



L'infection herpétique un facteur environnemental impliqué dans la progression de l'arthrite rhumatoïde

Mémoire

Patricia Lacerte

Maîtrise en médecine expérimentale
Maître ès Sciences (M.Sc.)

Québec, Canada

© Patricia Lacerte, 2014

Résumé

L'implication du virus Epstein-Barr (EBV) dans la progression de l'arthrite rhumatoïde (AR) est suspectée depuis plusieurs années. Il a précédemment été démontré que l'infection par le gammaherpèsvirus MHV-68 subséquente à l'injection de sérum arthritique aggrave l'inflammation articulaire. Cette réaction semble également spécifique au virus MHV-68 puisque ce phénomène n'est pas observable lors d'une infection par les virus mCMV ou HSV-1. La présence du génome viral détectée au niveau du tissu synovial indique que le virus peut être transporté par une sous-population cellulaire jusqu'aux articulations. La présence du virus a été décelée dans les monocytes inflammatoires, cellules présentes au niveau du liquide articulaire des souris infectées. Ces résultats démontrent que les monocytes inflammatoires jouent un rôle important dans l'exacerbation des symptômes induits par le virus MHV-68 dans un modèle murin d'arthrite. L'implication du TLR2, du TLR9, de même qu'EBV est également suggérée dans la pathogénèse de l'AR.

Abstract

For several years, the Epstein-Barr virus (EBV) is suspected to be involved in rheumatoid arthritis (RA) pathogenesis. Using a mouse model of arthritis, it was previously demonstrated that infection of arthritic mice with the herpes virus MHV-68, resulted in exacerbation of inflammation in joints of mice. Furthermore, this phenomenon was MHV-68 specific since no other herpes virus such as HSV-1 or mCMV was found to increase joint inflammation of arthritic mice. The presence of MHV-68 genome in synovial tissues of arthritic mice and subsequently in inflammatory monocytes also suggest the potential role of these cells in virus transport to the joint of arthritic mice. Together, these findings demonstrate the key role of inflammatory monocytes in exacerbation of inflammatory symptoms induced by MHV-68 in arthritic mice. The involvement of TLR2, TLR9 and EBV is also suggested in RA pathogenesis.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux	ix
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements	xix
Avant-propos	xxi
CHAPITRE 1: Introduction.....	1
1. Arthrite rhumatoïde.....	2
1.1 Épidémiologie	2
1.1.1 Facteurs de risque génétiques	3
1.1.2 Facteurs de risque environnementaux	4
1.2 Pathogénèse.....	5
1.2.1 L'articulation	5
1.2.2 Processus inflammatoire	9
1.2.3 La formation du pannus et la destruction articulaire	12
1.3 Diagnostic clinique	14
1.3.1 Facteur rhumatoïde	15
1.3.2 Anticorps anti-peptides citrullinés	17
1.3.3 Protéine C-réactive et vitesse de sédimentation des érythrocytes	18
2. Le virus Epstein-Barr et l'arthrite rhumatoïde	18
2.1 Caractéristiques du virus Epstein-Barr	18
2.2 Tropicisme cellulaire.....	19
2.3 Évasion du système immunitaire	21
2.4 Liens entre le virus Epstein-Barr et l'arthrite rhumatoïde	23
3. Modèle d'arthrite murin – transfert de sérum arthritique (K/BxN)	27
4. Le virus MHV-68.....	30
4.1 Caractéristiques du virus MHV-68	30
4.2 Tropicisme cellulaire.....	30

4.3 Homologie entre les virus EBV et MHV-68	31
5. Les récepteurs de l'immunité innée.....	33
5.1 Les voies de signalisation des TLRs.....	35
5.2 Les TLRs dans l'arthrite rhumatoïde	37
5.2.1 Récepteurs extracellulaires.....	38
5.2.2 Récepteurs intracellulaires.....	41
6. Hypothèse et objectifs de recherche	45
6.1 Hypothèse.....	45
6.2 Objectifs principaux.....	46
6.3 Objectifs spécifiques	46
CHAPITRE 2 : L'infection aiguë par le virus MHV-68 accroît la sévérité de l'arthrite chez la souris : la contribution des monocytes inflammatoires Ly6C^{high}	47
Résumé du manuscrit.....	48
Acute MHV-68 infection enhances severity of arthritis in mice: contribution of Ly6C ^{high} inflammatory monocytes.	49
CHAPITRE 3 : Augmentation de l'expression des « Toll-like receptors » 2 et 9 au niveau des sous-populations monocytaires et des neutrophiles de patients atteints d'arthrite rhumatoïde.	75
Résumé du manuscrit.....	76
Enhanced expression of Toll-like receptors 2 and 9 on monocyte subsets and neutrophils of rheumatoid arthritis patients	77
CHAPITRE 4: Discussion et conclusion.....	99
Discussion	100
Conclusions et perspectives.....	119
Bibliographie.....	123

Liste des tableaux

CHAPITRE 1

Tableau 1- 1: Critères de classification de l'arthrite rhumatoïde.....	15
Tableau 1- 2: Stratégies d'évasion d'EBV au système immunitaire	22
Tableau 1- 3: Résumé des études concernant l'implication d'EBV comme facteur environnemental dans la progression de l'arthrite rhumatoïde.....	27
Tableau 1- 4: Les TLRs et leurs ligands.....	33

CHAPITRE 3

Tableau 3- 1: Clinical features of selected patients.....	91
Tableau 3- 2: Presence of EBV genome in blood and synovial cells.	92

Liste des figures

CHAPITRE 1

Figure 1- 1: Schéma d'une articulation d'un patient atteint d'arthrite rhumatoïde	6
Figure 1- 2: Implication du facteur rhumatoïde dans la pathogénèse de maladies articulaires.....	16
Figure 1- 3: Cinétique de production d'anticorps spécifiques à EBV.....	25
Figure 1- 4: Modèle K/BxN et la production d'anticorps anti-glucose-6-phosphate isomérase spécifiques.	29
Figure 1- 5: La superfamille des TLRs et du récepteur de l'interleukin-1.....	35
Figure 1- 6: Signalisation intracellulaire des voies associées à MyD88 et à TRIF.....	37

CHAPITRE 2

Figure 2- 1: Acute MHV-68 infection enhances joint inflammation of arthritic mice.....	67
Figure 2- 2: Representation of joint inflammation and joint histology.....	68
Figure 2- 3: Detection of MHV-68 DNA in synovial tissues of arthritic mice.....	69
Figure 2- 4: Levels of joint fluid cytokines and chemokines are increased following MHV-68 infection.	70
Figure 2- 5: Levels of circulating inflammatory monocytes are increased in arthritic mice infected with MHV-68.	71
Figure 2- 6: Inflammatory monocytes are recruited to the inflamed joints following MHV-68 infection.....	72
Figure 2- 7: CCR2 plays a key role in MHV-68-induced joint inflammation.....	73
Figure 2- 8: Recruitment of MHV-68-infected Ly6C ^{high} CD11b ⁺ monocytes in joint of arthritic mice.....	74

CHAPITRE 3

Figure 3- 1: TLR2 and TLR9 expression on blood monocytes subsets of RA patients.....	94
Figure 3- 2: Expression levels of TLR2 and TLR9 on recruited monocyte subsets in synovial fluids of RA patients.....	95
Figure 3- 3: Expression of TLR2 and TLR9 on neutrophils of RA patients.....	96
Figure 3- 4: Cytokine levels in plasma and in synovial fluids of RA patients.....	97

Liste des abréviations

ACPA	Anticorps anti-protéine citrulliné (<i>Anti-citrullinated protein antibody</i>)
ACR	Association américaine de rhumatologie (<i>american rheumatism association</i>)
ADN	Acide désoxyribonucléique
AP1	<i>Activator protein 1</i>
APC	Cellules présentatrices d'antigènes (<i>antigen presenting cells</i>)
AR	Arthrite rhumatoïde
ARN	Acide ribonucléique
ARNdb	Acide ribonucléique double brin
ARNsb	Acide ribonucléique simple brin
BART	<i>BamH1-A rightward transcript</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma-2</i>
BCR	<i>B cell receptor</i>
C3b	<i>Complement component 3</i>
C57Bl/6	Souris C57 black 6
CD	Cluster de différenciation (<i>cluster of differentiation</i>)
CD4⁺	Lymphocytes T auxiliaires CD4 ⁺ (<i>helper</i>)
CD8⁺	Lymphocytes T cytotoxiques CD8 ⁺
CIA	Modèle d'arthrite induit au collagène (<i>collagen-induced arthritis</i>)
CLRs	<i>C-type lectin receptors</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus (hCMV, humain – mCMV, murin)
CRP	Protéine C-réactive (<i>C-reactive protein</i>)
CCR2	<i>C-C motif chemokine receptor 2</i>
CCR2^{-/-}	Souris déficientes en CCR2
CX3CR1	<i>C-X3-C motif chemokine receptor 1</i>
CX3CR1^{-/-}	Souris déficientes en CX3CR1
DAMPs	<i>Danger-associated molecular patterns</i>
DC	Cellule dendritique (<i>dendritic cell</i>)
DD	<i>Death domain</i>
DRB1*xxxx	Allèle de la région HLA (exemple DRB1*0404, allèle *0404 du gène HLA-DRB1)
E	Gènes précoces d'EBV (<i>early</i>)
EA	Antigène précoce (<i>early antigen</i>)
EBER	<i>Epstein-Barr virus-encoded small RNA</i>
EBNA	Antigène nucléaire du virus Epstein-Barr (<i>Epstein-Barr nuclear antigen</i>)
EBV	Virus Epstein-Barr
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ESR	Vitesse de sédimentation des érythrocytes (<i>erythrocyte sedimentation rate</i>)
EULAR	<i>The european league against rheumatism</i>
Fc	Fragment cristallisable (<i>fragment crystalline</i>)
FcγR	Récepteur Fc-gamma (<i>Fc-gamma receptor</i>)

g ou gp	Glycoprotéine (exemple gp350, glycoprotéine 350 – gB, glycoprotéine B)
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GFP^{+/-}	Souris transgéniques pour le « green fluorescent protein »
GPI	Glucose-6-phosphate isomérase (<i>glucose-6-phosphate isomerase</i>)
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HLA-DRB1	Locus DRB1 de la région HLA
HHV	Virus herpétique humain (<i>human herpesvirus</i>)
HMGB-1	<i>High mobility group box chromosomal protein 1</i>
HTLV-1	Virus T-lymphotropique humain 1 (<i>Human T-lymphotropic virus-1</i>)
Hsp	Protéines de choc thermique (<i>heat shock protein</i>) (exemple Hsp60, <i>heat shock protein-60</i>)
HSV-1	Virus herpès simplex-1
IE	Gènes précoces immédiats d'EBV (<i>immediate early</i>)
iE-DAP	<i>γ-D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid</i>
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IL-1R	Récepteur de l'IL-1 (<i>Interleukin-1 receptor</i>)
IL-1RA^{-/-}	Souris déficientes en IL-1RA (<i>interleukin-1 receptor antagonist</i>)
IκB	Inhibiteur de NF-κB
IKK	<i>IκB kinases</i>
IM	Mononucléose infectieuse (<i>infectious mononucleosis</i>)
i.n.	Injection intranasale
i.p.	Injection intrapéritonéale
IRAK	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase</i> (exemple IRAK1, <i>IL-1R-associated kinase-1</i>)
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i> (exemple IRF3, <i>interferon regulatory factor-3</i>)
JNK	<i>c-Jun amino terminal kinase</i>
K/BxN	Souris transgénique spontanément arthritique
KDa	Kilodalton
KO	Souris déficiente (<i>knock-out</i>)
kpb	kilo paires de bases
L	Gènes tardifs d'EBV (<i>late</i>)
LMP	<i>Latent membrane protein</i> (exemple LMP-1)
LP	<i>Leader Protein</i> (exemple : EBNA-LP)
LPS	Lipopolysaccharide
MAPKs	<i>Mitogen activated protein (MAP) kinases</i>
MCP-1	Protéine chimioattractante de monocytes-1 (<i>monocytes chemoattractant protein-1</i>)
MCSF	<i>Macrophage colony stimulating factor</i>
MEF	Fibroblaste embryonnaire murin (<i>mouse embryonic fibroblast</i>)
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i>
MHV-68 (γHV-68)	Gammaherpèsvirus-68 murin (<i>murine gamma herpesvirus-68</i>)
MIP-1	Protéine inflammatoire des macrophages-1 (<i>macrophages inflammatory protein-1</i>) (exemple MIP-1α, <i>macrophages inflammatory protein-1α</i>)

MMP	Métalloprotéinases (<i>Matrix metalloproteinase</i>)
MuHV4	Herpèsvirus murin-4 (<i>murid herpesvirus-4</i>)
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene-88</i>
NLRs	<i>Nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptors</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor-κB</i>
NK	<i>Natural Killer cells</i>
OA	Ostéoarthrite
PAD	Peptidyle arginine déiminase
PAMPs	Motifs moléculaires associés à des pathogènes (<i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBMC	Cellules mononucléaires du sang périphérique (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PCR	Réaction en chaîne par polymérase (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEM	Macrophage provenant d'exsudat péritonéal (<i>peritoneal exudate macrophage</i>)
PFU	Unités formatrices de plaques (<i>plaque-forming units</i>)
PRRs	Récepteurs de reconnaissance de motifs (<i>pattern recognition receptors</i>)
PTLD	Désordre lymphoprolifératif post-transplantation (<i>post-transplant lymphoproliferative disorder</i>)
qPCR	PCR en temps réel
R	Récepteur (exemple C5R, récepteur du C5)
RA	<i>Rheumatoid arthritis</i>
RANK	<i>Receptor activator of NF-κB</i>
RANKL	<i>Receptor activator of NF-κB ligand</i>
RANTES	<i>Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RF	Facteur rhumatoïde
RLRs	<i>Retinoic acid-inducible I (RIG-I)-like receptors</i>
RNase	Ribonucléase bovine pancréatique
ROS	Dérivés réactifs de l'oxygène (<i>reactive oxygen species</i>)
SE	<i>Shared epitope</i>
SLE	Lupus érythémateux disséminé (<i>systemic lupus erythematosus</i>)
TAB	<i>TAK1-binding protein</i> (exemple TAB1, <i>TAK1-binding protein 1</i>)
TAK1	<i>Transforming-growth factor-β-activated kinase</i>
TAP	Protéine de transport des antigènes (<i>transporter associated with antigen processing</i>)
TCR	Récepteur de cellules T (<i>T cell receptor</i>)
TGF-β	<i>Transforming growth factor-β</i>
Th0	Cellule T naïve
Th17	Cellules T auxiliaire 17 (<i>T helper 17</i>)
TIR	<i>Toll/IL-1R domain</i>
TIRAP	<i>TIR-domain-containing adaptor protein</i>
TLRs	<i>Toll-like receptors</i>
TLR2^{-/-}	Souris déficientes en TLR2
TLR4^{-/-}	Souris déficientes en TLR4
TLR7^{-/-}	Souris déficientes en TLR7
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>

TNFR1	<i>Tumor necrosis factor receptor 1</i>
TRAF6	<i>Tumour-necrosis-factorreceptor-associated factor 6</i>
Treg	Cellules T régulatrices
TRIF	<i>TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN-β</i>
UBC13	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme 13</i>
UEV1A	<i>Ubiquitin -conjugating enzyme E2 variant 1</i>
VCA	Antigène de la capsid virale (<i>viral capsid antigen</i>)
VCP	Peptides viraux citrullinés (<i>viral citrullinated peptides</i>)
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
WT	Souris de type sauvage (<i>wild-type</i>)
*	Caractère permettant de séparer le nom du gène et de l'allèle (exemple HLA-DRB1*0404, allèle *0404 du gène HLA-DRB1)

*À mes parents, Louise et Claude,
ainsi qu'à mon conjoint, Steve.*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement le Dr Jean Gosselin de m'avoir accueilli dans son laboratoire. J'ai pu y apprendre des techniques aussi différentes les unes des autres qui me seront bien utiles afin de décrocher un emploi à la hauteur de mes attentes. Je le remercie d'avoir toujours été là pour répondre à mes questions et pour m'avoir supporté durant toutes ces années. J'aimerais également remercier Mme Pierrette Côté pour son dynamisme et sa bonne humeur quotidienne. Un merci tout particulier à mon codirecteur, Alexandre Brunet, qui a été d'une grande aide dans les périodes difficiles que j'ai traversées tout au long de mes études graduées.

J'aimerais également remercier Stéphanie Fiola qui a été là pratiquement du début à presque à la fin pour moi. Tout d'abord, je te remercie pour toutes les techniques que tu m'as apprises. Tu as toujours été patiente et déterminée, même si je sais que ce ne devait pas toujours être facile avec toutes mes questions. Je te remercie également pour ton support moral tout au long de ces années, et ce, même dans les moments les plus difficiles. Tu étais toujours de bonne humeur, ce qui me redonnait le moral et la force de continuer. Un merci tout particulier à Manon Lebel qui a été là dans les derniers moments de mes études. Merci Manon de ton écoute, c'est en grande majorité grâce à toi si j'ai réussi à traverser le dernier droit de ma maîtrise. Ton oreille toujours attentive pour m'écouter a été très appréciée. Je voudrais également remercier François Coulombe, Anne-Julie Lessard, et Carine Paquet-Bouchard pour leur dynamisme et leur bonne humeur! Je veux également dire merci à Éric Gaudreault, François Michaud et Vincent Douville pour tous les mois (ou années) passés à vos côtés.

Merci également à mon conjoint, Steve Beaulieu, d'avoir été là du début à la fin. Même si parfois il ne comprenait pas très bien ce que je vivais, il était toujours là pour me remonter le moral et me permettre de continuer. Un merci tout particulier à mes grandes amies Marie-Ève Dupuis et Kathryn Bellemare, qui me comprennent mieux que personne. Finalement, je désire remercier mes parents, Louise et Claude, ma sœur Véronique et mon frère Mathieu, mes grands-parents (Aline, Hermance et Richard Lacerte) ainsi que ma belle-famille (Anne-Louise Baril, André et Éric Beaulieu) d'avoir toujours été là pour moi, d'avoir montré autant d'intérêt pour ce que je faisais, et d'avoir montré que vous étiez fier de ce que j'accomplissais.

J'aimerais finalement remercier les organismes subventionnaires sans lesquels ce projet n'aurait jamais pu se concrétiser. Ainsi, un merci tout particulier aux Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC) pour m'avoir octroyé une bourse, mais également pour avoir fourni un support financier à mon projet de recherche.

Je remercie également les Fonds de recherche sur l'Arthrite et les Maladies Rhumatismales de l'Université Laval (FRAMR) desquels j'ai également pu obtenir une bourse de maîtrise.

Avant-propos

Le chapitre 2 présente un article qui sera soumis sous peu. Voici la contribution détaillée de chaque auteur figurant sur l'article en question :

- Patricia Lacerte : Première auteure – J'ai grandement contribué à la conception et à l'exécution des expériences ainsi qu'à l'interprétation des résultats.
- Carine Paquet-Bouchard : Professionnelle de recherche dans le laboratoire - Elle a participé à certaines manipulations et à l'interprétation des résultats. Elle a également révisé le manuscrit avant sa soumission.
- Dre Manon Le Bel : Professionnelle de recherche dans le laboratoire – Elle a participé à certaines manipulations et à l'interprétation des résultats. Elle a également révisé le manuscrit avant sa soumission.
- Dre Christiane Girard : Médecin vétérinaire pathologiste, professeure titulaire à la faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal – Elle a permis l'analyse des coupes histologiques et a également collaboré à la révision du manuscrit avant sa soumission.
- Dr Jacques P. Brown : Rhumatologue, chef du service de rhumatologie du CHU de Québec, professeur clinicien de l'Université Laval et chercheur – Il a révisé le manuscrit avant sa soumission.
- Dr Jean Gosselin : Professeur titulaire et directeur du département de médecine moléculaire, ainsi que mon directeur de maîtrise – Il a été responsable de la conception des expériences, de l'analyse des résultats et de la rédaction de l'article scientifique.

Le chapitre 3 présente un article qui a été soumis à la revue « Arthritis & Rheumatology » (précédemment nommé « Arthritis & Rheumatism ») le 26 novembre 2013. Voici la contribution détaillée de chaque auteur figurant sur l'article en question :

- Patricia Lacerte : Première auteure – J'ai grandement contribué à la conception et à l'exécution des expériences ainsi qu'à l'interprétation des résultats.
- Dr Alexandre Brunet : Professeur associé à l'Université Laval, responsable du laboratoire de cytométrie du Dr Jean Gosselin, ainsi que mon codirecteur de maîtrise - il a permis l'analyse des résultats en cytométrie de flux.

- Dr Jacques P. Brown : Rhumatologue, chef du service de rhumatologie du CHU de Québec, professeur clinicien de l'Université Laval et chercheur – Il a été un collaborateur important puisqu'il permettait le recrutement de patients souffrant d'arthrite rhumatoïde et d'ostéoarthrite. Il a également révisé le manuscrit avant sa soumission.

- Dr Jean Gosselin : Professeur titulaire et directeur du département de médecine moléculaire, ainsi que mon directeur de maîtrise – Il a été responsable de la conception des expériences, de l'analyse des résultats et de la rédaction de l'article scientifique.

CHAPITRE 1: Introduction

1. Arthrite rhumatoïde

L'arthrite est une maladie caractérisée par une inflammation aiguë ou chronique des articulations regroupant une centaine de pathologies dont l'arthrite rhumatoïde, l'ostéoarthrite (ou arthrose), la goutte, la spondylarthrite ankylosante, l'arthrite psoriasique, l'arthrite juvénile idiopathique et le lupus érythémateux disséminé (SLE). La forme la plus sévère d'arthrite est l'arthrite rhumatoïde (AR). Il s'agit d'une maladie auto-immune inflammatoire dégénérative qui peut toucher toutes les articulations, et ce, même si elle affecte principalement celles situées en périphérie (1). La production d'anticorps spécifiques dirigés contre les molécules de l'hôte est au cœur de la pathogénèse de la maladie et permet ainsi de la classer parmi les pathologies auto-immunes. L'AR est une maladie systémique qui peut affecter l'ensemble du corps, c'est-à-dire qu'elle ne se limite donc pas seulement aux articulations, mais qu'elle peut également toucher certains organes, par exemple les poumons, le cœur, la peau et les reins. De plus, cette maladie est incurable puisqu'aucun traitement ne permet de la guérir. En effet, les traitements actuels reposent sur le contrôle des symptômes caractérisant la maladie. D'un point de vue clinique, l'AR est caractérisée par une atteinte bilatérale et symétrique, c'est-à-dire que les articulations des côtés gauche et droit du patient sont affectées au même moment et de manière plus ou moins identiques. Chez les patients atteints de la maladie, une importante inflammation articulaire est observée et entraîne une destruction du cartilage et de l'articulation. Ce processus inflammatoire entraîne plusieurs manifestations : rougeur, douleur, incapacités majeures, altération de l'état général (fatigue, perte de poids, etc.) (2, 3). Malgré le fait qu'il n'existe aucune thérapie permettant de guérir la maladie, certains médicaments permettent de prévenir et de ralentir la progression des dommages articulaires. D'ailleurs plusieurs études visent à approfondir nos connaissances sur cette maladie. À ce jour, les mécanismes exacts impliqués dans cette pathologie complexe demeurent mal définis.

1.1 Épidémiologie

L'AR affecte entre 0,5 à 1% de la population adulte mondiale et se manifeste principalement entre l'âge de 35 et 65 ans. Elle touche majoritairement les femmes dans un ratio de 3 : 1 et cette incidence est variable en fonction de l'âge. En effet, plus la population étudiée est vieillissante, plus le ratio hommes/femmes tend à s'équilibrer, soit un ratio presque identique pour un groupe de personnes âgées entre 75 et 84 ans (2). Malgré les nombreuses études publiées sur le sujet, l'étiologie de l'AR n'est pas bien définie. Dans la littérature, on souligne toutefois l'implication d'une composante génétique dans le développement de cette pathologie. Cependant, il est de plus en plus suggéré que des facteurs environnementaux pourraient également être

impliqués. Les facteurs génétiques seraient responsables de 50 à 60% du risque de souffrir d'AR, alors que les causes environnementales compteraient pour 40 à 50% (4).

1.1.1 Facteurs de risque génétiques

Plusieurs facteurs génétiques sont suspectés d'augmenter le risque de souffrir d'AR. Parmi ces derniers se trouvent les gènes reliés à la région du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) qui, à eux seuls, permettraient d'expliquer plus de 30% du risque génétique (2, 5). Le regroupement de gènes formant les CMHs chez l'humain est nommé HLA (« human leukocyte antigen »). Il se situe sur le bras court du chromosome 6 et est composé de trois régions. Les deux premières correspondent aux classes I et II du CMH et sont composées respectivement des HLA-A, B et C, ainsi que du HLA-D (incluant les HLA-DM, -DO, -DP, -DQ et -DR). La troisième région correspond au CMH de type III et code pour des composantes importantes de l'immunité innée, soient certaines molécules de la cascade du complément et des cytokines pro-inflammatoires dont le TNF (« tumor necrosis factor») (6).

Depuis plusieurs années, l'augmentation du risque de souffrir d'AR est associée au gène HLA-DRB1, le facteur génétique le mieux caractérisé à ce jour. Son rôle exact dans le développement de la maladie demeure toutefois incertain. La clé du mystère résiderait dans le partage d'une séquence d'acides aminés, appelée « shared epitope » (SE), située au niveau de la chaîne DRB1. Comme cette dernière assure la liaison de peptides au CMH et qu'il y aurait une mutation au niveau de cette chaîne, il est suggéré que des peptides du soi seraient présentés au système immunitaire. Ainsi, les cellules T de personnes porteuses d'allèles de prédisposition (DRB1*0101, *0102, *0401, *0404, *0405, *0408, *0410, *1001, *1402) effectueraient une reconnaissance inappropriée des molécules provenant de l'hôte (1, 2). Selon l'haplotype de l'hôte, l'augmentation du risque relatif de souffrir de la maladie est très variable. Le risque relatif se définit comme étant le risque de maladie chez les personnes exposées au facteur de risque comparativement à celles qui ne le sont pas. Certaines études suggèrent que pour l'allèle DRB1*0401, le risque relatif serait d'environ 3, alors que pour DRB1*0404, il serait seulement de 1,5 (2). Cependant, il n'existe aucun consensus sur la variation du risque relatif associé à chaque allèle. À titre d'exemple, les résultats obtenus dans une autre étude clinique sont contradictoires, c'est-à-dire que l'allèle de risque le plus important était DRB1*0404 avec un risque relatif de 3,5, comparativement à seulement 1,5 pour le *0401 (7, 8). Ce grand manque d'uniformité des résultats peut s'expliquer à la fois par la variabilité du nombre de patients étudiés, leurs particularités et le choix du groupe contrôle utilisé à titre de comparaison. Des recherches plus approfondies sur le sujet seront donc nécessaires afin de préciser l'impact réel de ces allèles dans l'AR.

D'autre part, plusieurs études suggèrent l'existence d'une catégorie d'allèles qui aurait plutôt un effet protecteur, soit DRB1*0103, *0402, *1102, *1103, *1301, *1302 et *1304. En effet, les personnes possédant l'un ou l'autre de ces allèles auraient un risque moins élevé de développer l'AR. La présence d'un seul de ces allèles serait suffisante pour diminuer le risque relatif, et ce, même si ces personnes sont porteuses du SE. Il semblerait qu'une séquence d'acides aminés (DERAA) serait commune entre les différents allèles protecteurs (5, 9). L'AR étant une maladie multifactorielle, il est important de considérer tous les autres facteurs de risque pouvant causer le développement de cette maladie afin d'évaluer adéquatement le risque relatif d'une personne. La seule présence d'allèles protecteurs ne peut donc pas garantir une protection complète à l'individu. Cependant, certaines études ont démontré que la sévérité des symptômes associés à la maladie seraient diminués chez les patients possédant de tels allèles (5). Des recherches plus approfondies seront nécessaires afin de mieux définir l'impact réel de ces facteurs.

En résumé, malgré toutes les recherches portant sur HLA-DRB1 et l'AR, l'impact réel de ce gène sur la progression de la maladie demeure litigieux et soulève de nombreuses questions. En effet, il serait intéressant de déterminer si ces allèles augmentent ou diminuent réellement le risque de souffrir d'AR, ou encore, s'ils ont un impact direct sur la sévérité de la maladie. Les nombreuses contradictions entre les différentes études réalisées ne nous permettent pas de répondre clairement à ces questions (7). Il faut cependant préciser que ces allèles de risque ne sont pas spécifiques à l'AR et qu'ils sont impliqués dans d'autres maladies auto-immunes (lupus érythémateux disséminé (SLE), syndrome de Sjögren, etc.) (1). Le même type d'allèles serait également retrouvé au niveau de la spondylarthrite ankylosante et de l'arthrite réactive. Dans ces deux dernières pathologies, certains sous-types du HLA-B27 semblent jouer un rôle dans l'augmentation du risque relatif (10). D'ailleurs, chez les patients arthritiques, la présence du gène HLA-B27 augmenterait les risques de développer des complications invalidantes importantes telles qu'une subluxation de la colonne cervicale ou une subluxation subaxiale (11, 12).

1.1.2 Facteurs de risque environnementaux

L'implication de facteurs environnementaux dans la progression de l'AR est fortement suspectée et de plus en plus reconnue. Une panoplie d'études portant sur des caractéristiques variées a déjà été réalisée. Parmi les différents facteurs étudiés, on retrouve les hormones, le tabagisme, la consommation d'alcool, l'obésité, l'infection par divers pathogènes, etc. Cependant, aucune étude n'a permis d'établir de relation solide entre ces facteurs environnementaux et l'AR. Parmi les caractéristiques précédentes, l'infection par divers pathogènes est le paramètre le plus étudié. Certains virus sont soupçonnés d'être impliqués dans l'initiation ou la progression de la maladie, soient le parvovirus B19, le cytomégalovirus humain (hCMV), le virus T-lymphotropique humain 1 (HTLV-1), les virus de l'hépatite B et C, ainsi que le virus Epstein-Barr (EBV) (13-

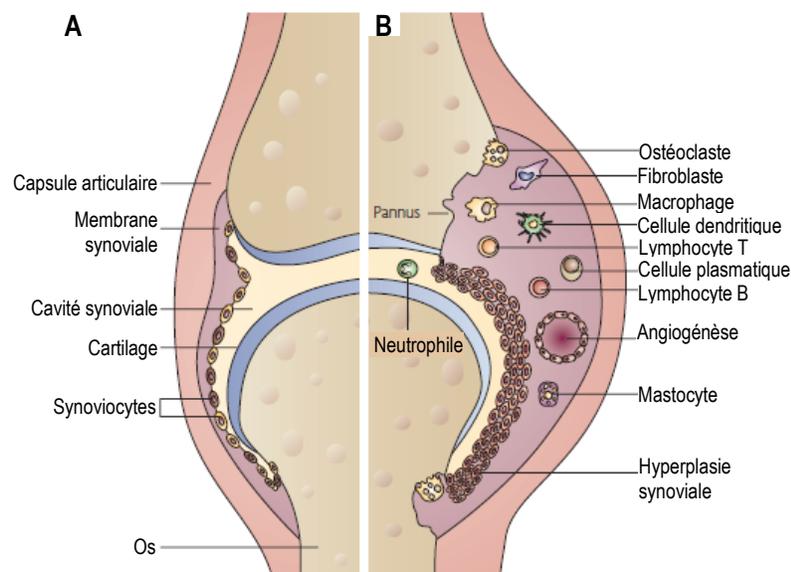
17). La détection du génome de certains de ces pathogènes au niveau du tissu synovial de patients arthritiques permet de suspecter leur implication dans la pathogénèse de l'AR (18). De plus, il est également proposé qu'un virus puisse jouer un rôle dans les manifestations inflammatoires aiguës observées chez approximativement 30% des patients arthritiques (19-21). Dans ce contexte, le pathogène devrait impérativement être doté de deux caractéristiques. Dans un premier lieu, il doit être ubiquitaire afin d'expliquer la prévalence importante de ces phases inflammatoires. Ensuite, le virus doit aussi avoir la capacité d'entrer en cycle de latence afin d'expliquer le caractère transitoire et cyclique de ces manifestations. Le virus EBV possède ces deux caractéristiques ce qui nous permet de croire à une implication de sa part dans le développement et la progression de l'AR à titre de facteur environnemental. La présence du génome d'EBV au niveau du tissu synovial de patients souffrant d'AR permet d'appuyer cette hypothèse (22, 23). Plusieurs autres découvertes ont permis, au fil des ans, de soutenir cette hypothèse et elles seront traitées plus en détails dans la section 2. Il est important de noter qu'EBV est étudié en lien avec la pathogénèse de plusieurs autres maladies auto-immunes, telle que le syndrome de Sjögren, le SLE ou encore la sclérose en plaques (24). Ainsi, ce pathogène pourrait être impliqué dans la progression du processus inflammatoire de plusieurs autres pathologies. Ces suspicions permettent d'expliquer l'intérêt des chercheurs à caractériser les interactions entre EBV et les différentes maladies auto-immunes.

1.2 Pathogénèse

1.2.1 L'articulation

Les articulations synoviales sont formées de plusieurs composantes (figure 1-1). Dans un premier temps, les articulations sont reliées entre elles à l'aide d'une capsule articulaire. Sous ces dernières se trouve la membrane synoviale, une structure normalement formée d'une couche cellulaire mince. Les cellules formant la membrane synoviale se nomment synoviocytes et sont responsables de la production du liquide synovial, ou synovie, un liquide biologique permettant de lubrifier les articulations. Pour sa part, la cavité synoviale réfère à l'espace situé entre les capsules articulaires et est remplie de liquide synovial. Chez les patients arthritiques, il est possible d'observer un épaississement de la membrane synoviale. Cette structure est composée de synoviocytes divisés en deux populations cellulaires distinctes: 1) les cellules de type A, ressemblant à des macrophages, et 2) les cellules de type B, ressemblant à des fibroblastes. L'hyperplasie synoviale (ou synovite) est un phénomène observé chez les patients arthritiques et est caractérisé par une augmentation marquée de la prolifération des macrophages et, dans une moindre mesure, des fibroblastes synoviaux. Certaines recherches ont permis d'observer que la proportion de synoviocytes de type B est plus élevée que celle de type A chez les donneurs sains, alors que le phénomène inverse est observable chez les

patients arthritiques. De plus, il est aussi possible d'observer un recrutement important de cellules inflammatoires jusqu'à la cavité synoviale des patients arthritiques, telles que les lymphocytes B et T et les granulocytes. Cet important afflux cellulaire entraîne alors une hyperplasie de l'articulation et la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, un phénomène nommé angiogénèse. Dans la littérature, il est reconnu que les macrophages synoviaux sont importants dans la pathogénèse de l'AR puisqu'ils peuvent permettre la phagocytose d'éléments étrangers ou encore agir à titre de cellules présentatrices d'antigènes. De plus, les macrophages synoviaux ont la capacité de se différencier en ostéoclastes, les cellules responsables de la destruction osseuse. Cette dernière caractéristique permet de comprendre l'engouement concernant l'étude de cette population cellulaire en lien avec la pathogénèse de l'AR (25-27).



Adapté de (28) (numéro de licence 3185040900376)

Figure 1- 1: Schéma d'une articulation d'un patient atteint d'arthrite rhumatoïde

Représentation d'une articulation saine (A) et d'une articulation atteinte d'arthrite rhumatoïde (B). Au niveau de l'articulation saine, une fine couche de synoviocytes forme la membrane synoviale. L'illustration de droite permet d'observer une hyperplasie de la membrane synoviale et un important recrutement cellulaire, causant la formation du pannus.

Plusieurs recherches ont permis de démontrer l'implication des monocytes et des macrophages dans la pathogénèse de l'AR. En fait, ces cellules ont un rôle important à jouer dans le processus inflammatoire. Dans un premier temps, les recherches effectuées sur le sujet ont permis de révéler que les monocytes et les

macrophages font partie de la vague de recrutement cellulaire aux articulations (29, 30). Ensuite, il a été démontré que l'augmentation d'une des sous-populations monocytaires, soit les cellules pro-inflammatoires (CD14⁺ CD16⁺), corrèle avec la sévérité de l'inflammation, et ainsi avec la gravité de la maladie (29, 31). Finalement, l'activation des monocytes et des macrophages mène à une production importante de TNF. Ces cellules représentent d'ailleurs les sources majeures de cette cytokine. Le TNF est reconnu pour être fortement impliquée dans l'initiation du processus inflammatoire et l'efficacité du traitement anti-TNF chez les patients atteints d'AR démontre l'importance de cette molécule dans la pathogénèse de la maladie (32, 33). Ainsi, les cellules responsables de sa production sont également suspectées d'être impliquées dans la pathogénèse de l'AR (34). Il a d'ailleurs pu être démontré que la déplétion des monocytes permet de diminuer l'inflammation puisque ces cellules sont absentes au niveau du pannus (32).

Les monocytes forment une population cellulaire hétérogène composée de deux à trois sous-populations. En effet, le nombre de sous-populations monocytaires varie en fonction de l'organisme étudié. Chez l'homme, il existe trois populations de monocytes : les « classiques » (CD14⁺⁺ CD16⁻), les « intermédiaires » (« pro-inflammatoires », CD14⁺⁺ CD16⁺) et les « non-classiques » (CD14^{low} CD16⁺⁺) (35). Le rôle exact de chacune de ces populations demeure incertain et il n'existe aucun consensus à ce sujet. Cependant, il a été démontré que les monocytes intermédiaires ont un rôle important à jouer dans la production de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF et l'interleukine (IL)-1. D'autre part, des études ont démontré que la population classique permet de produire d'autres types de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6 et -8. Enfin, le rôle de la population non-classique serait de patrouiller la circulation sanguine, une fonction partagée avec son homologue murin, les monocytes sentinelles (36). Dans la littérature, il a été démontré que la proportion de monocytes pro-inflammatoires (CD14⁺ CD16⁺) est augmentée dans la circulation sanguine des patients arthritiques comparativement aux donneurs sains. Il a été démontré que la quantité de monocytes pro-inflammatoires est directement proportionnelle à l'inflammation articulaire et au facteur rhumatoïde (29). De façon similaire, il a également été observé que cette même sous-population monocytaires est proportionnelle au taux de la protéine C-réactive (CRP) et à la vitesse de sédimentation des érythrocytes (ESR), deux marqueurs inflammatoires non-spécifiques à l'AR, mais qui sont utilisés, en combinaison avec d'autres paramètres, lors du diagnostic de la maladie (31). Néanmoins, il est important de préciser que ces études ont été réalisées sur deux sous-populations monocytaires seulement. En effet, il était précédemment reconnu que les monocytes humains se divisaient en deux sous-populations : les classiques (CD14⁺ CD16⁻) et les pro-inflammatoires (CD14⁺ CD16⁺). Ce sont des recherches ultérieures qui ont permis d'affirmer que ces cellules peuvent plutôt être divisées en trois populations distinctes. L'équipe de Rossol *et coll.* fut la première à démontrer une augmentation spécifique de la quantité de monocytes intermédiaires (CD14⁺⁺ CD16⁺) chez les patients arthritiques comparativement aux donneurs sains (37). Dans l'AR, les monocytes intermédiaires sont recrutés aux articulations en réponse à des molécules chimioattractantes incluant le MCP-1 (« monocytes

chemoattractant protein-1 ») ou le MIP-1 α (« macrophage inflammatory protein ») (38, 39). Cependant, il est important de mentionner que les rôles précis que remplissent les différentes sous-populations monocytaires dans le processus inflammatoire ou encore dans la pathogénèse de l'AR demeurent litigieux (40).

À ce jour, seulement deux sous-populations monocytaires ont été identifiées chez la souris: les cellules « inflammatoires » (Ly6C^{high} CD11b⁺) et « sentinelles » (Ly6C^{low} CD11b⁺) (35). D'abord, les monocytes sentinelles patrouillent la circulation sanguine et sont rapidement recrutés en réponse à une infection. Les cellules de cette sous-population monocyttaire possèdent des propriétés anti-inflammatoires. Néanmoins, il est suggéré que les monocytes sentinelles permettent la production de TNF et de molécules chemoattractantes qui entraînent une augmentation du recrutement des monocytes inflammatoires jusqu'au site d'infection. Cette dernière sous-population peut ensuite induire la production de cytokines et de chimiokines afin d'alimenter le processus inflammatoire (35, 38, 41-43). La nomenclature particulière des sous-populations de monocytes a été établie en fonction du rôle principal de ces cellules. En effet, tel que mentionné précédemment, la fonction des monocytes sentinelles est de patrouiller la circulation sanguine, tandis que les monocytes inflammatoires sont recrutés aux sites d'infection et d'inflammation dans divers modèles murins (44). Certaines études ont permis de suggérer que les cellules de cette dernière sous-population monocyttaire seraient des précurseurs des monocytes sentinelles (44, 45). Il est également reconnu que les monocytes ont la capacité de se différencier en macrophages lorsqu'ils atteignent un tissu en réponse à une infection ou une inflammation (30). Cette dernière caractéristique, ajoutée à la capacité des monocytes à produire des cytokines pro-inflammatoires font de ces cellules d'importantes joueuses dans le processus de destruction articulaire. De plus, à la suite du transfert adoptif de monocytes sentinelles sanguins, il a été possible d'observer que ces cellules patrouillent la circulation sanguine et se dirigent ensuite vers les tissus non-inflammés (43). Les mêmes manipulations ont également été effectuées, mais cette fois-ci en utilisant des monocytes inflammatoires. Dans ce cas particulier, les cellules étaient directement recrutées au site d'inflammation. Ces observations permettent de suggérer l'implication de cette dernière sous-population monocyttaire au niveau du processus inflammatoire. Qui plus est, il est reconnu que les monocytes inflammatoires ont la capacité de retourner à la moelle osseuse en absence d'inflammation (43).

Les macrophages forment une population cellulaire hétérogène composée de deux sous-populations distinctes, soit les cellules de type M1 et M2. Ces dernières possèdent respectivement des fonctions pro- et anti-inflammatoires. En effet, les cellules de type M1 contribuent à exacerber les dommages tissulaires en produisant un large éventail de cytokines pro-inflammatoires dont le TNF et l'IL-6. Les macrophages représentent d'ailleurs la principale source de TNF, ceci étant dit, les monocytes, les lymphocytes B et T, les cellules NK (« natural killer »), les neutrophiles, les mastocytes, les fibroblastes synoviaux et les ostéoblastes ont également la capacité de produire du TNF au niveau articulaire (33). Des études suggèrent que les

macrophages de type M1 sont générées à la suite de la différenciation des monocytes inflammatoires. Pour ce qui est des macrophages de type M2, ils permettraient de limiter la destruction tissulaire grâce à la production de cytokines anti-inflammatoires (par exemple, l'IL-10). Les cellules de cette sous-population proviendraient de la différenciation des monocytes sentinelles (46). Néanmoins, l'origine monocyttaire exacte des sous-populations de macrophage n'est pas clairement définie. Il est donc important de préciser que les monocytes inflammatoires et sentinelles peuvent très bien se différencier soit en macrophages de type M1 ou M2. Il est reconnu que les macrophages ont un rôle important à jouer dans la pathogénèse de l'AR puisqu'ils sont majoritairement responsables de la production de TNF (34). Il faut également préciser qu'ils permettent la production de chimiokines, comme MIP-1 α et RANTES (« regulated on activation, normal T cell expressed and secreted »), des molécules impliquées dans le recrutement de monocytes. De plus, les macrophages seraient responsables d'un important relâchement de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1, -6 et -17, entraînant l'activation des cellules du milieu environnant, par exemple les fibroblastes et les ostéoclastes synoviaux. Enfin, les macrophages peuvent également se différencier en ostéoclastes (2). L'ensemble de ces découvertes permet d'apprécier l'important potentiel inflammatoire des macrophages et des monocytes.

1.2.2 Processus inflammatoire

La pathogénèse de l'AR est un phénomène complexe qui implique l'action combinée de plusieurs cellules différentes : lymphocytes B et T, macrophages, monocytes, neutrophiles, fibroblastes synoviaux, ostéoclastes, etc. Ces cellules ont toutes un rôle important à jouer dans l'initiation et l'amplification du processus inflammatoire articulaire des patients arthritiques. Dans la présente sous-section, nous aborderons les différentes raisons pour lesquelles ces cellules sont suggérées d'être impliquées dans la pathogénèse de la maladie.

Les neutrophiles représentent la première ligne de défense de l'hôte puisqu'ils sont les premiers recrutés à la suite d'une infection. Ces cellules permettent alors d'initier la réponse immunitaire contre l'agent pathogène détecté (47). Les neutrophiles sont les principaux composants de la vague de recrutement cellulaire aux articulations des patients souffrant d'AR. En effet, ils représentent environ 90% des cellules présentes dans le liquide synovial des patients arthritiques. Ainsi, leur implication dans l'initiation et la progression de l'AR est étudiée depuis plusieurs années. De nombreuses études ont permis de suggérer l'implication de ces cellules dans la pathogénèse de la maladie. Dans un premier temps, les neutrophiles sont responsables de la production d'une grande quantité de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires incluant le TNF, l'IL-1 et l'IL-6, trois cytokines impliquées dans la pathogénèse de l'AR. De plus, grâce à cette production de cytokines et à la libération de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) ainsi que d'enzymes protéolytiques, les neutrophiles représentent des joueurs importants dans le processus de destruction osseuse (48). Il est donc probable et

fortement suggéré, et ce, depuis plusieurs années, que les neutrophiles aient un rôle à jouer dans le processus de destruction osseuse (2, 49).

Les monocytes ont également un rôle central à jouer dans le processus inflammatoire. Dans un premier temps, ces cellules ont la capacité de se différencier en macrophages, en cellules dendritiques et en ostéoclastes (32). Il a précédemment été démontré que la quantité de macrophages synoviaux est proportionnelle à la destruction articulaire caractérisant l'AR (50). Pour ce qui est des ostéoclastes, ces cellules sont responsables de la destruction osseuse. Une production trop importante d'ostéoclastes comparativement aux ostéoblastes entraîne un déséquilibre au niveau de la destruction et de la formation de nouvelle matrice osseuse (51-53). Cela démontre donc les monocytes sont cruciaux dans les processus d'inflammation et de destruction articulaire. Dans un second lieu, les monocytes de patients arthritiques ont la capacité de produire un vaste éventail de cytokines pro-inflammatoires (32). En effet, une étude précédemment réalisée a permis de démontrer des relâches spontanées d'IL-1 β , d'IL-6 et de TNF plus importantes lors de l'utilisation de monocytes sanguins provenant de patients arthritiques en comparaison aux donneurs sains (54). L'efficacité incontestée de la thérapie anti-TNF permet de conclure à l'importance des cellules responsables de sa production, en l'occurrence les monocytes et les macrophages (32, 33). Puisque ces populations cellulaires constituent entre 30 et 50% des cellules composant la membrane synoviale des patients arthritiques (55), il devient évident qu'une production excessive de cytokines pro-inflammatoires peut entraîner de lourdes conséquences. Cela nous permet également de conclure à l'importance de ces cellules au niveau du processus inflammatoire. Ces caractéristiques permettent de mieux comprendre l'engouement entourant l'étude des monocytes et des macrophages dans la pathogénèse de l'AR.

Les lymphocytes B jouent également un rôle important dans la progression de l'AR étant donné leur capacité à produire des anticorps spécifiques comme le facteur rhumatoïde (RF) et les anti-peptides citrullinés (ACPA). Ces deux types d'auto-anticorps sont des critères d'évaluation utilisés afin de confirmer ou d'infirmer un diagnostic clinique d'AR. En effet, ils représentent de bons indicateurs de la présence et de la sévérité de cette pathologie. D'ailleurs, plusieurs études ont démontré que la déplétion spécifique de ces lymphocytes entraîne une amélioration significative des symptômes. Une thérapie a donc été développée afin de cibler spécifiquement les lymphocytes B (Rituxan - Rituximab). Cette thérapie biologique est habituellement réservée aux patients souffrant d'une arthrite très agressive et qui ne répondent pas aux autres thérapies classiques. Il s'agit donc d'une alternative de traitement aux anti-TNF (2). Des études ont également démontré que les lymphocytes B sont fortement recrutés aux articulations des patients arthritiques ce qui permet d'expliquer le fait qu'ils soient présents en importante quantité au niveau du tissu synovial de ces patients (28, 56). Enfin, ces cellules pourraient agir à titre de cellules présentatrices d'antigène (APC) et ainsi alimenter le processus d'activation des cellules T et la production de cytokines et de chimiokines (56).

Les lymphocytes T ont aussi une implication importante dans la pathogénèse de l'AR, et ce, pour plusieurs raisons. Dans un premier temps, ces cellules ont la capacité de reconnaître des peptides présentés par les APC via une restriction du CMH. Ainsi, un chargement erroné des peptides du soi peut entraîner une réponse inappropriée dirigée contre ces molécules. Tel que mentionné précédemment, les gènes HLA codent pour les CMH et représentent les principaux facteurs de risques génétiques pour l'AR. Les processus entraînant la formation de cellules auto-réactives sont encore litigieux. Avant leur sortie du thymus, les lymphocytes T subissent une sélection positive et négative permettant de s'assurer de leur bonne fonctionnalité et éviter la génération de cellules T auto-réactives. Ainsi, les cellules T ne pouvant pas reconnaître le complexe CMH-peptide ou qui réagissent contre des peptides du soi sont éliminées par apoptose. En présence de maladies auto-immunes, une défaillance dans ces processus de sélection antigénique est fortement suspectée (2, 57). D'ailleurs plusieurs études ont démontré une forte corrélation entre ces allèles de susceptibilité et le risque relatif associé à l'AR. Cela démontre que les cellules T ont un rôle important à jouer dans la progression de la maladie (1, 2, 5, 7-9). La deuxième raison expliquant l'implication des cellules T dans la pathogénèse de l'AR est qu'une importante quantité de ces cellules sont recrutées aux articulations des patients arthritiques (2, 28, 57, 58). Il est également reconnu que ces cellules ont la capacité d'induire l'activation des ostéoclastes et ainsi d'augmenter la destruction osseuse et l'inflammation articulaire (59).

Deux autres types de cellules T ont également un rôle central à jouer dans la pathogénèse de la maladie, il s'agit des cellules T auxiliaires 17 (Th17) et T régulatrices (Treg). Il existe un équilibre au niveau de la proportion de ces deux types cellulaires (60, 61) et des problèmes sont engendrés lorsque ce dernier est rompu. Les Th17 sont les cellules responsables de la sécrétion d'IL-17. Elles ont également la capacité de sécréter d'autres cytokines telles que le TNF et l'IL-6 (61). L'IL-17 joue un rôle central dans la pathogénèse de l'AR puisqu'elle entraîne l'activation d'une panoplie de cellules, incluant les fibroblastes synoviaux, les neutrophiles, les monocytes, les macrophages et les ostéoclastes (60, 62). Par ailleurs, une étude a démontré que la concentration d'IL-17A au niveau du sérum et du liquide synovial de patients atteints d'AR corrèle avec la sévérité de la maladie (63). Cette cytokine serait également retrouvée au niveau du synovium de patients souffrant d'AR. De plus, l'IL-17A induit la synthèse d'IL-1 β , d'IL-6, d'IL-8 et de TNF (63). Ainsi, cette cytokine, de même que les cellules responsables de sa production, ont un rôle central à jouer dans l'initiation et la progression de l'AR. Le rôle des Treg est radicalement opposé à celui des Th17. En effet, leur fonction est de maintenir une homéostasie cellulaire par le contrôle de la prolifération des cellules T effectrices. Il a précédemment été démontré que l'IL-6 peut entraîner un déséquilibre au niveau des proportions de cellules Treg et Th17. En effet, cette cytokine permet de favoriser la prolifération de Th17 au détriment des Treg (60, 61).

1.2.3 La formation du pannus et la destruction articulaire

Les fibroblastes synoviaux sont des cellules très importantes dans l'initiation de l'inflammation articulaire puisqu'ils permettent d'initier le processus d'hyperplasie synoviale. La formation du pannus débute par la liaison des fibroblastes au cartilage. Pour y parvenir, ces cellules doivent d'abord être activées. Certaines études ont démontré que cette activation est subséquente à la reconnaissance de ligands spécifiques par leurs récepteurs de type Toll-like (TLRs). Elle permet ainsi d'augmenter l'expression de molécules d'adhésion qui vont entraîner la liaison de fibroblastes aux articulations et ainsi induire la production de cytokines et de molécules chimioattractantes. Ces chimiokines vont ensuite causer un important recrutement cellulaire aux articulations. Parmi les cellules recrutées dans la cavité synoviale se trouvent les neutrophiles, les monocytes, les macrophages ainsi que les lymphocytes B et T. Ils permettront, à leur tour, d'induire le recrutement d'autres cellules. Cette cascade d'événements mène directement à la production d'ostéoclastes et cause ainsi le processus d'invasion du cartilage et de l'articulation. D'ailleurs les fibroblastes synoviaux ont la capacité de produire des métalloprotéinases (MMPs). Ces dernières protéines sont fortement retrouvées au niveau des fibroblastes synoviaux de patients arthritiques et seraient impliquées dans le processus de destruction articulaire. Bref, les fibroblastes synoviaux ont un rôle important à jouer dans la pathogénèse de la maladie (64, 65).

L'homéostasie osseuse est maintenue grâce à un ratio équilibré d'ostéoclastes et d'ostéoblastes, deux types de cellules impliquées respectivement dans la résorption et la formation osseuse. Dans le cas d'une maladie dégénérative des articulations comme l'AR, ce ratio est déséquilibré par la formation d'une plus grande quantité d'ostéoclastes comparativement aux ostéoblastes. Ainsi, la résorption osseuse est supérieure à la formation de nouvelle matrice. Dans ce processus de résorption osseuse, les ostéoclastes doivent préalablement se différencier et s'activer à partir de leurs progéniteurs, soient les monocytes et les macrophages. Cette étape est médiée par la présence du M-CSF (« macrophage colony stimulating factor ») et de RANKL (« receptor activator of NF- κ B ligand »). La liaison entre les molécules RANKL et RANK (« receptor activator of NF- κ B »), exprimée sur les ostéoclastes, entraîne l'activation de la signalisation intracellulaire menant à la production d'ions hydrogène, de MMP-13 et de cathepsine K. Ces molécules sont produites au niveau des articulations par les ostéoclastes et sont impliquées dans la résorption osseuse. Certaines cytokines pro-inflammatoires se trouvant dans la cavité synoviale des patients arthritiques, par exemple le TNF, l'IL-6, -17 ou -1 β , ont la capacité d'induire l'augmentation de l'expression de RANKL. Cela permet ainsi de favoriser la différenciation et l'activation des ostéoclastes. La molécule RANKL est retrouvée majoritairement à la surface des ostéoblastes, mais également chez les fibroblastes synoviaux, les cellules stromales et les cellules T CD4⁺ recrutées aux articulations. D'autre part, le TNF a également la capacité de

se lier directement à la surface des ostéoclastes grâce au récepteur du TNF de type 1 (TNFR1) et ainsi permettre leur différenciation. Pour ce qui est de l'IL-17, cette cytokine permet d'induire la production de TNF et de l'IL-1 et agit ainsi indirectement sur l'activation des ostéoclastes. Il est donc évident que la cavité synoviale des patients arthritiques est riche en molécules menant à la différenciation et à l'activation des ostéoclastes. Ce milieu est donc propice au déséquilibre du ratio ostéoclastes/ostéoblastes, entraînant ainsi une destruction osseuse (2, 51-53).

Malgré les nombreuses avancées réalisées dans le domaine, les mécanismes exacts de la progression de l'AR ne sont pas clairement définis. Cependant, puisqu'il s'agit d'une maladie auto-immune, sa pathogénèse repose sur une reconnaissance inappropriée de molécules du soi par le système immunitaire. L'activation de cellules B en cellules plasmiques entraîne la production d'anticorps spécifiquement dirigés contre cette molécule du soi. Le complexe formé des molécules de l'hôte et des auto-anticorps est ensuite reconnu par les cellules se trouvant dans la cavité synoviale, par exemple les neutrophiles, les macrophages et les mastocytes. Cette reconnaissance entraîne une production massive de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines (66), permettant l'entrée subséquente d'autres cellules comme les leucocytes, les ostéoclastes et les fibroblastes synoviaux dans la cavité synoviale. La combinaison de cet important afflux cellulaire, de la progression des synoviocytes et de la présence d'une grande quantité de cytokines dans la cavité synoviale permettent alors la formation du pannus (hyperplasie du synovium). Enfin, l'invasion du cartilage et de l'os par le pannus entraîne une résorption et une destruction osseuse, deux caractéristiques propres à l'AR (28, 67). Il faut souligner que les dommages articulaires causés par cette réaction inflammatoire incontrôlée sont irréversibles.

Tel que mentionné précédemment, plusieurs cytokines seraient impliquées dans l'AR, comme par exemple l'IL-6, -15, -17 et -1 β , ainsi que le TNF (28). D'ailleurs, le TNF est considéré comme étant une molécule clé dans la progression de la maladie. Son implication a été démontrée grâce à l'utilisation de modèles murins d'arthrite. En effet, la production excessive et incontrôlée de cette cytokine entraîne une inflammation articulaire importante menant éventuellement à une destruction osseuse. L'effet néfaste du TNF est attribuable à sa capacité d'induire la formation d'ostéoclastes. De plus, le TNF entraîne le recrutement des progéniteurs des ostéoclastes de la moelle osseuse jusqu'aux articulations (33, 68, 69). Les résultats concluants obtenus au cours des études murines ont permis le développement d'une nouvelle thérapie biologique ciblant spécifiquement le TNF. Cette dernière est offerte aux patients arthritiques qui ne répondent pas adéquatement aux traitements classiques. Le taux d'échec de cette thérapie biologique est faible et d'environ 30%. Ce type de traitement a démontré son efficacité afin de prévenir les dommages articulaires, mais n'a aucune efficacité pour réparer ceux déjà existants. Il est d'ailleurs proposé dans la littérature que le traitement anti-TNF serait

plus efficace lorsqu'il est débuté en présence de dommages articulaires mineurs (33), soit à un stade précoce de la maladie.

1.3 Diagnostic clinique

Les critères diagnostiques de l'AR ont été revus en 2010 par la société américaine (ACR) et européenne (EULAR) de rhumatologie. Cette nouvelle grille d'évaluation fonctionne à l'aide d'un système numérique permettant d'attribuer des points en fonction de la présence de caractéristiques particulières. Le tableau 1-1 présente cette grille de façon détaillée. D'abord, elle est divisée en quatre grandes catégories : 1) le nombre et le type d'articulations inflammées, 2) les analyses sérologiques, 3) les marqueurs d'inflammation et 4) la durée des symptômes. Chacune de ces catégories est aussi divisée en sous-groupes. Par exemple, si une seule articulation est atteinte, aucun point n'est attribué alors que l'atteinte à plus de dix articulations permet d'attribuer cinq points. Cependant, le diagnostic de l'AR ne repose pas que sur une évaluation physique du patient. En effet, d'autres paramètres peuvent être utilisés afin d'infirmer ou de confirmer un diagnostic d'AR. Parmi ces mesures, on retrouve les analyses sériques qui permettent de déterminer les taux du facteur rhumatoïde (RF) et des anticorps anti-peptides citrullinés (ACPA) et ainsi, déterminer le stade d'avancement de la maladie. D'autre part, la protéine C-réactive (CRP) et la vitesse de sédimentation des érythrocytes (ESR) sont des facteurs liés à l'inflammation articulaire et permettent de déterminer la sévérité de cette dernière (70). Les sociétés en rhumatologie ont conclu que l'atteinte d'un pointage supérieur ou égal à six points dans cette grille d'évaluation confirme un diagnostic d'AR. Toutefois, un résultat inférieur à six ne permet pas d'exclure la possibilité que le patient soit atteint de la maladie. En effet, la présence d'érosions suspectes peut entraîner un diagnostic d'AR, et ce, indépendamment du résultat obtenu sur la grille d'évaluation.

Tableau 1- 1: Critères de classification de l'arthrite rhumatoïde

Catégories	Pointage
A) Articulations enflées	0-5
1 grosse articulation	0
2-10 grosses articulations	1
1-3 petites articulations	2
4-10 petites articulations	3
>10 articulations	5
B) Sérologie	0-3
RF <u>et</u> ACPA négatifs	0
RF <u>ou</u> ACPA faibles	2
RF <u>ou</u> ACPA élevés	3
C) Marqueurs d'inflammation	0-1
CRP et ESR normaux	0
CRP ou ESR anormaux	1
D) Durée des symptômes	0-1
<6 semaines	0
>6 semaines	1
Diagnostic (pointage catégories A-D)	
Arthrite rhumatoïde	≥ 6 points
Arthrite rhumatoïde si présence d'érosions ou si critères précédemment satisfaits	< 6 points

Adapté de (1, 70)

Grosses articulations : épaules, coudes, genoux, chevilles, hanches

Petites articulations : articulations métacarpo-phalangiennes, inter-phalangien proximal, 2^{ème} à 5^{ème} métatarso-phalangienne, inter-phalangien du pouce, poignets

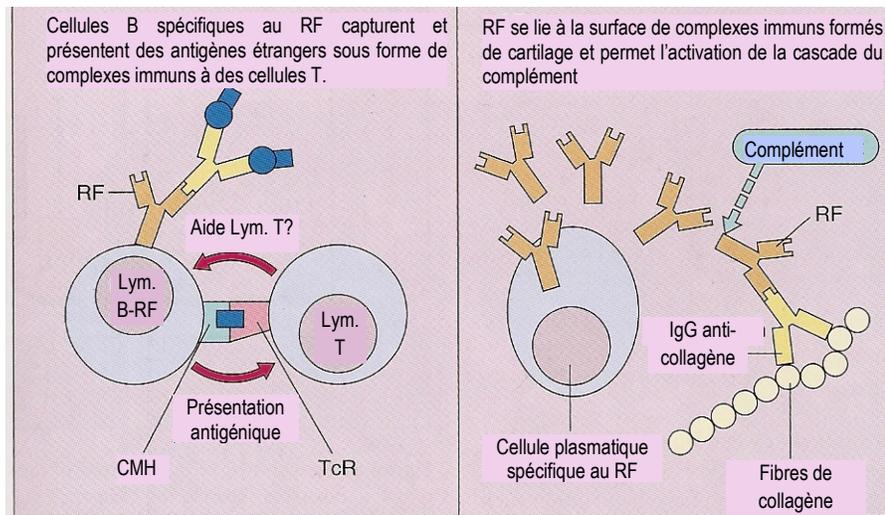
ACPA : anticorps anti-peptides citrullinés, CRP : protéine C-réactive, ESR : vitesse de sédimentation des érythrocytes, RF : facteur rhumatoïde

***Grille révisée en 2010 par la société américaine (ACR) et européenne (EULAR) en rhumatologie.*

1.3.1 Facteur rhumatoïde

Le facteur rhumatoïde (RF) est reconnu comme un critère de détection de l'AR et est retrouvé chez 60 à 80% des patients arthritiques. Il ne s'agit toutefois pas d'un marqueur spécifique aux maladies inflammatoires puisqu'il est aussi présent chez 10 à 15% des donneurs sains. Le RF est un anticorps reconnaissant le

fragment Fc des immunoglobulines de type G (IgG). Les IgG ont un rôle important à jouer dans la neutralisation de molécules étrangères en permettant, entre autres, l'activation de la cascade du complément. Tout d'abord, il y a formation d'un large complexe immun lorsqu'une liaison se crée entre une molécule étrangère, l'IgG et le RF. Ce complexe est ensuite reconnu par des cellules B possédant des récepteurs spécifiques au RF. La molécule étrangère, préalablement liée à l'IgG, est ensuite présentée par le CMH de classe II de la cellule B à un lymphocyte T et permet alors l'induction d'une réponse immunitaire dirigée contre ce peptide provenant du non-soi. Ce phénomène peut être observé autant chez des sujets sains que chez des patients arthritiques. Cependant, chez les patients arthritiques, il est possible de retrouver des IgG réagissant contre des molécules du soi (2). La littérature met d'ailleurs en évidence l'implication des complexes immuns dans la pathogénèse de l'AR. En effet, ces derniers sont présents de façon importante au niveau du sérum et des articulations des patients arthritiques (71, 72). À la suite de la formation du complexe immun, deux types de réponses sont possibles (figure 1-2). D'une part, le complexe IgG – antigène – RF peut être reconnu par une cellule B et entraîner une réponse immunitaire. D'autre part, ce même complexe peut activer la cascade du complément et ainsi causer une forte réponse inflammatoire dirigée contre l'antigène du soi (2).



Adapté de (2) (numéro de licence 3185361212850)

Figure 1- 2: Implication du facteur rhumatoïde dans la pathogénèse de maladies articulaires.

Illustration de la formation d'un complexe immun entre le facteur rhumatoïde (RF), les IgG et des molécules du soi ou du non-soi. La portion de gauche illustre l'action des lymphocytes B spécifiques au RF (Lym. B-RF) qui sont ensuite reconnus par des cellules T (Lym. T) entraînant une réponse immunitaire. L'illustration de droite illustre plutôt l'activation de la cascade du complément lors de la liaison du RF au complexe immun.

Il existe trois types de facteur rhumatoïde : RF-IgA, -IgG et -IgM. Chacun d'entre eux possède une sensibilité et une spécificité variable par rapport à l'AR. En effet, les RF-IgM seraient peu spécifiques puisqu'une grande proportion de donneurs sains obtient une sérologie positive pour ce paramètre (entre 10 à 15%). De plus, les RF-IgM peuvent être détectés chez des patients souffrant d'autres maladies auto-immunes comme le syndrome de Sjögren. Les RF-IgA, quant à eux, sont beaucoup plus spécifiques que les RF-IgM, et ce, même s'ils sont détectés en moins grande quantité chez les patients arthritiques (2). Des études ont d'ailleurs démontré qu'une forte présence des RF-IgA et -M serait un indicateur important de la gravité de la maladie (73). La détection de ces facteurs au stade précoce de l'AR pourrait permettre un diagnostic plus rapide de la pathologie (74, 75). Ainsi, un traitement pourrait être initié plus rapidement afin de prévenir les dommages articulaires. Puisque la thérapie biologique anti-TNF est plus efficace dans les stades précoces de la maladie (33), c'est-à-dire lorsque les dommages articulaires sont peu importants, les RF pourraient permettre aux cliniciens d'améliorer l'évaluation et la prise en charge initiale des patients. Toutefois, on doit prendre en considération que l'obtention de résultats non-concluants à ce test est très probable puisque le RF est détectable chez seulement 60 à 80% des patients arthritiques. On ne peut donc pas prendre le résultat de la concentration sérique du RF de façon individuelle pour établir un diagnostic d'AR (2). Des analyses complémentaires doivent être effectuées afin d'y parvenir.

1.3.2 Anticorps anti-peptides citrullinés

L'anticorps anti-peptide citrulliné (ACPA) est un autre marqueur couramment utilisé afin de détecter l'AR. Dans le cas d'une AR clairement diagnostiquée, l'ACPA a une sensibilité approximative de 75%. Comparativement au RF, l'ACPA présente une très grande spécificité pour l'arthrite rhumatoïde (>95%). Ces anticorps reconnaissent des régions protéiques citrullinées. La citrulline est obtenue à la suite d'une modification post-traductionnelle de l'arginine par l'action de l'enzyme peptidyle arginine déiminase (PAD) (2, 76). Ce processus est appelé citrullination ou déimination. Certaines molécules du soi possèdent des résidus citrullinés, pensons notamment à la filaggrine, une protéine retrouvée au niveau des cellules épithéliales. C'est la déphosphorylation et le clivage du précurseur de la filaggrine qui entraîne sa déimination (77, 78). Il a également été démontré que la citrullination peut se produire lors de l'apoptose et au cours du processus inflammatoire. Ainsi, comme l'enzyme PAD est exprimé au niveau des monocytes, des macrophages et des neutrophiles, le recrutement de ces cellules aux articulations permettrait d'induire le processus de déimination (77).

Chez les patients arthritiques, le ligand des ACPA serait localisé au niveau du tissu synovial. Cependant, puisque la filaggrine n'est pas exprimée au niveau des articulations, il ne peut donc pas s'agir de la cible de ces anticorps (77). Certaines études ont démontré que la fibrine serait un ligand de ces anticorps. Cette

protéine migrerait jusqu'aux articulations à la suite de sa citrullination pour ensuite être ciblée par les ACPA (79). Cependant, il est important de préciser que la cible exacte des ACPA est un sujet litigieux. Néanmoins, il est reconnu que les ACPA, tout comme le RF, sont des marqueurs permettant de déterminer la gravité de l'AR (73). Ainsi, plus la maladie est importante, plus les taux sériques de ces anticorps augmentent. Dans certains cas, ce paramètre peut permettre de confirmer un diagnostic clinique puisque les ACPA peuvent être décelés chez des patients « RF séronégatifs » (80). Enfin, certaines études ont démontré que les taux d'ACPA sont augmentés chez les patients porteurs d'allèles de susceptibilité pour l'AR, dont le HLA-DRB1*0404 (81).

1.3.3 Protéine C-réactive et vitesse de sédimentation des érythrocytes

La protéine C-réactive (CRP) et la vitesse de sédimentation des érythrocytes (ESR) sont des marqueurs de sévérité de l'inflammation. D'abord, la CRP est produite en réponse à un relâchement important de cytokines (par exemple l'IL-6) causé par un dommage tissulaire quelconque. Ainsi, plus l'inflammation est importante, plus la CRP sera élevée. L'ESR, quant à lui, il permet d'évaluer la vitesse à laquelle les érythrocytes sédimentent. Ce résultat est influencé par le niveau d'inflammation puisqu'il est modulé par la quantité de fibrinogène présente dans le sang. En effet, une réponse inflammatoire cause une hausse du fibrinogène et, par le fait même, de la vitesse de sédimentation (82). Plus l'inflammation est importante, plus l'ESR sera élevé. Ce paramètre permet donc de faire une évaluation de l'efficacité du traitement administré à un patient arthritique. En effet, une médication efficace aura un impact positif à la fois sur l'inflammation articulaire et sur l'ESR (83).

2. Le virus Epstein-Barr et l'arthrite rhumatoïde

2.1 Caractéristiques du virus Epstein-Barr

Le virus Epstein-Barr (EBV) ou herpèsvirus humain-4 (HHV-4), est un pathogène faisant partie de la famille des *Herpesviridae* et de la sous-famille des *Gammaherpesvirinae*. Ce virus est responsable de la mononucléose infectieuse (IM) et est également associé au carcinome nasopharyngé non différencié (84) ainsi qu'au lymphome de Burkitt. D'ailleurs, le virus EBV a initialement été isolé par les Dr Antony Epstein et Dre Yvonne Barr à partir de la lignée de cellules tumorales du lymphome de Burkitt (85). Le virus Epstein-Barr serait également relié à certaines tumeurs malignes à cellules B observées chez des personnes atteintes d'une immunodéficience innée ou acquise, comme le désordre lymphoprolifératif post-transplantation (86, 87). Ce pathogène est aussi impliqué dans environ 40% des cas de lymphome de Hodgkin classique (86, 88) et dans plusieurs autres affections malignes (86). À l'état naturel, on retrouve deux types de virus Epstein-Barr :

EBV-1 et -2. La différence entre ces deux types de pathogènes se situe au niveau de certaines régions de gènes exprimés durant le cycle de latence (89). De plus, il semblerait qu'EBV-2 est moins efficace pour induire l'immortalisation d'une lignée de cellules B. Le virus Epstein-Barr de type 2 est retrouvé presque exclusivement en Afrique et en Nouvelle Guinée, tandis qu'EBV-1 est présent de façon similaire dans différentes régions du monde (89, 90).

Le génome d'EBV est formé d'ADN double brin linéaire comportant environ 172 kilo paires de bases (kpb), codant pour au moins 86 gènes (91) et environ une centaine de protéines (92). Lors de l'infection d'une cellule hôte, le génome viral entre dans le noyau cellulaire où il sera circularisé afin de former un épisome (93). L'ADN de ce virus est enveloppé d'une capsidie icosaédrique, elle-même entourée d'une enveloppe où se trouvent plusieurs glycoprotéines. Enfin, une structure protéique nommée tégument permet de lier l'enveloppe à la capsidie virale (94, 95).

Le cycle de vie de ce pathogène se divise en deux phases : répllicative et latente. La capacité d'EBV à entrer en cycle de latence est une caractéristique commune aux *Herpesviridae* et permet d'expliquer la forte prévalence de ce virus dans la population adulte mondiale, soit plus de 90% (96).

2.2 Tropicisme cellulaire

Le tropisme cellulaire d'EBV est très diversifié. Toutefois, la cible principale de ce pathogène est le lymphocyte B. Lors d'une primo-infection, EBV infecte d'abord les cellules épithéliales ou les lymphocytes B du pharynx en se liant à ces cellules grâce à ses glycoprotéines. Une action combinée de deux liaisons entre les cellules de l'hôte et le pathogène permettent alors son entrée dans la cellule. Lors de l'infection d'une cellule B, les glycoprotéines virales gp350 et gp42 se lient respectivement au CD21 (récepteur de la molécule du complément C3d) et au HLA de classe II, deux molécules exprimées à la surface du lymphocyte. La fusion du virus à la cellule est ainsi rendue possible et permet l'entrée d'EBV par endocytose (92, 95). La capsidie virale est ensuite relâchée dans le cytosol puis dégradée. L'ADN d'EBV est alors relargué dans le milieu cytosolique et transporté jusqu'au noyau cellulaire. Le génome viral sera ensuite pris en charge par le système de réplication de la cellule. Un phénomène similaire se produit lors de l'infection des cellules épithéliales. Toutefois, ces dernières n'expriment pas de CD21 à leur surface et le virus doit alors utiliser d'autres glycoprotéines afin de permettre sa liaison à la cellule de l'hôte. Afin de permettre l'infection des cellules épithéliales, les protéines virales BMRF-2 et gH/gL se lient respectivement aux intégrines cellulaires $\beta 1$ et $\alpha \beta 6/8$ (95).

À la suite de son entrée dans le noyau cellulaire, l'ADN viral peut procéder à sa réplication en produisant, dans un premier temps, les gènes précoces immédiats (« immediate early » ou IE) – soit BZLF1 (Zta, ZEBRA) et BRLF1 (Rta). Ces derniers sont nécessaires au processus réplcatif puisqu'ils vont permettre la production de gènes précoces (« early » ou E) et tardifs (« late » ou L) codant respectivement pour des facteurs de réplication et des protéines structurelles (93, 95).

En plus des lymphocytes B et des cellules épithéliales, des études ont permis de démontrer qu'EBV peut infecter plusieurs autres types de cellules. Dans un premier temps, il a été observé que ce pathogène peut infecter les neutrophiles *in vitro* et causer leur entrée en apoptose (97). La détection du génome viral dans le noyau des neutrophiles démontre la capacité du virus à les infecter. Les neutrophiles peuvent phagocyter des organismes étrangers et représentent la première ligne de défense du système immunitaire contre un élément étranger. Les neutrophiles ont donc un rôle très important à jouer dans la défense innée par leur capacité à produire les molécules nécessaires à l'éradication d'une infection. La capacité d'EBV à infecter et à induire l'entrée subséquente en apoptose de ces cellules représente donc une stratégie efficace pour contrer les défenses de l'hôte. De ce fait, il a été possible d'observer la présence d'EBV au niveau du noyau de neutrophiles (97). Afin de confirmer que ce pathogène a la capacité d'infecter les neutrophiles, un inhibiteur de phagocytose a été utilisé. Les résultats obtenus permettent de confirmer qu'EBV peut infecter ces cellules et que la présence de ce pathogène au niveau du noyau cellulaire n'est pas simplement induit à la suite de sa phagocytose par les neutrophiles. D'autre part, il faut souligner que le génome viral a aussi été détecté au niveau de l'ADN de neutrophiles *in vivo*. En effet, l'ADN d'EBV a été détecté dans les neutrophiles de patients souffrant de mononucléose infectieuse mais pas chez ceux de donneurs sains. Cela démontre qu'EBV a la capacité d'infecter les neutrophiles *in vitro* et *in vivo* (97). Ensuite, des recherches ont démontré qu'EBV peut aussi infecter les monocytes puisque le génome d'EBV a été détecté au niveau du noyau cellulaire. Cette infection causerait une diminution importante de la capacité de phagocytose des monocytes (98). En plus d'interférer avec la présentation du pathogène au système immunitaire, il a été suggéré que cette caractéristique démontre l'importance de la différenciation des monocytes dans la propagation de l'infection virale (99). Il a également été démontré que l'infection par EBV entraîne l'apoptose des précurseurs monocytaires des cellules dendritiques. Une fois de plus, cette stratégie permettrait à EBV d'échapper aux défenses de l'hôte (100). De plus, il est intéressant de noter que le virus Epstein-Barr a la capacité d'inhiber la production de TNF. Ainsi, cela démontre, dans un premier temps, l'aptitude d'EBV à interagir avec les monocytes et les macrophages mais également d'interférer avec la production de certaines molécules antivirales (101). Enfin, les macrophages seraient également ciblés par ce virus puisque des gènes viraux associés aux cycles réplcatif et latent ont pu y être observés. Ces observations nous permettent de croire qu'EBV peut établir sa latence auprès des cellules B et des macrophages (102). De plus, on retrouve aussi la présence de protéines virales associées aux cycles réplcatif et latent au niveau des fibroblastes synoviaux de

patients arthritiques, démontrant ainsi la capacité d'EBV à infecter cette population cellulaire (103). Enfin, il faut mentionner que les cellules dendritiques folliculaires (104), les cellules endothéliales (105), les cellules NK (106), les thymocytes (107) et les lymphocytes T (108) pourraient également être permissifs à l'infection par ce pathogène.

Il est possible pour EBV de sortir de latence et ainsi retourner en cycle réplcatif afin de permettre sa prolifération. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène, mais le sujet demeure controversé. Cependant, on suppose que la sortie de latence du pathogène serait causée par la réponse de cellules B porteuses du virus EBV à une infection (95). D'autres études ont démontré qu'un stress important ou un système immunitaire compromis peuvent entraîner une réactivation virale (109). Ce pathogène est d'ailleurs associé avec la majorité des désordres lymphoprolifératifs post-transplantation (PTLD), une complication rencontrée chez 1 à 10% des patients transplantés. Ce type de désordre serait causé à la suite de l'administration de médicaments anti-rejet menant à une prolifération incontrôlée de cellules B infectées par EBV (95, 110). Le caractère latent d'EBV permet d'expliquer sa forte prévalence dans la population adulte mondiale. D'ailleurs, il faut mentionner que la personne porteuse de ce virus sous sa forme latente n'est pas contagieuse. Cependant, la réactivation sporadique de ce pathogène permet la transmission à un nouvel hôte, et ce, par des échanges de salive contaminée (95). EBV peut ainsi se répliquer, entrer en cycle de latence puis se réactiver afin de répéter ce même processus éternellement. Il augmente alors continuellement sa présence dans la population mondiale.

2.3 Évasion du système immunitaire

Depuis quelques décennies, il est suggéré que la réactivation de ce pathogène est impliquée dans plusieurs maladies auto-immunes : AR, sclérose en plaques, syndrome de Sjögren et SLE (24). Le caractère opportuniste de ce pathogène ainsi que sa capacité à échapper au système immunitaire nous permettent de mieux comprendre le nombre grandissant d'études portant sur la caractérisation d'EBV dans les maladies auto-immunes.

Afin de pouvoir subsister dans son hôte, le virus EBV a recourt à plusieurs stratégies d'évasion pour contrer le système immunitaire. Le tableau 1-2 décrit celles qui sont connues jusqu'à maintenant. Des études ont permis de démontrer qu'il existe trois grandes catégories de stratégies d'évasion. La première consiste à inhiber l'apoptose de la cellule grâce à deux protéines virales ayant des fonctions distinctes, BHRF1 et LMP-1. BHRF1 est une molécule agissant par mimétisme moléculaire et elle est un homologue fonctionnel de la protéine cellulaire bcl-2 (« B-cell lymphoma-2 ») (111). Cette homologie entraîne une reconnaissance erronée de la protéine virale par le système immunitaire. En effet, ce dernier confond la protéine BHRF1 avec une

molécule du soi et permet alors au virus de passer inaperçu. Comme la fonction de bcl-2 est de bloquer l'apoptose de la cellule, cela implique que la protéine virale peut imiter cette même propriété et peut ainsi empêcher les cellules infectées d'entrer en état de mort programmée. Pour sa part, LMP-1 possède également la capacité de modifier l'apoptose par une augmentation de la production de molécules responsables de l'inhibition de ce processus cellulaire, soit bcl-2, A20 et la survivin. Ainsi, tout comme BHRF1, LMP-1 agirait comme un inhibiteur du processus de mort cellulaire (112).

La seconde catégorie consiste à empêcher le chargement de peptides viraux sur les molécules du CMH. EBNA-1 (« Epstein-Barr nuclear antigen-1 ») est une protéine virale exprimée de façon constitutive par EBV, c'est-à-dire à la fois dans les cycles latent et réplicatif. Cette protéine permet d'empêcher sa propre dégradation par la machinerie cellulaire rendant ainsi le chargement de peptides viraux impossibles. Le CMH de classe I est alors incapable de présenter ces peptides viraux aux cellules T cytotoxiques et rend l'infection invisible aux yeux du système immunitaire (113). Les autres molécules virales possédant des caractéristiques similaires sont : BNLF2A, BILF1 et BGLF5. Ces dernières permettent de diminuer l'expression des CMH-I et II, ce qui entraîne une diminution de la reconnaissance par les lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ respectivement (114-116). Dans le cas de la molécule BNLF2A, il a récemment été démontré qu'elle interfère avec la protéine de transport des antigènes (TAP), ce qui lui permet d'éviter la présentation antigénique par le CMH de classe I (117).

Tableau 1- 2: Stratégies d'évasion d'EBV au système immunitaire

Molécule virale impliquée	Description du processus utilisé par le virus
BNLF2a, BILF1 et BGLF5	Diminuer la présentation des peptides par les CMH classe I et II présentés aux lymphocytes T CD4 ⁺ et CD8 ⁺
BCRF1	Mimétisme moléculaire (BCRF1 homologue à IL-10) Permet d'inhiber l'action de l'IFN γ
BARF1	Récepteur pour CSF-1 Permet d'inhiber l'action de l'IFN α
EBNA-1	Inhibe sa propre dégradation à des fins de présentation par le CMH-I aux lymphocytes T CD8 ⁺
BHRF1	Mimétisme moléculaire (BHRF1 homologue à bcl2) Inhibition de l'apoptose
LMP-1	Augmente l'expression de protéines inhibant l'apoptose (bcl-2, A20 et survivin)

Finalement, la dernière catégorie consiste à interférer avec la fonction de certaines cytokines impliquées dans le contrôle de l'infection virale (par exemple les interférons de types I et II). La protéine BCRF1 peut agir par mimétisme moléculaire et elle est une homologue de l'IL-10 à environ 70% (118). L'IL-10 est une cytokine anti-

inflammatoire ayant pour fonction d'inhiber l'action de cytokines pro-inflammatoires, incluant l'interféron (IFN)- γ . Les IFNs, quant à eux, ont un rôle important à jouer dans la défense antimicrobienne. Ainsi, la protéine virale BCRF1 peut être perçue comme l'IL-10 par le système immunitaire et ainsi inhiber la fonction de l'IFN- γ . Pour ce qui est de la protéine virale BARP1, elle agit à titre de récepteur soluble pour le CSF-1 (« colony-stimulating factor-1 » ou M-CSF) (119). Lorsque BARP-1 lie le CSF-1, cela l'empêche de remplir sa fonction. Le CSF-1 agit, entre autres, sur l'induction de la production massive d'IFN- α par les monocytes (120). Ces différentes liaisons vont alors toutes causer une diminution du processus inflammatoire et de l'immunité antivirale, et ainsi, permettre au virus de tromper le système immunitaire.

2.4 Liens entre le virus Epstein-Barr et l'arthrite rhumatoïde

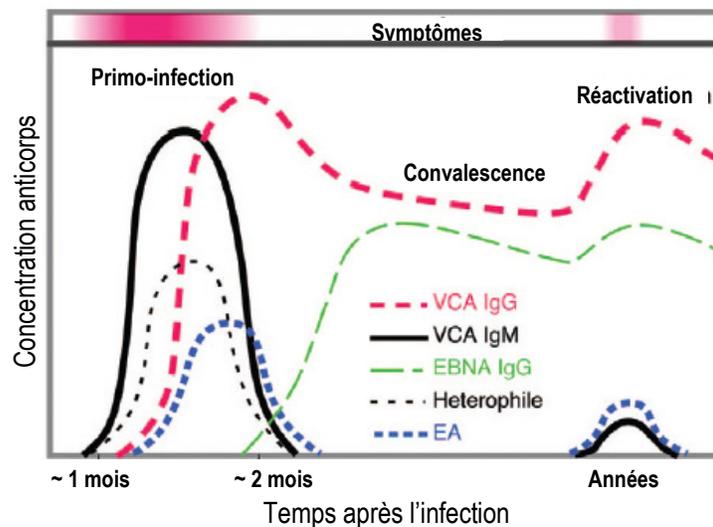
L'implication d'EBV dans la pathogénèse de l'AR est suspectée depuis quelques décennies. Il est important de souligner que le déclenchement de la maladie ne repose pas sur la seule présence du virus. Cependant, la présence de ce pathogène pourrait expliquer les crises inflammatoires transitoires qui affectent les patients arthritiques. En effet, il est possible d'observer des manifestations inflammatoires articulaires chez 30% des patients, et ce, sans l'identification d'une cause sous-jacente. D'ailleurs, on s'explique mal le fait que la médication cesse transitoirement de fonctionner alors qu'elle était efficace auparavant (19-21). Cette manifestation de la maladie finit par se résorber d'elle-même après un certain temps. La prise de médicaments efficaces pour traiter les symptômes de cette pathologie, comme le cyclophosphamide (Cytosan®) ou le méthotrexate, induit une immunodéficience transitoire (121). En effet, ces thérapies agissent en freinant l'inflammation, un phénomène naturel et essentiel du corps humain. Ce dysfonctionnement du système immunitaire pourrait alors permettre la réactivation d'un virus latent. Pour expliquer un phénomène aussi fréquent chez les patients arthritiques, le virus doit être ubiquitaire et avoir la capacité d'entrer en phase de latence, deux caractéristiques propres au virus EBV, mais également partagées avec d'autres pathogènes. Néanmoins, des recherches ont mis en évidence des liens unissant EBV et l'AR. On pense notamment à l'augmentation de la sérologie anti-EBV ou encore à la capacité de ce pathogène à mimer des molécules spécifiques à l'AR. De plus, chez les patients atteints d'AR, il a été possible d'observer la présence de cellules T auto-réactives réagissant à la fois contre des molécules du soi et des antigènes viraux. Finalement, il a été démontré que le pathogène a la capacité de citrulliner certaines de ses protéines.

Plusieurs études ont démontré une forte homologie entre les protéines du virus et celles de l'hôte. La glycoprotéine 110 (gp110) d'EBV est produite lors du cycle lytique et elle est nécessaire à l'assemblage de la particule virale. Elle représente l'antigène ciblé par le système immunitaire lors de la primo-infection (122). La gp110 posséderait une grande homologie de séquence avec le « shared epitope » exprimé au niveau de la chaîne DRB1 (123, 124). Cette séquence d'acides aminés, dont il a été question dans la section 1.1.1,

représente, rappelons-le, un facteur de risque génétique associé à l'AR. Il a été démontré que le système immunitaire des patients arthritiques répond de façon inappropriée à cette glycoprotéine (122). Parallèlement, il a été observé que la réponse T spécifique au gp110 est inversement proportionnelle à l'ESR et à la CRP (122). Ainsi, ce mimétisme moléculaire permettrait au virus de proliférer et de causer une inflammation incontrôlable en raison d'une confusion du système immunitaire qui reconnaît la protéine virale comme une molécule du soi. Cependant, d'autres études ont démontré le phénomène inverse, soit une forte reconnaissance de la gp110 et, par la même occasion, du « shared epitope », entraînant ainsi une véritable réaction contre le soi (124). L'homologie entre les molécules de l'hôte et les antigènes viraux entraîne la génération de cellules T auto-réactives menant à une reconnaissance erronée des peptides du soi. Lorsque cette reconnaissance a lieu au niveau des articulations, elle pourrait causer l'induction d'un processus inflammatoire local. Il est intéressant de noter qu'une forte présence de cellules T gp110-spécifiques a été observée au niveau du liquide synovial de patients arthritiques (125). Cette observation permet de suspecter qu'une réponse T dirigée contre le pathogène et contre les molécules du soi se produit dans les articulations de patients arthritiques. Cela entraînerait alors la production d'une vaste quantité de cytokines pro-inflammatoires. En ce qui concerne la protéine virale EBNA-6, elle pourrait également agir par mimétisme moléculaire. Elle serait homologue à l'allèle HLA-DQ*0302 (126). Enfin, la protéine virale EBNA-1, quant à elle, est composée de séquences répétées d'acides aminés (glycine-alanine) qui seraient similaires à des molécules du cytosquelette, incluant le collagène de type 2 (127, 128). Des anticorps ciblant cette séquence virale seraient alors produits et attaqueraient les cellules de la cavité synoviale plutôt que le virus lui-même. Dans le cas de personnes atteintes de maladies inflammatoires, ces réactions articulaires ciblées peuvent grandement aggraver les symptômes. Cette intensification de l'inflammation articulaire serait causée par une reconnaissance accrue des protéines viraux et des protéines de l'hôte qui sont homologues, entraînant ainsi une réponse contre des molécules du soi. Il pourrait également être causé par une réponse cellulaire inappropriée dirigée contre le virus. Cette dernière hypothèse permettrait au virus de se répliquer sans aucune contrainte. Ainsi, l'hôte serait constamment en contact avec ce pathogène ce qui favoriserait le maintien d'un état pro-inflammatoire et les symptômes lui étant associés.

D'autre part, il a été démontré que le peptide EBNA-1 peut subir une modification post-traductionnelle au niveau de la région riche en glycine/alanine et ainsi devenir citrulliné (23). Ainsi, ce peptide viral citrulliné devient une cible potentielle pour des anticorps nommés anti-VCP (« viral citrullinated peptides»). Cette production d'anticorps pourrait être parallèlement la cause d'une production massive d'anticorps anti-peptide citrulliné (ACPA) dirigés contre les molécules du soi citrullinées. On remarque que le dosage sérique des anti-VCP serait spécifique à l'AR. En effet, ces anticorps sont présents chez 45% des patients arthritiques contre seulement 5% des donneurs sains et des patients atteints d'autres maladies inflammatoires. On peut donc suspecter à nouveau l'implication du virus EBV dans la progression de la maladie (129, 130).

Dans les dernières années, de nombreuses recherches ont tenté d'établir un lien entre EBV et l'AR. Tout d'abord, il a été démontré que les concentrations sériques d'anticorps dirigés contre les antigènes précoces (EA), les antigènes nucléaires (EBNA) et les antigènes associés à la capsid virale (VCA) seraient beaucoup plus élevées chez les patients arthritiques (131, 132). Les anticorps dirigés contre ces antigènes sont produits à la suite de la primo-infection à EBV. Lors de la période de « convalescence », c'est-à-dire lorsque le virus a quitté la phase de réplication pour entrer en cycle de latence, certains anticorps ont presque disparus, tandis que d'autres sont toujours détectables. Cette dernière caractéristique permet de qualifier l'état « séropositif » de la personne atteinte (figure 1-3) (133). L'hypothèse d'une réactivation virale permettrait d'expliquer l'augmentation de la concentration sérique des anticorps anti-EBV chez les patients arthritiques par rapport aux donneurs sains.



Adapté de (133) (numéro de licence 3185050797977)

Figure 1- 3: Cinétique de production d'anticorps spécifiques à EBV.

La production d'anticorps dirigés contre EBV varie entre le moment de la primo-infection et de la période de convalescence. À la suite d'une primo-infection, des anticorps de types IgM-VCA, IgG-VCA, IgG-EA et hétérophiles sont produits. Les IgM-VCA et IgG-EA sont décelables uniquement durant la phase de primo-infection, tandis que la concentration des IgG-VCA diminuera dans le temps mais demeurera toujours détectable. Dans le cas des IgG-EBNA, ils sont détectables seulement durant la période de convalescence. Lors d'une réactivation virale, des hausses de la production des IgG-EA, -VCA et -EBNA peuvent être détectées.

Afin d'étudier la raison de cette hausse d'anticorps dirigés spécifiquement contre EBV, une équipe s'est intéressée plus précisément aux cellules B. Elle a permis de démontrer que le nombre de lymphocytes B infectés est beaucoup plus important chez les patients arthritiques que chez les donneurs sains. Elle a également observé que cette augmentation n'est pas seulement le résultat d'une hausse de la numération cellulaire, puisque la quantité de cellules B dénombrées est similaire dans les deux groupes. D'autre part, il faut mentionner que l'analyse de prélèvements provenant de patients souffrants de SLE a démontré une quantité de cellules B infectées similaire à celle des donneurs sains (134). Ainsi, la forte présence du virus ne serait pas une conséquence directe de l'inflammation et pourrait même nous permettre de croire au phénomène inverse, soit qu'une importante quantité de cellules B EBV positives puisse causer une augmentation de l'inflammation articulaire. Enfin, cette équipe de recherche a également pu observer une réponse T EBV-spécifique diminuée. Ce contrôle inapproprié de l'infection virale permettrait d'expliquer la forte présence du virus au niveau de la circulation sanguine ainsi que l'importante quantité de cellules B infectées (134). Par la suite, deux autres équipes ont spécifiquement observé une hausse de la quantité de génome viral dans les cellules du sang périphérique (135, 136). En effet, il a été démontré que les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMCs) de patients arthritiques étaient porteuses d'une plus grande quantité de génome viral que celles provenant de volontaires sains. De plus, ils ont observé la présence du génome d'EBV au niveau des cellules du liquide synovial. Toutefois, ce phénomène ne serait pas spécifique à l'AR puisqu'il a aussi été observé chez des patients souffrant d'autres maladies rhumatismales. Cependant, il faut souligner que la quantité d'échantillons provenant du groupe contrôle pour lesquels la présence du génome viral a été détectée est statistiquement inférieure à celle obtenue pour les patients arthritiques (135). Par la suite, ces observations ont pu être confirmées en effectuant une réaction en chaîne par polymérase en temps réel (qPCR) afin de quantifier la présence du génome d'EBV au niveau des PBMCs. Les pourcentages de patients arthritiques et de donneurs sains séropositifs étaient très similaires et avoisinaient les 90%. Ce résultat n'est pas surprenant puisqu'on sait que plus de 90% de la population adulte est porteuse du virus. Toutefois, cette équipe a observé une charge virale au niveau des PBMCs qui était environ dix fois plus élevée chez les patients arthritiques par rapport aux donneurs sains (137). Ainsi, le taux d'anticorps spécifiques à EBV, le nombre de cellules B infectées et la charge virale au niveau des PBMCs sont tous augmentés en comparaison avec les donneurs sains. Néanmoins, malgré toutes les informations intéressantes qu'apportent ces études, elles ne permettent pas d'identifier le type cellulaire infecté par EBV puisque les PBMCs ont été utilisés dans leur ensemble et n'ont pas été séparés en leurs diverses composantes, soient les lymphocytes B et T, les monocytes et les cellules NK.

De plus, certaines études ont permis de démontrer qu'il est possible de détecter la présence d'EBV dans les tissus synoviaux de patients arthritiques. En effet, la présence de protéines associées au cycle lytique a pu être observée dans les tissus synoviaux de patients arthritiques mais pas chez ceux souffrant d'ostéoartrite

(OA). Dans cette étude, ce dernier groupe agissait à titre de contrôle négatif puisque, dans l'arthrose, on retrouve plutôt une destruction progressive des articulations qui mène ensuite inévitablement à une importante inflammation articulaire. D'autre part, la présence de particules virales a aussi été observée dans les lymphocytes et les cellules synoviales de patients arthritiques. Cela permet de démontrer la présence d'une infection lytique active dans la cavité synoviale de ces patients (138). Enfin, Saal *et coll.* ont aussi obtenu des résultats similaires (22).

En résumé, les découvertes des dernières années ont permis de soupçonner EBV comme un facteur environnemental potentiellement impliqué dans la progression de l'AR (tableau 1-3). Cependant, à ce jour, rien ne nous permet de confirmer que ce pathogène soit impliqué dans cette pathologie. En effet, il n'a toujours pas été possible de déterminer la causalité directe liant ce pathogène à l'AR. Les résultats obtenus par les différentes équipes de recherche pourraient seulement être expliqués par la présence de la maladie ou par la médication administrée qui entraîneraient le dérèglement du système immunitaire. De plus, le manque d'uniformité entre les différents résultats de recherche rend difficile la formulation d'une conclusion claire sur le sujet.

Tableau 1- 3: Résumé des études concernant l'implication d'EBV comme facteur environnemental dans la progression de l'arthrite rhumatoïde

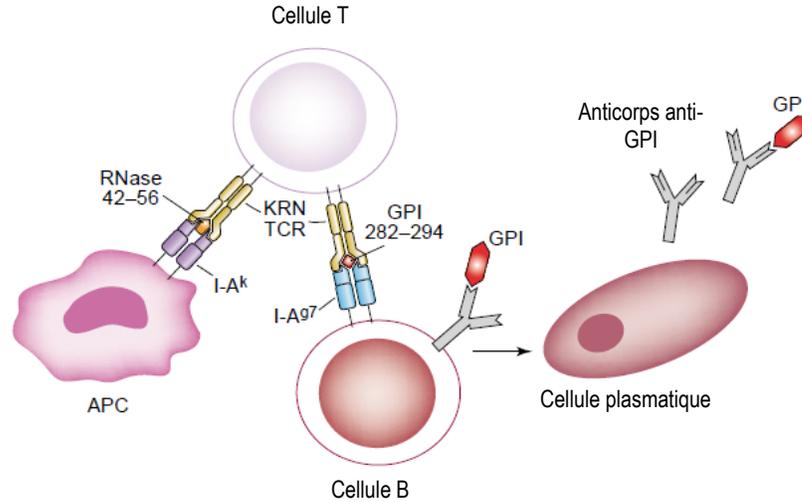
Relations entre le virus Epstein-Barr et l'arthrite rhumatoïde	Références
Caractère ubiquitaire et latence	(13, 23, 96, 139)
Stratégies d'évasion du système immunitaire	(111-120)
Mimétisme de protéines du soi associées à l'arthrite rhumatoïde	(122-124, 126-130)
Génération de cellules T auto-réactives	(124, 125)
Génération d'anticorps contre la protéine virale EBNA-1 citrullinée	(23, 129, 130)
Sérologie anti-EBV plus élevée chez les patients atteints d'AR	(131-133)
Génome viral retrouvé au niveau tissu synovial	(22, 138)
Nombre cellules B sanguines infectées et charge virale au niveau des PBMCs plus importants	(134-137)
Réponse cellulaire T EBV-spécifique diminuée	(114-116)

3. Modèle d'arthrite murin – transfert de sérum arthritique (K/BxN)

Au cours des dernières années, plusieurs modèles murins ont été développés afin d'étudier les différents mécanismes associés à l'AR. Parmi ces modèles, deux d'entre eux se démarquent particulièrement puisqu'ils sont les plus utilisés et les plus étudiés à ce jour. Il s'agit du modèle d'induction au collagène (CIA) et du

modèle de transfert de sérum arthritique provenant de souris transgéniques (K/BxN). Seul ce dernier modèle sera abordé pour les besoins du présent mémoire.

Le modèle de transfert de sérum arthritique (K/BxN) a été découvert en 1996 par l'équipe des Dr Benoist et Dr Mathis, de l'Université Harvard aux États-Unis. L'objectif initial était de mettre au point une lignée de souris munie d'un récepteur de cellules T (TCR) pouvant reconnaître un peptide provenant de la ribonucléase bovine pancréatique (RNase) présenté par un CMH de classe II (I-A^k). Ils ont ainsi créé une lignée de souris transgénique pour le TCR, nommée KRN. Cependant, puisque la sélection positive des cellules T reconnaissant la RNase n'était pas optimale, ils ont croisé les KRN avec des souris NOD (140-142). C'est à ce moment qu'ils se sont aperçus que la moitié des souris développait une inflammation articulaire spontanée. Ce modèle permet donc d'obtenir une arthrite similaire à celle observée chez l'homme puisque l'inflammation obtenue est symétrique et progressive. En fait, l'inflammation est causée par la production d'anticorps anti-glucose-6-phosphate isomérase (GPI), une enzyme impliquée dans la glycolyse et qui est présente en grande quantité chez la souris. La principale cause de cette réponse humorale repose sur la présence d'un CMH de classe II I-A^{g7} dont sont porteuses les souris NOD. C'est ce dernier type de CMH qui permet la présentation de la GPI. Sans ce sous-type particulier de CMH, il est impossible d'induire une réponse inflammatoire articulaire. D'ailleurs, les souris KRN ou NOD, prises de façon individuelle, ne présentent aucun signe inflammatoire. Pour y parvenir, les souris KRN doivent avoir été préalablement croisées avec des C57Bl/6 (K/B). Cette première génération est ensuite accouplée avec des souris NOD (K/BxN) afin de produire des souris présentant une forte inflammation articulaire. Ainsi, le TCR transgénique provenant des souris KRN a la capacité de reconnaître deux peptides différents, soit la RNase et le GPI, respectivement présentés à l'aide des CMH de classe II I-A^k et I-A^{g7}. Une cellule présentatrice d'antigène (APC) permet, dans un premier temps, de présenter la RNase par son CMH II I-A^k à une cellule T qui pourra ensuite se lier à un lymphocyte B. Cette cellule B est responsable de la présentation du GPI par son CMH II I-A^{g7} au lymphocyte T. Cette reconnaissance entraîne l'activation des lymphocytes B, leur différenciation en cellules plasmiques et la production d'anticorps anti-GPI spécifiques (140, 141, 143). La figure 1-4 permet de résumer les mécanismes responsables de la production d'anticorps dirigés contre le GPI.



Adapté de (143) (numéro de licence 3185051344571)

Figure 1- 4: Modèle K/BxN et la production d'anticorps anti-glucose-6-phosphate isomérase spécifiques.

Présentation de la ribonucléase pancréatique bovine (RNase 42-56) et du glucose-6-phosphate isomérase (GPI 282-294) respectivement par les CMH de classe II I-A^k et I-A^{g7} à une cellule T possédant un TCR transgénique. La présentation du GPI par le CMH II I-A^{g7} d'un lymphocyte B entraîne l'activation de cette dernière cellule, sa différenciation en cellule plasmatisque et la production d'anticorps anti-GPI spécifiques.

Puisque cette inflammation repose sur la production d'anticorps, il est possible de les isoler en récoltant le sérum des souris K/BxN. On peut alors induire l'arthrite dans d'autres lignées de souris, par exemple dans des C57Bl/6 sauvages, transgéniques ou déficientes. Ensuite, il est possible d'étudier les voies et les molécules nécessaires à l'induction de l'inflammation articulaire et ainsi déterminer le mécanisme de la progression de la maladie. L'injection de sérum arthritique à une souris hôte déclenche une cascade de réactions menant à une mobilisation cellulaire jusqu'aux articulations. Ces cellules, nouvellement recrutées, sont responsables de la sécrétion d'un large éventail de molécules chimioattractantes (chimiokines) et de la production de cytokines pro-inflammatoires, par exemple l'IL-6, le TNF et l'IL-1 (141, 144, 145). Cette production de chimiokines et de cytokines contribuera ensuite au recrutement d'autres cellules et à l'initiation du processus inflammatoire. De plus, les neutrophiles jouent un rôle important dans cette cascade de réactions puisqu'ils sont les instigateurs du processus inflammatoire articulaire. D'ailleurs, il a été démontré que la déplétion de ces cellules pendant une période de temps prolongée après une injection de sérum arthritique permet de freiner le processus

inflammatoire. Ces cellules sont donc nécessaires à l'induction et au maintien de l'inflammation articulaire (146).

Le choix de ce modèle pour l'étude de l'AR est approprié pour deux raisons. Dans un premier temps, l'inflammation induite s'apparente en plusieurs points à l'AR observée chez l'homme. En fait, l'inflammation articulaire observée chez les souris hôtes est progressive et symétrique. Cette inflammation est d'ailleurs transitoire et persiste pour une période de quinze à trente jours. Une analyse histologique des articulations permet également de constater une destruction osseuse ainsi que la formation de pannus (141, 147). Deuxièmement, ce modèle permet d'induire une inflammation articulaire à des souris C57Bl/6 sauvages, déficientes et transgéniques. Cette dernière caractéristique est importante et n'est malheureusement pas partagée avec tous les autres modèles murins d'arthrite disponibles de nos jours. Ainsi, dans le cas d'une étude portant sur la délétion ou la mutation de gènes spécifiques, il s'agit d'un modèle à privilégier.

4. Le virus MHV-68

4.1 Caractéristiques du virus MHV-68

Découvert à la fin des années 70, le gammaherpèsvirus-68 murin (γ HV-68), mieux connu sous l'acronyme MHV-68 ou MuHV4 (« murid herpesvirus 4 »), est un membre de la famille des *Herpesviridae* et de la sous-famille des *Gammaherpesvirinae*. Comme son nom l'indique, il s'agit d'un virus murin dont l'hôte naturel est le mulot et qui ne peut pas infecter l'homme (148, 149). Le génome de ce pathogène est composé d'ADN double brin linéaire formé de 118 kpb (codant pour environ 80 gènes) et de régions terminales répétées faisant environ 1 kpb (150, 151). Pour ce qui est de sa structure, elle s'apparente aux autres *Herpesviridae* et est donc identique à celle d'EBV (se référer à la section 2.1 pour plus d'informations) (94).

4.2 Tropisme cellulaire

Plusieurs voies d'administration peuvent être utilisées afin d'inoculer le virus MHV-68 aux souris. Le choix du type d'injection varie selon les expérimentations à effectuer. Par exemple, pour l'obtention d'une infection systémique affectant simultanément plusieurs organes lymphoïdes, la voie intraveineuse (i.v.) est un bon choix (152). Cependant, si on opte plutôt pour une infection pulmonaire, la voie intranasale (i.n.) est à privilégier. Lors d'une administration i.n. du virus, il se produit une infection des cellules épithéliales pulmonaires et des fibroblastes ce qui permet au virus de se répliquer (150, 153) et d'entraîner un recrutement important de cellules afin de contenir l'infection (152, 154). Le pathogène peut ensuite être transporté jusqu'à la rate où

l'infection latente peut alors débiter au niveau des lymphocytes B, des cellules dendritiques (DCs) et des macrophages (154-156). Avant l'entrée en latence, la présence des cellules B infectées dans la rate cause une splénomégalie, soit une inflammation de la rate due à un recrutement important de cellules T CD4⁺ et CD8⁺. En fait, il a été démontré que la déplétion des lymphocytes T auxiliaires (CD4⁺) permet d'éviter la splénomégalie (157). Des études réalisées chez des souris déficientes en lymphocytes B ou en T CD8⁺ ont permis de déterminer que les lymphocytes T cytotoxiques sont nécessaires au contrôle de l'infection, tandis que les cellules B permettent de contenir l'infection latente afin d'éviter la réactivation. De plus, ces études ont démontré que les lymphocytes B ne sont pas le seul réservoir viral (158).

La dose virale administrée et la lignée de souris utilisée pourrait avoir un impact sur la nécessité d'intervention d'un type cellulaire particulier pour le contrôle de l'infection. En effet, il a été démontré que l'infection de souris Balb/c déplétées en lymphocytes T CD8⁺ avec 600 PFU (« plaque-forming units ») de MHV-68 n'est pas létale, alors qu'elle l'est lors de l'utilisation de 10⁶ PFU. Cependant, une infection avec 10⁶ PFU de MHV-68 de souris C57Bl/6 déplétées pour la même population cellulaire ne cause aucune mortalité (159). À faible dose de virus, la déplétion des cellules T CD4⁺ ou des CD8⁺ n'entraîne pas la mort des souris. Par contre, la déplétion des deux populations de cellules T est létale (154, 159). Bref, la phase lytique du virus MHV-68 est un phénomène complexe qui varie en fonction de la voie d'administration choisie, de la dose administrée et du choix de lignée de souris.

Comme tous les autres *Herpesviridae*, ce pathogène a la capacité d'entrer en phase de latence. Cette caractéristique permet au virus de s'intégrer à l'ADN de la cellule hôte en circularisant son génome sous une forme épisomale. Le réservoir principal de MHV-68 est le lymphocyte B (160). Cependant, son tropisme cellulaire est variable en fonction de la voie d'administration, car les cellules porteuses du génome viral latent ne seront pas les mêmes. En effet, à la suite d'une infection i.n., il est possible que les cellules B, les macrophages et les cellules dendritiques (DCs) de la rate soient porteurs de ce pathogène (155). Une infection latente dans les cellules épithéliales pulmonaires est également possible avec la voie i.n. (156). En ce qui a trait à l'infection intrapéritonéale (i.p.), elle touche plutôt les cellules situées dans le péritoine, soit des macrophages provenant d'exsudats péritonéaux (PEM) (161).

4.3 Homologie entre les virus EBV et MHV-68

Les virus EBV et MHV-68 font partie de la même famille. Il existe donc plusieurs similitudes entre eux, tant sur le plan structurel que sur leurs caractéristiques liées au cycle de latence. Les deux pathogènes sont formés d'une capsidie icosaédrique enveloppant leur ADN double brin linéaire. Cette même capsidie est entourée du tégument et d'une enveloppe lipidique sur laquelle se trouve des glycoprotéines permettant d'infecter les

cellules d'intérêt (94). À titre de membre de la famille des *Herpesviridae*, ils ont tous les deux la capacité d'entrer en phase de latence, et ce, majoritairement au niveau des lymphocytes B (154). Comme EBV, MHV-68 possède un tropisme cellulaire varié et peut établir sa latence dans plusieurs autres types de cellules.

La caractéristique commune la plus importante de ces deux virus concerne leur homologie de séquence d'ADN. En effet, ils partagent environ 80% de leur génome et cette ressemblance se situe majoritairement au niveau des gènes responsables des cycles lytique et latent. Ainsi, les processus de réplication et de latence sont très similaires entre les deux pathogènes. On peut donc considérer le virus MHV-68 comme l'équivalent murin d'EBV (150, 151, 162). Dès lors, le virus MHV-68 représente une bonne alternative à EBV lorsqu'un modèle murin est retenu. En effet, EBV ne peut pas infecter les souris en raison de son tropisme très restreint (162).

Les deux virus peuvent également causer des symptômes similaires chez leurs hôtes respectifs. En effet, les souris infectées par voie intranasale avec MHV-68 développent une maladie semblable à la mononucléose infectieuse humaine. La primo-infection par ces deux pathogènes implique les cellules épithéliales puis les lymphocytes B et permet le transport du virus jusqu'aux organes lymphoïdes. Les cellules infectées atteignent ensuite la rate et entraînent le recrutement de plusieurs types cellulaires, dont les lymphocytes T. Cet important afflux cellulaire cause alors une splénomégalie, une manifestation clinique bien connue de la mononucléose infectieuse chez l'homme. L'entrée du virus en phase de latence peut alors débiter, entre autres, au niveau des lymphocytes B (163).

L'utilisation d'un modèle murin d'arthrite et de souris infectées par le virus MHV-68 est une façon simple d'étudier l'implication du virus EBV dans la progression de l'AR. Il y a quelques années, il a été démontré que l'infection de souris arthritiques (modèle K/BxN) avec le virus MHV-68 entraîne une augmentation significative de l'inflammation articulaire. Ensuite, cette même équipe a examiné l'effet de l'administration de cyclophosphamide (Cytoxan®) sur la réactivation virale. Pour y parvenir, des souris ont d'abord subi une infection à MHV-68 suivie d'une attente de quelques mois pour permettre au virus d'entrer en phase de latence. Cette équipe a alors pu démontrer que la prise de ce médicament cause une exacerbation des symptômes inflammatoires(121). Ainsi, il est probable que le virus se soit réactivé à la suite d'une défaillance du système immunitaire induite par l'administration de cet agent immunosuppresseur. Enfin, la présence du génome viral a pu être observée au niveau d'homogénats de chevilles de souris arthritiques infectées. Cela leur permet de conclure que ce dernier a probablement été transporté jusqu'aux articulations grâce aux cellules recrutées à la suite de la forte réponse inflammatoire induite par l'injection de sérum arthritique. Le virus se serait ensuite répliqué au niveau de la cavité synoviale et ainsi augmenter l'inflammation (121). Il est important de noter que leur étude n'a pas permis d'identifier le type cellulaire en cause. Actuellement, il est

impossible d'infirmer ou de confirmer ces hypothèses, mais elles permettent de croire à une implication probable du virus MHV-68 dans l'exacerbation des symptômes inflammatoires.

5. Les récepteurs de l'immunité innée

Les cellules de l'immunité innée expriment une grande variété de récepteurs permettant de reconnaître des organismes pathogènes. Ces récepteurs sont nommés PRRs (« pattern recognition receptors ») et reconnaissent des motifs moléculaires conservés chez les microorganismes (PAMPs). Ils ont également la possibilité de reconnaître des molécules du soi produites par des cellules malades ou en nécrose (DAMPs). Les PRRs sont divisés en quatre grandes familles de récepteurs : les CLR (« C-type lectin receptors »), les NLR (« NOD-like receptors »), les RLR (« (RIG)-I-like receptors ») et les TLR (« Toll-like receptors ») (164). Seuls les TLRs seront abordés ici puisque ces récepteurs sont pertinents à la compréhension du présent mémoire. Le tableau 1-4 porte d'ailleurs sur les différents ligands reconnus par les TLRs.

Tableau 1- 4: Les TLRs et leurs ligands

TLRs	Localisation cellulaire	Ligand	Origine du ligand
TLR1	Membrane plasmique	Lipoprotéine triacétyle	Bactéries
TLR2	Membrane plasmique	Lipoprotéine	Bactéries, virus, parasites, molécules soi
TLR3	Endolysosome	ARNdb	Virus
TLR4	Membrane plasmique	Lipopolysaccharide	Bactéries, virus, molécules soi
TLR5	Membrane plasmique	Flagelline	Bactéries
TLR6	Membrane plasmique	Lipoprotéine diacétyle	Bactéries, virus
TLR7 TLR8	Endosome	ARNsb	Virus, bactéries, molécules soi
TLR9	Endosome	Motifs CpG sur ADN	Virus, bactéries, protozoaires, molécules soi
TLR10 (1)	Inconnu	Inconnu	Inconnu
TLR11 (2)	Membrane plasmique	Profiline	Protozoaires
TLR12 (2)	Inconnu	Inconnu	Inconnu
TLR13 (2)	Inconnu	Inconnu	Inconnu

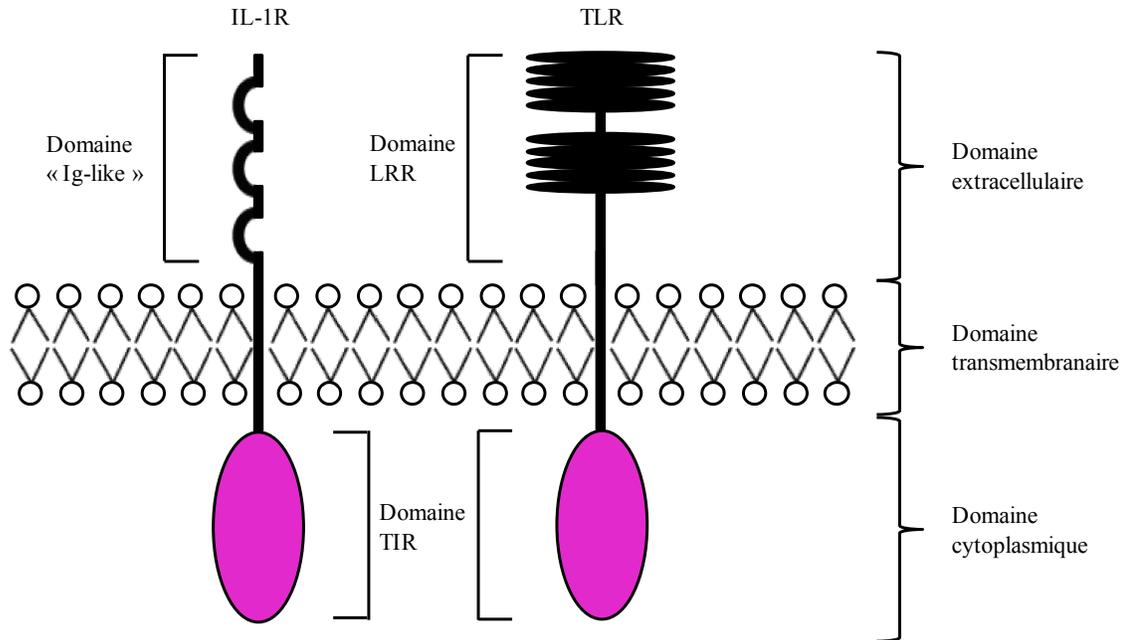
1 : Détecté chez l'homme.

2 : Détecté chez la souris.

Adapté de (164)

Les TLRs sont les récepteurs de l'immunité innée les mieux caractérisés. Ces derniers sont exprimés à la surface de plusieurs types cellulaires. Toutefois, on les retrouve majoritairement chez les monocytes, les macrophages et les DCs (165). Les recherches effectuées sur le sujet ont permis de démontrer l'existence de dix récepteurs chez l'homme et de douze chez la souris (164). Certains d'entre eux sont extracellulaires (TLR1, -2, -4, -5, 6 et -11), c'est-à-dire qu'ils sont exprimés à la surface de la cellule, tandis que d'autres (TLR3, -7, -8, et -9) sont de type endosomal, c'est-à-dire qu'ils sont exprimés à l'intérieur des endosomes. Il est important de préciser que certaines études menées sur le TLR8 murin ont permis de conclure que ce dernier était non fonctionnel (164). Cependant, des recherches plus récentes ont démontré que le TLR8 est bien exprimé chez la souris et qu'il permettrait de contrôler l'expression du TLR7 (166). Quant au TLR10, il est inactif chez la souris. Il est important de noter que la localisation cellulaire du TLR10 humain semble litigieuse. En effet, certaines recherches mentionnent qu'il serait exprimé à l'intérieur des endosomes. Cependant, d'autres équipes de recherche mentionnent plutôt qu'il s'agit d'un récepteur de surface qui pourrait former un hétérodimère avec le TLR2 (164, 167). Finalement, les TLR11, 12 et 13 seraient des récepteurs non fonctionnels chez l'homme (168).

Les TLRs sont constitués de trois domaines : 1) extracellulaire, 2) transmembranaire et 3) cytoplasmique (figure 1-5). La portion cytoplasmique est composée d'environ 200 acides aminés. Elle est formée de trois boîtes de composition conservée (20-30%) entre les différents récepteurs qui permettent la signalisation vers l'intérieur de la cellule. Cette région est nommée plus communément domaine TIR (domaine d'homologie TLR/IL-1R) puisqu'il existe une forte ressemblance entre les TLRs et le récepteur de l'IL-1 (IL-1R) (169). Toutefois, cette similitude ne concerne que cette seule région puisque leur domaine extracellulaire est, quant à lui, très différent. En effet, le domaine extracellulaire de l'IL-1R est composé de trois domaines ressemblant à des immunoglobulines (Ig) tandis que celui des TLRs est majoritairement constitué de motifs riches en leucine répétés de dix-neuf à vingt-cinq fois (LRRs) (169).



Adapté de (169)

Figure 1- 5: La superfamille des TLRs et du récepteur de l'interleukin-1.

Structure des récepteurs formant la superfamille des TLR/IL-1R. Ces derniers sont composés de trois domaines : extracellulaire, transmembranaire et cytoplasmique. Les TLRs et les IL-1R présentent une importante homologie au niveau de leur portion cytoplasmique (domaine TIR).

Il existe deux voies de signalisation différentes par lesquelles les TLRs peuvent activer la transcription de gènes codant pour la synthèse de cytokines et chimiokines, soient les voies associées à MyD88 ou à TRIF.

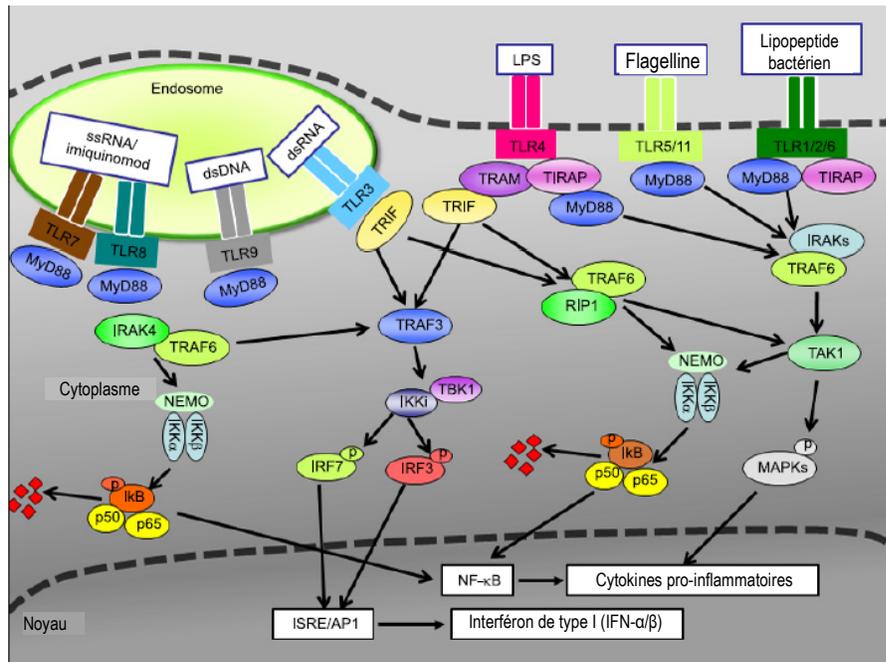
5.1 Les voies de signalisation des TLRs

MyD88 (« myeloid differentiation primary response gene-88 ») est une molécule adaptatrice nécessaire à la réponse de plusieurs TLRs à leurs ligands. Sa fonction est de recruter la kinase IRAK1 (« IL-1R associated kinases-1 ») au complexe formé entre un TLR, son ligand et MyD88. Tous les TLRs, à l'exception du TLR3, utilisent la voie de signalisation associée à MyD88 pour entraîner la production de cytokines pro-inflammatoires en réponse à leurs ligands. De son côté, le TLR3 utilise plutôt la voie associée à TRIF. Dans le cas de ce dernier récepteur, la molécule adaptatrice TRIF permet d'initier le processus de signalisation intracellulaire et ainsi induire la production d'IFN de type I (soit α et β). Pour ce qui est du TLR4, ce récepteur est le seul à avoir la capacité d'utiliser à la fois les voies de signalisation associées à MyD88 et à TRIF (164,

169). Les cascades de réactions menant à la signalisation intracellulaire à la suite de la liaison entre un TLR et son ligand sont illustrées à la figure 1-6.

En ce qui concerne les récepteurs utilisant la voie associée à MyD88, il y a activation de la voie des MAPKs (« mitogen activated protein kinases ») et du facteur de transcription NF- κ B (« nuclear factor- κ B »). Ce dernier pourra ensuite transloquer jusqu'au noyau cellulaire et ainsi permettre l'induction de la production de diverses molécules chimioattractantes (MCP-1, -2, -3 et -4, IL-8, RANTES, MIP-1 α et β , etc.) et de cytokines pro-inflammatoires (par exemple TNF, l'IL-1 ou l'IL-6) (164, 169-171). Les molécules chimioattractantes causent ainsi l'initiation d'un important recrutement de cellules, incluant les neutrophiles, les lymphocytes et les monocytes.

Dans le cas de la voie de signalisation associée à TRIF, elle permet l'activation des IRF3 et IRF7 (« interferon regulatory factor ») et leur translocation jusqu'au noyau cellulaire afin de permettre la production d'IFN de type I. Ces dernières cytokines sont très importantes pour la défense antivirale. Parallèlement, il y a une activation secondaire des MAPKs et du facteur de transcription NF- κ B qui entraînera la production de cytokines pro-inflammatoires incluant le TNF, l'IL-1 β , -6 et -12 (170, 172).



Tiré de (172)

Figure 1- 6: Signalisation intracellulaire des voies associées à MyD88 et à TRIF.

Molécules nécessaires au processus de signalisation intracellulaire suivant la reconnaissance par un TLR de son ligand. La voie associée à MyD88 permet la production de cytokines pro-inflammatoires à la suite de l'activation de NF- κ B et des MAPKs. Dans le cas de la voie de signalisation associée à TRIF, elle permet la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires mais également d'IFN de type I.

5.2 Les TLRs dans l'arthrite rhumatoïde

L'implication des TLRs dans l'initiation et la progression de l'AR a largement été étudiée au fil des ans. Les études ont pour objectif de mieux caractériser la maladie afin de comprendre l'implication de ces récepteurs dans le processus inflammatoire, et ainsi, permettre l'élaboration de nouvelles cibles thérapeutiques. À ce jour, la littérature reconnaît qu'à la suite de la reconnaissance de leurs ligands respectifs, les TLRs permettent la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines qui vont respectivement permettre l'induction du processus inflammatoire et du recrutement cellulaire. En ce qui concerne les macrophages et les DCs, on sait qu'ils expriment une grande variété de TLRs et qu'ils sont retrouvés en très grand nombre dans la cavité synoviale de patients arthritiques. Ces deux caractéristiques nous permettent donc de croire à l'implication de ces récepteurs dans le processus d'induction de l'inflammation articulaire. En effet, les chimiokines pourraient

permettre le recrutement de lymphocytes B et T jusqu'aux articulations, et ainsi, induire une réponse antigénique lors de la reconnaissance de peptides. Il est connu que des PAMPs sont présents au niveau de la membrane synoviale de patients arthritiques. Ainsi, les cellules se trouvant dans cette région et exprimant des TLRs ont la capacité de reconnaître ces motifs et ainsi causer la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines (173). L'origine exacte des PAMPs se trouvant dans la cavité synoviale est litigieuse. Cependant, on croit qu'ils proviennent de pathogènes ou de molécules du soi (31). La deuxième possibilité est, bien entendu, non souhaitable puisqu'elle consiste en une réponse inflammatoire dirigée spécifiquement contre l'hôte causée par la reconnaissance de peptides du soi (174).

5.2.1 Récepteurs extracellulaires

À la suite des différentes études réalisées dans le but de mieux caractériser l'implication des TLRs dans la progression de l'AR, deux récepteurs membranaires se distinguent des autres : les TLR2 et TLR4. Ces derniers sont largement suspectés d'être impliqués dans le processus inflammatoire entourant l'AR, et ce, depuis un grand nombre d'années. Les sous-sections suivantes permettront de mieux comprendre ces raisons par une énumération des différentes découvertes effectuées dans le domaine.

5.2.1.1 TLR2

Le TLR2 est un récepteur membranaire exprimé sur une grande diversité de cellules. Plusieurs études semblent démontrer un lien entre ce dernier et la progression de l'AR. D'ailleurs, de récents résultats d'études suggèrent que ce récepteur pourrait même avoir un effet protecteur. En effet, l'arthrite a été induite, à l'aide d'un modèle de transfert de sérum (K/BxN), chez des souris déficientes en TLR2 (TLR2^{-/-} ou TLR2 KO) et chez des souris sauvages (WT, « wild-type »). L'évaluation des stades d'inflammation a permis d'observer que l'inflammation articulaire est statistiquement plus élevée chez les souris KO par rapport aux souris WT (175). L'absence du TLR2 dans ce modèle murin est donc néfaste puisqu'elle cause une augmentation de l'inflammation. Ainsi, on suppose que la présence de ce récepteur permettrait de contrôler l'inflammation. Cependant, des études antérieures ont plutôt démontré que l'administration de ligands spécifiques au TLR2 pouvait augmenter l'inflammation articulaire dans un modèle de transfert de sérum (176). Ces résultats discordants démontrent que le TLR2 peut avoir à la fois un effet anti- et pro-inflammatoire et que son implication dans le processus est un phénomène complexe.

D'autres études ont permis de démontrer que le TLR2 est spécifiquement augmenté dans les tissus synoviaux de patients AR comparativement aux patients OA. Ce récepteur n'étant pratiquement pas détectable au niveau de la membrane synoviale de donneurs sains, cela nous permet de croire que le TLR2 a un rôle à jouer

dans la pathogénèse de l'AR (177). De plus, il a été démontré que le taux d'expression de ce récepteur est régulé en fonction de l'inflammation articulaire. En effet, des analyses ont permis de constater que l'expression du TLR2 est augmentée lors de l'utilisation de tissus moyennement inflammés en comparaison avec des tissus peu inflammés (177). De plus, une équipe avait préalablement observé que les fibroblastes synoviaux des patients arthritiques expriment une importante quantité de TLR2 à leur surface et que ce récepteur est fortement exprimé au niveau du site d'invasion du cartilage et de l'articulation (178). La hausse de l'expression de ce TLR au niveau des fibroblastes supporte l'hypothèse selon laquelle le TLR2 serait impliqué dans la pathogénèse de la maladie.

Il a également été démontré que les monocytes pro-inflammatoires (CD14⁺ CD16⁺) présentent une augmentation de l'expression du TLR2 comparativement aux monocytes classiques (CD14⁺ CD16⁻) (31). De plus, elle a observé que la proportion de la sous-population pro-inflammatoire est augmentée au niveau de la circulation sanguine de patients arthritiques. Ainsi, considérant que cette population cellulaire est plus nombreuse et qu'elle exprime une importante quantité de TLR2, il est possible de formuler deux hypothèses distinctes. Dans la première, on souligne que les monocytes pro-inflammatoires ont un rôle important à jouer dans la pathogénèse de l'AR. Cette théorie est supportée par la découverte d'un lien étroit entre la quantité relative de ces cellules et les marqueurs d'inflammation associés à l'AR. En effet, cette même équipe a démontré que le nombre de monocytes pro-inflammatoires est étroitement lié à l'inflammation articulaire puisqu'il est directement proportionnel au CRP et à l'ESR (31). De plus, ces monocytes causent une forte production de TNF et représentent les cellules progénitrices des macrophages, également reconnus pour leur forte production de TNF, une molécule importante dans la pathogénèse de l'AR. Bref, les monocytes et les macrophages sont considérés comme des cellules clés dans le processus inflammatoire. La seconde hypothèse souligne l'importance du récepteur TLR2 dans la reconnaissance de ligands spécifiques et dans l'initiation du processus inflammatoire chez les patients arthritiques. L'administration d'un antagoniste du TLR2 entraîne une diminution approximative de 50% de la sécrétion du TNF (31). Cette forte diminution laisse croire que des ligands présents au niveau de la cavité synoviale pourraient être reconnus par le TLR2 entraînant ainsi une forte production de TNF.

À la suite de ces découvertes, une équipe a démontré que l'expression du TLR2 est augmentée sur les macrophages synoviaux de patients arthritiques par rapport aux cellules de donneurs sains ayant été générées à partir de monocytes sanguins (174). Il faut toutefois préciser qu'il ne semble pas y avoir de différence significative entre le taux d'expression du TLR2 des patients atteints d'AR et d'OA. Dans cette étude, les cellules de patients arthritiques ont été isolées puis stimulées *in vitro*. Cette manipulation a permis de révéler que l'ajout d'un ligand spécifique au TLR2 cause une libération plus importante de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages de patients arthritiques par rapport aux cellules de patients souffrant

d'arthrose (174). D'autre part, il a été observé que les PBMCs de patients atteints d'AR présentent une plus forte expression du TLR2 par rapport aux donneurs sains (179). Une autre étude a permis de démontrer que le TLR2 plus fortement exprimé au niveau des fibroblastes synoviaux de patients AR par rapport aux patients OA ou aux donneurs sains (65).

L'origine exacte des ligands suspectés de jouer un rôle dans l'activation du TLR2 n'est pas encore identifiée à ce jour. Cependant, plusieurs études ont permis de mettre en évidence la présence de ligands spécifiques à ce récepteur au niveau de la cavité synoviale de patients arthritiques. Dans un premier temps, il a été démontré que la cavité synoviale des ces patients contient une grande quantité de la protéine Hsp60 (« heat shock protein-60 »), une molécule relâchée par les cellules en nécrose. Cette dernière aurait la capacité d'activer le TLR2 (31). Ensuite, la concentration de la gp96 (glycoprotéine de choc thermique de 96kDa) est directement proportionnelle à l'inflammation articulaire et à l'expression du TLR2 au niveau des macrophages synoviaux (180). Enfin, la protéine HMGB-1 (« high mobility group box chromosomal protein 1 ») serait fortement exprimée au niveau du liquide synovial (181) et serait produite par les monocytes et les macrophages en réponse à une stimulation au lipopolysaccharide (LPS). Une équipe de recherche a permis de démontrer que le HMGB-1 peut se lier, entre autres, au TLR2 et ainsi activer la cascade de signalisation intracellulaire menant à l'activation de NF- κ B et à la production subséquente de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (182). Ces résultats démontrent donc la capacité des TLRs à reconnaître des molécules du soi et ainsi contribuer au processus inflammatoire intimement lié à la pathogénèse de l'AR. En plus des ligands provenant du soi, des molécules étrangères peuvent également être reconnues par le TLR2. Il a été démontré que les monocytes peuvent spécifiquement reconnaître EBV grâce à leur TLR2 et entraîner la production de MCP-1, d'IL-8, de MIP-1 α et β (183). Considérant la forte présence de ce pathogène au niveau du tissu synovial de patients arthritiques, il pourrait servir de ligand au TLR2 et ainsi contribuer à l'exacerbation des symptômes inflammatoires.

5.2.1.2 TLR4

Le récepteur TLR4 revêt également une grande importance dans la pathogénèse de l'AR. Des études utilisant des modèles murins ont permis de démontrer l'implication du TLR4 dans le processus inflammatoire. Dans un premier temps, une étude utilisant le modèle de transfert de sérum arthritique (K/BxN) a déterminé que, chez des souris déficientes en TLR4, l'inflammation articulaire est diminuée (184). Ensuite, une autre équipe de recherche a permis d'observer une augmentation de l'inflammation articulaire lors de l'injection intrapéritonéale (i.p.) du ligand du TLR4 à des souris arthritiques (176). Ainsi, ces deux études nous permettent de croire au rôle inflammatoire du TLR4 dans le processus de la maladie. En effet, on remarque

que son absence permet une amélioration des symptômes, alors que l'administration de son ligand les aggrave.

Une étude a démontré que l'expression du TLR4 à la surface des monocytes classiques (CD14⁺ CD16⁻) et pro-inflammatoires (CD14⁺ CD16⁺) est augmentée chez les patients arthritiques par rapport aux donneurs sains (31). Une autre étude a démontré que le TLR4 est présent au niveau du tissu synovial d'une grande proportion de patients AR comparativement aux patients OA et aux donneurs sains. De plus, le niveau d'expression de ce récepteur serait régulé en fonction de l'intensité de l'inflammation articulaire (177). D'autre part, il a été déterminé que le TLR4 est fortement exprimé au niveau des fibroblastes synoviaux, ce qui nous permet de croire à l'implication de ce dernier récepteur dans la pathogénèse de l'AR. Ainsi, il est probable que la reconnaissance de ligands spécifiques par le TLR4 puisse causer une augmentation de l'expression de molécules d'adhésion des fibroblastes pour permettre leur liaison au cartilage et entraîner la production de cytokines et de chimiokines. La libération de ces molécules causerait ainsi un recrutement cellulaire et l'induction de la cascade inflammatoire (185) menant éventuellement à la formation de pannus. Dans un même ordre d'idées, il a été démontré que le TLR4 est exprimé plus fortement au niveau des fibroblastes synoviaux de patients atteints d'AR par rapport aux OA et aux donneurs sains (65). Enfin, une équipe a observé que l'expression du TLR4 est plus élevée à la surface des macrophages synoviaux provenant de patients arthritiques que de donneurs sains. Cependant, aucune différence au niveau des macrophages synoviaux n'a été démontrée entre les patients AR et OA (174).

Le TLR4 semble avoir un rôle important à jouer dans la pathogénèse de l'AR. Les ligands ou les mécanismes liés à ce récepteur ne sont toutefois pas encore clairement définis. Cependant, tout comme le TLR2, Hsp60 et HMGB-1 peuvent être reconnus par le TLR4 et ainsi causer la production de cytokines pro-inflammatoires (31, 182).

5.2.2 Récepteurs intracellulaires

En plus des récepteurs extracellulaires, des récepteurs intracellulaires sont largement suspectés d'avoir une implication dans la pathogénèse de l'AR. Les études effectuées dans le domaine ont permis de révéler que les TLR3, TLR7 et TLR9 représentent des cibles thérapeutiques intéressantes pour le contrôle de l'inflammation articulaire. Les sous-sections suivantes permettront de décrire les avancées des dernières années.

5.2.2.1 TLR3

Une étude a permis de démontrer que le TLR3, un récepteur intracellulaire, est exprimé de façon importante au niveau du tissu synovial des patients AR par rapport aux OA ou aux donneurs sains. Cette équipe a

également observé que la stimulation *in vitro* de DCs, avec un ligand spécifique au TLR3, entraîne une production importante d'IL-12. D'ailleurs, cette cytokine avait été étudiée auparavant en lien avec la régulation de l'expression des TLR2 et TLR4. Ainsi, ils ont émis l'hypothèse que le TLR3 pourrait, à la suite de la reconnaissance de son ligand, augmenter indirectement l'expression des TLR2 et TLR4 au niveau du synovium des patients arthritiques. Les TLR2 et TLR4 pourraient à leur tour se lier à leur ligand, entraîner la production de cytokines pro-inflammatoires et finalement causer une exacerbation de l'inflammation articulaire (186).

Par la suite, il a été observé que le TLR3 semble être le récepteur le plus exprimé au niveau des fibroblastes synoviaux. Cependant, une étude comparative portant sur les fibroblastes synoviaux de patients AR, OA et de donneurs sains n'a pas permis d'établir de différence significative entre ces trois groupes. On remarque aussi que la stimulation de ces cellules avec du poly(I :C), un ligand spécifique du TLR3, permet une forte production d'IL-6. De plus, cette équipe de recherche a également confirmé une observation précédente, soit une augmentation significative du TLR3 au niveau du tissu synovial de patients AR comparativement aux OA (185).

Le TLR3 a la capacité de reconnaître des ARN double brin. Ainsi, il serait possible qu'il y ait reconnaissance d'un virus dont le génome est composé d'ARN double brin au niveau de la cavité synoviale de patients atteints d'AR (186). De façon additionnelle à cette hypothèse, il a été démontré que certaines cellules peuvent libérer de l'ARN double brin lorsqu'elles sont en état de nécrose. Cette étude a d'ailleurs permis de démontrer que ces ARN ont la capacité de stimuler les fibroblastes synoviaux, et ce, spécifiquement par le TLR3 (187). Ce récepteur pourrait donc avoir un rôle à jouer dans la pathogénèse de cette maladie.

5.2.2.2 TLR7

Ce récepteur endosomal est fortement exprimé au niveau du tissu synovial de patients AR en comparaison aux patients OA et aux donneurs sains. Tout comme le TLR3, une stimulation *in vitro* de DCs avec le ligand du TLR7 entraîne une production importante d'IL-12. Ainsi, le TLR7 pourrait aussi avoir un rôle à jouer dans l'augmentation de l'expression des TLR2 et TLR4 (186).

Une équipe a récemment démontré que ce récepteur est spécifiquement augmenté dans les macrophages et les fibroblastes synoviaux de patients arthritiques comparativement aux donneurs sains. Cependant, ils ont remarqué que la stimulation du TLR7 avec un ligand spécifique au niveau des fibroblastes synoviaux n'entraîne pas la production de cytokines pro-inflammatoires. Ensuite, ils ont tenté d'augmenter l'expression du récepteur en stimulant ces mêmes cellules mais sans succès (188). Cependant, il faut souligner qu'une étude antérieure avait permis d'obtenir un résultat contradictoire puisque la stimulation de fibroblastes

synoviaux avait entraîné une augmentation de l'expression du TLR7 (189). Il a également été démontré que les monocytes des patients arthritiques expriment fortement le TLR7 par rapport aux donneurs sains. Cette étude a également permis d'établir une régression linéaire entre le niveau d'expression du TLR7 des monocytes et la production de TNF ce qui permet de croire que le TLR7 pourrait être largement impliqué dans cette pathologie. Enfin, cette même équipe a aussi procédé à l'extraction de l'ARN provenant du liquide synovial et du plasma de patients arthritiques et de donneurs sains. Ils ont alors tenté de stimuler le TLR7 avec cet ARN purifié. Ils ont découvert qu'il était possible de produire du TNF seulement avec l'ARN provenant du liquide synovial de patients arthritiques. Cela permet de mettre en évidence la présence d'un ligand spécifique du TLR7 au niveau du liquide synovial des patients arthritiques. Ainsi, il est fort probable que ce récepteur soit impliqué dans la pathogénèse de la maladie (188).

5.2.2.3 TLR9

Le TLR9 est un récepteur de type intracellulaire ayant la capacité de reconnaître des séquences CpG non-méthylées au niveau de l'ADN. Il a été démontré que l'injection intra-articulaire de CpG cause une importante inflammation articulaire. Ils ont ainsi confirmé l'importance du TLR9 dans l'induction des symptômes inflammatoires (190). Une étude a d'ailleurs été menée afin d'évaluer l'impact de l'injection de CpG dans un modèle d'arthrite induite au collagène. Pour y parvenir, ils ont utilisé deux types de CpG, méthylé ou non. Comme le CpG méthylé n'a pas la capacité d'être reconnu par le TLR9, il s'agit donc d'un contrôle négatif. L'évaluation des stades arthritiques a permis de révéler que l'injection de CpG non-méthylé entraîne une augmentation de l'inflammation articulaire, un phénomène absent lors de l'utilisation de CpG méthylé. De plus, les souris injectées avec du CpG non-méthylé présentent une infiltration cellulaire plus importante à la cavité synoviale et une exacerbation de la destruction du cartilage et de l'articulation. Bref, on remarque que l'injection de CpG non-méthylé cause une arthrite beaucoup plus agressive (191).

Malgré tout, le résultat de recherche le plus concluant permettant de suspecter que ce récepteur endosomal a un rôle à jouer dans la pathogénèse de l'AR est, sans aucun doute, la démonstration de son implication dans l'induction de la production du RF. En effet, le complexe formé par la liaison de la chromatine et des IgG2a peut être reconnu par le BCR (« B cell receptor ») à la surface d'une cellule B. À la suite de son entrée dans la cellule, ce complexe peut ensuite se lier au TLR9 et entraîner la production du RF. Cependant, la présence de ces auto-anticorps n'est pas spécifique à l'AR. Ainsi, on peut seulement confirmer que le TLR9 est impliqué dans l'induction du processus inflammatoire (192-194). Cependant, cela signifie qu'il serait possible de diminuer la production de tels auto-anticorps en empêchant la liaison entre ce récepteur et son ligand ce qui permettrait de diminuer la sévérité de l'AR (193).

Plusieurs thérapies sont disponibles sur le marché afin de prévenir les dommages articulaires. Il existe également des traitements qui, sans pour autant ralentir la progression des dommages articulaires, permettent de diminuer la douleur et l'inflammation chez les patients arthritiques. Parmi celles-ci, la chloroquine (Nivaquine® - un antipaludéen) et l'hydroxychloroquine (Plaquenil®) sont fréquemment utilisées chez des patients présentant une AR bénigne à modérée. La chloroquine a déjà été utilisée dans le passé pour le traitement de l'AR, mais dû à ses effets secondaires, elle a été délaissée par la grande majorité des rhumatologues pour laisser place à l'hydroxychloroquine. Néanmoins, chez les patients souffrant d'une maladie à un stade plus avancé, ces médicaments peuvent être utilisés en combinaison à un traitement visant à limiter les dommages articulaires, pensons notamment au méthotrexate (195). La chloroquine et l'hydroxychloroquine agissent en augmentant le pH des endosomes. L'acidification de ces compartiments cellulaires est nécessaire à la génération des peptides présentés par les CMH de classe II. De plus, l'absence d'acidification interfère avec le chargement des peptides et inhibe ainsi la formation du complexe CMH-peptide (6, 195). L'acidification de ces endosomes est également nécessaire à l'induction de la signalisation intracellulaire causée par la liaison des TLRs intracellulaires et de leur ligand (193). Ainsi, la chloroquine et l'hydroxychloroquine diminuent la réponse inflammatoire, la prolifération cellulaire ainsi que la production sous-jacente de cytokines pro-inflammatoires incluant le TNF, l'IL-1 β et l'IL-6 (2). Il est important de préciser que ce traitement a autrefois été considéré comme un antagoniste spécifique du TLR9 (196). Cependant, de nos jours, il est reconnu que cette molécule agit plutôt à titre d'inhibiteur des TLRs endosomaux en général (197). Il est donc impossible de conclure si seul le TLR9 est impliqué dans la pathogénèse de la maladie avec cette information. Nous pouvons toutefois confirmer qu'au moins un TLR endosomal serait impliqué dans le processus inflammatoire.

Une étude récente a permis de démontrer que le virus EBV peut être spécifiquement reconnu par le TLR9 exprimé chez les monocytes et induire la production de MCP-1 et d'IL-8. Il est intéressant de noter qu'il a été démontré que les TLR2 et TLR9 semblent tous les deux impliqués dans cette reconnaissance virale. En effet, on croit que ces deux récepteurs agissent de façon séquentielle dans la reconnaissance du pathogène (198). Il est donc probable que le virus EBV puisse servir de ligand spécifique au TLR2 et au TLR9 au niveau du tissu synovial et ainsi contribuer à l'exacerbation de l'inflammation articulaire chez les patients arthritiques.

6. Hypothèse et objectifs de recherche

6.1 Hypothèse

Depuis plusieurs années, EBV est suspecté de jouer un rôle dans la progression de l'AR. La littérature reconnaît qu'EBV peut réactiver lors de périodes de stress, ou lorsque le système immunitaire est affaibli par une infection ou la prise d'une médication immunosuppressive. Cette réactivation permettrait d'expliquer les phases inflammatoires transitoires observées chez certains patients atteints d'AR. Ce pathogène, démontrant une forte prévalence pour les articulations, pourrait ainsi être transporté jusqu'à la cavité synoviale à la suite du recrutement de cellules inflammatoires. La réplication de ce pathogène au niveau du tissu synovial (évaluée par hybridation in situ et par PCR) permettrait la production d'une grande quantité de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires via une activation des récepteurs de l'immunité innée, tels que les TLRs. Cet amalgame de cellules inflammatoires, de cytokines et de chimiokines pourrait entraîner une augmentation de l'inflammation articulaire. Une étude préalablement effectuée chez des souris arthritiques (à la suite de transfert de sérum de K/BxN) a démontré que l'infection herpétique par MHV-68 augmente l'inflammation articulaire. De plus, il leur a été possible d'observer la présence du génome viral au niveau d'homogénats de chevilles, démontrant la capacité de ce pathogène à se rendre jusqu'aux articulations inflammées. Toutefois, la façon dont le virus migre jusqu'à la cavité synoviale n'a pas pu être élucidé. Cette étude avait également permis de démontrer que la réactivation du virus herpétique MHV-68 entraîne une augmentation de l'inflammation articulaire (121). Ainsi, nous avons voulu évaluer les conséquences de l'infection herpétique aiguë sur la sévérité de l'inflammation articulaire, en plus de comparer l'effet de trois virus herpétiques latents chez une grande majorité des patients atteints d'AR. De plus, le but de ce projet consistait à caractériser la population cellulaire impliquée dans le transport du virus aux articulations. Le modèle murin a été utilisé pour évaluer différents paramètres afin de confirmer notre hypothèse et, dans un deuxième temps, certains paramètres sélectionnés ont été testés dans une cohorte de patients atteints d'AR.

6.2 Objectifs principaux

Le projet d'étude se divise en deux objectifs principaux :

- 1- Démontrer le rôle de l'infection herpétique dans la progression des symptômes inflammatoires associés à l'arthrite et identifier la population cellulaire impliquée dans le transport du virus aux articulations.
- 2- Déterminer le profil d'expression des TLR2 et TLR9 au niveau des monocytes de patients atteints d'arthrite rhumatoïde et évaluer la présence d'EBV dans ces cellules.

6.3 Objectifs spécifiques

Les objectifs spécifiques sont:

- 1- Comparer l'inflammation articulaire induite par une infection causée par différents virus herpétiques.
- 2- Évaluer la migration des sous-populations monocytaires sanguines vers les articulations de souris arthritiques en réponse à une infection par le virus MHV-68
- 3- Évaluer le rôle des monocytes dans le transport du virus jusqu'aux articulations.
- 4- Comparer les proportions des sous-populations monocytaires de donneurs sains, de patients atteints d'AR et d'OA ainsi que leurs niveaux respectifs d'expression des TLR2 et TLR9.
- 5- Examiner la présence du génome d'EBV au niveau des monocytes et des neutrophiles sanguins de patients AR.
- 6- Évaluer les concentrations de diverses cytokines au niveau du plasma et du liquide synovial de patients atteints d'AR et d'OA ainsi que la concentration sérique d'anticorps spécifiques anti-EBV chez les patients AR.

**CHAPITRE 2 : L'infection aiguë par le virus MHV-68
accroît la sévérité de l'arthrite chez la souris : la
contribution des monocytes inflammatoires
Ly6C^{high}**

Résumé du manuscrit

Objectif. Les virus herpétiques ont longtemps été soupçonnés d'aggraver la sévérité des symptômes chez les patients AR prédisposés. En outre, le type de cellules qui contribue au transport viral jusqu'aux articulations inflammées demeure toujours à être identifié. Dans la présente étude, nous avons comparé les effets des infections aiguës aux virus MHV-68, mCMV et HSV-1 sur la sévérité des symptômes inflammatoires en utilisant le modèle de transfert de sérum arthritique K/BxN et avons étudié la contribution des sous-populations monocytaires dans la migration du virus aux articulations.

Méthodes. L'arthrite a été induite chez les souris par le transfert de sérum arthritique avant de procéder à l'infection par les virus MHV-68, mCMV ou HSV-1. L'inflammation articulaire des souris a été évaluée quotidiennement et la présence du génome viral au niveau des tissus synoviaux a ensuite été déterminée par qPCR. Le suivi du déplacement des monocytes Ly6C^{high} et Ly6C^{low} dans les liquides synoviaux a ensuite été réalisé par cytométrie de flux. L'implication des monocytes dans le transport viral aux articulations a été déterminée en infectant des souris arthritiques CX3CR1^{-/-} et CCR2^{-/-}. Afin de confirmer la contribution d'un mécanisme CCR2-dépendant dans le transport du virus, les cellules de la moelle osseuse de souris transgéniques GFP⁺ ont été infectées, transférées dans des souris arthritiques CCR2^{-/-} et suivies par cytométrie de flux.

Résultats. Contrairement aux autres virus herpétiques, une infection aiguë à MHV-68 augmente l'inflammation articulaire de souris arthritiques tel que confirmé par la présence du génome viral au niveau des tissus synoviaux. Les monocytes inflammatoires Ly6C^{high} semblent être impliqués dans le transport viral jusqu'aux articulations comme en témoigne la diminution de la sévérité des symptômes chez les souris arthritiques CCR2^{-/-} infectées à MHV-68. Le rôle fonctionnel des monocytes inflammatoires dans le transport viral a été confirmé par le recrutement des monocytes Ly6C^{high} infectés aux articulations inflammées à la suite du transfert adoptif de cellules GFP⁺ à des souris CCR2^{-/-}.

Conclusion. Ces résultats indiquent que l'infection par MHV-68 peut aggraver l'inflammation chez les souris arthritiques et que les monocytes Ly6C^{high} contribuent au transport viral jusqu'aux articulations inflammées.

Acute MHV-68 infection enhances severity of arthritis in mice: contribution of Ly6C^{high} inflammatory monocytes.

Running title: Inflammatory monocytes contribute to viral transport.

Patricia Lacerte*, Carine Paquet-Bouchard*, Manon Le Bel*, Christiane Girard†, Jacques P. Brown‡, Jean Gosselin*

* Laboratory of Innate Immunology, Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CHUL) and Department of Molecular Medicine, Université Laval, Quebec, QC, Canada

† Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

‡ Department of Medicine, Division of Rheumatology, Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CHUL), and Department of Medicine, Université Laval, Quebec, QC, Canada

Corresponding author:

Dr. Jean Gosselin

Laboratory of Innate Immunology

Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CHUL)

2705 boul. Laurier, Room T 4-50

Quebec, QC, G1V 4G2 Canada

Phone: 418-525-4444 ext. 46165 Fax: 418-654-2127

E-mail: jean.gosselin@crchul.ulaval.ca

Keywords: Arthritis, Herpesvirus, MHV-68, Inflammatory monocytes, CCR2 receptor

CE DOCUMENT EST UNE ÉBAUCHE DU MANUSCRIT QUI SERA SOUMIS AU COURS DES PROCHAINES SEMAINES.

ABSTRACT

Objective. Herpesviruses have long been suspected to exacerbate symptom severity in susceptible rheumatoid arthritis patients. In addition, cell type contributing to viral transport into the inflamed joints remains to be identified. In this study, we have compared the effects of acute MHV-68, mCMV and HSV-1 infection on the severity of inflammatory symptoms using the K/B×N mouse serum transfer model of arthritis and investigated the contribution of monocyte subsets in the migration of the virus into the joints.

Methods. Arthritis was induced in mice by arthritogenic serum transfer prior acute infection with MHV-68, mCMV or HSV-1. Joint inflammation of mice was monitored daily and the presence of viral genome in joint tissues was determined by qPCR. Tracking of Ly6C^{high} and Ly6C^{low} monocytes in synovial fluids was performed by flow cytometry. The relevance of monocytes in viral transport to the joints was assessed by infecting arthritic CX3CR1^{-/-} and CCR2^{-/-} mice. To further confirm the contribution of CCR2-dependent mechanism in viral migration, bone marrow cells from GFP⁺ transgenic mice were infected, transferred in arthritic CCR2^{-/-} and followed by flow cytometry.

Results. In contrast to other herpesviruses, acute MHV-68 infection increased joint inflammation of arthritic mice as confirmed by the presence of viral genome in joint tissues. Ly6C^{high} inflammatory monocytes appear to be involved in virus transport into the joint as reflected by the decreased severity of symptoms in MHV-68-infected arthritic CCR2^{-/-} mice. Functional role of inflammatory monocytes in viral transport was confirmed by recruitment of infected Ly6C^{high} monocytes into the inflamed joints following adoptive transfer of GFP⁺ cells into CCR2^{-/-} mice.

Conclusion. These results indicate that MHV-68 infection can exacerbate inflammation in arthritic mice and that Ly6C^{high} monocytes contribute to viral transport into the inflamed joints.

INTRODUCTION

Rheumatoid Arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease that could progressively lead to joint destruction. Origin of RA is very complex but it is generally believed to arise from genetic susceptibility. Environmental factors including viral infection have also been suspected for many years to contribute to the progression of RA. Epstein-Barr Virus (EBV) is considered as a leading candidate underlying several autoimmune diseases including RA (1). In fact, since EBV is common throughout the world, persists within the body and is capable of altering host immune response (2-5), it is suspected to contribute to exacerbation of RA. However, while several pathophysiological links between EBV and RA have been documented (6-14), evidence confirming the potential role of EBV in RA and the mechanisms by which the virus may potentiate inflammatory symptoms in the disease remain to be documented.

The pathogenesis of RA is characterized by inappropriate recruitment and activation of cells of innate immunity, such as monocytes and neutrophils, which are abundant in inflamed synovial tissues. In arthritic joints, neutrophils and resident macrophages are known to contribute to joint inflammation through their massive production of cytokines. Monocytes are also recognized to play a crucial role in the disease. In humans, three main subsets of monocytes have been defined by the expression of CD14 and CD16 (15-18). The CD14⁺⁺ CD16⁻ monocytes represent the major subset of blood monocytes. They express high levels of the chemokine receptor CCR2 but low levels of CX3CR1. CD14⁺⁺ CD16⁺ is a smaller subset of monocytes which express very low levels of CCR2 but high levels of CX3CR1. They are considered as intermediate monocytes playing a pro-inflammatory role through their production of cytokines (18, 19). They were also found to increase in blood during inflammatory or infectious diseases. The third subset of monocytes is CD14^{low} CD16⁺⁺ and may refer to patrolling monocytes. In mice, two major monocyte subsets have been characterized ((20-22) and reviewed in (23, 24)). Both monocyte subsets express CD115 antigen (CSF-1R) but can be easily distinguished by their expression of Ly6C and CCR2. The major subsets of monocytes, called inflammatory monocytes, are CD115⁺ Ly6C^{high} CCR2⁺ and express low CX3CR1. They are similar to human CD14⁺⁺ CD16⁻ monocytes since they are recruited to inflamed tissue and produce high levels of inflammatory cytokines during infection. The second subset of monocytes, termed resident or blood patrolling monocytes, express CD115 and high levels of CX3CR1 but low Ly6C and CCR2 (CD115⁺ Ly6C^{low} CCR2[±] CX3CR1^{high}). These cells, similar to CD14^{low} CD16⁺⁺ human monocytes, are in "first line" and play a pivotal role in response to tissue damage as well as scavenging cell debris and microbial pathogens (23, 25). While less prevalent than inflammatory monocytes, patrolling subset is rapidly mobilized at the site of infection. Their action is however transient since the large production of inflammatory cytokines will be further released by inflammatory monocytes (CD115⁺ Ly6C^{high} CCR2⁺). Monocytes are recognized to play a crucial role in RA, especially inflammatory monocytes which were found to increase in sera of RA patients (26-29). Since it was reported

that EBV infects and modulates the release of pro-inflammatory cytokines by primary monocytes (30-32), it is plausible that EBV-infected monocytes are mobilized in RA joints and trigger the release of inflammatory mediators in response to innate sensors recognition. This process could lead to exacerbation of arthritic symptoms.

There is still no direct evidence showing the potential of EBV to contribute to joint inflammation. An interesting study, reported by Yarilin *et al.* (33), showed that infection of a mouse model of arthritis with a murine gamma-herpesvirus (MHV-68) (closely related to human EBV) enhanced severity of arthritis. Authors found the presence of viral DNA in ankles of arthritic mice, indicating that MHV-68 can reach joint tissue following infection. Reactivation of MHV-68 along with an increase of clinical symptoms were also observed in immunosuppressed arthritic mice. However, cell type contributing to viral transport into the inflamed joint was not identified.

In the present study, we have used the K/B×N serum transfer model of arthritis (34) to investigate the effects of herpesvirus infection on the severity of RA symptoms, and to determine the cell population involved in viral transport. Arthritic mice were infected with MHV-68, murine CMV (mCMV) or HSV-1 to compare the role of these herpesviruses in the progression of RA. Our results confirm that MHV-68 infection potentiates inflammatory symptoms in RA mice. In addition, we observed that infection with MHV-68 increases levels of circulating inflammatory monocytes and their subsequent recruitment to the joints. This process contributes to the virus migration to the joint and enhanced severity of RA symptoms.

MATERIALS AND METHODS

Ethics Statement. Experiments were conducted in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (CCAC) and of the animal research ethics board of Laval University (approval #09-146-3).

Mice. Females C57Bl/6 wild-type (WT) and NOD/ShiLtJ mice were obtained from Charles River (Quebec, Canada) and The Jackson Laboratory (Bar-Harbor, ME, USA) respectively. CX3CR1^{-/-}, CCR2^{-/-} and GFP⁺ transgenic mice were provided by Dr. Serge Rivest (Laval University, Quebec, Canada) whereas KRN mice were kindly provided by Dr. Christophe Benoist (Harvard University, Cambridge, MA, USA).

Virus purification. MHV-68 g2.4 strain (from Dr. Bernadette Dutia, University of Edinburgh, Edinburgh, UK) was produced in Baby-Hamster-Kidney cells (BHK-21 [C-13] (ATCC® CCL-10™)) (ATCC, Manassas, VA, USA) and titrated on Vero cells (ATCC® CCL-81™) using standard plaque assay as previously described (35). MCMV Smith strain, (ATCC® VR-1399™) was amplified *in vivo* in BALB/c mice and titrated on murine embryonic fibroblasts (MEFs) (36). HSV-1 F strain (ATCC® VR-733™) was amplified and titrated on Vero cells as previously described (37).

Serum transfer, mouse viral infection and drug therapy. Arthritogenic serum was obtained from 8-weeks old arthritic K/B×N mice (F1) (34). To induce arthritis, mice were injected twice by intraperitoneal (i.p.) administration at 48 hours interval. At 24 hours post-serum administration, mice were infected by intravenous (i.v.) administration of sublethal doses of MHV-68 (2×10^5 PFU), mCMV (2×10^5 PFU) or HSV-1 (2×10^3 PFU) to generate acute challenge. When indicated, mice were daily treated subcutaneously (s.c.) with cidofovir (50 mg/kg) from day 1 to day 7 post-infection.

Arthritic score and histological staining. Severity of arthritis in mice was daily quantified by evaluating the ankle thickness using a caliper. For each paw, a score of 1 was given when an increased swelling of 0.5 mm was measured as compared to the baseline, i.e. before arthritis induction. Arthritic score represents the mean of all four paw scores from mice of the same group.

At selected time points, ankle joints were collected for histological staining. Briefly, joints were isolated and fixed overnight in 4% paraformaldehyde followed by a 48-hour decalcification in 10% Na₂EDTA. Tissues were then embedded in paraffin, sectioned and stained with hæmatoxylin and eosin (H&E). Histopathological analyses were performed by a trained veterinary pathologist.

Flow cytometry analysis. Blood of mice was collected by intracardiac puncture and cells isolated as described (38). Synovial joints were obtained by puncture of inflamed joints with a 28G needle, pooled and

cells were isolated by centrifugation (34). Cell suspensions were treated first with CD16/32 (Biolegend, San Diego, CA, USA) to block Fc receptors and to avoid non-specific staining and then incubated with the following antibody panel: APC-Cy7-CD11b (clone M1/70), V500-CD45 (clone 30-F11), V450-Ly6G (clone 1A8) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), APC-CD115 (clone AFS98), PE-Ly6C (clone HK1.4) (Biolegend). Sample analyses were performed on a BD SORP LSR II (BD Biosciences) and data analysed with BD FACS Diva Software (BD Biosciences). Cell sorting was performed with the BD FACS Aria II (BD Biosciences).

***In vivo* adoptive transfer of Ly6C^{high} CD11b⁺ inflammatory monocytes.** Cells isolated from bone marrow of GFP⁺ transgenic mice were stained with APC-CD115, APC-Cy7-CD11b, V450-Ly6G and PE-Ly6C. Inflammatory monocytes (CD115⁺/CD11b⁺/Ly6G⁺/Ly6C^{high}/GFP⁺) were enriched by cell sorting (purity ≈98%) and next infected *in vitro* with MHV-68 (m.o.i. of 1) for 4 hours. Enriched monocytes were then harvested and resuspended in sterile DPBS at 20×10⁶ cells/ml for injection (i.v) in tail vein of arthritic CCR2^{-/-} recipient mice 4 days following arthritogenic serum administration. Efficiency of infection was tested by qPCR detection of MHV-68 DNA. Blood, joint fluids and synovial tissue were collected from CCR2^{-/-} recipient mice and cells were isolated at indicated times. Cells were resuspended in sterile buffer containing V500-CD45, APC-CD115, APC-Cy7-CD11b, V450-Ly6G and PE-Ly6C for flow cytometry analysis. When indicated, detection of genomic MHV-68 was performed by qPCR on DNA extracted from blood cells and isolated synovial tissues of CCR2^{-/-} recipient mice.

DNA extraction and quantitative PCR. Blood cells and synovial tissues were homogenized in TRIzol Reagent (Life Technologies, Ontario, Canada) and DNA extraction was performed following manufacturer's instructions. Extracted DNA was amplified using GoTaq qPCR MasterMix (Promega, Madison, WI, USA) according to manufacturer's instructions. The following primers were used to detect MHV-68 glycoprotein B (gB) gene (forward: 5' – GGC CCA AAT TCA ATT TGC CT - 3' and reverse: 5' – CCC TGG ACA ACT CCT CAA GC - 3') (39), mCMV gB gene (forward: 5' – AGG GCT TGG AGA GGA CCT ACA – 3' and reverse: 5' – GCC CGT CGG CAG TCT AGT C – 3') (40), HSV-1 ICP27 gene (forward: 5' – TTT CTC CAG TGC TAG CTG AAG G – 3' and reverse: 5' – TCA ACT CGC AGA CAC GAC TCG – 3') (41) and murine glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (mGAPDH) gene as an internal control (forward: 5' – TGT TCC AGT ATG ACT CCA CTC ACG - 3' and reverse: 5' – ATG GTG GTG AAG ACA CCA GTA GAC - 3'). MHV-68 gB, mCMV gB and HSV-1 ICP27 PCR amplicons were purified using Gel Extraction Kit (Quiagen, Ontario, Canada) and quantified with Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, DE, USA). Serial dilutions of purified amplicons were used as standards. Number of copies was determined as followed: $N_A \times \text{DNA (g/}\mu\text{l)} / \text{amplicon size} \times \text{MW}$ (N_A : Avogadro's number, MW: molecular weight of double stranded DNA).

Cytokines and chemokines measurement. Levels of IL-6, IFN- γ , IL-10, IL-12p70, MCP-1, TNF, IL-1 β , IL-17, KC and RANTES were determined in sera and joint fluids (34) (pooled from mice of the same group) using the BD Cytometric Bead Array system (BD Biosciences). Flow cytometry experiments were performed using BD FACS CANTO II followed by FCAP Array software (BD Biosciences) analyses.

Statistical analysis. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Newman-Keuls post-hoc test (4 digits) were performed to compare multiple groups. Student's t-test (unpaired, two-tailed) was used for two groups of experiments. Analyses were completed with PRISM 5 software version 5.04. Differences were considered significant at * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$.

RESULTS

Acute MHV-68 infection enhances inflammation in joints of arthritic mice.

Viruses, and particularly herpesvirus, are thought to contribute to the progression of RA symptoms. Several studies have addressed the presence of CMV and EBV in synovial tissues of RA patients, the latter being the most prevalent (2, 3, 5, 42). To confirm whether herpes infection can enhance severity of RA, we have compared three viruses of the Herpesviridae family capable of infecting mice: MHV-68, mCMV and HSV-1. Three days following induction of arthritis by serum transfer, arthritic mice were infected with one viral strain and severity of joint inflammation was monitored daily according to the arthritic scores described in the Materials and Methods. We observed that MHV-68 had significantly increased joint inflammation in arthritic mice (Fig. 1A). Treatment of infected mice with cidofovir significantly reduced effect of MHV-68 on joint inflammation, confirming the link between acute MHV-68 infection and enhanced inflammation in joints of arthritic mice (Fig. 1D). Infection with mCMV or HSV-1 had no effect on RA severity (Fig. 1B-1C). Impact of MHV-68 infection on the severity of arthritis can be easily visualized (Fig. 2A, 2B, 2C, left and middle panels). However, no significant difference between infected and not infected arthritic mice was observed with histological analyses (Fig. 2, right panels). In fact, joint histology of arthritic mice infected or not with MHV-68 showed similar histological features i.e. a thickened synovial membrane with inflammatory cells and hypertrophic synovial cells. Compared to control mice, the joint space also contained inflammatory cells and cellular debris.

MHV-68 genome is detected in joints of arthritic mice.

While it appears that only MHV-68 can increase joint inflammation in arthritic mice, we have looked for the presence of each viral genome in joint tissues by qPCR. Detection of MHV-68 and mCMV were based on their respective glycoprotein B (gB) gene sequence (40, 43) whereas HSV-1 was detected by amplification of the ICP27 viral gene (41). As shown in figure 3, MHV-68 genome has been detected in joint tissues from all infected arthritic mice (Fig. 3A). The presence of genomic mCMV but not genomic HSV-1 was detected in joints of mice (Fig. 3B). However, number of genomic mCMV copies was lower and sporadically detected in joints of arthritic mice as compared to MHV-68, and was no longer detected after 10 days of infection. These results show that MHV-68 is capable to migrate into joint and exacerbate inflammation of arthritic mice compared to other herpesviruses tested.

Acute MHV-68 challenge increases production of inflammatory cytokines in joints of arthritic mice.

Severity of arthritis is associated with excessive production of cytokines in joint. Enhanced joint inflammation observed in arthritic mice infected with MHV-68 prompted us to evaluate concentrations of various cytokines produced in joint fluids and sera of infected compared to uninfected arthritic mice. We then chose cytokines known to be upregulated in joints of RA patients. As showed in figure 4, infection of arthritic mice with MHV-68 significantly increased production of IL-6 and TNF α in sera of mice (Fig. 4A-4B). Interestingly, levels of MCP-1 and RANTES in both sera and joint fluids of RA mice were strongly enhanced following challenge with MHV-68 (Fig. 4C-4G). These cytokines are recognized to be chemotactic for monocytes (44, 45). Involved in regulating effector functions, secretion of IFN γ and IL-12p70 was also increased in sera and joint fluids of RA mice infected with MHV-68 (Fig. 4E-4F). In all mice infected with mCMV and HSV-1, levels of cytokines strongly dropped to basal levels after 4 days of infection ((46) and personal observations). Together, these results suggest that MHV-68 infection may sustain the release of various inflammatory mediators that may contribute to exacerbate symptoms in joints of arthritic mice.

MHV-68 infection increases the number of circulating inflammatory monocytes.

Rheumatoid synovitis is characterized by the migration of mononuclear cells, including monocytes, in joint. Under inflammatory conditions or during infection, monocytes accumulate in blood and further migrate to inflamed tissues (47). Inflammatory monocytes (Ly6C^{high} CD11b⁺) give rise to inflammatory macrophages which produce high levels of inflammatory cytokines in arthritic joints. To further evaluate the contribution of monocytes in enhanced inflammatory symptoms of RA mice infected with MHV-68, we have first compared the levels of blood monocytes in RA mice infected or not with MHV-68. As expected, levels of monocytes increased in blood of both groups of mice, a typical feature observed during inflammation and/or infection (Fig. 5B). However, levels of Ly6C^{high} CD11b⁺ inflammatory monocytes significantly increased in blood of infected RA mice compared to RA group controls. The number of patrolling monocytes (Ly6C^{low} CD11b⁺) in blood of arthritic mice was not significantly affected following the challenge with MHV-68. Such a difference between the numbers of monocyte subsets suggests that while both monocyte populations participate to the inflammatory response, the contribution of inflammatory monocytes is more prominent. We have next determined whether such increase of blood inflammatory monocytes could also be detected in joints of infected RA mice. As shown in figure 6B, a similar pattern was observed, e.g., a significant increase of inflammatory monocytes (Ly6C^{high} CD11b⁺) but not patrolling monocytes (Ly6C^{low} CD11b⁺) was detected in joint fluids of the infected arthritic group. These results are not surprising since inflammatory monocytes are known to be massively recruited to the site of inflammation. In the context of arthritis, we can therefore postulate that MHV-68 infection leads to a massive increase of blood inflammatory monocytes and augments

their migration from blood to inflamed tissues, a deleterious process that may enhance the severity of joint inflammation.

Deficiency of CCR2 receptor reduces joint inflammation of MHV-68-infected RA mice.

Ly6C^{high} monocyte recruitment is strongly mediated *in vivo* through CCR2 receptor and its ligand CCL2, also known as MCP-1 (review in (24)). Since we suspect that excessive recruitment of inflammatory monocytes in joints of arthritic mice infected with MHV-68 may contribute to enhanced inflammatory symptoms, we thus compared the severity of arthritis in CCR2- and CX3CR1-deficient mice following infection with MHV-68. Deficiency in CCR2 receptor resulted in a marked diminution of symptom severity induced by MHV-68 (Fig. 7A). Such reduction of joint inflammation was also observed in arthritic WT mice not infected with MHV-68 as compared to control groups. In CX3CR1^{-/-} mice, no significant impact on the severity of arthritis induced by MHV-68 was observed (Fig. 7B). As expected, the accumulation of monocytes (CD115⁺ CD11b⁺) in arthritic joints of infected mice was strongly reduced in absence of CCR2 but not in absence of CX3CR1 receptor (Fig. 7C). Therefore, CCR2 deficiency strongly reduces joint inflammation of arthritic mice but also the exacerbation of symptoms associated with MHV-68, highlighting the contribution of inflammatory monocytes in both joint inflammation and viral transport.

CCR2 mediates recruitment of Ly6C^{high} monocytes infected by MHV-68 in arthritic mice.

To further confirm the trafficking of inflammatory monocytes from blood to joints and to determine their contribution in transport of MHV-68 into joints of arthritic mice, we have performed adoptive transfer experiments. We have isolated and enriched Ly6C^{high} monocytes from GFP⁺ transgenic mice, infected them *in vitro* with MHV-68, and adoptively transferred these infected cells into CCR2^{-/-} mice, which are monocytopenic and in which GFP-tagged cell trafficking is facilitated. Arthritis was induced in CCR2^{-/-} recipient mice prior to adoptive transfer of inflammatory monocytes. At indicated times, the presence of GFP-tagged Ly6C^{high} CD11b⁺ monocytes was evaluated in blood and in joint tissues of recipient mice. As expected, transferred GFP⁺ cells were easily detectable in blood of mice at 90 minutes post-injection (Fig. 8A) and even after 18 hours (data not shown). Interestingly, GFP⁺ monocytes were also detected in joints of arthritic CCR2^{-/-} mice at 90 minutes post-transfer in all animals tested (Fig. 8B). Detection of MHV-68 DNA in joints of mice confirms the transport of the virus by inflammatory monocytes (Fig. 8C). The presence of infected inflammatory monocytes was no longer detectable after this period, probably due to the migration of the tagged cells to another tissue. Indeed, detection of viral DNA in spleen of recipient CCR2^{-/-} mice at 48 hours following cell transfer supports this assumption (data not shown). Therefore, these results confirm that infected inflammatory monocytes can traffic from blood to inflamed joints, a process contributing to the severity of joint inflammation.

DISCUSSION

While genetic factors are associated to RA susceptibility since many years, viral triggers have been proposed to contribute to the disease. It has been suggested that EBV could be a plausible candidate in the exacerbation of RA and also in several other autoimmune diseases. However, the potential involvement of herpesvirus infection, particularly EBV, in RA synovitis remains to be elucidated. To investigate the effects of herpesvirus infection on the severity of arthritis, we have tested the potential of three herpesviruses to exacerbate joint inflammation in mouse model of arthritis reported by Kouskoff *et al.* (34) and evaluated the contribution of monocytes to import the virus to the joint.

We observed that acute infection of arthritic mice with MHV-68 significantly enhanced severity of paw inflammation. This effect of MHV-68 was strongly abolished in mice treated with cidofovir, confirming that viral infection plays a role in the severity of acute arthritis. No similar effect on joint inflammation was detected in arthritic mice infected with either mCMV or HSV-1. However, while mCMV appears to exert no significant effect in our model, detection of its genome in synovial tissues of some RA mice indicates that mCMV can also migrate into the joints. A modest replicative activity of mCMV in joints of arthritic mice could reflect the absence of an exacerbated inflammation as observed with MHV-68. This remains to be confirmed. With respect to MHV-68, our results confirm a previous study reported by Yarilin *et al.* (33) showing that, upon infection with MHV-68, enhancement of severity of arthritis was observed. The authors also showed that latent infection could be reactivated in the synovium of mice treated with an immunosuppressive drug, suggesting that viral reactivation occurs locally in the arthritic joint. In line with these results, we have detected the presence of MHV-68 DNA in joint tissues of arthritic mice showing severe joint inflammation following infection. Such inflammation occurs in concomitance with the production in sera and joint fluids of cytokines known to be released in joints of RA patients. Of particular interest are the high levels of MCP-1/CCL2 and RANTES/CCL5 detected in joint fluids of arthritic mice infected with MHV-68. These mediators are known to contribute to the recruitment of Ly6C^{high} inflammatory monocytes from the bone marrow to inflamed tissues (48). Because monocytes are cellular components involved in innate immune responses activated in several inflammatory diseases, including arthritis (26, 28), we have hypothesized that during active MHV-68 infection, levels of circulating monocytes mobilized to the joints may be enhanced in arthritic mice, which process may increase severity of symptoms. In fact, we observed that MHV-68 infection of arthritic mice correlates with an increase of circulating monocytes, particularly those expressing an inflammatory phenotype. Similarly, the number of inflammatory monocytes detected in joint fluids of arthritic infected mice was also found higher than in the uninfected group. It is typically recognized that Ly6C^{high} monocytes exit from the bone marrow to the blood and are consequently recruited to the sites of inflammation/infection. Therefore we can assume that the enhanced

severity of symptoms observed in infected mice may be a consequence of an excessive monocyte migration to the inflamed joint and reflect a general mechanism activated by local inflammation or following infection.

Monocytes are known to be permissive to MHV-68 and it is plausible that they may contribute to migration of the virus into joints of arthritic mice. The detection of MHV-68 genome in circulating monocytes of infected arthritic mice and the reduced severity of joint inflammation in CCR2-deficient arthritic mice strongly support this hypothesis. These results are also consistent with the function of CCR2 as a crucial receptor of chemokine to recruit inflammatory monocytes. In addition, the significant production of MCP-1 in both joint fluids and sera of infected mice is also in line with these data. Together, these results indicate that monocytes contribute to joint inflammation via a preferential trafficking of inflammatory monocytes through a CCR2-dependent mechanism, and also that monocytes are involved in virus transport to the synovial tissue. A similar mechanism could also be applied to human. In this regard, we have previously reported that EBV infects and replicates in primary human monocytes (32) and it was also proposed that EBV infection may disseminate within the oral epithelium of hairy leukoplakia lesions of patients through infected monocytes suggesting that these cells contribute to virus transport (49). In addition, the presence of EBV DNA detected in circulating monocytes of solid organ transplanted patients (50) reinforces the role of monocytes in the dissemination of the virus.

Regarding arthritis, the contribution of monocytes in viral transport to inflamed tissue is conceivable since they are rapidly mobilized at sites of inflammation where they produce an impressive variety of inflammatory mediators. Following their migration into synovial tissue, infected monocytes (and viral components) can be recognized by innate sensors (such as TLR2 and TLR9) (30, 31, 39, 51) and activate/enhance the secretion of inflammatory cytokines and chemokines. Once activated, this mechanism may induce a feedback loop that exacerbates joint inflammation. This scenario could thus explain the contribution of infectious EBV to arthritis exacerbation and could also be applied to other chronic autoimmune diseases like multiple sclerosis in which EBV contribution was suggested (1).

Our data show that acute infection with MHV-68 exacerbates joint inflammation in a model of arthritic mice and also indicate that monocytes, especially Ly6C^{high} inflammatory monocytes, contribute to importation of the virus to the synovial tissue. We cannot exclude that other cell populations, including B cells, may also contribute to locally enhance inflammation of joints since the MHV-68 virus persists in these cells with continuous viral reactivation and immune stimulation. Our proposed mechanism involving monocytes could thus shed light on different immune sequences activated during arthritis and could be applied to arthritic patients.

REFERENCES

1. Lunemann, J. D., T. Kamradt, R. Martin, and C. Munz. 2007. Epstein-barr virus: environmental trigger of multiple sclerosis? *J. Virol.* 81: 6777-6784.
2. Bokarewa, M., A. Tarkowski, and M. Magnusson. 2007. Pathological survivin expression links viral infections with pathogenesis of erosive rheumatoid arthritis. *Scand. J. Immunol.* 66: 192-198.
3. Costenbader, K. H., and E. W. Karlson. 2006. Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis: is there a link? *Arthritis Res. Ther.* 8: 204.
4. Savard, M., and J. Gosselin. 2006. Epstein-Barr virus immunosuppression of innate immunity mediated by phagocytes. *Virus Res.* 119: 134-145.
5. Toussiro, E., and J. Roudier. 2007. Pathophysiological links between rheumatoid arthritis and the Epstein-Barr virus: an update. *Joint Bone Spine* 74: 418-426.
6. Baboonian, C., D. Halliday, P. J. Venables, T. Pawlowski, G. Millman, and R. N. Maini. 1989. Antibodies in rheumatoid arthritis react specifically with the glycine alanine repeat sequence of Epstein-Barr nuclear antigen-1. *Rheumatol. Int.* 9: 161-166.
7. Balandraud, N., J. B. Meynard, I. Auger, H. Sovran, B. Mugnier, D. Reviron, J. Roudier, and C. Roudier. 2003. Epstein-Barr virus load in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis: accurate quantification using real-time polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum.* 48: 1223-1228.
8. Birkenfeld, P., N. Haratz, G. Klein, and D. Sulitzeanu. 1990. Cross-reactivity between the EBNA-1 p107 peptide, collagen, and keratin: implications for the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 54: 14-25.
9. Petersen, J., G. Rhodes, J. Roudier, and J. H. Vaughan. 1990. Altered immune response to glycine-rich sequences of Epstein-Barr nuclear antigen-1 in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 33: 993-1000.
10. Pratesi, F., C. Tommasi, C. Anzilotti, D. Chimenti, and P. Migliorini. 2006. Deiminated Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 is a target of anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 54: 733-741.
11. Takeda, T., Y. Mizugaki, L. Matsubara, S. Imai, T. Koike, and K. Takada. 2000. Epstein-Barr virus infection in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 43: 1218-1225.
12. Toussiro, E., I. Auger, C. Roudier, J. Luka, D. Wendling, P. Tiberghien, and J. Roudier. 1999. HLA-DR polymorphism influences T-cell precursor frequencies to Epstein-Barr virus (EBV) gp110: implications for the association of HLA-DR antigens with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 54: 146-152.
13. Toussiro, E., D. Wendling, J. Luka, P. Tiberghien, and J. Roudier. 2003. Increased frequency of T cells specific for EBV gp110 in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 5 (Suppl. 1): S25.
14. Toussiro, E., D. Wendling, P. Tiberghien, J. Luka, and J. Roudier. 2000. Decreased T cell precursor frequencies to Epstein-Barr virus glycoprotein Gp110 in peripheral blood correlate with disease activity and severity in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 59: 533-538.
15. Passlick, B., D. Flieger, and H. W. Ziegler-Heitbrock. 1989. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74: 2527-2534.
16. Grage-Griebenow, E., H. D. Flad, and M. Ernst. 2001. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol* 69: 11-20.
17. Grage-Griebenow, E., H. D. Flad, M. Ernst, M. Bzowska, J. Skrzeczynska, and J. Pryjma. 2000. Human MO subsets as defined by expression of CD64 and CD16 differ in phagocytic activity and generation of oxygen intermediates. *Immunobiology* 202: 42-50.
18. Ziegler-Heitbrock, H. W. 2000. Definition of human blood monocytes. *J Leukoc Biol* 67: 603-606.
19. Belge, K. U., F. Dayyani, A. Horelt, M. Siedlar, M. Frankenberger, B. Frankenberger, T. Espevik, and L. Ziegler-Heitbrock. 2002. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 168: 3536-3542.

20. Sunderkotter, C., T. Nikolic, M. J. Dillon, N. Van Rooijen, M. Stehling, D. A. Drevets, and P. J. Leenen. 2004. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* 172: 4410-4417.
21. Jia, T., N. V. Serbina, K. Brandl, M. X. Zhong, I. M. Leiner, I. F. Charo, and E. G. Pamer. 2008. Additive roles for MCP-1 and MCP-3 in CCR2-mediated recruitment of inflammatory monocytes during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 180: 6846-6853.
22. Nahrendorf, M., F. K. Swirski, E. Aikawa, L. Stangenberg, T. Wurdinger, J. L. Figueiredo, P. Libby, R. Weissleder, and M. J. Pittet. 2007. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 204: 3037-3047.
23. Auffray, C., M. H. Sieweke, and F. Geissmann. 2009. Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells *Annu. Rev. Immunol.* 27: 669-692.
24. Shi, C., and E. G. Pamer. 2011. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 11: 762-774.
25. Serbina, N. V., T. Jia, T. M. Hohl, and E. G. Pamer. 2008. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* 26: 421-452.
26. Baeten, D., A. M. Boots, P. G. Steenbakkers, D. Elewaut, E. Bos, G. F. Verheijden, G. Berheijden, A. M. Miltenburg, A. W. Rijnders, E. M. Veys, and F. De Keyser. 2000. Human cartilage gp-39+,CD16+ monocytes in peripheral blood and synovium: correlation with joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43: 1233-1243.
27. Hepburn, A. L., J. C. Mason, and K. A. Davies. 2004. Expression of Fcγ and complement receptors on peripheral blood monocytes in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis *Rheumatology (Oxford)* 43: 547-554.
28. Kawanaka, N., M. Yamamura, T. Aita, Y. Morita, A. Okamoto, M. Kawashima, M. Iwahashi, A. Ueno, Y. Ohmoto, and H. Makino. 2002. CD14+,CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 46: 2578-2586.
29. Wijngaarden, S., J. A. van Roon, J. W. Bijlsma, J. G. van de Winkel, and F. P. Lafeber. 2003. Fcγ receptor expression levels on monocytes are elevated in rheumatoid arthritis patients with high erythrocyte sedimentation rate who do not use anti-rheumatic drugs. *Rheumatology (Oxford)* 42: 681-688.
30. Fiola, S., D. Gosselin, K. Takada, and J. Gosselin. 2010. TLR9 contributes to the recognition of EBV by primary monocytes and plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 185: 3620-3631.
31. Gaudreault, E., S. Fiola, M. Olivier, and J. Gosselin. 2007. Epstein-Barr virus induces MCP-1 secretion by human monocytes via TLR2. *J. Virol.* 81: 8016-8024.
32. Savard, M., C. Bélanger, M. Tardif, P. Gourde, L. Flamand, and J. Gosselin. 2000. Infection of primary human monocytes by Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 74: 2612-2619.
33. Yarin, D. A., J. Valiando, and D. N. Posnett. 2004. A mouse herpesvirus induces relapse of experimental autoimmune arthritis by infection of the inflammatory target tissue. *J. Immunol.* 173: 5238-5246.
34. Kouskoff, V., A.-S. Korganow, V. Duchatelle, C. Degott, C. Benoist, and D. Mathis. 1996. Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* 87: 811-822.
35. Neyts, J., and E. De Clercq. 1998. In vitro and in vivo inhibition of murine gamma herpesvirus 68 replication by selected antiviral agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 170-172.
36. Gosselin, J., P. Borgeat, and L. Flamand. 2005. Leukotriene B4 protects latently infected mice against murine cytomegalovirus reactivation following allogeneic transplantation. *J. Immunol.* 174: 1587-1593.
37. Gosselin, J., A. Tomolu, R. C. Gallo, and L. Flamand. 1999. Interleukin-15 as an activator of natural killer cell-mediated antiviral response. *Blood* 94: 4210-4219.
38. Coulombe, F., S. Fiola, S. Akira, Y. Cormier, and J. Gosselin. 2012. Muramyl dipeptide induces NOD2-dependent Ly6C(high) monocyte recruitment to the lungs and protects against influenza virus infection. *PLoS One* 7: e36734.
39. Michaud, F., F. Coulombe, E. Gaudreault, J. Kriz, and J. Gosselin. 2010. Involvement of TLR2 in recognition of acute gammaherpesvirus-68 infection. *PLoS One* 5: e13742.

40. Vliegen, I., S. Herengreen, G. Grauls, C. Bruggeman, and F. Stassen. 2003. Improved detection and quantification of mouse cytomegalovirus by real-time PCR. *Virus Res* 98: 17-25.
41. Gamba, G., H. Cavalieri, M. C. Courreges, E. J. Massouh, and F. Benencia. 2004. Early inhibition of nitric oxide production increases HSV-1 intranasal infection. *J Med Virol* 73: 313-322.
42. Balandraud, N., J. Roudier, and C. Roudier. 2005. What are the links between Epstein-Barr virus, lymphoma, and tumor necrosis factor antagonism in rheumatoid arthritis? *Semin. Arthritis Rheum.* 34: 31-33.
43. Weinberg, J. B., M. L. Lutzke, R. Alfinito, and R. Rochford. 2004. Mouse strain differences in the chemokine response to acute lung infection with a murine gammaherpesvirus. *Viral Immunol* 17: 69-77.
44. Boring, L., J. Gosling, S. W. Chensue, S. L. Kunkel, R. V. Farese, Jr., H. E. Broxmeyer, and I. F. Charo. 1997. Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J Clin Invest* 100: 2552-2561.
45. Schall, T. J., K. Bacon, K. J. Toy, and D. V. Goeddel. 1990. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 347: 669-671.
46. Mitrovic, M., J. Arapovic, S. Jordan, N. Fodil-Cornu, S. Ebert, S. M. Vidal, A. Krmpotic, M. J. Reddehase, and S. Jonjic. 2012. The NK cell response to mouse cytomegalovirus infection affects the level and kinetics of the early CD8(+) T-cell response. *J Virol* 86: 2165-2175.
47. Geissmann, F., C. Auffray, R. Palframan, C. Wirrig, A. Ciocca, L. Campisi, E. Narni-Mancinelli, and G. Lauvau. 2008. Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunol Cell Biol* 86: 398-408.
48. Tsou, C. L., W. Peters, Y. Si, S. Slaymaker, A. M. Aslanian, S. P. Weisberg, M. Mack, and I. F. Charo. 2007. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest* 117: 902-909.
49. Tugizov, S., R. Herrera, P. Veluppillai, J. Greenspan, D. Greenspan, and J. M. Palefsky. 2007. Epstein-Barr virus (EBV)-infected monocytes facilitate dissemination of EBV within the oral mucosal epithelium. *J Virol* 81: 5484-5496.
50. Greijer, A. E., S. J. Stevens, S. A. Verkuijlen, H. Juwana, S. C. Fleig, E. A. Verschuuren, B. G. Hepkema, J. J. Cornelissen, R. A. Brooimans, L. F. Verdonck, and J. M. Middeldorp. 2012. Variable EBV DNA load distributions and heterogeneous EBV mRNA expression patterns in the circulation of solid organ versus stem cell transplant recipients. *Clin Dev Immunol* 2012: 543085.
51. Guggemoos, S., D. Hangel, S. Hamm, A. Heit, S. Bauer, and H. Adler. 2008. TLR9 contributes to antiviral immunity during gammaherpesvirus infection. *J. Immunol.* 180: 438-443.

FOOTNOTES

This work was supported by grants to JG from the Canadian Institutes of Health Research (grant # MUS-94027) and from the Arthritis Society of Canada (grant # RG-10-012).

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. Acute MHV-68 infection enhances joint inflammation of arthritic mice. WT mice (n=8/group) were injected with arthritogenic serum to induce transient arthritis and were infected with (A) MHV-68, (B) mCMV or (C) HSV-1. (D) Arthritic mice were infected with MHV-68 and treated with cidofovir (50 mg/kg) from day 1 to day 7 post-infection. Mice were daily assessed to determine the arthritic score. No joint inflammation was observed in non-arthritic mice infected with MHV-68. Means of arthritic score for each group of mice are presented. (* $p \leq 0.05$ as compared to arthritic MHV-68-infected mice). RA: arthritic mice.

FIGURE 2. Representation of joint inflammation and joint histology. Left panels: Photos of rear paws (10 days following serum transfer) of (A) control mice, (B) arthritic mice (RA), (C) arthritic mice infected with MHV-68. Right panels: Histology of joints for corresponding groups (6 days post-infection). H&E staining (Magnification 50X). S: synovial membrane, F: joint space.

FIGURE 3. Detection of MHV-68 DNA in synovial tissues of arthritic mice. (A) Genomic DNA was extracted from synovial tissue of arthritic uninfected or MHV-68-infected mice (n=4) at day 4 post-infection and analyzed by qPCR for the presence of MHV-68 glycoprotein B (gB). Results showed the derivative melting curves (dF/dT) of MHV-68 gB amplicon. Purified MHV-68 DNA was used as a positive control for gB amplification. (B) Results showed the average number of MHV-68, mCMV and HSV-1 DNA copies per μg of total DNA. Data represent the mean \pm standard error of the mean (SEM) of four animals. NTC: no template control, N.D.: not detected, RA: arthritic mice. * $p \leq 0.05$ as compared to MHV-68.

FIGURE 4. Levels of joint fluid cytokines and chemokines are increased following MHV-68 infection. Arthritic WT mice were infected or not with MHV-68 (n=12/group) and joint fluids from mice of each group were punctured and pooled on day 6 post-infection. Levels of cytokines were measured in joint fluids and sera by BD Cytometric Bead Assay system: (A) IL-6, (B) TNF, (C) MCP-1, (D) IL-10, (E) IFN- γ , (F) IL-12p70, (G) RANTES, (H) IL-1 β , (I) IL-17A and (J) KC. Data shown are representative of three independent experiments (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ as compared to arthritic uninfected mice). N.D.: not detected, RA: arthritic mice.

FIGURE 5. Levels of circulating inflammatory monocytes are increased in arthritic mice infected with MHV-68. Blood of mice (n=6/group) was collected at days 3 and 6 post-infection (p.i.). (A) Gating strategy for FACS analysis. (B) Percentage of blood monocytes and monocyte subsets in mice. Data are representative of two independent experiments (* $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$ as compared to arthritic uninfected mice). RA: arthritic mice, Control: naive mice.

FIGURE 6. Inflammatory monocytes are recruited to the inflamed joints following MHV-68 infection. Joint fluids of mice (n=6/group) were collected at days 3 and 6 post-infection (p.i.). (A) Gating strategy for FACS analysis. (B) Percentage of monocytes and monocyte subsets detected in arthritic mice infected or not with MHV-68. Data are representative of two independent experiments (* $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$ as compared to arthritic uninfected mice). RA: arthritic mice.

FIGURE 7. CCR2 plays a key role in MHV-68-induced joint inflammation. Following arthritogenic serum transfer, (A) CCR2^{-/-} mice (n=6/group) and (B) CX3CR1^{-/-} mice (n=6/group) were infected or not with MHV-68 and arthritic scores were daily assessed (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$ as compared to WT arthritic mice infected with MHV-68). (C) Flow cytometry analysis of monocytes (CD11b⁺ CD115⁺) in joint fluids of mice on day 6 post infection. RA: arthritic mice

FIGURE 8. Recruitment of MHV-68-infected Ly6C^{high} CD11b⁺ monocytes in joint of arthritic mice. Bone marrow inflammatory monocytes from GFP⁺ transgenic mice (Ly6C^{high} CD11b⁺) were enriched by cell sorting and *in vitro* infected with MHV-68 for 4 hours. Following infection, cells were injected (i.v.) into arthritic CCR2^{-/-} recipient mice (n=4). At 90 minutes post-adoptive transfer, cells from (A) blood and (B) joint fluids were harvested and analysed by flow cytometry for the presence of GFP⁺ cells. (C) qPCR analysis (as detailed in figure 3) was performed for the presence of MHV-68 DNA in blood cells (left panel) and in synovial tissues (middle panel). Numbers of respective DNA copies were determined (right panel). NTC: no template control.

Figure 1

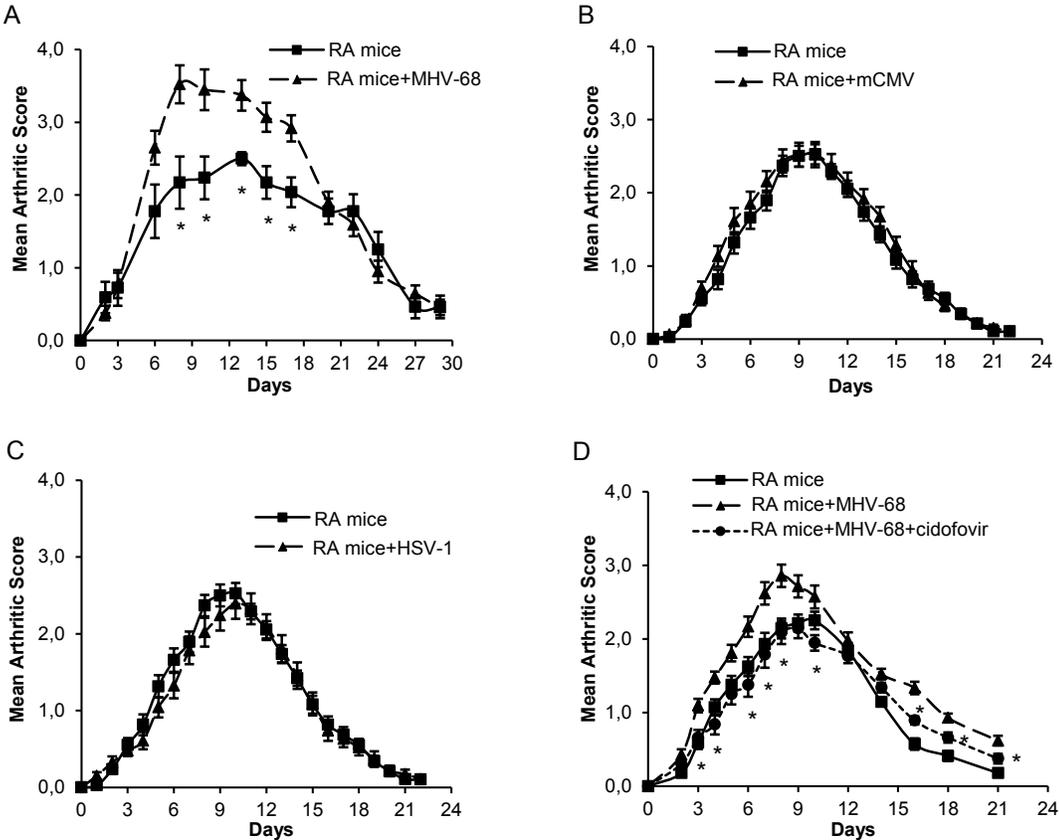


Figure 2- 1: Acute MHV-68 infection enhances joint inflammation of arthritic mice.

Figure 2

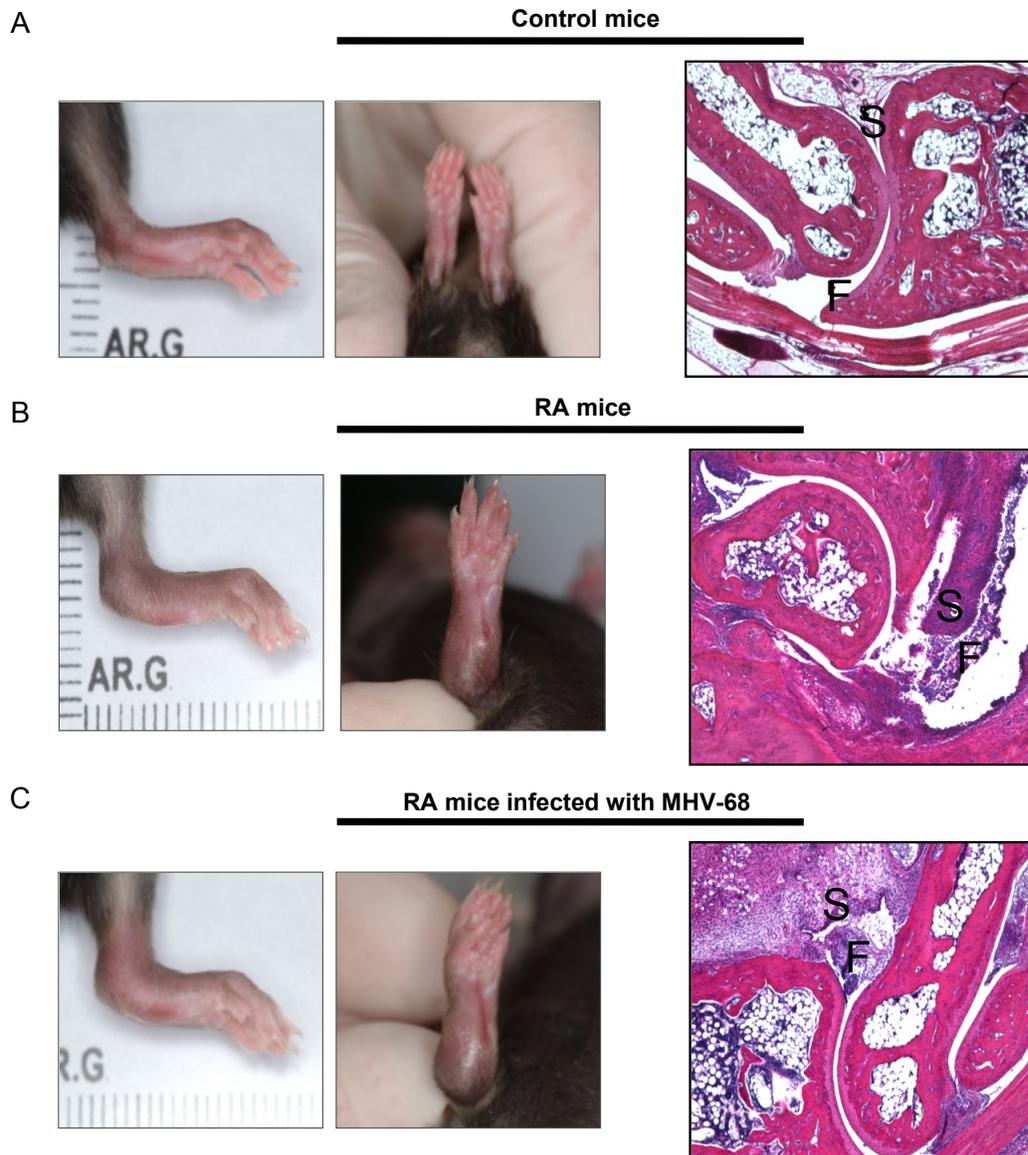


Figure 2- 2: Representation of joint inflammation and joint histology.

Figure 3

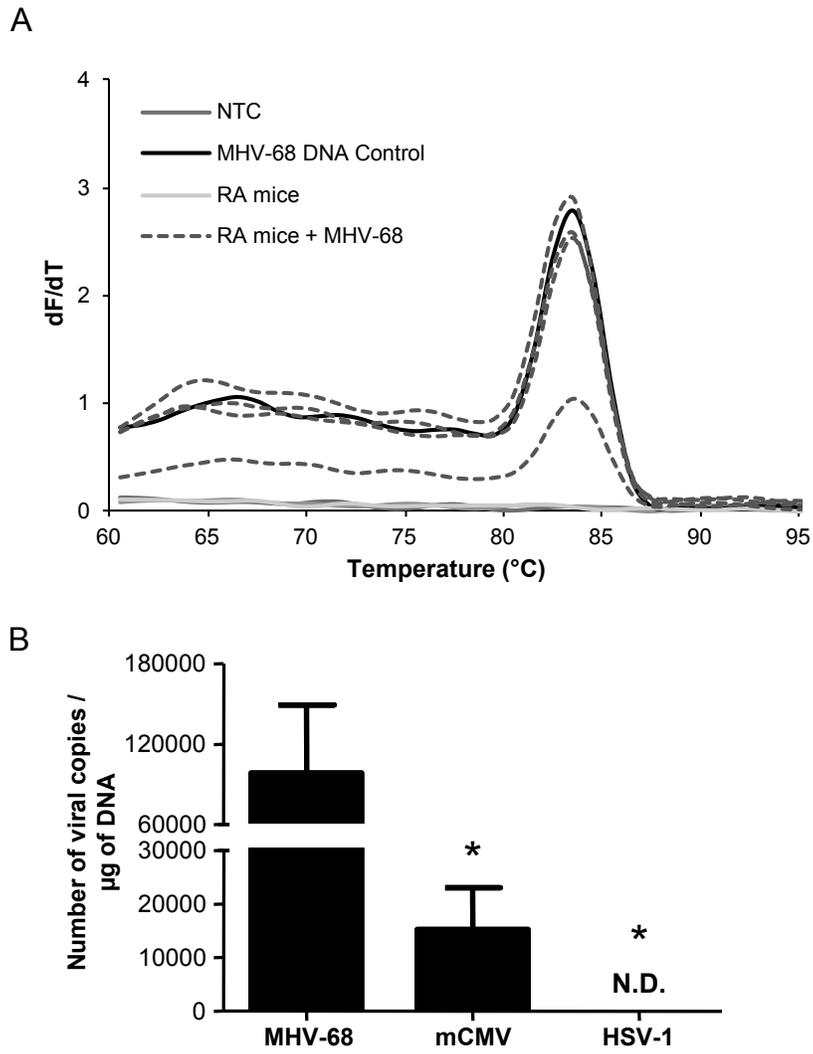


Figure 2- 3: Detection of MHV-68 DNA in synovial tissues of arthritic mice.

Figure 4

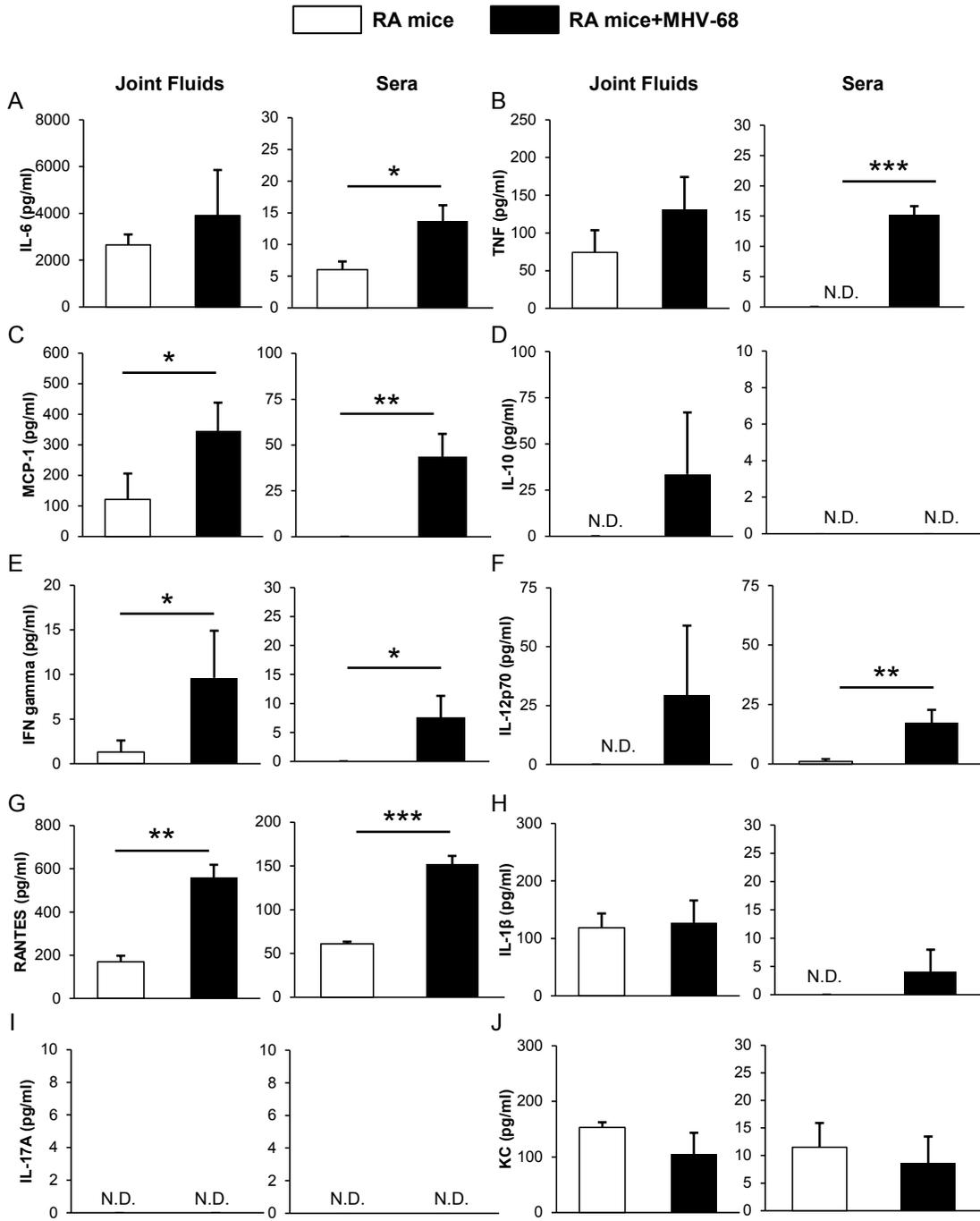


Figure 2- 4: Levels of joint fluid cytokines and chemokines are increased following MHV-68 infection.

Figure 5

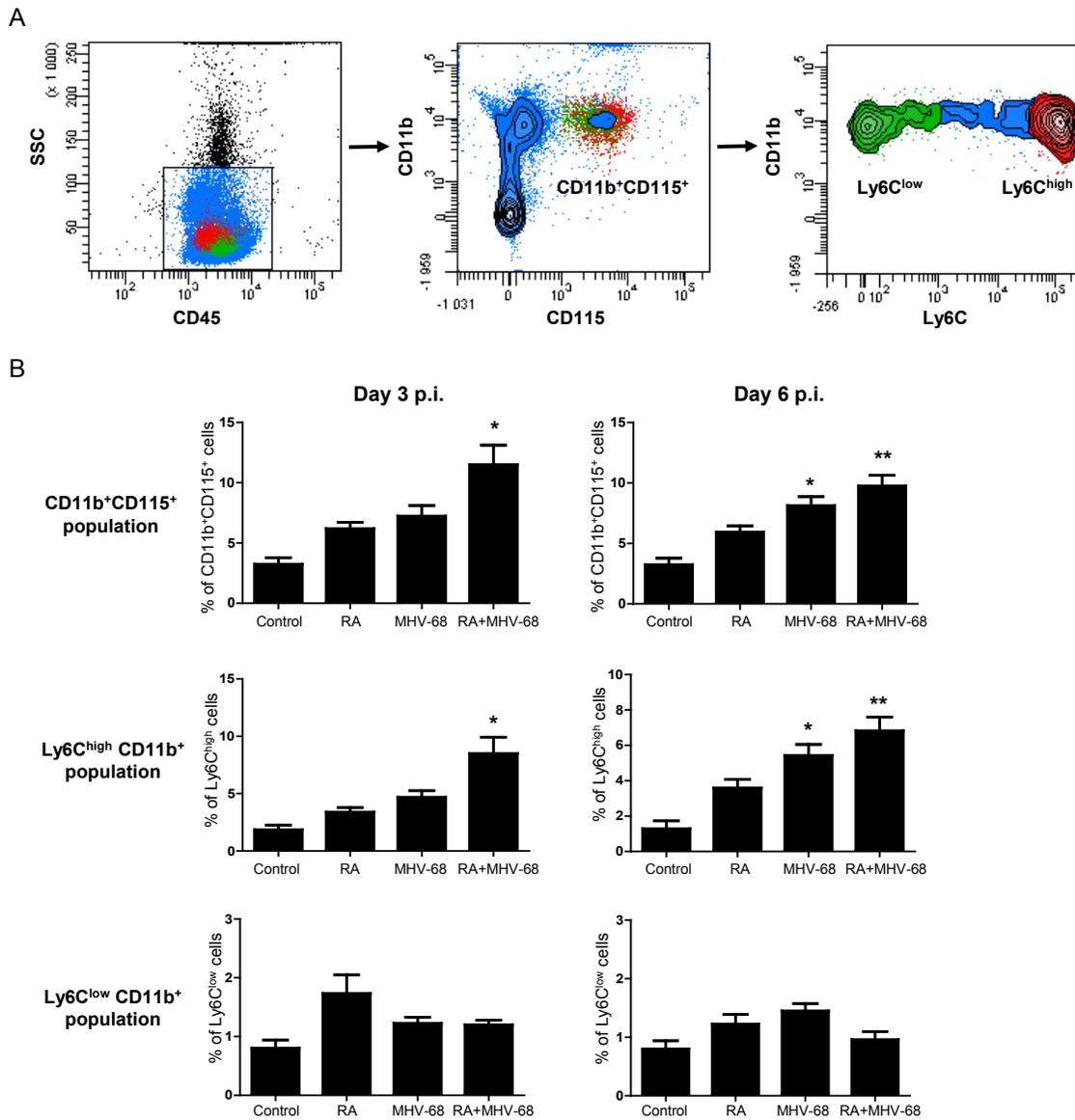


Figure 2- 5: Levels of circulating inflammatory monocytes are increased in arthritic mice infected with MHV-68.

Figure 6

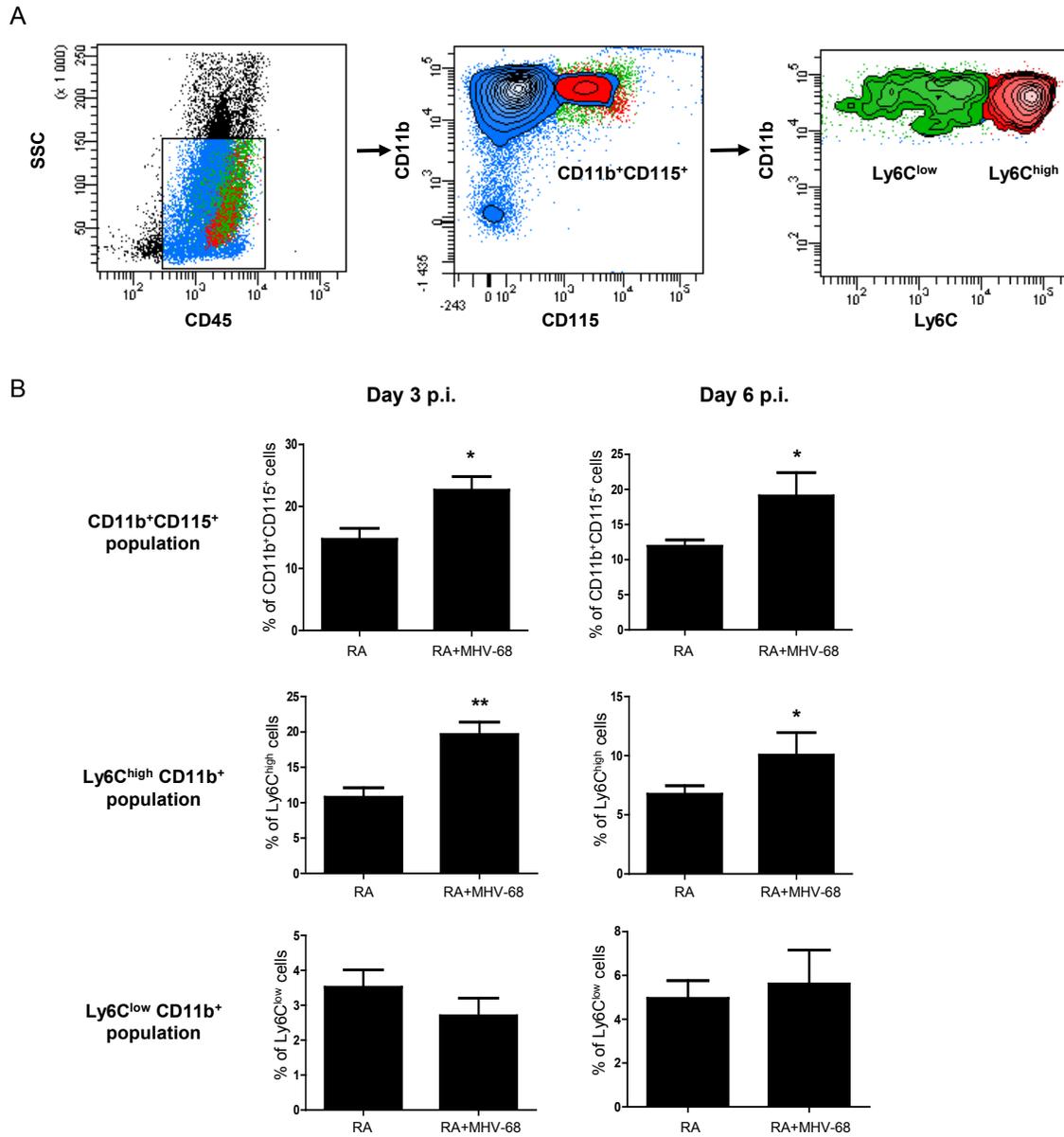


Figure 2- 6: Inflammatory monocytes are recruited to the inflamed joints following MHV-68 infection.

Figure 7

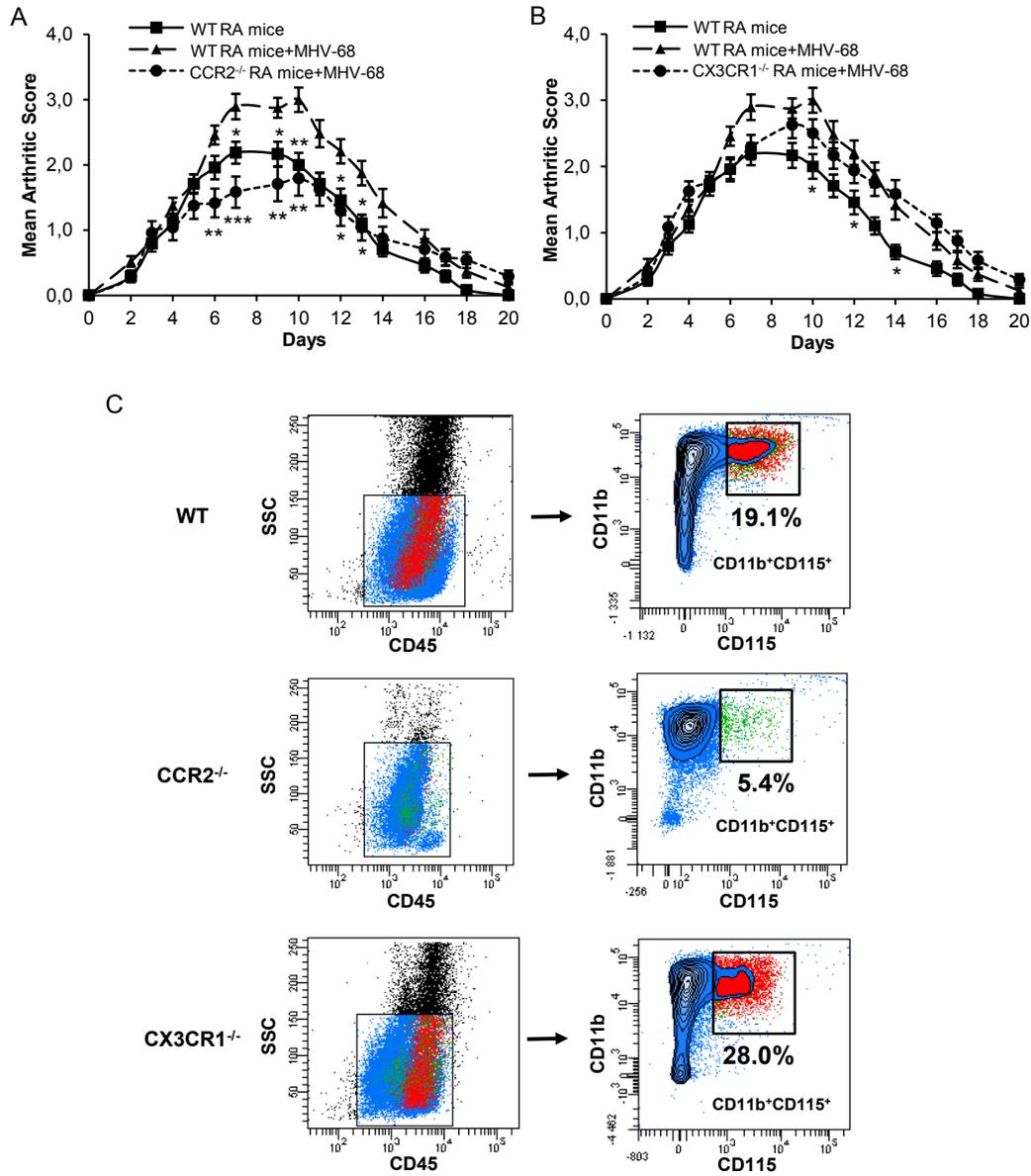


Figure 2- 7: CCR2 plays a key role in MHV-68-induced joint inflammation.

Figure 8

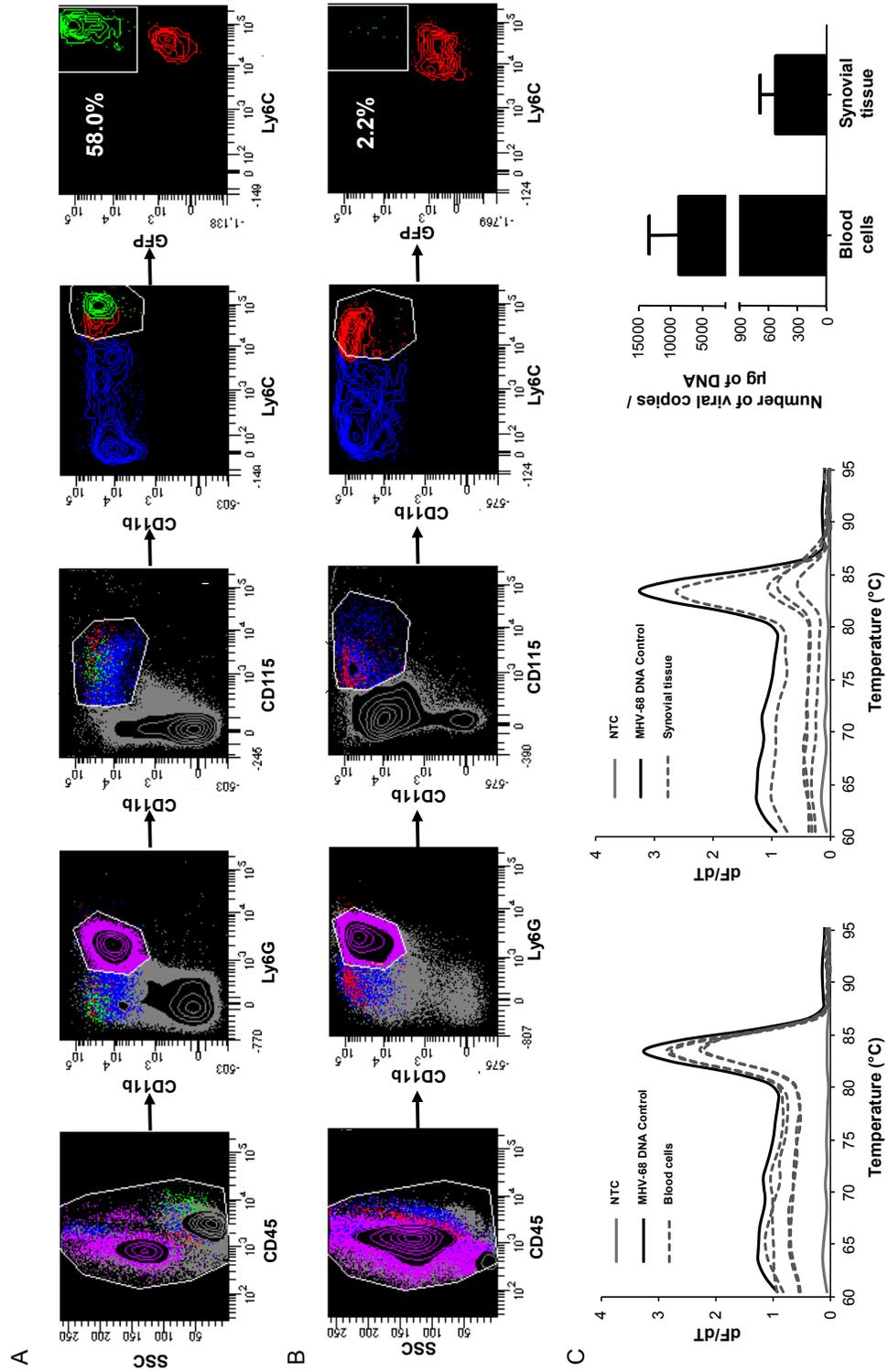


Figure 2- 8: Recruitment of MHV-68-infected Ly6C^{high} CD11b⁺ monocytes in joint of arthritic mice.

**CHAPITRE 3 : Augmentation de l'expression des
« Toll-like receptors » 2 et 9 au niveau des sous-
populations monocytaires et des neutrophiles de
patients atteints d'arthrite rhumatoïde.**

Résumé du manuscrit

Objectif. L'infiltration synoviale des monocytes et des neutrophiles est couramment associée à une inflammation chronique dans l'arthrite rhumatoïde (AR) par l'activation des « Toll-like receptors » (TLRs) et la sécrétion de cytokines inflammatoires. Nous avons évalué les niveaux d'expression des TLR2 et TLR9 au niveau des trois sous-populations monocytaires et des neutrophiles isolés de patients AR et avons également testé la présence du génome du virus Epstein-Barr (EBV) au niveau de ces populations cellulaires.

Méthodes. Les niveaux d'expression des TLR2 et TLR9 au niveau des monocytes sanguins et synoviaux purifiés CD14⁺⁺ CD16⁻, CD14⁺⁺ CD16⁺ et CD14^{low} CD16⁺⁺ et des neutrophiles isolés de patients AR et ostéoarthritiques (OA) ont été évalués par cytométrie de flux. La présence du génome d'EBV a également été déterminée par PCR en temps réel dans ces populations cellulaires. Les niveaux de cytokines ont été mesurés dans le plasma et le liquide synovial de patients AR et OA.

Résultats. Le TLR2 est fortement exprimé au niveau des monocytes sanguins et synoviaux CD14⁺⁺ CD16⁻ et CD14⁺⁺ CD16⁺ isolés de patients AR tandis que son expression demeure inchangée sur les monocytes de patients OA. Les niveaux d'expression de TLR9 sont augmentés sur les trois sous-populations monocytaires sanguines ainsi que les neutrophiles, et est également accrue sur les monocytes synoviaux CD14⁺⁺ CD16⁺ et les neutrophiles. La présence d'EBV a été décelée dans les monocytes et les neutrophiles de patients AR et peut refléter la production d'IL-10 ainsi que l'absence de TNF α dans les liquides synoviaux des articulations de patients AR.

Conclusion. Nos résultats suggèrent que les TLR2 et TLR9 exprimés au niveau des monocytes et des neutrophiles ont un rôle important à jouer dans la progression de l'AR. La présence du génome d'EBV au niveau des monocytes et des neutrophiles renforce l'hypothèse selon laquelle ce virus serait impliqué dans la progression de l'AR.

Enhanced expression of Toll-like receptors 2 and 9 on monocyte subsets and neutrophils of rheumatoid arthritis patients

RUNNING HEAD: Monocytes in rheumatoid arthritis

TITLE: ENHANCED EXPRESSION OF TOLL-LIKE RECEPTORS 2 AND 9 ON MONOCYTE SUBSETS AND NEUTROPHILS OF RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS

Patricia Lacerte, B.Sc.* , Alexandre Brunet, Ph.D.* , Jacques P. Brown, M.D.† and Jean Gosselin Ph.D.*

* Laboratory of Innate Immunology, Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CHUL) and Department of Molecular Medicine, Laval University, Québec, QC, Canada

† Department of Rheumatology, Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CHUL), Québec, QC, Canada

This work was supported by a grant from The Canadian Institutes of Health Research (to J.G. and J.P.B.). P.L. is recipient of a studentship from The Canadian Institutes of Health Research.

Corresponding author: Dr. Jean Gosselin
Laboratory of Innate Immunology
Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CHUL)
2705 Laurier Boulevard, Room T 4-50
Québec, QC, G1V 4G2, Canada
Phone: 418-525-4444 ext. 46165 Fax: 418-654-2127
E-mail: jean.gosselin@crchul.ulaval.ca

There is no conflict of interest with regard to this work.

ABSTRACT

Objective. Synovial infiltration of monocytes and neutrophils is commonly associated with chronic inflammation in rheumatoid arthritis (RA) through the activation of toll-like receptors (TLRs) and secretion of inflammatory cytokines. We assessed the expression levels of TLR2 and TLR9 in three monocyte subsets and neutrophils isolated from RA patients and also tested the presence of the EBV genome in these cell populations.

Methods. Expression levels of TLR2 and TLR9 in purified blood and synovial CD14⁺⁺ CD16⁻, CD14⁺⁺ CD16⁺ and CD14^{low} CD16⁺⁺ monocytes and neutrophils from RA and osteoarthritic (OA) patients were assessed by flow cytometry. The presence of EBV genome was also determined by real-time PCR in these cell populations. Cytokine levels were measured in plasma and synovial fluids of RA and OA patients.

Results. TLR2 is abundantly expressed on blood and synovial CD14⁺⁺ CD16⁻ and CD14⁺⁺ CD16⁺ monocytes from RA patients while its expression remained unchanged on monocytes of OA patients. Expression levels of TLR9 were increased on all three subsets of blood monocytes and neutrophils and markedly enhanced on synovial CD14⁺⁺ CD16⁺ monocytes and neutrophils. The presence of EBV detected in monocytes and neutrophils of RA patients may reflect the production of IL-10 and the absence of TNF α in synovial fluids of RA joints.

Conclusion. Our results suggest that both TLR2 and TLR9 expressed on monocytes and neutrophils play an active role in the progression of RA. The presence of the EBV genome in monocytes and neutrophils reinforces the suspected role of this virus in the progression of RA.

INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease that is characterized by chronic joint inflammation that progressively leads to cartilage and bone destruction. It is generally believed that genetic factors are involved in the susceptibility to develop RA, but evidence also suggests that environmental factors, including viral infections, may have an incidence on the disease. RA is characterized by synovial hyperplasia and inflammation resulting from a massive infiltration of inflammatory cells, including monocytes and neutrophils (1). These cells play a key role in the progression of the disease through the production of pro-inflammatory cytokines that leads to the development of an inflammatory environment and immune cell recruitment in RA joint. Following their migration to the joint, polarization of monocytes will give rise to two subsets of macrophages, M1 considered as pro-inflammatory through the production of TNF α and IL-1, and M2 macrophages which refer to an anti-inflammatory role via an IL-10 activity (2, 3).

In humans, monocytes are a heterogeneous cell population composed of three distinct subsets, based on their expression of CD14 and CD16 (4). The CD14⁺⁺ CD16⁻ classical subset that accounts for 80-90% of all circulating monocytes, is rapidly recruited to the sites of inflammation and modulates the production of pro-inflammatory cytokines (5, 6). The second monocyte subset expresses high levels of CD14 and low levels of CD16 (CD14⁺⁺ CD16⁺), is referred to as pro-inflammatory through their production of inflammatory cytokines such as TNF α and IL-1 β and is increased in blood of patients with acute inflammation (7). The third subset are nonclassical monocytes that express low levels of CD14 and high levels of CD16 (CD14^{low} CD16⁺⁺), and are referred to as patrolling monocytes (8). The two CD16⁺ subsets are thus recognized to expand in various inflammatory diseases while CD16⁻ monocytes remain unchanged or may decrease. However, their specific functions remain to be clarified.

Monocytes express a wide range of innate immune receptors, including toll-like receptors (TLRs). These receptors function as detectors to recognize microbial motifs and several debris and intracellular molecules released from necrotic cells (9, 10). Triggering of TLRs by various stimuli leads to the activation of signaling pathway that culminates in the production of pro-inflammatory cytokines, a process driving aberrant and chronic inflammation in joints of RA patients (reviewed in (11)). The role of TLRs in arthritis became underlined by the fact that resident and infiltrating cells in the inflamed joint expressed various TLRs. While their functional roles are not yet clearly defined, different studies attempted to identify which TLRs are associated with severity of RA. Indeed, TLR3 and TLR4 were found to be highly expressed in the synovial fibroblasts from RA patients (12). Abundant expression of TLR2 was also detected in the synovial tissue of RA patients compared to patients with osteoarthritis (13, 14). Monocytes and differentiated macrophages isolated from RA patients also showed an increased expression of TLR2 as compared to those from other forms of inflammatory arthritis (15).

Expression levels of TLR2 were also found to be increased in CD16⁺ blood monocytes isolated from RA patients compared to healthy controls (16). While these observations suggested that TLR2 may contribute to sustaining inflammation in joints, its role in RA pathogenesis remains speculative.

Little is known about the stimuli capable to trigger signals that result in synovial tissue damage. Viral infection has long been speculated to be a potential factor in RA and for many years, Epstein-Barr virus (EBV) has been considered as a leading candidate underlying autoimmune diseases including RA (17-19). EBV shows high prevalence in the population and persists in latently infected cells with continuous viral reactivation. This virus has also the potential to modulate the immune system and to infect monocytes and neutrophils (20, 21), two key cellular populations activated in RA. For these reasons, EBV is seen as a plausible candidate in triggering autoimmune diseases like RA.

The results presented in this study show that monocyte subsets and neutrophils isolated from RA patients express elevated levels of both TLR2 and TLR9 compared to controls. Interestingly, a significant fraction of blood monocytes and neutrophils from these patients were found to contain the EBV genome, supporting its possible contribution in the exacerbation of inflammation in susceptible RA patients.

MATERIALS AND METHODS

Ethics Statement. Experiments were performed in accordance with an internal review board-approved protocol at le Centre Hospitalier Universitaire de Québec (Laval University, Québec, Canada) (#105.05.06). All healthy donors and patients gave their written informed consent.

Cohort recruitment. Peripheral blood samples were obtained from twenty-two rheumatoid arthritis (RA) and eight osteoarthritis (OA) patients. As controls, blood samples from ten EBV-seropositive healthy donors were tested. Controls donors were not matched for age or sex with either RA or OA patients. When clinically indicated, synovial fluids sampled from inflamed knee joints of three OA and seven RA patients were investigated for the presence of monocyte subsets and concentrations of inflammatory cytokines. Clinical features of selected patients are presented in table 1. EBV serology (IgG antibodies to Early Antigen (EA), Epstein-Barr nuclear antigen 1 (EBNA-1) and Viral Capsid Antigen (VCA)) was also assayed in sera of RA patients by ELISA (DIASource, Belgium) and showed a marked increase of anti-EBV antibodies as compared to healthy EBV-seropositive donors, suggesting an active replication of the virus in these patients (data not shown).

Isolation of peripheral blood leukocytes and cells from synovial fluids. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated using Ficoll density gradient (Wisent, Québec, Canada). Blood monocytes were next enriched by cell adherence on autologous plasma-coated petri dishes as previously described (22). Monocytes were enriched from synovial fluids (SF) with the same approach. Blood neutrophils from RA and OA patients and healthy volunteers were isolated as previously described (20, 23).

Flow cytometry. Enriched blood and synovial fluid monocytes were washed twice in Hanks Balanced Salt Sodium (HBSS; Wisent) and stained with PE/Cy7-conjugated anti-CD14 (clone M5E2), A647-conjugated anti-CD16 (clone 3G8) (BD Biosciences), FITC-conjugated anti-TLR2 (clone TL2.1) or FITC-conjugated anti-TLR9 (clone 5G5) (Hycult Biotech, Uden, The Netherlands). Monocytes were fixed and permeabilized prior to TLR9 staining (22). Cells were subsequently washed twice and resuspended in HBSS supplemented with 1% bovine serum albumin (BSA; Wisent) for flow cytometry analysis. Classical, intermediate and nonclassical monocytes were specifically identified and analyzed by selective gating strategy based on their CD14 and CD16 expression as followed: CD14⁺⁺ CD16⁻ (classical), CD14⁺⁺ CD16⁺ (intermediate) and CD14^{low} CD16⁺⁺ (nonclassical). Expression of TLR2 and TLR9 was analyzed on each monocyte subset. Sample analyses were performed on a BD FACS SORP LSR II and data analyzed with the BD FACS Diva software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Neutrophils were stained with FITC-conjugated anti-TLR2 or with FITC-conjugated anti-

TLR9. Neutrophil purity (> 98%) was determined using intracellular staining with an anti-myeloperoxidase (MPO) antibody (clone 5B8, BD Biosciences).

DNA extraction and real-time PCR analysis. Enriched blood monocytes were resuspended in TRIzol Reagent (Life Technologies, Ontario, Canada) and DNA extraction was performed according to the manufacturer's instructions. DNA was amplified using GoTaq qPCR MasterMix (Promega, Madison, WI, USA) on a Rotor Gene 3000 (Montreal Biotech Inc., Montreal, Canada). The following primers were used to detect BamHI-W EBV gene (21) (**NCBI reference sequence NC_007605, Human herpesvirus 4 type 1 complete genome, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/82503188>**) (forward: 5'-GCG CCA TTT TGT CCC CAC GC-3' and reverse: 5'-TGG CCT AGC AAC GCG AAC CC-3') and human glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (hGAPDH) gene (forward: 5'-ATG CTG CAT TCG CCC TCT TAA TGG-3' and reverse: 5'-AGG CGC CCA ATA CGA CCA AAT CTA-3'). Purified DNA from EBV-positive B-cell line (B95.8; Advanced Biotechnologies Inc., Columbia, MD, USA) was used as positive control for BamHI-W amplification.

Cytokine measurement. Levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and tumor necrosis factor (TNF) were determined in the sera and in synovial fluids from RA and OA patients, using cytometric bead array system (CBA Flex Set; BD Biosciences). Samples were analyzed with BD FACS CANTO II and data analyzed by FCAP Array software (BD Biosciences).

Statistical analysis. Nonparametric one-way analysis of variance (Kruskal-Wallis test) followed by a Dunns post-hoc test were used to compare multiple groups. A nonparametric Student's t-test (Mann-Whitney) (unpaired, two-tailed) was performed for two experimental groups. Analyses were completed with PRISM 5 software version 5.04 (GraphPad software, La Jolla, CA). Differences were considered significant at * $p \leq 0.05$.

RESULTS

Increased levels of TLR2 and TLR9 are observed on blood monocyte subsets of RA patients.

Monocytes play a crucial role in the inflammatory process associated to RA. Because three distinct monocyte subpopulations are now defined, we have first determined the frequency of these monocyte subsets during active RA. We observed a significant increase for both CD14⁺⁺ CD16⁺ and CD14^{low} CD16⁺⁺ monocytes, while detecting a decrease of CD14⁺⁺ CD16⁻ monocytes in blood of RA patients as compared to the proportion of monocyte subsets in healthy volunteers (data not shown). A similar profile was observed in OA patients. This is in line with previous reports showing that CD16⁺ monocytes expand in inflammatory conditions and CD16⁻ subset can remain unchanged or decrease (24, 25). Since monocyte subsets can recognize various ligands through TLRs, we next wanted to determine whether TLR2 and TLR9 expression is increased in blood monocyte subsets of RA and OA patients compared to healthy controls. We chose to evaluate the expression of these sensors because TLR2 is abundantly expressed on monocytes and its expression was reported to be increased on CD14⁺⁺ CD16⁺ monocyte subset of RA patients (16), and TLR9 is known to sense host DNA released by damaged cells in systemic lupus erythematosus patients (26). Enriched blood monocytes from RA and OA patients and healthy controls were stained with anti-CD14, -CD16, -TLR2 and -TLR9 for flow cytometry analyses and monocyte subsets were gated as P1 (CD14⁺⁺ CD16⁻), P2 (CD14⁺⁺ CD16⁺) and P3 (CD14^{low} CD16⁺⁺) (Fig. 1A-B). The number of TLR2 positive CD14⁺⁺ CD16⁻ and CD14⁺⁺ CD16⁺ monocytes was found to significantly increase in RA patients as compared to healthy controls (Fig. 1C). Interestingly, the mean fluorescence intensities (MFI) of TLR2 expression were markedly higher in both CD14⁺⁺ CD16⁻ and CD14⁺⁺ CD16⁺ monocytes of RA patients (Fig. 1D), suggesting that these blood monocyte subsets could have been activated by TLR2 stimuli. In contrast, expression levels of TLR2 do not significantly change on monocytes of OA patients.

In healthy individuals, the number of monocytes expressing TLR9 is relatively low ((27), and personal observations). However, we observed that frequencies of circulating monocyte subsets expressing TLR9 were significantly increased in RA patients and, to a lesser extent, in OA patients as well (Fig. 1E). Indeed, we noted that the expression of TLR9 was increased on all three subsets of monocytes ranging from 22% on CD14⁺⁺ CD16⁻ to 52% on CD14⁺⁺ CD16⁺ and to 25% on CD14^{low} CD16⁺⁺. Furthermore, the expression levels of TLR9 were also higher on all subpopulations of monocytes from both RA and OA patients as compared to healthy volunteers (Fig. 1F). Such increased expression of TLR2 and especially of TLR9 on the monocyte subsets of RA patients suggests that these cells were already activated in blood of patients before their migration into the joints. In addition, the large amount of monocytes expressing TLR9 could designate this TLR as one of the key sensors that may drive chronic joint inflammation in RA patients.

Recruitment of monocyte subsets in synovial fluids of RA patients.

Synovial infiltration of monocytes is recognized as one of the key features in chronic inflammation (28). Following their recruitment to the joints, they can precipitate events leading to severe inflammation. To further examine whether monocyte profiles are similar in blood and in synovial fluids, we have next evaluated the frequency of monocyte subsets that migrate into the joints of RA patients and determined their respective expression levels of TLR2 and TLR9 (Fig. 2A). While all three subsets of monocytes have been detected in the synovial fluids of patients, it appears that a larger proportion of CD14⁺⁺ CD16⁻ and CD14⁺⁺ CD16⁺ monocytes infiltrate the joint (Fig. 2A-B). Percentage of CD14⁺⁺ CD16⁻ monocytes was found to be comparable in blood and synovial fluids while the number of CD14⁺⁺ CD16⁺ was higher in synovial fluids. These data indicate that intermediate CD14⁺⁺ CD16⁺ monocytes are massively recruited to inflamed tissues compared to other monocytes subsets and since they are known to play a pro-inflammatory role in several diseases (29), their presence in synovial fluid may contribute to the severity of joint inflammation in RA patients.

Furthermore, when looking for the expression levels of TLR2 and TLR9 on different subsets of monocytes isolated from synovial fluids of RA patients, we observed that expression levels of TLR2 were strongly increased on CD14⁺⁺ CD16⁻ and on CD14⁺⁺ CD16⁺ monocytes, while TLR9 seems to be abundantly expressed on CD14⁺⁺ CD16⁺ monocytes as compared to other phenotypes (Fig. 2C). The presence of both TLR2 and TLR9 on monocyte subsets reinforces their plausible pro-inflammatory role in the progression of arthritis.

Increased proportion of blood neutrophils expressing TLR9 in RA patients.

Massive infiltration of neutrophils in the joints is a typical feature of arthritis. Because this cell population expresses several TLRs and can release pro-inflammatory mediators, we next wanted determine whether the expression of TLR2 and TLR9 is also increased in blood neutrophils of RA patients (Fig. 3A). While not significant, the number of blood neutrophils expressing TLR2 at their cellular surface was found to increase in RA and OA patients compared to controls (Fig. 3B). However, the proportion of neutrophils expressing TLR9 was found to be markedly enhanced in blood of RA patients. Similarly, we detected a very high percentage of neutrophils expressing TLR9 ($\approx 90\%$) in synovial fluids of RA patients (Fig. 3B). These data suggest that like monocytes, circulating neutrophils were potentially activated before their migration to the joints, as reflected by the increased expression of TLR9 at their surface.

Presence of the EBV genome in monocytes and neutrophils of RA patients.

In addition to cellular debris, TLRs can be activated by viral components in the synovial tissue, a process that may also contribute to the exacerbation of inflammatory symptoms. It has long been suspected that viral

infection could enhance the severity of arthritis and disease flares in susceptible RA patients. Since many years, EBV is considered as a leading candidate in arthritis exacerbation (18, 30, 31). In addition, we have reported that EBV infects primary human monocytes and neutrophils (20, 21) and is recognized by TLR2 and TLR9 (22, 32). These observations prompted us to evaluate the presence of EBV genome in circulating monocytes and neutrophils of RA patients. Following DNA extraction from enriched blood monocytes and neutrophils, we performed a real-time PCR to amplify the BamHI-W repeated sequence of EBV genome. Interestingly, the presence of EBV genome was detected in circulating monocytes of 50% of RA patients tested, suggesting its reactivation from latency in these patients (Table 2). In addition, EBV genome was also detected in neutrophils from five of these patients. These results are in line with our previous study showing that neutrophils from infectious mononucleosis patients harbor EBV genome (20). The presence of EBV genome in blood monocytes of 3 OA patients indicates that reactivation of EBV is not specific to RA but could also be observed in other autoimmune diseases. In addition, we observed that monocytes from synovial fluids of three patients harbor the EBV genome, one of them also showing EBV positive neutrophils (Table 2), suggesting that both monocytes and neutrophils could contribute to the transport of the virus into the joints of patients.

Finally, we have measured the levels of various cytokines in the plasma and in synovial fluids of RA and OA patients. The results indicate that blood cells from both RA and OA patients secrete TNF α . However, while measured in plasma, production of TNF α was not detected in synovial fluids of RA patients which could be due to the presence of EBV-infected cells in the synovium. Indeed, the production of IL-10 and IL-6 was found to be strongly active in synovial fluids of RA patients compared to OA (Fig. 4). Since EBV is known to induce IL-6 secretion from monocytes (33) and also the synthesis of IL-10 which is known to exert immunosuppressive effects on the immune response (34, 35), it is possible that the presence of these mediators in the synovial fluids of RA patients could be a consequence of EBV reactivation in recruited cells like monocytes and neutrophils. We must also consider that the presence of IL-10 detected in synovial fluids could also be associated with IL-10-producing regulatory B cells which are sensitive to EBV infection and present in RA patients (36).

DISCUSSION

A growing body of evidence suggests that TLRs are involved in the pathogenesis of inflammatory diseases through their association with the production of cytokines (10, 37-39). Circulating monocytes, which give rise to tissue macrophages, are believed to play a significant role in chronic inflammation and joint destruction. We have observed a significant increase of both subsets of circulating CD16⁺ monocytes (CD14⁺⁺ CD16⁺ and CD14^{low} CD16⁺⁺) in RA patients which may reflect a level of activation and differentiation of monocytes in blood of these patients and also an active migration of monocytes from the bone marrow to the blood stream (data not shown). On the other hand, the decrease of blood CD14⁺⁺ CD16⁻ monocytes detected could reflect a constant recruitment of these cells to the inflamed tissue. Indeed, these cells which are the most prevalent subset of monocytes are recognized to be rapidly recruited to the site of inflammation. Our results showing that CD14⁺⁺ CD16⁻ monocytes are abundantly detected in synovial fluids of RA patients are in line with this assumption. Furthermore, the high percentage of CD14⁺⁺ CD16⁺ monocytes in synovial fluids indicates that these cells also migrate to the RA joint. We have next determined the expression levels of TLR2 and TLR9 on each monocyte subset. We chose TLR2 because it is expressed on cell membrane of monocytes and can recognize various ligands including microbial ligands and structures released from dead cells in inflamed tissues. TLR9 was chosen as a “second line” detector since it is expressed inside the cell and recognizes both microbial and human DNA motifs. Interestingly, TLR2 expression level was strongly increased on blood CD14⁺⁺ CD16⁻ and CD14⁺⁺ CD16⁺ of RA patients but remains unchanged on monocytes of OA patients. This suggests that TLR2 could be differently regulated in RA or could have somehow a different role in RA than in OA. On the other hand, expression of TLR9 was enhanced on all three subsets of monocytes of RA patients and at a lesser extent, on blood monocytes of OA patients. The exact roles of TLR2 and TLR9 in RA are still unknown and remain speculative. The presence of TLR2 on synovial tissues and macrophages of patients with clinically active disease was suggested to contribute to symptom severity through the production of inflammatory cytokines (13, 15, 40). Similarly, the enhanced expression of TLR2 on CD16⁺ monocytes was proposed to reflect the monocyte maturation during disease activity and contribute to the recognition of endogenous ligands when localized in synovium (16). In line with these results, we observed that two major subsets of monocytes, CD16⁺ and CD16⁻, isolated from RA patients express high levels of TLR2. Indeed, such enhanced expression of TLR2 could be essential to monocyte differentiation or could be linked to macrophage polarization in the synovium following its activation by specific ligands. In addition, it is also plausible that following migration into the joint, monocytes expressing TLR2 can be activated by specific stimuli leading to the secretion of chemotactic factors involved in the recruitment of blood inflammatory cells into the joint. These aspects remain, however, to be investigated.

Regarding TLR9, little is known about its role in RA. However, the therapeutic effect of chloroquine, an inhibitor of TLR9 signaling, suggests that TLR9 might participate to the severity of inflammatory symptoms in RA (41). The fact that we found that all blood and synovial monocyte subsets, particularly CD14⁺⁺ CD16⁺ monocytes, strongly express TLR9, suggests the potential role of this TLR in RA. Interestingly, this increased expression of TLR9 was also detected on blood and synovial neutrophils of RA patients. Neutrophils being essential to control invading agents and eliminate debris from damaged cells, such enhanced expression of TLR9 in neutrophils may thus reflect their degree of activation which may have deleterious impact when accumulating in joint tissue. In light of our observations, we propose that both TLR2 and TLR9 could be implicated in the pathogenesis of RA. TLR2 may generate the first signal following recognition of self molecules released from damaged cells, and TLR9 creates a feedback loop by binding DNA motifs internalized by phagocytes like neutrophils and macrophages. The combined activation of TLR2 and TLR9 may thus contribute to sustain inflammation in joints of RA patients by inducing a wide range of chemokines and cytokines. In the absence of efficient mechanisms that can regulate such “amplification loop”, an excessive production of inflammatory mediators may result in an increased severity of RA symptoms.

In addition to self molecules, infectious organisms in joints of RA patients may possibly trigger TLRs leading to an exacerbation of disease symptoms and abnormal host immune response. Interestingly, we found that EBV genome is present in monocytes of at least 50% of RA patients. Neutrophils from five of those RA patients were also found to contain EBV genome. These observations are thus in perfect agreement with our previous studies showing that EBV can infect monocytes (21) and neutrophils of patients suffering from severe infectious mononucleosis (20). Therefore, since EBV is recognized by both TLR2 and TLR9 and can also enhance TLR9 expression following its entry into monocytes (22, 32), we presume that TLR2 and TLR9 can be activated by self molecules but also by viral components in the synovial compartment, a mechanism causing arthritis exacerbation in susceptible RA patients. In other words, TLR2 and TLR9 integrate signals from various agonists including viral triggers like EBV in the synovium, which may contribute to sustain chronic inflammation observed in RA patients. Our observations also reinforce the link that infectious agent may lead to arthritis exacerbation and disease flares in susceptible patients. Indeed, despite good adherence to their DMARDs (like methotrexate and hydroxychloroquine), some patients show severe intermittent fluctuations of clinical activity of the disease. Because these drugs may suppress elements of the immune system, it is possible that their use in long-term therapy could affect immune surveillance of latent infection like EBV. This aspect must be investigated. In the whole, our results highlight the combined potential of TLR2 and TLR9 in the pathophysiology of RA and suggest the possible involvement of an opportunistic pathogen like EBV, in the exacerbation of RA symptoms.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Linda Brown for collection of blood samples and Louis Bessette for contributing to patient recruitment. We also thank Carine Paquet-Bouchard for technical assistance and Pierrette Côté for secretarial support.

REFERENCES

1. Strand V, Kimberly R, Isaacs JD. Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(1):75-92.
2. Hasan D, Chalouhi N, Jabbour P, Hashimoto T. Macrophage imbalance (M1 vs. M2) and upregulation of mast cells in wall of ruptured human cerebral aneurysms: preliminary results. *J Neuroinflammation.* 2012;9:222.
3. Kennedy A, Fearon U, Veale DJ, Godson C. Macrophages in synovial inflammation. *Frontiers in immunology.* 2011;2:52.
4. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(11):762-74.
5. Amir O, Spivak I, Lavi I, Rahat MA. Changes in the monocytic subsets CD14(dim)CD16(+) and CD14(++)CD16(-) in chronic systolic heart failure patients. *Mediators of inflammation.* 2012;2012:616384.
6. Mehta NN, Reilly MP. Monocyte mayhem: do subtypes modulate distinct atherosclerosis phenotypes? *Circ Cardiovasc Genet.* 2012;5(1):7-9.
7. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual review of immunology.* 2009;27:669-92.
8. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, et al. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity.* 2010;33(3):375-86.
9. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 2010;140(6):805-20.
10. Foell D, Wittkowski H, Roth J. Mechanisms of disease: a 'DAMP' view of inflammatory arthritis. *Nature clinical practice Rheumatology.* 2007;3(7):382-90.
11. Goh FG, Midwood KS. Intrinsic danger: activation of Toll-like receptors in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2012;51(1):7-23.
12. Ospelt C, Brentano F, Rengel Y, Stanczyk J, Kolling C, Tak PP, et al. Overexpression of toll-like receptors 3 and 4 in synovial tissue from patients with early rheumatoid arthritis: toll-like receptor expression in early and longstanding arthritis. *Arthritis and rheumatism.* 2008;58(12):3684-92.
13. Radstake TR, Roelofs MF, Jenniskens YM, Oppers-Walgreen B, van Riel PL, Barrera P, et al. Expression of toll-like receptors 2 and 4 in rheumatoid synovial tissue and regulation by proinflammatory cytokines interleukin-12 and interleukin-18 via interferon-gamma. *Arthritis and rheumatism.* 2004;50(12):3856-65.
14. Seibl R, Birchler T, Loeliger S, Hossle JP, Gay RE, Saurenmann T, et al. Expression and regulation of Toll-like receptor 2 in rheumatoid arthritis synovium. *The American journal of pathology.* 2003;162(4):1221-7.
15. Huang Q, Ma Y, Adebayo A, Pope RM. Increased macrophage activation mediated through toll-like receptors in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism.* 2007;56(7):2192-201.
16. Iwahashi M, Yamamura M, Aita T, Okamoto A, Ueno A, Ogawa N, et al. Expression of Toll-like receptor 2 on CD16+ blood monocytes and synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism.* 2004;50(5):1457-67.
17. Balandraud N, Roudier J, Roudier C. Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 2004;3(5):362-7.
18. Costenbader KH, Karlson EW. Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis: is there a link? *Arthritis research & therapy.* 2006;8(1):204.
19. Saal JG, Krimmel M, Steidle M, Gerneth F, Wagner S, Fritz P, et al. Synovial Epstein-Barr virus infection increases the risk of rheumatoid arthritis in individuals with the shared HLA-DR4 epitope. *Arthritis and rheumatism.* 1999;42(7):1485-96.
20. Larochelle B, Flamand L, Gourde P, Beauchamp D, Gosselin J. Epstein-Barr virus infects and induces apoptosis in human neutrophils. *Blood.* 1998;92(1):291-9.
21. Savard M, Belanger C, Tardif M, Gourde P, Flamand L, Gosselin J. Infection of primary human monocytes by Epstein-Barr virus. *Journal of virology.* 2000;74(6):2612-9.

22. Fiola S, Gosselin D, Takada K, Gosselin J. TLR9 contributes to the recognition of EBV by primary monocytes and plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol.* 2010;185(6):3620-31.
23. Gaudreault E, Paquet-Bouchard C, Fiola S, Le Bel M, Lacerte P, Shio MT, et al. TAK1 contributes to the enhanced responsiveness of LTB(4)-treated neutrophils to Toll-like receptor ligands. *Int Immunol.* 2012;24(11):693-704.
24. Hristov M, Weber C. Differential role of monocyte subsets in atherosclerosis. *Thrombosis and haemostasis.* 2011;106(5):757-62.
25. van de Veerdonk FL, Netea MG. Diversity: a hallmark of monocyte society. *Immunity.* 2010;33(3):289-91.
26. Barrat FJ, Meeker T, Gregorio J, Chan JH, Uematsu S, Akira S, et al. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *The Journal of experimental medicine.* 2005;202(8):1131-9.
27. Papadimitraki ED, Choulaki C, Koutala E, Bertsias G, Tsatsanis C, Gergianaki I, et al. Expansion of toll-like receptor 9-expressing B cells in active systemic lupus erythematosus: implications for the induction and maintenance of the autoimmune process. *Arthritis and rheumatism.* 2006;54(11):3601-11.
28. Smeets TJ, Barg EC, Kraan MC, Smith MD, Breedveld FC, Tak PP. Analysis of the cell infiltrate and expression of proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases in arthroscopic synovial biopsies: comparison with synovial samples from patients with end stage, destructive rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2003;62(7):635-8.
29. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *Journal of leukocyte biology.* 2007;81(3):584-92.
30. Bokarewa M, Tarkowski A, Magnusson M. Pathological survivin expression links viral infections with pathogenesis of erosive rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol.* 2007;66(2-3):192-8.
31. Toussiroit E, Roudier J. Pathophysiological links between rheumatoid arthritis and the Epstein-Barr virus: an update. *Joint Bone Spine.* 2007;74(5):418-26.
32. Gaudreault E, Fiola S, Olivier M, Gosselin J. Epstein-Barr virus induces MCP-1 secretion by human monocytes via TLR2. *Journal of virology.* 2007;81(15):8016-24.
33. Gosselin J, Flamand L, D'Addario M, Hiscott J, Stefanescu I, Ablashi DV, et al. Modulatory effects of Epstein-Barr, herpes simplex, and human herpes-6 viral infections and coinfections on cytokine synthesis. A comparative study. *J Immunol.* 1992;149(1):181-7.
34. Brennan FM. Interleukin 10 and arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 1999;38(4):293-7.
35. Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF, Trounstein ML, Khan TA, Mosmann TR. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science.* 1990;248(4960):1230-4.
36. Kalampokis I, Yoshizaki A, Tedder TF. IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease. *Arthritis research & therapy.* 2013;15 Suppl 1:S1.
37. O'Neill LA. Primer: Toll-like receptor signaling pathways--what do rheumatologists need to know? *Nature clinical practice Rheumatology.* 2008;4(6):319-27.
38. Seibl R, Kyburz D, Lauener RP, Gay S. Pattern recognition receptors and their involvement in the pathogenesis of arthritis. *Current opinion in rheumatology.* 2004;16(4):411-8.
39. Shotorbani SS, Su ZL, Xu HX. Toll-like receptors are potential therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *World journal of biological chemistry.* 2011;2(7):167-72.
40. Sacre SM, Andreakos E, Kiriakidis S, Amjadi P, Lundberg A, Giddins G, et al. The Toll-like receptor adaptor proteins MyD88 and Mal/TIRAP contribute to the inflammatory and destructive processes in a human model of rheumatoid arthritis. *The American journal of pathology.* 2007;170(2):518-25.
41. Kyburz D, Brentano F, Gay S. Mode of action of hydroxychloroquine in RA-evidence of an inhibitory effect on toll-like receptor signaling. *Nature clinical practice Rheumatology.* 2006;2(9):458-9.

Tableau 3- 1: Clinical features of selected patients.

	RA (n = 22)	OA (n = 8)
Gender M/F	2/20	5/3
Age (\pm SD)	57.3 \pm 11.2	63.0 \pm 7.9
Disease duration (year \pm SD)	4.6 \pm 6.7	N.A.
CRP(\pm SD) mg/l	11 \pm 9	4 \pm 1.6
ESR (\pm SD) mm/h	18.0 \pm 2.9	N.A.
RF (+) [n(%)]	9 (41%)	0
ACPA (+) [n(%)]	6 (27%)	0
DAS 28-CRP	5.1 \pm 1.5	N.A.

CRP: C-reactive protein, RF: rheumatoid factor, ACPA: anti-citrullinated protein – peptide antibodies, ESR: erythrocyte sedimentation rate. N.A.: not applicable.

Data are mean \pm SD.

Tableau 3- 2: Presence of EBV genome in blood and synovial cells.

Cell populations	Blood			Synovial Fluids	
	Healthy controls	RA patients	OA patients	RA patients	OA patients
Monocytes	1/10	11/22	3/8	3/7	0/3
Neutrophils	0/10	5/22	1/8	1/7	0/3

Monocytes and neutrophils were isolated from blood of healthy controls, RA and OA patients and from synovial fluids of patients presenting inflamed joints. DNA was extracted and analyzed by real-time PCR for the presence of BamH1-W sequence in the EBV genome as detailed in material and methods. Results are presented as number of positive samples over all donors tested. RA: rheumatoid arthritis. OA: osteoarthritis.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. TLR2 and TLR9 expression on blood monocytes subsets of RA patients. Flow cytometry analysis of TLR2 and TLR9 expression on blood monocytes subsets from (A) healthy controls and (B) RA patients. TLR2 and TLR9 positive cells appear in red. P1: CD14⁺⁺ CD16⁻. P2: CD14⁺⁺ CD16⁺. P3: CD14^{low} CD16⁺⁺. Gating strategy of monocytes subsets from one representative donor. Percentage (%) of positive cells for (C) TLR2 and (E) TLR9 expression in monocyte subsets of healthy controls, RA and OA patients (horizontal bars represent median) and mean fluorescence intensity (MFI) (mean \pm SEM) for (D) TLR2 and (F) TLR9 receptors. * $p \leq 0.05$ as compared to healthy controls. RA: rheumatoid arthritis. OA: osteoarthritis.

FIGURE 2. Expression levels of TLR2 and TLR9 on recruited monocyte subsets in synovial fluids of RA patients. (A) Flow cytometry analysis of monocyte subsets isolated from blood and synovial fluids of RA patients. P1: CD14⁺⁺ CD16⁻. P2: CD14⁺⁺ CD16⁺. P3: CD14^{low} CD16⁺⁺. Gating strategy from one representative RA patient. (B) Percentage (%) of blood and synovial fluid monocyte subsets from RA patients. (C) Expression of TLR2 and TLR9 is presented as % of positive monocyte subsets in synovial fluid of RA patients. Values represent the mean \pm SEM.

FIGURE 3. Expression of TLR2 and TLR9 on neutrophils of RA patients. (A) Flow cytometry analysis of TLR2 and TLR9 expression in neutrophils isolated from blood and synovial fluids. TLR2 and TLR9 positive neutrophils are represented by purple histograms whereas isotype control is represented by gray histograms. Data are representative of one RA patient. (B) Percentage (%) of positive cells for TLR2 or TLR9 expression in blood neutrophils isolated from healthy controls, RA and OA patients and in neutrophils from synovial fluid of RA patients. Median is expressed by horizontal bar. * $p \leq 0.05$ as compared to healthy controls. RA: rheumatoid arthritis. OA: osteoarthritis.

FIGURE 4. Cytokine levels in plasma and in synovial fluids of RA patients. Cytokine expression levels were assessed in plasma and synovial fluid from OA and RA patients by cytometric bead array: (A) IL-10, (B) TNF, (C) MCP-1 and (D) IL-6. Mean is expressed by the horizontal bar. * $p \leq 0.05$. RA: rheumatoid arthritis. OA: osteoarthritis. Cytokine levels were not detectable in plasma from healthy volunteers.

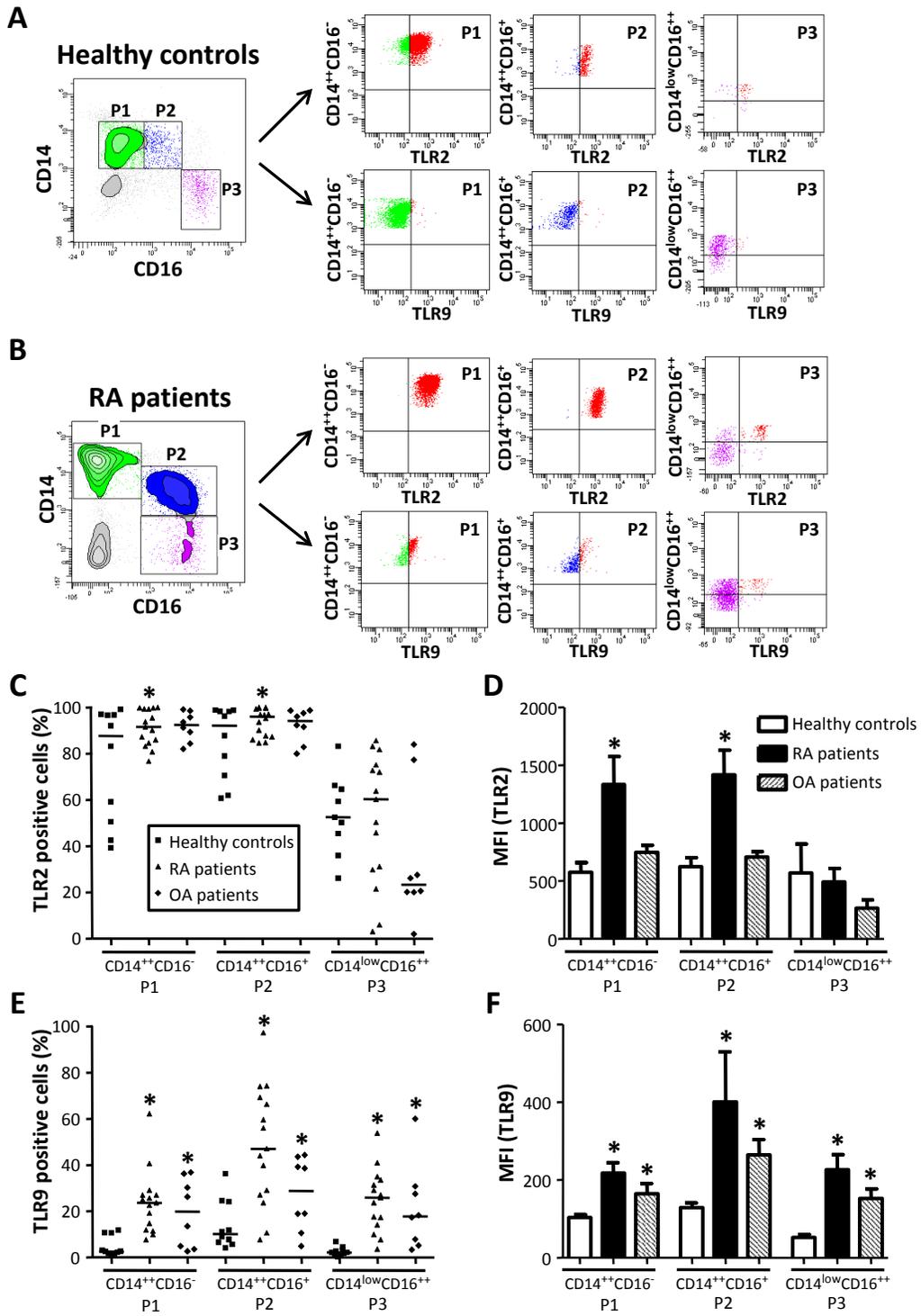


Figure 3- 1: TLR2 and TLR9 expression on blood monocytes subsets of RA patients.

FIGURE 2

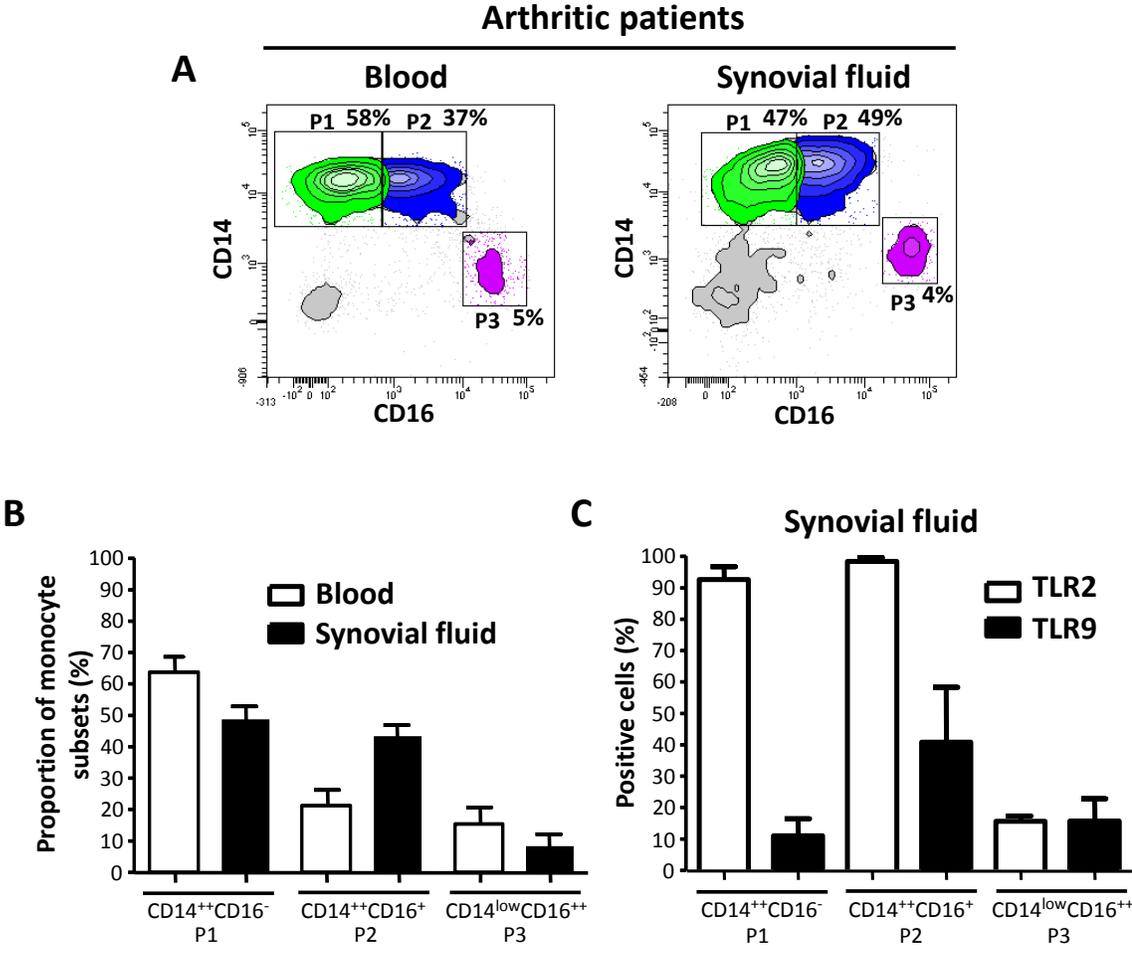


Figure 3- 2: Expression levels of TLR2 and TLR9 on recruited monocyte subsets in synovial fluids of RA patients.

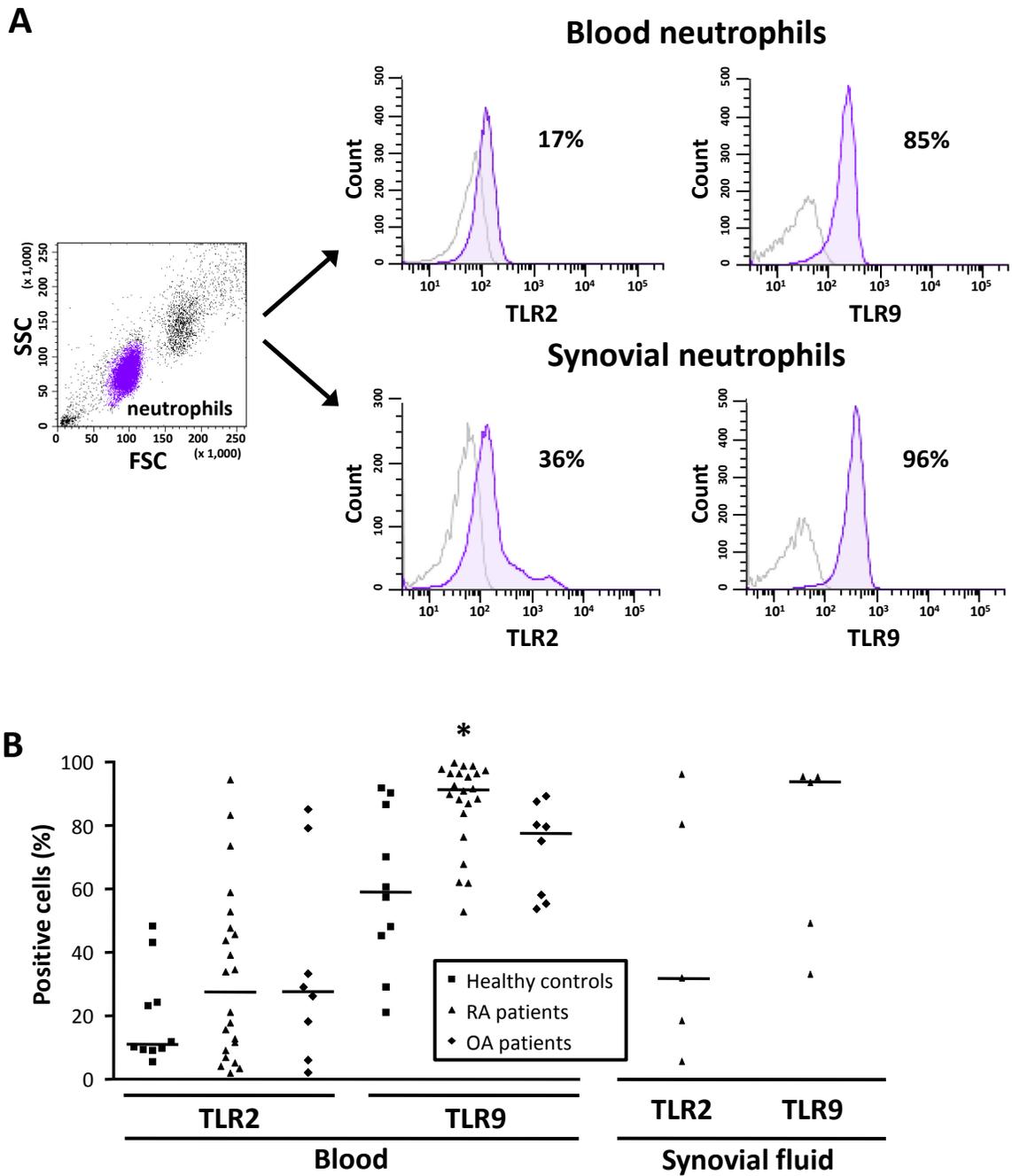


Figure 3- 3: Expression of TLR2 and TLR9 on neutrophils of RA patients.

FIGURE 4

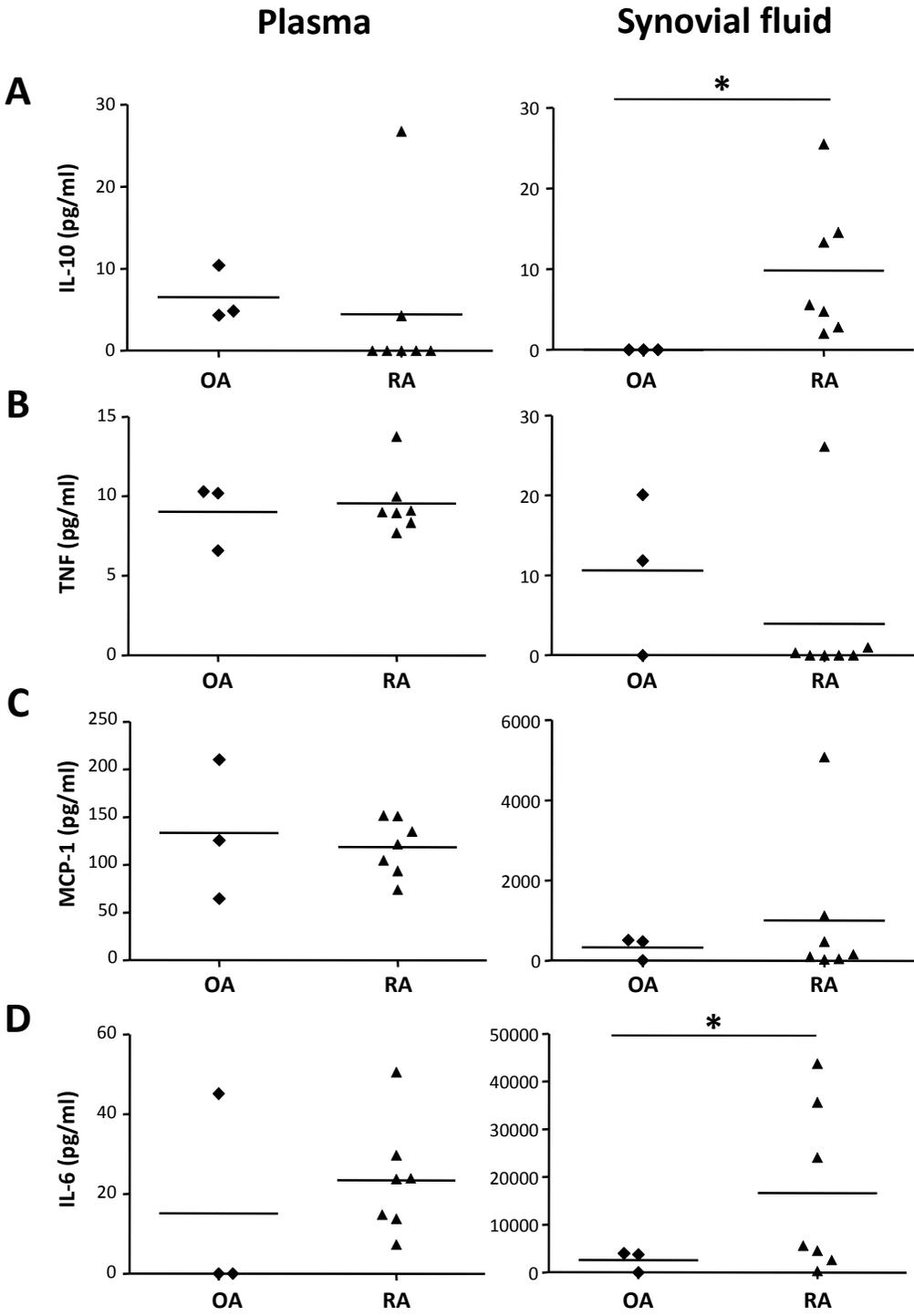


Figure 3- 4: Cytokine levels in plasma and in synovial fluids of RA patients.

CHAPITRE 4: Discussion et conclusion

Discussion

L'arthrite rhumatoïde est une pathologie complexe et multifactorielle. De nos jours, la littérature met en évidence l'implication de plusieurs facteurs génétiques dans l'étiologie de cette maladie. De plus, de nombreux facteurs environnementaux sont suspectés d'être impliqués dans le déclenchement de l'AR. Au fil des ans, plusieurs études ont été réalisées afin de mieux caractériser l'implication de ces facteurs environnementaux. Bien que ces facteurs soient variés (13-17), l'infection par EBV est le mieux caractérisé à ce jour. Malgré les étonnants progrès réalisés dans ce domaine, il est important de souligner qu'aucun lien direct n'a pu être établi entre ce pathogène et l'AR. Cependant, on sait que la seule présence d'EBV ne peut pas causer le déclenchement de la maladie. En effet, cette affirmation repose sur le fait que l'on remarque une grande disparité entre la prévalence mondiale d'EBV (plus de 90%) et celle des personnes atteintes d'AR (environ 1%) (96). À ce jour, il nous est impossible de déterminer si EBV a réellement un rôle à jouer dans la pathogénèse de l'AR à titre de facteur environnemental. Ce problème a précédemment été soulevé dans un article scientifique mentionnant qu'il est impossible de déterminer si l'anormalité de la réponse immunitaire anti-EBV est une cause ou une conséquence de l'AR (13). En effet, il demeure plausible que la réactivation de ce pathogène, ainsi que les anomalies sérologiques et cellulaires observées chez les patients arthritiques ne soient que des conséquences d'un système immunitaire déjà affaibli. EBV étant un pathogène opportuniste, il pourrait simplement profiter de cette baisse de la surveillance immunitaire afin de sortir de latence et se répliquer.

Malgré le fait que l'implication réelle d'EBV dans l'AR ne soit toujours pas confirmée, nous pouvons supposer que ce virus est responsable des manifestations inflammatoires aiguës observées chez environ 30% des patients souffrant d'AR. En effet, certains patients présentent des phases inflammatoires cycliques et transitoires pour lesquelles aucune cause sous-jacente n'a pu être déterminée. Il est probable que la médication immunosuppressive administrée aux patients soit responsable de telles manifestations, menant ainsi à un contrôle inapproprié de la réactivation d'EBV entraînant, par le fait même, l'exacerbation de l'inflammation articulaire. Toutefois, cette hypothèse demeure sous étude à ce jour.

La mise au point de modèles murins d'arthrite a permis de faciliter la caractérisation des causes sous-jacentes de l'AR. Cependant, ces modèles nécessitent l'utilisation de l'homologue murin d'EBV, soit MHV-68, étant donné le tropisme limité d'EBV pour son hôte (162). D'ailleurs, MHV-68 permet de causer une maladie similaire à la mononucléose infectieuse humaine occasionnée par la transmission du virus EBV (163). Cette dernière caractéristique ainsi que l'importante homologie entre les deux pathogènes (150, 151, 162) font de MHV-68 un excellent candidat afin de réaliser une étude sur l'implication de l'infection herpétique dans la progression de l'arthrite.

À ce jour, plusieurs équipes de recherche ont démontré la présence d'EBV au niveau des tissus synoviaux de patients atteints d'AR (22, 138). En accord avec ces observations, l'équipe de Yarilin *et coll.* a observé que l'infection herpétique causée par MHV-68 entraîne une exacerbation de l'inflammation articulaire dans un modèle murin de transfert de sérum arthritique (K/BxN). De plus, ils ont décelé la présence du génome viral au niveau d'homogénats de chevilles de souris arthritiques. Ces constatations leur ont permis de formuler une hypothèse selon laquelle ce virus pourrait être transporté jusqu'aux articulations à la suite de l'infection des cellules recrutées à la cavité synoviale (121). En se basant sur cette hypothèse, nous nous sommes alors intéressés à l'identification des cellules impliquées dans le processus de recrutement viral aux articulations de souris arthritiques. Les résultats de cette étude figurent dans le premier manuscrit (voir chapitre 2) du présent mémoire. Au cours de cette étude, nous avons confirmé que l'infection par MHV-68 cause une augmentation significative de l'inflammation articulaire chez les souris arthritiques. De plus, nous pouvons suggérer que ce processus est spécifique à MHV-68 puisque l'infection par les virus herpétiques mCMV et HSV-1 n'entraîne pas d'exacerbation des symptômes inflammatoires. Il nous est donc possible de croire que l'administration d'un agent antiviral pourrait entraîner une diminution de l'inflammation articulaire des souris arthritiques infectées avec MHV-68. Afin de confirmer cette théorie, nous avons administré du cidofovir (Vistide®) aux souris arthritiques infectées avec MHV-68. Il nous a été possible d'observer une diminution significative de l'inflammation articulaire chez les souris traitées avec l'agent antiviral comparativement aux animaux n'ayant pas reçu le traitement. À la lumière de ces résultats, il nous est possible de confirmer que MHV-68 est directement impliqué dans l'exacerbation de l'inflammation articulaire. Nous pouvons espérer que le même phénomène puisse également se produire chez les patients souffrant d'AR. Nous proposons donc un modèle dans lequel un pathogène opportuniste ayant la capacité d'entrer en latence pourrait être impliqué dans l'exacerbation des symptômes liés à la maladie. Ce pathogène pourrait tirer profit de la baisse du système immunitaire causée par l'administration d'un agent immunosuppresseur pour sortir de latence, se réactiver, entraîner une production massive de médiateurs inflammatoires et ainsi causer l'augmentation de l'inflammation articulaire. Bien entendu, il ne s'agit là que de suppositions, car nous n'avons aucune preuve nous permettant d'en arriver à de telles conclusions. Dans notre modèle murin, puisque MHV-68 est impliqué dans l'exacerbation des symptômes inflammatoires et que ce pathogène a la capacité d'entrer en latence, cela permet de supporter son implication dans le processus. D'autre part, une étude a permis de démontrer que l'administration de cyclophosphamide (Cytosan®) à des souris arthritiques porteuses du virus MHV-68 latent cause une augmentation de l'inflammation articulaire (121). Ce résultat peut être expliqué par le fait que ce médicament a la capacité d'induire une immunodéficience transitoire. Ainsi, son administration pourrait entraîner la réactivation du pathogène latent qui induirait ensuite une augmentation des symptômes inflammatoires. Ce résultat d'étude permet d'ailleurs de supporter notre hypothèse et le modèle que nous proposons.

Lors de nos expérimentations, des hausses significatives de la sécrétion de MCP-1 et de RANTES ont pu être observées dans le sérum et le liquide articulaire de souris arthritiques infectées avec MHV-68. Ces observations nous ont alors permis de suspecter une augmentation de la quantité de monocytes au niveau de la circulation sanguine et de la cavité synoviale. MCP-1 et RANTES sont deux molécules chimioattractantes qui causent un recrutement important de monocytes et qui sont reconnues pour leur implication dans la pathogénèse de l'AR (199-201). Par conséquent, le fait que ces molécules se retrouvent en forte concentration au niveau du liquide articulaire de souris arthritiques nous permet de suspecter un important recrutement de monocytes aux articulations. Les monocytes ont la capacité de produire un large éventail de cytokines pro-inflammatoires et leur infiltration au niveau de la cavité synoviale pourrait résulter en une exacerbation de l'inflammation articulaire. La présente étude nous a permis de démontrer une augmentation de la proportion des monocytes inflammatoires dans la circulation sanguine. De plus, nous avons observé que le recrutement subséquent de cette sous-population cellulaire aux articulations inflammées de souris arthritiques infectées avec MHV-68 est modulé à la hausse. Il est important de noter que ce phénomène n'a pas pu être observé avec les monocytes sentinelles Ly6C^{low}, ce qui nous permet de croire à une implication importante des monocytes inflammatoires Ly6C^{high} dans l'exacerbation de l'inflammation articulaire. Néanmoins, la présence d'une plus grande proportion de monocytes inflammatoires comparativement aux cellules sentinelles peut être expliquée par leur fonction respective. En effet, les monocytes Ly6C^{low} patrouillent la circulation sanguine, tandis que les cellules Ly6C^{high} sont rapidement recrutées aux sites d'infection et d'inflammation (44). Ainsi, la forte inflammation articulaire induite à la suite de l'injection de sérum arthritique, de même que la présence d'une infection aiguë permettent d'expliquer l'importante concentration de monocytes Ly6C^{high} au niveau des articulations. De plus, les transferts adoptifs de monocytes sentinelles et inflammatoires ont permis de démontrer que ces cellules migrent respectivement vers les tissus non-inflammés et inflammés (43). Il demeure néanmoins évident que les monocytes sentinelles ont également un rôle central à jouer dans l'exacerbation de l'inflammation articulaire. Il nous est possible d'en arriver à cette conclusion puisque la littérature soutient de plus en plus que les monocytes sentinelles représentent les cellules précurseurs des monocytes inflammatoires (44, 45). Par la suite, nous avons répété cette expérience en infectant les souris avec mCMV et n'avons pas observé d'augmentation de la proportion de monocytes sanguins chez les souris arthritiques infectées avec ce pathogène aux jours 1, 3 et 6 post-infection. Cette dernière observation permet, dans un premier temps, de confirmer que mCMV n'est pas impliqué dans l'exacerbation de l'inflammation articulaire. Ensuite, cela nous permet de renforcer le rôle central des monocytes dans ce processus.

L'analyse par qPCR de tissus synoviaux de souris arthritiques prélevés quatre jours suivant l'infection nous a permis d'y révéler la présence du génome de MHV-68. Par la suite, nous avons répété cette même expérience en infectant les souris à l'aide des virus herpétiques mCMV et HSV-1. Il nous a été impossible de détecter la

présence du virus HSV-1, mais nous avons pu détecter le génome de mCMV au niveau des tissus synoviaux de souris arthritiques. Néanmoins, le nombre de particules virales détectées étaient statistiquement inférieures chez les souris infectées avec mCMV comparativement à MHV-68. Il serait donc possible que le virus mCMV puisse, tout comme MHV-68, atteindre les articulations. Ce résultat n'est pas surprenant puisqu'il est reconnu que les monocytes ont un rôle important à jouer dans la dissémination d'une infection par mCMV (202). Ainsi, puisqu'une importante quantité de monocytes est recrutée aux articulations dans notre modèle murin d'arthrite, la détection du génome de mCMV au niveau des tissus synoviaux était attendue. Cependant, puisque l'infection de souris arthritiques par le virus mCMV n'entraîne pas d'augmentation de l'inflammation articulaire, nous pouvons présumer que la réplication de ce pathogène au niveau du tissu synovial est moins importante que celle de MHV-68. Une analyse similaire d'échantillons prélevés dix jours suivant l'infection nous a permis de détecter la présence du génome de MHV-68 mais pas de mCMV. Ce résultat nous permet donc de croire à la véracité de notre hypothèse, mais des analyses complémentaires seront nécessaires afin de confirmer cette dernière. Néanmoins, il nous est possible de suggérer que le virus mCMV a la capacité de se rendre aux articulations à la suite de l'infection des cellules y étant recrutées. Ce pathogène pourrait ensuite se répliquer au niveau du tissu synovial durant une courte période de temps. Il sortirait ensuite de la cavité synoviale afin d'augmenter la dissémination de l'infection. Dans le cas d'HSV-1, nos observations nous permettent de confirmer que ce pathogène est dans l'incapacité de se rendre aux articulations de souris arthritiques. L'absence de ce virus au niveau des tissus synoviaux de souris arthritiques prélevées quatre et dix jours suivant l'infection nous permettent d'en venir à une telle conclusion. Ce pathogène ne serait également pas impliqué dans l'exacerbation des symptômes inflammatoires puisque les souris arthritiques infectées avec HSV-1 ne présentent pas une inflammation articulaire supérieure à celle du groupe non infecté. Ces observations pourraient être expliquées par le fait qu'il est reconnu que le virus HSV-1 est dans l'incapacité d'infecter les monocytes (203). Néanmoins, les différents articles traitant de cette caractéristique ont été réalisés à l'aide de cellules humaines. Il serait donc intéressant d'effectuer des expérimentations *in vitro* sur la permissivité des monocytes murins à l'infection par HSV-1. Toutefois, si la théorie selon laquelle les cellules murines ne sont pas permissives à ce type d'infection s'avérait exacte, cela permettrait de confirmer que les monocytes ont un rôle crucial à jouer dans le transport de différents virus aux articulations inflammées dans un modèle murin d'arthrite. En combinant ces différents résultats, nous pouvons conclure que MHV-68 est spécifiquement impliqué dans l'exacerbation des symptômes inflammatoires à la suite de son transport dans les articulations de souris arthritiques.

Il nous a également été possible de détecter la présence du génome de MHV-68 de façon importante au niveau des monocytes inflammatoires sanguins (Ly6C^{high} CD11b⁺) et, dans une moindre mesure, au niveau des monocytes sentinelles (Ly6C^{low} CD11b⁺). Ces résultats nous permettent donc de confirmer la capacité pour MHV-68 à infecter les monocytes *in vivo*. La capacité de MHV-68 à infecter les monocytes inflammatoires

et l'important recrutement de cette sous-population cellulaire au liquide articulaire sont des observations qui nous permettent de croire que ces cellules pourraient être responsables du transport viral jusqu'à la cavité synoviale. Tel que mentionné précédemment, la détection du génome viral majoritairement au niveau des monocytes inflammatoires comparativement aux cellules sentinelles peut être expliquée par la fonction respective de ces deux sous-populations monocytaires. Ce faisant, puisque les monocytes sentinelles sont également permissifs à l'infection par MHV-68, il n'est pas exclu que ces cellules pourraient également avoir un rôle à jouer dans le transport viral jusqu'aux articulations inflammées.

L'utilisation de souris déficientes pour les gènes CCR2 ou CX3CR1 (« C-X3-C motif chemokine receptor 1 ») avait pour objectif de confirmer les résultats obtenus dans la présente étude. Les gènes CCR2 et CX3CR1 codent pour des récepteurs de molécules chimioattractantes permettant de différencier les sous-populations monocytaires murines. En effet, la littérature reconnaît que les monocytes inflammatoires expriment une forte quantité de CCR2 et une faible quantité de CX3CR1 (CCR2⁺ CX3CR1^{low}). Pour ce qui est des monocytes sentinelles, ils expriment fortement le CX3CR1 mais pas le CCR2 (CCR2⁻ CX3CR1^{high}) (35). Il est également intéressant de noter que les macrophages de type M1 expriment CCR2 mais pas CX3CR1 (CCR2⁺ CX3CR1⁻), tandis que les macrophages de type M2 possèdent le phénotype opposé (CCR2⁻ CX3CR1⁺) (204). Il a précédemment été suggéré que le récepteur CCR2 est impliqué dans la sortie des monocytes inflammatoires de la moelle osseuse et dans le recrutement subséquent de ces cellules aux sites d'infection (43, 205, 206). Quant à CX3CR1, il permettrait le recrutement des monocytes sentinelles, et, par la même occasion, des monocytes inflammatoires aux sites d'infection et d'inflammation (42, 43). L'évaluation de l'inflammation articulaire nous a permis de constater que les souris CCR2-déficientes infectées par MHV-68 présentent une inflammation articulaire statistiquement inférieure à celle observée chez les souris arthritiques infectées C57Bl/6 sauvages (« wild-type », WT). De plus, l'absence du gène CCR2 entraîne une diminution marquée de la présence des monocytes inflammatoires au niveau du liquide articulaire et suggère ainsi l'implication de ces cellules dans l'exacerbation des symptômes inflammatoires. Ensuite, tel que nous l'avons mentionné précédemment, il est reconnu que les macrophages de type M1 expriment également le CCR2. Ainsi, il est suggéré que l'absence du gène CCR2 altère le recrutement de ces cellules. Il est intéressant de noter que les macrophages de type M1 ont un rôle pro-inflammatoire. En effet, ces cellules sont responsables de la production d'un large éventail de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et l'IL12 (204). Une proportion réduite de monocytes inflammatoires et de macrophages de type M1 au niveau des articulations pourrait permettre d'expliquer l'inflammation articulaire réduite observée chez les souris arthritiques CCR2^{-/-} infectées. En effet, ces cellules pourraient avoir un rôle important à jouer dans le transport et dans la dissémination de l'infection par MHV-68. Parallèlement, nous avons comparé l'inflammation articulaire des souris arthritiques WT et CCR2-déficientes non infectées et n'avons pas observé de différence majeure entre les deux groupes. Cela nous permet de conclure que l'absence du gène CCR2 n'a pas d'impact majeur sur le processus

inflammatoire induit à la suite de l'injection de sérum arthritique. Cependant, nous pouvons constater que MHV-68 n'entraîne pas l'exacerbation de l'inflammation articulaire chez les souris CCR2-déficientes, ce qui suggère l'implication des monocytes inflammatoires et des macrophages de type M1 dans le processus. Nous pouvons donc conclure que le récepteur CCR2 joue un rôle central dans le processus inflammatoire induit par l'infection à MHV-68. L'injection de sérum arthritique aux souris CX3CR1^{-/-} mène à la manifestation de symptômes inflammatoires similaires à ceux observés chez les souris WT. Ainsi, la délétion de CX3CR1 ne semble pas avoir d'impact sur la progression de l'inflammation articulaire. De plus, la quantité de monocytes présents au niveau du liquide articulaire est semblable lorsque l'on compare les souris CX3CR1^{-/-} et les souris WT. En résumé, les monocytes inflammatoires et les macrophages de type M1 semblent jouer un rôle important dans la progression de l'inflammation articulaire induite par l'infection à MHV-68. De plus, l'important recrutement de monocytes inflammatoires aux articulations inflammées et la capacité du virus MHV-68 à infecter cette sous-population cellulaire nous permet de suggérer que ces cellules sont impliquées dans le transport viral et, subséquemment, dans la progression de l'inflammation articulaire. Ces résultats nous permettent également de confirmer que le recrutement des monocytes inflammatoires du sang vers les articulations inflammées se produit à l'aide d'un mécanisme CCR2-dépendant. Nous pouvons également conclure que les monocytes inflammatoires (Ly6C^{high}) et sentinelles (Ly6C^{low}), de même que les macrophages de type M1 et M2 n'ont pas de rôle central à jouer dans l'initiation de l'inflammation articulaire dans le modèle de transfert de sérum K/BxN. Il nous est possible d'en arriver à cette conclusion puisque la délétion des gènes CCR2 et CX3CR1 n'entraîne pas de diminution de l'inflammation articulaire en l'absence du virus MHV-68. À la lumière de ces résultats, nous proposons donc que les monocytes et les macrophages ne représentent pas des acteurs majeurs dans l'initiation du processus inflammatoire dans un modèle murin d'arthrite. Cependant, ces cellules auraient un rôle central à jouer dans la progression des symptômes (par exemple à la suite d'une infection ou d'une réactivation virale). Les résultats que nous avons obtenus jusqu'à présent permettent également de corroborer cette hypothèse. Ainsi, d'autres cellules, tels que les neutrophiles, pourraient initier le processus inflammatoire. Néanmoins, puisqu'il est reconnu que les monocytes et les macrophages sont impliqués dans la pathogénèse de l'AR humaine, nous ne pouvons pas exclure l'implication de ces cellules dans l'initiation de la maladie. Il serait donc intéressant de caractériser l'implication des monocytes et des macrophages dans le processus à l'aide d'expérimentations complémentaires.

Le déplacement des monocytes inflammatoires a ensuite été suivi grâce au transfert adoptif de cette sous-population cellulaire. Pour y parvenir, ces cellules ont été isolées de la moelle osseuse de souris GFP^{+/-} (souris transgéniques pour la « green fluorescent protein »). Les monocytes inflammatoires (Ly6C^{high} CD11b⁺ GFP⁺) ont ensuite été infectés *in vitro* avec le virus MHV-68 puis injectés à des souris arthritiques CCR2-déficientes. L'expression de la GFP par ces cellules nous a alors permis de suivre leur déplacement au niveau du sang et du tissu synovial des souris arthritiques CCR2-déficientes. Le virus a été détecté par qPCR au

niveau des articulations inflammées de ces souris 90 minutes suivant le transfert adoptif. Ce résultat nous permet donc de confirmer que les monocytes inflammatoires migrent rapidement vers les tissus inflammés transportant, par la même occasion, le virus MHV-68. Malheureusement, il nous a été impossible de détecter la présence du génome viral ultérieurement. Ainsi, nous croyons que le virus aurait plutôt migré vers des tissus lymphoïdes, comme la rate. D'ailleurs, nous avons confirmé cette hypothèse à la suite de la détection du génome viral au niveau de cet organe 48 heures suivant le transfert adoptif. Une analyse par qPCR, précédant le transfert adoptif, nous a permis de confirmer que les monocytes inflammatoires injectés aux souris arthritiques CCR2-déficientes étaient bel et bien infectés avec MHV-68. Par conséquent, ces résultats confirment la capacité de ce pathogène à infecter les monocytes inflammatoires *in vitro*. Cette caractéristique est d'ailleurs partagée avec son homologue, le virus Epstein-Barr. En effet, la présence du génome d'EBV avait préalablement été observée dans le noyau de monocytes primaires humains (98). Nos résultats démontrent également que les monocytes inflammatoires sont recrutés aux articulations de souris arthritiques, transportant, du même coup, le pathogène. Il aurait également été intéressant d'effectuer le même type de manipulations mais, cette fois-ci, en infectant des monocytes sentinelles. La très faible concentration de ces cellules au niveau de la moelle osseuse rend toutefois l'expérience irréalisable. L'utilisation de cellules sanguines s'est donc avérée être une bonne alternative, cependant, il nécessitait une trop grande quantité de souris afin d'obtenir le nombre de monocytes sentinelles désirés pour le transfert adoptif.

Dans la littérature, l'implication des monocytes dans la pathogénèse de l'AR est bien définie (29, 30). En effet, ces cellules sont recrutées aux articulations lors de la production de molécules chimioattractantes. Selon notre théorie, les monocytes pourraient agir à titre de transporteur du virus MHV-68. Lors de son entrée dans la cavité synoviale, le virus pourrait se répliquer et ainsi être reconnu par les récepteurs des cellules avoisinantes. À la suite de la reconnaissance virale, une importante quantité de cytokines pro-inflammatoires seraient relâchées dans la cavité synoviale causant ainsi une exacerbation de l'inflammation articulaire. Nous ne disposons pas de preuve permettant de conclure que MHV-68 a la capacité de se répliquer au niveau des monocytes. Néanmoins, la détection de transcrits lytiques d'EBV au niveau de monocytes sanguins humains laisse présager qu'un phénomène similaire est probable dans un modèle murin (98). Ainsi, des expérimentations subséquentes seront nécessaires afin de pouvoir répondre à cette question. Néanmoins, nous pouvons conclure que les monocytes inflammatoires peuvent être infectés par MHV-68 *in vitro* mais également *in vivo*. De plus, le recrutement de cette sous-population cellulaire est spécifiquement augmenté au niveau du liquide articulaire des souris arthritiques infectées par MHV-68 et il se produit de façon CCR2-dépendante. Ainsi, il est probable que l'entrée du pathogène au niveau du tissu synovial représente l'élément déclencheur de l'exacerbation des symptômes inflammatoires. À la lumière de ces résultats, il nous est également possible de confirmer que les monocytes sentinelles ont la capacité d'être infectés par MHV-68 *in vivo*. Malheureusement, pour les raisons précédemment évoquées, il nous est impossible de confirmer la

capacité de ce pathogène à infecter ces cellules *in vitro*. Cependant, nous ne pouvons pas écarter la possibilité que cette sous-population monocytaire ait un rôle à jouer dans le transport viral jusqu'aux articulations inflammées.

Dans la présente étude, il nous a été possible d'observer une augmentation de la sécrétion de MCP-1, de RANTES, d'IFN- γ , de TNF, d'IL-12p70 et d'IL-6 dans le sérum de souris arthritiques infectées par MHV-68 comparativement au groupe non infecté. De plus, de fortes concentrations de MCP-1, de RANTES et d'IFN- γ ont été détectées au niveau du liquide articulaire de ces mêmes souris. L'IFN- γ est une cytokine ayant la capacité d'induire la polarisation des macrophages en cellules de type M1. Ces dernières cellules sont reconnues pour leur caractère pro-inflammatoire puisqu'elles permettent, entre autres, la production de TNF et d'IL-6. Les macrophages de type M1 contribuent donc à exacerber les dommages tissulaires (207). Ainsi, il est possible de croire qu'une forte concentration d'IFN- γ au niveau de la cavité synoviale pourrait entraîner la polarisation d'une importante quantité de macrophages en cellules de type M1 exacerbant, par la même occasion, le processus inflammatoire et la destruction articulaire. Il serait intéressant d'étudier cette possibilité en analysant plus spécifiquement les sous-populations de macrophages. Nous avons ensuite mesuré les niveaux d'IL-6 au niveau du sérum de souris arthritiques infectées ou non avec mCMV. Aucune différence n'a pu être observée entre le groupe arthritique infecté et non infecté. Ce résultat permet, encore une fois, de confirmer que mCMV n'entraîne pas l'exacerbation des symptômes inflammatoires dans un modèle murin de transfert de sérum arthritique.

Précédemment, nous avons démontré une reconnaissance synergique d'EBV par les TLR2 et TLR9 des monocytes (198). Il est donc probable que ces mêmes récepteurs soient impliqués dans le processus inflammatoire. Des données non disponibles dans le présent mémoire nous ont permis de confirmer que les TLRs sont réellement impliqués dans l'exacerbation de l'inflammation articulaire causée par l'infection herpétique. En effet, nous avons utilisé des souris MyD88-, TRIF- ou TLR2-déficientes et avons pu observer que les récepteurs empruntant la voie MyD88-dépendante sont nécessaires à l'induction de l'inflammation articulaire dans un modèle murin de transfert de sérum arthritique (K/BxN). De plus, chez les souris TLR2-déficientes, l'infection par MHV-68 diminue significativement l'inflammation articulaire comparativement aux souris non infectées. Ensuite, la lignée de souris arthritiques TLR2-déficientes a été comparée avec des souris WT et ces résultats nous ont permis de confirmer ceux précédemment obtenus par Huang *et coll* (175). En effet, ils avaient démontré que l'inflammation articulaire induite par l'injection de sérum arthritique était plus importante chez les souris TLR2-déficientes que chez les animaux WT (175). Ainsi, l'absence de ce récepteur entraînerait un dérèglement du contrôle de l'inflammation articulaire, suggérant ainsi un effet protecteur du TLR2. De plus, puisque l'infection par MHV-68 n'entraîne pas d'augmentation significative de l'inflammation articulaire, nous pouvons suggérer que ce récepteur joue un rôle central dans la reconnaissance virale au

niveau de la cavité synoviale. D'ailleurs, l'implication de ce récepteur dans la reconnaissance du virus MHV-68 a précédemment été démontrée par notre équipe de recherche (208). En effet, la reconnaissance de ce pathogène par le TLR2 entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN de type I. La sécrétion de ces médiateurs inflammatoires a pu être partiellement abrogée lors de l'utilisation de souris TLR2-déficientes. Les résultats obtenus ont donc permis de démontrer l'implication du TLR2 dans l'immunité antivirale dirigée contre ce pathogène (208). À la lumière de ces observations et de nos résultats, il serait probable que la reconnaissance de MHV-68 au niveau de la cavité synoviale de souris arthritiques puisse avoir lieu grâce au TLR2. Ces résultats permettent également de suggérer l'implication de ce récepteur dans la progression des symptômes liés à l'arthrite. Nous proposons donc que MHV-68 pourrait être transporté jusqu'aux articulations à la suite du recrutement des monocytes à la cavité synoviale. La reconnaissance subséquente de ce pathogène par le TLR2 entraînerait la production de cytokines pro-inflammatoires et de molécules chimioattractantes qui induiraient un important recrutement cellulaire aux articulations. Ces molécules pourraient également mener à la différenciation des monocytes en macrophages ainsi que la polarisation subséquente de ces cellules. L'activation de ces cellules de même que la sécrétion massive de cytokines pro-inflammatoires entraîneraient une boucle de rétroaction menant à l'exacerbation de l'inflammation articulaire.

En résumé, ces observations permettent de démontrer l'implication des monocytes dans le transport du virus MHV-68 jusqu'aux articulations, causant ainsi l'exacerbation des symptômes inflammatoires. De par son importante homologie avec le virus MHV-68, il nous est possible de penser que le même type de résultats pourrait être obtenu avec le virus Epstein-Barr chez les patients souffrant d'AR. Des études complémentaires sur des échantillons sanguins et synoviaux provenant de patients atteints d'AR pourraient nous permettre de prouver l'implication d'EBV dans la progression de cette pathologie. Ainsi, nous avons recruté une cohorte constituée de donneurs sains et de patients souffrant d'AR et d'OA afin d'analyser leurs sous-populations monocytaires. Il s'agit du second manuscrit (voir chapitre 3) du présent mémoire. Nous avons observé que la proportion des monocytes intermédiaires ($CD14^{++} CD16^{+}$) et non-classiques ($CD14^{low} CD16^{++}$) est significativement augmentée chez les patients AR et OA comparativement aux donneurs sains. Les résultats obtenus étaient prévisibles puisqu'une étude antérieure avait déjà démontré que la proportion de monocytes pro-inflammatoires humains ($CD14^{+} CD16^{+}$) est augmentée chez les patients souffrant d'AR (29, 31). De plus, la présence des monocytes pro-inflammatoires ($CD14^{+} CD16^{+}$) semble directement proportionnelle à l'inflammation articulaire et à la sévérité de la maladie. En effet, ils ont observé une corrélation positive entre la proportion de monocytes pro-inflammatoires humains et le taux de CRP, l'ESR et le RF (29, 31). Ainsi, plus la maladie est agressive, plus le taux de monocytes pro-inflammatoires est élevé au niveau de la circulation sanguine ce qui alimente le processus inflammatoire. Cependant, il faut préciser que ces études n'ont pas permis de différencier les monocytes intermédiaires des non-classiques. En effet, on croyait auparavant que

les monocytes humains, tout comme les cellules murines, étaient subdivisés en deux sous-populations : les cellules classiques (CD14⁺ CD16⁻) et pro-inflammatoires (CD14⁺ CD16⁺). Des études ultérieures ont ensuite permis de reconnaître l'existence d'une troisième sous-population. Ainsi, la plupart de ces recherches n'ont probablement pas pu identifier correctement l'origine de cette importante proportion de monocytes pro-inflammatoires sanguins observée chez les patients arthritiques (29, 31). Néanmoins, une étude récente a démontré une augmentation significative de la proportion de monocytes intermédiaires (CD14⁺⁺ CD16⁺) chez les patients arthritiques tandis que celles des cellules classiques et non-classiques demeuraient inchangées (37). Ainsi, ils ont été les premiers à suggérer l'implication des monocytes intermédiaires dans la pathogénèse de l'AR (37). Les résultats que nous avons obtenus nous permettent de confirmer ces récentes découvertes. Toutefois, nos résultats diffèrent de ceux obtenus par Rossol *et coll.*, car nous avons plutôt observé une hausse des cellules CD14⁺⁺ CD16⁺ et CD14^{low} CD16⁺⁺ (37). Ces divergences peuvent être le résultat du recrutement d'une cohorte de patients présentant une pathologie à un stade plus avancé ou arborant une importante inflammation articulaire. Toutefois, il ne s'agit là que de suppositions. Afin de pouvoir en arriver à une conclusion à ce sujet, le recrutement de deux cohortes de patients AR distinctes serait nécessaire. Le premier groupe pourrait être composé de patients présentant une inflammation articulaire de faible intensité, tandis que la seconde cohorte comporterait des patients AR arborant une importante inflammation articulaire. Il serait également intéressant d'utiliser des cohortes de patients présentant une maladie à un stade plus ou moins avancé afin de comparer les divers résultats obtenus. L'étude présentée au chapitre 3 du présent mémoire nous a néanmoins permis de démontrer que les pourcentages des sous-populations monocytaires sont très similaires lorsque nous comparons les groupes de patients AR et OA. Ainsi, l'implication des monocytes intermédiaires et non-classiques dans la pathogénèse de l'AR ne serait pas un phénomène spécifique à cette maladie. En effet, il serait possible de croire que ces cellules ont un rôle tout aussi important à remplir dans la pathogénèse d'autres maladies inflammatoires, telle que l'OA.

Parallèlement, des échantillons de liquides synoviaux de patients atteints d'AR ont été analysés afin de déterminer la proportion des diverses sous-populations monocytaires s'y trouvant. Les résultats obtenus ont ensuite été comparés à ceux provenant des échantillons sanguins. Ainsi, nous avons démontré une proportion de monocytes intermédiaires CD14⁺⁺ CD16⁺ augmentée ainsi qu'une diminution de la quantité de cellules non-classiques CD14^{low} CD16⁺⁺ au niveau de la synovie des patients atteints d'AR. Ces observations permettent de suggérer que les cellules CD14⁺⁺ CD16⁺ sont impliquées dans la pathogénèse de l'AR. En effet, leur forte présence dans le liquide synovial suggère un recrutement plus important de cellules intermédiaires que des deux autres sous-populations monocytaires aux articulations de patients AR. Cette sous-population monocyttaire étant majoritairement responsable de la production de TNF et d'IL-1, l'importante présence de ces cellules chez les patients atteints d'AR pourrait entraîner l'exacerbation des symptômes liés à la maladie (36). Néanmoins, la diminution de la proportion des monocytes sanguins classiques CD14⁺⁺ CD16⁻ ne nous

permet toutefois pas d'infirmier que ces cellules ont un rôle central à jouer dans la pathogénèse de l'AR. En effet, de par leur fonction pro-inflammatoire, il est fort probable que ces cellules aient plutôt migré vers les articulations inflammées. Il est intéressant de noter qu'il nous effectivement été possible d'observer une importante proportion de monocytes CD14⁺⁺ CD16⁻ au niveau du liquide synovial de patients atteints d'AR. Pour ce qui est des monocytes synoviaux non-classiques CD14^{low} CD16⁺⁺, la faible proportion de ces cellules comparée aux autres sous-populations monocytaires au niveau de la cavité synoviale peut également être expliquée à l'aide de leur fonction. Les cellules non-classiques représentent l'équivalent humain des monocytes sentinelles murins. Ainsi, leur fonction est de patrouiller la circulation sanguine (36), permettant ainsi d'expliquer la faible concentration de cette sous-population monocyttaire au niveau du liquide synovial de patients atteints d'AR. Si l'on compare les résultats obtenus dans la portion humaine et murine de ce projet, il nous est possible de constater que la proportion des monocytes ayant une fonction pro-inflammatoire est augmentée au niveau du liquide synovial. Cela nous permet donc de confirmer l'implication de ces sous-populations monocytaires dans le processus inflammatoire. En résumé, les résultats que nous avons obtenus nous permettent de suggérer à la fois l'implication des monocytes classiques, intermédiaires et non-classiques dans la pathogénèse de l'AR. Les fonctions précises de chacune des sous-populations monocytaires demeurent largement méconnues, il serait donc intéressant de les caractériser afin de préciser leurs rôles dans la maladie. Finalement, il est intéressant de noter qu'il nous a également été possible d'obtenir du liquide synovial de patients OA. Le même type d'analyses a donc été réalisé mais avec un succès mitigé. En effet, une très faible quantité de lymphocytes et de monocytes a pu être isolée au niveau de la synovie de ces patients. Cette problématique ayant été rencontrée chez tous les patients atteints d'OA, il nous est possible de croire que les monocytes ont un rôle beaucoup moins important à jouer dans la pathogénèse de l'OA que dans celle de l'AR.

Également, l'activation incontrôlée des TLRs est fortement suspectée d'être impliquée dans la pathogénèse de maladies inflammatoires telles que l'AR (209, 210). Le récepteur TLR2 représente d'ailleurs un candidat de choix dans l'étude de la progression de cette pathologie. En effet, les modèles murins d'arthrite ont permis de confirmer l'implication de ce récepteur au niveau du processus inflammatoire articulaire. Cependant, le rôle exact qu'exerce ce récepteur de l'immunité innée demeure litigieux. Certaines études suggèrent que son activation mène à une inflammation articulaire accrue, tandis que d'autres proposent plutôt qu'il a une fonction protectrice. Ainsi, le rôle de ce récepteur dans la progression de l'AR demeure à être élucidé. Cette dernière hypothèse a d'ailleurs été émise par Huang *et coll.* qui ont démontré que l'inflammation articulaire chez les souris TLR2-déficientes était statistiquement supérieure à celle observée chez les souris WT (175). Ainsi, l'absence du TLR2 serait néfaste et entraînerait une exacerbation de l'inflammation articulaire, une observation que nous avons d'ailleurs pu confirmer. D'autre part, il est important de souligner que ce récepteur est augmenté à la surface des monocytes pro-inflammatoires (CD14⁺ CD16⁺) comparativement aux cellules

classiques (CD14⁺ CD16⁻) de patients atteints d'AR (31). Par conséquent, les monocytes pro-inflammatoires sont présents en plus grande quantité chez ces patients et ils expriment plus fortement le TLR2 à leur surface. De plus, cette étude a permis d'observer que l'expression du TLR2 corrèle avec le niveau de CRP chez les patients AR (31). À la lumière de ces résultats, cela permet de suggérer que le niveau d'expression de TLR2 est associé à la sévérité de la pathologie mais également que ce récepteur est nécessaire à la persistance de cet état inflammatoire. Ces observations permettent aussi de croire que les monocytes pro-inflammatoires pourraient être impliqués dans la reconnaissance virale au niveau des articulations, un processus pouvant conduire à des manifestations inflammatoires aiguës. De plus, nous avons précédemment démontré que le TLR2 agit en synergie avec le TLR9 lors de la reconnaissance d'EBV par les monocytes primaires humains (198). Ces observations ont porté notre intérêt sur l'expression des TLR2 et TLR9 au niveau des monocytes. Nos résultats démontrent une hausse significative de la proportion de monocytes sanguins CD14⁺⁺ CD16⁻ et CD14⁺⁺ CD16⁺ exprimant le TLR2 comparativement aux volontaires sains. L'expression relative du TLR2 (exprimée en « mean fluorescence intensity », MFI) au niveau de ces sous-populations cellulaires est également augmentée. Ces données nous permettent ainsi de croire que les patients arthritiques présentent non seulement des proportions plus élevées de monocytes classiques et intermédiaires exprimant le TLR2, mais que ces cellules expriment également une plus grande quantité de ce récepteur à leur surface. Il est intéressant de noter que l'analyse de cellules sanguines provenant de patients atteints d'OA ne nous a pas permis d'obtenir les mêmes résultats. Ainsi, nous pouvons croire à l'implication du TLR2 dans la pathogénèse de l'AR. Cette hypothèse peut d'ailleurs être supportée grâce aux résultats obtenus dans la portion murine de notre projet qui nous ont permis de confirmer l'implication de ce récepteur dans le processus d'inflammation articulaire. De façon similaire, nous avons observé une hausse des proportions des monocytes sanguins CD14⁺⁺ CD16⁻, CD14⁺⁺ CD16⁺ et CD14^{low} CD16⁺⁺ exprimant le TLR9 chez les patients arthritiques comparativement aux donneurs sains. De plus, une augmentation significative de l'expression du TLR9 (en MFI) a également été détectée. Contrairement aux résultats obtenus pour l'expression du TLR2 au niveau des monocytes sanguins de patients OA, nous avons observé une hausse significative de l'expression du TLR9 au niveau des trois sous-populations monocytaires comparativement aux donneurs sains. Néanmoins, nous remarquons que l'expression de ce récepteur est moins importante chez les patients OA que chez ceux atteints d'AR. Nous pouvons donc suggérer l'implication du TLR9 dans la pathogénèse de l'AR, mais nous pouvons également suspecter que ce récepteur pourrait jouer un rôle similaire dans la progression de l'OA. En effet, puisque ce récepteur n'est que très faiblement exprimé au niveau des monocytes isolés de donneurs sains, cela nous permet de suggérer que le TLR9 pourrait jouer un rôle crucial dans la pathogénèse de l'AR et de l'OA. En résumé, il est intéressant de noter qu'une augmentation de l'expression du TLR2 mais également du TLR9 peut être observée au niveau des monocytes classiques (CD14⁺⁺ CD16⁻) et intermédiaires (CD14⁺⁺ CD16⁺) isolés du sang périphérique des patients atteints d'AR. Ces cellules ayant une fonction pro-

inflammatoire, l'activation de ces dernières à la suite de la reconnaissance de ligands par leurs TLR2 et TLR9 pourrait entraîner la production d'une grande quantité de cytokines pro-inflammatoires menant à l'exacerbation des symptômes liés à l'AR.

Une analyse similaire a également été effectuée sur des échantillons de liquide synoviaux provenant de patients atteints d'AR. Nous avons observé que les proportions de monocytes classiques et intermédiaires exprimant le TLR2 sont statistiquement supérieures à la fréquence des cellules non-classiques positives pour ce même récepteur. L'analyse des échantillons sanguins nous ayant permis de suggérer l'implication du TLR2 dans la pathogénèse de l'AR, ce présent résultat nous permet de proposer que les monocytes non-classiques n'ont pas un rôle important à jouer dans la pathogénèse de l'AR. Du moins, ces cellules ne semblent pas jouer un rôle majeur au niveau des articulations. Cependant, puisque ces cellules patrouillent continuellement la circulation sanguine (36), elles pourraient directement ou indirectement avoir un rôle à jouer dans l'exacerbation de l'inflammation articulaire. En effet, ces cellules pourraient, de façon similaire à ce qui est proposé à l'aide notre modèle murin, être impliquées dans le transport de particules virales de la circulation sanguine jusqu'à la cavité synoviale. Néanmoins, il ne s'agit là que de suppositions. Pour ce qui est du TLR9, il semble être plus fortement exprimé au niveau des cellules CD14⁺⁺ CD16⁺ comparativement aux autres sous-populations monocytaires. Nous avons ensuite effectué une comparaison entre ces résultats et ceux précédemment obtenus lors de l'analyse des échantillons sanguins. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux types d'échantillons. Ainsi, les proportions de monocytes exprimant les TLR2 et TLR9 au niveau du liquide synovial sont comparables à celles des échantillons sanguins. En résumé, une proportion importante de monocytes CD14⁺⁺ CD16⁺ est observée au niveau du sang périphérique et du liquide synovial des patients atteints d'AR. De plus, ces cellules expriment plus fortement les récepteurs TLR2 et TLR9. Enfin, l'analyse globale des résultats obtenus permet de soutenir l'hypothèse selon laquelle les monocytes intermédiaires sont des cellules clés dans la pathogénèse de l'AR. De plus, la forte expression des TLR2 et TLR9 au niveau des monocytes sanguins CD14⁺⁺ CD16⁺ permet de suggérer que ces cellules se trouvent dans un état activé dans la circulation sanguine. Le recrutement de ces monocytes au niveau de la synovie pourrait donc entraîner la production d'une très grande quantité de cytokines pro-inflammatoires qui, bien entendu, aggraveraient l'inflammation articulaire.

Tel que précédemment mentionné, la pathogénèse de l'AR est un phénomène complexe impliquant un large éventail de cellules. Ainsi, en dépit du fait que nos résultats nous permettent de suggérer que les monocytes ont un rôle central à jouer dans cette maladie, il demeure évident que d'autres cellules sont également impliquées dans le phénomène. Dans le chapitre 1 du présent mémoire, il a été question des neutrophiles, cellules représentant la première ligne de défense de l'organisme. Puisqu'elles sont retrouvées en grande quantité au niveau du liquide synovial de patients AR, c'est la raison pour laquelle nous avons évalué

l'expression des TLR2 et TLR9 au niveau des neutrophiles sanguins. Il est intéressant de noter que la proportion de cellules sanguines exprimant le TLR2 et le TLR9 est supérieure chez les patients atteints d'AR comparativement aux donneurs sains. Néanmoins, il est important de préciser que la proportion de neutrophiles positifs pour le TLR2 n'est pas statistiquement différente lorsque nous comparons les donneurs sains aux patients AR. Nous pouvons toutefois émettre une théorie selon laquelle les neutrophiles se trouveraient dans un état activé au niveau de la circulation sanguine. La migration de ces cellules aux articulations inflammées pourrait, de façon similaire à ce qui a été proposé pour les monocytes, entraîner la production de cytokines pro-inflammatoires, et ainsi, alimenter le processus d'inflammation articulaire. À la lumière des résultats obtenus dans la présente étude, il nous serait possible de suggérer que les neutrophiles pourraient être rapidement recrutés aux articulations inflammées des patients AR. Les neutrophiles pourraient ensuite directement ou indirectement mener à la production de molécules chimioattractantes permettant le recrutement subséquent d'autres cellules inflammatoires, tels que les monocytes. Ainsi, nos résultats permettent de suggérer que les monocytes et les neutrophiles ont tous deux un rôle central à jouer dans la pathogénèse de l'AR, tel que précédemment mentionné dans d'autres articles scientifiques.

Des études antérieures ont permis de démontrer qu'une importante quantité de débris cellulaires et de DAMPs se trouvent au niveau des tissus synoviaux inflammés des patients AR (173). La forte concentration de ces molécules, de même que l'augmentation de l'expression des TLR2 et TLR9 au niveau des monocytes sanguins et synoviaux pourraient entraîner une reconnaissance accrue des débris cellulaires et des DAMPs chez ces patients. Par la même occasion, cette reconnaissance permettrait l'activation de ces cellules. Cela causerait la production de médiateurs inflammatoires, de cytokines et de chimiokines. Chez les patients atteints d'AR, l'absence de mécanismes permettant de réguler cette réponse inflammatoire mènerait à un recrutement cellulaire soutenu aux articulations qui résulterait inévitablement en une inflammation synoviale accrue de même qu'à une destruction articulaire. Cependant, il y a lieu de se questionner sur la cause sous-jacente d'une telle augmentation de l'expression des récepteurs TLR2 et TLR9. Les résultats obtenus par plusieurs études nous permettent de croire que la réponse du système immunitaire à une infection virale peut entraîner une hausse de l'expression de ces récepteurs de l'immunité innée. Notre équipe a d'ailleurs démontré que l'expression du TLR9 est statistiquement augmentée au niveau des cellules dendritiques plasmacytoïdes et des monocytes primaires humains à la suite d'une infection *in vitro* avec EBV (198). De façon similaire, l'infection de souris avec MHV-68 entraîne une augmentation de l'expression du TLR2 exprimé au niveau des monocytes inflammatoires et des granulocytes (208). Ces résultats précédemment obtenus par notre équipe de recherche revêtent donc d'une grande importance puisqu'ils démontrent qu'une infection virale a la capacité de moduler à la hausse l'expression des TLR2 et TLR9 (198, 208). Nous croyons donc en l'existence de mécanismes similaires chez les patients souffrant d'AR. Cette hypothèse est d'autant plus intéressante considérant le fait qu'il est fortement suggéré que l'infection virale, par exemple par EBV, serait

impliquée dans la progression de l'AR (13, 139). Puisque nous avons observé une hausse significative de l'expression des TLR2 et TLR9 au niveau des monocytes et des neutrophiles sanguins de patients atteints d'AR, nous pouvons donc suggérer que ces augmentations résultent d'une primo-infection ou encore d'une réactivation virale.

Afin de confirmer l'hypothèse d'une réactivation virale, nous avons quantifié la présence d'anticorps spécifiques anti-EBV au niveau du plasma de patients arthritiques. Il nous a été possible d'observer des niveaux anormalement élevés d'anticorps anti-EA, -EBNA ou -VCA chez tous les patients atteints d'AR. Il est également intéressant de noter que six des dix-sept patients arthritiques présentent des sérologies anormales à la fois pour les anticorps IgG anti-EA et -VCA. Puisque la détection d'anti-EA n'est plus possible lors de la période de convalescence (133), la concentration élevée de cet anticorps chez les patients arthritiques, en combinaison avec une anomalie au niveau de la concentration d'anti-VCA, nous permet d'émettre deux hypothèses distinctes. Premièrement, il est possible que ces patients AR puissent faire face à une primo-infection à EBV. Cependant, il est peu probable qu'ils soient tous dans cette situation étant donné la forte prévalence d'EBV dans la population adulte mondiale (96). Ainsi, la deuxième hypothèse selon laquelle ces patients font face à une réactivation virale est beaucoup plus plausible. Cette hypothèse est d'ailleurs supportée par la détection du génome d'EBV au niveau des monocytes sanguins de la moitié des patients atteints d'AR. Il est également intéressant de noter que chez cinq de ces vingt-deux patients, la présence du génome d'EBV a également pu être décelée au niveau des neutrophiles sanguins. Ainsi, nous suggérons qu'EBV infecte préférentiellement les monocytes plutôt que les neutrophiles. De plus, il est possible de croire que les patients pour lesquels le génome d'EBV a pu être détecté à la fois au niveau des monocytes et des neutrophiles présentent une maladie plus agressive ou à stade plus avancé. Nos résultats démontrent également la capacité d'EBV à infecter les monocytes *in vivo*. La même conclusion est également obtenue avec les neutrophiles sanguins, ce qui permet de confirmer des résultats que nous avons précédemment obtenus (97). Les deux articles dont il est question dans le présent mémoire nous ont donc permis de démontrer que les monocytes murins et humains sont respectivement permissifs à l'infection par MHV-68 et par EBV. Cette caractéristique commune ajoute donc une similitude entre les deux pathogènes. Il est important de préciser que le génome d'EBV est également décelable au niveau des monocytes sanguins d'environ 37% des patients OA. Ce résultat n'est pas surprenant en soi puisqu'il est reconnu qu'EBV est un pathogène opportuniste. Ainsi, la réactivation virale ne serait pas un phénomène spécifique à l'AR, mais pourrait être également observable au niveau d'autres maladies inflammatoires. Néanmoins, les résultats obtenus permettent de suggérer que la réactivation d'EBV est un phénomène rencontré plus couramment chez les patients AR comparativement aux OA. L'analyse des cellules provenant du liquide synovial nous permet également d'en venir à une conclusion similaire. En effet, il nous a été possible de déceler la présence du génome d'EBV respectivement au niveau des monocytes et des neutrophiles synoviaux d'environ 43% et

17% des patients AR, phénomène n'ayant pas été observé chez les patients OA. La présence du génome d'EBV au niveau du liquide synovial des patients AR, mais pas des patients OA est très révélatrice. En effet, dans un premier temps, cette observation nous permet de suggérer l'implication de ce virus opportuniste dans la pathogénèse de l'AR. Ensuite, elle nous permet de suggérer que les monocytes et les neutrophiles pourraient avoir un rôle à jouer dans le transport du pathogène de la circulation sanguine jusqu'aux articulations, permettant ainsi de faire un lien entre les résultats obtenus dans les deux articles présentés dans le présent mémoire. De plus, tel que mentionné précédemment, le liquide synovial de patients OA contient une quantité moins importante de monocytes comparativement aux patients AR. Ainsi, cette observation permet de supporter l'hypothèse selon laquelle les monocytes ont un rôle central à jouer dans le transport viral de la circulation sanguine aux articulations puisque le pathogène n'a pas pu être observé au niveau du liquide synovial de patients OA.

La production de cytokines pro- et anti-inflammatoires est au cœur de la pathogénèse de l'AR. En effet, un déséquilibre entre la production de médiateurs pro- et anti-inflammatoires serait en cause dans l'initiation de cette pathologie et mènerait inévitablement à d'importants dommages articulaires. Par ailleurs, plusieurs cytokines pro-inflammatoires sont déjà reconnues pour leur implication dans la progression de la maladie, notamment le TNF, l'IL-1 β et l'IL-6 (33). Ainsi, nous avons comparé les niveaux de sécrétion de diverses cytokines au niveau du plasma et du liquide synovial de patients atteints d'AR et d'OA. Nous avons alors observé une hausse significative de la sécrétion d'IL-10 et d'IL-6 dans le liquide synovial de patients AR comparativement aux OA. Nous avons ensuite mesuré la concentration de TNF et nous n'avons pas obtenu de différence notable entre les deux groupes de patients, et ce, tant au niveau du plasma que du liquide synovial. Ce résultat est, à première vue, bien étonnant puisque l'implication du TNF dans la pathogénèse de l'AR est largement reconnue. Cette observation peut néanmoins être expliquée par les stratégies d'évasion d'EBV au système immunitaire afin d'éviter son éradication. Ce pathogène peut, par exemple, recourir à du mimétisme moléculaire afin d'imiter la fonction de certaines protéines de l'hôte. La protéine lytique virale BCRF1, fréquemment nommée IL-10 virale, est homologue à plus de 70% à l'IL-10 humaine (118). L'IL-10 humaine est reconnue pour sa fonction immunosuppressive et anti-inflammatoire. En effet, cette molécule agit à titre d'inhibitrice de certaines cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ , l'IL-1 et le TNF (118, 211). Ainsi, un niveau important d'IL-10 dans le liquide synovial de patients arthritiques pourrait se traduire par une diminution de la sécrétion de TNF et d'IL-1 β , ce qui permettrait d'expliquer les résultats obtenus dans la présente étude. Une importante sécrétion d'IL-10 pourrait donc refléter une immunité antivirale défaillante. De plus, il est reconnu que l'infection de lymphocytes B par EBV entraîne une forte sécrétion d'IL-10 (212). Il est donc possible de croire à une importante répllication virale au niveau du liquide synovial des patients atteints d'AR étant donné la forte concentration d'IL-10 au niveau de ce liquide biologique. De façon similaire, il a précédemment été démontré que l'infection de monocytes par EBV entraîne la sécrétion d'IL-6 (213). Ainsi,

les résultats obtenus dans la présente étude permettent de suggérer qu'EBV est réactivé chez les patients AR. De plus, puisque nous avons détecté la présence du génome d'EBV au niveau des monocytes et des neutrophiles sanguins de patients AR, il nous est possible de suggérer que ces cellules auraient pu être recrutées aux articulations en transportant, par la même occasion, le pathogène. Il est également intéressant de noter qu'il nous a effectivement été possible de déceler la présence du génome viral au niveau des monocytes et des neutrophiles synoviaux. Une fois arrivé au niveau de la cavité synoviale, le virus EBV aurait ensuite la capacité d'infecter les cellules avoisinantes induisant ainsi la sécrétion d'un large éventail de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6 et l'IL-10. La forte concentration de ces molécules au niveau de la cavité synoviale aurait ensuite entraîné l'exacerbation de l'inflammation articulaire. Il ne s'agit toutefois que de suppositions. Néanmoins, les résultats obtenus dans la portion murine de ce projet permettent de supporter cette hypothèse. De plus, il est reconnu que l'IL-6 a la capacité de favoriser la prolifération des Th17 entraînant, par le fait même, un déséquilibre au niveau des proportions des cellules Treg et Th17 (60, 61). Les cellules Th17 sont reconnues pour leur capacité à sécréter du TNF, de l'IL-6 mais également de l'IL-17 (61). Cette dernière cytokine entraîne l'activation d'un large éventail de cellules et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (60, 63). Ainsi, les résultats que nous avons obtenus dans la portion humaine de ce projet suggèrent la présence d'un déséquilibre au niveau des proportions des Th17 comparativement aux Treg. Ce déséquilibre cellulaire pourrait avoir un rôle à jouer dans les phases inflammatoires aiguës observées chez certains patients atteints d'AR. Rappelons qu'il nous avait été possible d'observer de fortes concentrations d'IL-6 au niveau du sérum des souris arthritiques infectées par MHV-68. Par conséquent, il est possible que ces cellules aient un rôle important à jouer au niveau de l'exacerbation de l'inflammation articulaire. Il ne s'agit cependant que de suppositions, il serait donc intéressant d'étudier plus en détails les Th17 et les Treg afin de déterminer leur rôle exact dans le processus inflammatoire.

À la lumière des résultats obtenus dans la présente étude, nous pouvons suggérer l'implication des monocytes et des neutrophiles dans la pathogénèse de l'AR. Nous proposons que les monocytes pourraient, en accord avec ce que nous avons déjà observé avec notre modèle murin, être impliquées dans le transport d'EBV jusqu'aux articulations. Cependant, cette théorie mériterait d'être explorée davantage grâce à des analyses complémentaires afin de déterminer le rôle précis de chaque sous-population monocyttaire dans la pathogénèse et la progression des symptômes liés à la maladie. La forte concentration des monocytes classiques (CD14⁺⁺ CD16⁻) et intermédiaires (CD14⁺⁺ CD16⁺) au niveau du liquide synovial des patients AR de même que l'importante expression des TLR2 et TLR9 au niveau de ces sous-populations monocyttaires supportent néanmoins cette hypothèse. L'implication des monocytes à titre de transporteur d'EBV est depuis longtemps suspectée. En effet, une étude réalisée par Tugizov *et coll.* a permis de suggérer que l'infection des monocytes par EBV faciliterait le passage de ce pathogène à travers les couches d'épithélium buccales menant ainsi à la formation de lésions bénignes nommées leucoplasies chevelues buccales (« hairy

leukoplakia ») (214). Ces affections sont fréquemment observées chez les personnes porteuses du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (214). Il nous a ensuite été possible de détecter des niveaux anormalement élevés d'anticorps anti-EBV associés à des concentrations importantes d'IL-10 et d'IL-6 au niveau du liquide synovial de patients atteints d'AR. Ainsi, il est possible que ces patients soient aux prises avec une réactivation virale. Nous proposons donc qu'EBV aurait la capacité d'infecter les monocytes et les neutrophiles pour ensuite être transporté jusqu'aux articulations à la suite du recrutement de ces cellules à la cavité synoviale. Nos résultats nous permettent également de croire à une importante réactivation d'EBV au niveau des articulations inflammées de patients atteints d'AR. Les fortes concentrations de DAMPs et de PAMPs, tel qu'EBV, au niveau des articulations de ces patients nous permettent de suggérer qu'ils pourraient tous deux être impliqués dans l'activation des TLR2 et TLR9 exprimés au niveau des monocytes synoviaux. L'augmentation de l'expression de ces récepteurs permettrait de faciliter la reconnaissance de ces ligands. La présence de particules virales pourrait également expliquer l'importante proportion de monocytes ainsi que de neutrophiles sanguins et synoviaux de patients AR exprimant le TLR2 et le TLR9. En effet, notre équipe a précédemment démontré qu'une infection virale a la capacité de réguler à la hausse l'expression de ces récepteurs (198, 208). Nous proposons donc un mécanisme dans lequel le TLR2 aurait la capacité de reconnaître une composante de surface d'EBV. Cette reconnaissance initierait l'entrée du pathogène dans la cellule de même que sa dégradation. Le TLR9 pourrait ensuite reconnaître l'ADN viral. Cette reconnaissance synergique d'EBV par les TLR2 et TLR9 aurait pour objectif d'optimiser la réponse antivirale dirigée contre le pathogène. La reconnaissance d'EBV par ces récepteurs mènerait à l'activation des cellules et à la production de médiateurs pro-inflammatoires, de cytokines et de chimiokines initiant un important recrutement cellulaire aux articulations de patients atteints d'AR. Cela permettrait également d'activer une cascade de réactions induisant une boucle de rétroaction. Cette dernière mènerait inéluctablement à l'exacerbation des symptômes inflammatoires. Il est intéressant de noter que le modèle que nous proposons ici est supporté par les résultats obtenus dans la portion murine de cette étude. En effet, il nous avait été possible de suggérer que le TLR2 a un rôle central à jouer dans la reconnaissance virale au niveau de la cavité synoviale. Nos résultats permettent donc de croire à l'implication des monocytes, des neutrophiles, des TLR2 et TLR9 mais également d'un pathogène opportuniste, tel qu'EBV, dans la pathogénèse de l'AR. Ainsi, il est plausible qu'EBV ait un rôle important à jouer au niveau des phases inflammatoires aiguës observées chez les patients AR ayant des prédispositions génétiques.

Les monocytes représentent des éléments centraux permettant de lier l'immunité innée et acquise. Les études, dont il a été question dans le présent mémoire, nous permettent de confirmer l'implication de ces cellules dans la pathogénèse de l'AR. En effet, nous avons observé que les monocytes inflammatoires murins Ly6C^{high} et intermédiaires humains CD14⁺⁺ CD16⁺ sont impliqués dans la progression de la maladie. Leur importante concentration au niveau du fluide articulaire de souris arthritiques et de patients atteints d'AR nous

permet de supporter cette hypothèse. Nous avons ensuite proposé que les monocytes Ly6C^{high} et CD14⁺⁺ CD16⁺ pourraient être respectivement responsables du transport de MHV-68 et d'EBV aux articulations inflammées. Il demeure cependant évident que les autres sous-populations monocytaires ont également un rôle à jouer dans la pathogénèse de la maladie. Il n'est donc pas exclu que ces cellules pourraient également être impliquées dans le transport des particules virales à la cavité synoviale. Il serait intéressant de déterminer l'implication exacte de chaque sous-population monocytaire dans le processus au cours d'expérimentations ultérieures. Ensuite, l'AR étant une maladie complexe impliquant l'action combinée de plusieurs cellules distinctes, la participation d'autres cellules dans le transport viral n'est donc pas à exclure. Il serait donc possible que des cellules telles que les lymphocytes B aient aussi un rôle à jouer dans la pathogénèse de la maladie. La présente étude a d'ailleurs permis de suggérer que les neutrophiles, tout comme les monocytes, y jouent un rôle central. La détection du génome d'EBV au niveau des neutrophiles sanguins de patients atteints d'AR supportent d'ailleurs cette dernière hypothèse. Toutefois, le nombre de patients pour lesquels le génome du pathogène a pu être détecté au niveau des neutrophiles est largement inférieur au nombre de personnes avec des monocytes sanguins EBV-positifs. Il est donc possible de croire qu'EBV infecte préférentiellement les monocytes plutôt que les neutrophiles. Les deux études dont il est question dans le présent mémoire nous permettent également de suggérer l'implication de pathogènes opportunistes, soient MHV-68 et EBV, dans l'exacerbation des symptômes inflammatoires. L'inflammation articulaire accrue observée chez les souris arthritiques infectées, de même que la forte concentration d'anticorps spécifiques anti-EBV et de particules d'EBV au niveau des monocytes et des neutrophiles de patients atteints d'AR nous permettent d'émettre cette hypothèse. Les résultats obtenus dans l'étude présentée au chapitre 3 nous permettent également de suspecter une réactivation virale ainsi qu'une forte réplication du pathogène au niveau du liquide synovial de patients atteints d'AR. Ainsi, il est fort probable que ce pathogène ait un rôle central à jouer au niveau des phases inflammatoires aiguës observées chez certains patients AR. Nous avons ensuite suggéré que les TLR2 et TLR9 représentent des éléments centraux dans la progression de l'AR. Néanmoins, il nous est impossible d'exclure que d'autres récepteurs de l'immunité innée pourraient également jouer un rôle dans le processus. Des analyses complémentaires seront donc nécessaires afin de formuler une conclusion à ce sujet.

Conclusions et perspectives

La démonstration de l'implication des monocytes dans le transport du virus herpétique MHV-68 a permis de préciser certains mécanismes en lien avec la progression de l'arthrite. Ayant précédemment observé que la reconnaissance d'EBV par les monocytes primaires humains se produit grâce à une action combinée des TLR2 et TLR9 (183, 198), cela nous porte à croire que ces récepteurs pourraient jouer un rôle similaire dans la reconnaissance de MHV-68. L'utilisation de souris déficientes pour le gène MyD88 nous a permis d'observer une inhibition complète de l'inflammation articulaire. Ainsi, il est évident que des TLRs empruntant la voie MyD88-dépendante sont impliqués dans le processus inflammatoire et dans la reconnaissance virale. Par ailleurs, la délétion spécifique du TLR2 entraîne une exacerbation des symptômes inflammatoires. Ainsi, il est possible que ce récepteur ait plutôt un effet protecteur. L'absence du TLR2 l'empêche de remplir sa fonction ce qui entraîne une augmentation de l'inflammation articulaire. Nous avons donc proposé l'implication du TLR2 au niveau du processus d'exacerbation inflammatoire. Ce récepteur serait également important dans le processus de reconnaissance virale puisque l'inflammation articulaire est moins importante chez les souris arthritiques TLR2-déficientes infectées avec MHV-68 comparativement au groupe non infecté. Toutefois, il demeure possible que le TLR2 puisse agir en synergie avec d'autres TLRs afin de maximiser la reconnaissance de MHV-68 au niveau de la cavité synoviale de souris arthritiques. Les mécanismes associés à la reconnaissance virale doivent donc être davantage investigués, mais nous pouvons supposer que des phénomènes similaires surviennent chez les patients atteints d'AR.

Une fois de plus, ces observations nous permettent de soutenir l'implication des TLRs dans la pathogénèse de l'AR. Afin de mieux caractériser les mécanismes entourant la reconnaissance de ce pathogène, il serait intéressant d'utiliser des lignées de souris déficientes en différents récepteurs de l'immunité innée afin de vérifier leur implication au niveau de l'exacerbation de l'inflammation articulaire. Nous avons précédemment observé que l'inflammation chez les souris TRIF-déficientes n'est pas différente de celle des animaux WT. Ainsi, nous pouvons confirmer que le TLR3 n'est pas impliqué dans un tel processus. L'utilisation de souris MyD88-déficientes a, par ailleurs, soulevé toute l'importance des TLRs MyD88-dépendants dans un modèle de transfert de sérum arthritique, puisqu'en l'absence de cette protéine adaptatrice aucune inflammation articulaire ne peut être observée. De plus, nous pouvons suspecter que ces mêmes TLRs sont impliqués dans l'exacerbation de l'inflammation articulaire suivant une infection avec MHV-68. Tel que mentionné précédemment, l'implication du TLR2 est fortement suggérée, mais il est possible que les TLR4 et TLR9, par exemple, aient également un rôle à jouer dans le processus. Une étude antérieure a par ailleurs démontré l'implication du TLR4 dans le processus inflammatoire induit à la suite de l'injection de sérum arthritique (184). Le TLR9, quant à lui, n'est pas requis pour l'initiation du processus d'inflammation articulaire (176). La

prochaine étape serait donc d'utiliser des souris déficientes pour ces récepteurs afin de déterminer s'ils sont impliqués dans la reconnaissance de MHV-68 au niveau des articulations de souris arthritiques. Il serait ensuite intéressant de générer des souris possédant des déficiences multiples, par exemple à la fois pour les TLR2 et TLR9. Selon les résultats obtenus, il nous serait ensuite possible de confirmer ou non l'implication de ces deux récepteurs dans la pathogénèse de la maladie, ou encore, dans la reconnaissance de MHV-68. L'utilisation de fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) provenant de lignées de souris déficientes pour certains récepteurs de l'immunité innée pourrait également nous permettre de répondre à cette question. En effet, la reconnaissance du pathogène entraînerait certainement la production de cytokines. Ainsi, il serait possible de les quantifier et de comparer les résultats obtenus à ceux provenant de cellules contrôles, c'est-à-dire des MEFs de souris WT. Il serait ensuite intéressant de comparer les résultats obtenus avec ce modèle *in vitro* à ceux ayant été générés à la suite de l'injection de sérum arthritique à des lignées de souris déficientes pour certains TLRs. Ce faisant, cela pourrait nous permettre de confirmer l'implication de ces récepteurs dans la reconnaissance du virus MHV-68 et l'exacerbation de l'inflammation articulaire.

Ainsi, à la lumière des nos résultats, nous ne pouvons pas conclure sur les différents mécanismes impliqués dans la reconnaissance du pathogène au niveau de la cavité synoviale. Toutefois, nous pouvons formuler une hypothèse qui permettrait d'expliquer l'exacerbation des symptômes inflammatoires causée par l'infection avec MHV-68. En effet, à la suite de son transport par les monocytes jusqu'aux articulations inflammées de souris arthritiques, MHV-68 pourrait être reconnu par le TLR2 exprimé par les cellules avoisinantes. Cette reconnaissance pourrait ainsi mener à l'activation de ces cellules et à la production de cytokines pro-inflammatoires, dont l'IFN- γ (215). Cette cytokine peut ensuite induire le recrutement et la polarisation des macrophages en cellules de type M1-inflammatoires. Dans la littérature, il est déjà reconnu que ces cellules contribuent aux dommages tissulaires étant donné leur capacité à produire un large éventail de cytokines pro-inflammatoires incluant l'IL-6, le TNF et l'IL-1 β (207, 216). Par la suite, l'IL-6 pourrait inhiber la production d'IL-8 en faveur de la sécrétion de MCP-1 (217). La présence de cette molécule chimioattractante causerait ensuite un important recrutement de monocytes au niveau de la cavité synoviale. Ces cellules étant reconnues pour leur capacité à sécréter du TNF (33, 34), elles pourraient être indirectement impliquées dans le recrutement des précurseurs des ostéoclastes et dans leur différenciation en cellules matures (33, 68, 69). L'amalgame de ces cellules inflammatoires et la production de chimiokines et de cytokines permettrait d'exacerber l'inflammation synoviale et de contribuer à la destruction articulaire. Il semble donc évident que les monocytes sont largement impliqués dans la pathogénèse de l'arthrite. L'efficacité reconnue du traitement visant à inhiber le TNF nous permet de soutenir cette même conclusion. Néanmoins, leur rôle semblerait limité à la progression de la maladie. En effet, les souris arthritiques WT ne présentent pas une inflammation articulaire plus importante que les souris arthritiques CCR2-déficientes. Ainsi, les monocytes inflammatoires et les macrophages de type M1 ne semblent pas impliqués dans l'initiation des symptômes liés à la maladie.

Néanmoins, les souris arthritiques CCR2-déficientes infectées avec MHV-68 ont une inflammation articulaire statistiquement inférieure au groupe WT arthritique infecté. Ces cellules ont donc un rôle central à jouer dans la progression de l'inflammation articulaire induite à la suite de l'infection avec MHV-68. Il serait donc intéressant de tester des traitements visant une inhibition du recrutement des monocytes aux sites d'infection et d'inflammation afin de mieux contrôler les phases inflammatoires aiguës observées chez les patients AR prédisposés génétiquement. Cependant, des études cliniques de phase II ont obtenus des résultats décevants lors de l'utilisation d'anti-CCL2 (MCP-1) (2), une molécule essentielle dans le recrutement des monocytes aux sites d'infection et d'inflammation. D'autres cibles thérapeutiques doivent donc être développées afin de cibler directement les monocytes ou d'inhiber la reconnaissance d'EBV par ces cellules de l'immunité innée. En ce sens, un médicament prometteur nommé Laquinimod est depuis peu étudié en lien avec l'arthrite rhumatoïde. Des résultats préliminaires obtenus à l'aide d'un modèle murin de sclérose en plaques démontrent que ce médicament permettrait de diminuer le trafic des monocytes inflammatoires (218). Ce médicament n'entraînerait pas une diminution de la production des monocytes inflammatoires au niveau de la moelle osseuse puisque la proportion de monocytes totaux demeure inchangée. Néanmoins, il permettrait de contenir les monocytes inflammatoires au niveau de la circulation sanguine et diminuerait ainsi le déplacement de ces cellules vers les tissus inflammés (218). Ce médicament est donc très prometteur et permettrait peut-être de diminuer les phases inflammatoires aiguës observées chez les patients atteints d'AR.

L'implication d'EBV dans la progression de l'AR semble de plus en plus probable. Cette hypothèse peut d'ailleurs être soutenue par l'utilisation d'un modèle murin ayant permis de confirmer l'implication de MHV-68 dans l'exacerbation de l'inflammation articulaire. La détection d'importantes quantités de cellules B infectées et d'anticorps spécifiques anti-EBV chez les patients atteints d'AR permettent de suggérer que la réactivation d'EBV est possible lors des phases inflammatoires aiguës (131-134). Cette réactivation peut être causée, dans un premier temps, par le système immunitaire affaibli des patients arthritiques, ou encore, par la prise d'une médication causant une immunosuppression transitoire. Le virus Epstein-Barr étant un pathogène opportuniste, il pourrait alors profiter d'une diminution de la surveillance immune afin de sortir de latence et se répliquer. Il est donc suggéré qu'EBV est transporté à la cavité synoviale, et ce, à la suite de l'infection des cellules y étant recrutées. La reconnaissance d'EBV par les TLR2 et TLR9 au niveau de la cavité synoviale pourrait ensuite mener à la production de cytokines pro-inflammatoires permettant d'exacerber le processus d'inflammation articulaire. Ainsi, le modèle que nous proposons ici est étroitement lié aux résultats obtenus dans la portion murine de cette étude. Le passage du cycle réplicatif au cycle latent permettrait également d'expliquer le caractère transitoire de ces manifestations inflammatoires. Ces hypothèses peuvent être élaborées à la suite des données obtenues dans les présents manuscrits. En effet, nous pouvons conclure que le virus MHV-68 est bel et bien présent au niveau du tissu synovial de souris arthritiques et que cette infection induit spécifiquement une augmentation de l'inflammation articulaire. De plus, l'analyse d'échantillons

sanguins et synoviaux nous a permis de suggérer une importante réactivation d'EBV chez les patients atteints d'AR. Par le fait même, la prise d'agents antiviraux dirigés contre EBV pourrait s'avérer efficace dans le contrôle de l'inflammation articulaire chez les patients AR présentant des prédispositions génétiques. Il ne s'agirait cependant que d'une solution temporaire puisque le stress causé par cette médication encouragera le pathogène à retourner en phase de latence. Néanmoins, ce type de traitement pourrait grandement améliorer la qualité de vie des patients atteints d'AR en réduisant les symptômes handicapants liés à la pathologie (par exemple la douleur ou la raideur articulaire) et en limitant la destruction articulaire. Par ailleurs, les résultats que nous avons obtenus permettent de soutenir cette hypothèse puisque l'administration d'un agent antiviral aux souris arthritiques infectées avec MHV-68 a entraîné une diminution significative de l'inflammation articulaire.

Nous avons déterminé que les monocytes intermédiaires CD14⁺⁺ CD16⁺ sont présents en grande quantité au niveau de la circulation sanguine, de même que du liquide synovial de patients AR. Ce résultat suggère un important recrutement de cette sous-population monocyttaire aux articulations inflammées de patients arthritiques. De plus, puisque nous avons observé une sérologie anti-EBV anormalement élevée et une importante sécrétion d'IL-10, nous avons émis l'hypothèse que ce pathogène se serait réactivé et se trouverait en phase répllicative. Le modèle suggéré ici est très similaire à celui que nous avons proposé dans la portion murine de cette étude. Nous pouvons ainsi émettre un parallèle entre notre modèle murin d'arthrite et les patients atteints d'AR. Nous proposons donc que les monocytes, et plus particulièrement les cellules CD14⁺⁺ CD16⁺, pourraient être responsables du transport viral jusqu'aux articulations. L'implication des autres sous-populations monocytaires n'est toutefois pas exclue. La forte expression des TLR2 et TLR9 au niveau des monocytes sanguins et synoviaux permettrait de faciliter la reconnaissance virale. Cette dernière entraînerait la production de médiateurs inflammatoires menant à un important recrutement cellulaire qui pourrait ensuite causer l'exacerbation de l'inflammation articulaire. D'ailleurs, il est important de noter que de tels résultats n'ont pas été observés chez les patients atteints d'OA. Ainsi, le modèle que nous proposons serait spécifique à l'AR et supporte l'hypothèse voulant qu'un pathogène opportuniste, tel qu'EBV, puisse être impliqué dans la progression de cette pathologie. La découverte de tels mécanismes chez les patients atteints d'AR pourrait éventuellement entraîner une modification de la thérapie médicamenteuse recommandée. Bien qu'elle ne permettrait pas de guérir la maladie, elle serait efficace dans le contrôle des symptômes inflammatoires afin de minimiser les dommages articulaires.

Bibliographie

1. Callan, M. 2012. *The Rheumatology Handbook*. World Scientific Publishing Company Incorporated, London.
2. Hochberg, M. C., A. Silman, J. S. Smolen, M. E. Weinblatt, and M. H. Weisman. 2009. *Rheumatoid arthritis*. Mosby/Elsevier, Philadelphia.
3. Grassi, W., R. De Angelis, G. Lamanna, and C. Cervini. 1998. The clinical features of rheumatoid arthritis. *Eur J Radiol* 27 Suppl 1:S18-24.
4. Kobayashi, S., S. Momohara, N. Kamatani, and H. Okamoto. 2008. Molecular aspects of rheumatoid arthritis: role of environmental factors. *FEBS J* 275:4456-4462.
5. van der Helm-van Mil, A. H., T. W. Huizinga, G. M. Schreuder, F. C. Breedveld, R. R. de Vries, and R. E. Toes. 2005. An independent role of protective HLA class II alleles in rheumatoid arthritis severity and susceptibility. *Arthritis Rheum* 52:2637-2644.
6. Murphy, K. M., P. Travers, M. Walport, and C. Janeway. 2012. *Janeway's Immunobiology*. Garland Science.
7. Silman, A. J., and J. E. Pearson. 2002. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 4 Suppl 3:S265-272.
8. Thomson, W., B. Harrison, B. Ollier, N. Wiles, T. Payton, J. Barrett, D. Symmons, and A. Silman. 1999. Quantifying the exact role of HLA-DRB1 alleles in susceptibility to inflammatory polyarthritis: results from a large, population-based study. *Arthritis Rheum* 42:757-762.
9. van der Helm-van Mil, A. H., J. Z. Wesoly, and T. W. Huizinga. 2005. Understanding the genetic contribution to rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 17:299-304.
10. McMichael, A., and P. Bowness. 2002. HLA-B27: natural function and pathogenic role in spondyloarthritis. *Arthritis Res* 4 Suppl 3:S153-158.
11. Jaraquemada, D., W. Ollier, J. Awad, A. Young, A. Silman, I. M. Roitt, M. Corbett, F. Hay, J. A. Cosh, R. N. Maini, and et al. 1986. HLA and rheumatoid arthritis: a combined analysis of 440 British patients. *Ann Rheum Dis* 45:627-636.
12. Sheehan, N. J. 2004. The ramifications of HLA-B27. *J R Soc Med* 97:10-14.
13. Costenbader, K. H., and E. W. Karlson. 2006. Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis: is there a link? *Arthritis Res Ther* 8:204.
14. Kerr, J. R. 2000. Pathogenesis of human parvovirus B19 in rheumatic disease. *Ann Rheum Dis* 59:672-683.
15. Meyer, O. 2003. Parvovirus B19 and autoimmune diseases. *Joint Bone Spine* 70:6-11.
16. Newkirk, M. M., K. N. Watanabe Duffy, J. Leclerc, N. Lambert, and J. B. Shiroky. 1994. Detection of cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and herpes virus-6 in patients with rheumatoid arthritis with or without Sjogren's syndrome. *Br J Rheumatol* 33:317-322.
17. Zhang, L., S. Nikkari, M. Skurnik, T. Ziegler, R. Luukkainen, T. Mottonen, and P. Toivanen. 1993. Detection of herpesviruses by polymerase chain reaction in lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 36:1080-1086.
18. Mehraein, Y., C. Lennerz, S. Ehlhardt, K. Remberger, A. Ojak, and K. D. Zang. 2004. Latent Epstein-Barr virus (EBV) infection and cytomegalovirus (CMV) infection in synovial tissue of autoimmune chronic arthritis determined by RNA- and DNA-in situ hybridization. *Mod Pathol* 17:781-789.
19. Bingham, C. O., 3rd, R. Alten, S. J. Bartlett, V. P. Bykerk, P. M. Brooks, E. Choy, R. Christensen, D. E. Furst, S. E. Hewlett, A. Leong, J. E. May, P. Montie, C. Pohl, T. C. Sanderson, V. Strand, and T. G. Woodworth. 2011. Identifying preliminary domains to detect and measure rheumatoid arthritis flares: report of the OMERACT 10 RA Flare Workshop. *J Rheumatol* 38:1751-1758.
20. Bologna, C., P. Viu, M. C. Picot, C. Jorgensen, and J. Sany. 1997. Long-term follow-up of 453 rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate: an open, retrospective, observational study. *Br J Rheumatol* 36:535-540.

21. Mielants, H., E. M. Veys, C. Van der Straeten, C. Ackerman, and S. Goemaere. 1991. The efficacy and toxicity of a constant low dose of methotrexate as a treatment for intractable rheumatoid arthritis: an open prospective study. *J Rheumatol* 18:978-983.
22. Saal, J. G., M. Krimmel, M. Steidle, F. Gerneth, S. Wagner, P. Fritz, S. Koch, J. Zacher, S. Sell, H. Einsele, and C. A. Muller. 1999. Synovial Epstein-Barr virus infection increases the risk of rheumatoid arthritis in individuals with the shared HLA-DR4 epitope. *Arthritis Rheum* 42:1485-1496.
23. Toussiro, E., and J. Roudier. 2007. Pathophysiological links between rheumatoid arthritis and the Epstein-Barr virus: an update. *Joint Bone Spine* 74:418-426.
24. Dreyfus, D. H. 2011. Autoimmune disease: A role for new anti-viral therapies? *Autoimmun Rev* 11:88-97.
25. Iwanaga, T., M. Shikichi, H. Kitamura, H. Yanase, and K. Nozawa-Inoue. 2000. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Arch Histol Cytol* 63:17-31.
26. Smith, M. D. 2011. The normal synovium. *Open Rheumatol J* 5:100-106.
27. Sweeney, S. E., and G. S. Firestein. 2004. Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* 36:372-378.
28. Strand, V., R. Kimberly, and J. D. Isaacs. 2007. Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions. *Nat Rev Drug Discov* 6:75-92.
29. Kawanaka, N., M. Yamamura, T. Aita, Y. Morita, A. Okamoto, M. Kawashima, M. Iwahashi, A. Ueno, Y. Ohmoto, and H. Makino. 2002. CD14+, CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 46:2578-2586.
30. Xue, M., L. March, P. N. Sambrook, K. Fukudome, and C. J. Jackson. 2007. Endothelial protein C receptor is overexpressed in rheumatoid arthritic (RA) synovium and mediates the anti-inflammatory effects of activated protein C in RA monocytes. *Ann Rheum Dis* 66:1574-1580.
31. Iwahashi, M., M. Yamamura, T. Aita, A. Okamoto, A. Ueno, N. Ogawa, S. Akashi, K. Miyake, P. J. Godowski, and H. Makino. 2004. Expression of Toll-like receptor 2 on CD16+ blood monocytes and synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50:1457-1467.
32. Davignon, J. L., M. Hayder, M. Baron, J. F. Boyer, A. Constantin, F. Apparailly, R. Poupot, and A. Cantagrel. 2012. Targeting monocytes/macrophages in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 52:590-598.
33. McInnes, I. B., and G. Schett. 2007. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 7:429-442.
34. Feldmann, M., F. M. Brennan, and R. N. Maini. 1996. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 14:397-440.
35. Auffray, C., M. H. Sieweke, and F. Geissmann. 2009. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27:669-692.
36. Cros, J., N. Cagnard, K. Woollard, N. Patey, S. Y. Zhang, B. Senechal, A. Puel, S. K. Biswas, D. Moshous, C. Picard, J. P. Jais, D. D'Cruz, J. L. Casanova, C. Trouillet, and F. Geissmann. 2010. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33:375-386.
37. Rossol, M., S. Kraus, M. Pierer, C. Baerwald, and U. Wagner. 2012. The CD14(bright) CD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis Rheum* 64:671-677.
38. Soehnlein, O., L. Lindbom, and C. Weber. 2009. Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment. *Blood* 114:4613-4623.
39. Soehnlein, O., A. Zernecke, E. E. Eriksson, A. G. Rothfuchs, C. T. Pham, H. Herwald, K. Bidzhikov, M. E. Rottenberg, C. Weber, and L. Lindbom. 2008. Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood* 112:1461-1471.
40. Amir, O., I. Spivak, I. Lavi, and M. A. Rahat. 2012. Changes in the monocytic subsets CD14(dim)CD16(+) and CD14(++)CD16(-) in chronic systolic heart failure patients. *Mediators Inflamm* 2012:616384.

41. Auffray, C., D. Fogg, M. Garfa, G. Elain, O. Join-Lambert, S. Kayal, S. Sarnacki, A. Cumano, G. Lauvau, and F. Geissmann. 2007. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317:666-670.
42. Auffray, C., D. K. Fogg, E. Narni-Mancinelli, B. Senechal, C. Trouillet, N. Saederup, J. Leemput, K. Bigot, L. Campisi, M. Abitbol, T. Molina, I. Charo, D. A. Hume, A. Cumano, G. Lauvau, and F. Geissmann. 2009. CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J Exp Med* 206:595-606.
43. Shi, C., and E. G. Pamer. 2011. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 11:762-774.
44. Terry, R. L., D. R. Getts, C. Deffrasnes, C. van Vreden, I. L. Campbell, and N. J. King. 2012. Inflammatory monocytes and the pathogenesis of viral encephalitis. *J Neuroinflammation* 9:270.
45. Yona, S., K. W. Kim, Y. Wolf, A. Mildner, D. Varol, M. Breker, D. Strauss-Ayali, S. Viukov, M. Guilliams, A. Misharin, D. A. Hume, H. Perlman, B. Malissen, E. Zelzer, and S. Jung. 2013. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38:79-91.
46. Hasan, D., N. Chalouhi, P. Jabbour, and T. Hashimoto. 2012. Macrophage imbalance (M1 vs. M2) and upregulation of mast cells in wall of ruptured human cerebral aneurysms: preliminary results. *J Neuroinflammation* 9:222.
47. Cascao, R., H. S. Rosario, M. M. Souto-Carneiro, and J. E. Fonseca. 2010. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. *Autoimmun Rev* 9:531-535.
48. Burgos, R. A., M. A. Hidalgo, C. D. Figueroa, I. Conejeros, and J. L. Hancke. 2009. New potential targets to modulate neutrophil function in inflammation. *Mini Rev Med Chem* 9:153-168.
49. Cross, A., D. Bakstad, J. C. Allen, L. Thomas, R. J. Moots, and S. W. Edwards. 2005. Neutrophil gene expression in rheumatoid arthritis. *Pathophysiology* 12:191-202.
50. Mulherin, D., O. Fitzgerald, and B. Bresnihan. 1996. Synovial tissue macrophage populations and articular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 39:115-124.
51. Choi, Y., J. R. Arron, and M. J. Townsend. 2009. Promising bone-related therapeutic targets for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 5:543-548.
52. Redlich, K., and J. S. Smolen. 2012. Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. *Nat Rev Drug Discov* 11:234-250.
53. Schett, G. 2007. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Osteoclasts. *Arthritis Res Ther* 9:203.
54. Liote, F., B. Boval-Boizard, D. Weill, D. Kuntz, and J. L. Wautier. 1996. Blood monocyte activation in rheumatoid arthritis: increased monocyte adhesiveness, integrin expression, and cytokine release. *Clin Exp Immunol* 106:13-19.
55. Henderson, B., J. G. Edwards, and E. R. Pettipher. 1995. *Mechanisms and Models in Rheumatoid Arthritis*. Elsevier Science.
56. Silverman, G. J., and D. A. Carson. 2003. Roles of B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 5 Suppl 4:S1-6.
57. Weyand, C. M., E. Bryl, and J. J. Goronzy. 2000. The role of T cells in rheumatoid arthritis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 48:429-435.
58. Kohem, C. L., R. I. Brezinschek, H. Wisbey, C. Tortorella, P. E. Lipsky, and N. Oppenheimer-Marks. 1996. Enrichment of differentiated CD45RBdim,CD27- memory T cells in the peripheral blood, synovial fluid, and synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 39:844-854.
59. Horwood, N. J., V. Kartsogiannis, J. M. Quinn, E. Romas, T. J. Martin, and M. T. Gillespie. 1999. Activated T lymphocytes support osteoclast formation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 265:144-150.
60. Samson, M., S. Audia, N. Janikashvili, M. Ciudad, M. Trad, J. Fraszczak, P. Ornetti, J. F. Maillefert, P. Miossec, and B. Bonnotte. 2012. Brief report: inhibition of interleukin-6 function corrects Th17/Treg cell imbalance in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 64:2499-2503.
61. Kimura, A., and T. Kishimoto. 2010. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol* 40:1830-1835.

62. Aggarwal, S., and A. L. Gurney. 2002. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J Leukoc Biol* 71:1-8.
63. Metawi, S. A., D. Abbas, M. M. Kamal, and M. K. Ibrahim. 2011. Serum and synovial fluid levels of interleukin-17 in correlation with disease activity in patients with RA. *Clin Rheumatol* 30:1201-1207.
64. Huber, L. C., O. Distler, I. Tarnier, R. E. Gay, S. Gay, and T. Pap. 2006. Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 45:669-675.
65. Kim, K. W., M. L. Cho, S. H. Lee, H. J. Oh, C. M. Kang, J. H. Ju, S. Y. Min, Y. G. Cho, S. H. Park, and H. Y. Kim. 2007. Human rheumatoid synovial fibroblasts promote osteoclastogenic activity by activating RANKL via TLR-2 and TLR-4 activation. *Immunol Lett* 110:54-64.
66. Rommel, C., M. Camps, and H. Ji. 2007. PI3K delta and PI3K gamma: partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond? *Nat Rev Immunol* 7:191-201.
67. Paleolog, E. M. 2002. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 4 Suppl 3:S81-90.
68. Lam, J., S. Takeshita, J. E. Barker, O. Kanagawa, F. P. Ross, and S. L. Teitelbaum. 2000. TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J Clin Invest* 106:1481-1488.
69. Li, P., E. M. Schwarz, R. J. O'Keefe, L. Ma, B. F. Boyce, and L. Xing. 2004. RANK signaling is not required for TNFalpha-mediated increase in CD11(hi) osteoclast precursors but is essential for mature osteoclast formation in TNFalpha-mediated inflammatory arthritis. *J Bone Miner Res* 19:207-213.
70. Scott, D. L., F. Wolfe, and T. W. Huizinga. 2010. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 376:1094-1108.
71. Zhao, X., N. L. Okeke, O. Sharpe, F. M. Batliwalla, A. T. Lee, P. P. Ho, B. H. Tomooka, P. K. Gregersen, and W. H. Robinson. 2008. Circulating immune complexes contain citrullinated fibrinogen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 10:R94.
72. Zubler, R. H., U. Nydegger, L. H. Perrin, K. Fehr, J. McCormick, P. H. Lambert, and P. A. Miescher. 1976. Circulating and intra-articular immune complexes in patients with rheumatoid arthritis. Correlation of 125I-Clq binding activity with clinical and biological features of the disease. *J Clin Invest* 57:1308-1319.
73. Bas, S., S. Genevay, O. Meyer, and C. Gabay. 2003. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, IgM and IgA rheumatoid factors in the diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 42:677-680.
74. Nielen, M. M., D. van Schaardenburg, H. W. Reesink, R. J. van de Stadt, I. E. van der Horst-Bruinsma, M. H. de Koning, M. R. Habibuw, J. P. Vandenbroucke, and B. A. Dijkmans. 2004. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum* 50:380-386.
75. Rantapaa-Dahlqvist, S., B. A. de Jong, E. Berglin, G. Hallmans, G. Wadell, H. Stenlund, U. Sundin, and W. J. van Venrooij. 2003. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48:2741-2749.
76. Reparon-Schuijt, C. C., W. J. van Esch, C. van Kooten, G. A. Schellekens, B. A. de Jong, W. J. van Venrooij, F. C. Breedveld, and C. L. Verweij. 2001. Secretion of anti-citrulline-containing peptide antibody by B lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 44:41-47.
77. Raptopoulou, A., P. Sidiropoulos, M. Katsouraki, and D. T. Boumpas. 2007. Anti-citrulline antibodies in the diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis: evolving concepts. *Crit Rev Clin Lab Sci* 44:339-363.
78. Schellekens, G. A., B. A. de Jong, F. H. van den Hoogen, L. B. van de Putte, and W. J. van Venrooij. 1998. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 101:273-281.
79. Masson-Bessiere, C., M. Sebbag, E. Girbal-Neuhauser, L. Nogueira, C. Vincent, T. Senshu, and G. Serre. 2001. The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific anti-flaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. *J Immunol* 166:4177-4184.

80. Bas, S., T. V. Perneger, M. Seitz, J. M. Tiercy, P. Roux-Lombard, and P. A. Guerne. 2002. Diagnostic tests for rheumatoid arthritis: comparison of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, anti-keratin antibodies and IgM rheumatoid factors. *Rheumatology (Oxford)* 41:809-814.
81. Auger, I., M. Sebbag, C. Vincent, N. Balandraud, S. Guis, L. Nogueira, B. Svensson, A. Cantagrel, G. Serre, and J. Roudier. 2005. Influence of HLA-DR genes on the production of rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated fibrinogen. *Arthritis Rheum* 52:3424-3432.
82. Batlivala, S. P. 2009. Focus on diagnosis: the erythrocyte sedimentation rate and the C-reactive protein test. *Pediatr Rev* 30:72-74.
83. Otterness, I. G. 1994. The value of C-reactive protein measurement in rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 24:91-104.
84. Andersson-Anvret, M., N. Forsby, G. Klein, W. Henle, and A. Bjorklund. 1979. Relationship between the Epstein-Barr virus genome and nasopharyngeal carcinoma in Caucasian patients. *Int J Cancer* 23:762-767.
85. Epstein, M. A., B. G. Achong, and Y. M. Barr. 1964. Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* 1:702-703.
86. Kutok, J. L., and F. Wang. 2006. Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol* 1:375-404.
87. Hamilton-Dutoit, S. J., G. Pallesen, M. B. Franzmann, J. Karkov, F. Black, P. Skinhoj, and C. Pedersen. 1991. AIDS-related lymphoma. Histopathology, immunophenotype, and association with Epstein-Barr virus as demonstrated by in situ nucleic acid hybridization. *Am J Pathol* 138:149-163.
88. Weiss, L. M., L. A. Movahed, R. A. Warnke, and J. Sklar. 1989. Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 320:502-506.
89. Sample, J., L. Young, B. Martin, T. Chatman, E. Kieff, and A. Rickinson. 1990. Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *J Virol* 64:4084-4092.
90. Thompson, M. P., and R. Kurzrock. 2004. Epstein-Barr virus and cancer. *Clin Cancer Res* 10:803-821.
91. Kwok, H., A. H. Tong, C. H. Lin, S. Lok, P. J. Farrell, D. L. Kwong, and A. K. Chiang. 2012. Genomic sequencing and comparative analysis of Epstein-Barr virus genome isolated from primary nasopharyngeal carcinoma biopsy. *PLoS One* 7:e36939.
92. Cohen, J. I. 2000. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med* 343:481-492.
93. Tsurumi, T., M. Fujita, and A. Kudoh. 2005. Latent and lytic Epstein-Barr virus replication strategies. *Rev Med Virol* 15:3-15.
94. Amen, M. A., and A. Griffiths. 2011. Packaging of Non-Coding RNAs into Herpesvirus Virions: Comparisons to Coding RNAs. *Front Genet* 2:81.
95. Odumade, O. A., K. A. Hogquist, and H. H. Balfour, Jr. 2011. Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. *Clin Microbiol Rev* 24:193-209.
96. Savard, M., and J. Gosselin. 2006. Epstein-Barr virus immunosuppression of innate immunity mediated by phagocytes. *Virus Res* 119:134-145.
97. Larochelle, B., L. Flamand, P. Gourde, D. Beauchamp, and J. Gosselin. 1998. Epstein-Barr virus infects and induces apoptosis in human neutrophils. *Blood* 92:291-299.
98. Savard, M., C. Belanger, M. Tardif, P. Gourde, L. Flamand, and J. Gosselin. 2000. Infection of primary human monocytes by Epstein-Barr virus. *J Virol* 74:2612-2619.
99. Salek-Ardakani, S., S. A. Lyons, and J. R. Arrand. 2004. Epstein-Barr virus promotes human monocyte survival and maturation through a paracrine induction of IFN-alpha. *J Immunol* 173:321-331.
100. Li, L., D. Liu, L. Hutt-Fletcher, A. Morgan, M. G. Masucci, and V. Levitsky. 2002. Epstein-Barr virus inhibits the development of dendritic cells by promoting apoptosis of their monocyte precursors in the presence of granulocyte macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-4. *Blood* 99:3725-3734.

101. Gosselin, J., J. Menezes, M. D'Addario, J. Hiscott, L. Flamand, G. Lamoureux, and D. Oth. 1991. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha transcription by Epstein-Barr virus. *Eur J Immunol* 21:203-208.
102. Shimakage, M., M. Kimura, S. Yanoma, M. Ibe, S. Yokota, G. Tsujino, T. Kozuka, T. Dezawa, S. Tamura, A. Ohshima, M. Yutsudo, and A. Hakura. 1999. Expression of latent and replicative-infection genes of Epstein-Barr virus in macrophage. *Arch Virol* 144:157-166.
103. Koide, J., K. Takada, M. Sugiura, H. Sekine, T. Ito, K. Saito, S. Mori, T. Takeuchi, S. Uchida, and T. Abe. 1997. Spontaneous establishment of an Epstein-Barr virus-infected fibroblast line from the synovial tissue of a rheumatoid arthritis patient. *J Virol* 71:2478-2481.
104. van Gorp, J., K. C. Jacobse, R. Broekhuizen, J. Alers, J. G. van den Tweel, and R. A. de Weger. 1994. Encoded latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus on follicular dendritic cells in residual germinal centres in Hodgkin's disease. *J Clin Pathol* 47:29-32.
105. Xiong, A., R. H. Clarke-Katzenberg, G. Valenzuela, K. M. Izumi, and M. T. Millan. 2004. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activates nuclear factor-kappa B in human endothelial cells and inhibits apoptosis. *Transplantation* 78:41-49.
106. Kaneko, T., J. Fukuda, T. Yoshihara, H. Zheng, S. Mori, H. Mizoguchi, and K. Oshimi. 1995. Nasal natural killer (NK) cell lymphoma: report of a case with activated NK cells containing Epstein-Barr virus and expressing CD21 antigen, and comparative studies of their phenotype and cytotoxicity with normal NK cells. *Br J Haematol* 91:355-361.
107. Kelleher, C. A., R. K. Paterson, D. H. Dreyfus, J. E. Streib, J. W. Xu, K. Takase, J. F. Jones, and E. W. Gelfand. 1995. Epstein-Barr virus replicative gene transcription during de novo infection of human thymocytes: simultaneous early expression of BZLF-1 and its repressor RAZ. *Virology* 208:685-695.
108. Guan, M., G. Romano, and E. E. Henderson. 1998. In situ RT-PCR detection of Epstein-Barr virus immediate-early transcripts in CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *Anticancer Res* 18:3171-3180.
109. Coskun, O., K. Sener, S. Kilic, H. Erdem, H. Yaman, A. B. Besirbellioglu, H. C. Gul, and C. P. Eyigun. 2010. Stress-related Epstein-Barr virus reactivation. *Clin Exp Med* 10:15-20.
110. Hopwood, P., and D. H. Crawford. 2000. The role of EBV in post-transplant malignancies: a review. *J Clin Pathol* 53:248-254.
111. Henderson, S., D. Huen, M. Rowe, C. Dawson, G. Johnson, and A. Rickinson. 1993. Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8479-8483.
112. Kulwichit, W., R. H. Edwards, E. M. Davenport, J. F. Baskar, V. Godfrey, and N. Raab-Traub. 1998. Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11963-11968.
113. Levitskaya, J., A. Sharipo, A. Leonchiks, A. Ciechanover, and M. G. Masucci. 1997. Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12616-12621.
114. Hislop, A. D., M. E. Rensing, D. van Leeuwen, V. A. Pudney, D. Horst, D. Koppers-Lalic, N. P. Croft, J. J. Neefjes, A. B. Rickinson, and E. J. Wiertz. 2007. A CD8+ T cell immune evasion protein specific to Epstein-Barr virus and its close relatives in Old World primates. *J Exp Med* 204:1863-1873.
115. Keating, S., S. Prince, M. Jones, and M. Rowe. 2002. The lytic cycle of Epstein-Barr virus is associated with decreased expression of cell surface major histocompatibility complex class I and class II molecules. *J Virol* 76:8179-8188.
116. Rensing, M. E., D. Horst, B. D. Griffin, J. Tellam, J. Zuo, R. Khanna, M. Rowe, and E. J. Wiertz. 2008. Epstein-Barr virus evasion of CD8(+) and CD4(+) T cell immunity via concerted actions of multiple gene products. *Semin Cancer Biol* 18:397-408.
117. Horst, D., S. R. Burrows, D. Gatherer, B. van Wilgenburg, M. J. Bell, I. G. Boer, M. E. Rensing, and E. J. Wiertz. 2012. Epstein-Barr virus isolates retain their capacity to evade T cell immunity through BNLF2a despite extensive sequence variation. *J Virol* 86:572-577.

118. Moore, K. W., P. Vieira, D. F. Fiorentino, M. L. Trounstine, T. A. Khan, and T. R. Mosmann. 1990. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* 248:1230-1234.
119. Hsu, D. H., R. de Waal Malefyt, D. F. Fiorentino, M. N. Dang, P. Vieira, J. de Vries, H. Spits, T. R. Mosmann, and K. W. Moore. 1990. Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1. *Science* 250:830-832.
120. Cohen, J. I., and K. Lekstrom. 1999. Epstein-Barr virus BART1 protein is dispensable for B-cell transformation and inhibits alpha interferon secretion from mononuclear cells. *J Virol* 73:7627-7632.
121. Yarilin, D. A., J. Valiando, and D. N. Posnett. 2004. A mouse herpesvirus induces relapse of experimental autoimmune arthritis by infection of the inflammatory target tissue. *J Immunol* 173:5238-5246.
122. Toussiro, E., D. Wendling, P. Tiberghien, J. Luka, and J. Roudier. 2000. Decreased T cell precursor frequencies to Epstein-Barr virus glycoprotein Gp110 in peripheral blood correlate with disease activity and severity in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 59:533-538.
123. Lotz, M., and J. Roudier. 1989. Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis: cellular and molecular aspects. *Rheumatol Int* 9:147-152.
124. Roudier, J., J. Petersen, G. H. Rhodes, J. Luka, and D. A. Carson. 1989. Susceptibility to rheumatoid arthritis maps to a T-cell epitope shared by the HLA-Dw4 DR beta-1 chain and the Epstein-Barr virus glycoprotein gp110. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:5104-5108.
125. Toussiro, E., and J. Roudier. 2008. Epstein-Barr virus in autoimmune diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22:883-896.
126. Fox, R. I., M. Luppi, P. Pisa, and H. I. Kang. 1992. Potential role of Epstein-Barr virus in Sjogren's syndrome and rheumatoid arthritis. *J Rheumatol Suppl* 32:18-24.
127. Baboonian, C., P. J. Venables, D. G. Williams, R. O. Williams, and R. N. Maini. 1991. Cross reaction of antibodies to a glycine/alanine repeat sequence of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 with collagen, cytokeratin, and actin. *Ann Rheum Dis* 50:772-775.
128. Fox, R., R. Sportsman, G. Rhodes, J. Luka, G. Pearson, and J. Vaughan. 1986. Rheumatoid arthritis synovial membrane contains a 62,000-molecular-weight protein that shares an antigenic epitope with the Epstein-Barr virus-encoded associated nuclear antigen. *J Clin Invest* 77:1539-1547.
129. Anzilotti, C., G. Merlini, F. Pratesi, C. Tommasi, D. Chimenti, and P. Migliorini. 2006. Antibodies to viral citrullinated peptide in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 33:647-651.
130. Pratesi, F., C. Tommasi, C. Anzilotti, D. Chimenti, and P. Migliorini. 2006. Deiminated Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 is a target of anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54:733-741.
131. Alsbaugh, M. A., G. Henle, E. T. Lennette, and W. Henle. 1981. Elevated levels of antibodies to Epstein-Barr virus antigens in sera and synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 67:1134-1140.
132. Youinou, P., M. Buisson, J. M. Berthelot, C. Jamin, P. Le Goff, O. Genoulaz, A. Lamour, P. M. Lydyard, and J. M. Seigneurin. 1992. Anti-Epstein-Barr virus-nuclear antigen-1, -2A and -2B antibodies in rheumatoid arthritis patients and their relatives. *Autoimmunity* 13:225-231.
133. Gulley, M. L., and W. Tang. 2008. Laboratory assays for Epstein-Barr virus-related disease. *J Mol Diagn* 10:279-292.
134. Tosato, G., A. D. Steinberg, R. Yarchoan, C. A. Heilman, S. E. Pike, V. De Seau, and R. M. Blaese. 1984. Abnormally elevated frequency of Epstein-Barr virus-infected B cells in the blood of patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 73:1789-1795.
135. Blaschke, S., G. Schwarz, D. Moneke, L. Binder, G. Muller, and M. Reuss-Borst. 2000. Epstein-Barr virus infection in peripheral blood mononuclear cells, synovial fluid cells, and synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 27:866-873.
136. Newkirk, M. M., K. N. Duffy, A. Paleckova, E. Ivaskova, A. Galianova, J. Seeman, K. Vojtechovsky, and C. Dostal. 1995. Herpes viruses in multicase families with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 22:2055-2061.

137. Balandraud, N., J. B. Meynard, I. Auger, H. Sovran, B. Mugnier, D. Reviron, J. Roudier, and C. Roudier. 2003. Epstein-Barr virus load in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis: accurate quantification using real-time polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum* 48:1223-1228.
138. Takeda, T., Y. Mizugaki, L. Matsubara, S. Imai, T. Koike, and K. Takada. 2000. Lytic Epstein-Barr virus infection in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43:1218-1225.
139. Balandraud, N., J. Roudier, and C. Roudier. 2004. Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 3:362-367.
140. Kouskoff, V., A. S. Korganow, V. Duchatelle, C. Degott, C. Benoist, and D. Mathis. 1996. Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* 87:811-822.
141. Kyburz, D., and M. Corr. 2003. The KRN mouse model of inflammatory arthritis. *Springer Semin Immunopathol* 25:79-90.
142. Peccoud, J., P. Dellabona, P. Allen, C. Benoist, and D. Mathis. 1990. Delineation of antigen contact residues on an MHC class II molecule. *EMBO J* 9:4215-4223.
143. Ditzel, H. J. 2004. The K/BxN mouse: a model of human inflammatory arthritis. *Trends Mol Med* 10:40-45.
144. Corr, M., and B. Crain. 2002. The role of FcγR signaling in the K/B x N serum transfer model of arthritis. *J Immunol* 169:6604-6609.
145. Ravetch, J. V., and S. Bolland. 2001. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 19:275-290.
146. Wipke, B. T., and P. M. Allen. 2001. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J Immunol* 167:1601-1608.
147. Elliott, E. R., J. A. Van Ziffle, P. Scapini, B. M. Sullivan, R. M. Locksley, and C. A. Lowell. 2011. Deletion of Syk in neutrophils prevents immune complex arthritis. *J Immunol* 187:4319-4330.
148. Blaskovic, D., M. Stancekova, J. Svobodova, and J. Mistrikova. 1980. Isolation of five strains of herpesviruses from two species of free living small rodents. *Acta Virol* 24:468.
149. Blasdel, K., C. McCracken, A. Morris, A. A. Nash, M. Begon, M. Bennett, and J. P. Stewart. 2003. The wood mouse is a natural host for Murid herpesvirus 4. *J Gen Virol* 84:111-113.
150. Efstathiou, S., Y. M. Ho, and A. C. Minson. 1990. Cloning and molecular characterization of the murine herpesvirus 68 genome. *J Gen Virol* 71 (Pt 6):1355-1364.
151. Virgin, H. W. t., P. Latreille, P. Wamsley, K. Hallsworth, K. E. Weck, A. J. Dal Canto, and S. H. Speck. 1997. Complete sequence and genomic analysis of murine gammaherpesvirus 68. *J Virol* 71:5894-5904.
152. Sunil-Chandra, N. P., S. Efstathiou, J. Arno, and A. A. Nash. 1992. Virological and pathological features of mice infected with murine gamma-herpesvirus 68. *J Gen Virol* 73 (Pt 9):2347-2356.
153. Jia, Q., T. T. Wu, H. I. Liao, V. Chernishof, and R. Sun. 2004. Murine gammaherpesvirus 68 open reading frame 31 is required for viral replication. *J Virol* 78:6610-6620.
154. Flano, E., D. L. Woodland, and M. A. Blackman. 2002. A mouse model for infectious mononucleosis. *Immunol Res* 25:201-217.
155. Flano, E., S. M. Husain, J. T. Sample, D. L. Woodland, and M. A. Blackman. 2000. Latent murine gamma-herpesvirus infection is established in activated B cells, dendritic cells, and macrophages. *J Immunol* 165:1074-1081.
156. Stewart, J. P., E. J. Usherwood, A. Ross, H. Dyson, and T. Nash. 1998. Lung epithelial cells are a major site of murine gammaherpesvirus persistence. *J Exp Med* 187:1941-1951.
157. Usherwood, E. J., A. J. Ross, D. J. Allen, and A. A. Nash. 1996. Murine gammaherpesvirus-induced splenomegaly: a critical role for CD4 T cells. *J Gen Virol* 77 (Pt 4):627-630.
158. Weck, K. E., M. L. Barkon, L. I. Yoo, S. H. Speck, and H. I. Virgin. 1996. Mature B cells are required for acute splenic infection, but not for establishment of latency, by murine gammaherpesvirus 68. *J Virol* 70:6775-6780.
159. Stevenson, P. G., R. D. Cardin, J. P. Christensen, and P. C. Doherty. 1999. Immunological control of a murine gammaherpesvirus independent of CD8+ T cells. *J Gen Virol* 80 (Pt 2):477-483.

160. Sunil-Chandra, N. P., S. Efstathiou, and A. A. Nash. 1992. Murine gammaherpesvirus 68 establishes a latent infection in mouse B lymphocytes in vivo. *J Gen Virol* 73 (Pt 12):3275-3279.
161. Weck, K. E., S. S. Kim, H. I. Virgin, and S. H. Speck. 1999. Macrophages are the major reservoir of latent murine gammaherpesvirus 68 in peritoneal cells. *J Virol* 73:3273-3283.
162. Jia, Q., M. L. Freeman, E. J. Yager, I. McHardy, L. Tong, D. Martinez-Guzman, T. Rickabaugh, S. Hwang, M. A. Blackman, R. Sun, and T. T. Wu. 2010. Induction of protective immunity against murine gammaherpesvirus 68 infection in the absence of viral latency. *J Virol* 84:2453-2465.
163. Tripp, R. A., A. M. Hamilton-Easton, R. D. Cardin, P. Nguyen, F. G. Behm, D. L. Woodland, P. C. Doherty, and M. A. Blackman. 1997. Pathogenesis of an infectious mononucleosis-like disease induced by a murine gamma-herpesvirus: role for a viral superantigen? *J Exp Med* 185:1641-1650.
164. Takeuchi, O., and S. Akira. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140:805-820.
165. Muzio, M., N. Polentarutti, D. Bosisio, M. K. Prahladan, and A. Mantovani. 2000. Toll-like receptors: a growing family of immune receptors that are differentially expressed and regulated by different leukocytes. *J Leukoc Biol* 67:450-456.
166. Demaria, O., P. P. Pagni, S. Traub, A. de Gassart, N. Branzk, A. J. Murphy, D. M. Valenzuela, G. D. Yancopoulos, R. A. Flavell, and L. Alexopoulou. 2010. TLR8 deficiency leads to autoimmunity in mice. *J Clin Invest* 120:3651-3662.
167. Godfroy, J. I., 3rd, M. Roostan, Y. S. Moroz, I. V. Korendovych, and H. Yin. 2012. Isolated Toll-like receptor transmembrane domains are capable of oligomerization. *PLoS One* 7:e48875.
168. Beutler, B. 2004. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430:257-263.
169. Akira, S., and K. Takeda. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4:499-511.
170. Kawai, T., and S. Akira. 2006. TLR signaling. *Cell Death Differ* 13:816-825.
171. Takeda, K., and S. Akira. 2004. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 16:3-9.
172. Shin, O. S., and J. B. Harris. 2011. Innate immunity and transplantation tolerance: the potential role of TLRs/NLRs in GVHD. *Korean J Hematol* 46:69-79.
173. Huang, Q. Q., and R. M. Pope. 2009. The role of toll-like receptors in rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 11:357-364.
174. Huang, Q., Y. Ma, A. Adebayo, and R. M. Pope. 2007. Increased macrophage activation mediated through toll-like receptors in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 56:2192-2201.
175. Huang, Q. Q., R. E. Koessler, R. Birkett, H. Perlman, L. Xing, and R. M. Pope. 2013. TLR2 deletion promotes arthritis through reduction of IL-10. *J Leukoc Biol*.
176. Wu, H. J., H. Sawaya, B. Binstadt, M. Brickelmaier, A. Blasius, L. Gorelik, U. Mahmood, R. Weissleder, J. Carulli, C. Benoist, and D. Mathis. 2007. Inflammatory arthritis can be reined in by CpG-induced DC-NK cell cross talk. *J Exp Med* 204:1911-1922.
177. Radstake, T. R., M. F. Roelofs, Y. M. Jenniskens, B. Oppers-Walgreen, P. L. van Riel, P. Barrera, L. A. Joosten, and W. B. van den Berg. 2004. Expression of toll-like receptors 2 and 4 in rheumatoid synovial tissue and regulation by proinflammatory cytokines interleukin-12 and interleukin-18 via interferon-gamma. *Arthritis Rheum* 50:3856-3865.
178. Seibl, R., T. Birchler, S. Loeliger, J. P. Hossle, R. E. Gay, T. Saurenmann, B. A. Michel, R. A. Seger, S. Gay, and R. P. Lauener. 2003. Expression and regulation of Toll-like receptor 2 in rheumatoid arthritis synovium. *Am J Pathol* 162:1221-1227.
179. Sorensen, L. K., A. Havemose-Poulsen, S. U. Sonder, K. Bendtzen, and P. Holmstrup. 2008. Blood cell gene expression profiling in subjects with aggressive periodontitis and chronic arthritis. *J Periodontol* 79:477-485.
180. Huang, Q. Q., R. Sobkoviak, A. R. Jockheck-Clark, B. Shi, A. M. Mandelin, 2nd, P. P. Tak, G. K. Haines, 3rd, C. V. Nicchitta, and R. M. Pope. 2009. Heat shock protein 96 is elevated in rheumatoid arthritis and activates macrophages primarily via TLR2 signaling. *J Immunol* 182:4965-4973.
181. Taniguchi, N., K. Kawahara, K. Yone, T. Hashiguchi, M. Yamakuchi, M. Goto, K. Inoue, S. Yamada, K. Ijiri, S. Matsunaga, T. Nakajima, S. Komiyama, and I. Maruyama. 2003. High mobility group box

- chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis Rheum* 48:971-981.
182. Park, J. S., D. Svetkauskaite, Q. He, J. Y. Kim, D. Strassheim, A. Ishizaka, and E. Abraham. 2004. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem* 279:7370-7377.
 183. Gaudreault, E., S. Fiola, M. Olivier, and J. Gosselin. 2007. Epstein-Barr virus induces MCP-1 secretion by human monocytes via TLR2. *J Virol* 81:8016-8024.
 184. Choe, J. Y., B. Crain, S. R. Wu, and M. Corr. 2003. Interleukin 1 receptor dependence of serum transferred arthritis can be circumvented by toll-like receptor 4 signaling. *J Exp Med* 197:537-542.
 185. Ospelt, C., F. Brentano, Y. Rengel, J. Stanczyk, C. Kolling, P. P. Tak, R. E. Gay, S. Gay, and D. Kyburz. 2008. Overexpression of toll-like receptors 3 and 4 in synovial tissue from patients with early rheumatoid arthritis: toll-like receptor expression in early and longstanding arthritis. *Arthritis Rheum* 58:3684-3692.
 186. Roelofs, M. F., L. A. Joosten, S. Abdollahi-Roodsaz, A. W. van Lieshout, T. Sprong, F. H. van den Hoogen, W. B. van den Berg, and T. R. Radstake. 2005. The expression of toll-like receptors 3 and 7 in rheumatoid arthritis synovium is increased and costimulation of toll-like receptors 3, 4, and 7/8 results in synergistic cytokine production by dendritic cells. *Arthritis Rheum* 52:2313-2322.
 187. Brentano, F., O. Schorr, R. E. Gay, S. Gay, and D. Kyburz. 2005. RNA released from necrotic synovial fluid cells activates rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via Toll-like receptor 3. *Arthritis Rheum* 52:2656-2665.
 188. Chamberlain, N. D., S. J. Kim, O. M. Vila, M. V. Volin, S. Volkov, R. M. Pope, S. Arami, A. M. Mandelin, 2nd, and S. Shahrara. 2013. Ligation of TLR7 by rheumatoid arthritis synovial fluid single strand RNA induces transcription of TNFalpha in monocytes. *Ann Rheum Dis* 72:418-426.
 189. Carrion, M., Y. Juarranz, S. Perez-Garcia, R. Jimeno, J. L. Pablos, R. P. Gomariz, and I. Gutierrez-Canas. 2011. RNA sensors in human osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: immune regulation by vasoactive intestinal peptide. *Arthritis Rheum* 63:1626-1636.
 190. Deng, G. M., M. Verdrengh, Z. Q. Liu, and A. Tarkowski. 2000. The major role of macrophages and their product tumor necrosis factor alpha in the induction of arthritis triggered by bacterial DNA containing CpG motifs. *Arthritis Rheum* 43:2283-2289.
 191. Miyata, M., H. Kobayashi, T. Sasajima, Y. Sato, and R. Kasukawa. 2000. Unmethylated oligo-DNA containing CpG motifs aggravates collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum* 43:2578-2582.
 192. Leadbetter, E. A., I. R. Rifkin, A. M. Hohlbaum, B. C. Beaudette, M. J. Shlomchik, and A. Marshak-Rothstein. 2002. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 416:603-607.
 193. Takeda, K., and S. Akira. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17:1-14.
 194. Viglianti, G. A., C. M. Lau, T. M. Hanley, B. A. Miko, M. J. Shlomchik, and A. Marshak-Rothstein. 2003. Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA. *Immunity* 19:837-847.
 195. Fox, R. I. 1993. Mechanism of action of hydroxychloroquine as an antirheumatic drug. *Semin Arthritis Rheum* 23:82-91.
 196. Hacker, H., H. Mischak, T. Miethke, S. Liptay, R. Schmid, T. Sparwasser, K. Heeg, G. B. Lipford, and H. Wagner. 1998. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J* 17:6230-6240.
 197. Yasuda, H., A. Leelahavanichkul, S. Tsunoda, J. W. Dear, Y. Takahashi, S. Ito, X. Hu, H. Zhou, K. Doi, R. Childs, D. M. Klinman, P. S. Yuen, and R. A. Star. 2008. Chloroquine and inhibition of Toll-like receptor 9 protect from sepsis-induced acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 294:F1050-1058.
 198. Fiola, S., D. Gosselin, K. Takada, and J. Gosselin. 2010. TLR9 contributes to the recognition of EBV by primary monocytes and plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 185:3620-3631.
 199. Ellingsen, T., A. Buus, and K. Stengaard-Pedersen. 2001. Plasma monocyte chemoattractant protein 1 is a marker for joint inflammation in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 28:41-46.

200. Makki, R. F., F. al Sharif, M. A. Gonzalez-Gay, C. Garcia-Porrúa, W. E. Ollier, and A. H. Hajeer. 2000. RANTES gene polymorphism in polymyalgia rheumatica, giant cell arteritis and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 18:391-393.
201. Shahrara, S., A. E. Proudfoot, C. C. Park, M. V. Volin, G. K. Haines, J. M. Woods, C. H. Aikens, T. M. Handel, and R. M. Pope. 2008. Inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 ameliorates rat adjuvant-induced arthritis. *J Immunol* 180:3447-3456.
202. Hanson, L. K., J. S. Slater, Z. Karabekian, H. W. t. Virgin, C. A. Biron, M. C. Ruzek, N. van Rooijen, R. P. Ciavarrá, R. M. Stenberg, and A. E. Campbell. 1999. Replication of murine cytomegalovirus in differentiated macrophages as a determinant of viral pathogenesis. *J Virol* 73:5970-5980.
203. Bruun, T., A. K. Kristoffersen, H. Rollag, and M. Degre. 1998. Interaction of herpes simplex virus with mononuclear phagocytes is dependent on the differentiation stage of the cells. *APMIS* 106:305-314.
204. Di Pardo, A., S. Alberti, V. Maglione, E. Amico, E. P. Cortes, F. Elifani, G. Battaglia, C. L. Busceti, F. Nicoletti, J. P. Vonsattel, and F. Squitieri. 2013. Changes of peripheral TGF-beta1 depend on monocytes-derived macrophages in Huntington disease. *Mol Brain* 6:55.
205. Jia, T., N. V. Serbina, K. Brandl, M. X. Zhong, I. M. Leiner, I. F. Charo, and E. G. Pamer. 2008. Additive roles for MCP-1 and MCP-3 in CCR2-mediated recruitment of inflammatory monocytes during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 180:6846-6853.
206. Tsou, C. L., W. Peters, Y. Si, S. Slaymaker, A. M. Aslanian, S. P. Weisberg, M. Mack, and I. F. Charo. 2007. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest* 117:902-909.
207. Sica, A., and A. Mantovani. 2012. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 122:787-795.
208. Michaud, F., F. Coulombe, E. Gaudreault, J. Kriz, and J. Gosselin. 2010. Involvement of TLR2 in recognition of acute gammaherpesvirus-68 infection. *PLoS One* 5:e13742.
209. Allensworth, J. J., S. R. Planck, J. T. Rosenbaum, and H. L. Rosenzweig. 2011. Investigation of the differential potentials of TLR agonists to elicit uveitis in mice. *J Leukoc Biol* 90:1159-1166.
210. Chen, K., J. Huang, W. Gong, P. Iribarren, N. M. Dunlop, and J. M. Wang. 2007. Toll-like receptors in inflammation, infection and cancer. *Int Immunopharmacol* 7:1271-1285.
211. Brennan, F. M. 1999. Interleukin 10 and arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 38:293-297.
212. Minnicelli, C., M. H. Barros, C. E. Klumb, S. O. Romano, I. R. Zalberg, and R. Hassan. 2012. Relationship of Epstein-Barr virus and interleukin 10 promoter polymorphisms with the risk and clinical outcome of childhood Burkitt lymphoma. *PLoS One* 7:e46005.
213. Gosselin, J., L. Flamand, M. D'Addario, J. Hiscott, I. Stefanescu, D. V. Ablashi, R. C. Gallo, and J. Menezes. 1992. Modulatory effects of Epstein-Barr, herpes simplex, and human herpes-6 viral infections and coinfections on cytokine synthesis. A comparative study. *J Immunol* 149:181-187.
214. Tugizov, S., R. Herrera, P. Velupillai, J. Greenspan, D. Greenspan, and J. M. Palefsky. 2007. Epstein-Barr virus (EBV)-infected monocytes facilitate dissemination of EBV within the oral mucosal epithelium. *J Virol* 81:5484-5496.
215. Sarawar, S. R., R. D. Cardin, J. W. Brooks, M. Mehrpooya, R. A. Tripp, and P. C. Doherty. 1996. Cytokine production in the immune response to murine gammaherpesvirus 68. *J Virol* 70:3264-3268.
216. Qin, H., A. T. Holdbrooks, Y. Liu, S. L. Reynolds, L. L. Yanagisawa, and E. N. Benveniste. 2012. SOCS3 deficiency promotes M1 macrophage polarization and inflammation. *J Immunol* 189:3439-3448.
217. Kaplanski, G., V. Marin, F. Montero-Julian, A. Mantovani, and C. Farnarier. 2003. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol* 24:25-29.
218. Mishra, M. K., J. Wang, C. Silva, M. Mack, and V. W. Yong. 2012. Kinetics of proinflammatory monocytes in a model of multiple sclerosis and its perturbation by laquinimod. *Am J Pathol* 181:642-651.