development of the TH17 lineage. *Nature*, 441(7090), 231–234. <https://doi.org/10.1038/nature04754>
- Maric, I., Kucic, N., Turk Wensveen, T., Smoljan, I., Grahovac, B., Zoricic Cvek, S., Celic, T., Bobinac, D., & Vukicevic, S. (2012). BMP signaling in rats with TNBS-induced colitis

- following BMP7 therapy. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 302(10), G1151–G1162. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00244.2011>
- Marie, J. C., Letterio, J. J., Gavin, M., & Rudensky, A. Y. (2005). TGF- β 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4 +CD25+ regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 201(7), 1061–1067. <https://doi.org/10.1084/jem.20042276>
- Marie, J. C., Liggitt, D., & Rudensky, A. Y. (2006). Cellular Mechanisms of Fatal Early-Onset Autoimmunity in Mice with the T Cell-Specific Targeting of Transforming Growth Factor- β Receptor. *Immunity*, 25(3), 441–454. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.07.012>
- Martínez, V. G., Sacedón, R., Hidalgo, L., Valencia, J., Fernández-Sevilla, L. M., Hernández-López, C., Vicente, A., & Varas, A. (2015). The BMP pathway participates in human naive CD4+ T cell activation and homeostasis. *PLoS ONE*, 10(6), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131453>
- Martin-Malpartida, P., Batet, M., Kaczmarek, Z., Freier, R., Gomes, T., Aragón, E., Zou, Y., Wang, Q., Xi, Q., Ruiz, L., Veá, A., Márquez, J. A., Massagué, J., & Macías, M. J. (2017). Structural basis for genome wide recognition of 5-bp GC motifs by SMAD transcription factors. *Nature Communications*, 8(1), 2070. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02054-6>
- Massagué, J. (1985). Subunit structure of a high-affinity receptor for type beta-transforming growth factor. Evidence for a disulfide-linked glycosylated receptor complex. *Journal of Biological Chemistry*, 260(11), 7059–7066. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)88887-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)88887-1)
- Massagué, J. (2000). How cells read TGF- β signals. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 1(3), 169–178. <https://doi.org/10.1038/35043051>
- Massagué, J. (2012). TGF β signalling in context. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(10), 616–630. <https://doi.org/10.1038/nrm3434>
- Massam-Wu, T., Chiu, M., Choudhury, R., Chaudhry, S. S., Baldwin, A. K., McGovern, A., Baldock, C., Shuttleworth, C. A., & Kielty, C. M. (2010). Assembly of fibrillin microfibrils governs extracellular deposition of latent TGF β . *Journal of Cell Science*, 123(17), 3006–3018. <https://doi.org/10.1242/jcs.073437>
- Mathieu, A., Paladini, F., Vacca, A., Cauli, A., Fiorillo, M. T., & Sorrentino, R. (2009). The interplay between the geographic distribution of HLA-B27 alleles and their role in infectious and autoimmune diseases: a unifying hypothesis. *Autoimmunity Reviews*, 8(5), 420–425. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2009.01.003>
- Matthias, J., Heink, S., Picard, F., Zeiträg, J., Kolz, A., Chao, Y.-Y., Soll, D., de Almeida, G. P., Glasmacher, E., Jacobsen, I. D., Riedel, T., Peters, A., Floess, S., Huehn, J., Baumjohann, D., Huber, M., Korn, T., & Zielinski, C. E. (2020). Salt generates antiinflammatory Th17 cells but amplifies pathogenicity in proinflammatory cytokine microenvironments. *The Journal of Clinical Investigation*, 130(9), 4587–4600. <https://doi.org/10.1172/JCI137786>
- May, E., Dorris, M. L., Satumtira, N., Iqbal, I., Rehman, M. I., Lightfoot, E., & Taurog, J. D. (2003). CD8 $\alpha\beta$ T Cells Are Not Essential to the Pathogenesis of Arthritis or Colitis in HLA-B27 Transgenic Rats. *The Journal of Immunology*, 170(2), 1099–1105. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.2.1099>

- McAllister, K. A., Grogg, K. M., Johnson, D. W., Gallione, C. J., Baldwin, M. A., Jackson, C. E., Helmbold, E. A., Markel, D. S., McKinnon, W. C., Murrel, J., McCormick, M. K., Pericak-Vance, M. A., Heutink, P., Oostra, B. A., Haitjema, T., Westerman, C. J. J., Porteous, M. E., Guttmacher, A. E., Letarte, M., & Marchuk, D. A. (1994). Endoglin, a TGF- β binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nature Genetics*, *8*(4), 345–351. <https://doi.org/10.1038/ng1294-345>
- McCarron, M. J., Irla, M., Sergé, A., Soudja, S. M., & Marie, J. C. (2019). Transforming Growth Factor-beta signaling in $\alpha\beta$ thymocytes promotes negative selection. *Nature Communications*, *10*(1), 5690. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13456-z>
- McCarron, M. J., & Marie, J. C. (2014). TGF- β prevents T follicular helper cell accumulation and B cell autoreactivity. *The Journal of Clinical Investigation*, *124*(10), 4375–4386. <https://doi.org/10.1172/JCI76179>
- McGeachy, M. J., Bak-Jensen, K. S., Chen, Y., Tato, C. M., Blumenschein, W., McClanahan, T., & Cua, D. J. (2007). TGF- β and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain TH-17 cell-mediated pathology. *Nature Immunology*, *8*(12), 1390–1397. <https://doi.org/10.1038/ni1539>
- Mear, J. P., Schreiber, K. L., Münz, C., Zhu, X., Stevanović, S., Rammensee, H. G., Rowland-Jones, S. L., & Colbert, R. A. (1999). Misfolding of HLA-B27 as a result of its B pocket suggests a novel mechanism for its role in susceptibility to spondyloarthropathies. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *163*(12), 6665–6670.
- Meyer, C., Godoy, P., Bachmann, A., Liu, Y., Barzan, D., Ilkavets, I., Maier, P., Herskind, C., Hengstler, J. G., & Dooley, S. (2011). Distinct role of endocytosis for Smad and non-Smad TGF- β signaling regulation in hepatocytes. *Journal of Hepatology*, *55*(2), 369–378. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.11.027>
- Miller, M. J., Hejazi, A. S., Wei, S. H., Cahalan, M. D., & Parker, I. (2004). T cell repertoire scanning is promoted by dynamic dendritic cell behavior and random T cell motility in the lymph node. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(4), 998–1003. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306407101>
- Miyazawa, K., Shinozaki, M., Hara, T., Furuya, T., & Miyazono, K. (2002). Two major Smad pathways in TGF- β superfamily signalling. *Genes to Cells*, *7*(12), 1191–1204. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2002.00599.x>
- Miyazono, K. (2000). Positive and negative regulation of TGF-beta signaling. *Journal of Cell Science*, *113*(7), 1101–1109. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.7.1101>
- Moll, J. M. H., Haslock, I., Macrae, I. F., & Wright, V. (1974). Associations between ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, reiter's disease, the intestinal arthropathies, and behcet's syndrome. *Medicine (United States)*, *53*(5), 343–364. <https://doi.org/10.1097/00005792-197409000-00002>
- Morianos, I., Trochoutsou, A. I., Papadopoulou, G., Semitekolou, M., Banos, A., Konstantopoulos, D., Manousopoulou, A., Kapasa, M., Wei, P., Lomenick, B., Belaidi, E., Kalamatas, T., Karageorgiou, K., Doskas, T., Sallusto, F., Pan, F., Garbis, S. D., Quintana, F. J., & Xanthou, G. (2020). Activin-A limits Th17 pathogenicity and autoimmune neuroinflammation via CD39 and CD73 ectonucleotidases and Hif1- α -dependent

- pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(22), 12269–12280. <https://doi.org/10.1073/pnas.1918196117>
- Morikawa, M., Derynck, R., & Miyazono, K. (2016). TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021873>
- Morikawa, M., Koinuma, D., Tsutsumi, S., Vasilaki, E., Kanki, Y., Heldin, C.-H., Aburatani, H., & Miyazono, K. (2011). ChIP-seq reveals cell type-specific binding patterns of BMP-specific Smads and a novel binding motif. *Nucleic Acids Research*, 39(20), 8712–8727. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr572>
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., & Coffman, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology*, 136(7), 2348–2357. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.136.7.2348>
- Mosmann, T. R., & Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Annual Review of Immunology*, 7(1), 145–173. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.07.040189.001045>
- Mu, D., Cambier, S., Fjellbirkeland, L., Baron, J. L., Munger, J. S., Kawakatsu, H., Sheppard, D., Broaddus, V. C., & Nishimura, S. L. (2002). The integrin $\alpha\beta 8$ mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF- $\beta 1$. *The Journal of Cell Biology*, 157(3), 493–507. <https://doi.org/10.1083/jcb.200109100>
- Mu, Y., Sundar, R., Thakur, N., Ekman, M., Gudey, S. K., Yakymovych, M., Hermansson, A., Dimitriou, H., Bengoechea-Alonso, M. T., Ericsson, J., Heldin, C.-H., & Landström, M. (2011). TRAF6 ubiquitinates TGF β type I receptor to promote its cleavage and nuclear translocation in cancer. *Nature Communications*, 2(1), 330. <https://doi.org/10.1038/ncomms1332>
- Mulder, K. M., & Morris, S. L. (1992). Activation of p21(ras) by transforming growth factor β in epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 267(8), 5029–5031. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)42722-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)42722-6)
- Munger, J. S., Huang, X., Kawakatsu, H., Griffiths, M. J. D., Dalton, S. L., Wu, J., Pittet, J.-F., Kaminski, N., Garat, C., Matthay, M. A., Rifkin, D. B., & Sheppard, D. (1999). A Mechanism for Regulating Pulmonary Inflammation and Fibrosis: The Integrin $\alpha\beta 6$ Binds and Activates Latent TGF $\beta 1$. *Cell*, 96(3), 319–328. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80545-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80545-0)
- Murakami, G., Watabe, T., Takaoka, K., Miyazono, K., & Imamura, T. (2003). Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Molecular Biology of the Cell*, 14(7), 2809–2817. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-07-0441>
- Murphy, S. J., Doré, J. J. E., Edens, M., Coffey, R. J., Barnard, J. A., Mitchell, H., Wilkes, M., & Leof, E. B. (2004). Differential Trafficking of Transforming Growth Factor-Receptors and Ligand in Polarized Epithelial Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 15, 2853–2862. <https://doi.org/10.1091/mbc.E04>
- Muthusamy, B. P., Budi, E. H., Katsuno, Y., Lee, M. K., Smith, S. M., Mirza, A. M., Akhurst, R. J., & Derynck, R. (2015). ShcA Protects against Epithelial-Mesenchymal Transition through

- Compartmentalized Inhibition of TGF- β -Induced Smad Activation. *PLoS Biology*, 13(12), e1002325. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002325>
- Na, K.-S., Kim, T.-H., & Inman, R. D. (2006). Biomarkers in Spondyloarthritis. *Current Rheumatology Reports*.
- Nagai, S., Kurebayashi, Y., & Koyasu, S. (2013). Role of PI3K/Akt and mTOR complexes in Th17 cell differentiation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1280(1), 30–34. <https://doi.org/10.1111/nyas.12059>
- Nagarajan, R. P., Zhang, J., Li, W., & Chen, Y. (1999). Regulation of Smad7 Promoter by Direct Association with Smad3 and Smad4. *Journal of Biological Chemistry*, 274(47), 33412–33418. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.47.33412>
- Nakao, A., Afrakhte, M., Morn, A., Nakayama, T., Christian, J. L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N.-E., Heldin, C.-H., & Dijke, P. ten. (1997). Identification of Smad7, a TGF β -inducible antagonist of TGF- β signalling. *Nature*, 389(6651), 631–635. <https://doi.org/10.1038/39369>
- Neuzillet, C., Tijeras-Raballand, A., Cohen, R., Cros, J., Faivre, S., Raymond, E., & de Gramont, A. (2015). Targeting the TGF β pathway for cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 147, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.001>
- Nohe, A., Hassel, S., Ehrlich, M., Neubauer, F., Sebald, W., Henis, Y. I., & Knaus, P. (2002). The Mode of Bone Morphogenetic Protein (BMP) Receptor Oligomerization Determines Different BMP-2 Signaling Pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 277(7), 5330–5338. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102750200>
- Nössner, E., & Parham, P. (1995). Species-specific differences in chaperone interaction of human and mouse major histocompatibility complex class I molecules. *The Journal of Experimental Medicine*, 181(1), 327–337. <https://doi.org/10.1084/jem.181.1.327>
- Nurieva, R., Yang, X. O., Martinez, G., Zhang, Y., Panopoulos, A. D., Ma, L., Schluns, K., Tian, Q., Watowich, S. S., Jetten, A. M., & Dong, C. (2007). Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature*, 448(7152), 480–483. <https://doi.org/10.1038/nature05969>
- O'connell, D., & London, F. F. R. (1959). *HEREDITY IN ANKYLOSING SPONDYLITIS*. <https://annals.org>
- Oeckinghaus, A., & Ghosh, S. (2009). The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. In *Cold Spring Harbor perspectives in biology* (Vol. 1, Issue 4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000034>
- Oh, S. P., Seki, T., Goss, K. A., Imamura, T., Yi, Y., Donahoe, P. K., Li, L., Miyazono, K., ten Dijke, P., Kim, S., & Li, E. (2000). Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor- β 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(6), 2626–2631. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.6.2626>
- Ohkura, N., Hamaguchi, M., Morikawa, H., Sugimura, K., Tanaka, A., Ito, Y., Osaki, M., Tanaka, Y., Yamashita, R., Nakano, N., Huehn, J., Fehling, H. J., Sparwasser, T., Nakai, K., & Sakaguchi, S. (2012). T Cell Receptor Stimulation-Induced Epigenetic Changes and Foxp3 Expression Are Independent and Complementary Events Required for Treg Cell Development. *Immunity*, 37(5), 785–799. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.09.010>

- Olsen, O. E., Wader, K. F., Hella, H., Mylin, A. K., Turesson, I., Nesthus, I., Waage, A., Sundan, A., & Holien, T. (2015). Activin A inhibits BMP-signaling by binding ACVR2A and ACVR2B. *Cell Communication and Signaling*, *13*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12964-015-0104-z>
- O’Rielly, D. D., Uddin, M., & Rahman, P. (2016). Ankylosing spondylitis: beyond genome-wide association studies. *Current Opinion in Rheumatology*, *28*(4), 337–345. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000297>
- Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N. K., Valdez, P. A., & Hymowitz, S. G. (2011). Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annual Review of Immunology*, *29*(1), 71–109. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101312>
- Ozdamar, B., Bose, R., Barrios-Rodiles, M., Wang, H.-R., Zhang, Y., & Wrana, J. L. (2005). Regulation of the Polarity Protein Par6 by TGF β Receptors Controls Epithelial Cell Plasticity. *Science*, *307*(5715), 1603–1609. <https://doi.org/10.1126/science.1105718>
- Pakyari, M., Farrokhi, A., Maharlooei, M. K., & Ghahary, A. (2013). Critical Role of Transforming Growth Factor Beta in Different Phases of Wound Healing. *Advances in Wound Care*, *2*(5), 215–224. <https://doi.org/10.1089/wound.2012.0406>
- Papadimitriou, E., Kardassis, D., Moustakas, A., & Stournaras, C. (2011). TGF β -induced Early Activation of the Small GTPase RhoA is Smad2/3-independent and Involves Src and the Guanine Nucleotide Exchange Factor Vav2. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *28*(2), 229–238. <https://doi.org/10.1159/000331734>
- Park, H., Li, Z., Yang, X. O., Chang, S. H., Nurieva, R., Wang, Y.-H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., & Dong, C. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature Immunology*, *6*(11), 1133–1141. <https://doi.org/10.1038/ni1261>
- Pauff, S. M., & Miller, S. C. (2009). ERK-dependent T-cell receptor threshold calibration in rheumatoid arthritis. *Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901784>. ERK-dependent
- Pelton, R. W., Saxena, B., Jones, M., Moses, H. L., & Gold, L. I. (1991). Immunohistochemical localization of TGF beta 1, TGF beta 2, and TGF beta 3 in the mouse embryo: expression patterns suggest multiple roles during embryonic development. *Journal of Cell Biology*, *115*(4), 1091–1105. <https://doi.org/10.1083/jcb.115.4.1091>
- Pina Vegas, L., Drouin, J., Dray-Spira, R., & Weill, A. (2023). Prevalence, mortality, and treatment of patients with rheumatoid arthritis: A cohort study of the French National Health Data System, 2010–2019. *Joint Bone Spine*, *90*(1). <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2022.105460>
- Proft, F., & Poddubnyy, D. (2018). Ankylosing spondylitis and axial spondyloarthritis: recent insights and impact of new classification criteria. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, *10*(5–6), 129–139. <https://doi.org/10.1177/1759720X18773726>
- Qin, H., Wang, L., Feng, T., Elson, C. O., Niyongere, S. A., Lee, S. J., Reynolds, S. L., Weaver, C. T., Roarty, K., Serra, R., Benveniste, E. N., & Cong, Y. (2009). TGF- β Promotes Th17 Cell Development through Inhibition of SOCS3. *The Journal of Immunology*, *183*(1), 97–105. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801986>

- Quintana, F. J., Basso, A. S., Iglesias, A. H., Korn, T., Farez, M. F., Bettelli, E., Caccamo, M., Oukka, M., & Weiner, H. L. (2008). Control of Treg and TH17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, *453*(7191), 65–71. <https://doi.org/10.1038/nature06880>
- Rahman, M. A., & Thomas, R. (2017). The SKG model of spondyloarthritis. In *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology* (Vol. 31, Issue 6, pp. 895–909). Bailliere Tindall Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2018.07.004>
- Rehaume, L. M., Mondot, S., Aguirre de Cárcer, D., Velasco, J., Benham, H., Hasnain, S. Z., Bowman, J., Ruutu, M., Hansbro, P. M., McGuckin, M. A., Morrison, M., & Thomas, R. (2014). ZAP-70 genotype disrupts the relationship between microbiota and host, leading to spondyloarthritis and ileitis in SKG mice. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)*, *66*(10), 2780–2792. <https://doi.org/10.1002/art.38773>
- Renlund, N., O'Neill, F. H., Zhang, L. H., Sidis, Y., & Teixeira, J. (2007). Activin receptor-like kinase-2 inhibits activin signaling by blocking the binding of activin to its type II receptor. *Journal of Endocrinology*, *195*(1), 95–103. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0281>
- Reveille, J. D. (2022). Biomarkers in axial spondyloarthritis and low back pain: a comprehensive review. In *Clinical Rheumatology* (Vol. 41, Issue 3, pp. 617–634). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s10067-021-05968-1>
- Reveille, J. D., Witter, J. P., & Weisman, M. H. (2012). Prevalence of axial spondylarthritis in the United States: Estimates from a cross-sectional survey. *Arthritis Care & Research*, *64*(6), 905–910. <https://doi.org/10.1002/acr.21621>
- Rezaieanesh, A., Mahmoudi, M., Amirzargar, A. A., Vojdani, M., Jamshidi, A. R., & Nicknam, M. H. (2017). Ankylosing spondylitis M-CSF-derived macrophages are undergoing unfolded protein response (UPR) and express higher levels of interleukin-23. *Modern Rheumatology*, *27*(5), 862–867. <https://doi.org/10.1080/14397595.2016.1259716>
- Robertson, I. B., Horiguchi, M., Zilberberg, L., Dabovic, B., Hadjiolova, K., & Rifkin, D. B. (2015). Latent TGF- β -binding proteins. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, *47*, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.05.005>
- Robertson, I. B., & Rifkin, D. B. (2013). Unchaining the beast; insights from structural and evolutionary studies on TGF β secretion, sequestration, and activation. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *24*(4), 355–372. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2013.06.003>
- Robertson, I. B., & Rifkin, D. B. (2016). Regulation of the bioavailability of TGF- β and TGF- β -related proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *8*(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021907>
- Robinson, P. C., van der Linden, S., Khan, M. A., & Taylor, W. J. (2021). Axial spondyloarthritis: concept, construct, classification and implications for therapy. *Nature Reviews Rheumatology*, *17*(2), 109–118. <https://doi.org/10.1038/s41584-020-00552-4>
- Romand, X., Douillard, C., & Baillet, A. (2017). Biomarkers for outcomes of spondyloarthritis. *Joint Bone Spine*, *84*(4), 385–387. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2017.02.004>
- Ross, S., Cheung, E., Petrakis, T. G., Howell, M., Kraus, W. L., & Hill, C. S. (2006). Smads orchestrate specific histone modifications and chromatin remodeling to activate

- transcription. *The EMBO Journal*, 25(19), 4490–4502. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601332>
- Rückert, C., Fiorillo, M. T., Loll, B., Moretti, R., Biesiadka, J., Saenger, W., Ziegler, A., Sorrentino, R., & Uchanska-Ziegler, B. (2006). Conformational dimorphism of self-peptides and molecular mimicry in a disease-associated HLA-B27 subtype. *Journal of Biological Chemistry*, 281(4), 2306–2316. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508528200>
- Saharinen, J., Taipale, J., & Keski-Oja, J. (1996). Association of the small latent transforming growth factor-beta with an eight cysteine repeat of its binding protein LTBP-1. *The EMBO Journal*, 15(2), 245–253. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8617200>
- Saito, T., Kinoshita, A., Yoshiura, K. I., Makita, Y., Wakui, K., Honke, K., Niikawa, N., & Taniguchi, N. (2001). Domain-specific Mutations of a Transforming Growth Factor (TGF)- β 1 Latency-associated Peptide Cause Camurati-Engelmann Disease because of the Formation of a Constitutively Active Form of TGF- β 1. *Journal of Biological Chemistry*, 276(15), 11469–11472. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000859200>
- Sánchez-Paulete, A. R., Teijeira, A., Cueto, F. J., Garasa, S., Pérez-Gracia, J. L., Sánchez-Arráez, A., Sancho, D., & Melero, I. (2017). Antigen cross-presentation and T-cell cross-priming in cancer immunology and immunotherapy. In *Annals of Oncology* (Vol. 28, pp. xii44–xii55). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx237>
- Sander, E. E., & Collard, J. G. (1999). Rho-like GTPases. *European Journal of Cancer*, 35(14), 1905–1911. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(99\)00293-2](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(99)00293-2)
- Sanjabi, S., Oh, S. A., & Li, M. O. (2017). Regulation of the Immune Response by TGF- β : From Conception to Autoimmunity and Infection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(6), a022236. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022236>
- Santos, S. G., Lynch, S., Campbell, E. C., Antoniou, A. N., & Powis, S. J. (2008). Induction of HLA-B27 heavy chain homodimer formation after activation in dendritic cells. *Arthritis Research and Therapy*, 10(4). <https://doi.org/10.1186/ar2492>
- Sari, İ., Öztürk, M. A., & Akkoç, N. (2015). Treatment of ankylosing spondylitis. In *Turkish Journal of Medical Sciences* (Vol. 45, Issue 2, pp. 416–430). Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences. <https://doi.org/10.3906/sag-1401-79>
- Sato, K., Shiota, M., Fukuda, S., Iwamoto, E., Machida, H., Inamine, T., Kondo, S., Yanagihara, K., Isomoto, H., Mizuta, Y., Kohno, S., & Tsukamoto, K. (2009). Strong evidence of a combination polymorphism of the tyrosine kinase 2 gene and the signal transducer and activator of transcription 3 gene as a DNA-based biomarker for susceptibility to Crohn's disease in the Japanese population. *Journal of Clinical Immunology*, 29(6), 815–825. <https://doi.org/10.1007/s10875-009-9320-x>
- Sato, S., Sanjo, H., Tsujimura, T., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Takeuchi, O., & Akira, S. (2006). TAK1 is indispensable for development of T cells and prevention of colitis by the generation of regulatory T cells. *International Immunology*, 18(10), 1405–1411. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxl082>
- Satow, R., Kurisaki, A., Chan, T., Hamazaki, T. S., & Asashima, M. (2006). Dullard promotes degradation and dephosphorylation of BMP receptors and is required for neural induction. *Developmental Cell*, 11(6), 763–774. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.10.001>

- Sawcer, S., Hellenthal, G., Pirinen, M., Spencer, C. C. A., Patsopoulos, N. A., Moutsianas, L., Dilthey, A., Su, Z., Freeman, C., Hunt, S. E., Edkins, S., Gray, E., Booth, D. R., Potter, S. C., Goris, A., Band, G., Oturai, A. B., Strange, A., Saarela, J., ... Compston, A. (2011). Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. In *Nature* (Vol. 476, Issue 7359, pp. 214–219). <https://doi.org/10.1038/nature10251>
- Schlosstein, L., Terasaki, P. I., Bluestone, R., & Pearson, C. M. (1973). High Association of an HL-A Antigen, W27, with Ankylosing Spondylitis. *New England Journal of Medicine*, 288(14), 704–706. <https://doi.org/10.1056/NEJM197304052881403>
- Schmierer, B., & Hill, C. S. (2007). TGF β -SMAD signal transduction: Molecular specificity and functional flexibility. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 8, Issue 12, pp. 970–982). <https://doi.org/10.1038/nrm2297>
- Sebald, W., Nickel, J., Zhang, J.-L., & Mueller, T. D. (2004). Molecular recognition in bone morphogenetic protein (BMP)/receptor interaction. In *Biol. Chem* (Vol. 385).
- Sengle, G., Charbonneau, N. L., Ono, R. N., Sasaki, T., Alvarez, J., Keene, D. R., Bächinger, H. P., & Sakai, L. Y. (2008). Targeting of bone morphogenetic protein growth factor complexes to fibrillin. *Journal of Biological Chemistry*, 283(20), 13874–13888. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707820200>
- Shapira, K. E., Hirschhorn, T., Barzilay, L., Smorodinsky, N. I., Henis, Y. I., & Ehrlich, M. (2014). Dab2 inhibits the cholesterol-dependent activation of JNK by TGF- β . *Molecular Biology of the Cell*, 25(10), 1620–1628. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-09-0537>
- Sherlock, J. P., Joyce-Shaikh, B., Turner, S. P., Chao, C.-C., Sathe, M., Grein, J., Gorman, D. M., Bowman, E. P., McClanahan, T. K., Yearley, J. H., Eberl, G., Buckley, C. D., Kastelein, R. A., Pierce, R. H., Laface, D. M., & Cua, D. J. (2012). IL-23 induces spondyloarthritis by acting on ROR- γ t⁺ CD3⁺CD4⁺CD8⁻ enthesal resident T cells. *Nature Medicine*, 18(7), 1069–1076. <https://doi.org/10.1038/nm.2817>
- Shi, J., & Sun, S.-C. (2015). TCR signaling to NF- κ B and mTORC1: Expanding roles of the CARMA1 complex. *Molecular Immunology*, 68(2), 546–557. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.07.024>
- Shi, W., Chang, C., Nie, S., Xie, S., Wan, M., & Cao, X. (2007). Endofin acts as a Smad anchor for a receptor activation in BMP signaling. *Journal of Cell Science*, 120(7), 1216–1224. <https://doi.org/10.1242/jcs.03400>
- Shi, W., Sun, C., He, B., Xiong, W., Shi, X., Yao, D., & Cao, X. (2004). GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGF β type I receptor. *The Journal of Cell Biology*, 164(2), 291–300. <https://doi.org/10.1083/jcb.200307151>
- Shi, Y., Wang, Y.-F., Jayaraman, L., Yang, H., Massagué, J., & Pavletich, N. P. (1998). Crystal Structure of a Smad MH1 Domain Bound to DNA: Insights on DNA Binding in TGF-Signaling decoys (Heldin et al A TGF-response is initiated by the binding of a spe. In *Cell* (Vol. 94). Kretzschmar and Massagué.
- Shibuya, H. (1998). Role of TAK1 and TAB1 in BMP signaling in early *Xenopus* development. *The EMBO Journal*, 17(4), 1019–1028. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.4.1019>
- Shull, M. M., Ormsby, I., Kier, A. B., Pawlowski, S., Diebold, R. J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., Calvin, D., Annunziata, N., & Doetschman, T. (1992). Targeted disruption of

- the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*, 359(6397), 693–699. <https://doi.org/10.1038/359693a0>
- Sieper, J., & Poddubnyy, D. (2017). Axial spondyloarthritis. *Lancet (London, England)*, 390(10089), 73–84. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31591-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31591-4)
- Sorrentino, A., Thakur, N., Grimsby, S., Marcusson, A., von Bulow, V., Schuster, N., Zhang, S., Heldin, C.-H., & Landström, M. (2008). The type I TGF- β receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. *Nature Cell Biology*, 10(10), 1199–1207. <https://doi.org/10.1038/ncb1780>
- Sotgia, F., Williams, T. M., Schubert, W., Medina, F., Minetti, C., Pestell, R. G., & Lisanti, M. P. (2006). Caveolin-1 deficiency (-/-) conveys premalignant alterations in mammary epithelia, with abnormal lumen formation, growth factor independence, and cell invasiveness. *American Journal of Pathology*, 168(1), 292–309. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050429>
- Souchelnytskyi, S., Tamaki, K., Engström, U., Wernstedt, C., ten Dijke, P., & Heldin, C. H. (1997). Phosphorylation of Ser465 and Ser467 in the C terminus of Smad2 mediates interaction with Smad4 and is required for transforming growth factor-beta signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(44), 28107–28115. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.44.28107>
- Souchelnytskyi, S., ten Dijke, P., Miyazono, K., & Heldin, C. H. (1996). Phosphorylation of Ser165 in TGF-beta type I receptor modulates TGF-beta1-induced cellular responses. *The EMBO Journal*, 15(22), 6231–6240. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8947046>
- Sousa-Squiavinato, A. C. M., Rocha, M. R., Barcellos-de-Souza, P., de Souza, W. F., & Morgado-Diaz, J. A. (2019). Cofilin-1 signaling mediates epithelial-mesenchymal transition by promoting actin cytoskeleton reorganization and cell-cell adhesion regulation in colorectal cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1866(3), 418–429. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.10.003>
- STECHEER, R. M., & HERSH, A. H. (1955). Familial occurrence of ankylosing spondylitis. *The British Journal of Physical Medicine : Including Its Application to Industry*, 18(8), 176–183. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13240043>
- Stockis, J., Colau, D., Coulie, P. G., & Lucas, S. (2009). Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF-beta on the surface of activated human Treg. *European Journal of Immunology*, 39(12), 3315–3322. <https://doi.org/10.1002/eji.200939684>
- Stolwijk, C., Boonen, A., van Tubergen, A., & Reveille, J. D. (2012). Epidemiology of Spondyloarthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 38(3), 441–476. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2012.09.003>
- Stolwijk, C., van Tubergen, A., Castillo-Ortiz, J. D., & Boonen, A. (2015). Prevalence of extra-articular manifestations in patients with ankylosing spondylitis: A systematic review and meta-analysis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 74(1), 65–73. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-203582>
- Sun, Q., Mao, S., Li, H., Zen, K., Zhang, C. Y., & Li, L. (2013). Role of miR-17 family in the negative feedback loop of bone morphogenetic protein signaling in neuron. *PLoS ONE*, 8(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083067>
- Sun, X., Essalmani, R., Susan-Resiga, D., Prat, A., & Seidah, N. G. (2011). Latent transforming growth factor β -binding proteins-2 and -3 inhibit the proprotein convertase 5/6A. *Journal*

- of *Biological Chemistry*, 286(33), 29063–29073.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.242479>
- Suto, T., & Karonitsch, T. (2020). The immunobiology of mTOR in autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, 110, 102373. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.102373>
- Suzuki, H. I. (2018). MicroRNA control of TGF- β signaling. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19071901>
- Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., & Glimcher, L. H. (2000). A Novel Transcription Factor, T-bet, Directs Th1 Lineage Commitment. *Cell*, 100(6), 655–669. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80702-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80702-3)
- Szabo, S. J., Sullivan, B. M., Stemmann, C., Satoskar, A. R., Sleckman, B. P., & Glimcher, L. H. (2002). Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN- γ production in CD4 and CD8 T cells. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5553), 338–342. <https://doi.org/10.1126/science.1065543>
- Taipale, J., Miyazono, K., Heldin, C., & Keski-Oja, J. (1994). Latent transforming growth factor- β 1 associates to fibroblast extracellular matrix via latent TGF- β binding protein. *Journal of Cell Biology*, 124(1), 171–181. <https://doi.org/10.1083/jcb.124.1.171>
- Taipale, J., Saharinen, J., Hedman, K., & Keski-Oja, J. (1996). Latent transforming growth factor- β 1 and its binding protein are components of extracellular matrix microfibrils. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 44(8), 875–889. <https://doi.org/10.1177/44.8.8756760>
- Takabayashi, H., Shinohara, M., Mao, M., Phaosawasdi, P., El-Zaatari, M., Zhang, M., Ji, T., Eaton, K. A., Dang, D., Kao, J., & Todisco, A. (2014). Anti-Inflammatory Activity of Bone Morphogenetic Protein Signaling Pathways in Stomachs of Mice. *Gastroenterology*, 147(2), 396–406.e7. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.04.015>
- Tanaka, S., Jiang, Y., Martinez, G. J., Tanaka, K., Yan, X., Kurosaki, T., Kaartinen, V., Feng, X.-H., Tian, Q., Wang, X., & Dong, C. (2018). Trim33 mediates the proinflammatory function of Th17 cells. *Journal of Experimental Medicine*, 215(7), 1853–1868. <https://doi.org/10.1084/jem.20170779>
- Tang, L.-Y., Heller, M., Meng, Z., Yu, L.-R., Tang, Y., Zhou, M., & Zhang, Y. E. (2017). Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Directly Activates the JAK1-STAT3 Axis to Induce Hepatic Fibrosis in Coordination with the SMAD Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 292(10), 4302–4312. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.773085>
- Taurog, J. D. (1994). Song of an arthritis investigator. *Arthritis & Rheumatism*, 37(7), 1112–1112. <https://doi.org/10.1002/art.1780370721>
- Taurog, J. D., Chhabra, A., & Colbert, R. A. (2016). Ankylosing Spondylitis and Axial Spondyloarthritis. *The New England Journal of Medicine*, 374(26), 2563–2574. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1406182>
- Taurog, J. D., Maika, S. D., Simmons, W. A., Breban, M., & Hammer, R. E. (1993). Susceptibility to inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rat lines correlates with the level of B27 expression. *The Journal of Immunology*, 150(9).
- Taurog, J. D., Richardson, J. A., Croft, J. T., Simmons, W. A., Zhou, M., Fernández-Sueiro, J. L., Balish, E., & Hammer, R. E. (1994). The germfree state prevents development of gut and

- joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *The Journal of Experimental Medicine*, 180(6), 2359–2364. <https://doi.org/10.1084/jem.180.6.2359>
- Teitelbaum, S. L. (2000). Bone resorption by osteoclasts. In *Science* (Vol. 289, Issue 5484, pp. 1504–1508). <https://doi.org/10.1126/science.289.5484.1504>
- Tian, X., Guan, W., Zhang, L., Sun, W., Zhou, D., Lin, Q., Ren, W., Nadeem, L., & Xu, G. (2018). Physical interaction of STAT1 isoforms with TGF- β receptors leads to functional crosstalk between two signaling pathways in epithelial ovarian cancer. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 37(1). <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0773-8>
- Tillet, E., Ouarné, M., Desroches-Castan, A., Mallet, C., Subileau, M., Didier, R., Lioutsko, A., Belthier, G., Feige, J. J., & Bailly, S. (2018). A heterodimer formed by bone morphogenetic protein 9 (BMP9) and BMP10 provides most BMP biological activity in plasma. *Journal of Biological Chemistry*, 293(28), 10963–10974. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002968>
- Topper, J. N., Cai, J., Qiu, Y., Anderson, K. R., Xu, Y.-Y., Deeds, J. D., Feeley, R., Gimeno, C. J., Woolf, E. A., Tayber, O., Mays, G. G., Sampson, B. A., Schoen, F. J., Gimbrone, M. A., & Falb, D. (1997). Vascular MADs: Two novel MAD-related genes selectively inducible by flow in human vascular endothelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(17), 9314–9319. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.17.9314>
- Towne, C. F., York, I. A., Neijssen, J., Karow, M. L., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D., Neefjes, J. J., & Rock, K. L. (2008). Puromycin-Sensitive Aminopeptidase Limits MHC Class I Presentation in Dendritic Cells but Does Not Affect CD8 T Cell Responses during Viral Infections. *The Journal of Immunology*, 180(3), 1704–1712. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.3.1704>
- Tran, D. Q., Andersson, J., Wang, R., Ramsey, H., Unutmaz, D., & Shevach, E. M. (2009). GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF- β on platelets and activated FOXP3 + regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(32), 13445–13450. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901944106>
- Tran, T. M., Dorris, M. L., Satumtira, N., Richardson, J. A., Hammer, R. E., Shang, J., & Taurog, J. D. (2006). Additional human β 2-microglobulin curbs HLA-B27 misfolding and promotes arthritis and spondylitis without colitis in male HLA-B27-transgenic rats. *Arthritis and Rheumatism*, 54(4), 1317–1327. <https://doi.org/10.1002/ART.21740>
- Tran, T. M., Hořejší, V., Weinreich, S., Pla, M., Breur, B. S., Čapková, J., Flieger, M., Ivanyi, P., & Ivašková, E. (2000). Strong association of HLA-B27 heavy chain with β 2-microglobulin. *Human Immunology*, 61(12), 1197–1201. [https://doi.org/10.1016/S0198-8859\(00\)00220-2](https://doi.org/10.1016/S0198-8859(00)00220-2)
- Travis, M. A., Reizis, B., Melton, A. C., Masteller, E., Tang, Q., Proctor, J. M., Wang, Y., Bernstein, X., Huang, X., Reichardt, L. F., Bluestone, J. A., & Sheppard, D. (2007). Loss of integrin α β 8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice. *Nature*, 449(7160), 361–365. <https://doi.org/10.1038/nature06110>
- Tripathi, V., Sixt, K. M., Gao, S., Xu, X., Huang, J., Weigert, R., Zhou, M., & Zhang, Y. E. (2016). Direct Regulation of Alternative Splicing by SMAD3 through PCBP1 Is Essential to the Tumor-Promoting Role of TGF- β . *Molecular Cell*, 64(3), 549–564. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.013>

- Tsukazaki, T., Chiang, T. A., Davison, A. F., Attisano, L., & Wrana, J. L. (1998). SARA, a FYVE Domain Protein that Recruits Smad2 to the TGF β Receptor. *Cell*, *95*(6), 779–791. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81701-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81701-8)
- Tu, E., Chia, C. P. Z., Chen, W., Zhang, D., Park, S. A., Jin, W., Wang, D., Alegre, M. L., Zhang, Y. E., Sun, L., & Chen, W. J. (2018). T Cell Receptor-Regulated TGF- β Type I Receptor Expression Determines T Cell Quiescence and Activation. *Immunity*, *48*(4), 745-759.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.025>
- Turina, M. C., Landewé, R., & Baeten, D. (2017). Lessons to be learned from serum biomarkers in psoriasis and IBD—the potential role in SpA. In *Expert Review of Clinical Immunology* (Vol. 13, Issue 4, pp. 333–344). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2017.1244004>
- Turner, J. A., Stephen-Victor, E., Wang, S., Rivas, M. N., Abdel-Gadir, A., Harb, H., Cui, Y., Fanny, M., Charbonnier, L. M., Fong, J. J. H., Benamar, M., Wang, L., Burton, O. T., Bansal, K., Bry, L., Zhu, C., Li, Q. Z., Clement, R. L., Oettgen, H. C., ... Chatila, T. A. (2020). Regulatory T Cell-Derived TGF- β 1 Controls Multiple Checkpoints Governing Allergy and Autoimmunity. *Immunity*, *53*(6), 1202-1214.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.10.002>
- Ulloa, L., Doody, J., & Massagué, J. (1999). Inhibition of transforming growth factor- β /SMAD signalling by the interferon- γ /STAT pathway. *Nature*, *397*(6721), 710–713. <https://doi.org/10.1038/17826>
- Utriainen, L., Firmin, D., Wright, P., Cerovic, V., Breban, M., McInnes, I., & Milling, S. (2012). Expression of HLA-B27 causes loss of migratory dendritic cells in a rat model of spondylarthritis. *Arthritis and Rheumatism*, *64*(10), 3199–3209. <https://doi.org/10.1002/ART.34561>
- Valer, J. A., Sánchez-de-Diego, C., Pimenta-Lopes, C., Rosa, J. L., & Ventura, F. (2019). ACVR1 Function in Health and Disease. *Cells*, *8*(11), 1366. <https://doi.org/10.3390/cells8111366>
- Varas, A., Valencia, J., Lavocat, F., Martínez, V. G., Thiam, N. N., Hidalgo, L., Fernández-Sevilla, L. M., Sacedón, R., Vicente, A., & Miossec, P. (2015). Blockade of bone morphogenetic protein signaling potentiates the pro-inflammatory phenotype induced by interleukin-17 and tumor necrosis factor- α combination in rheumatoid synoviocytes. *Arthritis Research & Therapy*, *17*(1), 192. <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0710-6>
- Vardouli, L., Moustakas, A., & Stournaras, C. (2005). LIM-kinase 2 and cofilin phosphorylation mediate actin cytoskeleton reorganization induced by transforming growth factor-beta. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(12), 11448–11457. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402651200>
- Varkas, G., Cypers, H., Van Praet, L., Carron, P., Raeman, F., Gyselbrecht, L., Devinck, M., Corluy, L., Vanneuville, B., Elewaut, D., & Van den Bosch, F. (2014). OP0263 First Results from “Be-Giant”: Baseline Characteristics of an Early Spondyloarthritis Cohort: Table 1. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *73*(Suppl 2), 161.1-161. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-eular.4951>
- Veldhoen, M., Hirota, K., Westendorp, A. M., Buer, J., Dumoutier, L., Renauld, J. C., & Stockinger, B. (2008). The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature*, *453*(7191), 106–109. <https://doi.org/10.1038/nature06881>

- Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M., & Stockinger, B. (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, 24(2), 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.01.001>
- Venken, K., Jacques, P., Mortier, C., Labadia, M. E., Decruy, T., Coudenys, J., Hoyt, K., Wayne, A. L., Hughes, R., Turner, M., Van Gassen, S., Martens, L., Smith, D., Harcken, C., Wahle, J., Wang, C. T., Verheugen, E., Schryvers, N., Varkas, G., ... Elewaut, D. (2019). RORγt inhibition selectively targets IL-17 producing iNKT and γδ-T cells enriched in Spondyloarthritis patients. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07911-6>
- Voo, K. S., Wang, Y.-H., Santori, F. R., Boggiano, C., Wang, Y.-H., Arima, K., Bover, L., Hanabuchi, S., Khalili, J., Marinova, E., Zheng, B., Littman, D. R., & Liu, Y.-J. (2009). Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(12), 4793–4798. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900408106>
- Voorneveld, P. W., Kodach, L. L., Jacobs, R. J., Liv, N., Zonneville, A. C., Hoogenboom, J. P., Biemond, I., Verspaget, H. W., Hommes, D. W., de Rooij, K., van Noesel, C. J. M., Morreau, H., van Wezel, T., Offerhaus, G. J. A., van den Brink, G. R., Peppelenbosch, M. P., ten Dijke, P., & Hardwick, J. C. H. (2014). Loss of SMAD4 Alters BMP Signaling to Promote Colorectal Cancer Cell Metastasis via Activation of Rho and ROCK. *Gastroenterology*, 147(1), 196–208.e13. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.03.052>
- Wagner, A., Wang, C., Fessler, J., DeTomaso, D., Avila-Pacheco, J., Kaminski, J., Zaghouni, S., Christian, E., Thakore, P., Schellhaass, B., Akama-Garren, E., Pierce, K., Singh, V., Ron-Harel, N., Douglas, V. P., Bod, L., Schnell, A., Puleston, D., Sobel, R. A., ... Yosef, N. (2021). Metabolic modeling of single Th17 cells reveals regulators of autoimmunity. *Cell*, 184(16), 4168–4185.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.05.045>
- Walton, K. L., Makanji, Y., Chen, J., Wilce, M. C., Chan, K. L., Robertson, D. M., & Harrison, C. A. (2010). Two distinct regions of latency-associated peptide coordinate stability of the latent transforming growth factor-β1 complex. *Journal of Biological Chemistry*, 285(22), 17029–17037. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.110288>
- Wang, R., Wan, Q., Kozhaya, L., Fujii, H., & Unutmaz, D. (2008). Identification of a Regulatory T Cell Specific Cell Surface Molecule that Mediates Suppressive Signals and Induces Foxp3 Expression. *PLoS ONE*, 3(7), e2705. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002705>
- Wang, R., Zhu, J., Dong, X., Shi, M., Lu, C., & Springer, T. A. (2012). GARP regulates the bioavailability and activation of TGFβ. *Molecular Biology of the Cell*, 23(6), 1129–1139. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-12-1018>
- Wang, R.-X., Yu, C.-R., Mahdi, R. M., & Egwuagu, C. E. (2012). Novel IL27p28/IL12p40 cytokine suppressed experimental autoimmune uveitis by inhibiting autoreactive Th1/Th17 cells and promoting expansion of regulatory T cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(43), 36012–36021. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.390625>
- Wang, X., Ni, L., Wan, S., Zhao, X., Ding, X., Dejean, A., & Dong, C. (2020). Febrile Temperature Critically Controls the Differentiation and Pathogenicity of T Helper 17 Cells. *Immunity*, 52(2), 328–341.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.01.006>

- Wei, L., Laurence, A., Elias, K. M., & O'Shea, J. J. (2007). IL-21 Is Produced by Th17 Cells and Drives IL-17 Production in a STAT3-dependent Manner. *Journal of Biological Chemistry*, 282(48), 34605–34610. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705100200>
- Wei, P., Hu, G. H., Kang, H. Y., Yao, H. B., Kou, W., Liu, H., Zhang, C., & Hong, S. L. (2014). An aryl hydrocarbon receptor ligand acts on dendritic cells and T cells to suppress the Th17 response in allergic rhinitis patients. *Laboratory Investigation*, 94(5), 528–535. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2014.8>
- Wells, R. G., Yankelev, H., Lin, H. Y., & Lodish, H. F. (1997). Biosynthesis of the Type I and Type II TGF- β Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 272(17), 11444–11451. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.17.11444>
- Wendling, D. (2015). *Involvement of Th17 pathway in spondyloarthritis* (Issue 7).
- Wilkes, M. C., Murphy, S. J., Garamszegi, N., & Leof, E. B. (2003). Cell-Type-Specific Activation of PAK2 by Transforming Growth Factor β Independent of Smad2 and Smad3. *Molecular and Cellular Biology*, 23(23), 8878–8889. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.23.8878-8889.2003>
- Wu, B., Zhang, S., Guo, Z., Bi, Y., Zhou, M., Li, P., Seyedsadr, M., Xu, X., Li, J. liang, Markovic-Plese, S., & Wan, Y. Y. (2021). The TGF- β superfamily cytokine Activin-A is induced during autoimmune neuroinflammation and drives pathogenic Th17 cell differentiation. *Immunity*, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.12.010>
- Wu, J.-W., Hu, M., Chai, J., Seoane, J., Huse, M., Li, C., Rigotti, D. J., Kyin, S., Muir, T. W., Fairman, R., Massagué, J., & Shi, Y. (2001). Crystal Structure of a Phosphorylated Smad2. *Molecular Cell*, 8(6), 1277–1289. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00421-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00421-X)
- Xu, L., Kitani, A., Stuelten, C., McGrady, G., Fuss, I., & Strober, W. (2010). Positive and Negative Transcriptional Regulation of the Foxp3 Gene is Mediated by Access and Binding of the Smad3 Protein to Enhancer I. *Immunity*, 33(3), 313–325. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.09.001>
- Xu, X., Hong, P., Wang, Z., Tang, Z., & Li, K. (2021). MicroRNAs in Transforming Growth Factor-Beta Signaling Pathway Associated With Fibrosis Involving Different Systems of the Human Body. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.707461>
- Yadin, D., Knaus, P., & Mueller, T. D. (2016). Structural insights into BMP receptors: Specificity, activation and inhibition. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 27, 13–34. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.11.005>
- Yagi, K., Goto, D., Hamamoto, T., Takenoshita, S., Kato, M., & Miyazono, K. (1999). Alternatively spliced variant of Smad2 lacking exon 3. *Journal of Biological Chemistry*, 274(2), 703–709. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.2.703>
- Yakymovych, I., Yakymovych, M., & Heldin, C.-H. (2018). Intracellular trafficking of transforming growth factor beta receptors. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 50(1), 3–11. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmx119>
- Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Shibuya, H., Irie, K., Oishi, I., Ueno, N., Taniguchi, T., Nishida, E., & Matsumoto, K. (1995). Identification of a Member of the MAPKKK Family as a Potential Mediator of TGF- β Signal Transduction. *Science*, 270(5244), 2008–2011. <https://doi.org/10.1126/science.270.5244.2008>

- Yamaguchi, T., Kurisaki, A., Yamakawa, N., Minakuchi, K., & Sugino, H. (2006). FKBP12 functions as an adaptor of the Smad7–Smurf1 complex on activin type I receptor. *Journal of Molecular Endocrinology*, *36*(3), 569–579. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01966>
- Yamashita, M., Fatyol, K., Jin, C., Wang, X., Liu, Z., & Zhang, Y. E. (2008). TRAF6 Mediates Smad-Independent Activation of JNK and p38 by TGF- β . *Molecular Cell*, *31*(6), 918–924. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.09.002>
- Yan, Z., Winawer, S., & Friedman, E. (1994). Two different signal transduction pathways can be activated by transforming growth factor beta 1 in epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(18), 13231–13237. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)36823-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)36823-0)
- Yang, W. L., Wang, J., Chan, C. H., Lee, S. W., Campos, A. D., Lamothe, B., Hur, L., Grabiner, B. C., Lin, X., Darnay, B. G., & Lin, H. K. (2009). The E3 Ligase TRAF6 regulates akt ubiquitination and activation. *Science*, *325*(5944), 1134–1138. <https://doi.org/10.1126/science.1175065>
- Yang, X., Garner, L. I., Zvyagin, I. V., Paley, M. A., Komech, E. A., Jude, K. M., Zhao, X., Fernandes, R. A., Hassman, L. M., Paley, G. L., Savvides, C. S., Brackenridge, S., Quastel, M. N., Chudakov, D. M., Bowness, P., Yokoyama, W. M., McMichael, A. J., Gillespie, G. M., & Garcia, K. C. (2022). Autoimmunity-associated T cell receptors recognize HLA-B*27-bound peptides. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05501-7>
- Yang, X. O., Pappu, B. P., Nurieva, R., Akimzhanov, A., Kang, H. S., Chung, Y., Ma, L., Shah, B., Panopoulos, A. D., Schluns, K. S., Watowich, S. S., Tian, Q., Jetten, A. M., & Dong, C. (2008). T Helper 17 Lineage Differentiation Is Programmed by Orphan Nuclear Receptors ROR α and ROR γ . *Immunity*, *28*(1), 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.11.016>
- Yang, Z., Mu, Z., Dabovic, B., Jurukovski, V., Yu, D., Sung, J., Xiong, X., & Munger, J. S. (2007). Absence of integrin-mediated TGFbeta1 activation in vivo recapitulates the phenotype of TGFbeta1-null mice. *The Journal of Cell Biology*, *176*(6), 787–793. <https://doi.org/10.1083/jcb.200611044>
- Yasuda, K., Takeuchi, Y., & Hirota, K. (2019). The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases. *Seminars in Immunopathology*, *41*(3), 283–297. <https://doi.org/10.1007/s00281-019-00733-8>
- Yi, J. Y., Shin, I., & Arteaga, C. L. (2005). Type I Transforming Growth Factor β Receptor Binds to and Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(11), 10870–10876. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413223200>
- Yin, X., Chen, S., & Eisenbarth, S. C. (2021). Dendritic Cell Regulation of T Helper Cells. *Annual Review of Immunology*, *39*(1), 759–790. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-101819-025146>
- Yoon, J.-H., Sudo, K., Kuroda, M., Kato, M., Lee, I.-K., Han, J. S., Nakae, S., Imamura, T., Kim, J., Ju, J. H., Kim, D.-K., Matsuzaki, K., Weinstein, M., Matsumoto, I., Sumida, T., & Mamura, M. (2015). Phosphorylation status determines the opposing functions of Smad2/Smad3 as STAT3 cofactors in TH17 differentiation. *Nature Communications*, *6*, 7600. <https://doi.org/10.1038/ncomms8600>
- Yoshida, R., Imai, T., Hieshima, K., Kusuda, J., Baba, M., Kitaura, M., Nishimura, M., Kakizaki, M., Nomiyama, H., & Yoshie, O. (1997). Molecular Cloning of a Novel Human CC Chemokine EBI1-ligand Chemokine That Is a Specific Functional Ligand for EBI1, CCR7.

- Journal of Biological Chemistry*, 272(21), 13803–13809.
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.21.13803>
- Yoshinaga, K., Obata, H., Jurukovski, V., Mazzieri, R., Chen, Y., Zilberberg, L., Huso, D., Melamed, J., Prijatelj, P., Todorovic, V., Dabovic, B., & Rifkin, D. B. (2008). *Perturbation of transforming growth factor (TGF)- β 1 association with latent TGF-binding protein yields inflammation and tumors*. www.pnas.org/cgi/content/full/
- Yu, Q., & Stamenkovic, I. (2000). *Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis*. www.genesdev.org
- Zawel, L., Le Dai, J., Buckhaults, P., Zhou, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Kern, S. E. (1998). Human Smad3 and Smad4 Are Sequence-Specific Transcription Activators. *Molecular Cell*, 1(4), 611–617. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80061-1](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80061-1)
- Zeboulon, N., Dougados, M., & Gossec, L. (2008). Prevalence and characteristics of uveitis in the spondyloarthropathies: A systematic literature review. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 67(7), 955–959. <https://doi.org/10.1136/ard.2007.075754>
- Zeidler, H., & Hudson, A. P. (2021). Reactive Arthritis Update: Spotlight on New and Rare Infectious Agents Implicated as Pathogens. In *Current Rheumatology Reports* (Vol. 23, Issue 7). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11926-021-01018-6>
- Zeisberg, M., Hanai, J., Sugimoto, H., Mammoto, T., Charytan, D., Strutz, F., & Kalluri, R. (2003). BMP-7 counteracts TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nature Medicine*, 9(7), 964–968. <https://doi.org/10.1038/nm888>
- Zhang, F., Meng, G., & Strober, W. (2008). Interactions among the transcription factors Runx1, ROR γ t and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells. *Nature Immunology*, 9(11), 1297–1306. <https://doi.org/10.1038/ni.1663>
- Zhang, L., Zhou, F., Drabsch, Y., Gao, R., Snaar-Jagalska, B. E., Mickanin, C., Huang, H., Sheppard, K. A., Porter, J. A., Lu, C. X., & Ten Dijke, P. (2012). USP4 is regulated by AKT phosphorylation and directly deubiquitylates TGF- β type I receptor. *Nature Cell Biology*, 14(7), 717–726. <https://doi.org/10.1038/ncb2522>
- Zhang, L., Zhou, F., GarcíadeVinauesa, A., deKruif, E. M., Mesker, W. E., Hui, L., Drabsch, Y., Li, Y., Bauer, A., Rousseau, A., Sheppard, K. A., Mickanin, C., Kuppen, P. J. K., Lu, C. X., & tenDijke, P. (2013). TRAF4 Promotes TGF- β Receptor Signaling and Drives Breast Cancer Metastasis. *Molecular Cell*, 51(5), 559–572. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.07.014>
- Zhang, S., Takaku, M., Zou, L., Gu, A. Di, Chou, W. C., Zhang, G., Wu, B., Kong, Q., Thomas, S. Y., Serody, J. S., Chen, X., Xu, X., Wade, P. A., Cook, D. N., Ting, J. P. Y., & Wan, Y. Y. (2017). Reversing SKI-SMAD4-mediated suppression is essential for TH17 cell differentiation. *Nature*, 551(7678), 105–109. <https://doi.org/10.1038/nature24283>
- Zhang, Y., Feng, X.-H., & Derynck, R. (1998). Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF- β -induced transcription. *Nature*, 394(6696), 909–913. <https://doi.org/10.1038/29814>
- Zhao, G. Q. (2003). Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse. In *Genesis (United States)* (Vol. 35, Issue 1, pp. 43–56). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/gene.10167>

- Zhong, T., Lei, K., Lin, X., Xie, Z., Luo, S., Zhou, Z., Zhao, B., & Li, X. (2022). Protein ubiquitination in T cell development. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.941962>
- Zhou, L., Ivanov, I. I., Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy, D. E., Leonard, W. J., & Littman, D. R. (2007). IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature Immunology*, 8(9), 967–974. <https://doi.org/10.1038/ni1488>
- Zhou, L., Lopes, J. E., Chong, M. M. W., Ivanov, I. I., Min, R., Victora, G. D., Shen, Y., Du, J., Rubtsov, Y. P., Rudensky, A. Y., Ziegler, S. F., & Littman, D. R. (2008). TGF- β -induced Foxp3 inhibits TH17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t function. *Nature*, 453(7192), 236–240. <https://doi.org/10.1038/nature06878>
- Zhu, W., He, X., Cheng, K., Zhang, L., Chen, D., Wang, X., Qiu, G., Cao, X., & Weng, X. (2019). Ankylosing spondylitis: etiology, pathogenesis, and treatments. In *Bone Research* (Vol. 7, Issue 1). Sichuan University. <https://doi.org/10.1038/s41413-019-0057-8>
- Zimmermann, L.-M. A., Correns, A., Furlan, A. G., Spanou, C. E. S., & Sengle, G. (2021). Controlling BMP growth factor bioavailability: The extracellular matrix as multi skilled platform. *Cellular Signalling*, 85, 110071. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110071>
- Zinski, J., Tajer, B., & Mullins, M. C. (2018). TGF- β Family Signaling in Early Vertebrate Development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033274>
- Zuo, W., & Chen, Y.-G. (2009). Specific Activation of Mitogen-activated Protein Kinase by Transforming Growth Factor-Receptors in Lipid Rafts Is Required for Epithelial Cell Plasticity. *Molecular Biology of the Cell*, 20, 1020–1029. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08>
- Zuo, W., Huang, F., Chiang, Y. J., Li, M., Du, J., Ding, Y., Zhang, T., Lee, H. W., Jeong, L. S., Chen, Y., Deng, H., Feng, X. H., Luo, S., Gao, C., & Chen, Y. G. (2013). C-Cbl-Mediated Neddylation Antagonizes Ubiquitination and Degradation of the TGF- β Type II Receptor. *Molecular Cell*, 49(3), 499–510. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.12.002>

