



**HAL**  
open science

# Étude transcriptomique des cellules dendritiques CD103+ CD4+ chez le rat transgénique HLA-B27, modèle de la spondylarthrite

Ingrid Fert

► **To cite this version:**

Ingrid Fert. Étude transcriptomique des cellules dendritiques CD103+ CD4+ chez le rat transgénique HLA-B27, modèle de la spondylarthrite. *Biologie animale*. 2013. dumas-01473354

**HAL Id: dumas-01473354**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01473354>**

Submitted on 21 Feb 2017

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

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

**CONSERVATOIRE NATIONAL DES ARTS ET METIERS**

**PARIS**

**MEMOIRE**

**présenté en vue d'obtenir**

**le DIPLOME d'INGENIEUR de l'école d'ingénieurs du Cnam**

**SPECIALITE : GENIE BIOLOGIQUE**

**par**

**Ingrid FERT**

Etude transcriptomique des cellules dendritiques CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>  
chez le rat transgénique HLA-B27, modèle de la spondylarthrite

**Soutenu le 18 juin 2013**

**JURY**

**PRESIDENT :** Pr Philippe POCHART, Professeur des Universités, Cnam.

**RESPONSABLE  
SCIENTIFIQUE :** Pr Maxime BREBAN, PU-PH, Hôpital Ambroise Paré.

**MEMBRES :** Dr Gilles CHIOCCHIA, Directeur de Recherche, Inserm.  
Dr Olivier HENNEBERT, Maître de conférences, Cnam.  
Dr Christine LE BOUTEILLER, senior scientist, Sanofi-Aventis.  
Dr Agnès LEHUEN, Directeur de Recherche, CNRS.

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe « inflammation chronique et système immunitaire » à l'institut Cochin (Paris 14<sup>ème</sup>, Inserm U1016, CNRS UMR 8104 et Université Paris Descartes UMR-S1016).

## Résumé

La spondylarthrite (SpA) est l'un des rhumatismes inflammatoires chroniques les plus fréquents et se caractérise par des manifestations articulaires et extra-articulaires particulières. Chez le rat transgénique pour le HLA-B27 et la  $\beta_2$ -microglobuline humaine, le développement spontané d'une maladie proche de la SpA est fortement corrélé à un dysfonctionnement des cellules dendritiques (DC). Nous avons donc étudié les facteurs impliqués dans ce dysfonctionnement en effectuant une analyse transcriptomique des DC spléniques CD103+ CD4+ à l'aide de puces pangénomiques.

Cette étude a révélé un défaut majeur de la voie de signalisation de l'interféron (IFN) dans les DC de rats HLA-B27, par la sous-expression de nombreux gènes appartenant à cette voie. Nous avons comparé nos résultats avec ceux rapportés dans des macrophages dérivés de monocytes de patients atteints de SpA. Cette méta-analyse a révélé l'existence d'une signature inverse de l'IFN partagée entre les patients et les rats HLA-B27. Dans notre modèle de rat, ce défaut a ensuite été confirmé puis répliqué sur des échantillons indépendants par PCR quantitative sur une sélection de gènes d'intérêt : l'*Ifng*, les chimiokines *Cxcl9*, *Cxcl10* et *Cxcl11* ainsi que les facteurs de transcription *Stat1*, *Ifit2*, *Ifit3*, *Irf1* et *Irf7*. De plus, nous avons mis en évidence dans ces DC HLA-B27 une régulation positive de *Socs3* qui pourrait expliquer ce défaut de signalisation via l'IFN, ainsi qu'une sous-expression des gènes codant pour les interleukines IL-27 et IL-10, qui favoriserait l'expansion des lymphocytes Th17 pathogènes au détriment des cellules T régulatrices. Enfin, plusieurs gènes impliqués dans le stress du réticulum endoplasmique tels que *Calr*, *Pdia4* et *Pdia6* apparaissent surexprimés dans les DC de rats HLA-B27.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'expression du HLA-B27 dans les DC spléniques CD103+ CD4+ pourrait être à l'origine de la signalisation défectueuse de l'IFN, et ainsi jouer un rôle dans la pathogénèse de la SpA.

**Mot-clés** : spondylarthrite, cellule dendritique, HLA-B27, étude transcriptomique, interféron

---

## Abstract

Spondyloarthritis (SpA) is one of the most frequent chronic inflammatory joint diseases characterized by articular and extra-articular manifestations. In transgenic rats for HLA-B27 and human  $\beta_2$ -microglobulin, the spontaneous development of a SpA-like disease is tightly correlated with dendritic cells (DC) dysfunction. We therefore investigated the factors involved in this dysfunction by performing the transcriptomic analysis of CD103+ CD4+ splenic DC using genome-wide chips.

This study has revealed a major defect in the interferon (IFN) signaling pathway in DC from HLA-B27 rats, through the under-expression of many genes in this pathway. We compared our results with those reported in monocytes-derived macrophages from SpA patients. This meta-analysis revealed an reverse IFN signature shared between patients and HLA-B27 rats. In our rat model, the defect was subsequently confirmed and replicated in independent samples by quantitative PCR on selected genes of interest: *IFNg*, the chemokines *Cxcl9*, *Cxcl10* and *Cxcl11*, as well as the transcription factors *Stat1*, *Ifit2*, *Ifit3*, *Irf1* and *Irf7*. Moreover, we have highlighted in these DC HLA-B27 an upregulation of *Socs3* which could explain the lack of IFN signaling, and a reduced expression of both IL-27 and IL-10 interleukins genes, which could promote the expansion of pathogenic Th17 cells to the detriment of regulatory T cells. Besides, several genes involved in endoplasmic reticulum stress such as *Calr*, *Pdia4* and *Pdia6* were overexpressed in DC from HLA-B27 rats.

Altogether, these results suggest that the expression of HLA-B27 in CD103+ CD4+ splenic DC could be responsible for the defective IFN signaling, and thus play a role in SpA pathogenesis.

**Keywords** : spondyloarthritis, dendritic cell, HLA-B27, transcriptomic study, interferon

## REMERCIEMENTS

*Je tiens à adresser en premier lieu mes remerciements les plus respectueux à mon responsable scientifique et co-directeur du laboratoire, le Pr. Maxime BREBAN, pour m'avoir donné la chance d'intégrer son groupe de recherche sur la spondylarthrite et le modèle du rat transgénique pour le HLA-B27. Il ne m'a pas seulement encouragée, soutenue et encadrée dans mon projet d'ingénieur au CNAM; il a également su me renouveler sa confiance depuis plus de 7 ans en me permettant d'acquérir plus d'autonomie et de responsabilité dans l'accomplissement de mes travaux. Sa disponibilité, son optimisme et son enthousiasme inébranlable m'ont été d'un grand soutien dans la réalisation de ce projet.*

*Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe « inflammation chronique et système immunitaire » sous la codirection du Dr. Gilles CHIOCCHIA, à qui je tiens à exprimer ma profonde gratitude pour m'avoir fait confiance le premier, lors de mon stage de Licence Pro. Je le remercie pour son accueil chaleureux, ses conseils avisés et son soutien continu, toujours dans la bonne humeur.*

*J'adresse mes sincères remerciements à tous les membres de mon jury: au Pr. Philippe POCHART pour m'avoir fait l'honneur d'être mon tuteur pédagogique et pour avoir su se montrer disponible et compréhensif tout au long de l'accomplissement de ce projet. Aux Dr. Olivier HENNEBERT, Christine LE BOUTEILLER et Agnès LEHUEN qui ont accepté sans hésitation d'examiner ce travail. Qu'ils voient en ces quelques lignes le témoignage de ma sincère reconnaissance.*

*Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé à la réalisation de ce projet, à commencer par mes deux binômes successifs, Simon GLATIGNY et Luiza KRAUSE. Deux personnalités bien différentes, mais qui m'ont fait bénéficier chaque jour de leur gentillesse, leur savoir faire, leur enthousiasme et leur générosité. C'est un vrai bonheur de collaborer au quotidien avec des partenaires qui marient si bien efficacité et bonne humeur. Merci pour vos encouragements et votre soutien.*

*Je ne peux que m'incliner devant le maître de la bioinformatique, Nicolas CAGNARD, sans qui ce travail n'aurait pu être réalisé. Merci de m'avoir toujours accueillie chaleureusement pour nos journées d'analyse et de toujours t'être rendu disponible pour répondre à toutes mes questions.*

*Merci à Claudine ANDRE, pour m'avoir permis de m'installer dans son laboratoire et pour les nombreuses discussions enrichissantes que nous avons partagé autour du HLA-B27 ou d'un carré de chocolat.*

*Un grand merci aux membres de la plateforme Genom'IC : Franck, Seb et bien d'autres, pour votre accueil toujours chaleureux, votre disponibilité et votre efficacité redoutable. Un grand merci également à Muriel, Karine et Emmanuelle, de la plateforme de cytométrie Cybio, pour m'avoir accompagnée dans la mise en œuvre des expériences de tri cellulaire.*

*Je tiens à saluer le professionnalisme de Gaëlle et Ludo, animaliers de l'institut Jacques Monod, qui se montrent aux petits soins avec nos lignées de rats transgéniques et sont toujours disposés à nous rendre service malgré un emploi du temps bien rempli.*

*J'adresse mes remerciements les plus chaleureux à l'ensemble des habitants, passés et présents, du 1<sup>er</sup> étage du pavillon Hardy A. Même si aujourd'hui l'heure de la dispersion a sonné, ces quelques années passées à vos côtés ont été un concentré de belles rencontres et de bons moments partagés. Je ne me risquerai pas à énumérer toutes les personnes formidables que j'ai pu rencontrer, mais sachez que je n'oublierai jamais la forte cohésion qui régnait dans ce laboratoire ainsi que l'aide précieuse et amicale que vous m'avez offerte tout au long de mon parcours. Je quitte l'institut Cochin avec une poignée d'entre vous dans mes bagages, mais je ne doute pas d'arriver à tous vous retrouver régulièrement pour de fameuses « biblio » dont nous seuls avons le secret, ou encore lors d'un petit tour à l'Acad' ou au détour d'un « After Lab' ».*

*Je me dois d'adresser mes plus sincères remerciements à mes deux coachs personnels : Jean-grégory CORMIER et Cindy JEANTY, qui m'ont soutenue, divertie, encouragée, motivée, aidée et accompagnée tout au long de ce projet et bien au-delà ! Ces quelques mots ne sauraient exprimer à quel point votre amitié m'est précieuse.*

*Enfin, je souhaite remercier de tout mon cœur mes amis, mes parents et mes sœurs, qui m'ont toujours témoigné un soutien sans faille ainsi qu'une confiance et une affection sans limite.*

# SOMMAIRE

<b>INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX.....</b>	<b>7</b>
<b>ABREVIATIONS.....</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>12</b>
CHAPITRE 1	
SPONDYLARTHRITE.....	13
<i>I. Aspects cliniques de la spondylarthrite .....</i>	<i>13</i>
1. Manifestations cliniques.....	13
1.1. Manifestations articulaires.....	13
a. Atteintes axiales .....	13
b. Atteintes périphériques .....	15
1.2. Manifestations extra-articulaires .....	16
2. Traitements.....	16
<i>II. Epidémiologie et étiologie de la SpA.....</i>	<i>17</i>
1. Epidémiologie .....	18
2. Facteurs environnementaux.....	18
3. Génétique de la SpA : implication de l'allèle HLA-B27 .....	19
CHAPITRE 2	
HLA-B27, MOLECULE DU CMH DE CLASSE I .....	22
<i>I. Structure des molécules du CMH de classe I.....</i>	<i>22</i>
<i>II. Synthèse, repliement et apprêtement des molécules du CMH I.....</i>	<i>24</i>
<i>III. Prise en charge des protéines mal repliées.....</i>	<i>26</i>
CHAPITRE 3	
RATS TRANSGENIQUES POUR LE HLA-B27 .....	29
<i>I. Présentation des lignées de rats transgéniques .....</i>	<i>29</i>
<i>II. Spondylarthrite du rat .....</i>	<i>30</i>
1. Manifestations cliniques de la SpAr.....	30
1.1 Atteinte intestinale.....	30
1.2 Atteintes articulaires .....	31
1.3 Manifestations extra-articulaires .....	32
2. La SpAr, spécifique du HLA-B27.....	33
3. SpAr et stress du réticulum endoplasmique .....	33
4. Facteurs environnementaux.....	35
CHAPITRE 4	
MECANISMES IMMUNOLOGIQUES DE LA SPAR .....	36
<i>I. Identification des acteurs de la SpAr .....</i>	<i>36</i>
1. Lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> .....	36

2. Cellules présentatrices d'antigènes .....	38
2.1 Présentation antigénique et synapse immunologique .....	38
2.2 Implication des CPA dans la SpAr .....	40
II. Cellule dendritique : une piste d'intérêt .....	41
<b>CONTEXTE D'ETUDE .....</b>	<b>46</b>
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>51</b>
<i>Lignées de rats .....</i>	<i>52</i>
<i>Tri magnétique des DC spléniques CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> .....</i>	<i>53</i>
<i>Tri électronique des DC spléniques CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> .....</i>	<i>54</i>
<i>Extraction des ARNs.....</i>	<i>56</i>
<i>Hybridation et analyse des puces d'expression .....</i>	<i>57</i>
<i>Méta-analyse Homme/Rat des données de transcriptome .....</i>	<i>60</i>
<i>RT-PCR quantitative .....</i>	<i>61</i>
<i>Statistiques .....</i>	<i>62</i>
<b>RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>63</b>
RESULTATS .....	64
DISCUSSION .....	80
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>89</b>
CONCLUSIONS .....	90
PERSPECTIVES .....	92
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>95</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>102</b>
<i>Annexe 1 : Préparation des milieux et solutions.....</i>	<i>103</i>
<i>Annexe 2 : Représentation schématique d'un cytomètre de flux.....</i>	<i>104</i>
<i>Annexe 3 : Couples d'amorces utilisés en PCRq .....</i>	<i>105</i>
<i>Annexe 4 : Résultat obtenu en courbe de fusion pour Ifng .....</i>	<i>106</i>
<i>Annexe 5 : Résultat obtenu en courbe standard pour Ifng.....</i>	<i>107</i>
<i>Annexe 6 : Profil d'expression des gènes d'intérêt sélectionnés .....</i>	<i>108</i>

# INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX

## FIGURES

<i>Figure 1. Schéma d'une articulation sacro-iliaque normale, enflammée et ankylosée.</i> .....	14
<i>Figure 2. Atteinte du rachis.</i> .....	14
<i>Figure 3. Schéma d'une articulation arthritique.</i> .....	15
<i>Figure 4. Schéma des enthèses.</i> .....	16
<i>Figure 5. Organisation génomique du CMH.</i> .....	20
<i>Figure 6. Structure d'une molécule de CMH I.</i> .....	23
<i>Figure 7. Organisation de la cavité peptidique.</i> .....	24
<i>Figure 8. Apprêtement et trafic des molécules de CMH I.</i> .....	25
<i>Figure 9. Les différentes composantes de l'UPR.</i> .....	27
<i>Figure 10. Mauvais repliement et dimérisation en surface du HLA-B27.</i> .....	28
<i>Figure 11. Arthrites périphériques développées dans la SpAr.</i> .....	31
<i>Figure 12. Atteintes extra-articulaires de la SpAr.</i> .....	32
<i>Figure 13. Voies de présentation des peptides antigéniques sur les molécules de CMH I et II.</i> .....	39
<i>Figure 14. La synapse immunologique.</i> .....	40
<i>Figure 15. Morphologie en microscopie électronique des sous-populations de DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> et CD4<sup>-</sup>.</i> .....	44
<i>Figure 16. Profil cytométrique des cellules obtenues par tri magnétique.</i> .....	54
<i>Figure 17. Profil cytométrique des cellules obtenues par tri électronique.</i> .....	56
<i>Figure 18. Electrophorégrammes obtenus pour des ARN plus ou moins dégradé.</i> .....	57
<i>Figure 19. Protocole d'hybridation des puces d'expression.</i> .....	59
<i>Figure 20. Etude transcriptomique des DC spléniques CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> du rat HLA-B27.</i> .....	65
<i>Figure 21. Voies de signalisation impliquant les gènes différenciellement exprimés dans les DC HLA-B27.</i> .....	66
<i>Figure 22. Validation de l'expression différentielle des gènes d'intérêt par RT-PCRq.</i> .....	70
<i>Figure 23. Suivi de l'expression des gènes de la voie IFN et de l'IL-10 à différents âges.</i> .....	72
<i>Figure 24. Expression des gènes impliqués dans le stress du RE et l'immunité innée à différents âges.</i> .....	73
<i>Figure 25. Méta-analyse et profil d'expression combiné entre patients atteints de SA et rats HLA-B27.</i> .....	74
<i>Figure 26. Expression des gènes de l'immunité innée et antimicrobienne dans les DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> triées par FACS.</i> .....	76
<i>Figure 27. Expression des gènes d'intérêt dans les DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> triées par FACS.</i> .....	77

<i>Figure 28. Expression des gènes d'intérêt dans les DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> de rats mâles (21-3h x 283-2)F1.</i> .....	79
<i>Figure 29. Modulation de l'axe Ostéopontine/IL-27 par l'IFN<math>\gamma</math> dans les DC.</i> .....	83
<i>Figure 30. Signalisation primaire de l'interféron.</i> .....	85
<i>Figure 31. Structure et fonction des protéines SOCS.</i> .....	86

## **TABLEAUX**

<i>Tableau 1. Prévalence de l'allèle HLA-B27 selon les sous-types de SpA.</i> .....	20
<i>Tableau 2 : Sous-types HLA-B27 les plus étudiés et les plus associés à la SA.</i> .....	21
<i>Tableau 3. Lignées de rats transgéniques pour le HLA-B27 / -B7 et la <math>\beta_2mh</math>.</i> .....	29
<i>Tableau 4 : Marqueurs des différentes populations de DC myéloïdes spléniques.</i> .....	43
<i>Tableau 5. Gènes les plus différenciellement exprimés dans les DC HLA-B27.</i> .....	68
<i>Tableau 6. Gènes liés à l'IFN<math>\gamma</math> parmi les gènes dérégulés chez les DC HLA-B27.</i> .....	69
<i>Tableau 7. Gènes communs différenciellement exprimés dans les macrophages de patients atteints de SA et les DC de rats HLA-B27.</i> .....	75

## ABREVIATIONS

**AINS** : anti-inflammatoires non stéroïdien

**ARé** : arthrites réactionnelles

**ATF6**: activating transcription factor 6

**$\beta_2m$**  :  $\beta_2$ -microglobuline

**$\beta_2mh$**  :  $\beta_2$ -microglobuline humaine

**BSA** : bovine serum albumin (albumine sérique bovine)

**CD4** : cluster of differentiation 4 (cluster de différenciation 4)

**CMH** : complexe majeur d'histocompatibilité

**CPA** : cellule présentatrice d'antigènes

**CXCL9** : Chemokine (C-X-C motif) ligand 9

**CXCR3** : CXC chemokine receptor 3 (récepteur des chimiokines à motif CXC)

**DA** : dark agouti

**DC** : dendritic cell (cellule dendritique)

**EDTA** : ethylenediaminetetraacetic acid (acide éthylène diamine tétra-acétique)

**ERAD** : endoplasmic reticulum-associated degradation

**ERAP1** : endoplasmic reticulum aminopeptidase 1

**GAPDH** : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

**GMCSF** : granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

**HLA** : human leucocyte antigen

**ICAM** : intercellular adhesion molecule

**IFIT** : interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats

**IFN** : interféron

**IL** : interleukine

**IL23R** : récepteur de l'IL-23

**IPA** : ingenuity pathways analysis

**IRE-1** : inositol requiring enzyme 1

**IRF** : interferon regulatory factor

**JAK** : Janus kinase

**kDa** : kilodalton

**LT** : lymphocytes T

**Mb** : mégabase

**MICI** : maladie inflammatoire chronique de l'intestin

**NK** : natural killer

**NRQ** : normalised relative quantity (quantité relative normalisée)

**NTG** : non transgénique

**OPN** : ostéopontine

**Pb** : paires de bases

**PBMC** : peripheral blood mononuclear cell (cellules mononucléée du sang périphérique)

**PBS** : phosphate buffered saline (tampon phosphate salin)

**PCR** : polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)

**PCRq** : PCR quantitative

**PDI** : Protéine disulfide isomérase

**PERK** : PKR-like εR protein kinase

**PGK1** : phosphoglycerate kinase 1

**PR** : polyarthrite rhumatoïde

**RE** : réticulum endoplasmique

**RhPso** : rhumatisme psoriasique

**RIN** : RNA integrity number

**RPMI** : roswell park memorial institute

**SA** : spondylarthrite ankylosante

**SOCS** : Suppressor of cytokine signaling (Supresseur de la signalization de cytokine)

**SpA** : spondylarthrite

**STAT** : signal transducer and activator of transcription

**TAP** : transporter associated with antigen processing

**TCR**: T cells receptor (récepteur des lymphocytes T)

**TGF- $\beta$ 1** : transforming growth factor  $\beta$ 1

**Th17** : T helper cell type 17 (cellule T auxiliaire de type 17)

**TLR** : Toll like récepteur

**T<sub>m</sub>** : melting temperature (temperature de fusion)

**TNF** : tumor necrosis factor

**UPR** : unfolded protein response

**USpA** : formes indifférenciées de SpA

# **INTRODUCTION GENERALE**

# CHAPITRE 1

## SPONDYLARTHRITE

### I. Aspects cliniques de la spondylarthrite

La spondylarthrite (SpA) représente l'un des deux rhumatismes inflammatoires chroniques les plus fréquents avec la polyarthrite rhumatoïde (PR). La SpA peut se présenter sous six formes anatomo-cliniques. Il s'agit de la spondylarthrite ankylosante (SA), du rhumatisme psoriasique (RhPso), des arthrites réactionnelles (ARÉ), des arthrites liées aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (ICI), des formes juvéniles de SpA et des formes indifférenciées de la maladie. Néanmoins, elles se caractérisent toutes par une atteinte inflammatoire, secondairement ossifiante, des articulations axiales et/ou périphériques entraînant leur altération progressive et irréversible. Ces atteintes sont diversement associées à des manifestations inflammatoires extra-articulaires spécifiques.

#### 1. Manifestations cliniques

##### 1.1. Manifestations articulaires

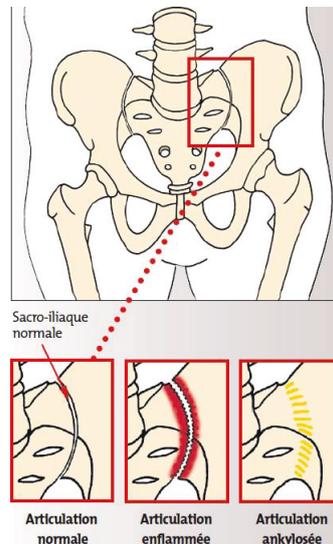
###### *a. Atteintes axiales*

La caractéristique principale de la SpA est l'atteinte du squelette axial, c'est-à-dire au niveau :

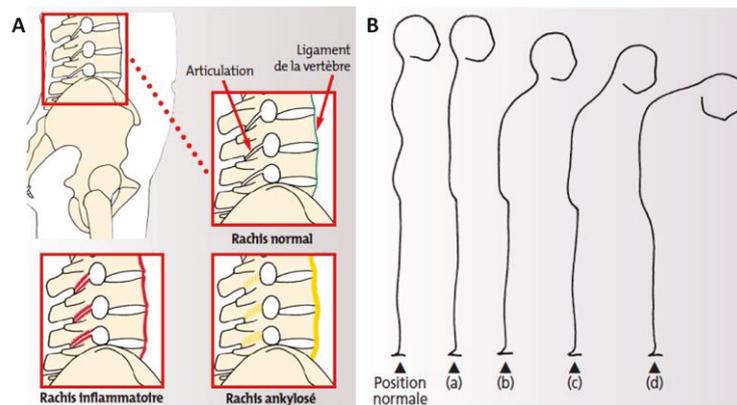
- du bassin (articulations sacro-iliaques) : ces articulations sont situées dans la fesse, entre le sacrum et l'os iliaque. La sacro-iliite est l'inflammation la plus fréquente des manifestations de la SA, forme emblématique de la SpA. L'évolution peut se faire vers l'ankylose articulaire, c'est-à-dire la formation d'un pont osseux qui réunit les deux berges de l'articulation et la fait disparaître (Bollow et al., 2000) (**Figure 1**).

- du rachis (colonne vertébrale) : elle peut se localiser à n'importe quel étage, du rachis cervical au rachis lombaire. L'inflammation siège au niveau des ligaments et des articulations entre les vertèbres. Elle est responsable de douleurs et d'impotence fonctionnelle liée à une diminution de la mobilité du rachis. Dans ce cas, le risque principal est l'évolution de l'inflammation vers une ankylose du rachis (**Figure 2**).

- de la paroi thoracique : constituée du sternum, des clavicules et des côtes, cette région riche en articulations peut être touchée au cours de la SpA et conduire à une diminution des capacités respiratoires.



**Figure 1. Schéma d'une articulation sacro-iliaque normale, enflammée et ankylosée.**  
(D'après Dougados , *Spondylarthrite en 100 questions*, Edition NHA Communication, 2001)



**Figure 2. Atteinte du rachis.**

**(A) Schéma du rachis normal, enflammé et ankylosé. (B) Les signes de l'ankylose rachidienne.**

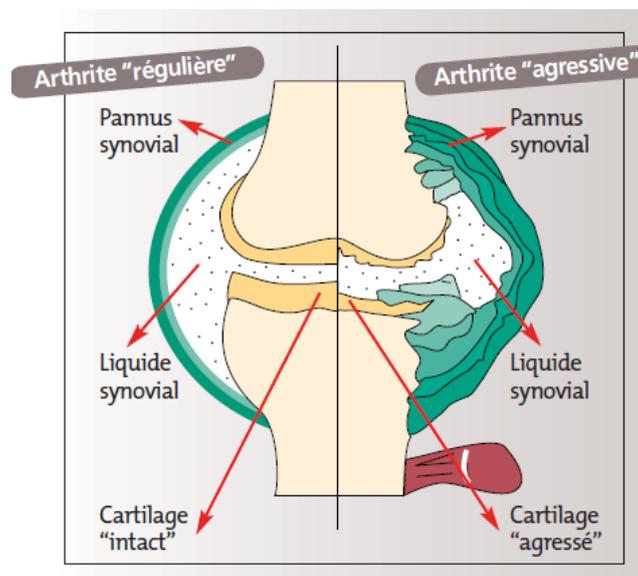
Les attitudes anormales les plus souvent observées sont: **a.** d'abord la perte de la cambrure des reins ; **b.** peut s'ensuivre une position penchée en avant, due à une bosse du dos ; **c.** Peut s'ensuivre une ankylose du cou qui va alors empêcher le malade de relever la tête; **d.** Ici, la gêne peut être très importante, notamment si l'attitude vicieuse est telle que le patient n'arrive pas à voir en face de lui.

(D'après Dougados , *Spondylarthrite en 100 questions*, Edition NHA Communication, 2001)

### b. Atteintes périphériques

Si l'atteinte du squelette axial est une caractéristique fondamentale de la SpA, l'inflammation des articulations périphériques est aussi très fréquente au cours de cette maladie. Même si certaines atteintes périphériques, telles que les arthrites, s'observent au cours d'autres rhumatismes inflammatoires chroniques, elles présentent des particularités physiopathologiques propres à la SpA telle que l'enthèse qui en constitue une cible élective.

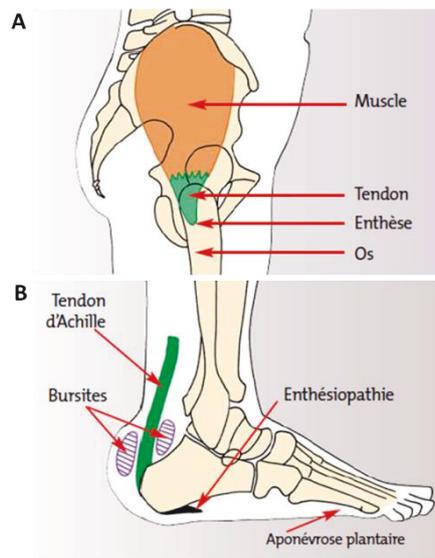
**Les arthrites périphériques** se manifestent par une synovite, inflammation de la membrane synoviale enveloppant l'articulation. Elle se traduit par un épaissement de ce tissu pouvant aller jusqu'à éroder l'os sous-jacent, et entraîner la formation de nodules inflammatoires que l'on appelle des pannus synoviaux. Lorsqu'il en résulte des lésions ostéo-cartilagineuses, on parle d'arthrite destructrice ou érosive (**Figure 3**). Les arthrites périphériques se manifestent cliniquement par des douleurs inflammatoires associées parfois à un gonflement articulaire. Dans la SpA, elles affectent préférentiellement les hanches, les genoux et les chevilles.



**Figure 3. Schéma d'une articulation arthritique.**

(D'après Dougados , Spondylarthrite en 100 questions, Edition NHA Communication, 2001)

**L'enthésite** est l'atteinte inflammatoire des enthèses, zone d'insertion des tendons et des ligaments dans l'os. Elle est la cause majeure de beaucoup de symptômes de la SpA, et notamment du risque d'ankylose. Toutes les enthèses peuvent être atteintes, mais les enthésites siègent de façon préférentielle aux membres inférieurs. L'atteinte la plus fréquente et la plus caractéristique de la SpA est l'enthésite calcanéenne, au niveau du talon (**Figure 4**).



**Figure 4. Schéma des enthèses.**

(A) L'enthèse est la partie terminale du tendon (Point d'attache à l'articulation). (B) Schéma d'une enthésite calcanéenne.

(D'après Dougados , Spondylarthrite en 100 questions, Edition NHA Communication, 2001)

**1.2. Manifestations extra-articulaires**

La SpA est également caractérisée par de nombreuses atteintes non rhumatismales, témoignant du caractère systémique de cette affection. Les plus fréquentes sont :

- une inflammation des muqueuses oculaires, sous la forme d'uvéïte antérieure aiguë.
- une inflammation de la peau et des ongles, sous la forme d'un psoriasis
- une inflammation des muqueuses intestinales, sous la forme d'une MICI, telles que la maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique.

D'autres manifestations extra-articulaires, plus rares, peuvent apparaître chez les patients atteints de SpA telles que des atteintes uro-génitales dont la plus fréquente est l'urétrite aseptique ou bien encore des atteintes cardiaques ou pulmonaires

**2. Traitements**

Les traitements des spondylarthrites sont nombreux et ont pour objectif de vaincre la douleur et l'inflammation et de prévenir les éventuelles complications. On peut ainsi distinguer deux groupes, les traitements symptomatiques et les traitements de fond.

Les traitements symptomatiques comprennent :

- les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) : ils restent le traitement incontournable des SpA car ils permettent le plus souvent d'en contrôler les symptômes. Cependant 25% des patients ne répondent pas aux AINS.
- les corticoïdes : administrés en traitement local par infiltration dans les articulations en cas d'arthrite ou dans les enthésites périphériques
- les antalgiques.

Les traitements de fond « classiques » s'adressent aux patients ne répondant pas ou répondant partiellement aux AINS et aux gestes locaux. De nombreux « traitements de fond » utilisés dans la PR l'ont aussi été dans les SpA, comme la *sulfasalazine* et le *méthotrexate*. Cependant, en dehors de la *sulfasalazine*, aucun de ces traitements n'a démontré formellement son efficacité dans des études contrôlées. Aujourd'hui, une nouvelle génération de traitement de fond est arrivée, avec l'avènement des biothérapies, en particulier les anti-TNF $\alpha$ , qui ont une plus grande rapidité d'action que les traitements de fond « classiques ». Ils bloquent l'action de cette cytokine produite par les cellules de l'immunité en cas d'inflammation et dont la production excessive favorise la persistance de l'état inflammatoire et joue un rôle central dans la progression de la SpA.

La kinésithérapie constitue un complément indispensable aux traitements médicamenteux. La rééducation est indiquée tout au long de la maladie et a pour but de lutter contre les douleurs et l'enraidissement à moyen terme. L'indication chirurgicale au cours de la SpA se limite, quant à elle à certaines situations relativement rares (prothèse, synovectomie).

## II. Epidémiologie et étiologie de la SpA

La SpA est une pathologie fréquente d'origine multifactorielle, son développement nécessitant l'interaction de facteurs génétiques et environnementaux. Sa prévalence varie selon les populations notamment en fonction de la fréquence de l'allèle HLA-B27 du CMH qui reste à ce jour le facteur de prédisposition génétique majeur de la SpA. Concernant les facteurs de l'environnement, ceux-ci sont particulièrement difficiles à mettre en lumière, bien que la flore microbienne semble jouer un rôle important dans le développement de la maladie.

## 1. Epidémiologie

Il est difficile d'évaluer de façon précise la prévalence de la SpA. En effet, celle-ci est estimée entre 0,5 et 2,0% dans les populations caucasiennes (Sieper et al., 2006). Ces variations importantes s'expliquent de plusieurs façons. Tout d'abord, les différences méthodologiques sont importantes et les critères de classification utilisés diffèrent selon les études. Une partie de cette variabilité est également expliquée par la variabilité dans les différentes populations de la fréquence de l'allèle HLA-B27, facteur de prédisposition génétique majeur à la SpA (cf Chap. 1 - II. 3. *Génétique de la SpA : implication de l'allèle HLA-B27*). En effet, jusqu'à 40% des Espagnols peuvent être porteurs du HLA-B27 contre moins de 10% des Français et moins de 5% des Africains (Saraux et al., 2000).

En France, Saraux et ses collaborateurs ont évalué la prévalence de la SpA à 0,3%. La maladie peut survenir à tout âge, mais son terrain de prédilection est l'adulte jeune, la moyenne d'âge de début se situant aux alentours de 26-27 ans. Contrairement aux idées reçues, la prévalence de la SpA semble équivalente chez les femmes et les hommes (0,29% et 0,31% respectivement) bien que la SpA soit probablement moins sévère chez les femmes, expliquant ainsi l'apparente prépondérance masculine en milieu rhumatologique (Saraux et al., 2005).

## 2. Facteurs environnementaux

Les facteurs déclenchant la SpA restent, à ce jour, inconnus dans la plupart des cas, que ce soit pour l'initiation de cette maladie ou pour son évolution par poussées. Néanmoins, il a été montré que la flore bactérienne joue un rôle déclencheur, notamment dans les ARÉ. Celles-ci ne représentent pas plus de 2% de l'ensemble des cas de SpA et se définissent par une poussée d'arthrite stérile survenant suite à une infection bactérienne. Il s'agit de bactéries à tropisme digestif telles que *Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella* et *Campylobacter*, et urétral telles que *Chlamydia trachomatis*.

Dans la SA, le rôle de *Klebsiella pneumoniae* a été évoqué sans pouvoir démontrer l'implication directe de cette bactérie (Ahmadi et al., 1998) (Zambrano-Zaragoza et al., 2005) et une étude récente de Syrbe *et al.*, montre un enrichissement des cellules Th1 (cellules T auxiliaires de type 1) spécifiques de la bactérie *Escherichia coli* dans les articulations

enflammées de patients atteints de SA. Ces résultats suggèrent l'implication possible d'antigènes bactériens d'origine intestinale dans la pathogenèse de la SA (Syrbe et al., 2012). Dans le RhPso, le rôle des streptocoques cutanés dans le déclenchement des manifestations articulaires est une hypothèse défendue par certains (Thomssen et al., 2000).

Il existe d'autres arguments évoquant un lien entre facteurs microbiens commensaux et SpA. Des études réalisées chez le rat transgénique pour le HLA-B27 et la  $\beta_2$ -microglobuline humaine ( $\beta_2$ mh), modèle animal de la SpA que nous présenterons plus précisément dans le Chapitre 3, ont montré que lorsqu'on élève ces rats en isolateur stérile (en condition « germ-free »), aucune inflammation des intestins et des articulations n'est détectée d'un point de vue clinique et histologique (Taurog et al., 1994). La reconstitution de leur flore bactérienne intestinale suffit à provoquer l'apparition de la maladie. De la même façon, la colonisation monospécifique par *Bacteroides vulgatus* suffit à induire, chez ces animaux, le développement d'une inflammation articulaire et intestinale (Rath et al., 1996). Les résultats de ces études suggèrent fortement que le microbiote intestinal est un inducteur de l'inflammation au niveau de la muqueuse intestinale, mais aussi au niveau des articulations, par la diffusion vers ces dernières, soit de constituants microbiens, soit des cellules responsables de la réponse immunitaire, telles que les lymphocytes T (Jacques and Elewaut, 2008); (Breban et al., 2011).

### 3. Génétique de la SpA : implication de l'allèle HLA-B27

Le déterminisme génétique de la SpA est illustré par une agrégation familiale de la maladie ainsi qu'un taux de concordance extrêmement élevé entre jumeaux monozygotes (50-75 %) (Brown et al., 1997). En outre, le risque relatif chez un apparenté de premier degré d'un patient est 40 à 60 fois plus élevé que celui observé dans la population générale. Ces résultats suggèrent que les facteurs de prédisposition génétique agissent selon un modèle dominant (Brown et al., 1996). De plus, la dimension génétique se situe au cœur même de la définition de la maladie puisqu'à l'origine du regroupement des cinq entités qui la composent, il y a, entre autres arguments, le fait qu'elles présentent un terrain génétique commun. En effet, tous les sous-types de SpA présentent une forte association avec un allèle spécifique du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité), le *HLA-B27*. Ce facteur de prédisposition génétique a été découvert au début des années 1970, suite à un typage sérologique de patients atteints de SA (Caffrey and James, 1973). Elle a été confirmée depuis pour tous les autres sous-types de

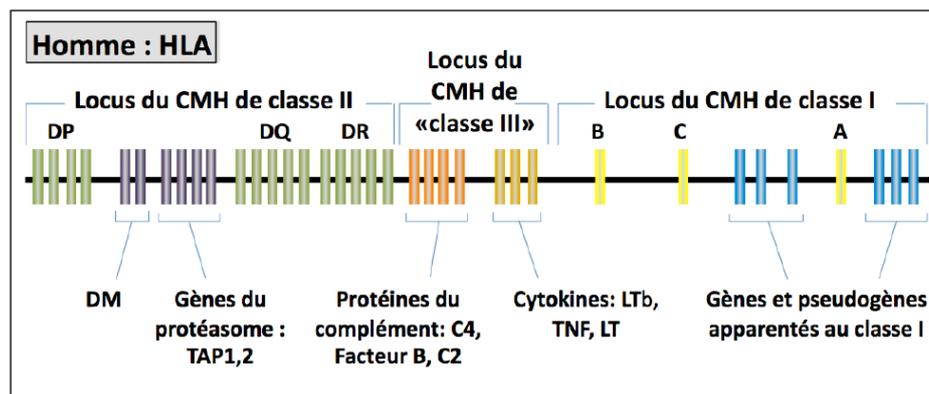
SpA (**Tableau 1**). Cette association est l'une des plus fortes connues à ce jour entre un allèle du CMH et une maladie humaine. Cependant, malgré le poids génétique extrêmement fort du *HLA-B27* dans la SpA, sa présence n'est ni nécessaire, ni suffisante pour la survenue de la maladie.

**Tableau 1. Prévalence de l'allèle *HLA-B27* selon les sous-types de SpA.**

<i>Sous-types SpA</i>	<i>Prévalence de HLA-B27 (%)</i>
Spondylarthrite ankylosante	≥ 90%
Arthrite réactionnelle	70%
Rhumatisme psoriasique	60-70%
Spondylarthrites des entérocolopathies inflammatoires	50-60%

(Reveille, J.D., Recent studies on the genetic basis of ankylosing spondylitis. *Curr Rheumatol Rep* 11, 340–348, 2009)

Le locus du CMH, comprenant le système HLA (Human Leucocyte Antigens), est situé sur le bras court du chromosome 6 (en 6p21.3). Il s'étend sur 3,6 Mb et comprend 226 gènes. Il est divisé en trois régions codant pour des produits différents de par leur localisation, leur structure et leurs fonctions (**Figure 5**).



**Figure 5. Organisation génomique du CMH.**

Ce locus est constitué de trois sous-locus : les locus du CMH de classe I, II et III. Le locus CMH I code pour les molécules de HLA-A, -B et -C. Le locus CMH II code pour les molécules HLA-DP, -DQ, -DR, -DM et pour les molécules TAP1 et TAP2 (transporteur associé au chargement de peptides). Le locus CMH III code pour certaines protéines du complément et pour des cytokines comme le TNF. (D'après Abbas A.K. et Lichtman A.H., *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique*, Edition Elsevier, 2005)

A ce jour, plus d'une centaine de sous-types de HLA-B27 ont été décrits, dont l'ancêtre commun semble être HLA-B\*2705 (*Anthony Nolan Trust database, <http://hla.alleles.org>*). Tous ces sous-types diffèrent les uns des autres par un ou plusieurs acides aminés des chaînes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  du domaine de présentation de l'antigène. La plupart de ces sous-types ont été découverts trop récemment et sont beaucoup trop rares pour pouvoir déterminer s'ils sont associés à la SpA. L'association entre le HLA-B27 et la SA a été observée avec presque tous les allèles dont la fréquence était suffisante pour pouvoir effectuer l'étude comme HLA-B\*2705, -B\*2704, -B\*2702 et -B\*2707 pour les principaux d'entre eux (**Tableau 2**). Cependant, deux sous-types semblent peu ou pas associés à la SA : HLA-B\*2706 et -B\*2709 (Reveille and Maganti, 2009).

**Tableau 2 : Sous-types HLA-B27 les plus étudiés et les plus associés à la SA.**

Principaux sous-types	Populations
<b>HLA-B*2705</b>	Caucasienne & monde entier
<b>HLA-B*2704</b>	Extrême Orient
<b>HLA-B*2702</b>	Caucasienne méditerranéenne
<b>HLA-B*2707</b>	Asie du Sud, Moyen-Orient

Néanmoins, même si 80 à 90 % des patients sont porteurs du HLA-B27 en France, contre 7,5% des individus dans la population générale, seule une petite partie (entre 1 et 5%) des individus HLA-B27 positifs développe la maladie (Brebant et al., 2006). Cette observation indique l'existence d'autres facteurs génétiques de prédisposition à la SpA. Ces dernières années, des études d'association portant sur l'ensemble du génome ont d'ailleurs permis d'identifier de nouveaux gènes situés hors du CMH et associés à la SA, tels que *IL23R* et *ERAPI* (Burton et al., 2007) (Reveille et al., 2010).

## CHAPITRE 2

### HLA-B27, MOLECULE DU CMH DE CLASSE I

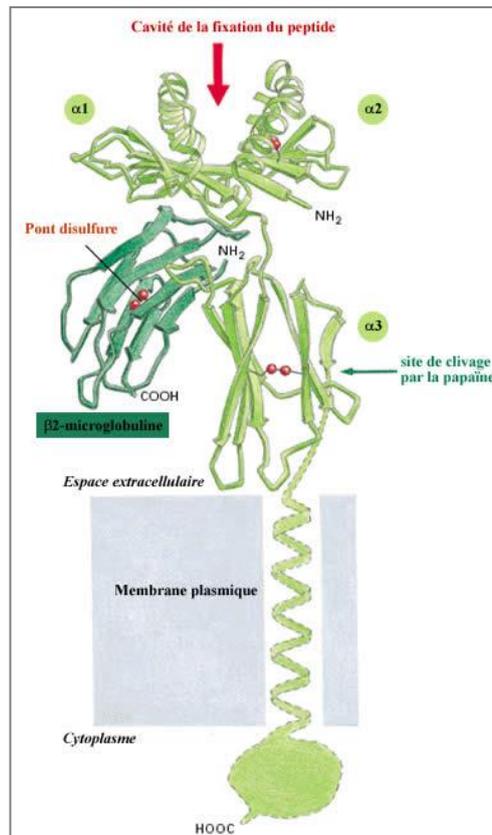
Les molécules du CMH de classe I sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique (RE). Elles ont une distribution ubiquitaire, mais sont le plus abondamment exprimées par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) que sont les macrophages ou encore les cellules dendritiques (DC), qui se situent au cœur de mon projet. La fonction des molécules du CMH est de présenter des antigènes aux lymphocytes T (LT). Classiquement, une molécule de CMH de classe I présente des antigènes endogènes aux LT CD8<sup>+</sup> alors qu'une molécule de classe II présentera plutôt des antigènes exogènes aux LT CD4<sup>+</sup>.

#### I. Structure des molécules du CMH de classe I

Les molécules du CMH de classe I (CMH I) sont des glycoprotéines transmembranaires nécessaires à l'établissement d'une immunité adaptative *via* l'activation spécifique de LT. Elles sont constituées d'une chaîne lourde  $\alpha$  polymorphe de 45 Da, associée de façon non covalente à une chaîne légère invariante de 12 Da, la  $\beta$ 2-microglobuline ( $\beta_2m$ ) (**Figure 6**).

La  $\beta_2m$  est formée de 99 acides aminés organisés en deux feuillets  $\beta$  plissés, reliés par un pont disulfure. Cette molécule a une structure globulaire très compacte correspondant à celle des molécules de la superfamille des immunoglobulines. La chaîne lourde  $\alpha$ , quant à elle, est formée de trois domaines extracellulaires  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$ , d'une région transmembranaire et d'une région cytoplasmique. Chacun des trois domaines extracellulaires comprend environ 90 acides aminés. Le segment transmembranaire comprend 25 résidus d'acides aminés essentiellement hydrophobes et traverse la bicouche lipidique sous forme d'une hélice  $\alpha$ . Le domaine cytoplasmique hydrophile, long de 30 à 40 résidus, peut être phosphorylé *in vivo* (**Figure 6**).

Toutes les molécules de classe I contiennent deux ponts disulfures conservés. Le premier se forme entre les résidus cystéines 203 et 259 du domaine  $\alpha_3$ . Le second se forme quant à lui entre les résidus cystéines 101 et 164 situés à l'endroit du site de fixation peptidique. Ces deux ponts disulfures sont essentiels pour l'assemblage de la molécule de classe I.

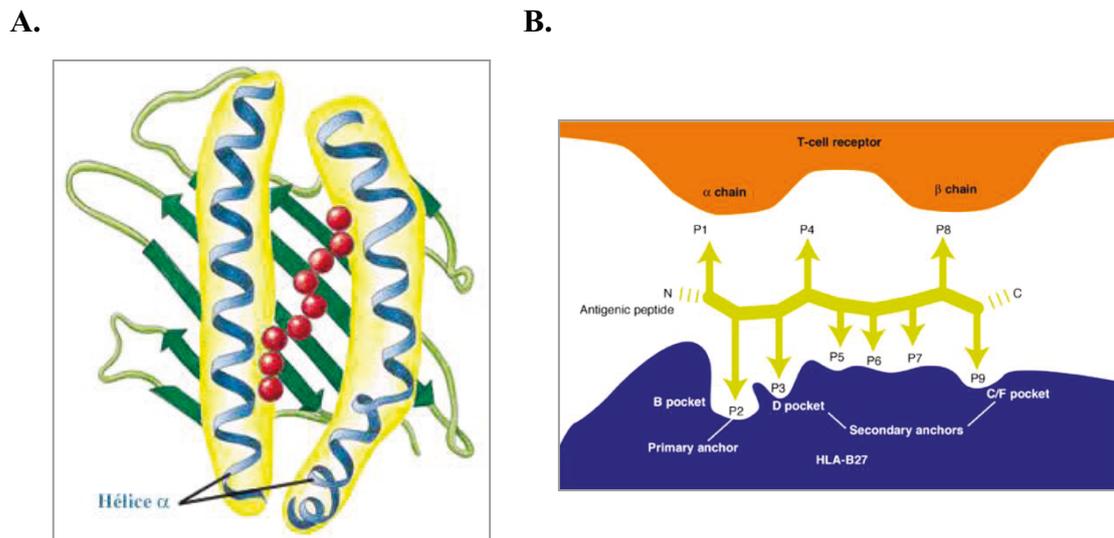


### Figure 6. Structure d'une molécule de CMH I.

Les molécules du C H de classe I sont formées par l'association non covalente d'une chaîne légère non polymorphe, la  $\beta_2m$ , et d'une chaîne lourde  $\alpha$  polymorphe. La chaîne lourde  $\alpha$  est constituée d'un court domaine intracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine extracellulaire formé par les trois sous-domaines  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$ . Les domaines  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  forment la cavité de liaison du peptide.

Les domaines  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  forment la cavité peptidique dont le fond est constitué de feuillettes  $\beta$  anti-parallèles et les parois latérales d'hélices  $\alpha$  anti-parallèles (**Figure 7A**). Les parois de cette cavité dessinent des saillies et des poches avec lesquelles interagissent les chaînes latérales des acides aminés constituant les peptides antigéniques. Le polymorphisme des acides aminés bordant la cavité peptidique est responsable d'une variation dans la position de ces poches et saillies. Ceci explique les différentes affinités de liaison aux peptides selon les allèles des molécules de CMH. A cet égard, il est à noter que le gène HLA-B est le plus polymorphe du génome humain.

La cavité peptidique des CMH I possède trois points d'ancrage pour la présentation des peptides : la poche B pour le deuxième acide aminé du peptide (P2), la poche D pour le troisième acide aminé (P3) et la poche C/F pour l'acide aminé en position C-terminale (Figure 7B).



### Figure 7. Organisation de la cavité peptidique.

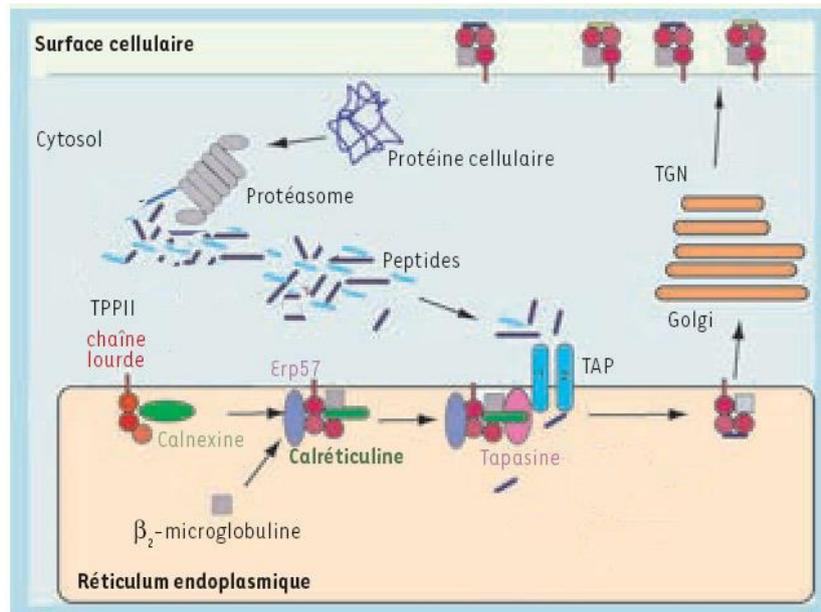
(A) Cavité de liaison du peptide. Elle est composée d'un « plancher » en feuillet  $\beta$  et de deux « berges » en hélice  $\alpha$ . (B) Schéma de la représentation d'un peptide antigénique par la molécule HLA-B27 et de sa reconnaissance par le récepteur T : exemple d'un nonamère. Les résidus P2, P3 et P9 sont les points d'ancrage du peptide, respectivement dans les poches B, D et C/F, formés par le sillon peptidique du HLA-B, P2 étant le point d'ancrage principal.

(D'après Bowness P, *Identification of T cell receptor recognition residues for a viral peptide presented by HLA B27*, Eur J Immunol 24 (10), pp. 2357-2363, 1994)

## II. Synthèse, repliement et apprêtement des molécules du CMH I

La chaîne lourde des molécules HLA de classe I est synthétisée dans la membrane du RE, où elle est prise en charge par la calnexine. Cette molécule permet à la chaîne protéique en cours de synthèse de débiter son repliement. La chaîne lourde se dissocie ensuite de la calnexine et s'associe à la  $\beta_2m$  et à la calréticuline avant d'intégrer le complexe de chargement de peptide. Ce complexe est constitué des deux sous-unités TAP-1 et TAP-2, de la tapasine et de l'Erp57, une oxydoréductase soluble. A ce stade, la molécule de classe I termine son repliement pour acquérir sa conformation tertiaire permettant le chargement du peptide. Le chargement du peptide dans la cavité peptidique de la chaîne lourde stabilise

l'hétérodimère C H I/ $\beta_2m$  et permet sa dissociation du transporteur TAP. La molécule de C H I correctement repliée et chargée d'un peptide de haute affinité est maintenant capable de quitter le RE et d'être transférée à la surface cellulaire *via* les vésicules de l'appareil de Golgi. (**Figure 8**).



**Figure 8. Apprêtement et trafic des molécules de CMH I.**

La chaîne lourde d'une molécule de C H I est synthétisée au niveau de la membrane du RE où elle est prise en charge par la calnexine et l'Erp57. Cette chaîne lourde va ensuite interagir avec la  $\beta_2m$  et la calréticuline, puis avec la tapasine et le transporteur TAP, pour former le complexe de chargement de peptides. Les peptides transportés dans le RE, vont se fixer sur la molécule de CMH I et ainsi stabiliser le complexe chaîne lourde/ $\beta_2m$ . La molécule de classe I complète va alors être adressée à la membrane plasmique, où elle a pour fonction de présenter un peptide aux LT CD8<sup>+</sup>.

(D'après Van Endert P, *Apprêtement des antigènes présentés par les molécules de classe I du CMH*, Médecine/sciences, 22 (8-9), p. 727-732, 2006)

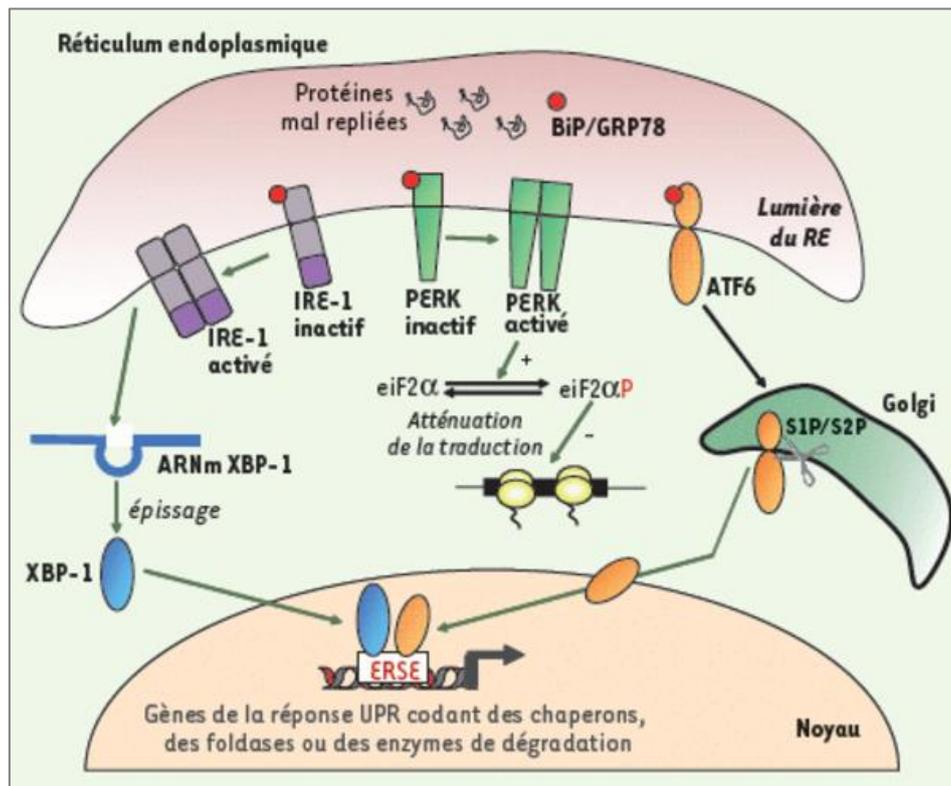
Les peptides présentés par les molécules du CMH I sont généralement issus de la dégradation des protéines endogènes. Au cours de leur synthèse ou bien en cas de dénaturation, les protéines du cytosol sont associées à des protéines de stress, notamment l'ubiquitine, et acheminées vers un complexe d'enzymes protéolytiques appelés protéasome. Les peptides de 8 à 11 acides aminés, produits par le protéasome, sont ensuite transportés vers la lumière du RE par un système de transporteur de peptides comprenant notamment les protéines TAP-1 et TAP-2 (Transporter associated with Antigen Processing), dépendantes de l'ATP et codées par des gènes polymorphes de la région de classe II du CMH. Ces transporteurs agissent comme un filtre, sélectionnant les peptides selon leur taille et leur conformation.

### III. Prise en charge des protéines mal repliées

La lumière du RE contient une grande concentration de protéines chaperonnes, d'enzymes qui modifient post-traductionnellement les protéines et d'autres facteurs qui facilitent le repliement des polypeptides nouvellement synthétisés. Les « foldases », telles que les protéines disulfide isomérases (PDI), jouent un rôle majeur dans le bon repliement des protéines dans le RE. Ce sont des enzymes qui catalysent, par oxydo-réduction, le réarrangement correct des ponts disulfure des protéines néo-synthétisées. Ce sont des protéines chaperonnes qui préviennent ainsi l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE.

Les protéines qui n'acquièrent pas leur conformation native, à cause de mutations génétiques, d'un stress cellulaire ou tout simplement d'évènements aléatoires, peuvent perturber le fonctionnement de la cellule. Pour contrecarrer les conséquences d'une accumulation de protéines mal repliées, ces molécules retenues dans le RE sont le plus souvent dégradées : il s'agit du mécanisme d'ER-Associated Degradation (ERAD). Pendant l'ERAD, les protéines mal repliées sont prises en charge par le protéasome 26S dans le cytoplasme. Pour cela, les protéines doivent d'abord être transférées du RE au cytoplasme, par un système de transport que l'on appelle rétrotranslocation, et être ubiquitinilées pour une meilleure prise en charge par le protéasome. Ce mécanisme de dégradation est d'autant plus important qu'une accumulation trop importante de protéines mal repliées peut induire une réponse appelée UPR (Unfolded Protein Response), pouvant mener à l'apoptose de la cellule.

L'UPR se déclenche suite à l'activation de trois protéines transmembranaires du RE: PERK (PKR-like ER-associated protein kinase), ATF6 (activating transcription factor 6) et IRE-1 (inositol requiring enzyme 1). L'activation de ces trois protéines est provoquée par toutes situations conduisant à une altération de la fonction du RE (accumulation de protéines mal repliées, modifications de l'homéostasie calcique) conduisant à leur dissociation de la protéine chaperonne Bip/GRP78 qui les maintient dans un état inactif. L'activation des facteurs de transcription XBP-1 et ATF6 conduit à la transcription de gènes codant pour des protéines chaperonnes majeures, telles que BiP/GRP78 et GRP94, de protéines impliquées dans le système ERAD et d'enzymes participant à la maturation des protéines telles que les PDI. Une forte induction de l'expression de ces gènes dans des cellules témoigne ainsi d'une réponse à un stress du RE (**Figure 9**).



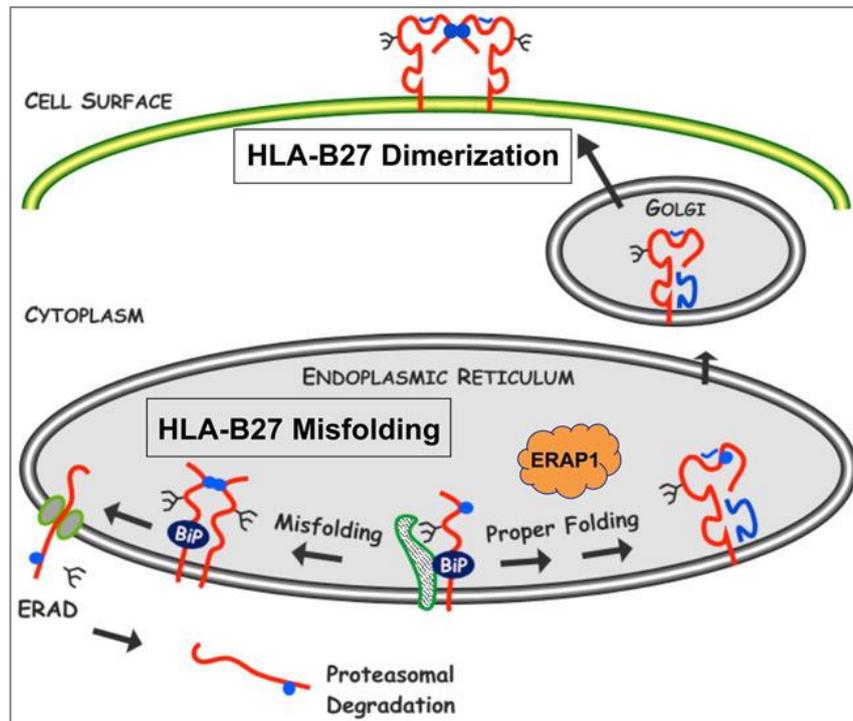
**Figure 9. Les différentes composantes de l'UPR.**

L'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE entraîne une dissociation de Bip/GRP78 et l'activation des trois protéines de la réponse UPR, PERK, IRE1 et ATF6. Ces trois protéines vont alors initier trois voies de signalisation qui vont aboutir à l'activation de gènes-cible de la réponse UPR.

(D'après Foufelle F, *La réponse UPR - Son rôle physiologique et physiopathologique*, Med. Sciences, 2007)

Ainsi, l'UPR a pour fonctions majeures de ralentir la synthèse protéique globale, de synthétiser de nouvelles protéines chaperonnes ou des « foldases » pour stimuler les processus de repliement, d'entraîner vers la dégradation les protéines mal repliées, et de déclencher l'apoptose de la cellule quand les processus précédents ont échoué.

Depuis la découverte de l'association entre l'allèle HLA-B27 et la SpA, ses mécanismes physiopathologiques restent encore inexpliqués malgré l'émergence, ces dernières années, de plusieurs théories se basant sur les particularités immunobiochimiques du HLA-B27, telles que : son répertoire peptidique spécifique, son repliement lent et sa tendance au mauvais repliement ainsi que sa capacité à former des homodimères covalents reconnus par des récepteurs leucocytaires (**Figure 10**).



**Figure 10. Mauvais repliement et dimérisation en surface du HLA-B27.**

Les chaînes lourdes du HLA-B27 nouvellement synthétisées présentent trois caractéristiques de « misfolding » : (1) association stable et prolongée avec la protéine Bip, (2) formation de dimères covalents et de possible oligomères, (3) augmentation de l'ERAD. Le HLA-B27 a également tendance à former, à partir de la surface cellulaire et via son recyclage par endocytose, des homodimères qui peuvent s'exprimer à la surface cellulaire. Les chaînes lourdes sont en rouge, la  $\beta_2m$  et le peptide en bleu. Les boules bleues représentent la Cys67. D'autres Cys sont impliquées dans la formation de ponts disulfures aberrants. (D'après Colbert R A, The immunobiology of HLA-B27 : variations on a theme, Curr Mol Med, 4 (1), pp. 21-30, 2004)

Ces dernières années, les modèles animaux transgéniques pour la molécule HLA-B27 ont été particulièrement utiles pour approfondir nos connaissances sur l'implication du HLA-B27 dans la SpA.

## CHAPITRE 3

# RATS TRANSGENIQUES POUR LE HLA-B27

### I. Présentation des lignées de rats transgéniques

En 1990, Joel Taurog et Robert Hammer ont produits plusieurs lignées de rats transgéniques pour la molécule HLA-B\*2705 et la  $\beta_2m$  humaine (Hammer et al., 1990). Ces différentes lignées ont été générées par micro-injection d'ADN génomique humain dans des œufs fécondés de rat. Plusieurs copies de l'allèle HLA-B\*2705 (allèle ancestral parmi l'allotype HLA-B27), provenant d'un patient atteint de SA, et du gène de la  $\beta_2m$  humaine ( $\beta_2mh$ ) ont ainsi été injectées. Le nombre de copies intégrées s'est fait de manière aléatoire en un site unique du génome et reste propre à chaque lignée (Hammer et al., 1990) (**Tableau 3**).

**Tableau 3. Lignées de rats transgéniques pour le HLA-B27 / -B7 et la  $\beta_2mh$ .**

Lignées	Allèles HLA-B	Nombre de copies du transgène		Fond génétique	Développement de la maladie
		HLA-B	$\beta_2mh$		
33-3	B*2705	55	28	F344	Oui
21-4H	B*2705	150	90	Lewis	Oui
21-4L	B*2705	6	6	Lewis	Non
21-3H	B*2705	40	30	Lewis	Oui
21-3h	B*2705	20	15	Lewis	Non
283-2	-	-	35	Lewis	Non
120-4H	B*0702	52	26	Lewis	Non
120-4H	B*0702	52	26	F344	Non

L'observation des différentes lignées de rats transgéniques ainsi obtenues a permis de montrer que seuls les rats des lignées surexprimant le HLA-B27 développent de manière spontanée, à partir de 6 semaines, une maladie inflammatoire proche de la SpA humaine que nous appellerons "SpA du rat" (SpAr). En effet, il en existe deux phénotypes, dont l'apparition dépend surtout du niveau d'expression des transgènes HLA-B27 et  $\beta_2mh$ .

Le premier de ces phénotypes a été décrit dans les lignées de rats ayant l'expression la plus forte du HLA-B27, à savoir les lignées 21-4H et 21-3H sur fond Lewis, et la lignée 33-3 sur fond Fisher 344 (F344) (**Tableau 3**). Il combine une inflammation intestinale, des arthrites, des lésions cutanées et unguéales d'allure psoriasique ainsi qu'une inflammation génitale chez les mâles. En dehors de l'appareil génital, il n'y a globalement pas de prédominance de l'atteinte selon le sexe. Toutes ces atteintes, qui seront développées plus loin dans ce mémoire, font du rat transgénique pour le HLA-B27 et la  $\beta_2m$  humaine un excellent modèle d'étude de la SpA.

Le deuxième phénotype malade s'observe chez des rats ayant intégré un nombre plus faible de copies du HLA-B27, issus de la lignée 21-3h, mais seulement après croisement avec la lignée 283-2 surexprimant la  $\beta_2m$  humaine ((21-3h x 283-2)F1) (**Tableau 3**). Dans ce cas, l'inflammation ne touche que les mâles. Il s'agit d'arthrites sévères, incluant une sacro-iliite et des lésions de type spondylite, ainsi que le développement d'une orchite. En revanche, ces rats ne développent pas d'atteinte intestinale, ce modèle étant donc plus proche de la SA axiale isolée (Tran et al., 2006).

## II. Spondylarthrite du rat

### 1. Manifestations cliniques de la SpAr

La SpAr se développe de manière spontanée chez les rats transgéniques âgés de 6 à 10 semaines. En fonction des lignées, elle combine une inflammation gastro-intestinale, des arthrites périphériques, des lésions cutanées de type psoriasis et une inflammation génitale chez les mâles.

#### 1.1 Atteinte intestinale

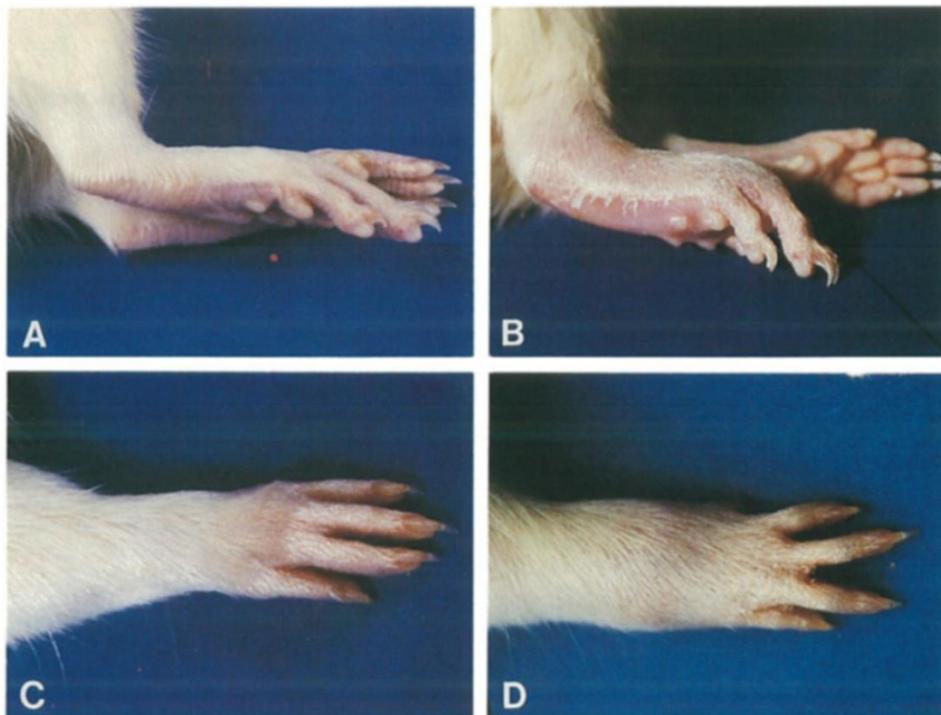
Il s'agit du premier signe clinique observé chez les rats développant la maladie. Cette atteinte correspond à une inflammation de l'intestin qui se caractérise par une diarrhée s'aggravant au cours du temps et pouvant devenir hémorragique. D'un point de vue histologique, la distribution et la sévérité des lésions varient mais celles-ci sont généralement prédominantes dans le côlon et le cæcum dont l'aspect correspond à celui de la rectocolite hémorragique chez l'Homme. Dans ces lésions intestinales, on observe une infiltration de la lamina propria par des cellules inflammatoires (LT, macrophages et polynucléaires

neutrophiles), une hyperplasie des cellules épithéliales ainsi que la formation d'abcès et/ou la destruction des cryptes intestinales dans les zones les plus enflammées (Hammer et al., 1990).

Dans les lignées de rats ayant une inflammation intestinale, celle-ci est constante, ce qui est très largement supérieur à la prévalence de cette atteinte au cours de la SpA humaine. En effet, chez l'Homme, l'atteinte inflammatoire intestinale ne survient que chez 5 à 10% des patients atteints de SpA. Par ailleurs, pouvant toucher tout le tube digestif, cette atteinte est souvent classée en « maladie de Crohn » plutôt qu'en « rectocolite hémorragique » dont les atteintes se limitent au gros intestin et au rectum.

## 1.2 Atteintes articulaires

A ces atteintes inflammatoires intestinales s'associent des manifestations articulaires. Il s'agit d'arthrites aiguës qui prédominent aux pattes arrières. Toutefois, on peut également observer une inflammation des articulations du carpe et des doigts bien que celle-ci soit moins fréquente (Hammer et al., 1990) (**Figure 11**).



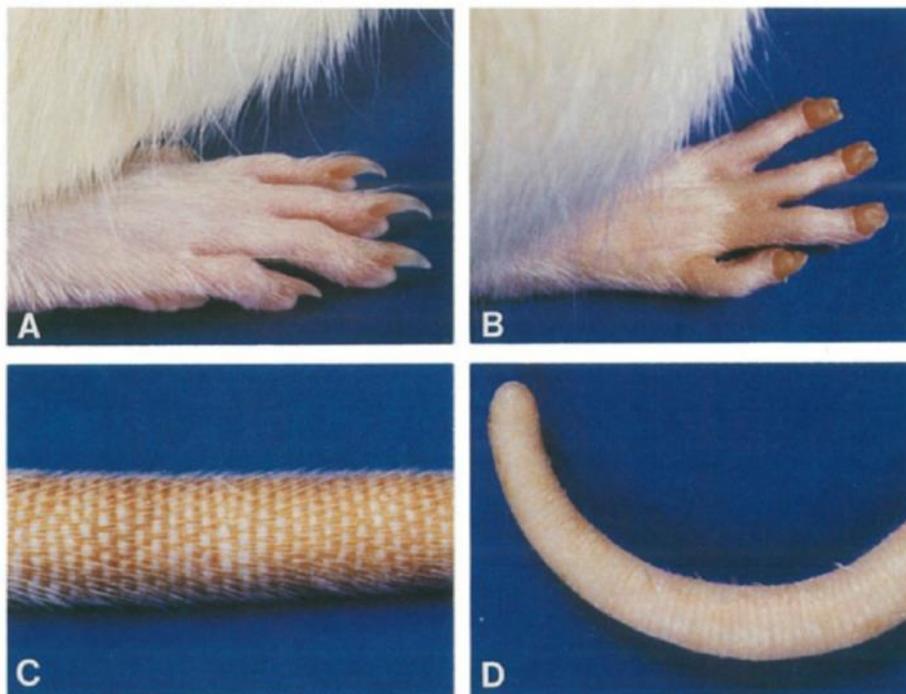
**Figure 11. Arthrites périphériques développées dans la SpAr.**

(A) Pattes postérieures normales chez un rat non transgénique. (B) Pattes postérieures arthritiques chez un rat transgénique surexprimant le HLA-B27 et la  $\beta_2m$ . (C) Pattes antérieures normales chez un rat non transgénique. (D) Pattes antérieures arthritiques chez un rat transgénique surexprimant le HLA-B27 et la  $\beta_2m$ . (Robert Hammer et al. « Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human  $\beta_2m$ . » *Cell* 1990;63:1099–112)

Contrairement à l'atteinte intestinale qui est constamment présente dans ces lignées (**Tableau 3**), les arthrites surviennent de façon plus variable. Elles touchent aussi bien les mâles que les femelles et leur analyse histologique montre une synovite hyperplasique, œdémateuse et infiltrée par un grand nombre de lymphocytes, de plasmocytes et de neutrophiles. A l'instar de ce qui est observé chez l'Homme, un pannus synovial se forme, érodant l'os et détruisant le cartilage de l'articulation. Une inflammation du squelette axial a également été décrite, avec des enthésites au niveau de l'attachement de l'anneau fibreux sur les vertèbres.

### 1.3 Manifestations extra-articulaires

Les rats présentent, de façon variable, des lésions de la peau et des ongles, proches histologiquement du psoriasis chez l'Homme mais aussi une folliculite, une alopecie (perte de poils) et une dystrophie des ongles (Hammer et al., 1990) (**Figure 12**).



**Figure 12. Atteintes extra-articulaires de la SpAr.**

(A) Doigts et ongles normaux chez un rat non transgénique. (B) Alopecie des doigts et hyperkeratose dystrophique des ongles chez un rat transgénique surexprimant le HLA-B27 et la  $\beta_2m$ . (C) Queue normale chez un rat non transgénique. (D) Atteintes cutanées de la queue chez un rat transgénique surexprimant le HLA-B27 et la  $\beta_2m$ , montrant un œdème, une alopecie, et une desquamation masquant la structure normale striée. (Robert Hammer et al. « Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human  $\beta_2m$ : an animal model of HLA-B27-associated human disorders. » *Cell* 1990;63:1099–112)

Il a également été décrit une inflammation du tractus génital chez les mâles caractérisée par une orchite et une épидидymite, responsable de leur stérilité. Enfin, plus rarement, il a été observé des myocardites et des uvéites.

## 2. La SpAr, spécifique du HLA-B27

L'observation des rats transgéniques a permis d'aboutir à plusieurs conclusions, affinant ainsi notre compréhension du mécanisme physiopathologique de la SpAr.

Tout d'abord, cette pathologie est spécifique de la molécule HLA-B27. En effet, les rats de la lignée 120-4, transgéniques pour le HLA-B7 qui est un allèle très proche du HLA-B27 dans sa composition en acides aminés, ne développent pas la maladie. En outre, l'apparition de la SpAr dépend également du niveau d'expression de la protéine HLA-B27, déterminé par le nombre de copies du transgène (Taurog et al., 1993), puisque seuls les rats ayant intégré un nombre élevé de copies développent la pathologie (**Tableau 3**). Ceci s'illustre également par le fait que la lignée 21-3 ne développe la maladie qu'à l'état homozygote (21-3H), confirmant ainsi l'importance du niveau d'expression du HLA-B27 (Taurog et al., 1993). A cet égard, il a d'ailleurs été observé une plus forte expression du HLA-B27 à la surface des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs) de patients atteints de SA en comparaison à des PBMCs de témoins sains. Il est important de souligner que cette augmentation est indépendante de l'état d'activation des cellules, du niveau général d'expression des HLA de classe I à la surface cellulaire et de la progression de la maladie (Cauli et al., 2002).

En conclusion, toutes les manifestations que nous avons décrites précédemment sont spécifiques de la molécule HLA-B27 et nécessitent sa surexpression. A noter cependant, que l'apparition de la SpAr dépend également du fond génétique du rat. En effet, si les fonds *Fischer* ou *Lewis* sont susceptibles au développement de la SpAr, les rats *Dark Agouti* (DA) présentent une résistance à l'apparition de la maladie, confirmant ainsi le caractère multi-génétique de cette maladie observée chez l'Homme (Taurog et al., 1999).

## 3. SpAr et stress du réticulum endoplasmique

Ces dernières années, rappelons que plusieurs équipes ont montré que la chaîne lourde de la protéine HLA-B27 se repliait plus lentement que d'autres molécules HLA, provoquant

leur accumulation dans le RE et leur élimination par le système ERAD. D'autre part, nous avons évoqué qu'elle avait la capacité de former des homodimères covalents de chaînes lourdes dans le RE et à la surface cellulaire. Ces caractéristiques ont été regroupées sous le terme de « misfolding » du HLA-B27. L'hypothèse émise, depuis lors par l'équipe de R A Colbert, est que ce « misfolding » aurait comme conséquence de déclencher un stress du RE, conduisant de ce fait à l'activation de l'UPR.

En effet, Turner et *al.* ont montré que les macrophages de rats transgéniques pour le HLA-B27 et la  $\beta_2m$  humaine présentaient une activation des gènes induits lors d'une réponse UPR. Dans ce modèle, l'UPR s'expliquerait par l'accumulation de formes mal repliées lors de la surexpression du HLA-B27. Cependant, aucune activation de l'UPR n'a été observée chez les jeunes rats pré-morbides. Cette induction d'UPR est spécifique du HLA-B27 puisqu'elle n'a pas lieu chez les rats transgéniques pour le HLA-B7 (Turner et al., 2005).

Tran et al. ont alors cherché à faciliter le repliement du HLA-B27, en croisant des rats de la lignée morbide 33-3, exprimant fortement le HLA-B27 et développant une UPR, avec la lignée des rats transgéniques 283-2, surexprimant uniquement la  $\beta_2m$  humaine (Tran et al., 2006). La  $\beta_2m$  pouvant se lier aux chaînes lourdes libres de HLA-B27, l'hypothèse était que l'augmentation de son niveau d'expression faciliterait le bon repliement des molécules HLA-B27, empêchant ainsi la formation d'homodimères et le déclenchement de l'UPR. Il a en effet été observé une réduction importante du « misfolding » et de l'UPR chez ces animaux. De façon très surprenante, la fréquence et la sévérité des arthrites ont cependant été aggravées. Par la suite, la lignée de rats transgéniques 21-3h, qui exprime un niveau plus faible de HLA-B27 et ne développe pas la SpAr, a été croisée avec les rats 283-2 afin de tester l'effet arthritogène de la surexpression de la  $\beta_2m$ . Les rats issus de ce croisement développent des arthrites avec une prévalence de 70 %, et ceci uniquement chez les mâles et en l'absence d'atteinte intestinale (Tran et al., 2006). Les résultats de cette étude ont remis en cause l'implication du « misfolding » du HLA-B27 et de l'UPR dans le déclenchement de la SpA.

Néanmoins, il a été montré que la surexpression de la  $\beta_2mh$  ne faisait qu'atténuer l'activation de l'UPR sans l'abolir pour autant (Colbert et al., 2010). Les conséquences de l'activation de l'UPR peuvent dépendre de l'amplitude de cette réponse puisqu'il est notamment connu qu'une forte UPR peut, par exemple, conduire à l'apoptose de la cellule.

Cela n'explique cependant pas pourquoi la surexpression de la  $\beta_2\text{mh}$  aggrave les arthrites des rats transgéniques tout en atténuant l'UPR

#### 4. Facteurs environnementaux

Comme dans le cas des ARé chez l'Homme, la flore bactérienne semble jouer un rôle important dans la survenue de la SpAr. En effet, aucune inflammation des intestins et des articulations n'est détectée, d'un point de vue clinique et histologique, chez les rats exprimant des niveaux élevés de HLA-B27/ $\beta_2\text{mh}$  lorsqu'ils sont élevés en isolateur stérile (en condition « germ-free ») (Taurog et al., 1994). Ces rats présentent tout de même des lésions génitales (chez le mâle) et des lésions de la peau. Ces lésions semblent donc être principalement dues à la surexpression du transgène. La reconstitution de leur flore bactérienne intestinale suffit à provoquer l'apparition de la maladie. De même, la colonisation monospécifique par *Bacteroides vulgatus* suffit à induire le développement d'une inflammation articulaire et digestive maximale (Rath et al., 1996). Les résultats de ces études suggèrent que l'atteinte inflammatoire de l'intestin et les arthrites résultent d'une réaction anormale de la muqueuse intestinale à cette bactérie. Des données cohérentes avec cette interprétation existent aussi chez l'Homme puisqu'au cours du processus de l'ARé, on peut observer une fragilisation de la muqueuse digestive par des bactéries pathogènes entéro-invasives, exposant la lamina propria aux constituants de la flore bactérienne et conduisant à une réponse inflammatoire majeure.

Tous ces résultats renforcent l'idée d'un rôle majeur de l'environnement au travers de la flore bactérienne dans la survenue de maladies inflammatoires chroniques telles que la SpA.

## CHAPITRE 4

# MECANISMES IMMUNOLOGIQUES DE LA SPAR

### I. Identification des acteurs de la SpAr

Depuis 1990, les mécanismes immunologiques mis en jeu dans la SpAr ont fait l'objet de nombreuses investigations. En 1993, des expériences de transferts cellulaires *in vivo* ont permis d'approfondir les mécanismes cellulaires impliqués dans la physiopathologie de la SpAr en mettant en évidence le rôle des cellules de la moelle osseuse et des LT dans le déclenchement de la maladie. Plusieurs études ont depuis permis d'affiner le rôle joué par ces cellules ainsi que les différents médiateurs de l'inflammation impliqués dans le déclenchement et le maintien de la pathologie.

#### 1. Lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

Le rôle primordial des LT dans l'expression de la maladie a été démontré chez les rats 33-3 homozygotes pour l'allèle *rnu* (homologue à l'allèle *Nude* chez la souris), qui confère notamment une aplasie thymique. En effet, les rats *rnu/rnu* transgéniques pour le HLA-B27 sont protégés du développement de la maladie, et leur reconstitution par des LT provoque son apparition. A noter que la reconstitution par des LT CD4<sup>+</sup> s'est avérée beaucoup plus efficace que celle par des LT CD8<sup>+</sup>. Par ailleurs, ces expériences ont permis de constater que l'expression du HLA-B27 par la population lymphocytaire n'est pas nécessaire. Ainsi, même les LT de rats non transgéniques suffisent à provoquer la survenue de la maladie chez des rats *rnu/rnu* transgéniques pour le HLA-B27 (Breban et al., 1996), (Hoentjen et al., 2006).

Dans la mesure où la molécule HLA-B27 est une molécule du CMH de classe I, les théories immunologiques plaident pour une réponse lymphocytaire pathogène médiée par des LT CD8<sup>+</sup>. De façon inattendue, il a cependant été montré que les LT CD8<sup>+</sup> des rats HLA-B27 malades n'avaient pas un phénotype de cellules activées, qu'ils ne subissaient pas d'expansion clonale et que leur déplétion ne modifiait pas l'expression de la maladie (May et al., 2003), (Taurog et al., 2009). Au contraire, c'est une expansion des LT CD4<sup>+</sup> qui a été observée,

désignant ainsi cette sous-population de lymphocytes comme cellules effectrices de la maladie.

Les LT CD4<sup>+</sup> sont les cellules coordinatrices majeures de la réponse immunitaire. Leur fonction dépend de la présence de facteurs membranaires mais également de facteurs solubles, les cytokines, dont ils ont la capacité à produire un large spectre. Suite à la rencontre avec un antigène, associé à une molécule de CMH de classe II présentée par une CPA, les LT CD4<sup>+</sup> vont être orientés vers une voie de différenciation particulière. Au cours des dernières années, de nombreuses études ont été menées sur les voies de différenciation fonctionnelle des LT CD4<sup>+</sup>. Celles-ci ont conduit à la découverte et à la caractérisation moléculaire de plusieurs sous-populations fonctionnelles de cellules T CD4<sup>+</sup>, telles que les Th1 et les Th17 qui initient des réponses pro-inflammatoires à médiation cellulaire.

L'étude des principaux sites inflammatoires de la SpAr, et notamment de la muqueuse intestinale, a permis l'identification de nombreux médiateurs solubles, ou cytokines, exprimés au cours de la maladie. Les premières études ont montré une élévation précoce de l'IL-2 et de l'IFN $\gamma$  suggérant ainsi une réponse prédominante des LT CD4<sup>+</sup> de type Th1 (Taurog et al., 1999).

Plus récemment, Colbert et al. ont mis en évidence chez les rats HLA-B27 une augmentation de la cytokine IL-23 dans les tissus enflammés et les cellules myéloïdes provenant de ces tissus. Celle-ci était corrélée à une forte augmentation de la cytokine IL-17, produite par les LT CD4<sup>+</sup> de la lamina propria et des ganglions lymphatiques mésentériques. Ces travaux ont permis de mettre en évidence une activation de l'axe IL-23/IL-17 dans le côlon des rats transgéniques malades (DeLay et al., 2009). Brièvement, la cytokine IL-23 participe à la stabilisation et à l'amplification du phénotype de LT CD4<sup>+</sup> Th17 impliqué dans l'immunité dirigée contre les bactéries et les organismes extracellulaires. La réponse Th17 est caractérisée par la production d'IL-17, connue pour induire la production, par de nombreux types cellulaires, de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines et de métalloprotéases. De plus, l'IL-17 est une cytokine clé du recrutement, de l'activation et de la migration des neutrophiles (Moseley et al., 2003).

Dans notre équipe, il a été montré une expansion des LT CD4<sup>+</sup> dans les ganglions mésentériques et poplités de rats malades comparés aux rats témoins (non transgéniques NTG ou rats HLA-B7). Parmi ces LT CD4<sup>+</sup>, les cellules ayant la plus forte expansion étaient celles

produisant de l'IL-17 et du TNF- $\alpha$ , cytokines produites par les Th17. Lors de cette étude, il a aussi été montré que les DC de rats HLA-B27 induisaient préférentiellement la différenciation, *in vitro*, de lymphocytes Th17 par un mécanisme dépendant des contacts intercellulaires (Glatigny et al., 2012).

L'ensemble de ces résultats fait de l'induction de la voie des lymphocytes Th17, un mécanisme pathogénique possible dans ce modèle de SpA. Cependant, ces LT ne sont pas suffisants pour induire la pathologie car le transfert isolé des LT provenant de rats HLA-B27 malades à des rats NTG, même irradiés, ne permet pas son apparition (Breban et al., 1996). Ceci suggère donc fortement l'implication d'autres acteurs de l'immunité dans le développement de la SpA.

## 2. Cellules présentatrices d'antigènes

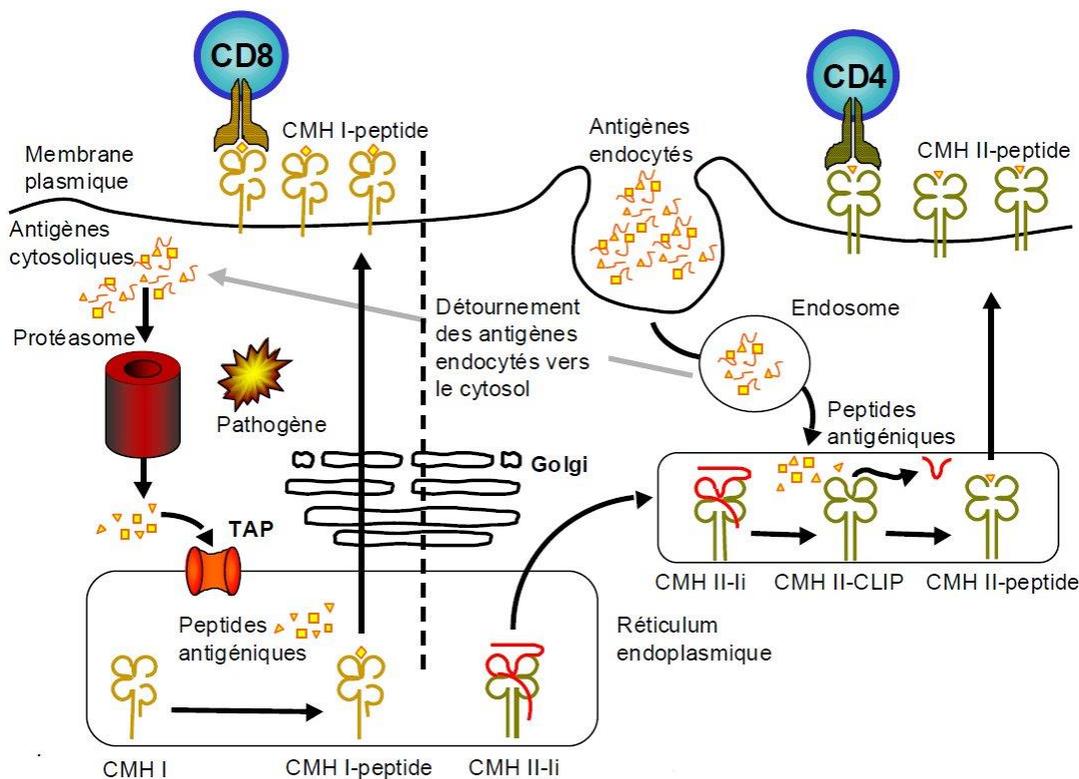
Nous venons de voir que les LT ne sont pas capables d'induire la SpA quand ils sont transférés à des rats sains. En revanche, cette maladie est transférable à des rats sains par les cellules de la moelle osseuse ou du foie fœtal provenant des lignées morbides, mettant en évidence un rôle essentiel des cellules d'origine hématopoïétique, distinctes des LT, dans le déclenchement de la maladie (Breban et al., 1993). Parmi les cellules d'origine hématopoïétique, les CPA semblent être les meilleures candidates pour jouer ce rôle puisqu'elles sont à même d'initier une réponse antigénique médiée par HLA-B27.

En effet, les CPA ont la propriété commune de capter, apprêter et présenter aux LT, des antigènes associés aux molécules du CMH I et II. Cette présentation conduit à la stimulation des LT et à l'initiation de la réponse immunitaire adaptative. Les CPA rassemblent les lymphocytes B, les monocytes, les macrophages et les DC. Ces cellules se caractérisent par l'expression, constitutive ou inductible, de molécules d'adhésion et de co-stimulation qui jouent un rôle déterminant dans la formation de la synapse immunologique.

### 2.1 Présentation antigénique et synapse immunologique

Classiquement, les peptides provenant de protéines endogènes qui sont dégradées dans le cytosol s'assemblent aux molécules du CMH de classe I dans le RE pour être ensuite exportés à la surface cellulaire et présentés aux LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques. Parallèlement, les peptides provenant de protéines exogènes sont endocytosés puis se lient aux molécules de

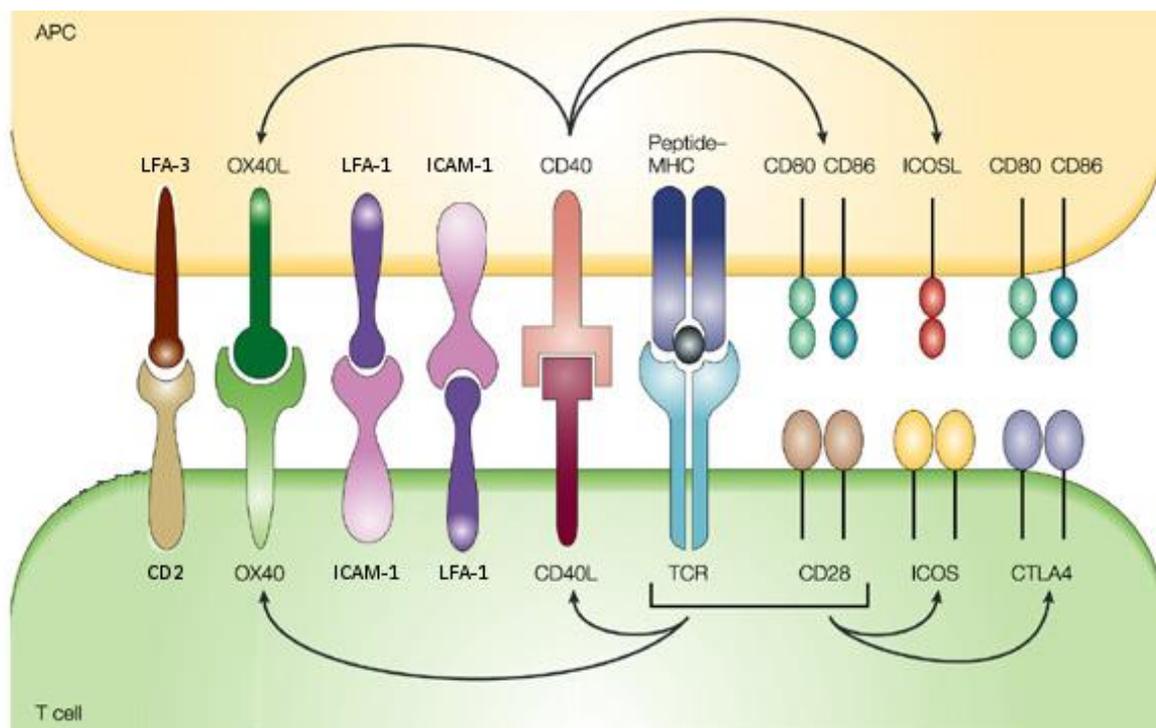
CMH de classe II dans les endosomes avant que le complexe ainsi formé ne soit exporté à la surface cellulaire et active les LT CD4<sup>+</sup> auxiliaires (**Figure 13**). Cette dichotomie des mécanismes de présentation n'est cependant pas entièrement exacte. En effet, dans les DC, qui jouent un rôle central dans l'initiation des réponses immunitaires, les peptides provenant de la dégradation de protéines exogènes peuvent être présentés par les molécules de CMH de classe I : il s'agit du phénomène de présentation croisée, ou « cross-presentation » (**Figure 13**). Ce phénomène permet aux DC de déclencher et de maintenir des réponses immunitaires à médiation cellulaire contre des agents pathogènes qui ne les infectent pas directement.



**Figure 13. Voies de présentation des peptides antigéniques sur les molécules de CMH I et II.** (D'après W.R. Heath and F.R. Carbone, 2001).

L'interaction entre le récepteur des cellules T (TCR) et le complexe CMH/peptide constitue le premier signal d'activation des LT. Néanmoins, l'affinité entre le CMH et le TCR est faible et de nombreuses molécules d'adhésion sont nécessaires pour stabiliser cette interaction afin que la cellule T réponde à ce premier signal (Par exemple les couples ICAM-1/LFA-1 et CD2/LFA-3). L'activation du LT nécessite alors un second signal, appelé signal de costimulation, qui ne peut être fourni que par une CPA : les molécules CD80/CD86, exprimées à la surface des CPA, vont interagir avec la molécule CD28 sur le LT. Cette activation entraîne une augmentation de la prolifération des LT et induit la production de

cytokines (IL-2, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) ainsi que l'expression de nouvelles molécules de costimulation qui joueront un rôle important dans le développement des cellules T effectrices (OX40, CD40L, ICOS). Un véritable dialogue s'établit et les CPA reçoivent en retour des signaux d'activation. Celui de la voie CD40/CD40L entraîne, entre autres, l'augmentation de l'expression des molécules CD80/CD86 et la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires par les CPA. En fonction des stimuli, les CPA activées, et notamment les DC, sont capables de produire un grand nombre de cytokines et influence alors la réponse immune. Enfin, les molécules CD80/CD86 peuvent également se lier à la molécule CTLA4, exprimée sur les cellules T activées, et délivrer un signal inhibiteur aux cellules T qui permet une modulation de leur réponse. Toutes ces molécules sont regroupées dans l'espace, à la surface des CPA, formant une zone de contact étroite avec les LT, appelée synapse immunologique (**Figure 14**).



**Figure 14. La synapse immunologique.**

(D'après Acuto et al. « CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling » *Nature Rev Immunol* 2003)

## 2.2 Implication des CPA dans la SpAr

Quian et al. ont montré que la flore bactérienne commensale du rat HLA-B27 induisait une production forte d'IFN $\gamma$  par les LT des ganglions mésentériques (Qian et al., 2005). Cette observation les a conduits à étudier les CPA capables d'activer ces LT. Ils ont ainsi démontré

que les cellules CD11b/c<sup>+</sup>, regroupant monocytes, macrophages et cellules dendritiques, étaient plus abondantes dans la rate des rats transgéniques HLA-B27. Cependant, ces CPA exprimant HLA-B27, pré-traitées par un lysat de bactéries intestinales, se sont avérées moins efficaces que des CPA de rats NTG pour induire la production d'IFN $\gamma$  par les LT CD4<sup>+</sup>.

De plus, la production d'IFN $\gamma$  par les LT CD4<sup>+</sup> semblait dépendre à la fois des molécules de classe II du rat et de la molécule HLA-B27 mature (Qian et al., 2005) (Qian et al., 2006). Leurs travaux sur les CPA se sont ensuite focalisés sur les récepteurs de type Toll (TLR) qu'elles expriment à leur surface et qui interviennent au cours de l'immunité innée en reconnaissant des motifs moléculaires conservés chez les pathogènes. Ainsi, les CPA de rats transgéniques expriment plus abondamment le TLR2 et le TLR4 que celles provenant de rats non transgéniques (Qian et al., 2008). Ces deux types de TLR sont impliqués dans la reconnaissance de fragments bactériens, le TLR4 ayant pour ligand le lipopolysaccharide (LPS), et le TLR2 reconnaissant les lipoprotéines et les peptidoglycanes bactériens. Ces observations suggèrent une réponse anormale à des fragments bactériens chez le rat transgénique HLA-B27. Après fixation de ces fragments, les CPA alors activées produiraient à leur tour des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines permettant ainsi le recrutement de cellules de l'immunité telles que les LT et les macrophages.

En conclusion, le déclenchement de la SpAr nécessite chez le rat la présence conjointe de cellules hématopoïétiques de type CPA exprimant des niveaux élevés de HLA-B27, et de LT CD4<sup>+</sup>, sans nécessairement que ces LT expriment le transgène.

## **II. Cellule dendritique : une piste d'intérêt**

Les DC sont les sentinelles du système immunitaire. Elles sont disséminées dans la plupart des tissus et organes et sont capables de détecter des signaux de danger tels qu'une infection. Elles jouent alors un rôle dans la réponse immunitaire innée. Cette réaction immunitaire immédiate fait intervenir des cellules phagocytaires (macrophages, polynucléaires neutrophiles), des cellules cytotoxiques (cellules natural killer ou NK), et des molécules solubles telles que les IFNs et le complément. Les DC participent à la réponse innée en produisant des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires et en phagocytant les pathogènes. Contrairement aux autres cellules de l'immunité innée, les DC ne meurent pas après avoir exercé ces fonctions mais migrent dans les organes lymphoïdes pour assurer leur fonction principale : la présentation des antigènes aux lymphocytes T. Les DC jouent ainsi un

rôle essentiel dans l'initiation de la réponse adaptative. De plus, si les CPA peuvent stimuler des cellules T activées ou mémoires, seules les DC sont capables d'activer des lymphocytes T naïfs (Banchereau and Steinman, 1998).

L'étude des différentes populations de DC chez le rat a débuté dans les années 1980, avec leur détection dans tous les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes (Hart and Fabre, 1981). La faible disponibilité des réactifs spécifiques pour des études chez le rat et le peu de lignées génétiquement modifiées dans cette espèce sont deux difficultés importantes pour mener à bien de telles études et expliquent la lente progression des connaissances dans ce domaine. L'ontogénie des DC chez le rat reste à ce jour encore mal connue bien que l'on sache que les cellules de moelle osseuse peuvent se différencier en DC, comme chez la souris, sous l'influence du G-CSF et de l'IL-4 (Talmor et al., 1998).

L'identification des DC n'est pas facile. En effet, il n'existe pas de marqueurs connus qui reconnaissent à la fois toutes les DC et spécifiquement des DC. De manière générale, on utilise une combinaison de marqueurs qui permet d'identifier les DC d'une part et d'exclure les autres cellules d'autre part. Comme nous l'avons vu, les DC expriment des molécules communes aux CPA comme les molécules de CMH de classe I et II, le CD45 et les molécules d'adhésion CD54 (ICAM-1), CD11b et Cd11c, utilisée pour purifier les DC chez la souris. Les DC expriment également des molécules de costimulation comme les molécules CD80/CD86) et le CD40. Cependant, l'expression de ces marqueurs ainsi que celle des molécules de CMH II dépend du niveau de maturation de ces cellules. Chez le rat, le seul anticorps spécifique des DC actuellement disponible est l'OX62. Cet anticorps reconnaît la chaîne  $\alpha 2$  de l'intégrine CD103 qui est un récepteur d'adhésion cellulaire. Bien que cet anticorps soit très spécifique des DC, il ne reconnaît néanmoins pas toutes les sous-populations de DC du rat. Les DC CD103<sup>+</sup> sont présentes dans les organes lymphoïdes et dans de nombreux organes non lymphoïdes, excepté dans les muscles lisses et le cœur (Brenan and Puklavec, 1992).

Le groupe de MacPherson et *al.* est le premier à avoir décrit deux sous-populations distinctes de DC purifiées à partir de la lymphe afférente chez le rat. Ces cellules migrent de l'intestin vers les ganglions mésentériques: il s'agit des DC CD4<sup>+</sup> et des DC CD4<sup>-</sup>. Bien qu'exprimant des taux équivalents de CMH II, d'ICAM-1, de CD11b/c et de CD103, ces deux populations de DC se distinguent notamment par leur morphologie et leur capacité à stimuler les LT. En effet, les DC CD4<sup>+</sup> stimulent de manière plus importante la prolifération de

cellules T allogéniques et de cellules T spécifiques d'un antigène *in vitro* et *in vivo* (Liu et al., 1998).

Josien et al ont ensuite caractérisé chez le rat les DC fraîchement purifiées d'organes lymphoïdes, notamment la rate, par sélection positive à l'aide de l'anticorps OX62 dirigé contre l'intégrine CD103. Ces travaux ont montré qu'on y retrouvait à nouveau les DC CD4<sup>-</sup> et CD4<sup>+</sup>. Ces deux populations de DC ont alors été caractérisées pour l'expression d'un grand nombre de marqueurs (**Tableau 4**). Voisine et al ont montré que les DC spléniques fraîchement isolées exprimaient différemment la molécule CD103, les CD4<sup>-</sup> ayant un phénotype CD103<sup>High</sup> et les CD4<sup>+</sup> CD103<sup>Low</sup>.

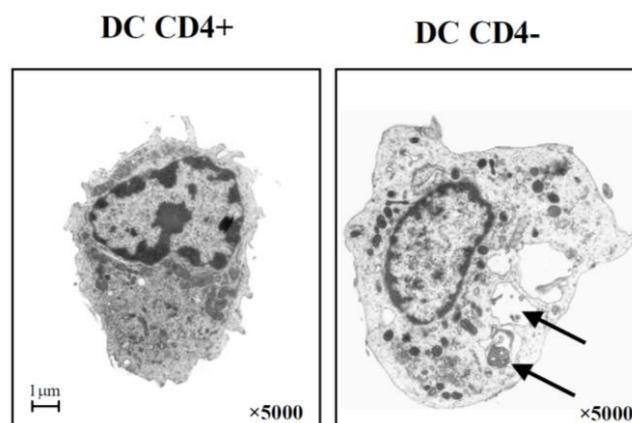
**Tableau 4 : Marqueurs des différentes populations de DC myéloïdes spléniques.**

<b>Populations de DC myéloïdes spléniques fraîchement isolées</b>	
<b>CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup></b>	<b>CD103<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup></b>
CD103 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	CD103 <sup>++</sup> CD4 <sup>-</sup>
<b>Marqueurs communs</b>	
CMH II <sup>++</sup> CD11a <sup>++</sup> CD11b <sup>+++</sup> CD54 <sup>++</sup> CD86 <sup>-</sup> CD40 <sup>-</sup>	CMH II <sup>++</sup> CD11a <sup>++</sup> CD11b <sup>+++</sup> CD54 <sup>++</sup> CD86 <sup>-</sup> CD40 <sup>-</sup>
<b>Marqueurs différents</b>	
CD80 <sup>++</sup> CD5 <sup>++</sup> CD90 <sup>+++</sup> SIRPα <sup>+</sup> CD11c <sup>+++</sup> CD200 <sup>+</sup>	CD80 <sup>+/-</sup> CD5 <sup>-</sup> CD90 <sup>+/-</sup> SIRPα <sup>-</sup> CD11c <sup>++</sup> CD200 <sup>+++</sup>

(D'après Voisine et al. « Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity » *J Immunol* 2002;169:2284–91)

L'analyse de ces sous-populations de DC spléniques a montré que seules les DC CD4<sup>+</sup> expriment les marqueurs CD5, SIRP $\alpha$  et CD90. Les deux populations de DC ont un phénotype relativement immature malgré une faible expression constitutive de la molécule CD80. Ces travaux ont également permis de mettre en évidence que ces deux populations expriment de façon équivalente les molécules de classe II, le CD11a, et le CD11b. Après culture sur la nuit de ces sous-populations, on observe une maturation des cellules se traduisant notamment par l'augmentation de l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86, avec une plus forte expression de celles-ci par les DC CD4<sup>+</sup>. D'après ces résultats, la population CD4<sup>-</sup> est considérée comme immature, alors que la population CD4<sup>+</sup> est à un stade de maturation intermédiaire (Voisine et al., 2002).

La morphologie des sous-populations de DC spléniques CD103<sup>+</sup> a été analysée en microscopie électronique par le groupe de Josien et al.. Cette analyse a montré que les DC CD4<sup>+</sup> sont des cellules assez hétérogènes et de plus petite taille que les DC CD4<sup>-</sup>, qui contiennent de larges phagosomes (Figure 15).



**Figure 15. Morphologie en microscopie électronique des sous-populations de DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> et CD4<sup>-</sup>.**

Les DC CD4<sup>+</sup> sont plus petites que les DC CD4<sup>-</sup> qui contiennent de nombreuses granules intracytoplasmiques et de larges phagosomes contenant parfois du matériel hétérogène (flèches).

(G. Pradal, centre régionale de microscopie électronique et de micro-analyse de l'ensemble santé, Faculté de Médecine, Université de Nantes)

Sur le plan fonctionnel, comme dans la lymphe, les DC CD4<sup>+</sup> spléniques induisent une prolifération importante des lymphocytes T tandis que les DC CD4<sup>-</sup> sont de faibles stimulatrices de ces cellules (Trinité et al., 2000) (Voisine et al., 2002). Cette différence peut notamment s'expliquer par une demi-vie plus courte de la population de DC CD4<sup>-</sup>, ainsi que

par la plus faible expression des molécules de costimulation à leur surface. Par ailleurs, cette étude a mis en évidence une activité cytotoxique directe des DC spléniques CD4<sup>-</sup> à l'encontre de la lignée de cellules YAC-1, habituellement utilisée pour tester la cytotoxicité des cellules NK (Trinité et al., 2000). Par la suite, cette activité cytotoxique a été confirmée sur un large panel de lignées cancéreuses et sur des cellules primaires endothéliales, et décrite comme passant par une voie apoptotique indépendante des caspases. Ces DC CD4<sup>-</sup> fraîchement isolées sont capables de phagocyter des cellules apoptotiques *in vitro*, et par conséquent, de phagocyter efficacement sans doute leurs propres victimes (Trinité et al., 2005). Cette propriété avait déjà été suggérée par les travaux de MacPherson et *al.* dans la lymphe, par la mise en évidence de DC CD4<sup>-</sup> transportant des corps apoptotiques de cellules intestinales épithéliales vers les ganglions (Huang et al., 2000). Ces résultats supposent un rôle potentiel de ces cellules dendritiques immatures dans l'induction de la tolérance périphérique au soi.

Enfin, notons que ces deux populations de DC CD103<sup>+</sup> sécrètent peu d'IFN $\alpha$  après une infection virale, les distinguant ainsi des DC plasmacytoïdes, qui ont, dans la rate, un phénotype CD103<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>.

Ainsi, les deux sous-populations de DC CD103<sup>+</sup> décrites chez le rat semblent exercer des fonctions différentes. En effet, les DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> semblent impliquées dans la survenue des réponses T en activant fortement les populations de LT, alors que les DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> exercent une activité cytotoxique vis-à-vis de certaines cibles et pourraient être impliquées dans les mécanismes de tolérance immunitaire.

## **CONTEXTE D'ETUDE**

Les travaux antérieurs menés sur le modèle du rat transgénique pour le HLA-B27 et la  $\beta_2\text{mh}$  ont contribué à approfondir la compréhension des mécanismes pathologiques impliquant la molécule HLA-B27 dans le développement de la SpAr. Cependant, les mécanismes moléculaires et les événements cellulaires auxquels la molécule HLA-B27 participe sont complexes et semblent faire intervenir de nombreux acteurs. Néanmoins, ces travaux ont permis de démontrer que le déclenchement de la SpAr nécessite la présence conjointe de cellules d'origine hématopoïétique exprimant des niveaux élevés de HLA-B27 ainsi que de LT  $\text{CD4}^+$ .

Comme nous l'avons évoqué précédemment, les DC sont les seules CPA capables de stimuler une réponse primaire des LT, conduisant à l'initiation de la réponse immune adaptative que l'on sait désormais jouer un rôle central dans le développement de la maladie. C'est pourquoi l'une de nos principales hypothèses de travail suppose que les DC surexprimant le HLA-B27 conduisent à l'initiation et la pérennisation d'une réponse immunitaire anormale, médiée par les LT  $\text{CD4}^+$  et aboutissant au développement de la SpAr. Ainsi, une partie des travaux antérieurs de notre équipe a consisté à étudier sur le plan fonctionnel les DC spléniques du rat HLA-B27 et plus particulièrement leur interaction avec les LT  $\text{CD4}^+$ .

Des expériences de co-stimulation *in vitro*, ont révélé un défaut fonctionnel des DC HLA-B27 des lignées malades (33-3 et 21-4H) dans leur capacité à activer des LT  $\text{CD4}^+$  allogéniques ou syngéniques. Cette anomalie fonctionnelle n'est pas une conséquence de l'état inflammatoire développé par ces animaux puisqu'elle a été retrouvée chez les rats HLA-B27 pré-morbides, ainsi que chez les rats HLA-B27 rnu/rnu et les rats de la lignée 33-3 sur fond génétique DA protégés du développement de la SpAr. De plus, la capacité des DC à faire proliférer les LT n'est pas significativement réduite chez les rats transgéniques HLA-B7. Ces résultats montrent que le défaut fonctionnel des DC est directement corrélé à la surexpression du HLA-B27 (Hacquard-Bouder et al., 2004).

Par la suite, nous nous sommes attachés à étudier la fonctionnalité des DC dans la lignée de rats transgéniques 21-3. Rappelons que les rats de cette lignée ne présentent pas d'atteintes à l'état hétérozygote (21-3h) mais développent à l'état homozygote (21-3H) un phénotype malade comparable aux 33-3, et qu'à l'état hétérozygote, s'ils surexpriment la  $\beta_2\text{mh}$  ((21-3h x 283-2)F1), ils développent des atteintes articulaires sévères sans inflammation intestinale. Dans cette étude, nous avons confirmé que la prolifération des LT  $\text{CD4}^+$  allogéniques induite par les DC était fortement diminuée en présence de DC provenant

de lignées de rats surexprimant fortement le HLA-B27, telles que les lignées 33-3 et 21-3H, alors que nous n'avons pas retrouvé ce défaut fonctionnel des DC dans la lignée 21-3h. En revanche, nous avons mis en évidence une diminution de la capacité des DC issues du croisement 21-3h x 283-2 à activer les LT. L'ensemble de ces résultats montrent que, dans ces lignées, le défaut fonctionnel des DC est corrélé à un certain niveau d'expression du HLA-B27 et au degré de susceptibilité à la maladie. Ceci renforce notre hypothèse selon laquelle cette anomalie des DC pourrait jouer un rôle fondamental dans le déclenchement de la maladie dans ce modèle (Fert et al., 2008).

Par ailleurs, ce phénomène s'accompagne d'une diminution de la formation de conjugués des DC HLA-B27 avec les LT CD4<sup>+</sup>, comparé aux DC HLA-B7 ou DC NTG. Ceci suppose donc un défaut dans la formation d'une synapse immunologique stable entre les DC et les LT. Cependant, les DC spléniques HLA-B27 utilisées dans cette étude après une nuit de culture, présentaient un phénotype mature avec des niveaux d'expression des molécules majeures de co-stimulation, telles que le CMH II, ICAM-1, CD80/86 et CD40, équivalents aux témoins (Hacquard-Bouder et al., 2004). Afin d'élucider les mécanismes moléculaires responsables de cette capacité réduite des DC HLA-B27 à former des conjugués avec les LT naïfs CD4<sup>+</sup>, nous avons étudié de plus près les mécanismes d'interaction ayant lieu entre ces cellules au cours de la formation de la synapse immunologique.

Des expériences de vidéomicroscopie ont mis en évidence que la fréquence des interactions entre les DC HLA-B27 et les LT était la même que pour les DC de rats témoins. Parallèlement, nous avons suivi l'apparition d'un flux calcique dans les LT après contact avec une DC, témoignant de la formation d'une synapse immunologique fonctionnelle. Ces expériences ont montré que, malgré un nombre de contacts équivalents, la fréquence d'apparition d'un flux calcique chez les LT CD4<sup>+</sup> naïfs étaient néanmoins réduits au contact de DC HLA-B27. Cette observation indiquant un défaut de formation de la synapse immunologique, des expériences de blocage des différentes molécules de co-stimulation ont été réalisées afin d'identifier les éventuelles molécules impliquées. Ainsi, il a été montré que ce phénomène faisait intervenir un déficit d'engagement des molécules de co-stimulation CD86/CD28 (Hacquard-Bouder et al., 2007).

A la suite de ces travaux, nous avons voulu explorer plus largement les processus moléculaires défectueux intervenant dans les DC des rats HLA-B27. Pour cela, nous avons utilisé une approche protéomique à partir de la population totale de DC spléniques

conventionnelles CD103<sup>+</sup> Nous avons comparé l'expression des protéines entre les DC de rats transgéniques pour le HLA-B27 (lignée 33-3), pour le HLA-B7 (lignée 120-4H), et les DC de rats NTG. Cette étude a permis de mettre en évidence trois groupes de protéines différenciellement exprimées entre les DC des rats malades et celles des rats témoins. Nous avons ainsi pu observer dans les DC HLA-B27 la surexpression de protéines intervenant dans le repliement et le chargement peptidique du CMH de classe I dans le RE ainsi que dans l'UPR (Grp78, la calréticuline, la sous-unité  $\beta 9$  du protéasome et la PDIA3) Par ailleurs, nous avons observé la sous-expression de protéines impliquées dans la mobilité cellulaire (cytosquelette d'actine) d'une part, et la synthèse du CMH de classe II (Cathepsine S et Cystatine) d'autre part. Nous avons ensuite validé ces résultats par différentes approches fonctionnelles.

Des expériences de mobilité cellulaire en vidéomicroscopie ont montré un défaut de mobilité des DC HLA-B27 après activation sur un support de fibronectine L'étude de l'expression des molécules du CMH de classe II a mis en évidence une expression réduite de ces protéines à la surface des différentes sous-populations de DC CD103<sup>+</sup> de rats HLA-B27. Enfin, nous avons observé une réduction prononcée de la viabilité des DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> HLA-B27 en culture. Cette population particulière de DC, d'une demi-vie plus courte que les DC CD4<sup>+</sup>, semble impliquée dans les phénomènes de tolérance. Ainsi, leur diminution marquée chez les rats HLA-B27 pourrait se révéler cruciale dans la pathogénie de ce modèle de SpA. Cependant, la forte mortalité de ces cellules rend difficile leur purification en vue d'études fonctionnelles plus spécifiques (Dhaenens et al., 2009).

Faisant suite à l'ensemble de ces résultats, le projet d'ingénieur qui m'a été confié par mon responsable scientifique, le Pr. Maxime BREBAN, avait pour objectif d'identifier les mécanismes moléculaires à l'origine des différentes anomalies fonctionnelles mises en évidence dans les DC spléniques conventionnelles du rat transgénique pour le HLA-B27. Devant l'accumulation de données suggérant des propriétés et des fonctions différentes des sous-populations CD4<sup>-</sup> et CD4<sup>+</sup> des DC CD103<sup>+</sup>, nous avons estimé plus pertinent de les étudier séparément. En outre, chacune de ces sous-populations présente un intérêt majeur pour mieux comprendre la physiopathologie de la SpAr. Cependant, les DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> fraîchement isolées de la rate présentent un phénotype plus mature que les CD4<sup>-</sup> et semblent plus impliquées dans l'activation des populations de LT. De plus, nous avons montré une forte mortalité des DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> suggérant que les défauts fonctionnels mis en évidence lors des travaux antérieurs impliqueraient plutôt la population survivante de DC, à savoir les

DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>. Dans le but d'identifier les voies de signalisation potentiellement impliquées dans le dysfonctionnement de ces cellules, nous avons choisi de réaliser l'étude de leur transcriptome.

# **MATERIELS ET METHODES**

## Lignées de rats

Développées par Taurog *et al.* (University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, USA), les lignées de rats utilisées dans cette étude sont élevées et hébergées dans l'animalerie conventionnelle de l'institut Jacques Monod (Paris 13ème). Les lignées utilisées dans cette étude sont au nombre de quatre :

- **La lignée 33-3**, sur fond génétique F344, qui est hétérozygote pour un transgène comportant 55 copies de l'allèle HLA-B\*2705 et 28 copies du gène codant pour la  $\beta_2$ mh. Cette lignée est maintenue à l'état hétérozygote puisque les mâles porteurs de ce transgène sont stériles. Pour entretenir cette lignée, nous procédons au croisement de femelles portant le transgène avec des mâles NTG. Rappelons que les rats transgéniques de cette lignée développent spontanément et ceci dès l'âge de 6 semaines, une inflammation intestinale, des arthrites et certaines atteintes extra-articulaires.
- **La lignée 120-4H**, sur fond génétique F344, qui est homozygote pour un transgène comportant 52 copies de l'allèle HLA-B\*0702 et 26 copies du gène codant pour la  $\beta_2$ mh. Ces rats ne développent aucune atteinte de la SpAr et servent de contrôles de la surexpression d'une molécule de HLA-B chez le rat F344.
- **La lignée 21-3h**, sur fond génétique Lewis, qui est hétérozygote pour un transgène comportant seulement 20 copies de l'allèle HLA-B\*2705 et 28 copies du gène codant pour la  $\beta_2$ mh. Ces rats ne développent aucune atteinte de la SpAr.
- **La lignée 283-2**, sur fond génétique Lewis, qui est hétérozygote pour un transgène comportant 35 copies du gène codant pour la  $\beta_2$ mh. Ces rats ne développent aucune atteinte de la SpAr.

Les lignées 21-3h et 283-2 ont été croisées pour obtenir des rats (21-3h x 283-2)F1, qui comptent alors 20 copies de la molécule HLA-B\*2705 et 50 copies de  $\beta_2$ mh. Rappelons que seuls les rats mâles issus de ce croisement développent des arthrites sévères mais ne présentent aucun signe d'atteinte intestinale. Les rats NTG générés lors des croisements F344 et Lewis sont utilisés comme témoins lors de nos expériences.

Le génotypage des rats transgéniques est réalisée par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à l'aide d'amorces spécifiques du HLA-B27 ou de la  $\beta_2$ mh. Selon les expériences, les rats sont âgés de 2 à 12 mois et ont été appariés en âge dans chaque groupe

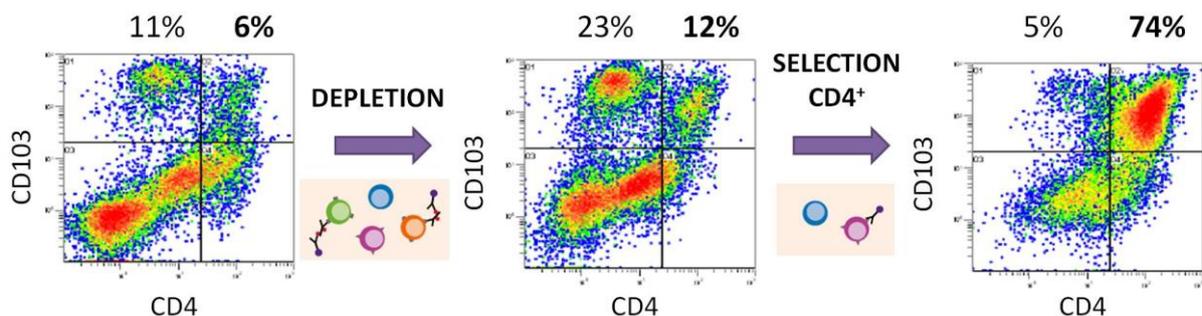
expérimental. Toutes les procédures réalisées au cours de cette étude ont été approuvées par le comité d'éthique institutionnel d'expérimentation animale (CEB-26-2012).

## **Tri magnétique des DC spléniques CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>**

Les DC sont fraîchement isolées *ex vivo* à partir de la rate en suivant un protocole dérivé de celui mis au point par Josien et al. (Josien et al., 1997). Après avoir perfusée la rate avec 2 ml d'une solution de collagénase D à 2 mg/ml dans du RP I complet (Annexe 1), celle-ci est hachée finement au scalpel afin de faciliter la digestion des tissus par la collagénase D, qui a lieu pendant 20 min à 37°C. Nous ajoutons alors de l'EDTA à 10 mM qui facilite, par sa propriété anti-coagulante, la dissociation du broyat obtenu après digestion. La suspension cellulaire est alors homogénéisée, filtrée et lavée avec une solution de PBS-EDTA-BSA (Annexe 1). Les cellules de faible densité, c'est-à-dire les cellules de grande taille avec un faible rapport nucléo-cytoplasmique, dont font partie les DC CD103<sup>+</sup>, sont isolées après centrifugation sur un gradient de densité composé de Nycodenz à 14,5% (Nycomed, Oslo, Norvège) (Annexe 1).

Afin d'éliminer les éventuelles cellules T et B résiduelles, nous procédons ensuite à une étape de déplétion. Les cellules de faible densité sont incubées à 4°C pendant 20 min avec les anticorps suivants : anti-CD45RC (marqueur des cellules B, T et pDC, clone OX-22, Santa Cruz Biotechnology), anti-chaîne Igκ (marqueur des cellules B, OX-12, Santa Cruz Biotechnology), anti-TCRαβ (marqueur des cellules T, clone R73, BD Pharmingen) et anti-CD25 (marqueur des cellules T activées, clone OX-39, BD Pharmingen). Les cellules lavées en PBS-EDTA (Annexe 1) sont ensuite incubées avec des anticorps anti-IgG de souris couplés à des microbilles (Miltenyi Biotec) à 4°C pendant 20 min. La sélection négative des cellules est réalisée par tri magnétique en déposant les cellules en suspension dans du PBS-EDTA-BSA, sur une colonne composée d'une matrice « ferreuse » placée dans un séparateur aimanté. Contrairement aux cellules non marquées qui traversent la colonne, les cellules marquées par les microbilles sont magnétiquement retenues à l'intérieur de la colonne (Miltenyi Biotec). L'éluat recueilli correspond alors à la fraction négative pour les marqueurs considérés et constitue une suspension cellulaire enrichie en DC CD103<sup>+</sup>. Les cellules sont ensuite incubées à 4°C pendant 20 min avec une concentration saturante d'anticorps anti-CD4 couplés à des microbilles (Miltenyi Biotec). La sélection positive des DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> est réalisée sur des colonnes S (Miltenyi Biotec), permettant l'élution des cellules retenues lors du tri magnétique à l'aide d'un piston

La matrice des colonnes se compose de fibres ferromagnétiques recouvertes d'un revêtement non cytotoxique. Lorsqu'elle est placée dans le champ magnétique d'un séparateur aimanté, les fibres amplifient le champ magnétique, ce qui crée un gradient élevé au sein de la colonne. Ceci est crucial pour l'isolement de cellules qui ne sont que faiblement marquées par les microbilles, laissant ainsi suffisamment d'épitopes libres pour réaliser ensuite un marquage avec un anticorps fluorescent. Les cellules marquées magnétiquement sont maintenues en suspension et ne sont pas "liées" à la matrice de la colonne. Ce maintien en suspension contribue à réduire le stress des cellules et permet d'optimiser les étapes de lavage et d'éluion en évitant la formation d'agrégats cellulaires. Cependant, une mortalité de 30 à 40% des cellules est constatée à la suite de ces deux étapes de tris magnétiques. La pureté des DC  $CD103^+ CD4^+$  obtenues avec ce protocole varie entre 70 et 80% (**Figure 16**).



**Figure 16 : Profil cytométrique des cellules obtenues par tri magnétique**

### **Tri électronique des DC spléniques $CD103^+ CD4^+$**

Cette méthode de tri a été développée pour améliorer la pureté de nos échantillons de DC  $CD103^+ CD4^+$ . En effet, les premières analyses transcriptomiques réalisées à partir des cellules triées magnétiquement ont montré les indices d'une contamination probable par d'autres types cellulaires, pouvant biaiser notre interprétation des résultats.

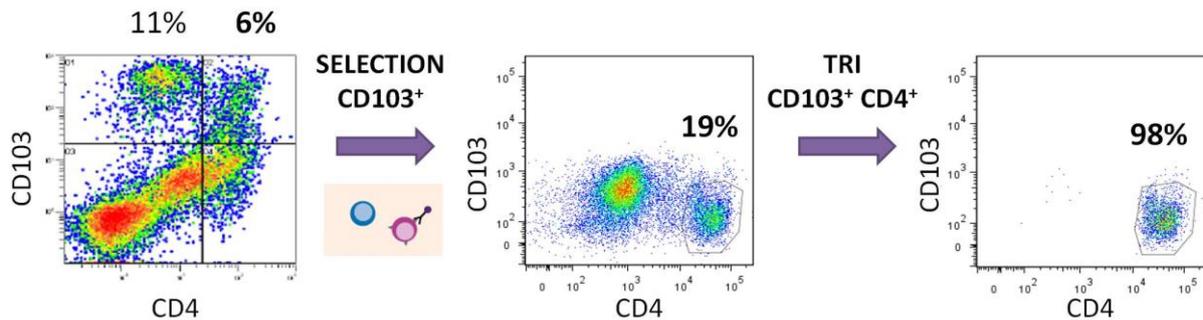
Les DC sont fraîchement isolées *ex vivo* à partir de la rate, en procédant comme précédemment jusqu'à la sélection des cellules de faible densité par centrifugation sur gradient Nycodenz à 14,5%.

On procède alors à une première étape de sélection positive des cellules  $CD103^+$  par tri magnétique. Pour cela, les cellules sont incubées à 4 °C pendant 20 min avec des anticorps anti- $CD103^+$  couplés à des microbilles (marqueur des DC chez le rat, clone OX62 Miltenyi

Biotec). Au vue de la mortalité importante constatée lors du protocole précédent, que nous attribuons à l'élution manuelle (par piston) trop violente pour nos cellules, la sélection positive est réalisée ici en utilisant un système automatisé, nouvellement acquis, de tri cellulaire magnétique (auto ACS Pro, i ltenyi Biotec) Cet appareil permet l'élution des cellules à une pression adaptée et constante. Ce système présente deux avantages majeurs : il améliore grandement la survie de nos cellules (mortalité < 20 %) et nous permet de standardiser cette étape de tri magnétique.

Les cellules sont ensuite marquées avec des anticorps couplés à des fluorochromes pour procéder au tri électronique par cytométrie en flux : les cellules sont incubées avec les anticorps anti-rat CD103-FITC (clone OX-62, Santa Cruz Biotechnology) et anti-rat CD4<sup>+</sup> CPA (clone OX-35, BD Pharmingen) pour permettre la sélection de la population double positive CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>. Nous marquons également ces cellules avec l'anticorps anti-rat CD45RC-PE (clone OX-22, BD Pharmingen) afin d'exclure les cellules CD45RC<sup>+</sup> pouvant correspondre à une faible contamination résiduelle de pDC ou de lymphocytes. Toutefois, celle-ci ne représente jamais plus de 5% de la population totale de nos cellules.

Le trieur utilisé pour ces expériences est le BD FACS-Aria III (BD Biosciences). La suspension préparée circule dans une buse étroite, conçue de telle sorte que les cellules défilent une à une devant un faisceau laser de longueur d'onde appropriée. La lumière émise par les cellules, en fonction de leur taille, leur granularité et leur marquage fluorescent, est mesurée et analysée par des photomultiplicateurs. La suspension est ensuite fractionnée en microgouttelettes contenant au plus une seule cellule par un dispositif de type vibreur ultrasonique. Au moment de sa formation, la gouttelette est affectée d'une charge électrique positive, négative ou nulle, selon la nature et l'intensité du signal fluorescent de la cellule. Les gouttelettes différemment chargées sont séparées les unes des autres par un champ électrique établi entre deux plaques déflectrices (Annexe 2). La pureté de la population de DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> ainsi obtenue est  $\geq 98\%$  (**Figure 17**).

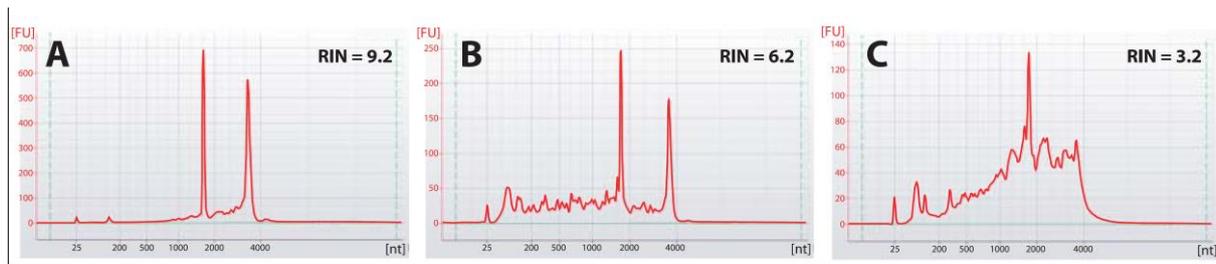


**Figure 17. Profil cytométrique des cellules obtenues par tri électronique.**

## **Extraction des ARNs**

Pour les études transcriptomiques, l'ARN total est extrait à partir de culots de DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> spléniques fraîchement isolées à l'aide du kit RNeasy (Qiagen). L'ADN génomique résiduel est éliminé par un traitement de 30 min à la désoxyribonucléase (RNase-Free DNase set, Qiagen) et les échantillons sont immédiatement stockés à -80 °C.

La qualité de l'ARN est évaluée par électrophorèse (Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies). Le dépôt des échantillons se fait sur des puces spécifiques et ne nécessite qu'une faible quantité d'ARN (50 à 400 ng). L'électrophorèse a lieu en présence d'un marqueur fluorescent et l'appareil mesure en temps réel l'intensité de fluorescence émise en fonction du temps de rétention des ARN au sein du micro-réseau. Les données de temps de rétention et d'intensité de fluorescence sont normalisées par rapport à un marqueur de poids moléculaire et les résultats sont visualisés sous forme d'électrophorégrammes. L'ARN total présente un rapport des bandes d'ARN ribosomiaux (ARNr) 28S/18S qui se rapproche de 2:1. Le logiciel évalue l'intégrité de chaque échantillon d'ARN en prenant en compte les informations provenant des pics d'ARNr et du profil général de l'électrophorégramme obtenu. Enfin, le logiciel attribue à chaque échantillon un indice de qualité, le RIN (RNA Integrity Number), qui varie sur une échelle de 0 à 10 en fonction de l'état de dégradation de l'ARN (**Figure 18**).



**Figure 18. Electrophorégrammes obtenus pour des ARN plus ou moins dégradé.** (A) ARN intacte (RIN = 9,2). (B) ARN partiellement dégradé (RIN = 6,2). (C) ARN dégradé (RIN = 3,2). (D'après <http://www.genomics.agilent.com>)

Les principaux avantages de l'utilisation de cette technologie pour l'analyse des échantillons d'ARN sont : la vitesse d'analyse, la faible quantité d'échantillon consommé, ainsi que la standardisation et l'automatisation du procédé.

La concentration en ARN des échantillons est mesurée par densité optique (DO) (Nanodrop ND-2000, Thermo Scientific NanoDrop) Les échantillons d'ARN sont validés lorsqu'ils présentent une DO 260/280 nm de 1,8 à 2,0 et une valeur de RIN comprise entre 7,5 et 10.

## Hybridation et analyse des puces d'expression

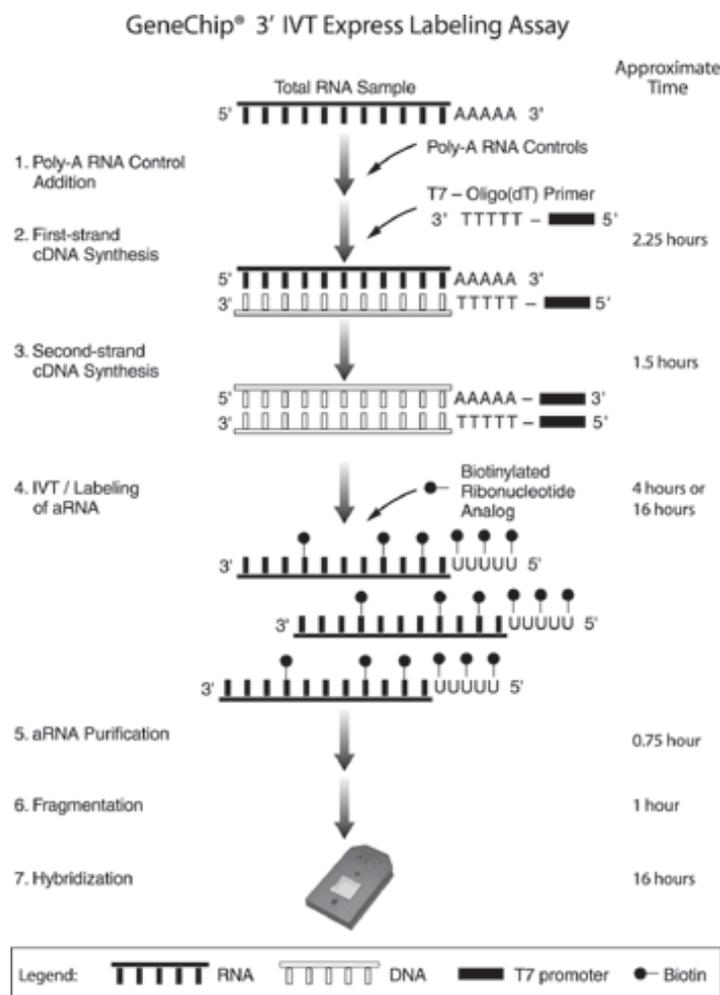
L'étude transcriptomique a été réalisée à partir des DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> triées magnétiquement provenant de pools de rats (2 rats / pool) de mâles âgés de 6 à 10 mois. Nous avons ainsi comparé les profils d'expression de 8 pools de rats HLA-B27 à 6 pools de rats HLA-B7 et 7 pools de rats NTG.

Pour cette étude, nous avons utilisé des puces pan-génomiques de rat (Affymetrix GeneChip® RatGenome 230.2.0). Ces puces fournissent une couverture complète du transcriptome du rat. Composées de plus de 31.000 probe-sets, elles permettent d'analyser plus de 30.000 transcrits et variants à partir de plus de 28.000 gènes de rats dûment annotés dans les bases de données. Les séquences utilisées dans la conception des GeneChip® RatGenome 230.2.0 ont été sélectionnées à partir de GenBank®, dbEST et RefSeq. Des sondes oligonucléotidiques complémentaires correspondant à chacune de ces séquences sont synthétisées *in situ* sur les puces. Onze paires de sondes oligonucléotidiques sont utilisées pour mesurer le niveau de transcription de chaque séquence représentée sur la puce, c'est ce que l'on appelle un Probe Set.

Dans un premier temps, 500 ng d'ARN total de DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> ont été rétro-transcrits pour chaque échantillon (Affymetrix GeneChip® 3' IVT Express Kit). L'ADNc double brin résultant est utilisé pour synthétiser de l'ARNa amplifié et biotinylé. L'ARNa est dit amplifié car la transcription *in vitro* génère de multiples copies de transcrits à partir de l'ADNc. Après purification, 7,5 pg de cet ARNa sont fragmentés et hybridés sur les puces d'expression (**Figure 19**).

L'hybridation s'effectue à 45°C sous agitation douce pendant 16 heures puis les puces sont lavées et marquées avec de la streptavidine-PE. Elles sont alors scannées après excitation par un laser à 532 nm et la quantité de lumière émise à 570 nm (longueur d'onde d'émission de la PE) est proportionnelle à la quantité de sondes hybridées pour chaque Probe Set. L'image ainsi obtenue est analysée avec le logiciel du scanner (Affymetrix) pour obtenir les fichiers .CEL, qui contiennent les valeurs brutes d'intensité de fluorescence mesurée pour chaque sonde et les mesures nécessaires aux contrôles qualité.

Dans notre cas, l'observation de ces paramètres et l'étude de la distribution des données brutes d'intensité à la surface des puces n'ont pas montré de valeurs expérimentales aberrantes nous permettant donc d'en exploiter les résultats. Les données d'expression sont disponibles dans la base de données ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) sous la référence E-MEXP-3808.



**Figure 19. Protocole d'hybridation des puces d'expression.**

(D'après GeneChip® 3' IVT Express Kit User a nual)

Après normalisation, l'expression des transcrits est comparée entre les rats HLA-B27 et HLA-B7 ainsi qu'entre les rats HLA-B27 et NTG. L'analyse de l'expression différentielle des transcrits est restreinte aux transcrits dont l'expression varie au moins d'un facteur 1,5 entre les génotypes comparés. Pour les analyses statistiques, le t-test a été utilisé pour calculer les valeurs de  $p$  avec un seuil de significativité fixé à  $p \leq 0,05$ . Nous avons ensuite utilisé les valeurs moyennes d'expression obtenues pour chaque Probe Set afin de classer les échantillons en fonction de leur profil d'expression génique par une classification hiérarchique ascendante. Brièvement, l'objectif de cette méthode d'analyse est de classer des individus en groupes ayant un comportement similaire sur un ensemble de variables, correspondant ici au profil d'expression obtenu pour les différentes sondes. L'algorithme utilisé commence par agréger les 2 individus les plus proches puis continue en agrégeant deux à deux les éléments les plus semblables jusqu'à ce que l'ensemble des individus se retrouve

dans une unique classe. Les individus sont donc regroupés de façon hiérarchique sous la forme d'un arbre contenant l'historique de la classification et cette méthode est dite ascendante car elle part du particulier pour remonter au général.

Pour l'annotation des sondes et l'analyse des réseaux de gènes, ainsi que des voies canoniques et des fonctions moléculaires impliquées, les données ont été analysées à l'aide des outils du logiciel IPA (Ingenuity Pathways Analysis, <http://www.ingenuity.com>).

## **Méta-analyse Homme/Rat des données de transcriptome**

Nous avons réalisé une méta-analyse, inspirée d'une étude publiée par Cros *et al.* (Cros et al., 2010), entre les données obtenues dans notre étude chez le rat et les données d'expression génique publiées lors d'une étude menée sur les macrophages de 8 patients atteints de SA et 9 sujets témoins en bonne santé (Smith et al., 2008a). L'extraction, la normalisation et l'analyse des données obtenues chez l'Homme ont été ré-effectuées à partir des données brutes, en suivant la méthodologie appliquée chez le rat afin d'obtenir des analyses comparables. Nous avons ensuite fusionné les données d'expression de l'Homme et du rat et réalisé une classification hiérarchique ascendante, dans le but de mettre en évidence les correspondances possibles entre les échantillons des deux espèces.

Pour cela, nous avons établi la liste des gènes différentiellement exprimés dans l'une ou l'autre de ces deux études qui étaient décrits dans les deux espèces, soit un ensemble de 251 gènes orthologues. Les sondes correspondantes ont alors été sélectionnées et regroupées par gène en utilisant leur moyenne d'intensité d'expression afin d'obtenir une mesure unique par gène et par échantillon. Pour limiter un biais spécifique de l'espèce dans les variations des niveaux d'expression génique, nous avons choisi de remplacer chaque mesure d'intensité par les valeurs "-1", "0" ou "1" en fonction de leur distance par rapport à la médiane de toutes les mesures d'intensité, toutes espèces confondues, du gène correspondant. Si la valeur est comprise dans un intervalle de 10% autour de la médiane on remplace cette valeur par "0", elle est remplacée par "-1" si elle est inférieure à cet intervalle et par "1" si elle lui est supérieure. Ainsi codées, nous avons pu fusionner les données humaines et de rat pour les soumettre à une classification hiérarchique ascendante.

## RT-PCR quantitative

Les expériences de PCR quantitative en temps réel (PCRq) ont été réalisées selon les recommandations du MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) (Bustin et al., 2010).

Pour un même échantillon, plusieurs aliquots de 100ng d'ARN ont été rétro-transcrits en ADNc en utilisant pour amorce un mélange d'oligonucléotides aléatoires composé principalement d'hexamères (Random Primers, Invitrogen). Ces aliquots sont ensuite mélangés pour homogénéiser le profil d'expression obtenu pour un échantillon. La PCRq a été réalisée en utilisant un thermocycleur LightCycler 480 permettant de travailler en plaque 96 puits et ainsi de traiter l'ensemble des échantillons dans une même expérience. Nous avons utilisé le « LightCycler 480 SYBR Green I Master Kit » (Roche) pour réaliser ces expériences. Il permet le suivi de l'amplification de l'ADN par incorporation de SYBR Green I, une molécule fluorescente capable de se lier au petit sillon de l'ADN.

Les séquences des amorces utilisées pour amplifier spécifiquement chaque transcrite d'intérêt ont été choisies à l'aide du logiciel de conception d'amorces Primer3 ([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)) et testées pour leur spécificité ainsi que leur efficacité (Annexe 3). Afin d'optimiser l'amplification de différents transcrits lors d'une même expérience, nous nous sommes attachés à sélectionner des couples d'amorces de  $T_m$  (température de fusion) comparables, comprises entre 55 et 60°C, et spécifiques d'amplicons de tailles équivalentes, autour de 100 paires de bases (pb). Cela nous a permis d'établir un programme de PCR commun, optimal pour l'amplification de tous les transcrits étudiés : une première étape de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 5 min, suivi de 45 cycles d'amplification composés de 10s à 95°C puis 10s à 60°C pour l'hybridation spécifique des amorces et enfin 15s à 72°C pour l'élongation du brin par l'ADN polymérase. Cette amplification spécifique est suivie par une courbe standard de dénaturation de l'amplicon. Cette étape consiste à augmenter la température de 45°C à 75°C par palier de 0.1°C en mesurant en continu l'intensité de fluorescence. Celle-ci chute lorsque l'on atteint la  $T_m$  de l'amplicon car ce dernier est dénaturé. La courbe de fusion obtenue nous permet de vérifier la spécificité des couples d'amorces utilisés (Annexe 4).

Leur efficacité est déterminée par l'établissement d'une courbe standard d'amplification, à partir d'une gamme de dilution d'ADN, dont la pente est directement corrélée à l'efficacité de la PCR (E) :  $E = 10^{(-1/\text{pente})}$  (Annexe 5).

Chaque échantillon est testé en duplicat et les gènes *Gapdh* (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) et *Pgk1* (phosphoglycérate kinase 1) ont été choisis en tant que gènes de référence (Pohjanvirta et al., 2006). A noter également que chaque expérience de PCRq comporte un contrôle négatif sans ADNc.

Les données ont été analysées par la méthode des  $\Delta\Delta Cq$ . Pour chaque échantillon, la quantité d'ADNc amplifié pour un gène cible (valeur Cq) est normalisée par la quantité d'ADNc amplifiée pour les gènes de référence et rapportée à un calibrateur. Le calibrateur correspond ici à l'expression moyenne obtenue sur l'ensemble des échantillons testés dans une même expérience (moyenne des Cq de tous les échantillons pour un transcrit donné). Les résultats sont ainsi représentés sous la forme d'une expression relative correspondant au paramètre NRQ (Normalised Relative Quantity), déterminé de la façon suivante :

$$NRQ = RQ_{\text{gène cible}} / RQ_{\text{gènes de référence}}$$

avec :

$$RQ_{\text{gène cible}} = E_{\text{gène cible}}^{(\Delta Cq \text{ gène cible})}$$

$$RQ_{\text{gènes de référence}} = \sqrt{(RQ_{GAPDH} * RQ_{PGKI})} = \sqrt{(E_{GAPDH}^{(\Delta Cq \text{ GAPDH})} * E_{PGKI}^{(\Delta Cq \text{ PGKI})})}$$

où Eff = Efficacité de PCR et  $\Delta Cq = Cq_{\text{calibrateur}} - Cq_{\text{échantillon}}$

## Statistiques

Pour chaque transcrit étudié, les résultats de RT-PCRq sont représentés par la moyenne des NRQ  $\pm$  SEM (Standard Error of the Mean), et la significativité des différences obtenues entre deux groupes d'individus a été déterminée par un test de Student (*t*-test) non apparié. Les valeurs de  $p < 0,05$  sont considérées comme significatives.

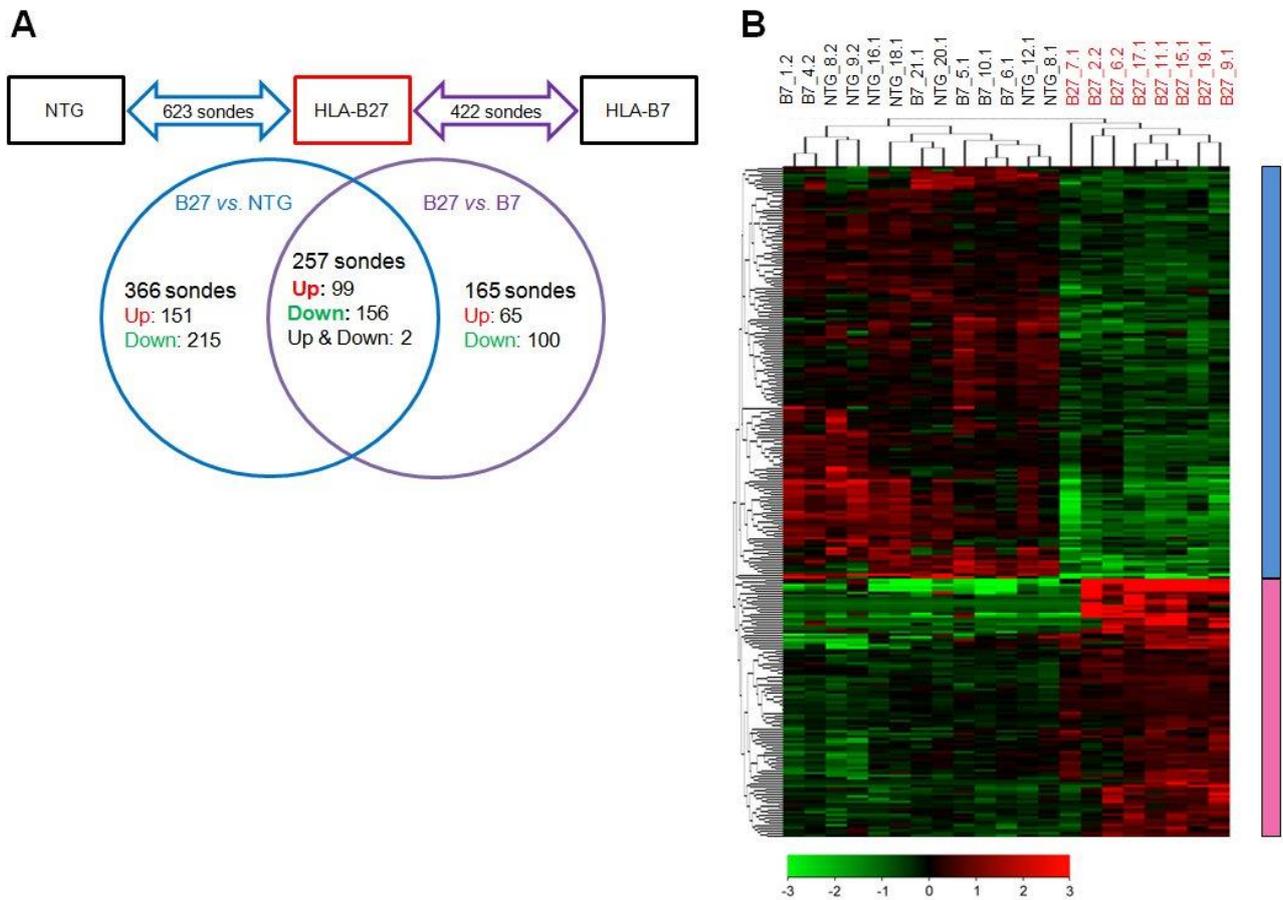
## **RESULTATS ET DISCUSSION**

# RESULTATS

## Etude transcriptomique des DC spléniques CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>

Le transcriptome de DC spléniques CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>, isolées par tri magnétique, a été comparé entre rats transgéniques HLA-B27 (n = 8 pools), HLA-B7 (n = 6 pools) et NTG (n = 7 pools). Pour cela, nous avons utilisé des puces pan-génomiques mesurant l'expression d'un ensemble de 31.100 transcrits de rat. Afin de sélectionner les transcrits d'intérêt pour la suite de l'analyse, nous avons appliqué deux critères inclusifs à l'ensemble de notre jeu de données : un seuil statistique de significativité fixé à 5% ( $p$ -value < 0,05) ainsi qu'un différentiel d'expression d'un facteur minimum de 1,5.

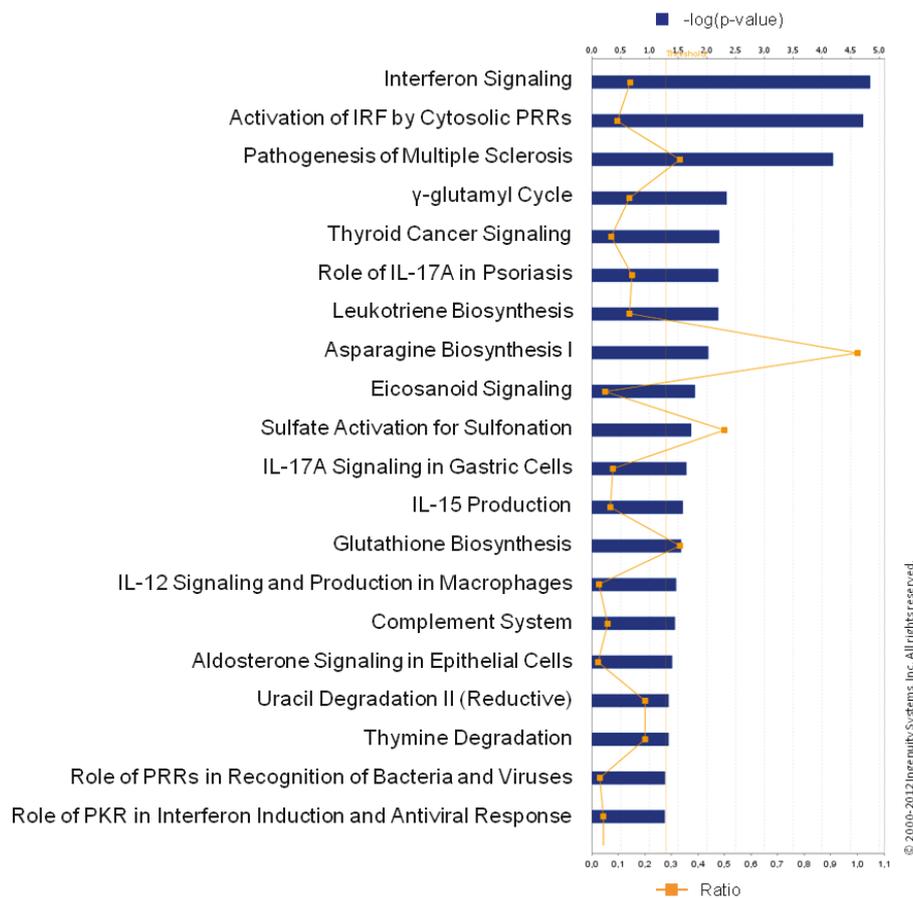
Cette analyse a, de cette façon, révélé l'expression différentielle de 422 sondes entre les DC HLA-B27 et les DC HLA-B7. Parmi ces sondes, 164 étaient surexprimées et 258 sous-exprimées chez les rats HLA-B27. Par ailleurs, lorsque nous avons comparé le transcriptome de DC HLA-B27 à celui de DC NTG, nous avons pu observer l'expression différentielle de 623 sondes, dont 252 étaient surexprimées et 371 sous-exprimées dans les DC des rats HLA-B27. Au total, nous avons pu retenir 255 sondes présentant une variation significative de leur expression dans les DC de rat HLA-B27 comparées à l'ensemble des deux groupes de rats témoins, HLA-B7 et NTG. Ces sondes correspondent à 172 gènes annotés dans les bases de données dont 69 sont surexprimés et 103 sous-exprimés chez les rats HLA-B27 selon notre étude (**Figure 20A**). En utilisant le profil d'expression de cette liste de gènes, une analyse de classification hiérarchique ascendante sépare nettement les rats HLA-B27 des rats définissant les deux groupes témoins (**Figure 20B**).



**Figure 20. Etude transcriptomique des DC spléniques CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> du rat HLA-B27**

L'analyse des puces d'expression pan-génomiques de rat a été réalisée à partir de l'ARN total de DC HLA-B27 (n=8), comparé à des DC HLA-B7 (n=6) et des DC NTG (n=7) **(A)** Diagramme de Venn représentant le chevauchement des profils d'expression obtenus dans les comparaisons DC HLA-B27 vs. DC NTG (bleu) et DC HLA-B27 vs. DC HLA-B7 (violet). Les sondes différentiellement exprimées sont caractérisées selon leur sens de variation dans les DC HLA-B27 comparées au(x) témoin(s). Seules deux sondes parmi les 257 communes aux deux listes de comparaison présentent des sens de variation opposés. **(B)** Classification hiérarchique ascendante réalisée à partir des 255 sondes communes aux deux listes de comparaison. Les barres bleue et rose représentent respectivement les transcrits sous-exprimés et surexprimés dans les DC HLA-B27.

Une analyse fonctionnelle globale de ce profil d'expression différentielle de 255 sondes a été réalisée avec le logiciel IPA. Celle-ci nous a permis de mettre en évidence que la voie de signalisation de l'interféron (IFN) était la voie de signalisation biologique la plus significativement affectée au sein de ce profil d'expression (**Figure 21**).



**Figure 21. Voies de signalisation impliquant les gènes différentiellement exprimés dans les DC HLA-B27.**

Les données d'expression ont été analysées avec le logiciel IPA (Ingenuity® Systems, <http://www.ingenuity.com>) qui permet d'identifier, à partir des bases de données du logiciel, les voies de signalisation qui sont le plus significativement affectées dans le profil d'expression différentielle. La significativité de l'association d'une voie de signalisation au profil d'expression génique est représentée par une  $p$ -value, calculée par un test exact de Fisher, dont le seuil est fixé à 5%. Le ratio représente la proportion de gènes appartenant au profil d'expression parmi l'ensemble de gènes constituant la voie de signalisation considérée.

En effet, plusieurs des gènes apparaissant fortement réprimés dans les DC de rats HLA-B27 sont liés à la voie de signalisation de l'IFN, témoignant ainsi d'une signature inverse de l'IFN. Par exemple, les gènes *Irf1*, *Irf7*, *Ifit2*, *Ifit3*, *Mx1*, *Ly6e*, *Cxcl9*, *Cxcl10* et *Cxcl11*, dont l'expression est connue pour être régulée positivement par l'IFN, sont sous-exprimés dans les DC de rats HLA-B27 (**Tableau 5**). Au total, 36 gènes parmi ceux étant sous-exprimés dans les DC HLA-B27 (soit 35%) sont directement reliés à la voie de signalisation *via* l'IFN- $\gamma$ , et une grande partie d'entre eux également à l'IFN- $\alpha$  (**Tableau 6**).

Étonnamment, les gènes les plus surexprimés dans les DC des rats HLA-B27 correspondent à des peptides anti-microbiens et à des voies de réponse de l'immunité innée : il s'agit par exemple des gènes de la famille des défensines associées à la fonction des neutrophiles (*Defa*, *Np4*, *RatNP-3b*), des protéases mastocytaires (*Mcpt1*, *Mcpt8*, *Cpa3*), des récepteurs de macrophages (*Cd163*, *Camp*, *Pglyrp1*), ou encore des gènes de l'inflammation (*S100a8*, *S100a9*) (**Tableau 5**). Cette observation soulève l'hypothèse d'une contamination possible des échantillons de DC par d'autres types cellulaires.

Pour valider les résultats obtenus avec la technologie des puces d'expression, nous avons mesuré par RT-PCRq, sur les mêmes échantillons d'ARN totaux de DC spléniques CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>, l'expression de certains des gènes différentiellement exprimés, présentant un intérêt particulier dans notre étude. Nous avons sélectionné un groupe de gènes sous-exprimés dans les DC HLA-B27 qui comprend principalement des gènes liés à la voie de signalisation de l'IFN et le gène de l'IL-10, et deux groupes de gènes surexprimés significativement correspondant à des gènes associés à l'immunité innée ou au stress du RE (**Annexe 6**). Nous avons ainsi confirmé les différences d'expression précédemment observées entre les DC HLA-B27 et les DC contrôles pour la plupart des gènes sélectionnés et ceci avec un différentiel d'expression d'amplitude similaire entre les deux techniques utilisées (**Figure 22**).

**Tableau 5. Gènes les plus différentiellement exprimés dans les DC HLA-B27.****Gènes les plus sous-exprimés dans les DC HLA-B27**

Gène	B27 vs. NTG		B27 vs. B7		Produit du gène
	P-value	Ratio	P-value	Ratio	
<i>Cxcl11</i>	1,07E-07	0,02	6,26E-06	0,06	chemokine (C-X-C motif) ligand 11
<i>LOC100363606</i>	1,23E-02	0,05	2,54E-05	0,05	mCG147639-like
<i>Ifit3</i>	4,20E-05	0,10	8,59E-03	0,21	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3
<i>Tpd5211</i>	1,17E-05	0,10	1,14E-02	0,27	tumor protein D52-like 1
<i>Krt8</i>	4,99E-06	0,15	1,01E-07	0,10	keratin 8
<i>Cmpk2</i>	3,13E-04	0,15	3,01E-03	0,20	cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2 mitochondrial
<i>Rtp4</i>	9,98E-07	0,15	1,18E-05	0,17	receptor (chemosensory) transporter protein 4
<i>Mx1</i>	2,70E-08	0,15	1,81E-06	0,19	myxovirus (influenza virus) resistance 1
<i>Ly6e</i>	1,95E-06	0,15	1,01E-05	0,16	Lymphocyte antigen 6 complex, locus E
<i>Cxcl10</i>	1,42E-06	0,16	5,65E-07	0,22	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
<i>Ifit2</i>	1,40E-05	0,16	6,44E-04	0,31	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2
<i>Irf7</i>	2,91E-06	0,17	4,46E-04	0,24	interferon regulatory factor 7
<i>Ret</i>	5,09E-07	0,19	1,36E-03	0,33	ret proto-oncogene
<i>Zbp1</i>	9,12E-09	0,21	1,90E-07	0,20	Z-DNA binding protein 1
<i>Cxcl9</i>	9,58E-07	0,22	3,08E-06	0,24	chemokine (C-X-C motif) ligand 9
<i>Ifitm3</i>	4,31E-06	0,22	1,78E-05	0,27	interferon induced transmembrane protein 3
<i>C3</i>	6,63E-05	0,24	2,47E-03	0,34	complement component 3
<i>Apoc3</i>	9,11E-04	0,24	4,39E-04	0,20	apolipoprotein C-III
<i>Oasl</i>	1,21E-05	0,24	2,48E-03	0,37	2-5-oligoadenylate synthetase-like
<i>Enpep</i>	2,35E-03	0,25	3,64E-02	0,57	glutamyl aminopeptidase (aminopeptidase A)

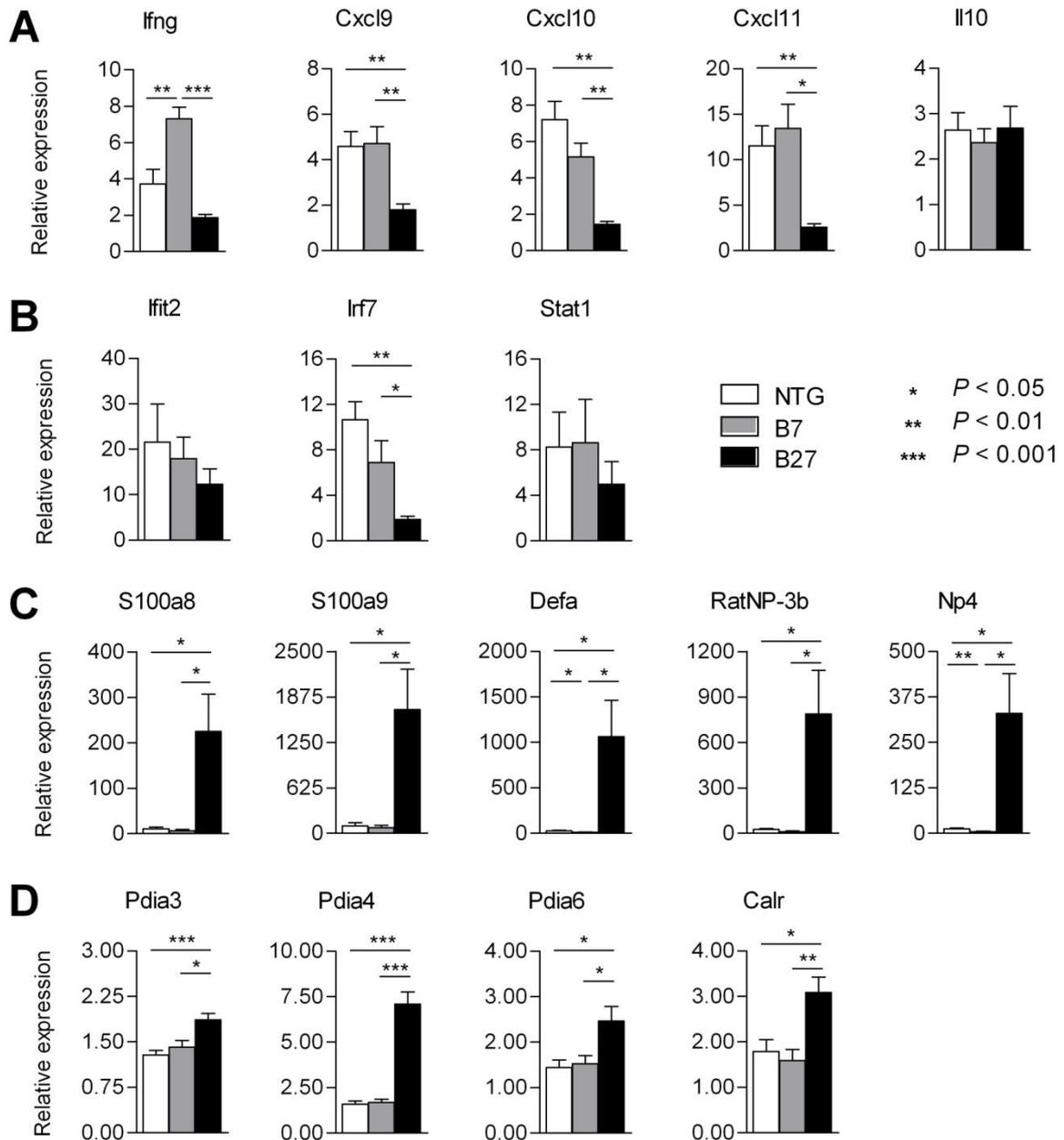
**Gènes les plus surexprimés dans les DC HLA-B27**

Gène	B27 vs. NTG		B27 vs. B7		Produit du gène
	P-value	Ratio	P-value	Ratio	
<i>Defa</i>	2,40E-04	89,11	1,25E-04	208,79	defensin
<i>Np4</i>	1,58E-04	44,78	8,09E-05	87,70	defensin NP-4 precursor
<i>RatNP-3b</i>	1,16E-04	44,01	6,79E-05	86,26	defensin RatNP-3 precursor
<i>Mcpt1</i>	2,52E-04	39,08	4,22E-03	15,15	mast cell protease 1
<i>S100a8</i>	2,19E-05	28,18	8,35E-05	29,92	S100 calcium binding protein A8
<i>Cpa3</i>	9,98E-03	26,59	1,84E-02	25,67	carboxypeptidase A3, mast cell
<i>Camp</i>	2,56E-03	24,46	4,84E-03	24,77	cathelicidin antimicrobial peptide
<i>S100a9</i>	3,72E-05	22,64	2,27E-04	23,02	S100 calcium binding protein A9
<i>Cd163</i>	1,56E-03	19,65	4,55E-02	6,96	CD163 molecule
<i>Pglyrp1</i>	2,58E-03	15,73	5,22E-03	15,57	peptidoglycan recognition protein 1
<i>Cd209b</i>	1,04E-02	14,08	1,70E-02	14,22	CD209b antigen
<i>Mcpt8</i>	7,14E-03	13,58	6,72E-03	15,34	mast cell protease 8
<i>Ccr4</i>	1,36E-02	11,00	1,74E-02	11,89	chemokine (C-C motif) receptor 4
<i>Mcpt4</i>	7,24E-03	8,87	1,55E-02	8,40	mast cell peptidase 4
<i>Cldn10</i>	9,49E-03	5,30	1,60E-02	5,31	claudin 10
<i>Slc1a3</i>	1,48E-02	4,71	2,40E-02	4,70	solute carrier family 1, member 3
<i>Pcsk1</i>	3,64E-04	4,58	3,50E-03	2,85	proprotein convertase subtilisin/kexin type 1
<i>Sphk1</i>	6,07E-03	3,87	1,07E-02	3,87	sphingosine kinase 1
<i>Cox6a2</i>	5,53E-04	3,52	9,42E-03	2,37	cytochrome c oxidase subunit 6a polypeptide 2
<i>Cpd</i>	3,78E-03	3,22	9,83E-04	4,40	carboxypeptidase D

**Tableau 6. Gènes liés à l'IFN $\gamma$  parmi les gènes dérégulés chez les DC HLA-B27.**

Gène	B27 vs. NTG		B27 vs. B7		Produit du gène
	P-value	Ratio	P-value	Ratio	
<i>Ifng</i>	2,27E-01	0,66	2,93E-02	0,36	interferon, gamma
<i>Cxcl11</i>	1,07E-07	0,02	6,26E-06	0,06	chemokine (C-X-C motif) ligand 11
<i>Ifit3</i> *	4,20E-05	0,10	8,59E-03	0,21	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3
<i>Rtp4</i>	9,98E-07	0,15	1,18E-05	0,17	receptor (chemosensory) transporter protein 4
<i>Mx1</i> *	2,70E-08	0,15	1,81E-06	0,19	myxovirus (influenza virus) resistance 1
<i>Ly6e</i> *	1,95E-06	0,15	1,01E-05	0,16	lymphocyte antigen 6 complex, locus E
<i>Cxcl10</i> *	1,42E-06	0,16	5,65E-07	0,22	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
<i>Irf7</i> *	2,91E-06	0,17	4,46E-04	0,24	interferon regulatory factor 7
<i>Ifit2</i> *	6,53E-05	0,20	3,29E-03	0,36	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2
<i>Cxcl9</i> *	9,58E-07	0,22	3,08E-06	0,24	chemokine (C-X-C motif) ligand 9
<i>C3</i>	6,63E-05	0,24	2,47E-03	0,34	complement component 3
<i>Oasl</i>	1,22E-05	0,24	2,48E-03	0,37	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like
<i>Ly6a</i> *	6,71E-04	0,29	2,60E-02	0,49	lymphocyte antigen 6 complex, locus A
<i>Btn3a2</i>	3,26E-02	0,29	8,53E-03	0,35	butyrophilin, subfamily 3, member A2
<i>Lgals3bp</i>	1,95E-08	0,30	1,37E-06	0,31	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein
<i>Cyp27a1</i>	2,41E-07	0,31	4,09E-06	0,42	cytochrome P450, family 27, subfamily A, polypeptide 1
<i>Vipr1</i>	7,29E-04	0,32	2,46E-02	0,44	vasoactive intestinal peptide receptor 1
<i>Isg15</i>	4,31E-05	0,35	8,26E-04	0,37	ISG15 ubiquitin-like modifier
<i>Ubd</i>	1,65E-05	0,36	3,89E-07	0,35	ubiquitin D
<i>C1r</i>	2,01E-03	0,40	3,15E-02	0,65	complement component 1, r subcomponent
<i>Oasl</i>	1,29E-02	0,42	2,55E-02	0,38	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa
<i>Herc6</i>	1,83E-05	0,44	6,70E-04	0,51	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 6
<i>Dhx58</i>	5,28E-05	0,46	1,80E-05	0,51	DEXH (Asp-Glu-X-His) box polypeptide 58
<i>Gzmm</i>	8,14E-03	0,46	3,44E-03	0,09	granzyme M (lymphocyte met-ase 1)
<i>Cdc42ep2</i>	1,66E-02	0,47	3,29E-02	0,62	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 2
<i>Cmpk2</i>	8,07E-05	0,49	1,57E-03	0,59	cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2, mitochondrial
<i>Gbp2</i>	7,75E-05	0,51	5,48E-03	0,63	guanylate binding protein 2
<i>Stat1</i> *	1,57E-04	0,53	5,68E-03	0,55	signal transducer and activator of transcription 1
<i>Ifi44l</i>	5,85E-03	0,57	1,59E-02	0,54	interferon-induced protein 44-like
<i>Phactr1</i>	9,58E-04	0,58	1,15E-05	0,45	phosphatase and actin regulator 1
<i>Irf1</i> *	2,62E-06	0,59	2,23E-05	0,62	interferon regulatory factor 1
<i>Isg20</i>	4,48E-04	0,62	1,27E-03	0,60	interferon stimulated exonuclease gene 20kDa
<i>Retnla</i>	1,47E-02	0,63	6,48E-03	0,53	resistin like alpha
<i>Marcks1l</i>	3,53E-04	0,64	2,61E-03	0,66	MARCKS-like 1
<i>Pla2g16</i>	1,42E-03	0,66	2,71E-03	0,61	phospholipase A2, group XVI
<i>RT1-EC2</i>	1,37E-05	0,67	4,47E-05	0,61	RT1 class Ib, locus EC2
<i>Mmp11</i>	1,28E-02	1,64	3,56E-02	1,57	matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)
<i>Tnfrsf25</i>	1,69E-02	1,70	2,92E-02	1,67	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25
<i>Sell</i>	2,15E-02	1,80	1,22E-02	1,97	selectin L
<i>Slc12a2</i>	5,89E-03	2,17	8,41E-03	2,15	solute carrier family 12, member 2
<i>Chac1</i>	3,45E-03	2,27	1,44E-02	2,07	ChaC, cation transport regulator homolog 1 (E, coli)
<i>Egr2</i>	2,70E-03	2,32	1,66E-03	2,44	early growth response 2
<i>Cpd</i>	3,78E-03	3,22	9,83E-04	4,40	carboxypeptidase D
<i>Sphk1</i>	6,07E-03	3,87	1,07E-02	3,87	sphingosine kinase 1
<i>Pcsk1</i>	1,16E-06	4,18	2,96E-05	2,57	proprotein convertase subtilisin/kexin type 1
<i>Slc1a3</i>	1,48E-02	4,71	2,40E-02	4,70	solute carrier family 1, member 3
<i>Ccr4</i>	1,36E-02	11,00	1,74E-02	11,89	chemokine (C-C motif) receptor 4
<i>Cd163</i>	1,56E-03	19,65	4,55E-02	6,96	CD163 molecule
<i>S100a9</i>	3,72E-05	22,64	2,27E-04	23,02	S100 calcium binding protein A9
<i>Camp</i>	2,56E-03	24,46	4,84E-03	24,77	cathelicidin antimicrobial peptide
<i>S100a8</i>	2,19E-05	28,18	8,35E-05	29,92	S100 calcium binding protein A8

\* gènes communs à la signalisation par l'interféron  $\alpha/\beta$ .



**Figure 22. Validation de l'expression différentielle des gènes d'intérêt par RT-PCRq.**

(A) Cytokines et chimiokines, (B) facteurs de transcription impliqués dans la voie de signalisation de l'IFN, (C) protéines de l'immunité innée et (D) de la réponse au stress du RE, dans les échantillons d'ARN de DC spléniques CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> HLA-B27 (n=8), HLA-B7 (n=6) et NTG (n=7) utilisés pour les puces d'expression. Les résultats ont été normalisés par l'expression des gènes de ménage *Gapdh* et *Pgkl* et sont représentés par une valeur d'expression relative correspondant à la moyenne  $\pm$  SEM des NRQ obtenus pour chaque groupe d'échantillons. L'analyse statistique a été réalisée par un test t de Student non apparié.

## Réplication de l'expression différentielle des gènes d'intérêt à différents âges chez le rat HLA-B27

Nous avons pu mettre en évidence un ensemble de gènes différentiellement exprimés entre les DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> provenant de rats HLA-B27 en comparaison aux DC de rats témoins. La transcription différentielle des gènes dans une cellule, ici la DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>, détermine ses propriétés. De façon légitime, nous nous sommes alors interrogés sur l'influence que pourrait avoir l'évolution de la SpAr sur l'expression de ces gènes d'intérêt

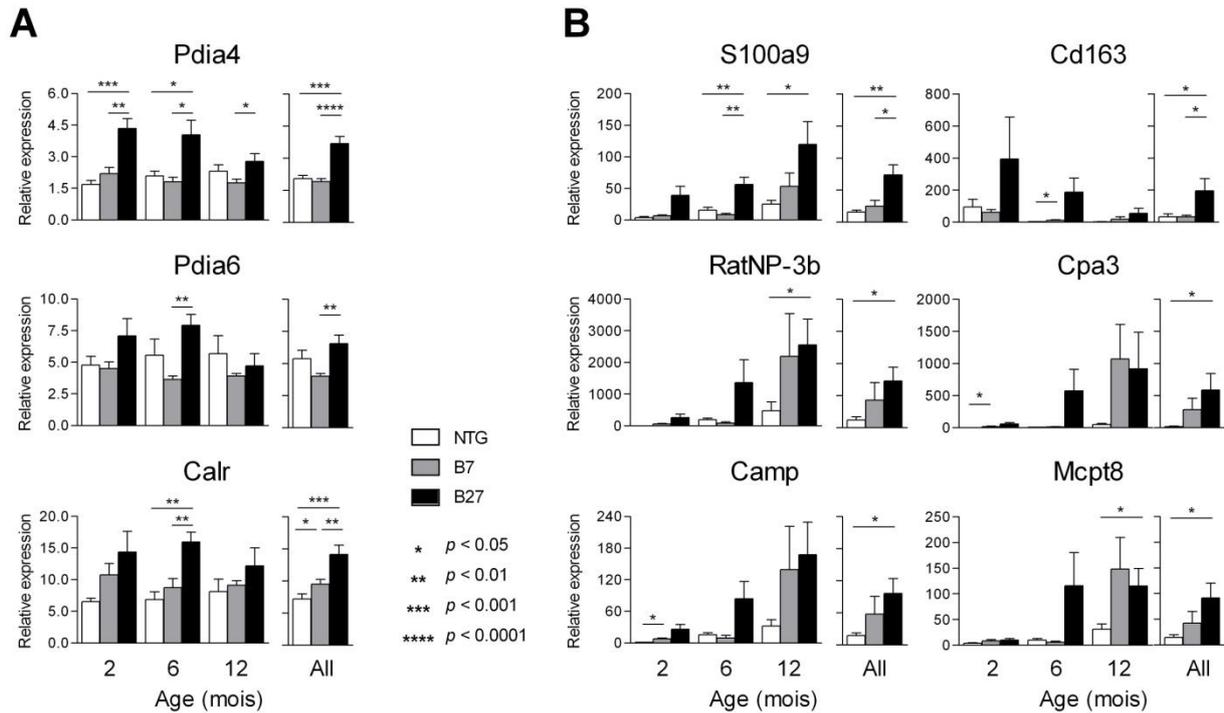
Dans le but de suivre l'expression de ces gènes au cours de l'évolution de la maladie, leur niveau de transcrits a été mesuré par RT-PCRq chez des rats âgés de 2 mois, 6 mois ou 1 an. Cette cinétique a été réalisée à partir d'ARN de DC spléniques CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>, isolées par tri magnétique, provenant de rats HLA-B27, HLA-B7 et NTG.

L'expression réduite de plusieurs cytokines, chimiokines et facteurs de transcription associés à la voie de l'IFN (**Figure 23**) ainsi que la surexpression de gènes impliqués dans le stress du RE (**Figure 24A**) et l'immunité innée et/ou anti-microbienne (**Figure 24B**) ont été retrouvées dans les DC de rats HLA-B27 dès l'âge de 2 mois.

Toutefois, il est à noter que seule la surexpression des gènes intervenant dans l'immunité innée et/ou antimicrobienne semble évoluer en fonction de l'âge des animaux (**Figure 24B**). En effet, pour la plupart des gènes étudiés ici, le différentiel d'expression observé dans les DCs HLA-B27 persiste jusqu'à l'âge de 1 an, sans pour autant être modulé significativement au cours du temps. Parallèlement, nous avons donc regroupé les données des échantillons de rats d'âges différents mais de même génotype afin d'enrichir les effectifs et augmenter ainsi la puissance statistique de notre analyse.

Celle-ci a permis de valider les différentiels d'expression obtenus pour l'ensemble des gènes d'intérêt examinés lors de ces expériences de réplication, réalisées sur des échantillons indépendants de notre étude transcriptomique initiale. Soulignons néanmoins que les résultats les plus significatifs ont été obtenus pour les gènes impliqués dans la voie de l'IFN (**Figure 23**) et le stress du RE (**Figure 24A**).





**Figure 24. Expression des gènes impliqués dans le stress du RE et l'immunité innée à différents âges.**

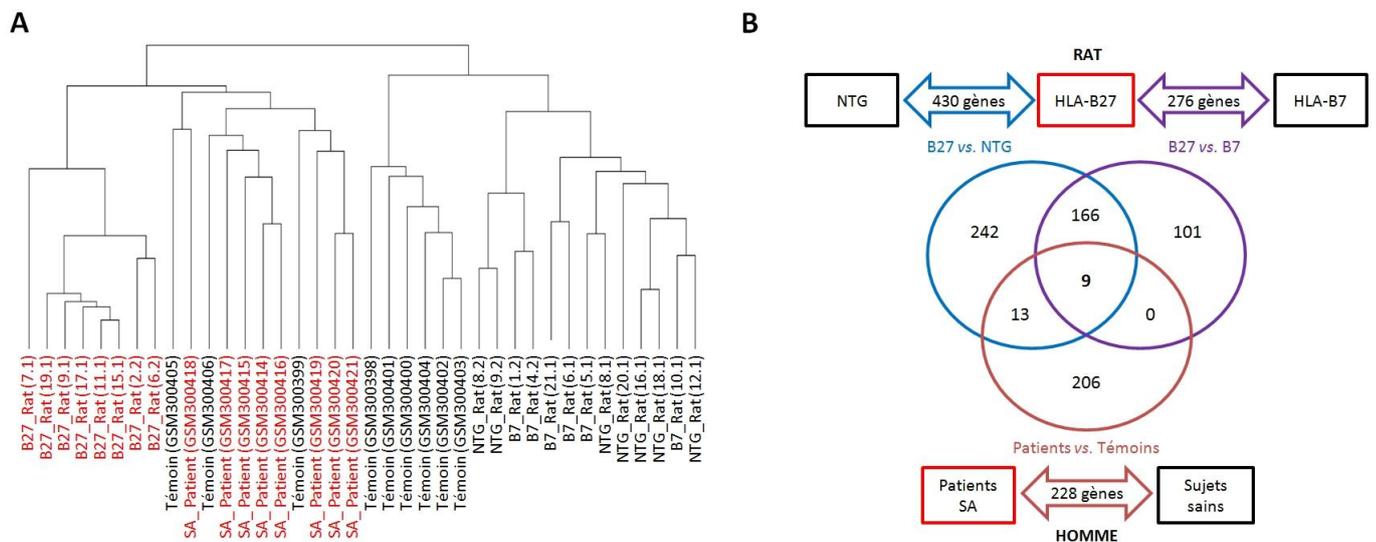
Nous avons quantifié par RT-PCRq l'expression de gènes impliqués dans (A) la réponse au stress du RE et (B) l'immunité innée, dans des DC spléniques  $CD103^+ CD4^+$  isolées par tri magnétique à partir de rats HLA-B27, HLA-B7 et NTG aux âges indiqués. Les résultats ont été normalisés par l'expression des gènes de ménage *Gapdh* et *Pgk1* et sont représentés par une valeur d'expression relative, correspondant à la moyenne  $\pm$  SEM des NRQ obtenus pour chaque groupe d'échantillons ( $n=5$  à 6 pools de 2 rats par condition). L'analyse statistique de ces résultats a été réalisée par un test *t* de Student non apparié.

## Défaut de la voie de signalisation de l'IFN commun aux rats HLA-B27 et aux patients atteints de SA

Lors d'une précédente étude, Smith et al. ont comparé le transcriptome de macrophages dérivés de monocytes entre des patients atteints de SA ( $n = 8$ ) et des sujets sains ( $n = 9$ ), mettant en évidence une signature inverse de l'IFN $\gamma$  (Smith et al., 2008a). Certaines de nos données n'étant pas sans rappeler ces résultats, nous avons effectué une méta-analyse des données de transcriptome obtenues chez l'Homme avec celles du rat, dans le but de révéler les concordances possibles entre les échantillons de ces deux espèces. Pour cela, l'extraction, la normalisation et l'analyse des données d'expression obtenues chez l'Homme

ont été réalisées en suivant la même méthodologie et en appliquant les mêmes seuils de significativité que lors de notre étude transcriptomique chez le rat.

Une analyse de classification hiérarchique combinée (Homme et rat) a été réalisée à partir du profil d'expression de 251 gènes orthologues. Celle-ci a permis de séparer distinctement deux groupes d'échantillons constitués de tous les patients et rats HLA-B27 (n = 16) d'un côté, et de 19 des 22 témoins rats et humains de l'autre (**Figure 25A**). La méta-analyse des données d'expression des deux espèces a révélé 9 gènes différentiellement exprimés de manière commune par les patients atteints de SA et les rats HLA-B27, par rapport à leurs témoins respectifs (**Figure 25B**). Par ailleurs, il est important de souligner que le sens de variation de ces gènes était le même entre patients et rats HLA-B27 pour 7 d'entre eux, correspondant tous à une signature inverse de l'IFN (**Tableau 7**).



**Figure 25. Méta-analyse et profil d'expression combiné entre patients atteints de SA et rats HLA-B27. (A) Classification hiérarchique ascendante combinée entre Homme et rat, réalisée à partir de l'expression de 255 sondes orthologues. Cette analyse sépare distinctement les patients atteints de SA et rats HLA-B27 d'une part (en rouge, n=16), et 19 des 22 témoins rats et humains d'autre part (en noir). (B) Diagramme de Venn représentant le chevauchement des profils d'expression obtenus dans les comparaisons DC HLA-B27 vs. DC NTG (bleu), DC HLA-B27 vs. DC HLA-B7 (violet) et macrophages de patients SA vs. macrophages de sujets sains (rouge).**

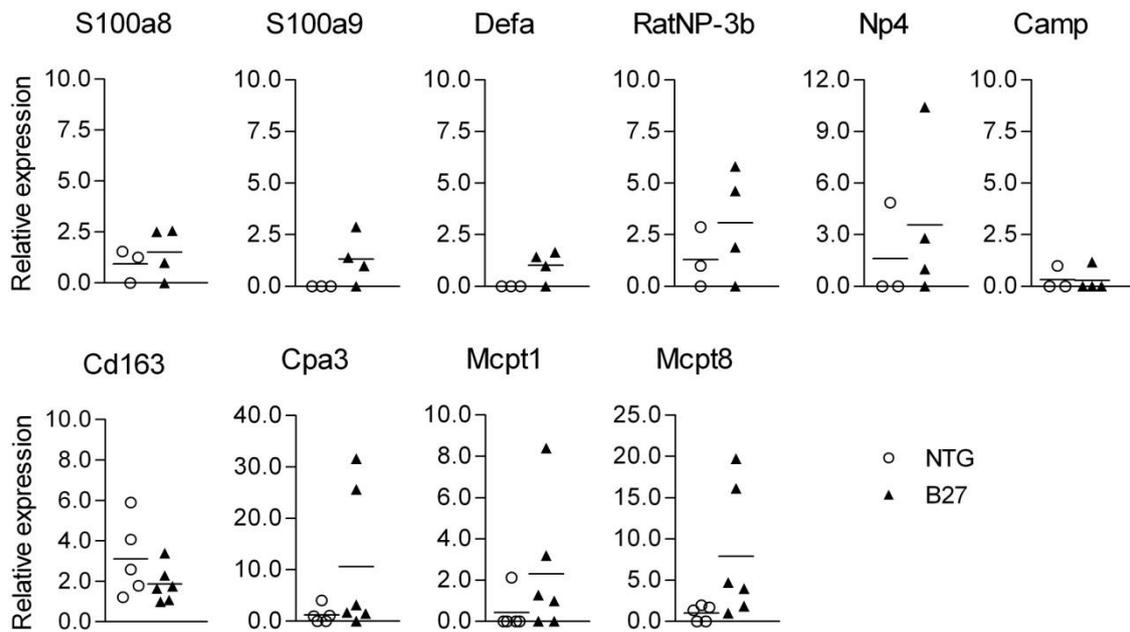
**Tableau 7. Gènes communs différentiellement exprimés dans les macrophages de patients atteints de SA et les DC de rats HLA-B27.**

Gène	Homme		Rat				Produit du gène
	Patients vs. Contrôles		HLA-B27 vs. NTG		HLA-B27 vs. HLA-B7		
	P-value	Ratio	P-value	Ratio	P-value	Ratio	
<i>Cxcl9</i>	8,39E-03	0,28	9,58E-07	0,22	3,08E-06	0,24	chemokine (C-X-C motif) ligand 9
<i>Cxcl10</i>	7,61E-03	0,20	1,42E-06	0,16	5,65E-07	0,22	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
<i>Ifit3</i>	6,34E-03	0,64	4,20E-05	0,10	8,59E-03	0,21	IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats 3
<i>Irf1</i>	6,76E-03	0,32	2,62E-06	0,59	2,23E-05	0,62	IFN regulatory factor 1
<i>Stat1</i>	5,41E-03	0,46	1,57E-04	0,53	5,39E-05	0,67	signal transducer and activator of transcription 1
<i>Ddx60</i>	4,20E-02	0,56	2,37E-05	0,43	3,93E-05	0,35	DEAD box polypeptide 60
<i>Epstil</i>	1,95E-03	0,30	4,43E-03	0,61	7,37E-03	0,62	epithelial stromal interaction 1
<i>Tpd52l</i>	2,94E-02	1,89	1,17E-05	0,10	1,14E-02	0,27	tumor protein D52-like 1
<i>Sell</i>	3,88E-02	0,50	2,15E-02	1,80	1,22E-02	1,97	L-selectin

## Confirmation dans des DC hautement purifiées du défaut de la voie de l'IFN et de la surexpression de gènes du stress du RE

Les expériences précédentes ont soulevé l'hypothèse d'une contamination possible des DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> triées magnétiquement par d'autres populations cellulaires du type macrophage, neutrophile ou encore mastocyte. Il était donc capital pour nous de savoir si les différences d'expression observées seraient retrouvées sur des échantillons de DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> hautement purifiées. Nous avons donc répété nos expériences de RT-PCRq sur des DC spléniques de rats HLA-B27 et NTG, triées cette fois-ci par cytométrie. De façon très satisfaisante, nos échantillons étaient alors d'une pureté supérieure à 98%.

Dans ces conditions, les gènes de l'immunité innée et/ou antimicrobienne testés précédemment, présentaient une très faible expression, parfois même indétectable (**Figure 26**). Ainsi, leur surexpression dans les DC de rats HLA-B27 triées magnétiquement reflétait bien la présence de populations cellulaires contaminantes, probablement surnuméraires chez ces rats en raison du contexte inflammatoire qu'ils développent.

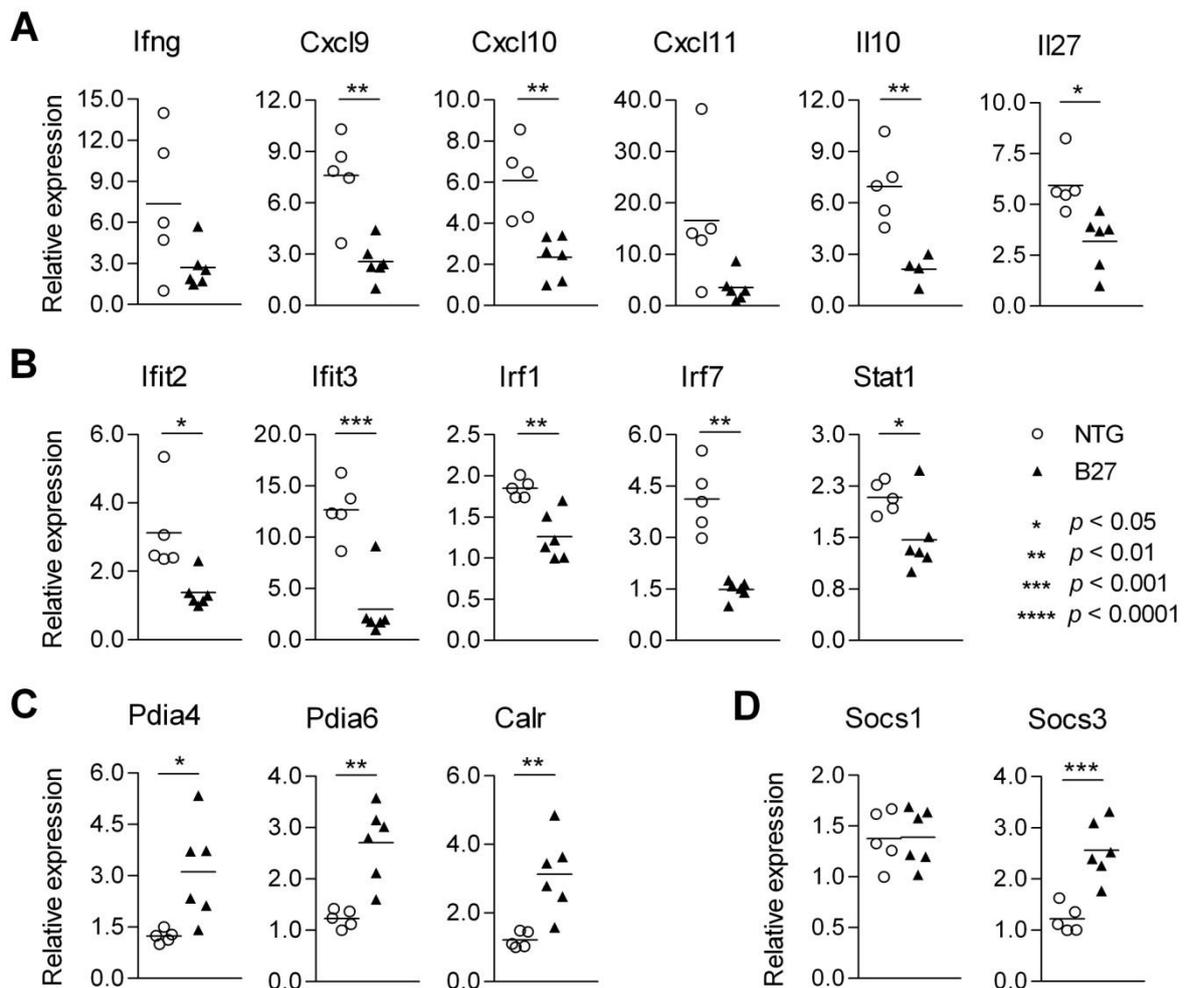


**Figure 26. Expression des gènes de l'immunité innée et antimicrobienne dans les DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> triées par FACS.** Nous avons quantifié par RT-PCRq l'expression de gènes impliqués dans l'immunité innée et antimicrobienne dans les DC spléniques CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> triées par cytométrie à partir de 3 à 6 pools de rats HLA-B27 et NTG âgés de 6 à 8 mois. Les résultats ont été normalisés par l'expression des gènes de ménage *Gapdh* et *Pgk1* et sont représentés par des valeurs d'expression relative (NRQ), dont la moyenne est matérialisée par une barre horizontale. L'analyse statistique de ces résultats a été réalisée par un test *t* de Student non apparié.

Cette étude menée sur des DC hautement purifiées a, en revanche, clairement permis d'attribuer l'altération de la voie de signalisation de l'IFN aux DC spléniques CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> de rats HLA-B27. En effet, la plupart des gènes liés à cette voie ont été retrouvés sous-exprimés dans ces cellules (**Figure 27A et 27B**), notamment ceux de la signature commune aux patients atteints de SA : *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Ifit3*, *Irf1* et *Stat1*. La sous-expression de l'*IL10* (**Figure 27A**) ainsi que la surexpression des gènes *Pdia4*, *Pdia6* et *Calr*, liés à la réponse au stress du RE (**Figure 27C**), ont également été confirmées dans les DC de rats HLA-B27.

Il a récemment été démontré que l'activation de la voie de signalisation de l'IFN $\gamma$  dans les DC induit l'expression de la cytoïne IL-27. Cette dernière favorise alors la suppression de la production d'IL-17 et l'induction de la sécrétion d'IL-10 par les LT (Murugaiyan et al., 2010). De manière intéressante, nous avons observé une expression significativement réduite du gène *Il27* dans les DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> purifiées de rats HLA-B27 (**Figure 27A**).

Par ailleurs, nous avons également étudié dans ces cellules l'expression de gènes *Socs1* et *Socs3*, suppresseurs de la signalisation cytokinique, et connus pour leur rôle crucial dans la limitation des réponses inflammatoires médiées par certaines cytokines, dont l'IFN. Aucune différence n'a été observée dans l'expression de *Socs1* entre les rats HLA-B27 et NTG. En revanche, *Socs3* est surexprimé dans les DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> de rats HLA-B27, fournissant une piste plausible quant à la régulation négative de la voie de signalisation de l'IFN (**Figure 27D**).



**Figure 27. Expression des gènes d'intérêt dans les DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> triées par FACS.**

Nous avons quantifié par RT-PCRq l'expression de gènes codant pour (A) des cytokines et chimiokines et (B) des facteurs de transcription impliqués dans la voie de signalisation de l'IFN, (C) la réponse au stress du RE et (D) des suppresseurs de la signalisation cytokinique. L'expression de ces gènes a été mesurée dans les DC spléniques CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> triées par cytométrie et provenant de rats HLA-B27 (n=6) et NTG (n=5) âgés de 6 à 8 mois. Les résultats ont été normalisés par l'expression des gènes de ménage *Gapdh* et *Pgk1* et sont représentés par des valeurs d'expression relative (NRQ), dont la moyenne est matérialisée par une barre horizontale. L'analyse statistique de ces résultats a été réalisée par un test *t* de Student non apparié.

## Défaut de la voie de signalisation de l'IFN retrouvé dans les DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> des rats mâles (21-3h x 283-2)F1

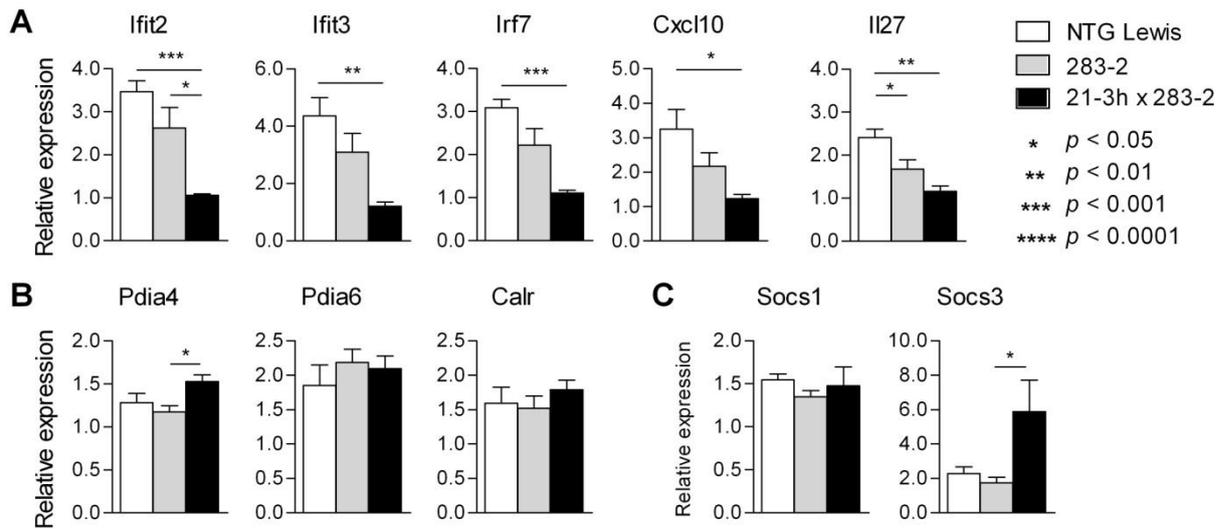
Rappelons que pour étudier le rôle potentiel de l'UPR et du stress du RE dans le déclenchement de la SpA, des rats transgéniques de la lignée 21-3h, exprimant des niveaux modérés de HLA-B27 et de  $\beta_2$ mh, ont été croisés avec des rats de la lignée 283-2 transgéniques uniquement pour la  $\beta_2$ mh (**Tableau 3**). Dans la génération F1, les mâles porteurs des deux locus transgéniques développent une forme sévère de SpAr, malgré la mise en évidence d'un meilleur repliement du HLA-B27 et d'une réduction du stress du RE chez ces animaux (Tran et al., 2006).

Lors d'une étude précédente, nous avons montré que les DC spléniques de ces rats présentaient le même défaut fonctionnel que les rats HLA-B27 de la lignée 33-3, à savoir une capacité réduite à stimuler la prolifération des LT (Fert et al., 2008). Ici, nous avons voulu examiner si dans cet autre modèle de SpA l'expression du HLA-B27 était également associée à un défaut de la signalisation de l'IFN.

Ainsi, plusieurs gènes de cette voie (*Cxcl10*, *Ifit2*, *Ifit3*, *Irf7*) ont été retrouvés sous-exprimés dans les DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> de mâles (21-3h x 283-2)F1, comparés aux rats NTG et/ou transgéniques pour la  $\beta_2$ mh (lignée 283-2) (**Figure 28A**).

De manière intéressante, parmi les gènes étudiés et impliqués dans la réponse au stress du RE, seule l'expression de *Pdia4* a été retrouvée légèrement augmentée chez les mâles (21-3h x 283-2)F1 (**Figure 28B**).

Enfin, la surexpression de *Socs3* et une diminution de l'expression de *Il27* ont également été retrouvées dans ce modèle, à l'instar de ce qui a été observé dans la lignée 33-3 (**Figure 28A et 28C**).



**Figure 28. Expression des gènes d'intérêt dans les DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> de rats mâles (21-3h x 283-2)F1.** Nous avons quantifié par RT-PCRq l'expression de gènes impliqués dans (A) la voie de signalisation de l'IFN, (B) la réponse au stress du RE et (C) la suppression de la signalisation cytokinique, dans des DC spléniques CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>, triées par cytométrie, de mâles (21-3h x 283-2)F1 (n=4), NTG (n=4) et 283-2 (n=4), âgés de 6 à 10 mois. Les résultats ont été normalisés par l'expression des gènes de ménage *Gapdh* et *Pgkl* et sont représentés par une valeur d'expression relative, correspondant à la moyenne  $\pm$  SEM des NRQ obtenue pour chaque groupe d'échantillons. L'analyse statistique de ces résultats a été réalisée par un test *t* de Student non apparié.

## DISCUSSION

Plusieurs hypothèses ont été proposées au fil des années pour expliquer l'association intrigante entre SpA et HLA-B27. Les travaux de recherche réalisés sur les lignées de rats transgéniques pour le HLA-B27 et la  $\beta_2\text{mh}$  ont permis de vérifier certaines d'entre elles. Par exemple, l'hypothèse du peptide arthritogène responsable du déclenchement d'une réponse auto-immune (Benjamin and Parham, 1990) est devenue peu probable, puisqu'il a été montré que les LT  $\text{CD8}^+$  ne sont pas nécessaires au développement de la maladie chez les rats (Breban et al., 1996), (May et al., 2003), (Taurog et al., 2009). Les résultats obtenus par les expériences de transfert de cellules menées dans des études antérieures nous ont conduit à l'hypothèse que les CPA exprimant des niveaux élevés de HLA-B27 et  $\beta_2\text{mh}$  étaient nécessaires à l'induction de la maladie, en interagissant avec les cellules T  $\text{CD4}^+$  (Breban et al., 1993), (Breban et al., 1996).

Nous avons déjà évoqué que les DC HLA-B27 des lignées de rats transgéniques développant la maladie présentent des fonctions altérées (Hacquard-Bouder et al., 2004) (Hacquard-Bouder et al., 2007). L'une des anomalies constantes révélée au cours de nos expériences a été la capacité diminuée des DC HLA-B27 à stimuler les cellules T (Hacquard-Bouder et al., 2007) Ce phénomène est lié à l'altération de la formation de la synapse immunologique entre les DC exprimant le HLA-B27 et les cellules T  $\text{CD4}^+$ .

Nous avons montré que cette altération pouvait être due à plusieurs anomalies moléculaires : un défaut d'engagement des molécules de co-stimulation exprimées à la surface des DC avec leurs partenaires sur les lymphocytes T, une dynamique altérée du cytosquelette, ou encore une expression réduite des molécules du CMH de classe II et une mort par apoptose accrue de ces cellules. Par ailleurs, ce défaut de stimulation des lymphocytes T a été retrouvé dans des DC dérivés de monocytes de patients atteints de SpA (Bonilla et al., 2009, communication orale). C'est pourquoi dans l'étude qui vous est présentée ici, nous avons choisi d'examiner les voies de signalisation pouvant être dérégulées dans les DC par l'expression du HLA-B27.

Notre travail s'est focalisé sur les DC spléniques  $\text{CD103}^+ \text{CD4}^+$ , car cette population est impliquée dans l'activation des LT et qu'elle est suffisamment caractérisée pour être purifiée (Voisine et al., 2002). Ainsi, nous avons choisi une approche transcriptomique du génome entier sur les DC  $\text{CD103}^+ \text{CD4}^+$  fraîchement isolées de la rate. Les résultats obtenus

ont révélé un profil d'expression génique dérégulé dans les DC isolées de rat HLA-B27 de la lignée 33-3, avec la mise en évidence frappante d'une signature inverse de l'IFN dans ces cellules.

Cette observation a été confirmée à plusieurs reprises au cours de cette étude. Dans un premier temps, en utilisant des rats d'âges différents, nous avons retrouvé ce défaut de la voie de signalisation de l'IFN et ceci dès l'âge de 2 mois, soit dès le début de la maladie. Nous avons par la suite confirmé nos observations dans des DC hautement purifiées par tri électronique. Puisque de telles variations d'expression sont présentes dans les DC spléniques du rat HLA-B27 au moment de l'apparition de la maladie et qu'elles persistent au cours de son développement, il est concevable que certains des gènes étudiés puissent contribuer au processus inflammatoire chronique chez ces animaux. Par ailleurs, nous avons également mis cela en évidence dans une autre lignée transgénique pour le HLA-B27 et la  $\beta_2m\mu$ , celle des rats (21-3h x 283-2)F1, dont le phénotype correspond étroitement à celui de la SA, sans inflammation intestinale. De plus, nous avons constaté que cette signature inverse de l'IFN chez les DC de rats HLA-B27 était partagée avec les macrophages dérivés de monocytes de patients atteints de SA (Smith et al., 2008a).

L'IFN regroupe une famille de cytokines produites par de nombreux types cellulaires et caractérisées par leur implication commune dans la réponse antivirale. Il existe les IFN de type I, incluant principalement l'IFN $\alpha$  et l'IFN $\beta$ , et l'IFN de type II correspondant à l'IFN $\gamma$ . Ce dernier est connu pour être majoritairement sécrété lors de l'activation des cellules Th1, des LT CD8<sup>+</sup> et des cellules natural killer (NK). Toutefois, des études ont montré que les cellules myéloïdes, telles que les DC conventionnelles et les macrophages, sécrètent aussi l'IFN $\gamma$  qui est probablement important pour leur activation autocrine pendant le début d'une infection. Les IFN de type I quand à eux sont sécrétés de manière caractéristique par les pDC et les cellules infectées lors d'une réponse antivirale

Les gènes impliqués dans la réponse antivirale sont préférentiellement induits par les IFN de type I, mais l'IFN $\gamma$  est connu pour sa capacité à inhiber directement la réplication virale. Par ailleurs, les deux types d'IFN partagent des propriétés anti-tumorales à travers leur capacité à inhiber la prolifération cellulaire. Cette activité antiproliférative est notamment médiée par le gène suppresseur de tumeur *IRF1* (interferon regulatory factor 1) induit par l'IFN $\gamma$ .

L'IFN $\gamma$  est une cytokine essentielle pour l'immunité innée et adaptative contre les infections intracellulaires bactériennes et virales. L'IFN $\gamma$  présente des propriétés immunorégulatrices particulières, il va :

- Activer les macrophages, les cellules NK et les LT CD8<sup>+</sup>.
- Augmenter l'expression des molécules du CMH de classe I et classe II.
- Participer à la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> en cellules Th1.
- Permettre la commutation de classe des LB vers la production d'IgG opsonisantes
- Participer au chimiotactisme des LT en induisant la sécrétion de chimiokines telles que CXCL9, CXCL10 et CXCL11.

Ces trois chimiokines se fixent sur un récepteur commun, CXCR3, présent à la surface des cellules NK et des LT activés. Ce récepteur est décrit comme préférentiellement exprimé à la surface des cellules Th1 et l'interaction CXCR3/ligand conduit au recrutement et à la maturation de ces cellules effectrices sous la dépendance de l'IFN $\gamma$ , entraînant une boucle d'amplification de la réponse Th1 (Groom and Luster, 2011). Au cours de notre étude, nous avons clairement établi la sous-expression des gènes *Cxcl9*, *Cxcl10* et *Cxcl11* dans les DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> de rats HLA-B27.

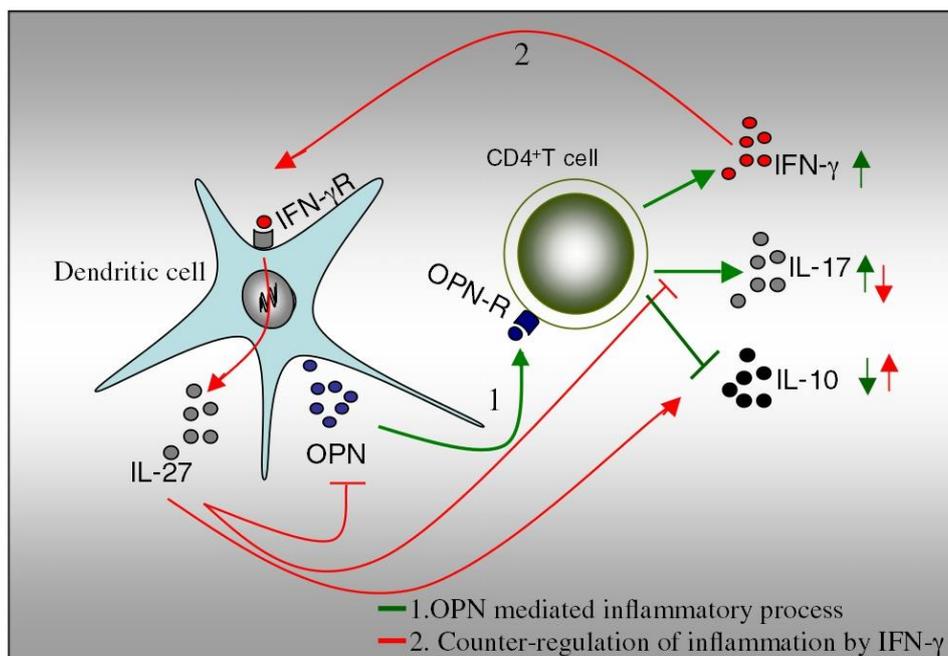
Ainsi, un défaut de la signalisation de l'IFN $\gamma$  dans les CPA conduirait à la moindre production de ces chimiokines, et pourrait être à l'origine d'un défaut du recrutement et de l'amplification des LT CD4<sup>+</sup> Th1 par ces cellules. Ceci pourrait favoriser une expansion accrue des LT CD4<sup>+</sup> Th17, dont le rôle effecteur dans la pathogénie de la SpA est aujourd'hui avéré.

En effet, il a été proposé que les cellules pro-inflammatoires Th17 soient des effecteurs clés de la SpA, car elles s'accumulent dans les organes lymphoïdes et les organes cibles de l'inflammation au cours du développement de la maladie (DeLay et al., 2009), (Glatigny et al., 2012), (van Duivenvoorde et al., 2012). De plus, des expériences récentes ont démontré que les DC de rats HLA-B27 favorisent l'expansion des cellules Th17 (Glatigny et al., 2012) (Utriainen et al., 2012) et une étude en cours dans notre laboratoire semble montrer que les DC HLA-B27 affectent la différenciation et l'activation des cellules T régulatrices de telle manière qu'elles produisent moins d'IL-10 et plus d'IL-17 (Krause et al., 2012, communication orale) L'ensemble de ces résultats fournit des arguments convaincants pour conclure que l'expression du HLA-B27 favoriserait une maladie médiée par les Th17.

Cependant, le mécanisme moléculaire par lequel les DC HLA-B27 influenceraient la différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> pour conduire à un tel biais pro-inflammatoire reste à élucider.

La régulation négative de la voie IFN, comprenant le gène de l'IFN $\gamma$  lui-même, est la signature la plus pertinente que nous ayons relevée dans les DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> pour expliquer la pathogenèse de la SpA. Ce défaut de signalisation, combiné à la diminution de la production d'IL-10 par ces cellules, pourrait contribuer à favoriser la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> en cellules Th17 pathogènes et affecter parallèlement la fonctionnalité des cellules T régulatrices (Chaudhry et al., 2011), (Huber et al., 2011).

Par ailleurs, Murugaiyan et *al.* ont montré que l'induction de la signalisation par l'IFN $\gamma$  jouait un rôle majeur dans les DC, en influençant l'orientation de la réponse T qu'elles initient par une modulation de l'axe IL-27/ostéopontine (OPN) En effet, l'OPN sécrétée par les DC au cours d'une réponse inflammatoire induit la production d'IFN $\gamma$  et d'IL-17 par les LT CD4<sup>+</sup> Cette sécrétion d'OPN s'accompagne d'un rétro-contrôle négatif par l'IFN $\gamma$  qui inhibe l'expression de l'OPN et induit la sécrétion d'IL-27 par les DC. Cette cytokine exerce alors une activité anti-inflammatoire, s'opposant à celle de l'OPN, en limitant la production d'IL-17 tout en induisant celle d'IL-10 par les LT CD4<sup>+</sup> (Murugaiyan et al., 2010) (**Figure 29**).



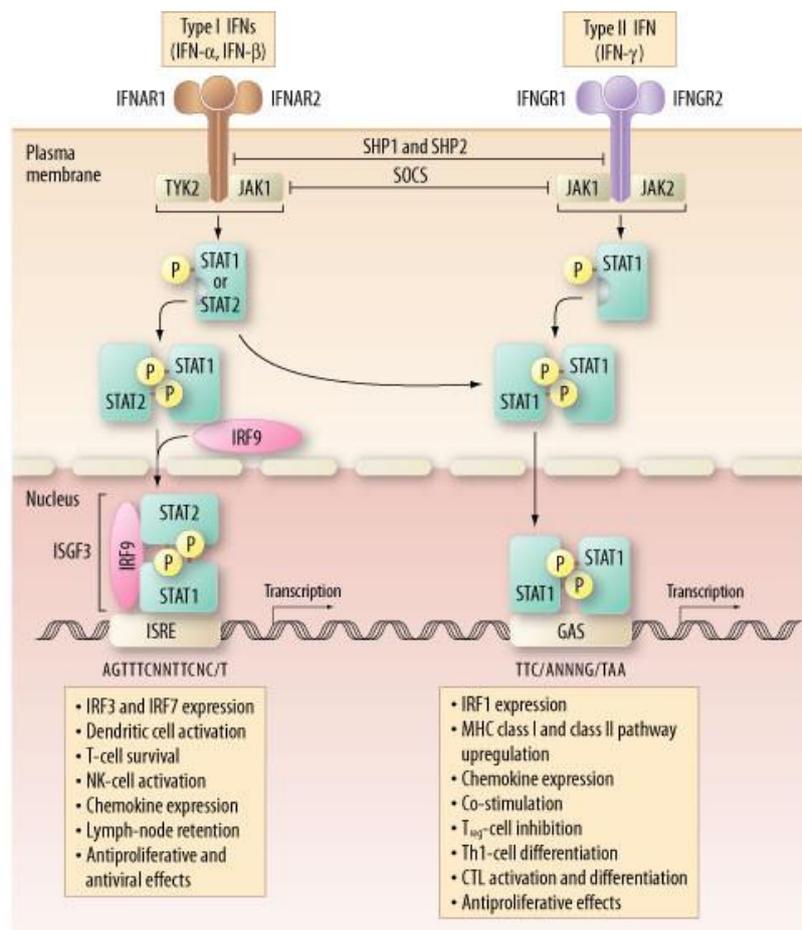
**Figure 29. Modulation de l'axe Ostéopontine/IL-27 par l'IFN $\gamma$  dans les DC.**  
 (D'après Murugaiyan et al., *PNAS*, 2010)

En l'absence de signalisation *via* l'IFN $\gamma$  dans la DC, cette boucle de rétro-contrôle négatif est compromise, ce qui favoriserait l'amplification de la réponse inflammatoire médiée par les Th17. Etayant cette hypothèse, nous avons observé une diminution significative de l'expression de l'*IL27* dans les DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> de rats HLA-B27. De plus, deux études réalisées cette fois-ci chez l'Homme ont permis de corroborer nos résultats. En effet, les patients atteints de SA présente un taux sérique plus élevé d'OPN (Choi et al., 2008) et le gène *IL27A* a récemment été décrit comme prédisposant à la SpA (Cortes, 2013).

Les IFN ont également pour rôle d'induire l'expression de centaines de gènes dans le cadre d'un programme antimicrobien élaboré, destiné à lutter contre l'infection de toutes les cellules nucléées. Ce processus, appelé immunité cellulaire autonome, repose sur les propriétés fonctionnelles des protéines effectrices induites par l'IFN. Ces protéines restreignent les bactéries, les protozoaires et les virus dans différents compartiments subcellulaires ou à différents stades de leur cycle de vie. Plusieurs de ces facteurs de défense de l'hôte récemment décrits participent également à des voies oxydatives et autophagiques pour améliorer la clairance bactérienne. Ensemble, ces réseaux d'effecteurs médiés par l'IFN confèrent à l'hôte vertébré une résistance à un monde microbien vaste et complexe (MacMicking, 2012).

Les rats transgéniques HLA-B27 développent de manière moins efficace une réponse immunitaire appropriée vis-à-vis de certains agents infectieux. Il pourrait donc s'agir d'une autre conséquence de la signature inverse de l'IFN observée dans les DC. Il a d'ailleurs été démontré chez les rats HLA-B27 une plus grande vulnérabilité vis à vis du pathogène *Listeria monocytogenes* (Warner et al., 1996). De plus, une étude de leur flore intestinale a montré un dérèglement du microbiote de ces animaux dans la lignée 33-3. Néanmoins, il reste à déterminer s'il s'agit d'une cause ou bien d'une conséquence de l'inflammation intestinale développée dans cette lignée (Onderdonk et al., 1998). Des données récentes indiquent toutefois que les rats 21-3 x 283-2, qui ne développent pas d'inflammation intestinale, ont également un microbiote différent de celui des rats NTG (Bach et al., 2012, communication orale).

Comme beaucoup de cytokines et de facteurs de croissance, la signalisation des IFN est initiée par leur interaction avec des récepteurs de surface spécifiques. Les IFN de type I se lient à un récepteur commun (l'IFNAR), différent de celui reconnu par l'IFN $\gamma$  (l'IFNGR). La première voie de signalisation activée par cette interaction cytokine/récepteur est la voie JAK-STAT (**Figure 30**). Les protéines tyrosine kinases de la famille des Janus kinase (Jak) sont activées lors de la fixation du ligand sur son récepteur et phosphorylent les domaines cytoplasmiques de ce dernier, créant ainsi des sites de liaison reconnus par les domaines SH2 de leurs substrats spécifiques que sont les facteurs de transcription de la famille des STAT (signal transducers and activators of transcription). S'ensuit alors une phosphorylation de ces protéines qui entraîne leur dimérisation puis leur translocation dans le noyau où elles exercent alors leur rôle de facteur de transcription. La fixation des IFN de type I sur leur récepteur induit la transcription spécifique de gènes par un hétérodimère STAT1/STAT2, alors que la liaison de l'IFN $\gamma$  sur son récepteur permet le recrutement et l'activation d'un homodimère de STAT1 (**Figure 30**).

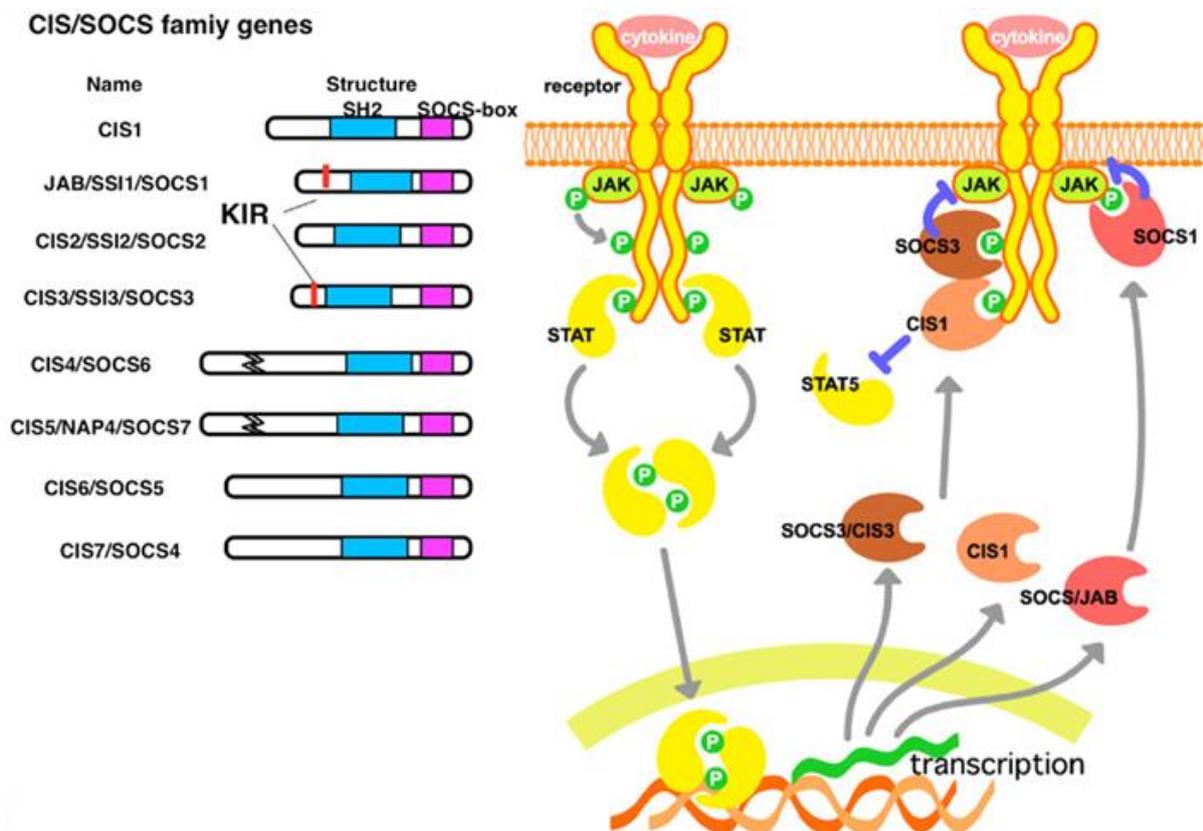


**Figure 30. Signalisation primaire de l'interféron.**

(D'après Dunn et al., *Interferons, immunity and cancer immunoediting*, *Nature rev. Immunology*, 2006)

Cette cascade de signalisation va conduire à l'expression de nombreux gènes, parmi lesquels les facteurs de transcription de la famille IRF (interferon regulatory factor) qui vont se lier à des séquences promotrices spécifiques et induire une réponse secondaire.

La voie JAK/STAT est régulée négativement par les protéines SOCS. Celles-ci se caractérisent par un domaine central SH2 et un domaine SOCS box (**Figure 31**). Les protéines contenant un domaine SOCS box fonctionnent comme des E3 ubiquitine ligases et conduisent à la dégradation, par ubiquitinylation, des protéines qui s'associent à leur région N-terminale. Le domaine SH2, quant à lui, détermine la cible de chaque protéine SOCS. Ainsi, les protéines SOCS empêchent l'activation des STATs en occupant leurs sites de liaisons sur les récepteurs de cytokines ou en se liant directement aux protéines JAK, supprimant de ce fait leur signalisation. Les protéines SOCS1 et SOCS3 sont des inhibiteurs particulièrement puissants des protéines JAK car elles possèdent une région inhibitrice de kinase (KIR) à leur extrémité N-terminale (**Figure 31**).



**Figure 31. Structure et fonction des protéines SOCS.**

(D'après Yoshimura et al., *SOCS, inflammation, and autoimmunity*, *Frontiers in immunology*, 2012)

Nous avons donc examiné les niveaux d'expression des *Socs1* et *Socs3* codant pour ces inhibiteurs essentiels de récepteurs de cytokines, régulant notamment la transduction du signal médié par les récepteurs de l'IFN. En effet, une étude a montré que dans des DC déficientes pour SOCS1, le facteur de transcription STAT1 était suractivé et les gènes régulés par l'IFN, dont celui de l'IFN $\gamma$  lui-même, étaient surexprimés. Par ailleurs, les DC dans lesquelles la protéine SOCS3 était surexprimée produisaient de faibles niveaux d'IFN $\gamma$  (Yoshimura et al., 2007). Dans notre étude, si aucune différence d'expression significative de *Socs1* n'a été détectée, nous avons néanmoins observé une surexpression significative de *Socs3* dans les DC de rats HLA-B27. Ce résultat constitue une explication plausible de la signature inverse de l'IFN que nous avons rapportée.

De manière intéressante, l'expression de *Socs3* a été trouvée augmentée dans une étude transcriptomique réalisée sur des PBMCs de patients atteints de SpA (Gu et al., 2009). De plus, les SOCS sont impliquées dans la régulation négative d'autres protéines présentant des tyrosines phosphorylées, telle que la protéine adaptatrice MAL/TIRAP (Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptator protein) impliquée dans les voies de signalisation des TLR2 et TLR4 (Kobayashi et al., 2006). A cet égard, rappelons que Qian et al. ont décrit une surexpression de ces deux récepteurs dans les CPA HLA-B27 de la rate qui pourrait être à l'origine du déclenchement d'un rétro-contrôle négatif par les SOCS (Qian et al., 2008). Notre analyse du transcriptome a d'ailleurs montré dans les DC de rats HLA-B27 une diminution modérée mais toutefois significative de l'expression de plusieurs autres gènes associés à la signalisation des TLRs et des cytokines (*Irak2*, *Map4k4*, *Traf3*). Ces protéines SOCS sont donc des régulateurs physiologiques clés de l'homéostasie immunitaire de par leur implication dans de nombreux processus immunologiques. Des études récentes ont par ailleurs montré que SOCS1 et SOCS3 sont d'importants régulateurs de la différenciation et de l'activation des LT auxiliaires. Il a notamment été suggéré que l'expression de SOCS3 favoriserait celle de l'IL-17 par les LT CD4<sup>+</sup> (Kleinsteinuber et al., 2012).

Parallèlement, la surexpression de gènes codant pour des protéines chaperonnes impliquées dans la réponse au stress du RE, tels que *Calr*, *Pdia3*, *Pdia4* et *Pdia6*, a également été observée dans les DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> HLA-B27 de la lignée 33-3. Nous avons évoqué en introduction le rôle de la calréticuline dans le repliement et l'apprêtement des molécules de CMH de classe I, mais celle-ci participe également à la prise en charge des protéines mal repliées aux côtés des protéines disulfides isomérasés (PDI) que sont PDIA3, PDIA4 et PDIA6.

La surexpression de ces protéines chaperonnes corrobore les résultats d'une précédente étude protéomique réalisée sur les DC CD103<sup>+</sup> spléniques de la même lignée de rats. Celle-ci a en effet permis de montrer l'expression accrue de protéines impliquées dans le chargement du peptide au CMH de classe I et de protéines chaperonnes du RE, notamment la calréticuline et PDIA3 (Dhaenens et al., 2009). Ces résultats sont cohérents avec l'apparition d'une UPR, initialement décrite dans les macrophages dérivés de la moelle osseuse de rats HLA-B27 de la lignée 33-3 (Turner et al., 2005). Le mauvais repliement du HLA-B27 et le déclenchement de l'UPR qui s'en suit ont été proposés comme éléments déclencheurs à l'origine de la pathogénicité du HLA-B27 chez le rat, en favorisant la transcription de l'IFN- $\beta$  et/ou de l'IL-23 (Smith et al., 2008b) (DeLay et al., 2009). Un tel mécanisme ne semble pas expliquer cependant le dysfonctionnement des DC étudiées ici, puisqu'aucune augmentation de ces cytokines n'a été détectée lors de notre étude transcriptomique. De plus, les gènes de la réponse au stress du RE ne sont pas ou peu exprimés dans les DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> des rats arthritiques 21-3 x 283-2, conformément aux expériences antérieures qui montraient une UPR atténuée dans cette lignée. Ceci serait la conséquence probable de l'expression plus élevée de la  $\beta_2m$  dans ces cellules, qui réduirait alors le mauvais repliement de la molécule HLA-B27 (Tran et al., 2006).

Enfin, qu'il y ait un lien de causalité entre l'expression du HLA-B27 dans les DC et l'induction de *Socs3* reste à établir. Une étude récente, réalisée dans des macrophages murins, a mis en évidence que les molécules de CMH de classe I pouvaient, elles aussi, participer à la régulation négative des réactions inflammatoires médiées par les TLRs. L'activation des TLRs conduirait à la phosphorylation du domaine intracellulaire des molécules de CMH I exprimées à la membrane. Ceci permettrait alors le recrutement de la phosphatase SHP-2 qui inhiberait la signalisation des TLRs en empêchant l'activation de la molécule de signalisation TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6, E3 ubiquitin protein ligase) (Xu et al., 2012). Ainsi, les propriétés biochimiques particulières de la molécule HLA-B27 pourraient influencer ce processus et les événements en aval, et conduire à une induction accrue de SOCS3.

## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

## CONCLUSIONS

Par leur fréquence et les complications qui en résultent, les maladies rhumatismales chroniques, telles que la SpA, pèsent lourdement sur le coût de la santé publique. Notre travail focalisé sur le modèle du rat transgénique pour le HLA-B27 a permis au travers d'une étude transcriptomique de démontrer l'existence de gènes différentiellement exprimés chez ces animaux, en comparaison à des rats témoins.

La régulation négative de la voie de l'IFN chez le rat HLA-B27 est le résultat majeur de cette étude du profil d'expression génique des DC spléniques CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>. Ce défaut de signalisation semble accompagner l'apparition de la maladie et participer à sa mise en place, puisqu'il a pu être détecté dès le développement des premiers symptômes chez les rats HLA-B27. De plus, la pertinence de cette signature inverse a été renforcée en étant d'une part confirmée dans les DC spléniques CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> d'un second modèle de rat transgénique pour le HLA-B27, la lignée (21-3h x 283-2)F1, et en étant d'autre part commune aux macrophages de patients atteints de SpA.

Etant donné le rôle crucial de la voie de signalisation de l'IFN dans le contrôle des réponses inflammatoires par les CPA, nous avons fait l'hypothèse que cette déficience dans les DC peut avoir des conséquences et des implications fondamentales pour la pathogénie de la SpA. En effet, ce défaut de signalisation semble affecter plusieurs mécanismes de régulation impliqués dans la réponse immunitaire, majoritairement dépendants d'une médiation par l'IFN $\gamma$  :

Il pourrait contribuer à favoriser la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> en cellules Th17 pathogènes et affecter la fonctionnalité des cellules T régulatrices. En effet, ces dernières nécessitent une signalisation médiée par l'IL-10 pour réprimer la réponse Th17, or nous avons mis en évidence un défaut de son expression. Ce défaut de signalisation de l'IFN $\gamma$  conduirait également à la diminution de l'expression d'IL-27 par les DC, favorisant à nouveau l'amplification de la réponse inflammatoire médiée par les lymphocytes Th17. Enfin, cette signature inverse de l'IFN pourrait être à l'origine d'une altération de la capacité à lutter contre certains agents infectieux, observée chez les rats HLA-B27.

La surexpression de la protéine SOCS3 pourrait être à l'origine de la régulation négative de la voie de l'IFN, de par sa propriété inhibitrice de certains TLR et récepteurs de cytokines.

Ainsi, nos résultats semblent indiquer que l'expression du HLA-B27 dans les DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> conduirait à un défaut de signalisation de l'IFN, secondaire à l'induction de SOCS3 dans ces cellules, qui favoriserait le développement d'une réponse Th17 pathogène.

Cette hypothèse ouvre des perspectives quant au développement de nouvelles approches thérapeutiques pour la SpA. Néanmoins, notre étude reste à ce stade essentiellement descriptive et bien que les résultats obtenus soient très encourageants, l'interprétation que nous en faisons reste pour l'heure encore suggestive. Ils peuvent refléter les effets synergiques de différents signaux au niveau de la transcription des gènes. La complexité du système IFN ne laisse aucun doute quant à l'importance des efforts qui seront nécessaires pour définir précisément la structure hiérarchique du réseau de signalisation médié par ce dernier.

Le but ultime de ces investigations est l'amélioration de la connaissance de la physiopathologie de la SpA et nous avons l'espoir que celles-ci puissent à terme permettre d'améliorer la prise en charge et la thérapeutique des patients.

## PERSPECTIVES

Le travail que nous avons réalisé nous a permis d'améliorer notre compréhension du rôle de la sous population de DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> dans la SpAr, d'appréhender les différentes voies de signalisation impliquées dans cette pathologie et d'apporter de nouvelles pistes de recherche sur les mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'étiologie de la SpA. Toutefois, il est primordial, à présent, de décortiquer les mécanismes susceptibles d'intervenir dans la mise en place de cette signature inverse de l'IFN chez les DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>. Il s'agira donc de définir dans quel ordre ces mécanismes interviennent ainsi que leur rôle physiopathologique dans le déclenchement de la maladie.

Ainsi, nous devons déterminer si l'augmentation de l'expression de Socs3 et le défaut de signalisation de l'IFN, constituent l'une des causes ou bien une conséquence de la réponse inflammatoire développée par les rats HLA-B27. Pour y répondre, nous pourrions observer le transcriptome des DC CD103<sup>+</sup> DC4<sup>+</sup> de rats HLA-B27 rnu/rnu. Ces rats athymiques sont dans l'impossibilité de mettre en place une réponse inflammatoire médiée par les LT, mais leurs DC présentent les mêmes défauts fonctionnels liés à l'expression du HLA-B27. Si nous retrouvons une signature inverse de l'IFN dans ces cellules, cela démontrera qu'elle est antérieure au développement de la maladie et probablement la conséquence de l'expression du HLA-B27 dans ces cellules. Il serait également intéressant de savoir si l'apparition de ce défaut de signalisation est dépendant d'une forte expression du HLA-B27 en étudiant le transcriptome des DC de rats HLA-B27 de la lignée 21-3h, présentant une faible expression de HLA-B27 et ne développant pas la maladie.

Nous souhaitons identifier plus finement les événements qui conduiraient à l'établissement de cette signature inverse de l'IFN dans les DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>. Nous envisageons pour cela de suivre l'évolution de l'expression des gènes dérégulés dans les DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>, lors de l'activation *in vitro* de ces cellules, sous l'effet de différents agents stimulants : IFN $\gamma$ , LPS ou autres activateurs sélectifs de différents TLRs. Ce travail permettra de déterminer si la voie de signalisation de l'IFN peut être restaurée et si tel est le cas, sous quelles conditions de stimulation. Nous étudierons en parallèle les conséquences d'une modulation de la voie de l'IFN dans ces DC HLA-B27, en suivant l'expression des gènes supposés en dépendre, notamment l'IL-27 et l'IL-10. Il sera primordial de confirmer l'ensemble des différentiels

d'expression génique observés au niveau de l'expression protéique elle-même, pour s'assurer que l'étude du transcriptome reflète bien une variation quantitative de la production de la protéine fonctionnelle correspondant à chaque transcrite. Les protéines sécrétées, telles que les cytokines, pourront être dosées par ELISA dans le milieu de culture et les protéines intracellulaires, étudiées en western blot.

Il serait également intéressant d'étudier les conséquences fonctionnelles d'une modulation de la voie de l'IFN sur la capacité des DC à activer les LT naïfs et d'analyser la nature de la réponse immune ainsi obtenue par des expériences de co-culture et des tests de prolifération.

L'identification des récepteurs et donc des voies de signalisation régulées négativement par SOCS3 ainsi que des mécanismes régulant son expression dans les DC HLA-B27, apparaît comme une perspective majeure pour déterminer l'implication de SOCS3 dans le dysfonctionnement des DC HLA-B27 et ses origines. Une approche de perte de fonction pourrait être envisagée, par ARN interférence, afin de voir si son inhibition suffirait à restaurer la voie de signalisation de l'IFN, ainsi que l'expression d'IL-27 et d'IL-10.

Par ailleurs, lors de cette étude nous avons validé un protocole d'isolement des sous-populations de DC spléniques CD103<sup>+</sup> qui nous permet aujourd'hui d'envisager l'étude de la sous-population CD103<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup>. En effet, bien que des études aient montré l'implication préférentielle des DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> dans la stimulation des LT CD4<sup>+</sup>, il n'est pas exclu que les DC CD103<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> jouent un rôle majeur dans la pathogénie de la SpAr. Leur rôle potentiel dans l'induction de la tolérance périphérique au soi, associée à leur apoptose accrue chez les rats HLA-B27, en font des candidates de choix pour la suite de nos études. L'une d'elles consisterait à examiner leur profil d'expression par une étude transcriptomique.

L'ensemble des résultats obtenus dans le modèle du rat transgénique pour le HLA-B27 et la  $\beta_2m\mu$  soulève plusieurs hypothèses sur les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de la SpAr et sur le rôle des DC. L'étude de ces cellules chez les patients atteints de SpA est primordiale afin de déterminer si ces mécanismes moléculaires sont également impliqués dans la pathogénie de la SpA humaine. Les DC générées *in vitro* à partir de monocytes du sang périphérique de patients atteints de SpA font d'ailleurs actuellement l'objet d'une étude transcriptomique dans notre laboratoire.

La SpA est une pathologie multifactorielle dans laquelle la flore bactérienne constitue un facteur environnemental majeur. Il semble donc essentiel d'explorer l'influence du microbiote

dans le déclenchement de la maladie. Dans le but d'identifier les espèces bactériennes pouvant être à l'origine d'un déséquilibre de la flore intestinale, une analyse qualitative et quantitative du microbiote intestinal est actuellement menée au laboratoire chez les rats transgéniques HLA-B27 ainsi que chez des patients atteints de SpA.

Malgré les progrès spectaculaires réalisés ces dernières années, il est certain que les mécanismes d'action de l'IFN ne sont que partiellement connus, et que de nouvelles voies de signalisation empruntées par cette cytokine restent à identifier. Les connaissances actuelles ne permettent pas d'expliquer les mécanismes d'induction de tous les gènes dont l'expression est contrôlée par l'IFN et, en particulier, ceux dont l'induction nécessite la coopération avec d'autres voies de signalisation médiées par d'autres cytokines ou des TLRs. Une telle diversité de signalisation est conforme aux effets biologiques pléiotropes des IFN sur les cellules et les tissus cibles. Comprendre les mécanismes moléculaires qui régissent les actions synergiques et/ou antagonistes des IFN vis-à-vis des autres cytokines et facteurs de croissance, ainsi que les interconnexions entre les voies de signalisation qu'ils empruntent, est certainement l'un des enjeux majeurs des recherches fondamentales en immunologie.

# **BIBLIOGRAPHIE**

- Ahmadi, K., Wilson, C., Tiwana, H., Binder, A., and Ebringer, A. (1998). Antibodies to *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide in patients with ankylosing spondylitis. *Br. J. Rheumatol.* *37*, 1330–1333.
- Bach, M.H., Van Gelder, R.N., Taurog, J.D., and Rosenbaum, J.T. (2012). The presence of HLA-B27 shapes gut microbiome composition in rats. *Arthritis and Rheumatism* *64*, S1052–S1053.
- Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* *392*, 245–252.
- Benjamin, R., and Parham, P. (1990). Guilt by association: HLA-B27 and ankylosing spondylitis. *Immunol. Today* *11*, 137–142.
- Bollow, M., Fischer, T., Reißhauer, H., Backhaus, M., Sieper, J., Hamm, B., and Braun, J. (2000). Quantitative analyses of sacroiliac biopsies in spondyloarthropathies: T cells and macrophages predominate in early and active sacroiliitis—cellularity correlates with the degree of enhancement detected by magnetic resonance imaging. *Ann Rheum Dis* *59*, 135–140.
- Bonilla, N., Breban, M., and Chiochia, G. (2009). Heightened HLA molecules upregulation and decreased CD4<sup>+</sup> T cells stimulation in monocytes-derived dendritic cells (DCs) from ankylosing spondylitis (AS) patients. *Arthritis & Rheumatism* *60*, S535–S536.
- Breban, M., Hammer, R.E., Richardson, J.A., and Taurog, J.D. (1993). Transfer of the inflammatory disease of HLA-B27 transgenic rats by bone marrow engraftment. *The Journal of Experimental Medicine* *178*, 1607–1616.
- Breban, M., Fernandez-Sueiro, J.L., Richardson, J.A., Hadavand, R.R., Maika, S.D., Hammer, R.E., and Taurog, J.D. (1996). T cells, but not thymic exposure to HLA-B27, are required for the inflammatory disease of HLA-B27 transgenic rats. *The Journal of Immunology* *156*, 794–803.
- Breban, M., Miceli-Richard, C., Zinovieva, E., Monnet, D., and Said-Nahal, R. (2006). The genetics of spondyloarthropathies. *Joint Bone Spine* *73*, 355–362.
- Breban, M., Leboime, A., Fert, I., and Furet, J.-P. (2011). Microbiote intestinale et spondylarthrites: quelles perspectives? *Revue Du Rhumatisme* *78*, *Supplement 5*, A35–A36.
- Brenan, M., and Pukavec, M. (1992). The MRC OX-62 antigen: a useful marker in the purification of rat veiled cells with the biochemical properties of an integrin. *The Journal of Experimental Medicine* *175*, 1457–1465.
- Brown, M.A., Pile, K.D., Kennedy, L.G., Calin, A., Darke, C., Bell, J., Wordsworth, B.P., and Cornelis, F. (1996). HLA class I associations of ankylosing spondylitis in the white population in the United Kingdom. *Annals of the Rheumatic Diseases* *55*, 268–270.
- Brown, M.A., Kennedy, L.G., MacGregor, A.J., Darke, C., Duncan, E., Shatford, J.L., Taylor, A., Calin, A., and Wordsworth, P. (1997). Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins: the role of genes, HLA, and the environment. *Arthritis Rheum.* *40*, 1823–1828.
- 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., et al. (2007). Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat. Genet.* *39*, 1329–1337.
- Bustin, S.A., Beaulieu, J.-F., Huggett, J., Jaggi, R., Kibenge, F.S.B., Olsvik, P.A., Penning, L.C., and Toegel, S. (2010). MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Mol. Biol.* *11*, 74.

- Caffrey, M.F., and James, D.C. (1973). Human lymphocyte antigen association in ankylosing spondylitis. *Nature* 242, 121.
- Cauli, A., Dessole, G., Fiorillo, M.T., Vacca, A., Mameli, A., Bitti, P., Passiu, G., Sorrentino, R., and Mathieu, A. (2002). Increased level of HLA-B27 expression in ankylosing spondylitis patients compared with healthy HLA-B27-positive subjects: a possible further susceptibility factor for the development of disease. *Rheumatology (Oxford)* 41, 1375–1379.
- Chaudhry, A., Samstein, R.M., Treuting, P., Liang, Y., Pils, M.C., Heinrich, J.-M., Jack, R.S., Wunderlich, F.T., Brüning, J.C., Müller, W., et al. (2011). Interleukin-10 Signaling in Regulatory T Cells Is Required for Suppression of Th17 Cell-Mediated Inflammation. *Immunity* 34, 566–578.
- Choi, S.T., Kim, J.H., Kang, E.-J., Lee, S.-W., Park, M.-C., Park, Y.-B., and Lee, S.-K. (2008). Osteopontin might be involved in bone remodelling rather than in inflammation in ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)* 47, 1775–1779.
- Colbert, R.A., DeLay, M.L., Klenk, E.I., and Layh-Schmitt, G. (2010). From HLA-B27 to spondyloarthritis: a journey through the ER. *Immunological Reviews* 233, 181–202.
- Cortes, A. (2013). (IGAS) IGoASC. Multiple novel loci harboring common and rare variants implicated in ankylosing spondylitis. *Nature Genetics in press*.
- Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S.-Y., Senechal, B., Puel, A., Biswas, S.K., Moshous, D., Picard, C., et al. (2010). Human CD14<sup>dim</sup> monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33, 375–386.
- DeLay, M.L., Turner, M.J., Klenk, E.I., Smith, J.A., Sowders, D.P., and Colbert, R.A. (2009). HLA-B27 misfolding and the unfolded protein response augment interleukin-23 production and are associated with Th17 activation in transgenic rats. *Arthritis & Rheumatism* 60, 2633–2643.
- Dhaenens, M., Fert, I., Glatigny, S., Haerincx, S., Poulain, C., Donnadieu, E., Hacquard-Bouder, C., André, C., Elewaut, D., Deforce, D., et al. (2009). Dendritic cells from spondylarthritis-prone HLA-B27-transgenic rats display altered cytoskeletal dynamics, class II major histocompatibility complex expression, and viability. *Arthritis Rheum* 60, 2622–2632.
- Van Duivenvoorde, L.M., Dorris, M.L., Satumtira, N., van Tok, M.N., Redlich, K., Tak, P.P., Taurog, J.D., and Baeten, D.L. (2012). Relationship between inflammation, bone destruction, and osteoproliferation in the HLA-B27/human  $\beta$  2 -microglobulin-transgenic rat model of spondylarthritis. *Arthritis & Rheumatism* 64, 3210–3219.
- Fert, I., Glatigny, S., Poulain, C., Satumtira, N., Dorris, M.L., Taurog, J.D., and Breban, M. (2008). Correlation between dendritic cell functional defect and spondylarthritis phenotypes in HLA-B27/HUMAN  $\beta$ 2-microglobulin-transgenic rat lines. *Arthritis Rheum* 58, 3425–3429.
- Glatigny, S., Fert, I., Blaton, M.A., Lories, R.J., Araujo, L.M., Chiocchia, G., and Breban, M. (2012). Proinflammatory Th17 cells are expanded and induced by dendritic cells in spondylarthritis-prone HLA-B27-transgenic rats. *Arthritis & Rheumatism* 64, 110–120.
- Groom, J.R., and Luster, A.D. (2011). CXCR3 in T cell function. *Experimental Cell Research* 317, 620–631.
- Gu, J., Wei, Y.-L., Wei, J.C.C., Huang, F., Jan, M.-S., Centola, M., Frank, M.B., and Yu, D. (2009). Identification of RGS1 as a candidate biomarker for undifferentiated spondylarthritis by genome-wide expression profiling and real-time polymerase chain reaction. *Arthritis & Rheumatism* 60, 3269–3279.

- Hacquard-Bouder, C., Falgarone, G., Bosquet, A., Smaoui, F., Monnet, D., Ittah, M., and Breban, M. (2004). Defective costimulatory function is a striking feature of antigen-presenting cells in an HLA-B27-transgenic rat model of spondylarthropathy. *Arthritis Rheum* *50*, 1624–1635.
- Hacquard-Bouder, C., Chimenti, M.-S., Giquel, B., Donnadieu, E., Fert, I., Schmitt, A., André, C., and Breban, M. (2007). Alteration of antigen-independent immunologic synapse formation between dendritic cells from HLA-B27-transgenic rats and CD4<sup>+</sup> T cells: selective impairment of costimulatory molecule engagement by mature HLA-B27. *Arthritis Rheum* *56*, 1478–1489.
- Hammer, R.E., Maika, S.D., Richardson, J.A., Tang, J.P., and Taurog, J.D. (1990). Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell* *63*, 1099–1112.
- Hart, D.N., and Fabre, J.W. (1981). Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. *The Journal of Experimental Medicine* *154*, 347–361.
- Hoentjen, F., Tonkonogy, S.L., Liu, B., Sartor, R.B., Taurog, J.D., and Dieleman, L.A. (2006). Adoptive transfer of nontransgenic mesenteric lymph node cells induces colitis in athymic HLA-B27 transgenic nude rats. *Clinical and Experimental Immunology* *143*, 474–483.
- Huang, F.P., Platt, N., Wykes, M., Major, J.R., Powell, T.J., Jenkins, C.D., and MacPherson, G.G. (2000). A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J. Exp. Med.* *191*, 435–444.
- Huber, S., Gagliani, N., Esplugues, E., O'Connor, W., Huber, F.J., Chaudhry, A., Kamana, a., Kobayashi, Y., Booth, C.J., Rudensky, A.Y., et al. (2011). Th17 Cells Express Interleukin-10 Receptor and Are Controlled by Foxp3<sup>-</sup> and Foxp3<sup>+</sup> Regulatory CD4<sup>+</sup> T Cells in an Interleukin-10-Dependent Manner. *Immunity* *34*, 554–565.
- Jacques, P., and Elewaut, D. (2008). Joint expedition: linking gut inflammation to arthritis. *Mucosal Immunol* *1*, 364–371.
- Josien, R., Heslan, M., Soulillou, J.-P., and Cuturi, M.-C. (1997). Rat spleen dendritic cells express natural killer cell receptor protein 1 (NKR-P1) and have cytotoxic activity to select targets via a Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanism. *The Journal of Experimental Medicine* *186*, 467–472.
- Kleinsteinuber, K., Heesch, K., Schattling, S., Sander-Juelch, C., Mock, U., Riecken, K., Fehse, B., Fleischer, B., and Jacobsen, M. (2012). SOCS3 promotes interleukin-17 expression of human T cells. *Blood* *120*, 4374–4382.
- Kobayashi, T., Takaesu, G., and Yoshimura, A. (2006). Mal-function of TLRs by SOCS. *Nat. Immunol.* *7*, 123–124.
- Krause, L., Fert, I., Labroquère, K., Andrieu, M., Chioecchia, G., and Breban, M. (2012). Regulatory T cells in spondyloarthritis (SpA) animal model and modulatory role of inducible costimulator (ICOS). *Arthritis & Rheumatism* *64*, S260–S261.
- Liu, L., Zhang, M., Jenkins, C., and MacPherson, G.G. (1998). Dendritic cell heterogeneity in vivo: two functionally different dendritic cell populations in rat intestinal lymph can be distinguished by CD4 expression. *The Journal of Immunology* *161*, 1146–1155.
- MacMicking, J.D. (2012). Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nature Reviews Immunology* *12*, 367–382.

- May, E., Dorris, M.L., Satumtira, N., Iqbal, I., Rehman, M.I., Lightfoot, E., and Taurog, J.D. (2003). CD8 alpha beta T cells are not essential to the pathogenesis of arthritis or colitis in HLA-B27 transgenic rats. *J. Immunol.* *170*, 1099–1105.
- Moseley, T.A., Haudenschild, D.R., Rose, L., and Reddi, A.H. (2003). Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* *14*, 155–174.
- Murugaiyan, G., Mittal, A., and Weiner, H.L. (2010). Identification of an IL-27/osteopontin axis in dendritic cells and its modulation by IFN- limits IL-17-mediated autoimmune inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *107*, 11495–11500.
- Onderdonk, A.B., Richardson, J.A., Hammer, R.E., and Taurog, J.D. (1998). Correlation of cecal microflora of HLA-B27 transgenic rats with inflammatory bowel disease. *Infection and Immunity* *66*, 6022–6023.
- Pohjanvirta, R., Niittynen, M., Lindén, J., Boutros, P.C., Moffat, I.D., and Okey, A.B. (2006). Evaluation of various housekeeping genes for their applicability for normalization of mRNA expression in dioxin-treated rats. *Chem. Biol. Interact.* *160*, 134–149.
- Qian, B.-F., Tonkonogy, S.L., Hoentjen, F., Dieleman, L.A., and Sartor, R.B. (2005). Dysregulated luminal bacterial antigen-specific T-cell responses and antigen-presenting cell function in HLA-B27 transgenic rats with chronic colitis. *Immunology* *116*, 112–121.
- Qian, B.-F., Tonkonogy, S.L., and 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.
- Qian, B.-F., Tonkonogy, S.L., and Sartor, R.B. (2008). Aberrant innate immune responses in TLR-ligand activated HLA-B27 transgenic rat cells. *Inflamm. Bowel Dis.* *14*, 1358–1365.
- Rath, H.C., Herfarth, H.H., Ikeda, J.S., Grenther, W.B., Hamm Jr, T.E., Balish, E., Taurog, J.D., Hammer, R.E., Wilson, K.H., and Sartor, R.B. (1996). Normal luminal bacteria, especially *Bacteroides* species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats. *Journal of Clinical Investigation* *98*, 945.
- Reveille, J.D., and Maganti, R.M. (2009). Subtypes of HLA-B27: history and implications in the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Adv. Exp. Med. Biol.* *649*, 159–176.
- Reveille, J.D., Sims, A.-M., Danoy, P., Evans, D.M., Leo, P., Pointon, J.J., Jin, R., Zhou, X., Bradbury, L.A., Appleton, L.H., et al. (2010). Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci. *Nat. Genet.* *42*, 123–127.
- Saraux, A., Allain, J., Guedes, C., Devauchelle, V., and Le Goff, P. (2000). Epidémiologie des spondylarthropathies. *La Lettre Du Rhumatologue* 6–8.
- Saraux, A., Guillemin, F., Guggenbuhl, P., Roux, C.H., Fardellone, P., Le Bihan, E., Cantagrel, A., Chary-Valkenaere, I., Euller-Ziegler, L., Flipo, R.-M., et al. (2005). Prevalence of spondyloarthropathies in France: 2001. *Ann. Rheum. Dis.* *64*, 1431–1435.
- Sieper, J., Rudwaleit, M., Khan, M.A., and Braun, J. (2006). Concepts and epidemiology of spondyloarthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* *20*, 401–417.
- Smith, J.A., Barnes, M.D., Hong, D., DeLay, M.L., Inman, R.D., and Colbert, R.A. (2008a). Gene expression analysis of macrophages derived from ankylosing spondylitis patients reveals interferon- $\gamma$  dysregulation. *Arthritis & Rheumatism* *58*, 1640–1649.

- Smith, J.A., Turner, M.J., DeLay, M.L., Klenk, E.I., Sowders, D.P., and Colbert, R.A. (2008b). Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response are linked to synergistic IFN- $\beta$  induction via X-box binding protein 1. *European Journal of Immunology* *38*, 1194–1203.
- Syrbe, U., Scheer, R., Wu, P., and Sieper, J. (2012). Differential synovial Th1 cell reactivity towards *Escherichia coli* antigens in patients with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *71*, 1573–1576.
- Talmor, M., Mirza, A., Turley, S., Mellman, I., Hoffman, L.A., and Steinman, R.M. (1998). Generation of large numbers of immature and mature dendritic cells from rat bone marrow cultures. *Eur. J. Immunol.* *28*, 811–817.
- Taurog, J.D., Maika, S.D., Simmons, W.A., Breban, M., and Hammer, R.E. (1993). Susceptibility to inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rat lines correlates with the level of B27 expression. *The Journal of Immunology* *150*, 4168–4178.
- Taurog, J.D., Richardson, J.A., Croft, J.T., Simmons, W.A., Zhou, M., Fernández-Sueiro, J.L., Balish, E., and Hammer, R.E. (1994). The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *The Journal of Experimental Medicine* *180*, 2359–2364.
- Taurog, J.D., Maika, S.D., Satumtira, N., Dorris, M.L., McLean, I.L., Yanagisawa, H., Sayad, A., Stagg, A.J., Fox, G., Lê O'Brien, A., et al (1999) Inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *Immunol. Rev.* *169*, 209–223.
- Taurog, J.D., Dorris, M.L., Satumtira, N., Tran, T.M., Sharma, R., Dressel, R., van den Brandt, J., and Reichardt, H.M. (2009). Spondylarthritis in HLA-B27/human  $\beta$ <sub>2</sub>-microglobulin-transgenic rats is not prevented by lack of CD8. *Arthritis & Rheumatism* *60*, 1977–1984.
- Thomssen, H., Hoffmann, B., Schank, M., Elewaut, D., Meyer zum Büschenfelde, K.H., and Märker-Hermann, E. (2000). There is no disease-specific role for streptococci-responsive synovial T lymphocytes in the pathogenesis of psoriatic arthritis. *Med. Microbiol. Immunol.* *188*, 203–207.
- Tran, T.M., Dorris, M.L., Satumtira, N., Richardson, J.A., Hammer, R.E., Shang, J., and Taurog, J.D. (2006). Additional human  $\beta$ 2-microglobulin curbs HLA-B27 misfolding and promotes arthritis and spondylitis without colitis in male HLA-B27-transgenic rats. *Arthritis & Rheumatism* *54*, 1317–1327.
- Trinité, B., Voisine, C., Yagita, H., and Josien, R. (2000). A subset of cytolytic dendritic cells in rat. *The Journal of Immunology* *165*, 4202–4208.
- Trinité, B., Chauvin, C., Pêche, H., Voisine, C., Heslan, M., and Josien, R. (2005). Immature CD4–CD103+ rat dendritic cells induce rapid caspase-independent apoptosis-like cell death in various tumor and nontumor cells and phagocytose their victims. *The Journal of Immunology* *175*, 2408–2417.
- Turner, M.J., Sowders, D.P., DeLay, M.L., Mohapatra, R., Bai, S., Smith, J.A., Brandewie, J.R., Taurog, J.D., and Colbert, R.A. (2005). HLA-B27 misfolding in transgenic rats is associated with activation of the unfolded protein response. *J. Immunol.* *175*, 2438–2448.
- Utraiainen, L., Firmin, D., Wright, P., Cerovic, V., Breban, M., McInnes, I., and Milling, S. (2012). Expression of HLA-B27 causes loss of migratory dendritic cells in a rat model of spondylarthritis. *Arthritis & Rheumatism* *64*, 3199–3209.
- Voisine, C., Hubert, F.-X., Trinité, B., Heslan, M., and Josien, R. (2002). Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *The Journal of Immunology* *169*, 2284–2291.

Warner, T.F., Madsen, J., Starling, J., Wagner, R.D., Taurog, J.D., and Balish, E. (1996). Human HLA-B27 gene enhances susceptibility of rats to oral infection by *Listeria monocytogenes*. *The American Journal of Pathology* *149*, 1737.

Xu, S., Liu, X., Bao, Y., Zhu, X., Han, C., Zhang, P., Zhang, X., Li, W., and Cao, X. (2012). Constitutive MHC class I molecules negatively regulate TLR-triggered inflammatory responses via the Fps-SHP-2 pathway. *Nature Immunology* *13*, 551–559.

Yoshimura, A., Naka, T., and Kubo, M. (2007). SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nature Reviews Immunology* *7*, 454–465.

Zambrano-Zaragoza, F., García-Latorre, E., Domínguez-López, M.L., Cancino-Díaz, M.E., Burgos-Vargas, R., and Jiménez-Zamudio, L. (2005). CD4 and CD8 T cell response to the rHSP60 from *Klebsiella pneumoniae* in peripheral blood mononuclear cells from patients with ankylosing spondylitis. *Rev. Invest. Clin.* *57*, 555–562.

## **ANNEXES**

## **Annexe 1 : Préparation des milieux et solutions**

- **RPMI complet**

On ajoute à 430 ml de milieu RPMI (Life Technologies Gibco® RPMI 1640 + L-glutamine) :

- 50 ml de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté 30 mn à 56°C, soit 10%
- 10 ml d'une solution de sodium pyruvate à 100 mM (Life Technologies Gibco®), soit une concentration finale de 2 mM.
- 5 ml d'une solution d'antibiotiques Pénicilline et Streptomycine à diluer 100x (Life Technologies Gibco®).
- 5 ml d'une solution tampon d'HEPES à 1 M (Life Technologies Gibco®), soit une concentration finale de 10 mM.
- 0.5 ml d'une solution de  $\beta$ -Mercaptoéthanol à 55 mM (Life Technologies Gibco®), soit une concentration finale de 55  $\mu$ M.

- **Collagénase D**

500 mg de collagénase D (Roche) sont dissouts dans 250 ml de RPMI complet pour atteindre une concentration de 2 mg/ml. Cette solution est filtrée puis aliquotée en fractions de 2 ml qui seront congelées à -20°C jusqu'à utilisation

- **PBS-EDTA**

On ajoute à 500 ml de PBS (Phosphate-Buffered Saline, Life Technologies Gibco®) :

- 0.5 ml d'une solution d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA, Life Technologies Gibco®) à 0.5 M (Life Technologies Gibco®), soit une concentration finale de 0.5 mM.

- **PBS-EDTA-BSA**

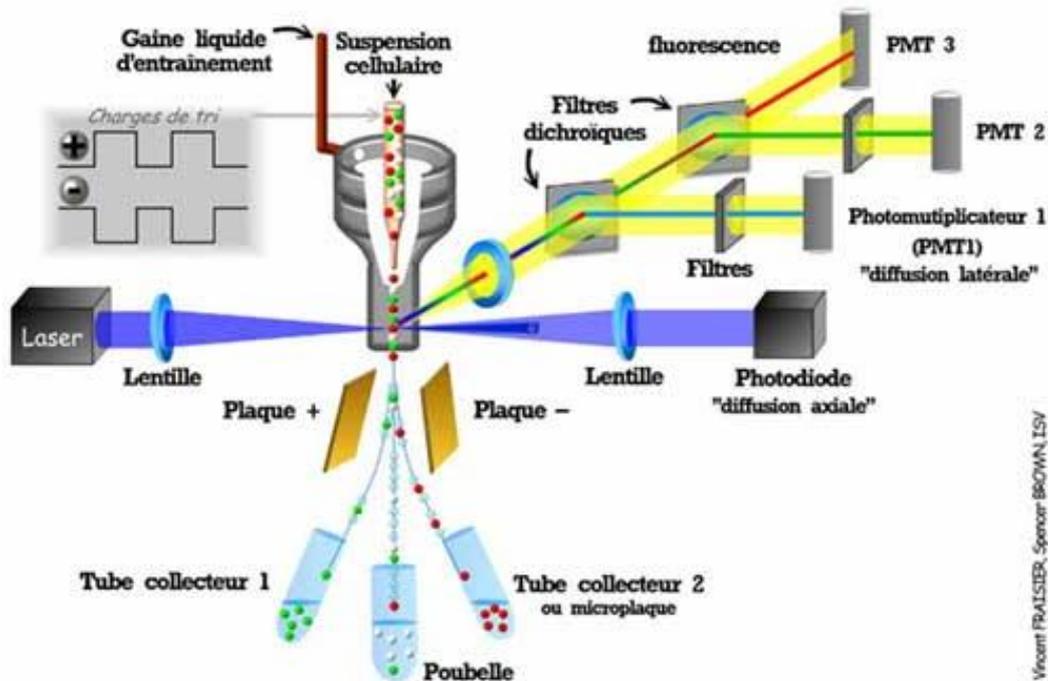
5 g d'albumine de sérum bovin (BSA, sigma-aldrich) sont dissouts dans 500 ml de solution PBS-EDTA pour atteindre une concentration de 10 g/l.

- **Gradient Nycodenz® à 14.5%**

14.5 g de Nycodenz® ((Nycomed) sont dissouts dans 100 ml de solution PBS-EDTA-BSA pour atteindre une concentration de 10 g/l.

**L'ensemble des solutions qui ne sont pas congelées, sont conservées à 4°C.**

## Annexe 2 : Représentation schématique d'un cytomètre de flux



L'analyse par cytométrie en flux passe par une préparation des échantillons : la détection des caractères étudiés nécessite un marquage fluorescent. Les cellules marquées sont convoyées dans une buse de très faible diamètre et sont soumises à un rayonnement LASER pour provoquer l'excitation du fluorophore. La fluorescence émise par le fluorochrome, provoquée par le passage du rayon laser dans la gouttelette, est mesurée par un ou plusieurs photomultiplicateurs ou une photodiode. Les variations des signaux permettent de sélectionner différentes populations de l'échantillon et de les séparer à l'aide d'un champ électrique.

([http://www.memoireonline.com/07/12/6013/m\\_Analyse-des-bacteries-non-cultivables8.html](http://www.memoireonline.com/07/12/6013/m_Analyse-des-bacteries-non-cultivables8.html) )

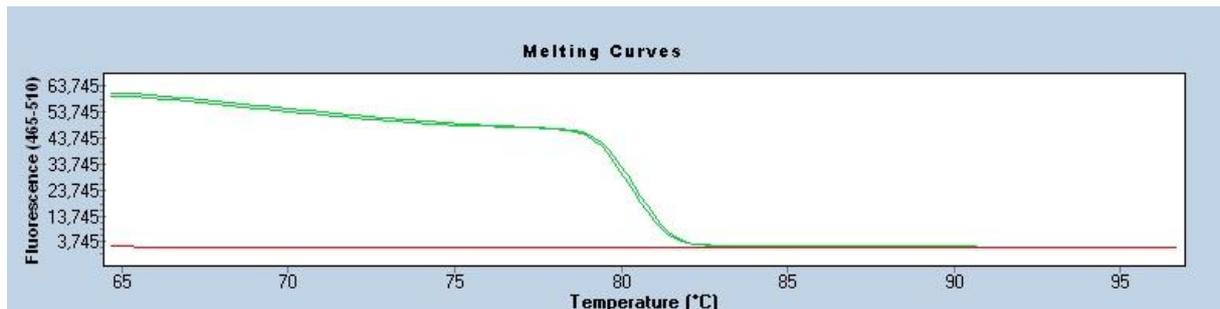
## Annexe 3 : Couples d'amorces utilisés en PCRq

Gène cible	Numéro d'accension ADNc	Séquence de l'amorce sens (5' → 3')	Séquence de l'amorce anti-sens (5' → 3')	Taille amplicon (pb)	Efficacité PCR (%)
<i>Calr</i>	NM_022399	CTCCTGGCCTCTCATTTTTG	AGGGCTTTTCCTCCATACCT	105	94,40
<i>Camp</i>	NM_001100724	CAACCAGCAGTCTTTGGACA	TCTCCTTCACTCGGAACCTC	113	95,57
<i>Cd163</i>	NM_001107887	GGCCCATGTGGACAGATAGT	GGCTGGCTTGCTCTGTTC	93	99,40
<i>Cpa3</i>	NM_019300	TCTTGCTTATGGGGGTCATC	GCTTGCTTTTCATCCTGGAG	100	93,85
<i>Cxcl10</i>	NM_139089	CTCCACACACCCTCCTTCTC	ATTTGCCATCTCACCTGGAC	96	98,50
<i>Cxcl11</i>	NM_182952	CCTTTCCCAAATAACACGA	GGCACCTCATGAATGCTAAA	100	99,95
<i>Cxcl9</i>	NM_145672.4	ACCCACCATCCGGAGT	GGGAAGGCGTTTTAGTATGAT	100	99,35
<i>Defa</i>	NM_173329	GCACACGCTGTGGTTTTAGA	TTCTTCTTGGTCGGAGTGCT	99	100,00
<i>Gapdh</i>	NM_017008	AGCCCAGCAAGGATACTGAG	GGATGGAATTGTGAGGGAGA	104	98,10
<i>Ifit2</i>	NM_001024753	CTTCCAGAAGGCAGACAAGG	CAGGATGGGAGACAGAATCC	95	98,95
<i>Ifit3</i>	NM_001007694	ACTCTGAGCACAAAGCGACA	TTCAGCTTGCCCTAAGCATT	98	99,45
<i>Ifng</i>	NM_138880	TGAACAACCCACAGATCCAG	GACTCCTTTTCCGCTTCCTT	99	97,50
<i>Il10</i>	NM_012854	GAACCACCCGGCATCTACT	CAAGGAGTTGCTCCCGTTAG	88	99,15
<i>Il27</i>	XM_344962	CCTACATTCCTGGAGCTTG	GGGCCTGAAGCTAGGTGTTA	111	100,00
<i>Irf1</i>	NM_012591	TGAGGGTTGTCTCCCTTAGC	TGGCAAAGTCCACAGAGAAA	102	93,70
<i>Irf7</i>	NM_001033691	TCTTGGCCTGTGCTTGCTA	GTTGGGGTCTGAATCAAGC	96	100,00
<i>Mcpt1</i>	NM_017145	AGCTGTGGTGGGTTTCTCAT	TATTCCTCGCTTGCTCACGTC	110	98,45
<i>Mcpt8</i>	NM_021598	ACAACGACTCCATCCAGCTT	ACTCCATCGCACACAAAAGG	94	100,00
<i>Np4</i>	NM_173299	ACAGCCATGAGGACACTCACT	AGCCGCCTTAGCTCTTTCTT	93	96,65
<i>Pdia3</i>	NM_017319	AAGGACGTGCTGATCGAGTT	GAGTTTCTCCCCAGCTCTT	87	100,00
<i>Pdia4</i>	NM_053849	AGCAGCTGGAGCCTGTCTAC	TTGGTGATGTCATTGGCAGT	100	95,55
<i>Pdia6</i>	NM_001004442	GGGAATGAGCAGTTTTCCAG	TCACTGTTGGCAGTTTTCCAG	99	99,20
<i>Pgk1</i>	NM_053291	CGCATCTCCATTTGGTGTTAG	CCGATGCAGTAAAGACGA	98	96,30
<i>RatNP-3b</i>	NM_001079898	GCGTGACCTGCTCTGTAGA	GCTCAGCAACAGAGTCGGTA	100	100,00
<i>S100a8</i>	NM_053822	CGAAGAGTTCCTTGTTGG	CAGGCCAGAAGCTCTGTTACT	83	98,55
<i>S100a9</i>	NM_053587	TGAGAAGCTGCATGAGAACAA	GACTTGTTGGGCAGATGTT	104	96,65
<i>Socs1</i>	NM_145879	GCACTCACTTCCGCACCT	CAGGGGTCCCCAGTAGAAG	99	92,70
<i>Socs3</i>	NM_053565	CATGGCACAAGCACAAAAT	GGCCTGAGGAAGAAGCCTAT	82	94,65
<i>Stat1</i>	NM_032612	GAGCCCAGGAATCTCTCCTT	TGGTGACTGACGAAAACCTGC	94	98,20

## Annexe 4 : Résultat obtenu en courbe de fusion pour Ifng

- **Courbe standard de dénaturation de l'amplicon ou courbe de fusion.**

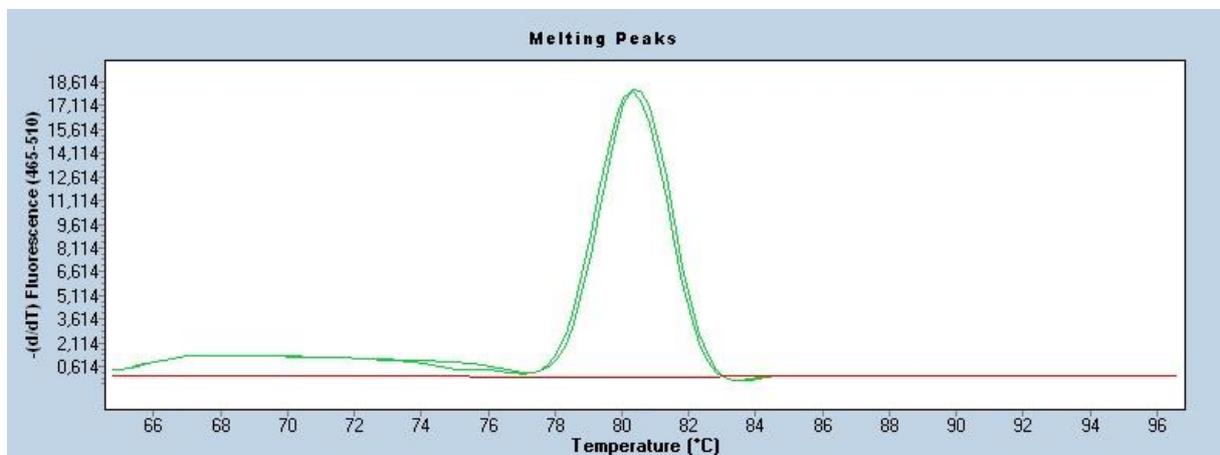
Cette étape consiste à augmenter la température de 45°C à 75°C par palier de 0.1°C en mesurant en continu l'intensité de fluorescence. Celle-ci chute lorsque l'on atteint la  $T_m$  de l'amplicon car ce dernier est dénaturé.



### Courbes de fusion obtenues pour l'amplification de l'Ifng en duplicat

- **Analyse en pic de fusion.**

Si la courbe de fusion est unimodale, le calcul de la dérivé primaire de celle-ci donne une courbe en cloche dont l'abscisse du maximum corespondant à la  $T_m$  du produit de la PCR. Donc, si plusieurs amplicons sont amplifiés par un couple d'amorces peu spécifique, cette représentation montrera autant de pic que d'amplicons différents amplifiés au cours de la PCR.

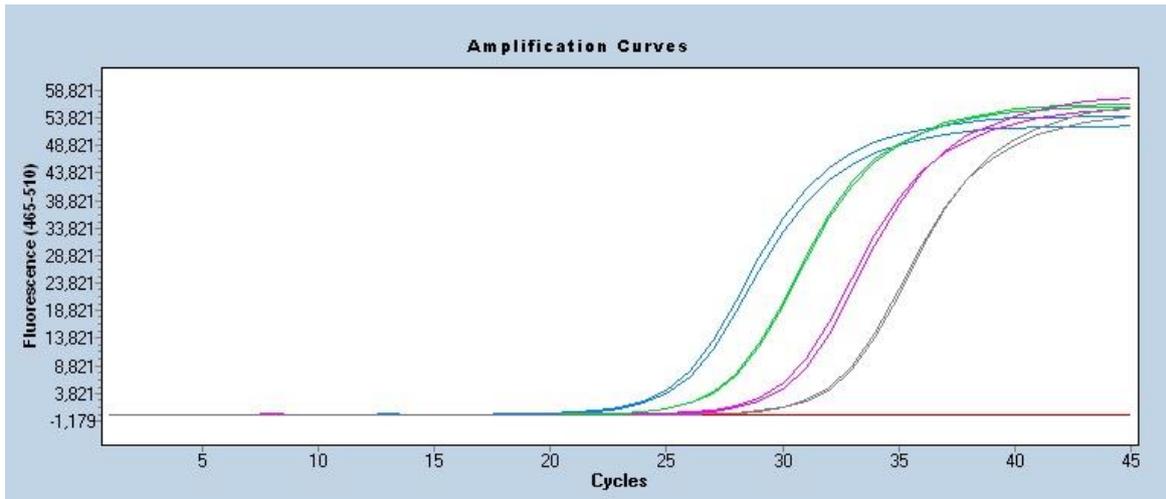


### Courbes de fusion obtenues pour l'amplification de l'Ifng en duplicat

## Annexe 5 : Résultat obtenu en courbe standard pour *Ifng*

- **Courbes standards d'amplification.**

On procède à l'amplification par PCRq d'une gamme de dilution de raison 10 d'un échantillon d'ADNc : 1/10, 1/100, 1/1000 et 1/10000.

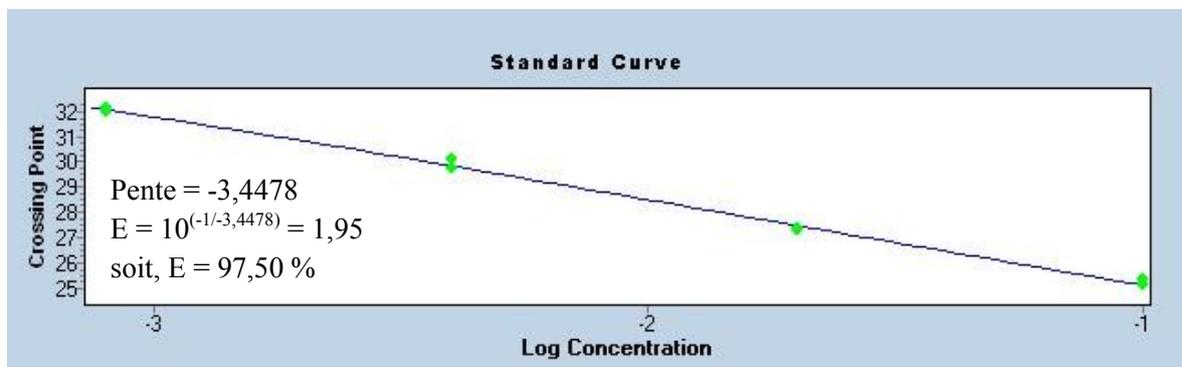


Courbes standards de dilution obtenues pour l'amplification de l'*Ifng* en duplicat.

- **Droite standard d'Efficacité de la PCR.**

Les Cq de la gamme sont placées sur une échelle logarithmique et le coefficient directeur de la droite de régression linéaire passant par ces points donne l'efficacité de la PCR :

$E = 10^{(-1/\text{pente})}$ . Une efficacité de 100% est égale à 2 puisque la quantité de matériel double à chaque cycle.



Droite standard d'Efficacité de la PCR obtenues pour l'amplification de l'*Ifng*.

## Annexe 6 : Profil d'expression des gènes d'intérêt sélectionnés

### Voie de signalisation de l'IFN $\gamma$

Sonde	Gène	HLA-B27 vs. NTG		HLA-B27 vs. HLA-B7		Produit du gène
		P-value	Ratio	P-value	Ratio	
1370790_at	<i>Ifn<math>\gamma</math></i>	2,27E-01	0,66	2,93E-02	0,36	interferon gamma
1382454_at	<i>Cxcl9</i>	9,58E-07	0,22	3,08E-06	0,24	chemokine (C-X-C motif) ligand 9
1373544_at	<i>Cxcl9</i>	2,55E-06	0,23	3,58E-06	0,25	chemokine (C-X-C motif) ligand 9
1387969_at	<i>Cxcl10</i>	1,42E-06	0,16	5,65E-07	0,22	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
1379365_at	<i>Cxcl11</i>	1,07E-07	0,02	6,26E-06	0,06	chemokine (C-X-C motif) ligand 11
1387711_at	<i>Il10</i>	1,25E-02	0,66	5,12E-02	0,58	interleukin 10
1379568_at	<i>Ifit2</i>	1,40E-05	0,16	6,44E-04	0,31	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2
1384180_at	<i>Ifit2</i>	6,53E-05	0,20	3,29E-03	0,36	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2
1376908_at	<i>Ifit3</i>	4,20E-05	0,10	8,59E-03	0,21	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3
1368073_at	<i>Irf1</i>	2,62E-06	0,59	2,23E-05	0,62	interferon regulatory factor 1
1383564_at	<i>Irf7</i>	2,91E-06	0,17	4,46E-04	0,24	interferon regulatory factor 7
1368835_at	<i>Stat1</i>	1,57E-04	0,53	5,39E-05	0,67	signal transducer and activator of transcription 1
1372757_at	<i>Stat1</i>	1,30E-05	0,68	5,36E-03	0,72	signal transducer and activator of transcription 1
1387354_at	<i>Stat1</i>	4,09E-06	0,70	5,68E-03	0,55	signal transducer and activator of transcription 1
1375568_at	<i>Socs1</i>	4,09E-01	1,00	5,14E-01	1,00	suppressor of cytokine signaling 1
1369584_at	<i>Socs3</i>	2,78E-01	1,08	3,18E-01	1,08	suppressor of cytokine signaling 3

### Immunité innée

Sonde	Gène	HLA-B27 vs. NTG		HLA-B27 vs. HLA-B7		Produit du gène
		P-value	Ratio	P-value	Ratio	
1387943_at	<i>Defa</i>	2,40E-04	89,11	1,25E-04	208,79	defensin
1370470_at	<i>Np4</i>	1,58E-04	44,78	8,09E-05	87,70	defensin NP-4 precursor
1370791_at	<i>RatNP-3b</i>	1,16E-04	44,01	6,79E-05	86,26	defensin RatNP-3 precursor
1393603_at	<i>Camp</i>	2,56E-03	24,46	4,84E-03	24,77	cathelicidin antimicrobial peptide
1368494_at	<i>S100a8</i>	2,19E-05	28,18	8,35E-05	29,92	S100 calcium binding protein A8
1387125_at	<i>S100a9</i>	3,72E-05	22,64	2,27E-04	23,02	S100 calcium binding protein A9
1393917_at	<i>Cd163</i>	1,56E-03	19,65	4,55E-02	6,96	CD163 molecule
1371151_at	<i>Cpa3</i>	9,98E-03	26,59	1,84E-02	25,67	carboxypeptidase A3 (mast cell)
1371260_at	<i>Mcpt1</i>	2,52E-04	39,08	4,22E-03	15,15	mast cell protease 1
1368501_s_at	<i>Mcpt8</i>	7,14E-03	13,58	6,72E-03	15,34	mast cell protease 8
1371164_at	<i>Mcpt8</i>	4,39E-03	13,39	1,03E-02	12,40	mast cell protease 8
1369586_at	<i>Mcpt8</i>	2,29E-03	8,58	4,44E-03	8,45	mast cell protease 8
1387220_at	<i>Mcpt8</i>	4,05E-03	4,81	1,04E-02	4,52	mast cell protease 8

### Stress du réticulum endoplasmique

Sonde	Gène	HLA-B27 vs. NTG		HLA-B27 vs. HLA-B7		Produit de gène
		P-value	Ratio	P-value	Ratio	
1398788_at	<i>Pdia3</i>	4,66E-05	1,41	2,58E-05	1,37	protein disulfide isomerase family A, member 3
1370007_at	<i>Pdia4</i>	4,97E-08	2,92	2,52E-08	2,52	protein disulfide isomerase family A, member 4
1370859_at	<i>Pdia6</i>	1,86E-04	1,79	4,85E-04	1,68	protein disulfide isomerase family A, member 6
1398750_at	<i>Calr</i>	7,54E-04	1,60	2,76E-02	1,30	calreticulin