



HAL
open science

Répertoire B auto-réactif T-dépendant et t-indépendant dans la Polyendocrinopathie Auto-immune de type 1

Emmanuelle Proust Proust-Lemoine

► **To cite this version:**

Emmanuelle Proust Proust-Lemoine. Répertoire B auto-réactif T-dépendant et t-indépendant dans la Polyendocrinopathie Auto-immune de type 1. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2010. Français. NNT : 2010LIL2S051 . tel-00625477

HAL Id: tel-00625477

<https://theses.hal.science/tel-00625477>

Submitted on 21 Sep 2011

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

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



Université Lille Nord de France
Pôle de Recherche
et d'Enseignement Supérieur

THESE

UNIVERSITÉ Lille 2 – Droit et santé
Pour l'obtention du titre de Docteur en Sciences de la Vie
Spécialité Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par :

Emmanuelle PROUST-LEMOINE

Le vendredi 17 décembre 2010

REPERTOIRE B AUTO-REACTIF T-DEPENDANT ET T-INDEPENDANT DANS LA POLYENDOCRINOPATHIE AUTO-IMMUNE DE TYPE 1

JURY

Professeur J.C. Carel

Rapporteur

Professeur L. Prin

Professeur J. F. Tron

Rapporteur

Professeur J.L. Wémeau

Directeur de Thèse

Docteur D. Lefranc

Docteur R. Mallone

Je dédie cette thèse

**A Stéphane,
A Elise et Clémence,
A mes parents,**

Votre soutien, votre présence m'ont été des plus précieux.

A mes grands-parents,

Votre magnifique parcours de nonagénaires demeure un exemple pour moi.

Aux autres membres de ma famille,

A mes amis,

Vous tous dont j'ai croisé la route et qui comptent toujours pour moi,
De Saintes, Cognac, Bordeaux, Montpellier, Paris, New York, Nouakchott, du Kivu,
De Lille et ses alentours, de Bayonne et d'Anglet...

A mes collègues, de Lille et d'ailleurs,

A mes rapporteurs et juges

Monsieur le Professeur Carel

Très spontanément vous avez accepté de juger ce travail, c'est un honneur pour moi.

Votre dynamisme, votre enthousiasme, votre expertise reconnue internationalement demeurent un exemple pour moi. Que cette thèse soit le témoignage de mon profond respect.

Monsieur le Professeur Tron

Vous avez immédiatement accédé à ma demande de juger cette thèse.

Veillez trouver ici l'expression de mes sincères et respectueux remerciements.

A mes examinateurs et juges

Monsieur le Professeur Prin

Vous me faites l'honneur de juger ce travail.

J'ai pu bénéficier durant toutes ces années de votre soutien, de votre enseignement, de vos conseils, notamment durant la rédaction de cette thèse.

Veillez recevoir l'expression de ma sincère gratitude et de mon profond respect.

Monsieur le Docteur Lefranc

Tu as accepté de juger cette thèse. J'ai beaucoup apprécié ton soutien, ton éternel optimisme et ta bonne humeur. Sois assuré de ma reconnaissance et de ma sincère amitié.

Monsieur le Docteur Mallone

Vous avez immédiatement accepté de juger ce travail.

Soyez assuré de ma sincère reconnaissance.

A mon directeur de thèse

Monsieur le Professeur Wémeau

Vos enseignements m'ont été précieux tout au long de mon parcours lillois.

Vous m'avez fortement encouragée à débiter cette thèse. Je vous suis reconnaissante de m'avoir soutenue jusqu'à l'issue de celle-ci. Soyez assuré de mes sincères remerciements.

Je tiens à remercier également

Monsieur le Professeur Dessaint,

Qui a accepté de m'accueillir dans le laboratoire d'Immunologie.

L'ensemble des médecins, cliniciens et biologistes, qui ont participé à l'étude, dans l'Inter-région Nord-Ouest, puis sur le territoire national dans le cadre du PHRC, Pour leur aide dans le recrutement des patients, dans la réalisation des prélèvements, et pour l'accueil qu'ils m'ont réservé dans leurs centres hospitaliers respectifs.

Je tiens à remercier en particulier, **Monsieur le Professeur Hervé Lefebvre**, pour son enthousiasme pour cette thématique et sa sympathie.

Mesdames les Docteurs Pascale Saugier-Weber, Isabelle Fajardy, Nicole Fabien, Sophie Duban pour leur aide technique et leurs aimables conseils.

Amélie et Virginie,

Pour leur sourire, leur bonne humeur, leur sens de l'humour, et bien sûr pour l'aide apportée pour faire aboutir ensemble ce travail. Soyez assurées de ma sincère amitié.

Sylvain, Isabelle, Caty, Patricia, Jean-Emmanuel, Sandrine, Guillaume, Bénédicte,
Pour leur écoute, leurs conseils et leur sympathie.

Fanny, Christine, Laura, Anne-Sophie, Frédérique, Sophie, Catherine,

Pour leur présence au quotidien durant ces deux années de clinicat, leur gentillesse, et leur soutien sans faille dans les moments les plus difficiles.

Toutes les internes avec qui j'ai apprécié de travailler dans la joie et la bonne humeur,

Le personnel d'Endocrinologie du CHU de Lille,

Notamment Patricia et Christine, pour ne nommer qu'elles...

Le personnel du laboratoire d'Immunologie,

Laure, Chantal, Jacques, Laurence, Véronique, et tous les autres...

L'équipe du PHRC, et ses attachés de recherche clinique.

Les médecins anatomo-pathologistes et les chirurgiens qui m'ont fourni les tissus nécessaires à ce travail : Mesdames et Messieurs les Professeurs Véronique Martinot, François Pattou, Bruno Carnaille, Dominique Chevalier, Emmanuelle Leteurtre, Xavier Leroy, Madame le Docteur Agnès Wacreniez, et Monsieur le Docteur Laurent Arnalsteen.

Les patients qui ont accepté de se déplacer en vue de ce travail et de l'enquête clinique, familiale et à la réalisation de nombreux prélèvements sanguins.

RESUME

Auteur : Emmanuelle PROUST-LEMOINE

Titre : REPERTOIRE B AUTO-REACTIF T-DEPENDANT ET T-INDEPENDANT
DANS LA POLYENDOCRINOPATHIE AUTO-IMMUNE DE TYPE 1

Directeur de thèse : Professeur Jean-Louis Wémeau

Lieu et date de soutenance : Lille, 17 décembre 2010

Résumé :

La polyendocrinopathie auto-immune de type 1 (PEA1) est liée aux mutations du gène *AIRE*. En l'absence de AIRE se développe un défaut de tolérance immune centrale, à l'origine de pathologies auto-immunes multiples spécifiques d'organe.

Objectif: évaluer l'effet d'une altération « exemplaire » du répertoire T sur les empreintes auto-réactives humorales.

Méthodes: les données cliniques et immunologiques ont été recueillies chez des patients atteints de polyendocrinopathie auto-immune de type 1, puis ils ont bénéficié du séquençage du gène *AIRE*. Chez ces patients ont été analysés les profils d'auto-réactivité sérique IgG et IgM vis à vis des tissus pancréatique et surrénalien, en comparaison à des patients atteints d'autres endocrinopathies auto-immunes, et à des sujets sains. Les bandes antigéniques discriminantes ont été sélectionnées grâce à un test de Chi-2, et une approche immuno-protéomique a permis leur caractérisation moléculaire.

Résultats: dix-neuf patients atteints de PEA1 ont pu être étudiés. Ils présentaient de 1 à 10 manifestations cliniques liées à la maladie. Quatre mutations du gène *AIRE* différentes ont été identifiées, et la délétion 13-bp dans l'exon 8 (c.967-979del13) s'est avérée la plus fréquente. L'étude en immuno-empreinte a permis d'identifier 6 antigènes préférentiellement reconnus par les patients atteints de PEA1. Leur caractérisation par approche immuno-protéomique a permis de montrer qu'il s'agissait à la fois d'antigènes tissu-spécifiques (lipase pancréatique reconnue à la fois par les IgM et les IgG, amylase pancréatique reconnue par les IgG, Regenerating Protein 1 alpha pancréatique ciblée par les IgM) mais également ubiquitaires (péroxiredoxine-2 reconnue à la fois par les IgG et les IgM, Heat Shock cognate 71kDa Protein ciblée par les IgM, aldose réductase reconnue par les IgG).

Conclusion: une altération majeure du répertoire T auto-réactif, telle que celle liée aux mutations du gène *AIRE*, affecte de manière importante les réponses humorales sériques auto-réactives dépendantes d'IgG, mais également d'IgM. Ces modifications touchent à la fois des antigènes tissu-spécifiques et ubiquitaires, nous faisant évoquer un rôle au moins partiel de AIRE dans des phénomènes T-indépendants et /ou des altérations de l'immunité naturelle.

PLAN

COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS	p 10
GLOSSAIRE	p 13
PARTIE I : INTRODUCTION	p 14
<u>I. La polyendocrinopathie auto-immune de type 1 ; aspects épidémiologiques et clinico-biologiques</u>	p 16
A- Epidémiologie	p 16
B- Aspects cliniques	p 16
1- Candidose cutanéomuqueuse	p 18
2- Manifestations auto-immunes endocriniennes	p 18
3- Manifestations auto-immunes non endocriniennes	p 18
4- Manifestations cliniques plus rares	p 19
C- Diagnostics différentiels	p 20
D- Marqueurs biologiques d'auto-réactivité humorale	p 20
1- Antigènes tissus-spécifiques	p 21
2- Autres cibles antigéniques	p 22
<u>II. Bases moléculaires de la PEA1 : gène et protéine AIRE</u>	p 25
A- Identification et expression du gène <i>AIRE</i>	p 25
B- La protéine AIRE	p 26
1- Structure	p 26
2- Localisation et rôle intracellulaire de la protéine AIRE	p 27
3- Régulation de l'expression de AIRE	p 28
C- Rôle de AIRE dans la tolérance immune	p 29
1- AIRE et tolérance centrale	p 29
2- AIRE et différenciation cellulaire des mTECs	p 32
3- AIRE et cellules T régulatrices	p 34
4- AIRE et tolérance périphérique	p 36
a. Cellules hématopoïétiques périphériques	p 36
b. Cellules stromales périphériques	p 36

5- Mécanismes effecteurs en périphérie	p 38
a. Rôles respectifs des lymphocytes B et T	p 38
b. Implication des cellules iNKT	p 39
<u>III. Objectifs</u>	p 41
A- Analyse clinique, immunologique et génétique de la population étudiée	p 41
B- Analyse des profils d'auto-réactivité IgG des patients atteints de PEA1	p 42
C- Analyse des profils d'auto-réactivité IgM des patients atteints de PEA1	p 42
D- Etude des sous-populations lymphocytaires B	p 43

PARTIE II : RESULTATS

<u>I. Caractéristiques de la population étudiée</u>	p 44
A- Recueil des données cliniques	p 44
B- Méthodes d'analyse des données immunologiques	p 44
C- Séquençage du gène <i>AIRE</i>	p 45
D- Recherche de corrélation génotype-phénotype clinique	p 45

Article 1

Autoimmune Polyendocrine Syndrome Type 1 in North-Western France: *AIRE* Gene Mutation Specificities and Severe Forms Needing Immunosuppressive Therapies.

Horm Res Paediatr 2010;74:275–284

<u>II. Dérégulation de l'homéostasie B naturelle et adaptative dans la PEA1</u>	p 48
A- Etude des profils sériques auto-réactifs IgG et IgM	p 48
B- Comparaison des profils et analyse statistique	p 49
C- Approche immuno-protéomique	p 49
Article 2	p 50
Distortion of serum IgG and IgM self-reactive responses against tissue-specific and ubiquitous antigens in autoimmune polyendocrine syndrome type 1	
Soumis à Clinical Immunology	
<u>III. Dérèglement de l'homéostasie B dans la PEA1, résultats préliminaires</u>	p 51
A- Méthodes	p 51
B- Premiers résultats	p 52
PARTIE III : DISCUSSION	p 55
PARTIE IV : CONCLUSION ET PERSPECTIVES	p 64
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	p 67

COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS SUR LE SUJET

PUBLICATIONS

Proust-Lemoine E, Ryndak A, Dutoit V, Duban S, Lee-Chang C, Wémeau JL, Lefranc D, Prin L. Distortion of serum IgG and IgM self-reactive responses against tissue-specific and ubiquitous antigens in autoimmune polyendocrine syndrome type 1. Soumis à *Clinical Immunology*.

Proust-Lemoine E, Saugier-Véber P, Lefranc D, Dubucquoi S, Ryndak A, Buob D, Lalau JD, Desaillood R, Weill J, Prin L, Lefebvre H, Wémeau JL. Auto-immune Polyendocrine Syndrome Type 1 in north-west France: *AIRE* gene mutation specificities and severe forms needing immunosuppressive therapies. *Horm Res Paediatr*. 2010;74(4):275-84.

Proust-Lemoine E, Wémeau JL. APECED syndrome or autoimmune polyendocrine syndrome Type 1. *Press Med*. 2008;37(7-8):1158-71.

COMMUNICATIONS

Communications orales avec comité de lecture scientifique

Proust-Lemoine E, Dutoit V, Duban S, Raymond-Top I, Saugier-Véber P, Ryndak A, Trauet J, Labalette M, Wémeau JL, Prin L, Lefranc D. Modification des profils sériques IgG auto-réactifs vis à vis d'antigènes tissu-spécifiques et ubiquitaires et des sous-populations lymphocytaires B dans la polyendocrinopathie auto-immune de type 1. Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Nice, 9 octobre 2009.

Proust-Lemoine E, Cardot-Bauters C, Saugier-Veber P, Lefebvre H, Lalau J-D, Desaillood R., Reznik Y, Lefranc D, Prin L, Wémeau J-L. Evaluation clinique, immunologique et génétique du syndrome APECED dans le Nord-Ouest de la France : à propos de 19 observations. Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Marseille, 22 mars 2007.

Communications orales sur invitation

Proust-Lemoine E. Polyendocrinopathies auto-immunes de type 1. Congrès de la Société Française de Pédiatrie, Paris, Palais des Congrès, 16 juin 2010.

Proust-Lemoine E. Thyroïdites et polyendocrinopathies auto-immunes, Club Thyroïde Aquitaine, Bordeaux, 27 mars 2010.

Proust-Lemoine E, Quand évoquer et comment évaluer une polyendocrinopathie auto-immune de type 1 ? Journées Régionales d'Endocrinologie, Lille, 9 avril 2009.

Proust-Lemoine E, Le syndrome APECED, Un registre des patients, Séminaire d'Endocrinologie Pédiatrique, Paris, 13 janvier 2009.

Wémeau JL, Saugier-Véber P, Lefebvre H, Reznik Y, Desaillood R, **Proust-Lemoine E.** Syndrome APECED ou polyendocrinopathie auto-immune de type 1. Journées Guéritée, Paris, 21 novembre 2008.

Communications affichées avec comité de lecture scientifique

Proust-Lemoine E, Lefranc D, Cardot-Bauters C, Lefebvre H, Frébourg T, Lalau JD, Desaillood R, Reznik Y, Wémeau JL, Prin L. Seric self-IgG reactive patterns in APS 1 reveal a distortion of responses involving both tissue-specific and ubiquitary antigens. P3-586, Endocrine Society, San Francisco, 2008.

Proust-Lemoine E, Cardot-Bauters C, Saugier-Veber P, Lefebvre H, Lalau JD, Desaillood R, Reznik Y, Lefranc D, Prin L, Wémeau J-L. Autoimmune polyendocrine syndrome type 1 in

West Northern France: clinical, immunological and genetic description and immunosuppressive therapies. European Congress of Endocrinology. Berlin. 2008

Proust-Lemoine E, Lefranc D, Saugier-veber P, Lefebvre H, Lalau JD, Reznik Y, Wémeau JL, Prin L. Seric self-IgG reactive patterns in APECED reveal a distortion of responses involving both tissue-specific and ubiquitary antigens. Congrès de la Société Française d'Immunologie, Lyon 2007.

Proust-Lemoine E, Lefranc D, Cardot-Bauters C, Lefebvre H, Frebourg T, Lalau JD, Desaillood R, Reznik Y, Wémeau JL, Prin L. Analyse des altérations du répertoire B auto-réactif chez les patients atteints de polyendocrinopathie auto-immune de type 1. P1 024. Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Montpellier 2006. Ann Endocrinol, 2006, 5, 6703.

GLOSSAIRE

AADC	= Aromatic L-amino Acid Decarboxylase
AC	= Anticorps
Ag	= Antigène
AIRE	= AutoImmune Regulator
APECED	= Autoimmune PolyEndocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy
BAFF	= B cell Activating Factor of the TNF Family
CD	= Cellule Dendritique
CMH	= Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	= Cellule Présentatrice d'Antigène
CTL	= C-Type Lectin
CYP1A2	= Cytochrome P450 A2
eTACs	= extra-Thymic Aire expressing Cells
IFI	= Immunofluorescence Indirecte
Ig	= Immunoglobuline
GAD 65	= Glutamic Acid Decarboxylase
HSP71	= Heat Shock cognate 71 kDa Protein
iNKT	= invariant NKT "restreint au CD1"
LT	= Lymphotoxine
MALDI-TOF-MS	= Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight- Mass Spectrometry
mTEC	= Cellules Epithéliales Médullaires Thymiques
MZ	= Zone Marginale
NK	= Natural Killer
PAMP	= Pathogen-Associated Molecular Pattern
PEA	= PolyEndocrinopathie Auto-immune
PRR	= Pattern Recognition Receptor
Reg1A	= pancreatic Regenerating protein 1 α
SEP	= Sclérose En Plaques
TLRs	= Toll-Like Receptors
TH	= Tyrosine Hydroxylase
TPH	= Tryptophane Hydroxylase

PARTIE I : INTRODUCTION

Si le sujet a été longtemps controversé, il est maintenant communément admis que les phénomènes d'auto-réactivité correspondent à un événement physiologique majeur. Non seulement le système immunitaire a la faculté de reconnaître le « soi », préalable indispensable à la construction du répertoire immunologique, mais il est également capable, à la fois d'éliminer les cellules hautement auto-réactives et pathogènes, et de contrôler en permanence les cellules faiblement auto-réactives qui ont été préservées. En effet, certaines de ces cellules naïves ne sont pas éliminées, et leur maintien s'avère même indispensable à l'homéostasie du système immunitaire. Ces phénomènes de tolérance s'exercent donc à la fois au niveau central (élimination des cellules très auto-réactives), mais également au niveau périphérique (contrôle des cellules faiblement auto-réactives).

Ainsi, chacun possède des clones lymphocytaires naïfs T et B faiblement auto-réactifs, mais aussi des anticorps naturels dirigés contre des antigènes du soi, dits auto-anticorps naturels, présents avant même tout contact antigénique externe. Ces auto-anticorps, participent à une première ligne de défense. Ils constituent une part importante des immunoglobulines (Ig) circulantes, et présentent différentes spécificités isotypiques (IgM, IgG ou IgA). Bien que ce répertoire auto-réactif humoral « primordial » évolue et varie d'un individu à l'autre (rôle probable de l'environnement et de l'« histoire antigénique » du sujet), il demeure, semble-t-il, relativement conservé au sein de l'espèce humaine. Son répertoire serait restreint à un nombre limité d'antigènes du soi, formant une sorte d'« empreinte » dénommée « homunculus immunologique » [1]. Cette relative conservation du répertoire se vérifie à la fois pour les IgM, mais également pour les IgG [2-4].

Des travaux antérieurs du laboratoire ont montré que le répertoire auto-réactif des IgG sériques pouvait être altéré dans certaines circonstances pathologiques [5, 6]. Ainsi, dans la sclérose en plaques (SEP), cette altération a été mise en évidence par analyse en immuno-empreinte. Ceci a permis de distinguer des singularités de profils d'auto-réactivité en individualisant clairement les sujets contrôles (sujets sains et sujets atteints de syndrome de Gougerot-Sjögren) des patients atteints de SEP. Cette analyse distingue même les différentes formes cliniques de SEP [5]. Ces altérations du répertoire des IgG sériques surviennent très tôt, dès les premières manifestations de la maladie [7]. La caractérisation des cibles auto-réactives discriminantes par immuno-protéomique a permis d'identifier quelques antigènes propres au

système nerveux central [8]. De manière plus inattendue, la majorité des protéines identifiées par cette approche correspondent majoritairement à des protéines ubiquitaires.

Ces résultats nous ont conduit à nous interroger quant à la signification de telles anomalies du répertoire B dans une pathologie supposée T-dépendante comme la SEP [9]. De plus, nous avons été intrigués par le fait que les protéines identifiées comme antigènes discriminants étaient majoritairement non spécifiques de tissu, dans une pathologie touchant spécifiquement le tissu cérébral. En d'autres termes, nos premiers résultats obtenus dans la SEP témoignent-ils d'un dérèglement qui affecte à la fois la réponse immune thymo-dépendante (T-dépendante) et thymo-indépendante (T-indépendante)? Si la méthodologie employée (modalités de réalisation des immuno-empreintes) ne permet pas d'exclure une telle hypothèse, il était nécessaire de le confirmer pour mieux appréhender notamment la part respective de l'auto-réactivité naturelle et celle de l'auto-réactivité acquise dans les modifications des immuno-empreintes.

Afin de répondre à ces interrogations, il nous est apparu pertinent d'utiliser un modèle humain pathologique supposé particulièrement exemplaire en matière de T-dépendance. Dans ce modèle en effet, il existerait des anomalies moléculaires et cellulaires affectant des processus de tolérance des lymphocytes T et participant au développement de maladies auto-immunes multiples, spécifiques d'organe. Le syndrome APECED (Autoimmune PolyEndocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy) ou polyendocrinopathie auto-immune de type 1 (PEA1) correspond à cette définition. Il s'agit en effet d'une des rares pathologies auto-immunes d'origine génétique bien définie. De transmission autosomique récessive, elle est liée aux mutations du gène *AIRE* et se caractérise par un défaut de sélection négative thymique de clones T auto-réactifs vis-à-vis d'antigènes tissus-spécifiques, entraînant une atteinte auto-immune des organes cibles. La PEA1 constitue ainsi une maladie auto-immune exceptionnelle, du fait de son origine monogénique et de son mécanisme physiopathologique qui semble aujourd'hui bien défini. Nous verrons qu'à la suite de nos travaux, de nouvelles pistes physiopathologiques peuvent être évoquées.

I. La polyendocrinopathie auto-immune de type 1 ; aspects épidémiologiques et clinico-biologiques

A. Epidémiologie

La PEA1 est une pathologie rare, dont la fréquence varie d'un pays à l'autre. Sa prévalence en Finlande (où un grand nombre de cas ont été décrits du fait d'un effet fondateur) est de 1/25000 [10]. Elle est de 1/14400 en Sardaigne [11] et de 1/9000 dans la population juive iranienne [12]. Récemment, dans la population norvégienne, la prévalence a été évaluée à 1/90 000 [13], alors qu'elle serait de 1/43 000 en Slovénie [14], de 1/129 000 en Pologne [15] et de 1/130 000 en Irlande [16]. Sa prévalence en France restait jusque là incertaine car seules quelques observations isolées avaient été rapportées. Dans le monde, on a estimé le nombre de patients atteints à environ 500, ce qui est probablement sous-estimé. Sa transmission est autosomique récessive, liée aux mutations du gène *AIRE* [10].

B- Aspects cliniques

La PEA1 se caractérise par l'association d'une polyendocrinopathie auto-immune, associé ou non à d'autres pathologies auto-immunes non endocriniennes, d'une candidose cutanéomuqueuse chronique et d'une atteinte ectodermique. Elle est définie par la présence d'au moins 2 des 3 atteintes principales que sont l'insuffisance surrénalienne (ou maladie d'Addison), l'hypoparathyroïdie et la candidose ; ces 3 composantes constituent le syndrome de Whitaker [17]. Cette affection débute ordinairement dès l'enfance, mais sa reconnaissance est possible à l'adolescence et l'âge adulte. Le phénotype clinique est extrêmement variable d'un individu à l'autre, puisque les patients peuvent présenter entre 1 et 10 atteintes cliniques différentes [18]. Les principales atteintes ainsi que leurs fréquences relatives sont résumées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Les principales atteintes et leur fréquence relative dans les principales séries cliniques (H=homme, F= femme, ND=non déterminé)

	Série finlandaise 1990 [19] 68 patients	Série juive iranienne 1992 [12] 23 patients	Série italienne 1998 [20] 41 patients	Série norvégienne 2007 [13] 36 patients
Endocrinopathies				
➤ Hypoparathyroïdie	79%	96%	93%	82%
➤ Insuffisance surrénalienne	72%	22%	73%	68%
➤ Hypogonadisme périphérique	60% F 14% H	3 F 3 H	60% F 0 H	53% F 0 H
➤ Diabète de type 1	12%	4%	2,5%	9%
➤ Hypothyroïdie	3%	3%	10%	9%
➤ Hypophysite	ND	ND	7%	0
Autres maladies auto-immunes				
➤ Anémie de Biermer	13%	9%	15%	0
➤ Malabsorption	18%	ND	15%	9%
➤ Hépatite	12%	ND	20%	3%
➤ Alopécie	29%	13%	37%	41%
➤ Vitiligo	13%	ND	12%	20%
Candidose cutanéomuqueuse	100%	17%	83%	79%
Atteintes ectodermiques				
➤ Kératopathie	35%	ND	12%	9%
➤ Hypoplasie de l'émail dentaire	77%	ND	ND	38%
➤ Dystrophie unguéale	52%	ND	7%	15%

1- Candidose cutanéomuqueuse

C'est la manifestation clinique la plus fréquente. Cette candidose survient le plus souvent avant 5 ans, révélant fréquemment la maladie [12, 18-22]. Bien que différentes hypothèses physiopathologiques développées ultérieurement aient été proposées, on ignore encore aujourd'hui les raisons précises pour lesquelles ces sujets présentent une susceptibilité particulière aux infections candidosiques. Les patients peuvent également être sujets à d'autres pathologies infectieuses sévères.

2- Manifestations endocriniennes auto-immunes

L'hypoparathyroïdie s'avère l'atteinte auto-immune la plus fréquente. C'est généralement la première manifestation endocrinienne, le plus souvent présente avant 10 ans [12, 18-22].

L'insuffisance surrénalienne est la seconde atteinte auto-immune par ordre de fréquence, survenant avant l'âge de 15 ans [12, 18-22].

L'hypogonadisme périphérique se révèle plus fréquemment chez la femme que l'homme, et survient le plus souvent durant la seconde décennie [12, 18-22].

Le diabète de type 1 est moins fréquent [12, 18-22].

La thyroïdite auto-immune responsable d'hypothyroïdie est également plus rare [12, 18-22]. La maladie de Basedow est exceptionnelle dans ce contexte.

L'hypophysite lymphocytaire, également rare, est en général diagnostiquée chez l'enfant devant un retard de croissance [12, 18-22].

3- Manifestations auto-immunes non endocriniennes

Les gastrites auto-immunes surviennent chez moins de 15% des patients atteints de PEA1 et peuvent se compliquer d'anémie de Biermer [12, 18-22].

La malabsorption, fréquente, apparaît précocement [12, 18-22]. Plusieurs étiologies ont été incriminées ; destruction auto-immune des cellules entérochromaffines à différents étages du tractus gastro-intestinal, atteinte infectieuse intestinale (*C. Albicans*, *G. Lamblia* ou *C.*

difficile), insuffisance pancréatique exocrine d'origine auto-immune, maladie coeliaque, lymphangiectasies intestinales ou fibrose kystique du pancréas [20].

L'hépatite auto-immune est de fréquence et de sévérité variable, survenant précocement [12, 18-22].

Le vitiligo, retrouvé dans moins d'1/4 des cas, peut apparaître très précocement, précédant les éléments diagnostiques classiques [12, 18-22]. Il est parfois universel.

L'alopecie demeure une composante fréquente du syndrome APECED, survenant précocement [12, 18-22]. Il s'agit d'alopecie en plaques, décalvante voire universelle.

La kérato-conjonctivite constitue une atteinte fréquente, apparaissant le plus souvent avant 4 ans [12, 18-22].

L'hypoplasie de l'émail dentaire et la **dystrophie unguéale** sont inconstamment rapportées, et débutent généralement durant la première décennie de la vie [19, 22]. Un mécanisme auto-immun a été évoqué [20], bien que ces sites ne soient pas facilement accessibles à une atteinte auto-immune. Tout récemment, une équipe a montré l'expression très précoce de Aire chez l'embryon murin, avant la gastrulation, dès le stade blastocyste; l'absence très précoce de Aire serait une explication potentielle à cette atteinte ectodermique [23].

4- Manifestations cliniques plus rares

D'autres pathologies, associés ou non à des marqueurs d'auto-réactivité spécifique, ont été décrites au cours de la PEA1 [12, 18-22]: bronchiolite oblitérante, néphrite tubulo-interstitielle, hypertension artérielle pulmonaire primitive, myocardite lymphocytaire, atrophie splénique, syndrome de Gougerot-Sjögren, sclérodermie, polyarthrite rhumatoïde, dysplasie métaphysaire réversible, atrophie musculaire progressive, anémie hémolytique auto-immune, insuffisance primitive des cellules de Sertoli, insuffisance testiculaire exocrine, pseudo-hyperminéralo-corticisme,...

Des pathologies tumorales sont également possibles ; carcinomes épidermoïdes de la sphère buccale ou digestive haute se développant sur un terrain de candidoses muqueuses chroniques négligées [18], leucémies à grands lymphocytes granuleux [24], ...

La multiplicité de ces pathologies associées laisse penser qu'il existe une profonde altération de l'homéostasie du système immunitaire avec de graves conséquences sur les processus de tolérance mais aussi sur les phénomènes d'immuno-surveillance.

C-Diagnostics différentiels

La PEA1 est à distinguer des autres polyendocrinopathies auto-immunes : celles-ci demeurent beaucoup plus fréquentes, progressivement constituées à l'âge adulte, polygéniques, et liées à l'haplotype HLA. Elles ont été initialement démembrées en type 2 (atteinte surrénale et thyroïdienne), type 3 (atteinte thyroïdienne et autre atteinte auto-immune excluant la surrénale), type 4 (pathologies auto-immunes différentes de celles précédemment spécifiées) [25, 26]. Ces classifications n'ont plus, à ce jour, de justification physiopathologique, et sont actuellement regroupées sous le terme générique de **polyendocrinopathies auto-immunes de type 2** ou PEA2 [27].

Le **syndrome IPEX** (Immune dysrégulation Polyendocrinopathy, Enteropathy, X linked syndrome), plus exceptionnel encore, constitue une autre pathologie auto-immune à transmission monogénique liée à l'X. Il se caractérise par la survenue très précoce d'un diabète de type 1, d'une entéropathie, d'un eczéma, d'une hypothyroïdie et d'autres manifestations auto-immunes [28]. Il est lié aux mutations du gène *FOXP3*, (forkhead box P3) ; la protéine FOXP3 est en effet un facteur de transcription essentiel au développement et au fonctionnement des cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺, impliquées dans l'homéostasie immune et la prévention de l'auto-immunité pathologique.

Enfin, de manière intéressante, une association de pathologies auto-immunes similaires au syndrome APECED (hypoparathyroïdie, insuffisance surrénalienne) vient d'être décrite chez un patient atteint de thymome. Alors que celui-ci n'était pas porteur de mutations du gène *AIRE*, il a été noté l'absence d'expression de AIRE au niveau de la tumeur [29]. Plus fréquemment, des myasthénies d'origine auto-immune sont décrites chez ces patients. De plus, les AC anti-interféron de type 1 et anti-IL-17F et anti-IL-22 y sont retrouvés, comme dans la PEA1 [30, 31]. Un défaut de tolérance centrale lié à l'absence de AIRE est évoqué chez les patients atteints de thymomes [32].

D- Marqueurs biologiques d'autoréactivité humorale

De nombreux antigènes majoritairement spécifiques d'organe sont la cible d'auto-anticorps (AC) détectés dans le sérum de ces patients (tableau 2). Certains AC sont identiques à ceux retrouvés dans d'autres maladies auto-immunes, d'autres sont spécifiques de la PEA1.

1-Antigènes tissus-spécifiques

-Atteinte parathyroïdienne : les AC anti-parathyroïde détectés en IFI sont habituellement absents chez les patients APECED [20], alors que les AC anti-récepteur sensible au calcium sont retrouvés de manière inconstante selon la technique utilisée [18, 33, 34]. Des anticorps anti- NALP5 (NACHT leucine-rich-repeat protein 5) ont été observés chez 49 % des patients atteints d'hypoparathyroïdie au cours de la PEA1 mais sont absents dans les autres causes d'hypoparathyroïdie [35].

-Atteinte surrénalienne et gonadique : les anticorps anti-surrénale identifiés en immunofluorescence indirecte (IFI) sont très souvent positifs au moment du diagnostic (plus de 90 % des cas). Les AC anti-cellules stéroïdiennes détectés en IFI sont considérés comme des marqueurs sérologiques de l'hypogonadisme périphérique. Trois auto-antigènes ont été identifiés dans ces atteintes, correspondant au cytochrome P450 impliqués dans la synthèse des hormones stéroïdiennes: les AC anti-21 hydroxylase (associés aux anticorps anti-surrénale et à l'atteinte surrénalienne), les anticorps anti-Side Chain Cleavage (associés aux AC anti-cellules stéroïdiennes, aux atteintes surrénalienne et gonadique), et les AC anti-17 α hydroxylase (dont l'association avec l'atteinte gonadique est controversée) [20, 36]. Ils sont présents chez respectivement 76, 61 et 52 % des patients [37, 38]

-Atteinte pancréatique endocrine: les AC anti-Glutamic Acid Decarboxylase 65 (GAD 65) et les AC anti-îlots de Langherans (ICA) sont très souvent retrouvés chez les patients APECED, mais sont peu spécifiques de diabète de type 1 [20]. Les AC anti-Tyrosine Phosphatase-like Protein (IA-2) et anti-insuline, semblent être moins sensibles mais beaucoup plus spécifiques [36]. On retrouve également des AC anti-Aromatic L-Amino acid Décarboxylase (AADC) [38].

-Atteinte thyroïdienne : les AC anti-thyropéroxydase et les AC anti-thyroglobuline sont positifs dans 27 à 28 % des cas, mais ils sont peu spécifiques [20, 38].

-Atteinte hypophysaire : les techniques d'IFI se sont révélées peu contributives. Des AC anti-TDRD6 (Tudor domain containing protein 6, protéine exprimée dans l'hypophyse de fonction inconnue) ont été détectés chez 49 % des patients atteints d'APECED, et absente chez les témoins. Mais elle n'est curieusement pas corrélée avec l'atteinte hypophysaire [39]. Des AC anti-enolase hypophysaire ont également été détectés, mais leur présence n'est là encore pas corrélée à l'atteinte clinique correspondante [40].

-Malabsorption : les cellules entéro-chromaffines du tractus digestif sont des cibles d'auto-réactivité privilégiées spécifiques dans la PEA de type 1. On peut mettre en évidence des AC anti-tryptophane hydroxylase chez 45 à 50 % des patients atteints [36, 41], des anticorps anti-histidine décarboxylase chez 37 % des patients [42] et de manière plus inattendue des anticorps anti-GAD65 (exprimée aussi dans les plexus nerveux intestinaux) [36].

-Atteinte gastrique : les AC anti-cellules pariétales gastriques en IFI sont les habituels marqueurs d'anémie de Biermer, ainsi que les AC anti-facteur intrinsèque [38].

-Atteinte hépatique : les AC anti-LKM1 (Liver Kidney Microsomes) sont présents chez 50 à 75 % des patients souffrant d'hépatite auto-immune au cours de la PEA 1 [20, 38]; les AC anti-cytochrome P450 1A2 (CYP1A2), les AADC mais également plus étonnamment les AC anti-Tryptophane Hydroxylase (TPH), sont très significativement associés à l'atteinte hépatique [36, 43].

-Atteinte cutanée : les AC anti-follicules pileux et les AC anti-tyrosine hydroxylase (TH) sont associés à l'alopecie [44, 45]. Les AC anti-AADC mais aussi les anticorps anti-SOX 10 sont quant à eux associés à la présence d'un vitiligo [36, 46].

-Atteinte bronchique : la présence d'AC dirigés contre l'épithélium respiratoire des bronchioles a été caractérisée ; les AC anti-KCNRG (potassium channel regulator) sont spécifiques de l'atteinte bronchique [47].

2-Autres cibles antigéniques

Par ailleurs, il est intéressant de noter que des auto-anticorps non tissus-spécifiques ont été identifiés chez ces patients ; **des AC anti-interféron** de type IgG ont été identifiés dans le sérum de patients atteints de PEA1 [13, 48]. Ils possèdent une action neutralisante et sont dirigés principalement contre les IFN- α , mais également contre les INF- ω . Dans cette étude, les

2 types d'AC sont présents chez tous les patients, ce qui leur confère une excellente sensibilité (100%). Leurs titres sont très élevés, et leur survenue peut précéder les premières manifestations cliniques auto-immunes, voire la candidose. S'ils sont absents chez les témoins sains ou hétérozygotes, ils peuvent être retrouvés chez les patients atteints de thymome, mais à des taux plus faibles. Si leur rôle exact reste à définir [48], ils pourraient être considérés comme un nouveau marqueur diagnostique de la pathologie [30].

Plus récemment des AC dirigés contre des cytokines de type Th17 ont été mis en évidence dans le syndrome APECED, simultanément par deux équipes. En effet, les lymphocytes T de type Th17, producteurs de cytokines pro-inflammatoires telle que l'IL17-A, sont impliqués dans la première ligne de défense contre les infections fongiques épithéliales, particulièrement au niveau des muqueuses [49]. Dans ce type d'infection, les lymphocytes de type Th17 produisent des cytokines (IL-17 et IL-22), permettant ainsi le recrutement et l'activation des polynucléaires neutrophiles qui élimineront l'infection [50]. Les réponses de type IL-17F et IL-22 au *Candida* sont diminuées chez les patients APECED atteints de candidose, alors même que ces patients expriment des AC neutralisants vis à vis de ces 2 cytokines [31, 51]. Ainsi, les patients atteints de PEA1 ont des titres élevés d'auto-AC neutralisants contre l'IL-17A, l'IL-17F et l'IL-22, notamment ceux atteints de candidose. Ces AC sont retrouvés dans les thymomes, mais pas dans les autres pathologies auto-immunes étudiées. Ils pourraient être ainsi liés à la survenue de candidoses chez ces patients.

Composant de la pathologie	Tissu touché	Cible antigénique	Rôle de l'antigène
Insuffisance surrénalienne	Cortico-surrénale	21 hydroxylase 17 α hydroxylase enzyme de clivage (SCC)	} Biosynthèse des hormones stéroïdiennes
Hypoparathyroïdie	Parathyroïde	Récepteur sensible au calcium NALP5	Homéostasie calcique ?
Hypogonadisme	Ovaire et testicule	17 α hydroxylase enzyme de clivage (SCC)	} Biosynthèse des hormones stéroïdiennes
Diabète de type 1	Pancréas endocrine	Glutamic Acid Decarboxylase (GAD65) Insuline Tyrosine phosphatase (IA2)	Biosynthèse du GABA Homéostasie glucidique ?
Hypothyroïdie	Thyroïde	Thyropéroxydase Thyroglobuline	Biosynthèse des hormones thyroïdiennes Précurseur des hormones thyroïdiennes
Hypophysite	Hypophyse	Tudor Domain containing protein 6 (TDRD6)	?
Gastrite atrophique / Biermer	Muqueuse gastrique	Facteur intrinsèque	Absorption de la vitamine B12
Malabsorption	Tractus gastro-intestinal	Glutamic Acid Decarboxylase (GAD65) Histidine décarboxylase Tryptophane hydroxylase	Biosynthèse du GABA Biosynthèse de l'histamine Biosynthèse de la sérotonine (1 ^{ère} étape)
Hépatite auto-immune	Foie	Aromatic L-Amino acid DéCarboxylase (AADC) Cytochrome P450 1A2 Cytochrome P450 2A6 Cytochrome P450 1A1 Cytochrome P450 2B6	Biosynthèse de la dopamine (2 ^{ème} étape) et de la sérotonine (2 ^{ème} étape) } Transport d'électrons et hydroxylation
Vitiligo	Peau	SOX 9 SOX 10 Aromatic L-Amino acid DéCarboxylase (AADC)	} Facteurs de transcription Biosynthèse des catécholamines et indolamines
Alopécie	Follicule pileux	Tyrosine hydroxylase	Biosynthèse de la dopamine (1 ^{ère} étape)
Atteinte bronchiolaire	Bronchiole	KCNRG	Canal potassique

Tableau 2 : principales cibles antigéniques connues pour chaque tissu potentiellement siège d'une atteinte auto-immune dans la PEA1.

II. Bases moléculaires de la PEA1 : gène et protéine AIRE

A- Identification et expression du gène AIRE

Le locus de la PEA1 a été mis en évidence en 1994 par analyse de liaison ; il est situé en 21q22.3 [10]. Le gène *AIRE* (AutoImmune REgulator) a finalement été identifié par clonage positionnel en 1997 [52, 53], il comprend 14 exons (figure 1). Plus d'une soixantaine de mutations ont été identifiées à ce jour.

Ce gène est exprimé principalement au niveau thymique (cellules épithéliales médullaires, mTECs et cellules dendritiques, CD). Cette expression du gène *Aire* a également été identifiée dans la région médullaire et paracorticale des ganglions, dans la rate et dans le foie fœtal et dans des cellules stromales appelées extra-Thymic Aire expressing Cells (eTACs) [52, 54]. Il est également retrouvé dans le sang périphérique, mais exclusivement au niveau des monocytes et des CD différenciées (pour la protéine Aire) [55].

De manière intéressante, Aire serait exprimé très tôt chez l'embryon, avant la différenciation en 3 couches germinales (ectoderme, endoderme, mésoderme) ou gastrulation; cette notion récente pourrait avoir un lien avec l'existence d'une dystrophie ectodermique dans l'APECED. En effet, il n'est pas clairement établi si cette manifestation du syndrome APECED est une entité à part entière ou s'il s'agit simplement d'une atteinte auto-immune des phanères (ongles, émail dentaire...) [23].

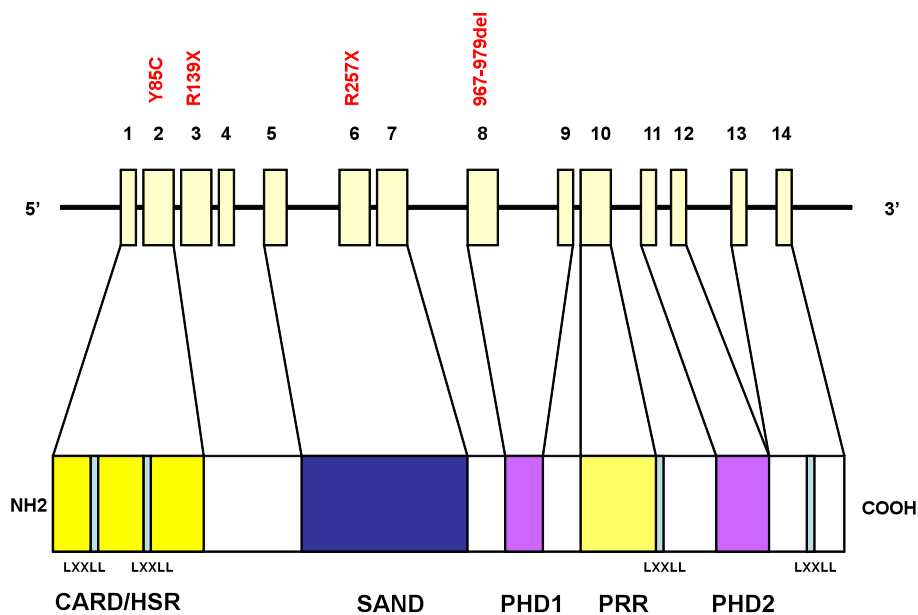


Figure 1: gène *AIRE* et protéine correspondante, avec ses différents domaines fonctionnels. Les mutations du gène *AIRE* les plus fréquentes sont annotées en rouge.

B- La protéine AIRE

1- Structure

Le gène *AIRE* code pour la protéine AIRE 1 de 57,7 kDa, de pHi à 7,32, comportant 545 acides aminés [53]. Cette protéine est composée de nombreux domaines structurels retrouvés dans d'autres facteurs de transcription (figure 1).

On y trouve 2 domaines typiques en doigt de zinc (Plant Homeo Domain = PHD), PHD1 et 2, contenus dans des protéines nucléaires correspondant à des co-activateurs de la transcription ou à des modulateurs de la chromatine. Les 4 motifs LXXLL sont fréquemment retrouvés dans les co-activateurs de la transcription ; il permettrait la liaison protéine-protéine. Le domaine SAND est un domaine de liaison à l'ADN. Il existe également un domaine CARD (caspase recruitment domain), ayant une fonction d'homo ou d'hétéro-dimérisation [56], autrefois identifié comme ayant une forte homologie avec le domaine HSR (Homogeneously Staining Region) de la protéine Sp100 (modulatrice de la transcription). On note enfin une région riche en proline (PRR).

Ces domaines jouent un rôle important dans la fonctionnalité de la protéine, comme en témoigne le fait qu'ils soient le siège de la majorité des mutations du gène *AIRE* (figure 1). La plupart d'entre elles ont pour effet de modifier la distribution cytoplasmique et nucléaire de la protéine AIRE. Les mutations qui touchent le domaine CARD ou HSR, comme la mutation iranienne la plus commune c.254A>G (p.Tyr85Cys), bloquent la domiciliation cytoplasmique de AIRE, vraisemblablement en inhibant l'importation de la protéine vers le noyau [57]. Les mutations affectant le domaine SAND modifient la répartition de la protéine entre le noyau et le cytoplasme, et provoquent une coloration péri-nucléaire excessive *in vitro* [57, 58]. Ceci est en faveur d'un rôle du domaine SAND dans les mécanismes de transport nucléaire. La mutation finlandaise dite « majeure » c.769 C>T (p.Arg257Stop), affecte ce domaine, aboutissant à une protéine tronquée en son extrémité carboxy-terminale ; non seulement la répartition intracellulaire de la protéine est modifiée, mais sa fonction transactivatrice est abolie, avec la perte de ses 2 domaines PHD [57]. Ainsi, cette mutation non sens c.769 C>T (p.Arg257Stop) s'avère très délétère, puisqu'elle résulte en une perte quasi-totale de la fonction protéique, et il a été noté que sa présence chez un patient atteint de syndrome APECED était associée à une fréquence accrue de candidoses [59]. D'autres mutations faux-sens touchant le

domaine CARD/HSR ou le domaine PRR semblent avoir des effets moindres sur la fonctionnalité de la protéine.

2- Localisation et rôle intracellulaire de la protéine AIRE

La protéine AIRE est principalement localisée au niveau nucléaire (aspect ponctué en immunofluorescence) [57], mais également le long du cytosquelette cytoplasmique [54].

De par sa structure et sa localisation, AIRE possède de nombreuses caractéristiques d'un facteur de transcription. De plus, elle se lie au co-facteur de transcription CREB-binding protein (CBP), qui serait impliqué dans la régulation de la transcription [60]. D'autres co-activateurs de la transcription tels pTEF-B (impliqué dans l'élongation transcriptionnelle) [61] et DNA-PK (kinase spécifique de l'ADN) [62] interagissent avec AIRE (Figure 4, p 37) [63]. Ce rôle transcriptionnel de AIRE a été montré *in vitro*. Lors d'expériences de co-transfection, Aire peut activer le promoteur de l'INF β et cette activité transcriptionnelle est médiée par les domaines PHD [58]. Ce domaine se lie à l'histone H3 en fonction de sa méthylation (affinité sélective pour H3K4 non méthylé) [64]. AIRE possède également une activité de transactivation de la transcription [60]. Enfin, AIRE présente une activité E3 ubiquitine ligase, abolie en cas de mutation du domaine PHD1 et pourrait ainsi jouer un rôle dans la voie du protéasome, par facilitation de la polyubiquitination de ses substrats [65].

Toutefois AIRE ne partage pas toutes les caractéristiques d'un facteur de transcription typique. D'une part AIRE influence l'expression d'un nombre considérable de gènes, et il semble difficile qu'elle soit capable de se lier de manière spécifique à un si grand nombre de promoteurs [66]. D'autre part, AIRE régule l'expression de gènes regroupés en « clusters » au niveau du génome [67]. De plus les transcrits sous le contrôle de AIRE sont très dépendants de la cellule concernée ; les profils d'expression génique sous la dépendance de AIRE varient en effet entre les cellules épithéliales médullaires thymiques (medullary Thymic Epithelial Cells ou mTECs), les cellules extra-thymiques exprimant AIRE (ou eTACs), ... [68, 69]. Enfin, il a été montré qu'une mTEC donnée exprime un transcrit ectopique de manière stochastique [70, 71]. L'ensemble de ces paramètres suggère que AIRE n'est pas un facteur de transcription conventionnel, mais que cette protéine régule l'expression de gènes en accentuant ou modifiant des programmes déjà en place dans la cellule [66].

3- Régulation de l'expression de AIRE

Autrement dit, qui régule le régulateur ? Les mécanismes régulant l'expression de AIRE sont encore peu connus. Il a été suggéré que la voie des lymphotoxines (LT, exprimées au niveau des thymocytes) via leur récepteur LT β R (à la surface des mTECs) était responsable de l'expression de AIRE et de ses gènes cibles au niveau des mTECs [72]. Toutefois, des travaux ultérieurs ont montré que la signalisation LT β R intervenait bien dans la différenciation des mTECs, mais pas dans l'expression de AIRE [73], et que son influence serait plus marquée dans les mTECs Aire $-/-$ [74].

Le système RANK/RANK ligand et sa cascade de signalisation TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) et NIK (NF- κ B inducing kinase) sembleraient jouer un rôle plus important dans la génération des mTECs Aire $+/+$, puisque leurs modèles murins KO respectifs sont à l'origine d'une nette réduction de ces cellules [75, 76]. Là encore, il reste difficile de distinguer l'impact de la signalisation RANK sur la différenciation des mTECs et sur l'activation de AIRE [66].

C- Rôle de AIRE dans la tolérance immune

1- AIRE et tolérance centrale

La protéine AIRE est ainsi principalement exprimée au niveau des mTECs, et présente *in vitro* des caractéristiques de facteur de transcription. Or des transcrits d'ARN codant pour des protéines ectopiques sont retrouvés au niveau de ces mêmes mTECs [77].

L'élaboration simultanée par 2 équipes d'un modèle murin Aire^{-/-} a permis la mise en évidence du rôle central de Aire dans la tolérance du soi. L'homologue murin du gène *AIRE* code pour une protéine de 552 acides aminés, qui présente 71% d'homologie avec la protéine humaine. Les souris Aire^{-/-} présentent une auto-immunité spontanée spécifique d'organe, similaire à celle de la PEA1 [68, 78], mais non identique ; de plus, elles ne développent pas de candidoses. Cette auto-immunité est variable d'une souris Aire^{-/-} à l'autre, influencée par d'autres facteurs génétiques tels que le CMH ou les régions *Idd3* et *Idd5* [79]. Dans ces modèles d'étude, on note une réduction voire une abolition spécifique de transcrits ectopiques le plus souvent tissus-spécifiques au niveau des mTEC. Certains d'entre eux (codant pour le cytochrome P450 1A2, la préproinsuline, la thyroglobuline, ...) codent pour des protéines reconnues par des auto-anticorps dans la PEA1 [68]. D'autres anomalies de la réponse immune ont été observées dans ce contexte. La prolifération clonale lymphocytaire T après immunisation par un antigène exogène tel que HEL (Hen Egg Lysosome) est 3 à 5 fois plus importante que celle des souris Aire^{+/+} [78]. Ces réponses traduisent une altération des processus de régulation contrôlant une réponse immune adaptée. Un remarquable modèle de souris double transgène (croisement de souris exprimant l'antigène HEL dans les cellules β pancréatiques sous la commande du promoteur de l'insuline, avec des souris exprimant un TCR de forte avidité pour le HEL) a permis de mieux appréhender ces mécanismes. Chez cette souris double transgène Aire^{-/-}, il existe une perte de la sélection négative thymique des lymphocytes T spécifiques de HEL qui sont ainsi retrouvés en périphérie [80]. On note ainsi un ciblage de la réponse auto-réactive pathogène vis-à-vis des cellules β des îlots pancréatiques. Aire commande ainsi l'expression de transcrits d'ARN ectopiques et ce de manière dose-dépendante ; la perte d'un seul allèle réduit de manière importante l'expression thymique d'une protéine donnée et favorise la constitution de clones T auto-réactifs en périphérie [81].

Des travaux récents soulignent aussi certaines relations entre les modalités d'expression du gène *Aire* et l'induction de processus apoptotiques. Pour certains auteurs, l'expression de

Aire dans une cellule (notamment les mTECs) entraînerait une mort rapide par apoptose [82]. Les thymocytes pourraient ainsi reconnaître les complexes CMH/ antigènes ectopiques non seulement directement sur les mTECs, mais également indirectement sur les CD ayant phagocyté des corps apoptotiques issus de mTECs (figure 2) [66]. Toutefois, pour d'autres auteurs, cette apoptose des mTECs liée à l'expression de Aire dans ces cellules serait un phénomène indirect et retardé. En effet, les mTECs évolueraient secondairement vers un stade Aire- CD80^{intermediate} ; ainsi l'expression de Aire dans la mTEC ne serait pas constitutive et immuable (à partir du moment où elle y est apparue jusqu'à la mort cellulaire), mais serait « down-régulée » dans les phases de différenciation terminale de la mTEC [23].

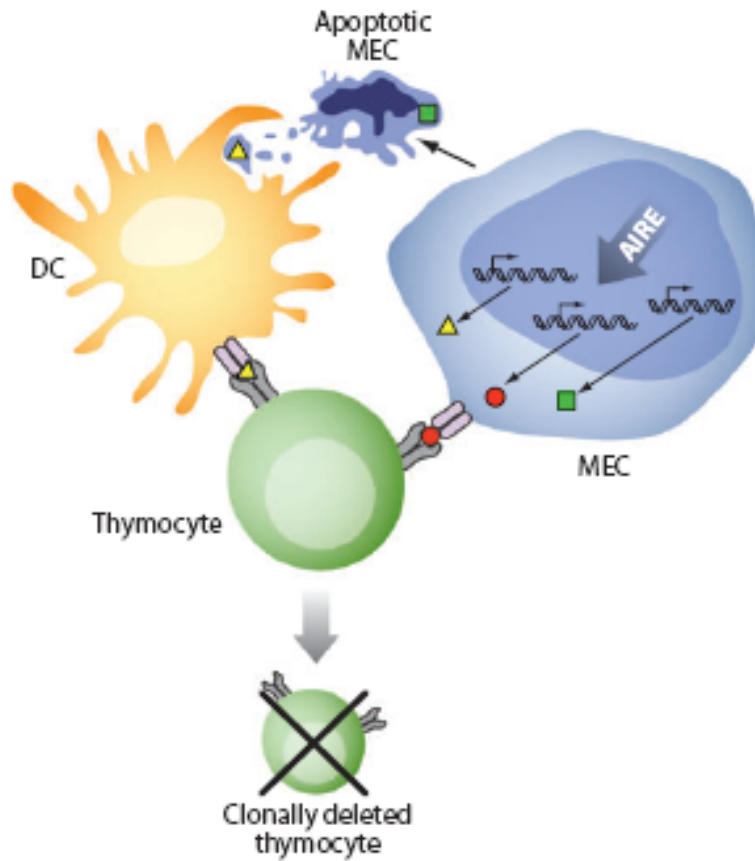


Figure 2 : Aire permet la délétion clonale des thymocytes auto-réactifs, d’après Mathis D et Benoist C [66].

Aire permet l’expression de nombreux antigènes ectopiques par les mTECs, qui les présentent à leur surface, liés au CMH. La mTEC meurt ensuite par apoptose.

Le thymocyte migre à travers la médulla, et si son TCR reconnaît le complexe CMH/Ag avec une forte affinité, il est délété. Les thymocytes peuvent reconnaître le complexe CMH/Ag directement sur la mTEC, ou indirectement sur une DC ayant phagocyté des corps apoptotiques de mTECs.

2- AIRE et différenciation cellulaire des mTECs

Deux modèles de différenciation cellulaire s'opposent pour expliquer cette intrigante capacité des mTECs à exprimer des transcrits ectopiques (figure 3). Farr *et al* défendent un modèle de « restriction progressive » (figure 3B), selon lequel les mTECs d'abord pluripotentes perdraient progressivement cette capacité, pour ne représenter finalement qu'un profil de synthèse de protéines propre à un type cellulaire donné (certaines cellules ayant eu un aspect voisin des thyrocytes, ou de cellules mammaires par exemple) [83, 84]. Les publications plus récentes sont plutôt en faveur d'un modèle de « différenciation terminale » (figure 3A). Dans ce modèle, les mTECs Aire + représenteraient une population cellulaire à un stade avancé de différenciation [82]. Ainsi, une même cellule exprimerait des transcrits ectopiques qui n'auraient pas de lien entre eux, et ne serait donc pas représentative d'un sous-type cellulaire particulier [70]. Enfin, il a été montré qu'un transcrit codant pour un antigène ectopique donné n'est exprimé que par un nombre très réduit de mTECs [70].

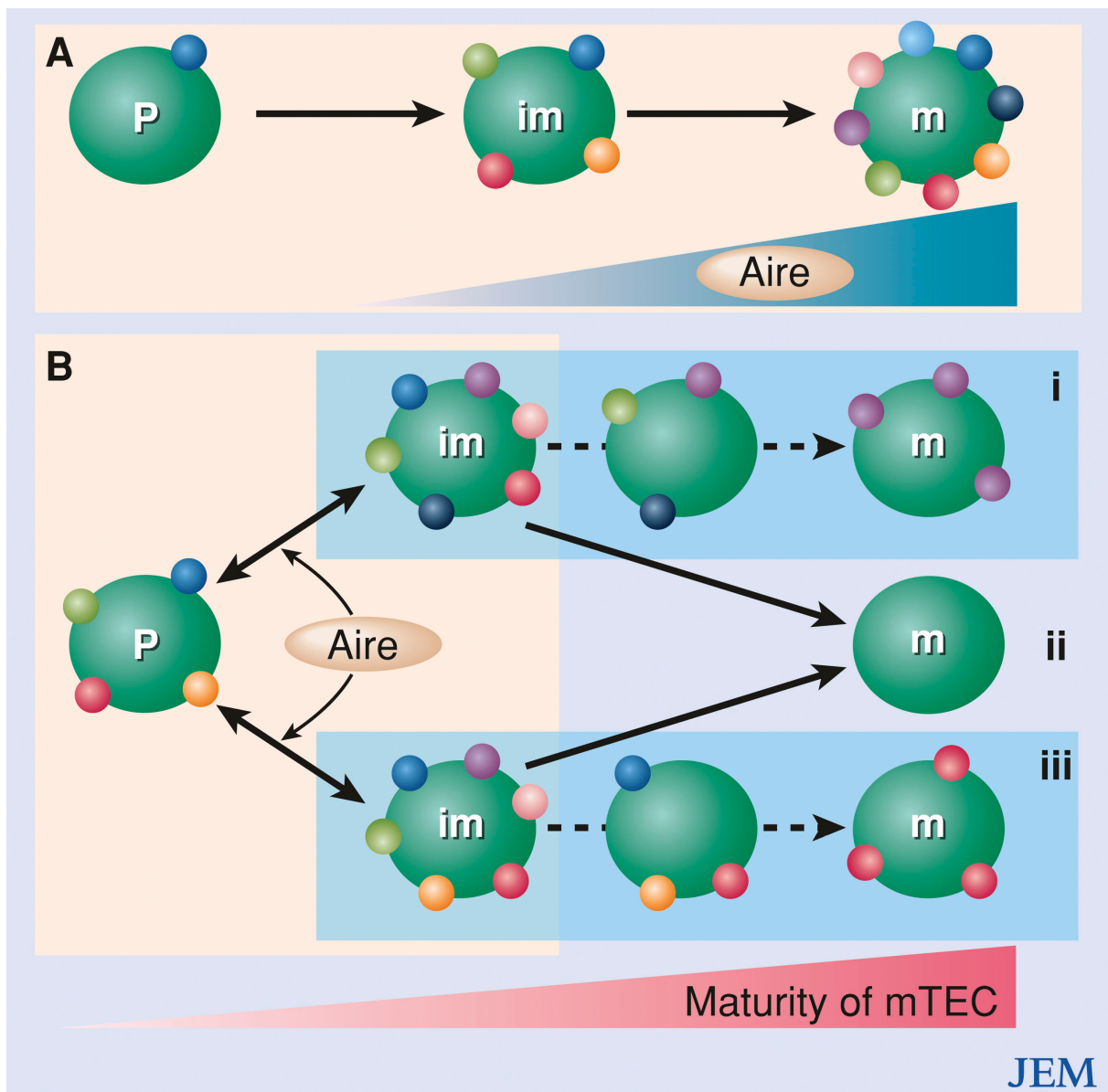


Figure 3 : Mécanismes potentiels permettant l’expression d’antigène ectopiques par les mTECs, d’après Gillard et Farr [84].

A : modèle de différenciation terminale ; la cellule devient progressivement capable d’exprimer Aire et des transcrits d’origines diverses. Ce modèle est actuellement privilégié.

B : modèle de restriction progressive ; les progéniteurs pluripotents se différencient progressivement pour n’exprimer le programme que d’un sous-type cellulaire donné (i ou iii), ou pour perdre tous les régulateurs périphériques et exprimer finalement un programme indéterminé (ii).

3- AIRE et cellules T régulatrices

Rappelons tout d'abord qu'il existe au moins deux grands types de cellules T régulatrices. D'une part, les **cellules T régulatrices adaptatives ou induites** : leur genèse est liée à des interactions, en périphérie, de cellules T naïves avec des CD. Ces dernières peuvent en effet favoriser des réponses tolérogènes en fonction de la qualité des signaux membranaires adressés aux cellules T et/ou de la production de médiateurs (cytokines immuno-régulatrices, ...). Ainsi, les cellules Tr1 (Type 1 T regulatory) et les cellules Th3 ont des propriétés de cellules régulatrices. Elles produisent respectivement de l'interleukine 10 ou du TGF- β . D'autre part, les **cellules T régulatrices naturelles**, constitutivement présentes, et d'origine thymique : il s'agit de cellules CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ qui inhibent *in vitro* et *in vivo* la prolifération et la réponse effectrice des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. Comme décrit plus haut, leur déficit chez l'homme est à l'origine du syndrome IPEX. Ces cellules sont sélectionnées au niveau thymique, tout comme les cellules T auto-réactives naïves dont elles vont contrôler la prolifération en périphérie ; l'équilibre entre ces cellules T régulatrices et T effectrices est maintenu en permanence de manière dynamique, en situation physiologique [85].

Certains auteurs ont remis en cause le fait que les mTECs (qui constituent un nombre restreint de cellules) puissent à elles seules épurer l'ensemble du répertoire T à fort potentiel auto-réactif. Ils ont ainsi évoqué la possibilité d'un rôle de AIRE dans la sélection positive des cellules T régulatrices. Des résultats contradictoires ont été obtenus à partir de différents modèles d'études. D'une part, les données expérimentales dans les modèles murins n'ont pas apporté d'arguments permettant d'évoquer une implication des T régulateurs. A l'inverse, des études cliniques plaident pour des altérations quantitatives et qualitatives des T régulateurs dans la PEA1.

Chez les souris Aire $-/-$, le nombre et la fonction *in vitro* des lymphocytes T régulateurs CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ en périphérie ne semblent pas altérés [86, 87]. Il a été montré, en comparant les modèles murins Aire $+/+$ et Aire $-/-$ double transgènes (TCR et son antigène « cognate », décrit plus haut), que le défaut d'expression de Aire n'avait aucun effet sur le nombre de cellules T régulatrices Foxp3⁺ [80, 81, 87]. De plus, la comparaison des répertoires du TCR de cellules T régulatrices issues de souris Aire $+/+$ et Aire $-/-$ a mis en évidence leur similarité, laissant penser que la sélection positive et le répertoire global des cellules T régulatrices ne sont pas Aire-dépendant [88].

A contrario, une altération qualitative et quantitative des cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺ a été constatée, chez les patients atteints de PEA1 [89]. Ceci constitue une explication potentielle au fait que le phénotype clinique des patients atteints de PEA1 apparaît plus sévère que celui des souris Aire $-/-$. Ainsi, la proportion de ces cellules serait diminuée chez ces patients [90]. De plus, elles présenteraient des altérations qualitatives du répertoire auto-réactif de leur TCR (plus polyclonal que chez les témoins). Il a été noté par ailleurs une diminution significative de l'expression de FOXP3 (ARNm et protéine), et une expression préférentielle de AIRE dans la périphérie des corpuscules de Hassall thymiques [89], impliqués dans la sélection positive des cellules T régulatrices [91]. Toutefois, d'autres auteurs soulignent que cette diminution relative du nombre de cellules T régulatrices dans la PEA1 pourrait être secondaire aux infections chroniques par le *Candida albicans*, par séquestration au niveau des sites inflammatoires [66]. Enfin, il existerait physiologiquement un réservoir de cellules T régulatrices naïves en périphérie, appelé « recent thymic emigrants » ou RETs ; chez les patients atteints de PEA1, ce réservoir de cellules T régulatrices naïves périphériques aurait un turn-over accéléré, entraînant une déplétion de celui-ci au profit de cellules T régulatrices activées [92]. Or ces cellules T régulatrices activées des patients souffrant de PEA1 expriment moins FOXP3 que les sujets sains [89, 92], et l'on sait que le niveau d'expression de FOXP3 serait corrélé à l'activité suppressive de ces cellules. L'ensemble de ces données plaide en faveur d'une altération à la fois qualitative et quantitative des cellules T régulatrices CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ dans la PEA1.

Ainsi, l'homéostasie de ce pool de cellules régulatrices semble perturbée chez le patient atteint de PEA1, alors qu'elle apparaît relativement conservée dans le modèle murin Aire $-/-$. Ce constat pourrait expliquer la différence entre les atteintes relativement modérées du modèle murin, et le phénotype clinique gravissime de certains patients atteints de syndrome APECED. Toutefois, l'interprétation des processus liés à cette dérégulation reste mal définie.

4- AIRE et tolérance périphérique

a. Cellules hématopoïétiques périphériques

Le rôle de la protéine Aire au niveau des monocytes et des CD en périphérie est controversé. Si Aire y est effectivement exprimée, le nombre de transcrits y est dix fois inférieur à celui retrouvé dans les mTECs [68]. Toutefois, certains auteurs ont montré que les CD des souris Aire^{-/-} induisaient une prolifération lymphocytaire T CD4⁺ plus importante que celles des souris Aire^{+/+}, de manière indépendante de l'expression du CMH de classe II. Ce caractère « immunogène » des CD serait liée à la surexpression de molécules co-stimulatrices comme le VCAM-1 à leur surface [93]. De plus, le nombre de cellules présentatrices d'antigène (CPA) sanguines, spléniques et ganglionnaires serait augmenté chez les souris Aire^{-/-} [93]. D'autres auteurs n'ont pu confirmer ces données [87].

b. Cellules stromales périphériques

Plus récemment une population de cellules stromales exprimant également des transcrits ectopiques a attiré l'attention de deux équipes. Lee *et al.* ont rapporté leur présence au niveau ganglionnaire, et leur capacité à exprimer Aire, sans apporter la preuve du lien entre la présence de ces transcrits ectopiques et celle de Aire [94]. Par la suite, Gardner *et al.* ont confirmé l'expression de Aire en périphérie dans ces cellules stromales (appelées eTACs, pour « extra-Thymic Aire expressing Cells » dans leur travail), dans les ganglions et la rate, au niveau des zones de jonction entre cortex et para-cortex. Ces cellules stromales exprimeraient le CMH de classe II, et Aire y jouerait également un rôle transcriptionnel. De nombreux gènes sont ainsi « up-régulés » par Aire dans les eTACs, mais ils s'avèrent différents de ceux dont AIRE module l'expression dans les mTECs (Figure 4). Il s'agit majoritairement de gènes codant pour des protéines le plus souvent ubiquitaires, impliquées dans l'adhésion inter-cellulaire (VCAM-1 ; ICAM-1, ...) ou dans la présentation de l'Ag (LAMP-1, CMH de classe 2, ...), suggérant une interaction avec les lymphocytes T. Les eTACs joueraient ainsi en périphérie un rôle similaire à celui des mTECs au niveau thymique permettant ainsi l'expression d'auto-Ag et la délétion clonale de lymphocytes T auto-réactifs [69]. Ce système constituerait ainsi un réseau secondaire de tolérance en périphérie. Aire ne semble toutefois pas la seule protéine impliquée dans ce réseau de tolérance périphérique. En effet, il a été récemment montré que l'expression d'autres antigènes ectopiques dans d'autres cellules comme les-cellules endothéliales des ganglions semble Aire-indépendante [95].

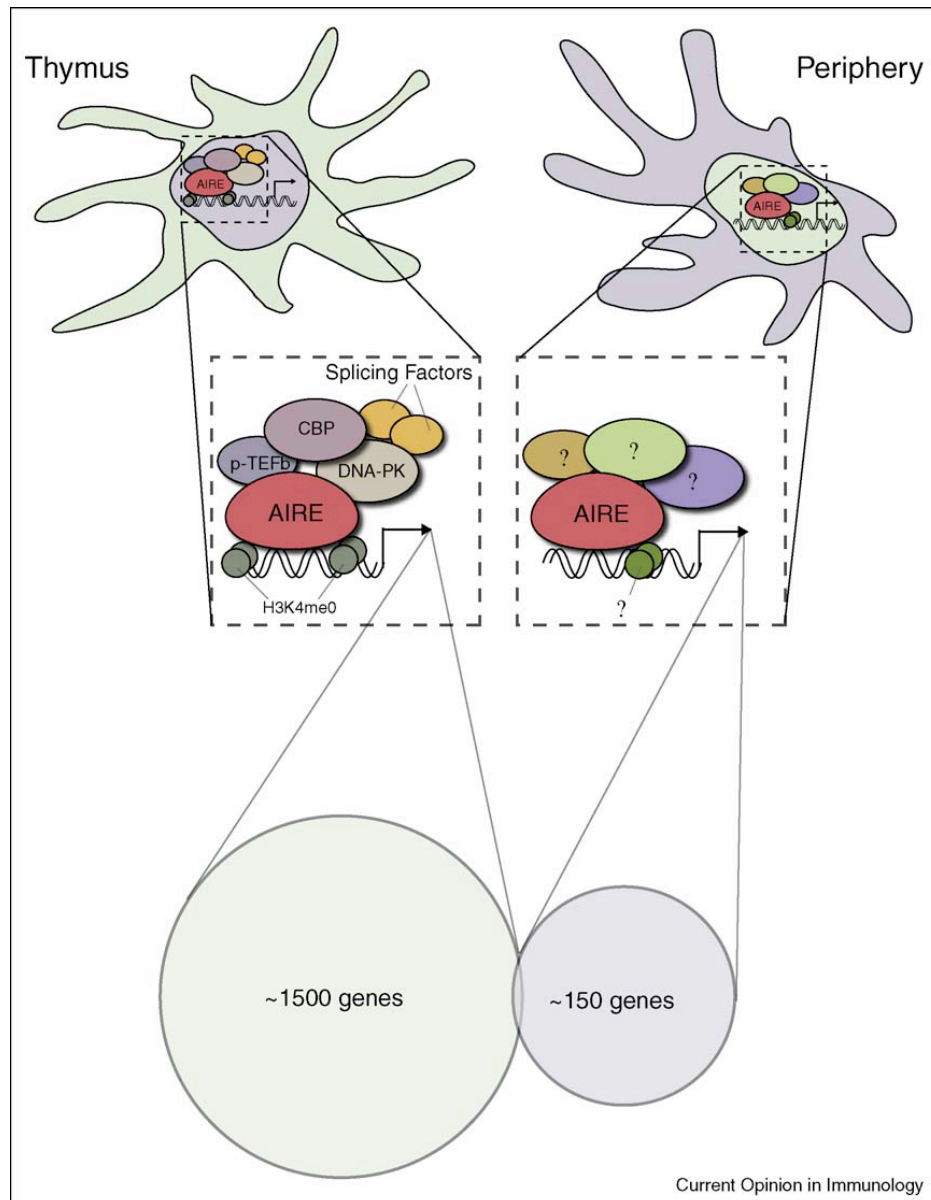


Figure 4 : L'activité transcriptionnelle de Aire s'exerce à la fois au niveau thymique (mTECs) et en périphérie (eTACs), d'après Gardner [63].

Les gènes dont la transcription est sous l'influence de Aire dans les eTACS sont le plus souvent différents des gènes Aire-dépendants dans les mTECs; de plus, le nombre de gènes sous la dépendance de Aire dans les eTACs y demeure moins important.

Dans la mTEC, les co-facteurs de transcription se liant à Aire sont bien connus, (CBP, pTEFb, DNA-PK). Le domaine PHD1 de AIRE se lie de manière spécifique à la chromatine (implication de l'histone H3K4 non méthylé). En revanche, les mécanismes inhérents à l'activité transcriptionnelle de AIRE dans les eTACs demeurent méconnus.

5- Mécanismes effecteurs en périphérie

a. Rôles respectifs des lymphocytes B et T

Deux théories s'opposent pour tenter d'expliquer la relation entre ce défaut de tolérance centrale et ses conséquences réelles sur les mécanismes effecteurs périphériques, conduisant aux maladies auto-immunes multiples présentes chez la souris Aire^{-/-} et dans la PEA1.

Ainsi des souris Aire^{-/-} déficientes en cellules T (par invalidation du gène codant la chaîne α du TCR) ne développent pas de maladie auto-immune, alors que des souris Aire^{-/-} μ MT^{-/-} (modèle dans lequel il existe un blocage de la maturation cellulaire B au stade pré-B) présentent des infiltrats inflammatoires tissulaires proches de ceux présents chez la souris Aire^{-/-}, bien qu'un peu atténués. De plus, dans cette étude, un transfert à des souris SCID de populations lymphocytaires issues de souris Aire^{-/-} déplétées en populations CD8⁺ n'empêche pas l'apparition d'infiltrats tissulaires inflammatoires. En revanche, si l'on transfère à ces souris SCID des populations lymphocytaires Aire^{-/-} déplétées en lymphocytes CD4⁺, la maladie auto-immune ne se développe pas chez ces souris. Ainsi, seul le compartiment T CD4⁺ (et non CD8⁺) apparaît indispensable au développement de la maladie. Les auteurs montrent que ces cellules T CD4⁺ ont une polarisation de type Th 1. De plus, l'administration d'un AC monoclonal anti-CD4 aux souris Aire^{-/-} diminue nettement les processus auto-immuns. Dans cette étude, le rôle des cellules T CD4⁺ apparaît prépondérant. Le rôle des lymphocytes B y semble ici secondaire, puisque les souris Aire^{-/-} μ MT^{-/-} y développent la maladie, toutefois de manière un peu atténuée [96].

Une autre équipe utilisant deux modèles distincts de déplétion en lymphocytes B rapporte des résultats différents. Là encore, les souris Aire^{-/-} μ MT^{-/-} développent la maladie de manière atténuée, alors que les souris Aire^{-/-} Jh^{-/-} (modèle dans lequel l'absence de région jonctionnelle de chaîne lourde donc de BCR résulte dans le blocage de maturation de cellules proB en préB, soit un blocage complet dans la différenciation cellulaire B) présentent des infiltrats inflammatoires mineurs [97]. Ces données mettent ici en exergue l'importance de l'implication des lymphocytes B. L'apparente discordance entre ces deux modèles d'étude pourrait être liée au fait que le modèle μ MT^{-/-} est à l'origine d'un blocage de la lignée B moins complet que le modèle Jh^{-/-} [66, 98]. Dans ces travaux qui mettent l'accent sur le rôle des lymphocytes B, les auteurs soulignent que les auto-AC ne seraient pas directement pathogènes, et que les cellules B ne participeraient pas à la phase effectrice. Toutefois, l'administration précoce à des souris Aire^{-/-} d'AC monoclonal anti-CD20 permet de diminuer

la survenue d'événements auto-immuns [97]. Ainsi les cellules B pourraient aussi avoir un rôle régulateur précoce dans le « priming » puis dans l'expansion de la réponse cellulaire T.

b. Implication des cellules iNKT

Jusqu'il y a peu, le rôle des cellules NK (Natural Killers) et iNKT (invariant NKT « restreintes » au CD1) n'avait été que peu abordé, aussi bien dans le modèle murin Aire $-/-$, que dans la PEA1. Seule une étude avait évoqué l'implication de Aire dans le développement thymique des cellules iNKT [99], mais les auteurs s'étaient ensuite rétractés en raison d'inexactitudes, tout en maintenant leurs conclusions [100]. Récemment deux études se sont à nouveau intéressées à ces cellules de l'immunité dite « intermédiaire ». Ainsi, il semble que le nombre de cellules iNKT soit réduit dans le thymus et les organes périphériques chez les souris Aire $-/-$. De plus le nombre de cellules iNKT circulantes chez les patients atteints de PEA1 serait diminué [101]. En revanche, le nombre de cellules NK ne serait pas affecté chez les souris Aire $-/-$, chez qui ces cellules se différencieraient normalement [101]. Ainsi l'hypothèse selon laquelle le développement des cellules iNKT pourrait être influencé par Aire est à nouveau émise. Suite à ces résultats, d'autres auteurs se sont interrogés sur le rôle de ces cellules dans la survenue des candidoses. Ils ont montré que la diminution du nombre de iNKT se vérifiait chez tous les patients atteints de candidoses, qu'ils soient atteints de PEA1 ou non (22 patients étudiés, dont 9 PEA1). De plus, in vitro, ils n'ont pas mis en évidence d'induction de la prolifération des iNKT par des souches de *Candida* inactivées par la chaleur. Ils en concluent que la diminution des iNKT serait plutôt une conséquence de la candidose, qu'une de ses causes [102]. Ceci n'est toutefois pas une explication satisfaisante à la diminution du nombre de ces cellules chez les souris Aire $-/-$, qui sont quant à elles indemnes d'infections candidosiques.

En conclusion, au travers des premières données rappelées dans ce chapitre introductif, si le défaut de tolérance centrale semble bien défini dans la PEA1, il n'apparaît pas aujourd'hui si simple d'en comprendre les conséquences sur le déroulement global de la réponse immune, notamment sur l'implication de l'immunité innée, et sur les dysrégulations éventuelles induites entre réponses innées et réponses adaptatives. Il apparaît surtout difficile d'objectiver des liens précis permettant de rattacher l'apparition de certains processus pathogènes induits et/ou associés à cette mutation (exemple de la candidose, dont le mécanisme d'apparition est loin d'être complètement élucidé). C'est pour tenter de répondre à certaines de ces questions que nous avons souhaité mener une étude sur l'exploration du répertoire B dans un tel contexte. Nous disposions en effet au laboratoire d'un modèle d'analyse d'immuno-protéomique de référence ; nous avons en parallèle collecté les sérums de patients atteints de PEA1, modèle clinique de référence.

III. Objectifs

Dans nos travaux antérieurs, les résultats obtenus dans la sclérose en plaques [5, 7, 8] ou dans les formes neuro-psychiatriques de lupus érythémateux aigu disséminé [6] ont mis l'accent sur l'intérêt d'une démarche sans *a priori* pour étudier ce répertoire B, et en particulier les profils d'auto-réactivité sérique IgG. Ainsi, il a été montré que ces profils pouvaient constituer une « signature sérologique » de ces maladies auto-immunes, puisqu'on retrouvait une singularité du répertoire B propre aux patients atteints et distincte de celui des sujets contrôles. Toutefois les cibles antigéniques identifiées étaient majoritairement ubiquitaires dans des pathologies tissus-spécifiques. La méthodologie utilisée par le laboratoire permettait ainsi d'évaluer, de façon intégrative, « l'empreinte humorale » d'une réaction auto-immune sans préjuger de son caractère T-dépendant ou T-indépendant. Pour faciliter la compréhension et la signification de ces immuno-empreintes, notamment l'éventuelle part de l'auto-réactivité naturelle, et le caractère de dépendance vis-à-vis des lymphocytes T, nous souhaitons disposer d'un modèle de référence. C'est dans cette perspective que nous avons orienté nos travaux sur l'étude de la PEA1 dans laquelle, de façon remarquable, l'altération du répertoire T est caricaturale, au moins si l'on en juge par les premières publications sur ce thème [68, 78, 80]. Dans un premier temps, nous avons constitué des bases de données clinico-biologiques indispensables à notre étude en coordonnant un réseau d'abord inter-régional puis national depuis 2009 dans le cadre d'un Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC). Une collection d'échantillons sériques précieux nous a permis la réalisation ultérieure d'études d'immuno-empreinte sans *a priori* dans la PEA1 et dans d'autres pathologies testées à titre de contrôles. Nous verrons que nos résultats ouvrent de nouvelles perspectives sur la physiopathologie de l'APECED qui n'apparaît plus strictement dépendante des lymphocytes T.

A. Analyse clinique, immunologique et génétique de la population étudiée

Pour cela nous avons, dans un premier temps, collecté le sérum de patients atteints de cette pathologie exceptionnelle, jusque là non explorée en France. Grâce à la collaboration des centres hospitaliers de l'Inter-région Nord-Ouest, nous avons pu recenser 19 patients atteints. Les caractéristiques clinico-biologiques précises ont été documentées pour chacun de ces cas. Un séquençage du gène *AIRE* a permis d'en identifier les mutations. Les différents auto-anticorps tissus-spécifiques susceptibles d'être présents dans le sérum de ces patients ont été recherchés. Le génotypage HLA de classe 2, dont on sait qu'il influe sur le phénotype clinique des patients [59], a été analysé. Un premier immuno-phénotypage lymphocytaire (T, B, NK) a

également été réalisé afin de préciser les altérations quantitatives secondaires potentiellement liées au défaut de sélection négative des lymphocytes T auto-réactifs (Article 1).

B- Analyse des profils d'auto-réactivité IgG des patients atteints de PEA1

Par la suite, nous avons étudié les profils d'auto-réactivité sériques IgG de ces patients atteints de PEA1. Par technique d'immuno-empreinte, nous avons comparé leurs profils à ceux obtenus chez 2 groupes de sujets contrôles (sujets sains ou atteints d'autres endocrinopathies auto-immunes). Nous avons choisi d'étudier l'auto-réactivité sérique IgG vis à vis d'homogénats de tissus potentiellement atteints dans la PEA1 : les tissus surrénalien, parathyroïdien, thyroïdien, pancréatique, gastrique, ovarien et cutané. En cas d'altérations constatées du répertoire B prouvées par analyse statistique, nous avons caractérisé, par une démarche d'immuno-protéomique, les antigènes permettant de distinguer les patients atteints de PEA1 des sujets contrôles. Nous avons présenté les résultats obtenus avec des tissus surrénaliens et pancréatiques qui se sont avérés les plus représentatifs (Article 2).

C- Analyse des profils d'auto-réactivité IgM des patients atteints de PEA1

Les résultats obtenus grâce à l'étude des profils d'auto-réactivité IgG ont permis de montrer que ces patients présentaient bien une auto-réactivité vis à vis d'antigènes tissus-spécifiques. De manière moins attendue, une auto-réactivité discriminante vis à vis de cibles antigéniques ubiquitaires a aussi été observée. Or, les auto-anticorps de classe IgG peuvent être aussi des auto-anticorps naturels. Il nous est ainsi apparu judicieux de poursuivre notre enquête avec l'analyse des profils dépendants d'auto-anticorps de classe IgM pour mieux interpréter la T-dépendance ou la T-indépendance des profils préalablement obtenus. En effet, un répertoire auto-réactif naturel IgM est qualitativement normal chez les souris déficientes en lymphocytes T [103]. De plus, les auto-anticorps naturels IgM peuvent être détectés en l'absence de toute immunisation connue. Ainsi lors de la vie fœtale se constitue un répertoire auto-réactif humoral de type IgM sélectif et très conservé entre les individus [104].

Comme dans l'étude précédente, nous avons donc étudié les profils d'auto-réactivité sériques IgM des patients atteints de PEA1 en comparaison à 2 groupes contrôles. La recherche d'une altération de ces profils a été suivie de la caractérisation des antigènes cibles, afin de déterminer s'il s'agissait de cibles spécifiques aux IgM, ou des mêmes cibles que celles reconnues par les IgG (Article 2).

D- Etude des sous-populations lymphocytaires B

Ces premiers résultats ont permis de mettre en évidence dans la PEA1 une auto-réactivité dépendante d'IgG et d'IgM dirigée contre des cibles antigéniques tissus-spécifiques, mais aussi ubiquitaires. La présence d'une auto-réactivité IgG vis à vis d'antigènes tissus-spécifiques chez les patients atteints de PEA1 était attendue. Elle peut être la conséquence d'une coopération T-B qui favorise les phénomènes d'hypermutation somatique et de commutation isotypique. Un défaut de sélection de cellules T auto-réactives pourrait en effet favoriser l'activation des cellules B auto-réactives dans le cadre d'une aide « cognate » ou connexe dans les organes lymphoïdes secondaires. En revanche, la présence d'une auto-réactivité IgG vis à vis d'antigènes ubiquitaires s'est avérée plus surprenante. Ce résultat pourrait témoigner de l'implication d'autres populations lymphocytaires B auto-réactives, T-indépendantes. Par ailleurs, il existe des auto-anticorps naturels de classe IgG. Cette hypothèse de T-indépendance est renforcée par certaines données expérimentales récentes. Ainsi, les souris Aire $-/-$ âgées présentent des infiltrats tissulaires de 2 types, B folliculaires et B issus de la zone marginale de la rate (dits MZ chez la souris, MZ-like chez l'homme) [105]. Elles développent également des lymphomes de cette zone marginale [105]. Or, ces populations sont à l'origine d'une auto-réactivité naturelle T-indépendante. Les patients atteints de PEA1 pourraient ainsi présenter à la fois une activation des populations B folliculaires mais également des populations B de type MZ-like, à l'origine d'une altération de l'auto-réactivité adaptative mais également naturelle. Nous avons donc caractérisé les sous-populations lymphocytaires B de ces patients (notamment MZB-like et folliculaires), en comparaison de celles observées dans d'autres polyendocrinopathies auto-immunes et chez des sujets sains.

PARTIE II : RESULTATS

I. Caractéristiques de la population étudiée

La polyendocrinopathie auto-immune de type 1 demeure une pathologie exceptionnelle, tant par son mécanisme physiopathologique, que par sa rareté au plan épidémiologique. Aucune étude n'avait jusque là tenté de rassembler les cas français, de les caractériser au plan clinique, immunologique et génétique. Ainsi, grâce à la collaboration des praticiens endocrinologues et pédiatres des centres hospitaliers généraux et universitaires de l'Inter-région Nord-Ouest (Nord-Pas-de-Calais, Picardie, Haute et Basse Normandie), nous avons pu recenser 19 patients atteints dans cette Inter-région.

A. Recueil des données cliniques

Tout d'abord, le phénotype clinique des patients a pu être décrit précisément, en particulier dans les formes sévères de la maladie nécessitant la mise sous immunosuppresseurs.

B. Méthodes d'analyse des données immunologiques

La présence d'auto-anticorps tissus-spécifiques habituellement retrouvés dans cette pathologie a été recherchée. L'immuno-fluorescence indirecte a été utilisée pour détecter la présence d'AC anti-parathyroïde, anti-îlots de Langerhans, anti-ovaire, anti-cellules pariétales gastriques, anti-LKM1 et anti-muscles lisses (avec confirmation en immuno-dot pour les 2 derniers si nécessaire). Les AC anti-récepteur sensible au calcium ont été recherchés par technique d'immuno-transfert, en utilisant un polypeptide recombinant correspondant aux acides aminés 1-603 du domaine extra-cellulaire du récepteur sensible au calcium [33] (grâce à l'aimable collaboration du Dr Nicole Fabien, Unité Fonctionnelle d'Auto-Immunité, Centre Hospitalier Lyon-Sud). Les AC anti-21 hydroxylase, anti-IA2, anti-GAD65 ont été dosés par technique radio-immunologique (RIA). Les AC anti-thyroglobuline et anti-thyroperoxydase ont été mesurés soit par RIA, soit par ELISA en fonction des centres hospitaliers où le patient a été prélevé. Les AC anti-facteur intrinsèque ont été recherchés soit par immuno-dot, soit par ELISA.

Un immuno-phénotypage lymphocytaire a permis d'étudier quantitativement les différentes sous-populations lymphocytaires T, B et NK. Les phénotypes CD3, CD4, CD8, CD19 et CD56 ont été étudiés. Cette analyse a été réalisée dans le laboratoire référent de chaque centre hospitalier concerné.

Le génotypage HLA de classe II des patients a été également déterminé, du fait de son influence dans les pathologies auto-immunes en général, et en cas de déficit de AIRE, aussi bien chez la souris que chez l'homme [59, 79]. Il a été réalisé par technique de PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism). La dénomination des allèles a été réalisée grâce à la nomenclature établie par le comité de nomenclature de l'OMS. Là encore, cette analyse a été réalisée dans le laboratoire référent de chaque centre hospitalier.

C. Séquençage du gène *AIRE*

Le diagnostic clinique a été confirmé par séquençage du gène *AIRE* (grâce à l'aimable collaboration du Dr Pascale Saugier-Véber, Laboratoire de Génétique Moléculaire, INSERM U614, Rouen). Le diagnostic moléculaire de PEA1 a été réalisé en deux étapes : dans un premier temps, un séquençage des exons 6 et 8 du gène *AIRE*, où siègent la majorité des mutations, a été réalisé. Si aucune mutation n'était identifiée dans ces deux exons ou qu'une mutation unique était mise en évidence, le criblage était poursuivi par le séquençage des 12 autres exons du gène *AIRE*.

D. Recherche de corrélation génotype-phénotype clinique

Devant la très grande variabilité des phénotypes cliniques, et ce au sein-même de fratries, nous avons recherché quels facteurs pouvaient influencer l'apparition des différentes manifestations de la maladie. En particulier, nous nous sommes interrogés quant à l'existence d'une corrélation entre le phénotype clinique de nos patients, et les mutations du gène *AIRE*. L'étude statistique a été réalisée grâce à un test de Fisher exact. Nous avons également recherché une corrélation entre le phénotype clinique de nos patients et leur génotypage HLA de classe II ; toutefois, cette analyse n'a pu être faite qu'au cas par cas, du fait du faible effectif de la population en regard du nombre de sous-groupes HLA.

Au total, cette première étape s'est avérée indispensable à la poursuite de l'étude, puisqu'elle nous a permis de caractériser précisément la population étudiée et de collecter les sérums nécessaires à l'étude du répertoire B auto-réactif dans la PEA1. De plus, elle a été le point de départ d'une étude beaucoup plus large, financée depuis 2009 par un PHRC national, intitulé : « **Présentation et pronostic du syndrome APECED : recensement national** ».

Article 1

Autoimmune Polyendocrine Syndrome Type 1 in North-Western France: *AIRE* Gene Mutation Specificities and Severe Forms Needing Immunosuppressive Therapies.

Horm Res Paediatr 2010;74:275–284

II. Dérégulation de l'homéostasie B naturelle et adaptative dans la PEA1

Outre la dimension descriptive au plan clinique et génétique de la première partie de ce travail, son intérêt résidait également dans l'étude de phénomènes auto-réactifs T-dépendants bien connus dans la PEA1. En effet, l'atteinte auto-immune des différents organes en périphérie semble être directement liée au défaut de sélection négative des thymocytes auto-réactifs en l'absence de AIRE [68, 80]. Les auto-AC dirigés contre des antigènes tissus-spécifiques détectés dans cette pathologie, connus de longue date [19, 38], sont vraisemblablement les témoins de cette altération de tolérance centrale, et témoignent donc probablement d'une altération du répertoire B auto-réactif T dépendant.

Toutefois, ce type d'approche ne permet d'étudier qu'une partie très restreinte de l'auto-réactivité B. Afin d'élargir notre étude à l'ensemble du répertoire B auto-réactif, à la fois T-dépendant mais également T-indépendant, nous avons choisi d'utiliser la technique sans *a priori* du western blot, couplé à une approche immuno-protéomique avec caractérisation moléculaire des cibles discriminantes par analyse en spectrométrie de masse.

A. Etude des profils sériques auto-réactifs IgG et IgM

Dans un premier temps, nous avons étudié les profils sériques d'auto-réactivité IgG vis à vis de différents tissus par technique d'immuno-empreinte en une dimension (1D). Nous avons initialement étudié les profils d'auto-réactivité vis à vis des principaux tissus cibles d'une atteinte auto-immune dans la PEA1 : tissus surrénalien, parathyroïdien, thyroïdien, pancréatique, gastrique, ovarien et cutané (travail réalisé dans le cadre d'un Master 2 Recherche, E. Proust-Lemoine). Nous avons choisi de présenter uniquement les résultats les plus représentatifs, obtenus avec les tissus pancréatiques et surrénaliens. Nous avons donc comparé les profils auto-réactifs sériques IgG vis à vis de ces 2 tissus cibles en utilisant le sérum de nos patients atteints de PEA1 et celui de sujets contrôles (patients atteints d'autres types d'endocrinopathies auto-immunes et sujets sains).

Ayant constaté une altération de ces profils auto-réactifs IgG dans la PEA1 par rapport aux groupes contrôles, nous nous sommes secondairement intéressés aux profils sériques d'auto-réactivité IgM, pour les raisons développées dans le chapitre introductif. A nouveau, une altération des profils auto-réactifs IgM a été constatée, grâce à la comparaison des

immuno-empreintes en 1D obtenus chez nos patients PEA1 et ceux obtenus dans nos 2 groupes contrôles.

B. Comparaison des profils et analyse statistique

Afin de déterminer quels étaient les antigènes cibles de cette auto-réactivité spécifique de la PEA1, nous avons analysé les profils d'auto-réactivité de manière qualitative, par alignement, en notant pour chaque sérum la présence ou l'absence de chaque bande antigénique (sans tenir compte de son intensité). Cette détection et cet alignement ont été réalisés grâce au logiciel Diversity Database 2.2. Les profils auto-réactifs sériques IgG et IgM ont été analysés de manière indépendante. S'en est suivie une étude statistique par test de Chi-2, permettant de déterminer quelles bandes antigéniques faisaient l'objet d'une auto-réactivité plus spécifique de la PEA1.

C. Approche immuno-protéomique

Une approche immuno-protéomique a complété ce travail, afin de caractériser les protéines antigéniques cibles de cette auto-réactivité spécifique. Elle a été réalisée en 3 étapes :

- électrophorèse bidimensionnelle permettant l'obtention d'une carte protéique en 2 dimensions pour chaque tissu étudié
- superposition de cette carte avec l'immuno-empreinte en 2D d'un sérum d'intérêt
- caractérisation moléculaire des antigènes d'intérêt par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization- time of flight- time of flight).

Article 2

Distortion of serum IgG and IgM self-reactive responses against tissue-specific and ubiquitous antigens in autoimmune polyendocrine syndrome type 1

Soumis à Clinical Immunology

III. Dérèglement de l'homéostasie B dans la PEA1, résultats préliminaires

Après la mise en évidence d'une altération de la réponse humorale significative chez les patients atteints de PEA1, ciblant des antigènes non seulement tissus-spécifiques mais aussi ubiquitaires, et de la découverte chez la souris Aire -/- âgée de la survenue de lymphomes de la zone marginale de la rate, il nous est apparu légitime d'engager une étude sur l'homéostasie des lymphocytes B circulants dans le PEA1.

Nos premières analyses réalisées sur un faible nombre de patients montrent des modifications notables dans l'équilibre des sous-populations lymphocytaires circulantes dans la PEA1. On note en effet une diminution du nombre des cellules B naïves et des cellules B transitionnelles chez ces patients. Cette dernière anomalie a déjà été mise en évidence au laboratoire dans d'autres pathologies auto-immunes spécifiques d'organe comme la sclérose en plaques [106]. En revanche, un accroissement d'une population cellulaire MZB-like circulante est aussi observé dans tous les cas de PEA1 étudiés.

L'ensemble de ces résultats sera intégré dans une prochaine publication lorsque nous disposerons d'un nombre suffisant de cas pour la réalisation d'études statistiques. Cette démarche s'inscrit dans les objectifs du PHRC national, dans lequel nous poursuivons nos inclusions.

Dans les chapitres suivants sont présentés le matériel et méthodes (A) puis les premiers résultats obtenus (B).

A. Methods : Analysis of naïve and memory B cells using multiparameter flow cytometry.

Unprocessed whole blood samples were stained with fluorochrome-labeled murine monoclonal antibodies according to the manufacturers' instructions. Analysis was performed using an FC500 flow cytometer (Beckman Coulter). Reagents and instrumentation were obtained from Beckman Coulter (Miami, FL, USA), Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA) and Dako (Glostrup, Denmark). Absolute and relative numbers of CD19+ B lymphocytes were determined using monoclonal antibodies. Unprocessed whole blood samples were stained with direct conjugates of fluorochrome-labeled using a four-color assay and antibodies to CD19-PC5 and CD45-PC7. Flow-Count fluorospheres were added and

acquired without washing along with the lymphocyte events (defined as CD45^{bright}, low side scatter). The naïve, memory and MZ-like subsets of CD19⁺ B cell populations were detected using four-color staining with antibodies to CD19-PC5 in combination with CD27-PC5, IgDPE and IgM-FITC and transitional subsets were detected using CD19-PC5, IgM-FITC and CD38-PE. Red cell lysis was carried out using an automatic workstation (TQ-Prep), after which the cells were washed twice prior to acquisition. Naïve and memory B cell subsets were expressed percentages of total CD19 B cell counts. Their absolute counts were calculated by multiplying the specific subset percentage by the absolute CD19⁺ B lymphocyte count. Four APS1 patients were compared with 4 patients with OAE and with age-matched healthy controls (9 controls aged 5–10 years and 76 controls aged 20–60 years).

B. First results : Change in the distribution of circulating B cell subsets in APS1 patients

We phenotypically characterized the various circulating CD19⁺ B cell subsets from late-immature (CD19⁺ CD38^{high}) to memory-switched B cells (CD19⁺ CD27⁺ IgM⁻ IgD⁻) in 4 APS1 patients compared with 2 control groups (age-matched OAE and healthy subjects; Table 1). Representative histograms are shown in Figure 1 for one patient with APS1, one patient with OAE and one age-matched control. We did not perform statistical analyses because of the difference in the number of patients among the 3 populations.

However, some aspects were common to all 4 APS1 patients. The proportions of CD27⁻ IgD⁺ IgM⁺ subsets (naïve B cells) and CD38⁺ IgM⁺ subsets (transitional B cells) were reduced in APS1 patients compared with age-matched healthy controls and OAE controls. In addition, the prevalence of CD27⁺ IgM⁺ IgD⁺ subsets (MZ B-like cells) was higher in APS1 patients compared with healthy controls and OAE patients. Results for 3 adults with APS1, 4 age-matched OAE patients and 76 healthy controls are summarized in Table 1A. We observed the same trend for patient 1 (aged 6 years), who was compared with 9 children aged 5–10 years (Table 1B). The prevalence of CD27⁺ IgD⁻ IgM⁺ and CD27⁺ IgD⁻ IgM⁻ (memory B cells) subsets in APS1 patients and the control populations were similar (data not shown).

Figure 1

Representative histogram of the elevated circulating MZ B-like subpopulation in 1 APS1 patient compared with 1 OAE patient and 1 healthy donor.

A higher proportion of MZ B-like subsets in the blood of the APS1 patient is evident compared with the age-matched OAE patient and the age-matched healthy control. This B cell subset expressed CD19+ CD27+ IgD+, as shown by the histogram (grey gate) and also expressed IgM (top window).

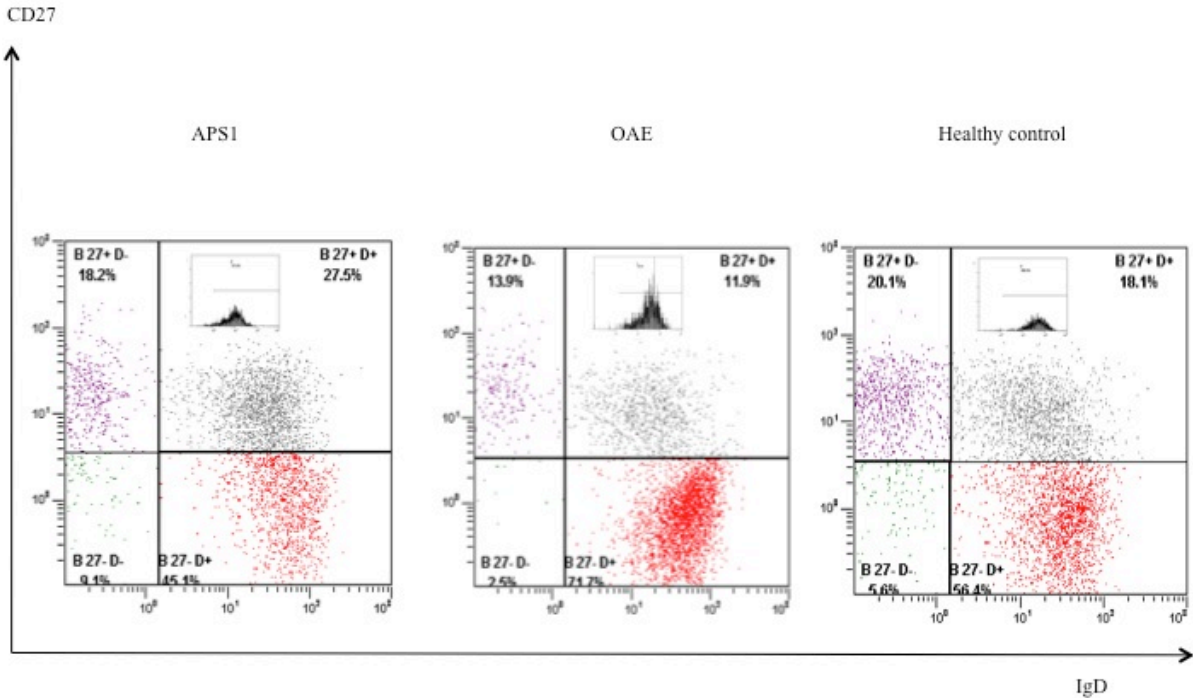


Table 1: Repartitioning of B cells subset:

1A: in 3 APS1 patients compared with 4 OAE patients and 76 age-matched healthy controls (relative values).

	Healthy subjects (n = 76)			OAE (n=4)				APS1 (n=3)		
	20 to 60 years old			26 to 40 years old				28 to 42 years old		
	Mean	SEM	95% CI	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6	Patient 7
Transitional B cells										
CD19+ CD38+ IgM+ (%)	5.37	0.32	4.74-6.00	2.4	2.1	5	2.8	0.4	0.8	3.9
Naive B cells										
CD19+ CD27- IgD+ IgM+ (%)	64.2	1.73	60.75-67.65	89.5	71	67	87.5	15.7	45.8	41
MZ B like cells										
CD19+ CD27+ IgD + IgM + (%)	15.12	1.03	13.07-17.17	3.7	11.6	14.5	4.9	21.6	22.1	27.5

1B: One APS1 child compared with 9 age-matched healthy controls (relative values).

	Healthy subjects			APS1
	5-10 years old (n=9)			6 year old
	Mean	SEM	95% CI	
Transitional B cells				
CD19+ CD38+ IgM+ (%)	11.67	1.5	10.52-12.82	4.1
Naive B cells				
CD19+ CD27- IgD+ IgM+ (%)	80.89	10.65	72.70-89.07	66.9
MZ B like cells				
CD19+ CD27+ IgD + IgM + (%)	7.56	4.16	4.36-10.75	18.3

PARTIE III : DISCUSSION

Le concept d'auto-réactivité physiologique et pathologique fait encore l'objet de débats. On décrit une auto-réactivité dite **physiologique ou naturelle** qui serait très conservée au cours de la vie de l'individu et qui se constituerait au cours de l'ontogénie des lymphocytes B. C'est dans ce cadre que s'inscrit l'« homonculus immunologique » décrit par Cohen [1]. La présence d'auto-anticorps de classe IgM, mais aussi d'isotypes IgA et IgG avant tout contact antigénique, atteste de l'existence de ce répertoire « primordial » naturellement présent chez le nouveau-né [107]. Le répertoire auto-réactif IgM naturel est très restreint et homogène dès la naissance [104], et demeure conservé à l'âge adulte [2, 4, 108], même s'il tend à se diversifier [2, 109]. Les cibles de cette auto-réactivité sérique IgM mises en évidence chez le nouveau-né sont retrouvées à l'âge adulte [2]. Le répertoire auto-réactif IgM ne dépend pas de celui de la mère, puisque les IgM ne passent pas la barrière placentaire. Il est donc propre au nouveau-né, différent du répertoire maternel, et reste très conservé d'un individu à l'autre [109]. Le répertoire auto-réactif IgA ne dépend pas non plus du répertoire maternel (ce type d'Ig ne passe pas non plus la barrière placentaire). Il demeure également très homogène d'un nouveau-né à l'autre [104]. Enfin, le répertoire auto-réactif dépendant des IgG est également restreint et conservé d'un individu à l'autre [3], et demeure stable à l'âge adulte [108]. Celui-ci contraste avec l'hétérogénéité inter-individuelle du répertoire IgG dirigé contre des antigènes étrangers, dont la diversité augmente avec l'âge [110]. En revanche, chez le nouveau-né, le répertoire auto-réactif sérique IgG est très proche de celui de sa mère, du fait du passage trans-placentaire des IgG [104]. A côté de ce répertoire auto-réactif physiologique naturel présent dès la naissance et conservé à l'âge adulte, il existerait un répertoire **auto-réactif physiologique homéostatique** maintenant chez l'individu un état de tolérance permanent vis à vis des stimulations antigéniques extérieures [3, 111]. Dans le maintien de ces équilibres, le rôle du réseau idiotype/anti-idiotype serait déterminant. Enfin, chez certains individus se développe un répertoire auto-immun **pathologique** lié à une rupture de tolérance, à l'origine de la survenue de maladies auto-immunes. L'un des enjeux essentiel aujourd'hui est d'appréhender les mécanismes en cause dans ces processus de rupture de tolérance. Ceux-ci impliquent-ils une dérégulation de l'auto-réactivité naturelle (exemple de la dérégulation du réseau idiotype) et/ou dépendent-ils d'événements liés à l'environnement (rôle de l'immunité innée et des signaux de danger, notion de mimétisme moléculaire, altération du pool de

cellules régulatrices dans la théorie « hygiéniste » ...)? L'existence de perturbations du répertoire IgG sérique auto-réactif dans des maladies auto-immunes telles que la sclérose en plaques ou le neuro-lupus a été largement étudiée lors de travaux antérieurs de notre équipe [5-7], mais leur signification physiopathologique demeurerait incertaine, notamment du fait d'une auto-réactivité dirigée majoritairement contre des cibles ubiquitaires, dans des pathologies spécifiques du système nerveux central. S'agissait-il de perturbations du répertoire B auto-réactif naturel, majoritairement T-indépendant, ou bien d'altérations du répertoire B auto-réactif adaptatif, T-dépendant ?

Dans la PEA1, liée aux mutations du gène *AIRE*, se développent de nombreuses maladies auto-immunes spécifiques d'organe, en raison d'une rupture de tolérance d'origine essentiellement thymique centrale liée à un défaut de délétion de clones lymphocytaires T auto-réactifs [68, 80]. Nous avons donc choisi ce « modèle » humain afin de mieux appréhender les phénomènes de distorsion du répertoire B auto-réactif constaté dans d'autres pathologies auto-immunes. Notre travail a permis non seulement de confirmer qu'il existait des anomalies du répertoire B d'origine T-dépendante comme attendu, mais également de montrer qu'il existait probablement des anomalies du répertoire B T-indépendant. Cette dernière observation ouvre, bien entendu, de nouvelles perspectives physiopathologiques.

Nous allons discuter de chacun de ces aspects en développant dans un premier temps l'ensemble des éléments qui confirment dans notre étude la T-dépendance de PEA1 puis ensuite les arguments qui suggèrent une T-indépendance de certains événements associés à PEA1.

Tout d'abord, la présence de nombreux anticorps de classe IgG spécifiques d'organe chez les souris Aire ^{-/-} [68, 78] et chez les patients atteints de PEA1 a été largement démontrée [36, 38], de manière le plus souvent corrélée à l'atteinte clinique correspondante. Nous l'avons confirmé dans notre série de patients (article 1), par des techniques conventionnelles utilisées dans les différents laboratoires d'Immunologie. Il est à noter que certains auto-AC peuvent être présents en dehors de toute atteinte clinique correspondante [36]. L'exemple des AC anti-thyroglobuline et anti-thyropéroxydase, présents dans la PEA1 dans environ 1/3 des cas, alors que la thyroïdite y est rare de manière patente (moins de 10% des cas) illustre bien cette notion de l'existence de « marqueurs biologiques d'auto-

immunité » asymptomatique [38]. La présence de certains AC, notamment anti-21 hydroxylase, peut toutefois être prédictive de la survenue de l'atteinte clinique correspondante [38]. *A contrario*, certains patients présentant une atteinte clinique ne possèdent pas les auto-AC correspondants dans leur sérum, comme dans l'atteinte surrénalienne ou le diabète de type 1, notamment lorsque la pathologie est installée depuis plusieurs années [20]. En effet, le processus inflammatoire régresse vraisemblablement, faisant place à de la fibrose, et les auto-AC initialement présents finissent par disparaître.

Notre étude immuno-protéomique (article 2) n'a pas permis la mise en évidence des auto-AC décrits habituellement dans la maladie d'Addison comme cibles d'une auto-réactivité spécifique chez nos patients atteints de PEA1: AC anti-21 hydroxylase [112, 113], anti-17 α hydroxylase [114], anti-enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol [115, 116]. Ceci est vraisemblablement dû au fait que nous avons choisi pour groupe contrôle des patients atteints d'autres poly-endocrinopathies auto-immunes, notamment de type 2. Or dans cette pathologie où la maladie d'Addison est particulièrement fréquente les auto-AC retrouvés sont les mêmes que dans la PEA1 [113], d'où l'absence de discrimination détectable par notre test statistique. De plus, dans notre approche, nous avons choisi de ne pas sélectionner les patients en fonction des atteintes cliniques présentées, mais de les traiter de manière globale en groupe 1 : PEA1 liée aux mutations du gène *AIRE*, et groupe 2 : autres endocrinopathies auto-immunes [27]. La même remarque concernant une discrimination indétectable par notre approche peut-être faite pour les antigènes cibles habituels d'une auto-réactivité spécifique dans le diabète de type 1. D'une part, cette atteinte du pancréas endocrine est relativement peu fréquente dans la PEA1 [19, 21] ; d'autre part, elle est également présente dans la PEA2, plus souvent que dans la PEA1 [117].

En revanche, notre étude des profils auto-réactifs sériques IgG a mis en évidence une auto-réactivité spécifique chez les patients atteints de PEA1 vis à vis de l'aldose réductase. Quoique considérée comme ubiquitaire, cette enzyme de la voie des polyols est largement exprimée dans le tissu surrénalien [118]. Cette expression singulière est liée au fait que cette enzyme y sert de réductase à l'isocaproaldéhyde, produit issu de la stéroïdogénèse après action de l'enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol. Elle y jouerait un rôle régulateur de la stéroïdogénèse en réponse à un stimulus de stress induit par les catécholamines [119]. De manière très intéressante, il a été montré dans le modèle murin Aire-/- que son expression thymique était sous le contrôle de Aire [68]. Or nous savons que la

perte d'expression d'un antigène Aire-dépendant au niveau thymique peut avoir pour conséquence l'apparition d'AC ciblant cet antigène en périphérie (exemple de la mucine-6 ou de l'IRBP, interphotoreceptor retinoid-binding protein) [120, 121]. Si on ne peut extrapoler directement que l'expression thymique d'un gène sous la dépendance de Aire chez la souris le soit aussi chez l'homme, cette hypothèse reste cependant plausible et mériterait d'être vérifiée.

Notre approche immuno-protéomique a également permis de caractériser d'autres cibles antigéniques tissus-spécifiques dans la PEA1, jusque là non connues comme telles. Il s'agissait de l'amylase pancréatique (cible d'AC d'isotype IgG), de la lipase pancréatique (cible à la fois d'AC d'isotype IgG et IgM), ainsi que de la pancreatic regenerating protein 1 α (cible d'AC de classe IgM). La découverte de telles cibles pourrait avoir un intérêt clinique potentiel. En effet, les patients souffrant de PEA1 sont fréquemment atteints de malabsorption très invalidante [21], pour laquelle plusieurs hypothèses diagnostiques ont été évoquées. Une atteinte auto-immune des cellules entérochromaffines gastro-intestinales a été décrite [42, 122]. Par ailleurs, une atteinte auto-immune du pancréas exocrine a aussi été mise en évidence [123], sans que les cibles antigéniques précises soient définies. La présence d'AC anti-amylase et anti-lipase pourrait témoigner d'une atteinte auto-immune du pancréas exocrine dans la PEA1, et constituer ainsi une explication alternative à la malabsorption. Cette hypothèse est d'autant plus séduisante que certains patients sont résistants à l'apport exogène d'extraits pancréatiques [124, 125]. De plus, chez la souris Aire $-/-$, l'atteinte du pancréas exocrine prédomine largement sur l'atteinte endocrine [68], même chez les souris NOD Aire $-/-$ [79]. Par ailleurs, la pancreatic regenerating protein 1 α (Reg1A) est également une protéine du pancréas exocrine ; elle constitue un facteur de croissance spécifique du pancréas endocrine, et y joue un rôle anti-apoptotique sur les cellules β de Langherans [126]. Elle est par ailleurs impliquée dans la physiopathologie de cancers de l'appareil digestif [127-129]. La mise en évidence d'une auto-réactivité anti-Reg1A dans la PEA1 où la fréquence du diabète de type 1 peut atteindre 10% des patients mérite d'être soulignée.

Ainsi, la découverte de nouvelles cibles antigéniques tissus-spécifiques (amylase, lipase, Reg1A pancréatiques) ou restreintes à quelques tissus (aldose réductase) dans la PEA1 semble bien d'origine T-dépendante. La présence combinée d'AC d'isotypes à la fois IgM

et/ou IgG dirigée contre ces cibles est vraisemblablement liée à un processus de commutation de classe. La réalisation d'une analyse sur prélèvements séquentiels permettrait d'évaluer les modalités d'apparition respective de ces anticorps et leur signification.

Pour compléter notre approche sur la T-dépendance des événements liée aux mutations du gène *AIRE*, nous avons exploré l'homéostasie des lymphocytes circulants chez nos patients (article 1). Nous avons mis en évidence chez 9 patients atteints de PEA1 une élévation du taux moyen de lymphocytes CD4⁺ et une baisse du taux moyen de lymphocytes T CD8⁺ par rapport aux normes établies dans une population témoin, se traduisant par une élévation moyenne du ratio CD4/CD8 chez les patients APECED. Ces données sont conformes aux données antérieures qui retrouvaient une hyperlymphocytose T CD4⁺ et une lymphopénie CD8⁺ par rapport à un groupe témoin [16, 130], ainsi qu'une élévation du ratio CD4/CD8 [16]. Notre travail corrobore donc ces résultats, même si dans ces 3 études, l'analyse a été réalisée sur de petits effectifs inférieurs à 20 patients. Or il a été montré que les populations T CD4⁺ humaines exprimaient constitutionnellement le gène *AIRE* (contrairement aux cellules T CD8⁺), et de manière plus marquée après une stimulation antigénique ou par l'IL2 [131]. Par ailleurs, chez la souris *Aire*^{-/-}, la surexpression de molécules co-stimulatrices (tel le VCAM-1) à la surface des cellules dendritiques est à l'origine d'une prolifération lymphocytaire T CD4⁺ plus importante que chez les souris *Aire*^{+/+} [93]. Enfin et surtout, les cellules effectrices à l'origine du développement d'infiltrats inflammatoires dans les tissus sont les cellules CD4⁺ (polarisées Th1), alors que les cellules T CD8⁺ semblent y jouer un rôle secondaire) [96]. Ainsi, l'élévation des lymphocytes T CD4⁺ chez les patients atteints de syndrome APECED pourrait être la résultante d'anomalies fonctionnelles intrinsèques de ces cellules privées de l'expression de *AIRE*, d'une altération de la construction de leur répertoire au niveau thymique, et d'une activation exagérée par des cellules dendritiques présentant des anomalies au niveau de leurs molécules de surface. La lymphopénie T CD8⁺ pourrait être la conséquence directe de l'augmentation du pool des cellules T CD4⁺ (régulation homéostatique ?). Toutefois, il est également probable que les anomalies d'éducation thymique aient un retentissement sur le répertoire de ces cellules T CD8⁺, comme le suggère la description d'une prolifération monoclonale T CD8⁺ chez l'un de nos patients (article 1) et dans la littérature [24, 132]. Le lien avec la lymphopénie reste à éclaircir.

L'ensemble de ces éléments souligne la T-dépendance des événements observés dans la PEA1. Le défaut d'expression thymique de AIRE a donc de multiples conséquences à la fois **qualitative** sur le répertoire T (en particulier celui des cellules T régulatrices [89, 92]), sur la prolifération de lymphocytes T auto-réactifs en périphérie (parfois de manière clonale conduisant des leucémies [24, 132]), et **quantitative** sur les populations lymphocytaires T. Les données antérieures de la littérature ainsi que les éléments sus-cités dans notre travail attestent d'une altération du répertoire B thymo-dépendant, directement liée à ce défaut de tolérance thymique centrale. Des éléments complémentaires obtenus au cours de notre étude mettent aussi l'accent sur l'existence probable d'évènements T-indépendants.

Ainsi, de manière moins attendue, notre travail a permis de montrer l'existence d'une auto-réactivité discriminante vis à vis de cibles antigéniques ubiquitaires chez les patients atteints de PEA1, telles que la peroxyredoxine-2 (ciblée à la fois par des IgG et des IgM), ou la heat shock cognate 71 kDa protein ou HSP71 (ciblée par des IgM). Nous avons discuté plus haut du cas, selon nous particulier, de l'aldose réductase détectée par des IgG.

Il n'y avait jusque là eu que très peu d'antigènes ubiquitaires détectés comme cibles d'une auto-réactivité spécifique dans la PEA1. Seuls les AC anti-interféron de type 1 [48, 133] ou anti-IL-17 et IL-22 [31, 51] ont été récemment détectés dans le sérum des patients atteints de ces patients. La présence d'AC anti-cytokines de polarisation Th17 pourrait être en lien avec la survenue des candidoses cutanéomuqueuses observées chez ces patients, comme vu plus haut.

La peroxyredoxine-2, comme l'HSP71 sont des protéines ubiquitaires impliquées dans la protection cellulaire contre le stress oxydatif. Ainsi, la peroxyredoxine-2 a une fonction anti-oxydante, réductrice des peroxydes. Des AC anti-peroxyredoxine ont déjà été détectés dans des maladies auto-immunes systémiques, de type lupus ou autres vascularites systémiques [134-136]. Il a été évoqué que la peroxyredoxine serait exprimée et relarguée par les cellules apoptotiques dans ces maladies auto-immunes. De plus la peroxyredoxine est capable d'activer la sécrétion de nombreuses cytokines, et jouerait donc un rôle dans l'induction de processus inflammatoires [135]. L'HSP-71 appartient quant à elle à la famille des HSP-70. L'HSP-70 a également une fonction protectrice de la cellule contre le stress

oxydatif, et s'avère augmentée en cas de stress, de situation pathologique à l'origine d'une inflammation, de nécrose cellulaire ... Elle se lie alors aux protéines endommagées. L'expression de l'HSP-70 est ainsi augmentée au cours de certaines maladies auto-immunes telles que le lupus [137]. Des AC contre cette protéine ont été détectés dans le purpura thrombopénique auto-immun [138] ou dans les lupus d'expression neuro-psychiatrique [6]. De plus les HSP jouent un rôle important dans l'immunorégulation. L'HSP70 aurait la capacité de promouvoir l'auto-immunité in vivo ; elle peut fonctionner comme un signal de danger endogène, agissant sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) [139]. Nous savons en effet que les PRRs (Pattern Recognition Receptors) ont la capacité de les reconnaître; l'HSP70 mimerait ainsi la présence de PAMPs (Pathogen-Associated Molecular patterns) microbiens et entraînerait une réponse inflammatoire du système immunitaire inné [140].

La présence d'AC dirigés contre des antigènes ubiquitaires dans la PEA1 n'a été que rarement rapportée, et a plusieurs explications potentielles. En effet, comme décrit plus haut, Aire ne commande pas uniquement l'expression d'antigènes ectopiques tissus-spécifiques au niveau des mTECs. Cette protéine est également responsable de l'expression d'autres antigènes, beaucoup plus largement distribués, au sein des eTACs, cellules stromales ganglionnaires ou spléniques [69]. Toutefois ces antigènes ubiquitaires sont principalement des antigènes impliquant la présentation de l'antigène ou la communication inter-cellulaire [69]. Ainsi, la présence de certains AC dirigés contre des cibles plus ubiquitaires pourrait être liée à une rupture de tolérance Aire-dépendante en périphérie, au niveau splénique et/ou ganglionnaire.

Par ailleurs, d'autres arguments plaident pour la T-indépendance de certains événements observés dans la PEA1. La présence d'AC discriminants de classe à la fois IgM ou IgG dirigés contre des cibles ubiquitaires le suggère. Les anomalies du répertoire B T-indépendant pourraient être par exemple liées à des signaux inappropriés délivrés par des PRRs, ou à l'implication d'un certain type de sous-populations lymphocytaires B.

Ainsi, ces signaux inappropriés peuvent être associés à une anomalie soit de l'engagement des PRRs, soit des signaux de transduction [141]. Les mutations du gène *CARD9* à l'origine d'anomalies de la transduction du signal PRRs sont également responsables de candidoses [142]. En effet , les glucannes et mannanes, situés à la surface des

Candida constituent des PAMPs reconnus par les PRRs de la famille des TLRs (Toll-Like Receptors 2, 4 et 9) ou de celle des CTL (C-Type lectin) [143]. La dectine-1, comme la dectine-2, appartiennent à cette dernière famille ; elles jouent un rôle primordial dans la reconnaissance du Candida. Suite à cette reconnaissance est enclenchée la voie de Syk/CARD9 [144-146], conduisant à l'activation du NFκB et de la voie des MAP-kinases (Mitogen Activated Protein) au sein de cellules myéloïdes. En découle la sécrétion de cytokines (TNF-α, IL-6, IL-23) qui vont conduire des lymphocytes T naïfs à développer un profil de type Th17 [144, 147]. Ces voies sont ainsi primordiales dans la protection vis à vis du Candida [49]. Toutefois, le niveau d'expression de ces différents PRRs ne serait pas modifié dans les cellules dendritiques immatures des patients atteints de PEA1 en réponse au Candida, par rapport au contrôle [148]. En revanche, les cellules dendritiques issues de patients souffrant de candidoses (APECED et non APECED) ne parviendraient pas à « down-réguler » l'expression de l'ARN messager des PRRs en réponse au Candida, contrairement à des CD de sujets sains [149]. Ce défaut de rétro-contrôle négatif traduirait un défaut de maturation de ces cellules dendritiques, affectant la régulation de l'expression des PRRs en réponse au Candida ; ces anomalies de transduction de signaux PRR pourraient être responsables, au moins en partie, des difficultés de ces patients à se défendre vis à vis des candidoses [148]. Ce défaut de maturation des cellules dendritiques dans la PEA1 avait déjà été souligné par les mêmes auteurs, qui avaient montré une hyperactivation de ces cellules en réponse au Candida, avec hypersécrétion de cytokines (IFN-γ, IL-2, TNF-α, IL-13) [150]. Cette hyperactivation des CD pourrait être réactionnelle à une altération de la réponse lymphocytaire T au Candida, en particulier de polarisation Th17. Quoiqu'il en soit, la présence d'AC anti-HSP 70 pourrait également, nous l'avons vu précédemment, plaider pour des anomalies d'activation des PRRs et donc de l'immunité innée dans la PEA1. Les anomalies de développement de la lignée iNKT décrits récemment dans la PEA1 sont un argument supplémentaire pour des anomalies de l'immunité innée dans la PEA1 [101].

Enfin, plusieurs arguments permettent d'évoquer aussi l'implication de sous-types cellulaires B T-indépendants dans la PEA1. Nous avons en effet détecté une augmentation de la sous-population cellulaire MZB-like chez 4 patients atteints de syndrome APECED, alors que les cellules B transitionnelles et naïves seraient diminuées (données préliminaires). Dans la littérature, plusieurs arguments sont également en faveur d'une implication de ce sous-type cellulaire. En effet, les souris Aire -/- développent des lymphomes de la zone marginale de la

rate et des infiltrats lymphocytaires B hépatiques suggérant une activation exagérée de ces lymphocytes en périphérie [105]. Or les cellules B de la zone marginale (MZB) sont capables de proliférer de manière T-indépendante. De plus, il existe, chez ces souris Aire $-/-$, une augmentation des taux de cytokine BAFF (B cell Activating Factor of the TNF family) qui contribue à l'activation des lymphocytes B notamment les MZB les rendant plus enclins à la production d'auto-anticorps et à la présentation d'antigènes [151]. Chez l'homme, 20% des cellules B matures expriment des auto-anticorps de faible affinité. Durant la lymphopoïèse B, plusieurs points de contrôle situés à différentes étapes de la maturation permettraient de reconnaître et d'éliminer les cellules B auto-réactives [152]. Un ou plusieurs de ces points de contrôle semblent être pris à défaut dans certaines pathologies auto-immunes, comme le lupus [153]. La différenciation des cellules B transitionnelles en cellules B MZB-like s'accompagne d'un passage par un point de contrôle responsable d'une chute du nombre de cellules autoréactives [154]. Un des éléments régulateurs de cette transition entre cellules B immatures et matures est la cytokine BAFF. En effet, à l'état physiologique, une compétition s'opèrerait entre cellules auto-réactives et cellules non auto-réactives en fonction de la concentration de BAFF. L'excès de production de BAFF pourrait être responsable d'un défaut d'élimination des cellules B autoréactives et plus particulièrement des cellules MZB-like. Or, chez les patients atteints de syndrome APECED, les taux sériques de BAFF sont accrus [151], ce qui pourrait contribuer à l'activation des cellules B de type MZ, aux dépens des cellules B naïves et transitionnelles.

PARTIE IV: CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La PEA1 constitue, par son origine monogénique, un excellent modèle pour la compréhension de l'auto-immunité spécifique d'organe. Initialement supposée T-dépendante, cette pathologie apparaît beaucoup plus complexe aujourd'hui. Elle semble impliquer d'autres cellules immunocompétentes de l'immunité innée ou adaptative. Nous avons surtout orienté nos travaux sur l'analyse des B lymphocytes et sur le répertoire B. Nos résultats sont en faveur d'une telle hypothèse.

Si la présence d'AC vis à vis de nouvelles cibles antigéniques tissus-spécifiques est un argument supplémentaire qui confirme bien l'existence de perturbations du répertoire B d'origine T-dépendante, la présence d'AC vis à vis de cibles ubiquitaires plaide en revanche pour une altération du répertoire B T-indépendant. Ces perturbations touchent à la fois le répertoire systémique auto-réactif IgG et systémique IgM. A la lumière de nos premiers résultats, une activation inappropriée des signaux de danger ou une hyperactivation des sous-populations lymphocytaires de type MZ-B like peuvent être suggérées. Dans ce contexte, il n'est pas exclu que les anomalies T-indépendantes dans la PEA1 mises en évidence impliquent une atteinte de l'immunité naturelle.

A la suite de ce travail, plusieurs perspectives de recherche peuvent être envisagées, grâce notamment à la mise en place d'un PHRC national sur cette thématique en 2009. Il ouvre en effet les perspectives d'un recrutement plus large de patients dans cette pathologie rare, en tentant de rassembler l'ensemble des cas français. Nous espérons ainsi confirmer ces résultats sur une cohorte plus représentative de patients, mais également élargir les axes de recherche à la fois à visée fondamentale, mais également en vue d'applications cliniques.

A. Poursuite du travail débuté sur les immuno-empreintes

1. Confirmation des résultats d'immuno-empreintes en IgM et IgG

Grâce au PHRC national débuté depuis juillet 2009 dans lequel une cinquantaine de patients est attendue, nous comptons donc poursuivre la réalisation d'immuno-empreintes IgM et IgG afin de confirmer nos résultats. Nous envisageons surtout la réalisation d'analyses

séquentielles afin d'estimer la stabilité de ce répertoire dans le temps puisque les patients vont être prélevés de manière annuelle pendant au moins 3 années consécutives. Ceci pourrait également nous permettre d'évaluer de manière qualitative l'évolution de l'auto-réactivité IgG et IgM respective vis à vis des Ag cibles mis en évidence par la présente analyse, et de mieux en comprendre la signification. Si l'effectif s'avérait suffisant, nous pourrions également effectuer une analyse par sous groupes, constitués selon les atteintes cliniques des patients.

2. Poursuite de l'étude de l'auto-réactivité parathyroïdienne

Nous poursuivrons également l'analyse des immuno-empreintes qui ont été débutées sur le tissu parathyroïdien. Les cibles de l'auto-réactivité parathyroïdienne dans la PEA1 et dans d'autres hypoparathyroïdies autoimmunes sont encore mal connues à l'exception du récepteur sensible au calcium et de NALP5. La recherche de nouveaux antigènes candidats par l'analyse des profils d'auto-réactivité IgG et IgM a été initiée, les cibles antigéniques d'une auto-réactivité spécifique seront caractérisées par les techniques d'immuno-protéomique.

En parallèle, un projet d'identification des épitopes cibles d'auto-réactivité au sein du récepteur sensible au calcium et de NALP5 par puces protéiques (Innobiochips) est mené dans le cadre du PHRC. Les premiers résultats sont en cours d'interprétation.

3. Etude des profils sérologiques anti-Candida albicans

Les récentes découvertes concernant la participation des mécanismes auto-immuns impliquant des AC dirigés contre les cytokines de type IL-17 (défaillance des processus de défense) nous incite à étudier les profils de réactivité sérologique vis-à-vis de différents antigènes candidosiques chez des patients ayant une candidose, avec ou sans PEA1. Dans cette perspective, une collaboration avec le laboratoire du Pr Poulain, par l'intermédiaire du Dr Boualem Sendid (U 799, Physiopathologie des Candidoses) a été engagée.

B. De l'immunité humorale à l'homéostasie B

Nous souhaiterions confirmer les données préliminaires concernant les cellules B naïves et transitionnelles, mais aussi les cellules MZB-like qui semblent être activées dans la PEA1. Cet état de « priming » pourrait induire une production inappropriée d'auto-AC. Chez ces patients, les taux de BAFF sont également augmentés en comparaison des taux observés chez les sujets sains. Nous proposons donc de poursuivre des immunophénotypages lymphocytaires B chez les patients atteints de PEA1, en les comparant à 2 groupes contrôles appariés pour l'âge et le sexe (groupe de PEA2 déjà constitué, et cohorte de sujets sains récemment établie au laboratoire [106]). Conjointement, un dosage de BAFF sérique par test ELISA sera réalisé à la recherche d'une corrélation entre les taux de BAFF et le nombre de cellules MZB-like.

Le modèle murin Aire^{-/-} constitue une aide précieuse à la compréhension de la PEA1. Il est envisageable de réaliser une étude séquentielle du répertoire auto-réactif naturel de ces souris notamment avant et après l'apparition des signes cliniques et des infiltrats lymphocytaires. Cette analyse accompagnée de dosages de BAFF et d'immunophénotypages lymphocytaires B (MZ) permettrait de déterminer si les modifications du répertoire précèdent l'apparition de la pathologie ou y sont associées. Cette approche nécessitera la mise en place d'une collaboration avec des équipes internationales avec lesquelles des contacts ont déjà été engagés.

C. Du laboratoire à la clinique

L'utilisation de protéines recombinantes devrait nous permettre de confirmer la présence d'une auto-réactivité vis à vis de ces cibles pancréatiques tissus-spécifiques (amylase, lipase, Reg1A) et surrénaliennes (aldose réductase) dans la PEA1. Une collaboration avec une cellule de biotechnologie associée à l'Université de Lille 2 est en cours, pour la réalisation de « micro-arrays » (Innobiochips). Dans un second temps, après la validation des antigènes cibles à valeur diagnostique et/ou pronostique, la mise en place de tests ELISA nous autoriserait à réaliser cette recherche de manière plus aisée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Cohen IR, *The cognitive paradigm and the immunological homunculus*. Immunol Today, 1992. **13**: p. 490-4.
2. Mouthon L, Nobrega A, Nicolas N, Kaveri SV, Barreau C, Coutinho A, Kazatchkine MD, *Invariance and restriction toward a limited set of self-antigens characterize neonatal IgM antibody repertoires and prevail in autoreactive repertoires of healthy adults*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**: p. 3839-43.
3. Mouthon L, Haury M, Lacroix-Desmazes S, Barreau C, Coutinho A, Kazatchkine MD, *Analysis of the normal human IgG antibody repertoire. Evidence that IgG autoantibodies of healthy adults recognize a limited and conserved set of protein antigens in homologous tissues*. J Immunol, 1995. **154**: p. 5769-78.
4. Mouthon L, Lacroix-Desmazes S, Nobrega A, Barreau C, Coutinho A, Kazatchkine MD, *The self-reactive antibody repertoire of normal human serum IgM is acquired in early childhood and remains conserved throughout life*. Scand J Immunol, 1996. **44**: p. 243-51.
5. Lefranc D, Almeras L, Dubucquoi S, de Seze J, Vermersch P, Prin L, *Distortion of the self-reactive IgG antibody repertoire in multiple sclerosis as a new diagnostic tool*. J Immunol, 2004. **172**: p. 669-78.
6. Lefranc D, Launay D, Dubucquoi S, de Seze J, Dussart P, Vermersch M, Hachulla E, Hatron PY, Vermersch P, Mouthon L, Prin L, *Characterization of discriminant human brain antigenic targets in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus using an immunoproteomic approach*. Arthritis Rheum, 2007. **56**: p. 3420-32.
7. Zéphir H, Lefranc D, Dubucquoi S, de Seze J, Boron L, Prin L, Vermersch P., *Serum IgG repertoire in clinically isolated syndrome predicts multiple sclerosis*. Mult Scler, 2009. **15**: p. 593-600.
8. Almeras L, Lefranc D, Drobecq H, de Seze J, Dubucquoi S, Vermersch P, Prin L, *New antigenic candidates in multiple sclerosis: identification by serological proteome analysis*. Proteomics, 2004. **4**: p. 2184-94.
9. Scholz C, Patton KT, Anderson DE, Freeman GJ, Hafler DA, *Expansion of autoreactive T cells in multiple sclerosis is independent of exogenous B7 costimulation*. J Immunol, 1998. **160**: p. 1532-8.
10. Aaltonen J, Bjorses P, Sandkuijl L, Perheentupa J, Peltonen L, *An autosomal locus causing autoimmune disease: autoimmune polyglandular disease type I assigned to chromosome 21*. Nat Genet, 1994. **8**: p. 83-7.
11. Rosatelli MC, Meloni A, Meloni A, Devoto M, Cao A, Scott HS, Peterson P, Heino M, Krohn KJ, Nagamine K, Kudoh J, Shimizu N, Antonarakis SE. , *A common mutation in Sardinian autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy patients*. Hum Genet, 1998. **103**: p. 428-34.
12. Zlotogora J, Shapiro MS., *Polyglandular autoimmune syndrome type I among Iranian Jews*. J Med Genet, 1992. **29**(11): p. 824-6.
13. Wolff AS, Erichsen MM, Meager A, Magitta NF, Myhre AG, Bollerslev J, Fougner KJ, Lima K, Knappskog PM, Husebye ES,

- Autoimmune polyendocrine syndrome type 1 (APS I) in Norway - phenotypic variation, autoantibodies and novel mutations in the autoimmune regulator (AIRE) gene.* J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**: p. 595-603.
14. Podkrajsek KT, Bratanic N, Krzisnik C, Battelino T, *Autoimmune regulator-1 messenger ribonucleic acid analysis in a novel intronic mutation and two additional novel AIRE gene mutations in a cohort of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy patients.* J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**: p. 4930-35.
 15. Stolarski B, Pronicka E, Korniszewski L, Pollak A, Kostrzewa G, Rowinska E, Wlodarski P, Skorka A, Gremida M, Krajewski P, Ploski R, *Molecular background of polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy syndrome in a Polish population: novel AIRE mutations and an estimate of disease prevalence.* Clin Genet, 2006. **70**: p. 348-54
 16. Dominguez M, Crushell E, Ilmarinen T, McGovern E, Collins S, Chang B, Fleming P, Irvine AD, Brosnahan D, Ulmanen I, Murphy N, Costigan C, *Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) in the Irish population.* J Pediatr Endocrinol Metab, 2006. **19**: p. 1343-52.
 17. Whitaker J, Landing BH, Esselborn VM, Williams RR, *The syndrome of familial juvenile hypoadrenocorticism, hypoparathyroidism and superficial moniliiasis.* J Endocrinol, 1956. **16**: p. 1374-87.
 18. Perheentupa J, *Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy.* J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**: p. 2843-50.
 19. Ahonen P, Myllarniemi S, Sipila I, Perheentupa J, *Clinical variation of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) in a series of 68 patients.* N Engl J Med, 1990. **322**: p. 1829-36.
 20. Betterle C, Greggio NA, Volpato M, *Clinical review 93: Autoimmune polyglandular syndrome type 1.* J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**: p. 1049-55.
 21. Proust-Lemoine E, Wémeau JL, *APECED or Auto-immune Polyglandular syndrome type 1: an update.* Press Med, **37**: p. 1158-71.
 22. Myhre AG, Halonen M, Eskelin P, Ekwall O, Hedstrand H, Rorsman F, Kampe O, Husebye ES, *Autoimmune polyendocrine syndrome type 1 (APS I) in Norway.* Clin Endocrinol (Oxf), 2001. **54**(2): p. 211-17.
 23. Nishikawa Y, H.F., Yano M, Kitajima H, Miyazaki J, Kawamoto H, Mouri Y, Matsumoto M, *Biphasic Aire expression in early embryos and in medullary thymic epithelial cells before end-stage terminal differentiation.* J Exp Med, 2010. **207**: p. 963-71.
 24. Hervier B, Rimbart M, Maisonneuve H, Hamidou MA, *Large granular lymphocyte leukemia with pure red cell aplasia associated with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy: an unfortuitous association?* Int J Immunopathol Pharmacol, 2010. **23**: p. 947-50.
 25. Neufeld M, Maclaren N, Blizzard R, *Autoimmune polyglandular syndromes.* Pediatr Ann, 1980 **9**: p. 154-162

26. Betterle C, Zanchetta R, *Update on autoimmune polyendocrine syndromes (APS)*. Acta Biomed Ateneo Parmense, 2003. **74**: p. 9-33.
27. Michels AW, Eisenbarth GS, *Autoimmune polyendocrine syndrome type 1 (APS-1) as a model for understanding autoimmune polyendocrine syndrome type 2 (APS-2)*. J Intern Med, 2009. **265**: p. 530-40.
28. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD, *The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3*. Nat Genet, 2001. **27**: p. 20-21.
29. Cheng MH, Fan U, Grewal N, Barnes M, Mehta A, Taylor S, Husebye ES, Murphy EJ, Anderson MS, *Acquired autoimmune polyglandular syndrome, thymoma, and an AIRE defect*. N Engl J Med, 2010. **362**: p. 764-6.
30. Meloni A, Furcas M, Cetani F, Marcocci C, Falorni A, Perniola R, Pura M, Bøe Wolff AS, Husebye ES, Lilic D, Ryan KR, Gennery AR, Cant AJ, Abinun M, Spickett GP, Arkwright PD, Denning D, Costigan C, Dominguez M, McConnell V, Willcox N, Meager A., *Autoantibodies against type I interferons as an additional diagnostic criterion for autoimmune polyendocrine syndrome type I*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**: p. 4389-97.
31. Kisand K, Boe Wolff AS, Podkrajsek KT, Tserel L, Link M, Kisand KV, Ersvaer E, Perheentupa J, Erichsen MM, Bratanic N, Meloni A, Cetani F, Perniola R, Ergun-Longmire B, Maclaren N, Krohn KJ, Pura M, Schalke B, Ströbel P, Leite MI, Battelino T, Husebye ES, Peterson P, Willcox N, Meager A, *Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines*. J Exp Med, 2010 **207**: p. 299-308.
32. Marx A, Willcox N, Leite MI, Chuang WY, Schalke B, Nix W, Ströbel P, *Thymoma and paraneoplastic myasthenia gravis*. Autoimmunity., 2010. **43**: p. 413-27.
33. Mayer A, Ploix C, Orgiazzi J, Desbos A, Moreira A, Vidal H, Monier JC, Bienvenu J, Fabien N, *Calcium-sensing receptor autoantibodies are relevant markers of acquired hypoparathyroidism*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**: p. 4484-8.
34. Li Y, Song YH, Rais N, Connor E, Schatz D, Muir A, Maclaren N, *Autoantibodies to the extracellular domain of the calcium sensing receptor in patients with acquired hypoparathyroidism*. J Clin Invest, 1996. **97**: p. 910-14
35. Alimohammadi M, Björklund P, Hallgren A, Pöntynen N, Szinnai G, Shikama N, Keller MP, Ekwall O, Kinkel SA, Husebye ES, Gustafsson J, Rorsman F, Peltonen L, Betterle C, Perheentupa J, Akerström G, Westin G, Scott HS, Holländer GA, Kämpe O, *Autoimmune polyendocrine syndrome type 1 and NALP5, a parathyroid autoantigen*. N Engl J Med, 2008. **358**: p. 1018-28.
36. Soderbergh A, Myhre AG, Ekwall O, Gebre-Medhin G, Hedstrand H, Landgren E, Miettinen A, Eskelin P, Halonen M, Tuomi T, Gustafsson J, Husebye ES, Perheentupa J, Gylling M, Manns MP, Rorsman F,

- Kampe O, Nilsson T *Prevalence and clinical associations of 10 defined autoantibodies in autoimmune polyendocrine syndrome type I*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**: p. 557-62.
37. Chen S, Sawicka J, Betterle C, Powell M, Prentice L, Volpato M, Rees Smith B, Furmaniak J, *Autoantibodies to steroidogenic enzymes in autoimmune polyglandular syndrome, Addison's disease, and premature ovarian failure*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**: p. 1871-1876.
 38. Perniola R, Falorni A, Clemente MG, Forini F, Accogli E, Lobreglio G, *Organ-specific and non-organ-specific autoantibodies in children and young adults with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED)*. Eur J Endocrinol, 2000. **143**: p. 497-503.
 39. Bensing S, Fetisov SO, Mulder J, Perheentupa J, Gustafsson J, Husebye ES, Oscarson M, Ekwall O, Crock PA, Hokfelt T, Hulting AL, Kampe O, *Pituitary autoantibodies in autoimmune polyendocrine syndrome type I*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(3): p. 949-954.
 40. O'Dwyer DT, Mac Elduff P, Peterson P, Perheentupa J, Crock PA., *Pituitary autoantibodies in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED)*. Acta Biomed, 2007. **78**: p. 248-54.
 41. Ekwall O, Hedstrand H, Haavik J, Perheentupa J, Betterle C, Gustafsson J, Husebye E, Rorsman F, Kampe O, *Pteridin-dependent hydroxylases as autoantigens in autoimmune polyendocrine syndrome type I*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**: p. 2944-50.
 42. Skoldberg F, Portela-Gomes GM, Grimelius L, Nilsson G, Perheentupa J, Betterle C, Husebye ES, Gustafsson J, Ronnblom A, Rorsman F, Kampe O, *Histidine Decarboxylase, a Pyridoxal Phosphate-Dependent Enzyme, Is an Autoantigen of Gastric Enterochromaffin-Like Cells*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**: p. 1445-52.
 43. Obermayer-Straub P, Perheentupa J, Braun S, Kayser A, Barut A, Loges S, Harms A, Dalekos G, Strassburg CP, Manns MP, *Hepatic autoantigens in patients with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy*. Gastroenterology, 2001. **121**: p. 668-77.
 44. Hedstrand H, Perheentupa J, Ekwall O, Gustafsson J, Michaelsson G, Husebye E, Rorsman F, Kampe O, *Antibodies against hair follicles are associated with alopecia totalis in autoimmune polyendocrine syndrome type I*. J Invest Dermatol, 1999. **113**: p. 1054-58.
 45. Hedstrand H, Ekwall O, Haavik J, Landgren E, Betterle C, Perheentupa J, Gustafsson J, Husebye E, Rorsman F, Kampe O, *Identification of tyrosine hydroxylase as an autoantigen in autoimmune polyendocrine syndrome type I*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **267**: p. 456-61.
 46. Hedstrand H, Ekwall O, Olsson MJ, Landgren E, Kemp EH, Weetman AP, Perheentupa J, Husebye E, Gustafsson J, Betterle C, Kampe O, Rorsman F, *The transcription factors SOX9 and SOX10 are vitiligo autoantigens in autoimmune polyendocrine syndrome type I*. J Biol Chem, 2001. **276**: p. 35390-5.

47. Alimohammadi M, Dubois N, Sköldbberg F, Hallgren A, Tardivel I, Hedstrand H, Haavik J, Husebye ES, Gustafsson J, Rorsman F, Meloni A, Janson C, Vialettes B, Kajosaari M, Egner W, Sargur R, Pontén F, Amoura Z, Grimfeld A, De Luca F, Betterle C, Perheentupa J, Kämpe O, Carel JC, *Pulmonary autoimmunity as a feature of autoimmune polyendocrine syndrome type 1 and identification of KCNRG as a bronchial autoantigen*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**: p. 4396-4401.
48. Meager A, Visvalingam K, Peterson P, Moll K, Murumagi A, Krohn K, Eskelin P, Perheentupa J, Husebye E, Kadota Y, Willcox N, *Anti-Interferon Autoantibodies in Autoimmune Polyendocrinopathy Syndrome Type 1*. PLoS Med, 2006 **3**: p. e289
49. Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P., *Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice*. J Infect Dis, 2004. **190**: p. 624-31.
50. Netea MG, M.L., *Innate immune mechanisms for recognition and uptake of Candida species*. Trends Immunol, 2010. **31**: p. 346-53.
51. Puel A, Döffinger R, Natividad A, Chrabieh M, Barcenas-Morales G, Picard C, Cobat A, Ouachée-Chardin M, Toulon A, Bustamante J, Al-Muhsen S, Al-Owain M, Arkwright PD, Costigan C, McConnell V, Cant AJ, Abinun M, Polak M, Bougnères PF, Kumararatne D, Marodi L, Nahum A, Roifman C, Blanche S, Fischer A, Bodemer C, Abel L, Lilic D, Casanova JL., *Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type 1*. J Exp Med, 2010. **207**: p. 291-7.
52. Consortium, T.F.-G.A., *An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. The Finnish-German APECED Consortium. Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy*. Nat Genet, 1997. **17**: p. 399-403.
53. Nagamine K, Peterson P, Scott HS, Kudoh J, Minoshima S, Heino M, Krohn KJ, Lalioti MD, Mullis PE, Antonarakis SE, Kawasaki K, Asakawa S, Ito F, Shimizu N *Positional cloning of the APECED gene*. Nat Genet., 1997. **17**: p. 393-8.
54. Heino M, Peterson P, Kudoh J, Nagamine K, Lagerstedt A, Ovod V, Ranki A, Rantala I, Nieminen M, Tuukkanen J, Scott HS, Antonarakis SE, Shimizu N, Krohn K and *Autoimmune regulator is expressed in the cells regulating immune tolerance in thymus medulla*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **257**: p. 821-5.
55. Kogawa K, Nagafuchi S, Katsuta H, Kudoh J, Tamiya S, Sakai Y, Shimizu N, Harada M, *Expression of AIRE gene in peripheral monocyte/dendritic cell lineage*. Immunol Lett, 2002. **80**: p. 195-8.
56. Ferguson BJ, Alexander C, Rossi SW, Liiv I, Rebane A, Worth CL, Wong J, Laan M, Peterson P, Jenkinson EJ, Anderson G, Scott HS, Cooke A, Rich T, *AIRE's CARD revealed, a new structure for central tolerance provokes transcriptional plasticity*. J Biol Chem, 2008. **283**: p. 1723-31.

57. Bjorses P, Halonen M, Palvimo JJ, Kolmer M, Aaltonen J, Ellonen P, Perheentupa J, Ulmanen I, Peltonen L, *Mutations in the AIRE gene: effects on subcellular location and transactivation function of the autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy protein* Am J Hum Genet, 2000. **66**: p. 378-92.
58. Pitkanen J, Vahamurto P, Krohn K, Peterson P, *Subcellular localization of the autoimmune regulator protein. characterization of nuclear targeting and transcriptional activation domain.* J Biol Chem, 2001. **276**: p. 19597-602.
59. Halonen M, Eskelin P, Myhre AG, Perheentupa J, Husebye ES, Kampe O, Rorsman F, Peltonen L, Ulmanen I, Partanen J, *AIRE mutations and human leukocyte antigen genotypes as determinants of the autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy phenotype.* J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**: p. 2568-74.
60. Pitkanen J, Doucas V, Sternsdorf T, Nakajima T, Aratani S, Jensen K, Will H, Vahamurto P, Ollila J, Vihinen M, Scott HS, Antonarakis SE, Kudoh J, Shimizu N, Krohn K, Peterson P, *The autoimmune regulator protein has transcriptional transactivating properties and interacts with the common coactivator CREB-binding protein.* J Biol Chem, 2000. **275**: p. 16802-9
61. Oven I, Brdicková N, Kohoutek J, Vaupotic T, Narat M, Peterlin BM., *AIRE recruits P-TEFb for transcriptional elongation of target genes in medullary thymic epithelial cells.* Mol Cell Biol, 2007. **27**: p. 8815-23.
62. Liiv I, Rebane A, Org T, Saare M, Maslovskaja J, Kisand K, Juronen E, Valmu L, Bottomley MJ, Kalkkinen N, Peterson P., *DNA-PK contributes to the phosphorylation of AIRE: importance in transcriptional activity.* Biochim Biophys Acta, 2008. **1783**: p. 74-83.
63. Gardner JM, Fletcher AL, Anderson MS, Turley SJ, *AIRE in the thymus and beyond.* Curr Opin Immunol, 2009. **21**: p. 582-9.
64. Chakravarty S, Zheng L, Zhou MM., *Structure and site-specific recognition of histone H3 by the PHD finger of human autoimmune regulator.* Structure, 2009. **17**: p. 670-9.
65. Uchida D, Hatakeyama S, Matsushima A, Han H, Ishido S, Hotta H, Kudoh J, Shimizu N, Doucas V, Nakayama KI, Kuroda N, Matsumoto M, *AIRE functions as an E3 ubiquitin ligase.* J Exp Med, 2004. **199**: p. 167-72.
66. Mathis D, Benoist C, *Aire.* Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 287-312.
67. Johnnidis JB, Venanzi ES, Taxman DJ, Ting JP, Benoist CO, Mathis DJ, *Chromosomal clustering of genes controlled by the aire transcription factor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**: p. 7233-8
68. Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, von Boehmer H, Bronson R, Dierich A, Benoist C, Mathis D, *Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein.* Science, 2002. **298**: p. 1395-401.
69. Gardner JM, DeVoss JJ, Friedman RS, Wong DJ, Tan XT, Zhou X, Johannes KP, Su MA, Chang HY, Krummel MF, Anderson MS, *Deletional tolerance mediated by extrathymic Aire-expressing cells.* Science, 2008. **321**: p. 843-47.

70. Derbinski J, Pinto S, Rosch S, Hexel K, Kyewski B, *Promiscuous gene expression patterns in single medullary thymic epithelial cells argue for a stochastic mechanism.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**: p. 657-62.
71. Villaseñor J, Besse W, Benoist C, Mathis D, *Ectopic expression of peripheral-tissue antigens in the thymic epithelium: probabilistic, monoallelic, misinitiated.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**: p. 15854-59.
72. Chin RK, Lo JC, Kim O, Blink SE, Christiansen PA, Peterson P, Wang Y, Ware C, Fu YX, *Lymphotoxin pathway directs thymic Aire expression.* Nat Immunol, 2003. **4**: p. 1121-7.
73. Boehm T, Scheu S, Pfeffer K, Bleul CC, *Thymic medullary epithelial cell differentiation, thymocyte emigration, and the control of autoimmunity require lympho-epithelial cross talk via LTbetaR.* J Exp Med, 2003. **198**: p. 757-69.
74. Seach N, Ueno T, Fletcher AL, Lowen T, Mattesich M, Engwerda CR, Scott HS, Ware CF, Chidgey AP, Gray DH, Boyd RL, *The lymphotoxin pathway regulates Aire-independent expression of ectopic genes and chemokines in thymic stromal cells.* J Immunol, 2008. **180**: p. 5384-92.
75. Akiyama T, Maeda S, Yamane S, Ogino K, Kasai M, Kajiura F, Matsumoto M, Inoue J, *Dependence of self-tolerance on TRAF6-directed development of thymic stroma.* Science, 2005. **308**: p. 248-51.
76. Akiyama T, Shimo Y, Yanai H, Qin J, Ohshima D, Maruyama Y, Asaumi Y, Kitazawa J, Takayanagi H, Penninger JM, Matsumoto M, Nitta T, Takahama Y, Inoue J, *The tumor necrosis factor family receptors RANK and CD40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance.* Immunity, 2008. **29**: p. 423-37.
77. Derbinski J, Schulte A, Kyewski B, Klein L, *Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self.* Nat Immunol, 2001. **2**: p. 1032-9
78. Ramsey C, Winqvist O, Puhakka L, Halonen M, Moro A, Kampe O, Eskelin P, Pelto-Huikko M, Peltonen L, *Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response.* Hum Mol Genet, 2002. **11**: p. 397-409.
79. Jiang W, Anderson MS, Bronson R, Mathis D, Benoist C, *Modifier loci condition autoimmunity provoked by Aire deficiency.* J Exp Med, 2005. **202**: p. 805-15.
80. Liston A, Lesage S, Wilson J, Peltonen L, Goodnow CC, *Aire regulates negative selection of organ-specific T cells.* Nat Immunol, 2003. **4**: p. 350-4.
81. Liston A, Gray DH, Lesage S, Fletcher AL, Wilson J, Webster KE, Scott HS, Boyd RL, Peltonen L, Goodnow CC, *Gene dosage-limiting role of Aire in thymic expression, clonal deletion, and organ-specific autoimmunity.* J Exp Med, 2004. **200**: p. 1015-26.
82. Gray DHD, Abramson J, Benoist C, Mathis D, *Proliferative arrest and rapid turnover of thymic epithelial cells expressing Aire.* J Exp Med, 2007. **204**: p. 2521-28.

83. Farr AG, Dooley JL, Erickson M, *Organization of thymic medullary epithelial heterogeneity: implications for mechanisms of epithelial differentiation*. Immunol Rev, 2002. **189**: p. 20-7.
84. Gillard GO, Farr AG, *Contrasting models of promiscuous gene expression by thymic epithelium*. J Exp Med, 2005. **202**: p. 15-9.
85. Wing K, Sagakuchi S, *Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity*. Nat Immunol, 2010. **11**: p. 7-13.
86. Kuroda N, Mitani T, Takeda N, Ishimaru N, Arakaki R, Hayashi Y, Bando Y, Izumi K, Takahashi T, Nomura T, Sakaguchi S, Ueno T, Takahama Y, Uchida D, Sun S, Kajiura F, Mouri Y, Han H, Matsushima A, Yamada G, Matsumoto M *Development of autoimmunity against transcriptionally unrepressed target antigen in the thymus of Aire-deficient mice*. J Immunol, 2005. **174**: p. 1862-70.
87. Anderson MS, Venanzi ES, Chen Z, Berzins SP, Benoist C, Mathis D, *The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance*. Immunity, 2005. **23**: p. 227-39.
88. Daniely D, K.J., Cebula A, Ignatowicz L., *Diversity of TCRs on natural Foxp3+ T cells in mice lacking Aire expression*. J Immunol, 2010. **184**: p. 6865-73.
89. Kekalainen E, Tuovinen H, Joensuu J, Gylling M, Franssila R, Pontynen N, Talvensaari K, Perheentupa J, Miettinen A, Arstila TP, *A defect of regulatory T cells in patients with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy*. J Immunol, 2007. **178**(2): p. 1208-1215.
90. Wolff AS, Oftedal BE, Kisand K, Ersvaer E, Lima K, Husebye ES, *Flow cytometry study of blood cell subtypes reflects autoimmune and inflammatory processes in autoimmune polyendocrine syndrome type I*. Scand J Immunol., 2010. **71**: p. 459-67.
91. Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito T, Wang YH, Cao W, Liu YJ, *Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus*. Nature, 2005. **436**: p. 1181-85.
92. Laakso SM, Laurinolli TT, Rossi LH, Lehtoviita A, Sairanen H, Perheentupa J, Kekäläinen E, Arstila TP, *Regulatory T cell defect in APECED patients is associated with loss of naive FOXP3(+) precursors and impaired activated population*. J Autoimmun, 2010. **35**: p.251-7.
93. Ramsey C, Hassler S, Marits P, Kampe O, Surh CD, Peltonen L, Winqvist O, *Increased antigen presenting cell-mediated T cell activation in mice and patients without the autoimmune regulator*. Eur J Immunol, 2006. **36**: p. 305-17.
94. Lee JW, Epardaud M, Sun J, Becker JE, Cheng AC, Yonekura AR, Heath JK, Turley SJ, *Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes T cell tolerance to intestinal self*. Nat Immunol, 2007. **8**: p. 181-90.
95. Cohen JN, Guidi CJ, Tewalt EF, Qiao H, Rouhani SJ, Ruddell A, Farr AG, Tung KS, Engelhard VH., *Lymph node-resident lymphatic endothelial cells mediate peripheral tolerance via Aire-independent direct antigen presentation*. J Exp Med, 2010. **207**: p. 681-8.

96. Devoss JJ, Shum AK, Johannes KP, Lu W, Krawisz AK, Wang P, Yang T, Leclair NP, Austin C, Strauss EC, Anderson MS, *Effector mechanisms of the autoimmune syndrome in the murine model of autoimmune polyglandular syndrome type 1*. J Immunol, 2008. **181**: p. 4072-79.
97. Gavanescu I, Benoist C, Mathis D, *B cells are required for Aire-deficient mice to develop multi-organ autoinflammation: a therapeutic approach for APECED patients*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**: p. 13009-14.
98. Hasan M, Polic B, Bralic M, Jonjic S, Rajewsky K, *Incomplete block of B cell development and immunoglobulin production in mice carrying the muMT mutation on the BALB/c background*. Eur J Immunol, 2002 **32**: p. 3463-71.
99. Mi QS, Deng ZB, Joshi SK, Wang ZZ, Zhou L, Eckenrode S, Joshi R, Ly D, Yi B, Delovitch TL, She JX, *The autoimmune regulator (Aire) controls iNKT cell development and maturation*. Nat Med, 2006. **12**: p. 624-6.
100. Mi QS, Deng ZB, Joshi SK, Wang ZZ, Zhou L, Eckenrode S, Joshi R, Ly D, Yi B, Delovitch TL, She JX, *Retraction*. Nat Med, 2006 **12**: p. 624-6.
101. Lindh E, Rosmaraki E, Berg L, Brauner H, Karlsson MC, Peltonen L, Höglund P, Winqvist O, *AIRE deficiency leads to impaired iNKT cell development*. J Autoimmun, 2010. **34**: p. 66-72.
102. Ng WF, Tudhope SJ, von Delwig A, Lilic D, *Invariant natural killer T (iNKT) cell deficiency in chronic mucocutaneous candidiasis - A consequence or a cause?* Immunol Lett, 2010. **Oct 12**. [Epub ahead of print].
103. Malanchère E, Marcos MA, Nobrega A, Coutinho A., *Studies on the T cell dependence of natural IgM and IgG antibody repertoires in adult mice*. Eur J Immunol., 1995. **25**: p. 1358-65.
104. Merbl Y, Zucker-Toledano M, Quintana FJ, Cohen IR, *Newborn humans manifest autoantibodies to defined self molecules detected by antigen microarray informatics*. J Clin Invest, 2007. **117**: p. 712-8.
105. Hassler S, Ramsey C, Karlsson MC, Larsson D, Herrmann B, Rozell B, Backheden M, Peltonen L, Kampe O, Winqvist O, *Aire deficient mice develop hematopoietic irregularities and marginal zone B cell lymphoma*. Blood, 2006. **108**: p. 1941-48.
106. Lee-Chang C, Lefranc D, Salleron J, Faveeuw C, Allet C, Vermersch P, Oxombre B, Prin L, *Susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis is associated with altered B-cell subsets distribution and decreased serum BAFF levels*. Immunol Lett, 2010. **Sous presse**.
107. Coutinho A, Kazatchkine M, Avrameas S., *Natural autoantibodies*. Curr Opin Immunol, 1995. **7**: p. 812-8.
108. Lacroix-Desmazes S, Mouthon L, Kaveri SV, Kazatchkine MD, Weksler ME. *Stability of natural self-reactive antibody repertoires during aging*. Stability of natural self-reactive antibody repertoires during aging. J Clin Immunol, 1999. **19**: p. 26-34.
109. Madi A, Hecht I, Bransburg-Zabary S, Merbl Y, Pick A, Zucker-Toledano M, Quintana FJ, Tauber AI, Cohen IR, Ben-Jacob E,

- Organization of the autoantibody repertoire in healthy newborns and adults revealed by system level informatics of antigen microarray data.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**: p. 14484-9.
110. Lacroix-Desmazes S, Mouthon L, Coutinho A, Kazatchkine MD, *Analysis of the natural human IgG antibody repertoire: life-long stability of reactivities towards self antigens contrasts with age-dependent diversification of reactivities against bacterial antigens.* Eur J Immunol, 1995. **25**: p. 2598-604.
 111. Plotz PH, *The autoantibody repertoire: searching for order.* Nat Rev Immunol., 2003 **3**: p. 73-8.
 112. Song YH, Connor EL, Muir A, She JX, Zorovich B, Derovanesian D, Maclaren N, *Autoantibody epitope mapping of the 21-hydroxylase antigen in autoimmune Addison's disease.* J Clin Endocrinol Metab, 1994. **78**: p. 1108-12.
 113. Uiho R, Aavik E, Peterson P, Perheentupa J, Aranko S, Pelkonen R, Krohn KJ, *Autoantibodies to cytochrome P450 enzymes P450_{scc}, P450_{c17}, and P450_{c21} in autoimmune polyglandular disease types I and II and in isolated Addison's disease* J Clin Endocrinol Metab, 1994. **78**: p. 323-28.
 114. Krohn K, Uiho R, Aavik E, Peterson P, Savilahti K, *Identification by molecular cloning of an autoantigen associated with Addison's disease as steroid 17 alpha-hydroxylase.* Lancet, 1992. **339**: p. 770-73.
 115. Winqvist O, Gustafsson J, Rorsman F, Karlsson FA, Kampe O, *Two different cytochrome P450 enzymes are the adrenal antigens in autoimmune polyendocrine syndrome type I and Addison's disease.* J Clin Invest, 1993. **92**: p. 2377-85.
 116. Winqvist O, Gebre-Medhin G, Gustafsson J, Ritzen EM, Lundkvist O, Karlsson FA, Kampe O, *Identification of the main gonadal autoantigens in patients with adrenal insufficiency and associated ovarian failure.* J Clin Endocrinol Metab, 1995. **80**: p. 1717-1723
 117. Michels AW, Gottlieb PA, *Autoimmune polyglandular syndromes.* Nat Rev Endocrinol, 2010. **6**: p. 270-7.
 118. Mathur EJ, Grimshaw CE, *Immunoquantitation of aldose reductase in human tissues.* Anal Biochem, 1989. **176**: p. 66-71.
 119. Lambert-Langlais S, Pointud J, Lefrançois-Martinez AM, Volat F, Manin M, Coudoré F, Val P, Sahut-Barnola I, Ragazzon B, Louiset E, Delarue C, Lefebvre H, Urade Y, Martinez A, *Aldo keto reductase 1B7 and prostaglandin F2alpha are regulators of adrenal endocrine functions.* PLoS One, 2009. **4**: p. e7309.
 120. Gavanescu I, Kessler B, Ploegh H, Benoist C, Mathis D, *Loss of Aire-dependent thymic expression of a peripheral tissue antigen renders it a target of autoimmunity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**: p. 4583-87.
 121. Devoss J, Hou Y, Johannes K, Lu W, Liou GI, Rinn J, Chang H, Caspi R, Fong L, Anderson MS, *Spontaneous autoimmunity prevented by thymic expression of a single self-antigen.* J Exp Med, 2006. **203**: p. 2727-35.
 122. Ekwall O, Hedstrand H, Grimelius L, Haavik J, Perheentupa J, Gustafsson J, Husebye E, Kampe O, Rorsman F, *Identification of*

- tryptophan hydroxylase as an intestinal autoantigen*. Lancet, 1998. **352**: p. 279-83.
123. Scire G, Magliocca FM, Cianfarani S, Scalamandre A, Petrozza V, Bonamico M, *Autoimmune polyendocrine candidiasis syndrome with associated chronic diarrhea caused by intestinal infection and pancreas insufficiency*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1991. **13**: p. 224-7.
 124. Ward L, Paquette J, Seidman E, Huot C, Alvarez F, Crock P, Delvin E, Kampe O, Deal C, *Severe autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy in an adolescent girl with a novel AIRE mutation: response to immunosuppressive therapy*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**: p. 844-52.
 125. Hogenauer C, Meyer RL, Netto GJ, Bell D, Little KH, Ferries L, Santa Ana CA, Porter JL, Fordtran JS, *Malabsorption due to cholecystokinin deficiency in a patient with autoimmune polyglandular syndrome type I*. N Engl J Med, 2001. **344**: p. 270-74.
 126. Okamoto H, *The Reg gene family and Reg proteins: with special attention to the regeneration of pancreatic beta-cells*. J Hepatobiliary Pancreat Surg., 1999. **6**: p. 254-62.
 127. Zhou L, Zhang R, Wang L, Shen S, Okamoto H, Sugawara A, Xia L, Wang X, Noguchi N, Yoshikawa T, Uruno A, Yao W, Yuan Y, *Upregulation of REG Ialpha accelerates tumor progression in pancreatic cancer with diabetes*. Int J Cancer, 2010. **127**: p. 1795-803.
 128. Astrosini C, Roeffzaad C, Dai YY, Dieckgraefe BK, Jöns T, Kemmner W, *REGIA expression is a prognostic marker in colorectal cancer and associated with peritoneal carcinomatosis*. Int J Cancer, 2008. **123**: p. 409-13.
 129. Hayashi K, Motoyama S, Sugiyama T, Izumi J, Anbai A, Nanjo H, Watanabe H, Maruyama K, Minamiya Y, Koyota S, Koizumi Y, Takasawa S, Murata K, Ogawa J, *REG Ialpha is a reliable marker of chemoradiosensitivity in squamous cell esophageal cancer patients*. Ann Surg Oncol, 2008. **15**: p. 1224-31.
 130. Perniola R, Lobreglio G, Rosatelli MC, Pitotti E, Accogli E, De Rinaldis C, *Immunophenotypic characterisation of peripheral blood lymphocytes in autoimmune polyglandular syndrome type I: clinical study and review of the literature*. J Pediatr Endocrinol Metab, 2005. **18**: p. 155-164.
 131. Nagafuchi S, Katsuta H, Koyanagi-Katsuta R, Yamasaki S, Inoue Y, Shimoda K, Ikeda Y, Shindo M, Yoshida E, Matsuo T, Ohno Y, Kogawa K, Anzai K, Kurisaki H, Kudoh J, Harada M, Shimizu N, *Autoimmune Regulator (AIRE) Gene Is Expressed in Human Activated CD4(+) T-Cells and Regulated by Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway*. Microbiol Immunol, 2006. **50**: p. 979-87.
 132. Dhodapkar MV, Lust JA, Phylly RL, *T-cell large granular lymphocytic leukemia and pure red cell aplasia in a patient with type I autoimmune polyendocrinopathy: response to immunosuppressive therapy*. Mayo Clin Proc, 1994 **69**: p. 1085-1088.
 133. Zhang L, Barker JM, Babu S, Su M, Stenerson M, Cheng M, Shum A, Zamir E, Badolato R, Law A, Eisenbarth GS, Anderson MS, *A robust immunoassay for anti-interferon autoantibodies that is highly specific*

- for patients with autoimmune polyglandular syndrome type 1.* Clin Immunol, 2007. **125**: p. 131-7.
134. Karasawa R, Ozaki S, Nishioka K, Kato T, *Autoantibodies to peroxiredoxin I and IV in patients with systemic autoimmune diseases.* Microbiol Immunol, 2005. **49**: p. 57-65.
 135. Karasawa R, Kurokawa MS, Yudoh K, Masuko K, Ozaki S, Kato T, *Peroxiredoxin 2 is a novel autoantigen for anti-endothelial cell antibodies in systemic vasculitis.* Clin Exp Immunol, 2010. **Jul 14**. [Epub ahead of print].
 136. Iwata Y, Ogawa F, Komura K, Muroi E, Hara T, Shimizu K, Hasegawa M, Fujimoto M, Tomita Y, Sato S, *Autoantibody against peroxiredoxin I, an antioxidant enzyme, in patients with systemic sclerosis: possible association with oxidative stress.* Rheumatology (Oxford), 2007. **46**: p. 790-795.
 137. Dhillon VB, Mac Callum S, Norton P, Twomey BM, Erkeller-Yuksel F, Lydyard P, Isenberg DA, Latchman DS, *Differential heat shock protein overexpression and its clinical relevance in systemic lupus erythematosus.* Ann Rheum Dis, 1993 **52**: p. 436-42.
 138. Xiao C, Chen S, Yuan M, Ding F, Yang D, Wang R, Li J, Tanguay RM, Wu T, *Expression of the 60 kDa and 71 kDa heat shock proteins and presence of antibodies against the 71 kDa heat shock protein in pediatric patients with immune thrombocytopenic purpura.* BMC Blood Disord, 2004. **4**: p.1.
 139. Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones E, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, Koo GC, Calderwood SK, *HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependent pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine.* Nat Med, 2000. **6**: p. 435-42.
 140. Millar DG, Garza KM, Odermatt B, Elford AR, Ono N, Li Z, Ohashi PS, *Hsp70 promotes antigen-presenting cell function and converts T-cell tolerance to autoimmunity in vivo.* Nat Med, 2003 **9**: p. 1469-76.
 141. Capolunghi F, Cascioli S, Giorda E, Rosado MM, Plebani A, Auriti C, Seganti G, Zuntini R, Ferrari S, Cagliuso M, Quinti I, Carsetti R, *CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies.* J Immunol, 2008. **180**: p. 800-8.
 142. Glocker EO, Hennigs A, Nabavi M, Schäffer AA, Woellner C, Salzer U, Pfeifer D, Veelken H, Warnatz K, Tahami F, Jamal S, Manguiat A, Rezaei N, Amirzargar AA, Plebani A, Hanneschläger N, Gross O, Ruland J, Grimbacher B, *A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections.* N Engl J Med, 2009. **361**: p. 1727-35.
 143. Glocker E, Grimbacher B, *Chronic mucocutaneous candidiasis and congenital susceptibility to Candida.* Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2010. **10**: p. 542-50.
 144. Ruland J, *CARD9 signaling in the innate immune response.* Ann N Y Acad Sci, 2008. **1143**: p. 35-44.
 145. Gross O, Gewies A, Finger K, Schäfer M, Sparwasser T, Peschel C, Förster I, Ruland J, *Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity.* Nature, 2006. **442**: p. 651-6.

146. Robinson MJ, Osorio F, Rosas M, Freitas RP, Schweighoffer E, Gross O, Verbeek JS, Ruland J, Tybulewicz V, Brown GD, Moita LF, Taylor PR, Reis e Sousa C, *Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection.* J Exp Med, 2009. **206**: p. 2037-51.
147. LeibundGut-Landmann S, Gross O, Robinson MJ, Osorio F, Slack EC, Tsoni SV, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Brown GD, Ruland J, Reis e Sousa C, *Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17.* Nat Immunol, 2007. **8**: p. 630-8.
148. Hong M, Ryan KR, Arkwright PD, Gennery AR, Costigan C, Dominguez M, Denning DW, McConnell V, Cant AJ, Abinun M, Spickett GP, Swan DC, Gillespie CS, Young DA, Lilic D, *Pattern recognition receptor expression is not impaired in patients with chronic mucocutaneous candidiasis with or without autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy.* Clin Exp Immunol, 2009. **156**: p. 40-51.
149. Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM., *Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells.* J Immunol, 2001. **166**: p. 249-55.
150. Ryan KR, Hong M, Arkwright PD, Gennery AR, Costigan C, Dominguez M, Denning D, McConnell V, Cant AJ, Abinun M, Spickett GP, Lilic D, *Impaired dendritic cell maturation and cytokine production in patients with chronic mucocutaneous candidiasis with or without APECED.* Clin Exp Immunol, 2008. **154**: p. 406-14.
151. Lindh E, Lind SM, Lindmark E, Hässler S, perheentupa J, Peltonen L, Winquist O, Karlsson MCI, *AIRE regulates T-cell-independent B-cell responses through BAFF.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**: p. 18466-71.
152. Wardemann H, Nussensweig MC, *B-cell self-tolerance in humans.* Adv Immunol, 2007. **95**: p. 83-110.
153. Yurasov S, Wardemann H, Hammersen J, Tsuiji M, Meffre E, Pascual V, Nussenzweig MC, *Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus.* J Exp Med, 2005. **201**: p. 703-11.
154. Tsuiji M, Yurasov S, Velinzon K, Thomas S, Nussenzweig MC, Wardemann H, *A checkpoint for autoreactivity in human IgM+ memory B cell development.* J Exp Med, 2006. **20**: p. 393-400.

Tableau 1 : Les principales atteintes et leur fréquence relative dans les principales séries cliniques (H=homme, F= femme, ND=non déterminé)

	Série finlandaise 1990 [19] 68 patients	Série juive iranienne 1992 [12] 23 patients	Série italienne 1998 [20] 41 patients	Série norvégienne 2007 [13] 36 patients
Endocrinopathies				
➤ Hypoparathyroïdie	79%	96%	93%	82%
➤ Insuffisance surrénalienne	72%	22%	73%	68%
➤ Hypogonadisme périphérique	60% F 14% H	3 F 3 H	60% F 0 H	53% F 0 H
➤ Diabète de type 1	12%	4%	2,5%	9%
➤ Hypothyroïdie	3%	3%	10%	9%
➤ Hypophysite	ND	ND	7%	0
Autres maladies auto-immunes				
➤ Anémie de Biermer	13%	9%	15%	0
➤ Malabsorption	18%	ND	15%	9%
➤ Hépatite	12%	ND	20%	3%
➤ Alopécie	29%	13%	37%	41%
➤ Vitiligo	13%	ND	12%	20%
Candidose cutanéomuqueuse	100%	17%	83%	79%
Atteintes ectodermiques				
➤ Kératopathie	35%	ND	12%	9%
➤ Hypoplasie de l'émail dentaire	77%	ND	ND	38%
➤ Dystrophie unguéale	52%	ND	7%	15%

1- Candidose cutanéomuqueuse

C'est la manifestation clinique la plus fréquente. Cette candidose survient le plus souvent avant 5 ans, révélant fréquemment la maladie [12, 18-22]. Bien que différentes hypothèses physiopathologiques développées ultérieurement aient été proposées, on ignore encore aujourd'hui les raisons précises pour lesquelles ces sujets présentent une susceptibilité particulière aux infections candidosiques. Les patients peuvent également être sujets à d'autres pathologies infectieuses sévères.

2- Manifestations endocriniennes auto-immunes

L'hypoparathyroïdie s'avère l'atteinte auto-immune la plus fréquente. C'est généralement la première manifestation endocrinienne, le plus souvent présente avant 10 ans [12, 18-22].

L'insuffisance surrénalienne est la seconde atteinte auto-immune par ordre de fréquence, survenant avant l'âge de 15 ans [12, 18-22].

L'hypogonadisme périphérique se révèle plus fréquemment chez la femme que l'homme, et survient le plus souvent durant la seconde décennie [12, 18-22].

Le diabète de type 1 est moins fréquent [12, 18-22].

La thyroïdite auto-immune responsable d'hypothyroïdie est également plus rare [12, 18-22]. La maladie de Basedow est exceptionnelle dans ce contexte.

L'hypophysite lymphocytaire, également rare, est en général diagnostiquée chez l'enfant devant un retard de croissance [12, 18-22].

3- Manifestations auto-immunes non endocriniennes

Les gastrites auto-immunes surviennent chez moins de 15% des patients atteints de PEA1 et peuvent se compliquer d'anémie de Biermer [12, 18-22].

La malabsorption, fréquente, apparaît précocement [12, 18-22]. Plusieurs étiologies ont été incriminées ; destruction auto-immune des cellules entérochromaffines à différents étages du tractus gastro-intestinal, atteinte infectieuse intestinale (*C. Albicans*, *G. Lamblia* ou *C.*

difficile), insuffisance pancréatique exocrine d'origine auto-immune, maladie coeliaque, lymphangiectasies intestinales ou fibrose kystique du pancréas [20].

L'hépatite auto-immune est de fréquence et de sévérité variable, survenant précocement [12, 18-22].

Le vitiligo, retrouvé dans moins d'1/4 des cas, peut apparaître très précocement, précédant les éléments diagnostiques classiques [12, 18-22]. Il est parfois universel.

L'alopecie demeure une composante fréquente du syndrome APECED, survenant précocement [12, 18-22]. Il s'agit d'alopecie en plaques, décalvante voire universelle.

La kérato-conjonctivite constitue une atteinte fréquente, apparaissant le plus souvent avant 4 ans [12, 18-22].

L'hypoplasie de l'émail dentaire et la **dystrophie unguéale** sont inconstamment rapportées, et débutent généralement durant la première décennie de la vie [19, 22]. Un mécanisme auto-immun a été évoqué [20], bien que ces sites ne soient pas facilement accessibles à une atteinte auto-immune. Tout récemment, une équipe a montré l'expression très précoce de Aire chez l'embryon murin, avant la gastrulation, dès le stade blastocyste; l'absence très précoce de Aire serait une explication potentielle à cette atteinte ectodermique [23].

4- Manifestations cliniques plus rares

D'autres pathologies, associés ou non à des marqueurs d'auto-réactivité spécifique, ont été décrites au cours de la PEA1 [12, 18-22]: bronchiolite oblitérante, néphrite tubulo-interstitielle, hypertension artérielle pulmonaire primitive, myocardite lymphocytaire, atrophie splénique, syndrome de Gougerot-Sjögren, sclérodermie, polyarthrite rhumatoïde, dysplasie métaphysaire réversible, atrophie musculaire progressive, anémie hémolytique auto-immune, insuffisance primitive des cellules de Sertoli, insuffisance testiculaire exocrine, pseudo-hyperminéralo-corticisme,...

Des pathologies tumorales sont également possibles ; carcinomes épidermoïdes de la sphère buccale ou digestive haute se développant sur un terrain de candidoses muqueuses chroniques négligées [18], leucémies à grands lymphocytes granuleux [24], ...

La multiplicité de ces pathologies associées laisse penser qu'il existe une profonde altération de l'homéostasie du système immunitaire avec de graves conséquences sur les processus de tolérance mais aussi sur les phénomènes d'immuno-surveillance.

C-Diagnostics différentiels

La PEA1 est à distinguer des autres polyendocrinopathies auto-immunes : celles-ci demeurent beaucoup plus fréquentes, progressivement constituées à l'âge adulte, polygéniques, et liées à l'haplotype HLA. Elles ont été initialement démembrées en type 2 (atteinte surrénale et thyroïdienne), type 3 (atteinte thyroïdienne et autre atteinte auto-immune excluant la surrénale), type 4 (pathologies auto-immunes différentes de celles précédemment spécifiées) [25, 26]. Ces classifications n'ont plus, à ce jour, de justification physiopathologique, et sont actuellement regroupées sous le terme générique de **polyendocrinopathies auto-immunes de type 2** ou PEA2 [27].

Le **syndrome IPEX** (Immune dysrégulation Polyendocrinopathy, Enteropathy, X linked syndrome), plus exceptionnel encore, constitue une autre pathologie auto-immune à transmission monogénique liée à l'X. Il se caractérise par la survenue très précoce d'un diabète de type 1, d'une entéropathie, d'un eczéma, d'une hypothyroïdie et d'autres manifestations auto-immunes [28]. Il est lié aux mutations du gène *FOXP3*, (forkhead box P3) ; la protéine FOXP3 est en effet un facteur de transcription essentiel au développement et au fonctionnement des cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺, impliquées dans l'homéostasie immune et la prévention de l'auto-immunité pathologique.

Enfin, de manière intéressante, une association de pathologies auto-immunes similaires au syndrome APECED (hypoparathyroïdie, insuffisance surrénalienne) vient d'être décrite chez un patient atteint de thymome. Alors que celui-ci n'était pas porteur de mutations du gène *AIRE*, il a été noté l'absence d'expression de AIRE au niveau de la tumeur [29]. Plus fréquemment, des myasthénies d'origine auto-immune sont décrites chez ces patients. De plus, les AC anti-interféron de type 1 et anti-IL-17F et anti-IL-22 y sont retrouvés, comme dans la PEA1 [30, 31]. Un défaut de tolérance centrale lié à l'absence de AIRE est évoqué chez les patients atteints de thymomes [32].

D- Marqueurs biologiques d'autoréactivité humorale

De nombreux antigènes majoritairement spécifiques d'organe sont la cible d'auto-anticorps (AC) détectés dans le sérum de ces patients (tableau 2). Certains AC sont identiques à ceux retrouvés dans d'autres maladies auto-immunes, d'autres sont spécifiques de la PEA1.

1-Antigènes tissus-spécifiques

-Atteinte parathyroïdienne : les AC anti-parathyroïde détectés en IFI sont habituellement absents chez les patients APECED [20], alors que les AC anti-récepteur sensible au calcium sont retrouvés de manière inconstante selon la technique utilisée [18, 33, 34]. Des anticorps anti- NALP5 (NACHT leucine-rich-repeat protein 5) ont été observés chez 49 % des patients atteints d'hypoparathyroïdie au cours de la PEA1 mais sont absents dans les autres causes d'hypoparathyroïdie [35].

-Atteinte surrénalienne et gonadique : les anticorps anti-surrénale identifiés en immunofluorescence indirecte (IFI) sont très souvent positifs au moment du diagnostic (plus de 90 % des cas). Les AC anti-cellules stéroïdiennes détectés en IFI sont considérés comme des marqueurs sérologiques de l'hypogonadisme périphérique. Trois auto-antigènes ont été identifiés dans ces atteintes, correspondant au cytochrome P450 impliqués dans la synthèse des hormones stéroïdiennes: les AC anti-21 hydroxylase (associés aux anticorps anti-surrénale et à l'atteinte surrénalienne), les anticorps anti-Side Chain Cleavage (associés aux AC anti-cellules stéroïdiennes, aux atteintes surrénalienne et gonadique), et les AC anti-17 α hydroxylase (dont l'association avec l'atteinte gonadique est controversée) [20, 36]. Ils sont présents chez respectivement 76, 61 et 52 % des patients [37, 38]

-Atteinte pancréatique endocrine: les AC anti-Glutamic Acid Decarboxylase 65 (GAD 65) et les AC anti-îlots de Langerhans (ICA) sont très souvent retrouvés chez les patients APECED, mais sont peu spécifiques de diabète de type 1 [20]. Les AC anti-Tyrosine Phosphatase-like Protein (IA-2) et anti-insuline, semblent être moins sensibles mais beaucoup plus spécifiques [36]. On retrouve également des AC anti-Aromatic L-Amino acid Décarboxylase (AADC) [38].

-Atteinte thyroïdienne : les AC anti-thyropéroxydase et les AC anti-thyroglobuline sont positifs dans 27 à 28 % des cas, mais ils sont peu spécifiques [20, 38].

-Atteinte hypophysaire : les techniques d'IFI se sont révélées peu contributives. Des AC anti-TDRD6 (Tudor domain containing protein 6, protéine exprimée dans l'hypophyse de fonction inconnue) ont été détectés chez 49 % des patients atteints d'APECED, et absente chez les témoins. Mais elle n'est curieusement pas corrélée avec l'atteinte hypophysaire [39]. Des AC anti-enolase hypophysaire ont également été détectés, mais leur présence n'est là encore pas corrélée à l'atteinte clinique correspondante [40].

-Malabsorption : les cellules entéro-chromaffines du tractus digestif sont des cibles d'auto-réactivité privilégiées spécifiques dans la PEA de type 1. On peut mettre en évidence des AC anti-tryptophane hydroxylase chez 45 à 50 % des patients atteints [36, 41], des anticorps anti-histidine décarboxylase chez 37 % des patients [42] et de manière plus inattendue des anticorps anti-GAD65 (exprimée aussi dans les plexus nerveux intestinaux) [36].

-Atteinte gastrique : les AC anti-cellules pariétales gastriques en IFI sont les habituels marqueurs d'anémie de Biermer, ainsi que les AC anti-facteur intrinsèque [38].

-Atteinte hépatique : les AC anti-LKM1 (Liver Kidney Microsomes) sont présents chez 50 à 75 % des patients souffrant d'hépatite auto-immune au cours de la PEA 1 [20, 38]; les AC anti-cytochrome P450 1A2 (CYP1A2), les AADC mais également plus étonnamment les AC anti-Tryptophane Hydroxylase (TPH), sont très significativement associés à l'atteinte hépatique [36, 43].

-Atteinte cutanée : les AC anti-follicules pileux et les AC anti-tyrosine hydroxylase (TH) sont associés à l'alopecie [44, 45]. Les AC anti-AADC mais aussi les anticorps anti-SOX 10 sont quant à eux associés à la présence d'un vitiligo [36, 46].

-Atteinte bronchique : la présence d'AC dirigés contre l'épithélium respiratoire des bronchioles a été caractérisée ; les AC anti-KCNRG (potassium channel regulator) sont spécifiques de l'atteinte bronchique [47].

2-Autres cibles antigéniques

Par ailleurs, il est intéressant de noter que des auto-anticorps non tissus-spécifiques ont été identifiés chez ces patients ; **des AC anti-interféron** de type IgG ont été identifiés dans le sérum de patients atteints de PEA1 [13, 48]. Ils possèdent une action neutralisante et sont dirigés principalement contre les IFN- α , mais également contre les INF- ω . Dans cette étude, les

2 types d'AC sont présents chez tous les patients, ce qui leur confère une excellente sensibilité (100%). Leurs titres sont très élevés, et leur survenue peut précéder les premières manifestations cliniques auto-immunes, voire la candidose. S'ils sont absents chez les témoins sains ou hétérozygotes, ils peuvent être retrouvés chez les patients atteints de thymome, mais à des taux plus faibles. Si leur rôle exact reste à définir [48], ils pourraient être considérés comme un nouveau marqueur diagnostique de la pathologie [30].

Plus récemment des AC dirigés contre des cytokines de type Th17 ont été mis en évidence dans le syndrome APECED, simultanément par deux équipes. En effet, les lymphocytes T de type Th17, producteurs de cytokines pro-inflammatoires telle que l'IL17-A, sont impliqués dans la première ligne de défense contre les infections fongiques épithéliales, particulièrement au niveau des muqueuses [49]. Dans ce type d'infection, les lymphocytes de type Th17 produisent des cytokines (IL-17 et IL-22), permettant ainsi le recrutement et l'activation des polynucléaires neutrophiles qui élimineront l'infection [50]. Les réponses de type IL-17F et IL-22 au *Candida* sont diminuées chez les patients APECED atteints de candidose, alors même que ces patients expriment des AC neutralisants vis à vis de ces 2 cytokines [31, 51]. Ainsi, les patients atteints de PEA1 ont des titres élevés d'auto-AC neutralisants contre l'IL-17A, l'IL-17F et l'IL-22, notamment ceux atteints de candidose. Ces AC sont retrouvés dans les thymomes, mais pas dans les autres pathologies auto-immunes étudiées. Ils pourraient être ainsi liés à la survenue de candidoses chez ces patients.

Composant de la pathologie	Tissu touché	Cible antigénique	Rôle de l'antigène
Insuffisance surrénalienne	Cortico-surrénale	21 hydroxylase 17 α hydroxylase enzyme de clivage (SCC)	} Biosynthèse des hormones stéroïdiennes
Hypoparathyroïdie	Parathyroïde	Récepteur sensible au calcium NALP5	Homéostasie calcique ?
Hypogonadisme	Ovaire et testicule	17 α hydroxylase enzyme de clivage (SCC)	} Biosynthèse des hormones stéroïdiennes
Diabète de type 1	Pancréas endocrine	Glutamic Acid Decarboxylase (GAD65) Insuline Tyrosine phosphatase (IA2)	Biosynthèse du GABA Homéostasie glucidique ?
Hypothyroïdie	Thyroïde	Thyropéroxydase Thyroglobuline	Biosynthèse des hormones thyroïdiennes Précurseur des hormones thyroïdiennes
Hypophysite	Hypophyse	Tudor Domain containing protein 6 (TDRD6)	?
Gastrite atrophique / Biermer	Muqueuse gastrique	Facteur intrinsèque	Absorption de la vitamine B12
Malabsorption	Tractus gastro-intestinal	Glutamic Acid Decarboxylase (GAD65) Histidine décarboxylase Tryptophane hydroxylase	Biosynthèse du GABA Biosynthèse de l'histamine Biosynthèse de la sérotonine (1 ^{ère} étape)
Hépatite auto-immune	Foie	Aromatic L-Amino acid DéCarboxylase (AADC) Cytochrome P450 1A2 Cytochrome P450 2A6 Cytochrome P450 1A1 Cytochrome P450 2B6	Biosynthèse de la dopamine (2 ^{ème} étape) et de la sérotonine (2 ^{ème} étape) } Transport d'électrons et hydroxylation
Vitiligo	Peau	SOX 9 SOX 10 Aromatic L-Amino acid DéCarboxylase (AADC)	} Facteurs de transcription Biosynthèse des catécholamines et indolamines
Alopécie	Follicule pileux	Tyrosine hydroxylase	Biosynthèse de la dopamine (1 ^{ère} étape)
Atteinte bronchiolaire	Bronchiole	KCNRG	Canal potassique

Tableau 2 : principales cibles antigéniques connues pour chaque tissu potentiellement siège d'une atteinte auto-immune dans la PEA1.

II. Bases moléculaires de la PEA1 : gène et protéine AIRE

A- Identification et expression du gène AIRE

Le locus de la PEA1 a été mis en évidence en 1994 par analyse de liaison ; il est situé en 21q22.3 [10]. Le gène *AIRE* (AutoImmune REgulator) a finalement été identifié par clonage positionnel en 1997 [52, 53], il comprend 14 exons (figure 1). Plus d'une soixantaine de mutations ont été identifiées à ce jour.

Ce gène est exprimé principalement au niveau thymique (cellules épithéliales médullaires, mTECs et cellules dendritiques, CD). Cette expression du gène *Aire* a également été identifiée dans la région médullaire et paracorticale des ganglions, dans la rate et dans le foie fœtal et dans des cellules stromales appelées extra-Thymic Aire expressing Cells (eTACs) [52, 54]. Il est également retrouvé dans le sang périphérique, mais exclusivement au niveau des monocytes et des CD différenciées (pour la protéine Aire) [55].

De manière intéressante, Aire serait exprimé très tôt chez l'embryon, avant la différenciation en 3 couches germinales (ectoderme, endoderme, mésoderme) ou gastrulation; cette notion récente pourrait avoir un lien avec l'existence d'une dystrophie ectodermique dans l'APECED. En effet, il n'est pas clairement établi si cette manifestation du syndrome APECED est une entité à part entière ou s'il s'agit simplement d'une atteinte auto-immune des phanères (ongles, émail dentaire...) [23].

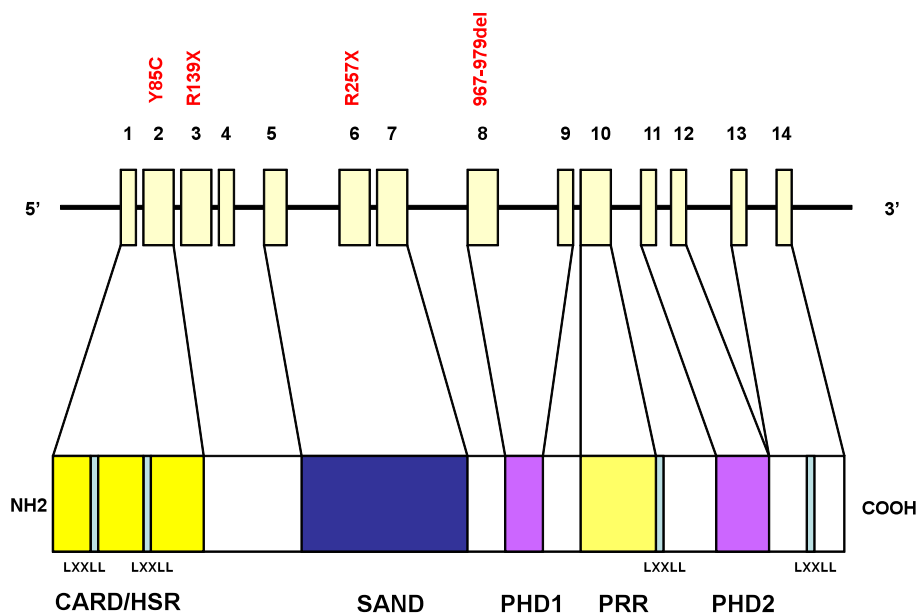


Figure 1: gène *AIRE* et protéine correspondante, avec ses différents domaines fonctionnels. Les mutations du gène *AIRE* les plus fréquentes sont annotées en rouge.

B- La protéine AIRE

1- Structure

Le gène *AIRE* code pour la protéine AIRE 1 de 57,7 kDa, de pHi à 7,32, comportant 545 acides aminés [53]. Cette protéine est composée de nombreux domaines structurels retrouvés dans d'autres facteurs de transcription (figure 1).

On y trouve 2 domaines typiques en doigt de zinc (Plant Homeo Domain = PHD), PHD1 et 2, contenus dans des protéines nucléaires correspondant à des co-activateurs de la transcription ou à des modulateurs de la chromatine. Les 4 motifs LXXLL sont fréquemment retrouvés dans les co-activateurs de la transcription ; il permettrait la liaison protéine-protéine. Le domaine SAND est un domaine de liaison à l'ADN. Il existe également un domaine CARD (caspase recruitment domain), ayant une fonction d'homo ou d'hétéro-dimérisation [56], autrefois identifié comme ayant une forte homologie avec le domaine HSR (Homogeneously Staining Region) de la protéine Sp100 (modulatrice de la transcription). On note enfin une région riche en proline (PRR).

Ces domaines jouent un rôle important dans la fonctionnalité de la protéine, comme en témoigne le fait qu'ils soient le siège de la majorité des mutations du gène *AIRE* (figure 1). La plupart d'entre elles ont pour effet de modifier la distribution cytoplasmique et nucléaire de la protéine AIRE. Les mutations qui touchent le domaine CARD ou HSR, comme la mutation iranienne la plus commune c.254A>G (p.Tyr85Cys), bloquent la domiciliation cytoplasmique de AIRE, vraisemblablement en inhibant l'importation de la protéine vers le noyau [57]. Les mutations affectant le domaine SAND modifient la répartition de la protéine entre le noyau et le cytoplasme, et provoquent une coloration péri-nucléaire excessive *in vitro* [57, 58]. Ceci est en faveur d'un rôle du domaine SAND dans les mécanismes de transport nucléaire. La mutation finlandaise dite « majeure » c.769 C>T (p.Arg257Stop), affecte ce domaine, aboutissant à une protéine tronquée en son extrémité carboxy-terminale ; non seulement la répartition intracellulaire de la protéine est modifiée, mais sa fonction transactivatrice est abolie, avec la perte de ses 2 domaines PHD [57]. Ainsi, cette mutation non sens c.769 C>T (p.Arg257Stop) s'avère très délétère, puisqu'elle résulte en une perte quasi-totale de la fonction protéique, et il a été noté que sa présence chez un patient atteint de syndrome APECED était associée à une fréquence accrue de candidoses [59]. D'autres mutations faux-sens touchant le

domaine CARD/HSR ou le domaine PRR semblent avoir des effets moindres sur la fonctionnalité de la protéine.

2- Localisation et rôle intracellulaire de la protéine AIRE

La protéine AIRE est principalement localisée au niveau nucléaire (aspect ponctué en immunofluorescence) [57], mais également le long du cytosquelette cytoplasmique [54].

De par sa structure et sa localisation, AIRE possède de nombreuses caractéristiques d'un facteur de transcription. De plus, elle se lie au co-facteur de transcription CREB-binding protein (CBP), qui serait impliqué dans la régulation de la transcription [60]. D'autres co-activateurs de la transcription tels pTEF-B (impliqué dans l'élongation transcriptionnelle) [61] et DNA-PK (kinase spécifique de l'ADN) [62] interagissent avec AIRE (Figure 4, p 37) [63]. Ce rôle transcriptionnel de AIRE a été montré *in vitro*. Lors d'expériences de co-transfection, Aire peut activer le promoteur de l'INF β et cette activité transcriptionnelle est médiée par les domaines PHD [58]. Ce domaine se lie à l'histone H3 en fonction de sa méthylation (affinité sélective pour H3K4 non méthylé) [64]. AIRE possède également une activité de transactivation de la transcription [60]. Enfin, AIRE présente une activité E3 ubiquitine ligase, abolie en cas de mutation du domaine PHD1 et pourrait ainsi jouer un rôle dans la voie du protéasome, par facilitation de la polyubiquitination de ses substrats [65].

Toutefois AIRE ne partage pas toutes les caractéristiques d'un facteur de transcription typique. D'une part AIRE influence l'expression d'un nombre considérable de gènes, et il semble difficile qu'elle soit capable de se lier de manière spécifique à un si grand nombre de promoteurs [66]. D'autre part, AIRE régule l'expression de gènes regroupés en « clusters » au niveau du génome [67]. De plus les transcrits sous le contrôle de AIRE sont très dépendants de la cellule concernée ; les profils d'expression génique sous la dépendance de AIRE varient en effet entre les cellules épithéliales médullaires thymiques (medullary Thymic Epithelial Cells ou mTECs), les cellules extra-thymiques exprimant AIRE (ou eTACs), ... [68, 69]. Enfin, il a été montré qu'une mTEC donnée exprime un transcrit ectopique de manière stochastique [70, 71]. L'ensemble de ces paramètres suggère que AIRE n'est pas un facteur de transcription conventionnel, mais que cette protéine régule l'expression de gènes en accentuant ou modifiant des programmes déjà en place dans la cellule [66].

3- Régulation de l'expression de AIRE

Autrement dit, qui régule le régulateur ? Les mécanismes régulant l'expression de AIRE sont encore peu connus. Il a été suggéré que la voie des lymphotoxines (LT, exprimées au niveau des thymocytes) via leur récepteur LT β R (à la surface des mTECs) était responsable de l'expression de AIRE et de ses gènes cibles au niveau des mTECs [72]. Toutefois, des travaux ultérieurs ont montré que la signalisation LT β R intervenait bien dans la différenciation des mTECs, mais pas dans l'expression de AIRE [73], et que son influence serait plus marquée dans les mTECs Aire -/- [74].

Le système RANK/RANK ligand et sa cascade de signalisation TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) et NIK (NF- κ B inducing kinase) sembleraient jouer un rôle plus important dans la génération des mTECs Aire +/+, puisque leurs modèles murins KO respectifs sont à l'origine d'une nette réduction de ces cellules [75, 76]. Là encore, il reste difficile de distinguer l'impact de la signalisation RANK sur la différenciation des mTECs et sur l'activation de AIRE [66].

C- Rôle de AIRE dans la tolérance immune

1- AIRE et tolérance centrale

La protéine AIRE est ainsi principalement exprimée au niveau des mTECs, et présente *in vitro* des caractéristiques de facteur de transcription. Or des transcrits d'ARN codant pour des protéines ectopiques sont retrouvés au niveau de ces mêmes mTECs [77].

L'élaboration simultanée par 2 équipes d'un modèle murin Aire^{-/-} a permis la mise en évidence du rôle central de Aire dans la tolérance du soi. L'homologue murin du gène *AIRE* code pour une protéine de 552 acides aminés, qui présente 71% d'homologie avec la protéine humaine. Les souris Aire^{-/-} présentent une auto-immunité spontanée spécifique d'organe, similaire à celle de la PEA1 [68, 78], mais non identique ; de plus, elles ne développent pas de candidoses. Cette auto-immunité est variable d'une souris Aire^{-/-} à l'autre, influencée par d'autres facteurs génétiques tels que le CMH ou les régions *Idd3* et *Idd5* [79]. Dans ces modèles d'étude, on note une réduction voire une abolition spécifique de transcrits ectopiques le plus souvent tissus-spécifiques au niveau des mTEC. Certains d'entre eux (codant pour le cytochrome P450 1A2, la préproinsuline, la thyroglobuline, ...) codent pour des protéines reconnues par des auto-anticorps dans la PEA1 [68]. D'autres anomalies de la réponse immune ont été observées dans ce contexte. La prolifération clonale lymphocytaire T après immunisation par un antigène exogène tel que HEL (Hen Egg Lysosome) est 3 à 5 fois plus importante que celle des souris Aire^{+/+} [78]. Ces réponses traduisent une altération des processus de régulation contrôlant une réponse immune adaptée. Un remarquable modèle de souris double transgène (croisement de souris exprimant l'antigène HEL dans les cellules β pancréatiques sous la commande du promoteur de l'insuline, avec des souris exprimant un TCR de forte avidité pour le HEL) a permis de mieux appréhender ces mécanismes. Chez cette souris double transgène Aire^{-/-}, il existe une perte de la sélection négative thymique des lymphocytes T spécifiques de HEL qui sont ainsi retrouvés en périphérie [80]. On note ainsi un ciblage de la réponse auto-réactive pathogène vis-à-vis des cellules β des îlots pancréatiques. Aire commande ainsi l'expression de transcrits d'ARN ectopiques et ce de manière dose-dépendante ; la perte d'un seul allèle réduit de manière importante l'expression thymique d'une protéine donnée et favorise la constitution de clones T auto-réactifs en périphérie [81].

Des travaux récents soulignent aussi certaines relations entre les modalités d'expression du gène *Aire* et l'induction de processus apoptotiques. Pour certains auteurs, l'expression de

Aire dans une cellule (notamment les mTECs) entraînerait une mort rapide par apoptose [82]. Les thymocytes pourraient ainsi reconnaître les complexes CMH/ antigènes ectopiques non seulement directement sur les mTECs, mais également indirectement sur les CD ayant phagocyté des corps apoptotiques issus de mTECs (figure 2) [66]. Toutefois, pour d'autres auteurs, cette apoptose des mTECs liée à l'expression de Aire dans ces cellules serait un phénomène indirect et retardé. En effet, les mTECs évolueraient secondairement vers un stade Aire- CD80^{intermediate} ; ainsi l'expression de Aire dans la mTEC ne serait pas constitutive et immuable (à partir du moment où elle y est apparue jusqu'à la mort cellulaire), mais serait « down-régulée » dans les phases de différenciation terminale de la mTEC [23].

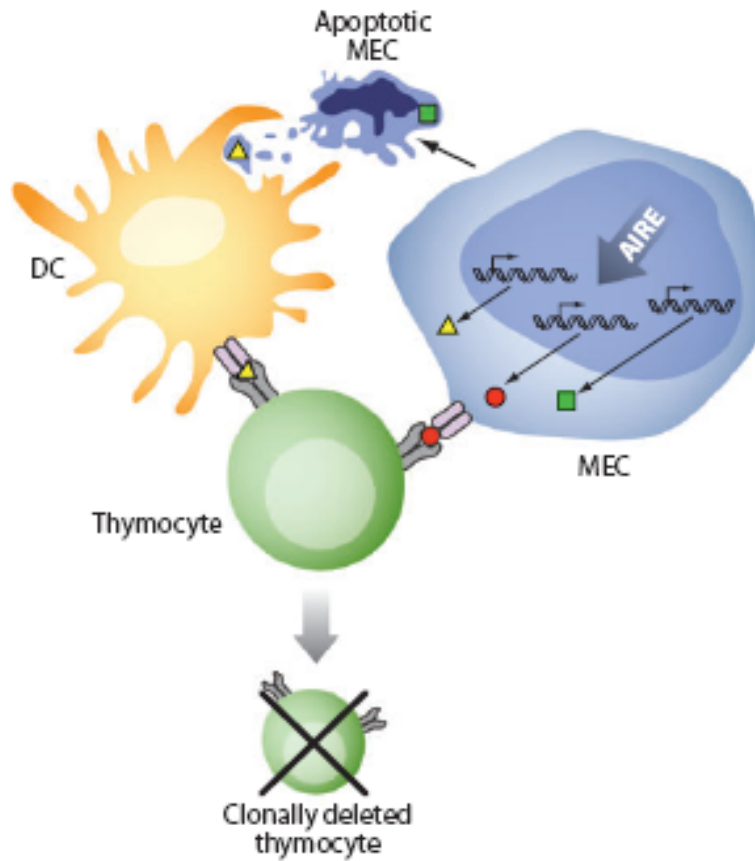


Figure 2 : Aire permet la délétion clonale des thymocytes auto-réactifs, d’après Mathis D et Benoist C [66].

Aire permet l’expression de nombreux antigènes ectopiques par les mTECs, qui les présentent à leur surface, liés au CMH. La mTEC meurt ensuite par apoptose.

Le thymocyte migre à travers la médulla, et si son TCR reconnaît le complexe CMH/Ag avec une forte affinité, il est délété. Les thymocytes peuvent reconnaître le complexe CMH/Ag directement sur la mTEC, ou indirectement sur une DC ayant phagocyté des corps apoptotiques de mTECs.

2- AIRE et différenciation cellulaire des mTECs

Deux modèles de différenciation cellulaire s'opposent pour expliquer cette intrigante capacité des mTECs à exprimer des transcrits ectopiques (figure 3). Farr *et al* défendent un modèle de « restriction progressive » (figure 3B), selon lequel les mTECs d'abord pluripotentes perdraient progressivement cette capacité, pour ne représenter finalement qu'un profil de synthèse de protéines propre à un type cellulaire donné (certaines cellules ayant eu un aspect voisin des thyrocytes, ou de cellules mammaires par exemple) [83, 84]. Les publications plus récentes sont plutôt en faveur d'un modèle de « différenciation terminale » (figure 3A). Dans ce modèle, les mTECs Aire + représenteraient une population cellulaire à un stade avancé de différenciation [82]. Ainsi, une même cellule exprimerait des transcrits ectopiques qui n'auraient pas de lien entre eux, et ne serait donc pas représentative d'un sous-type cellulaire particulier [70]. Enfin, il a été montré qu'un transcrit codant pour un antigène ectopique donné n'est exprimé que par un nombre très réduit de mTECs [70].

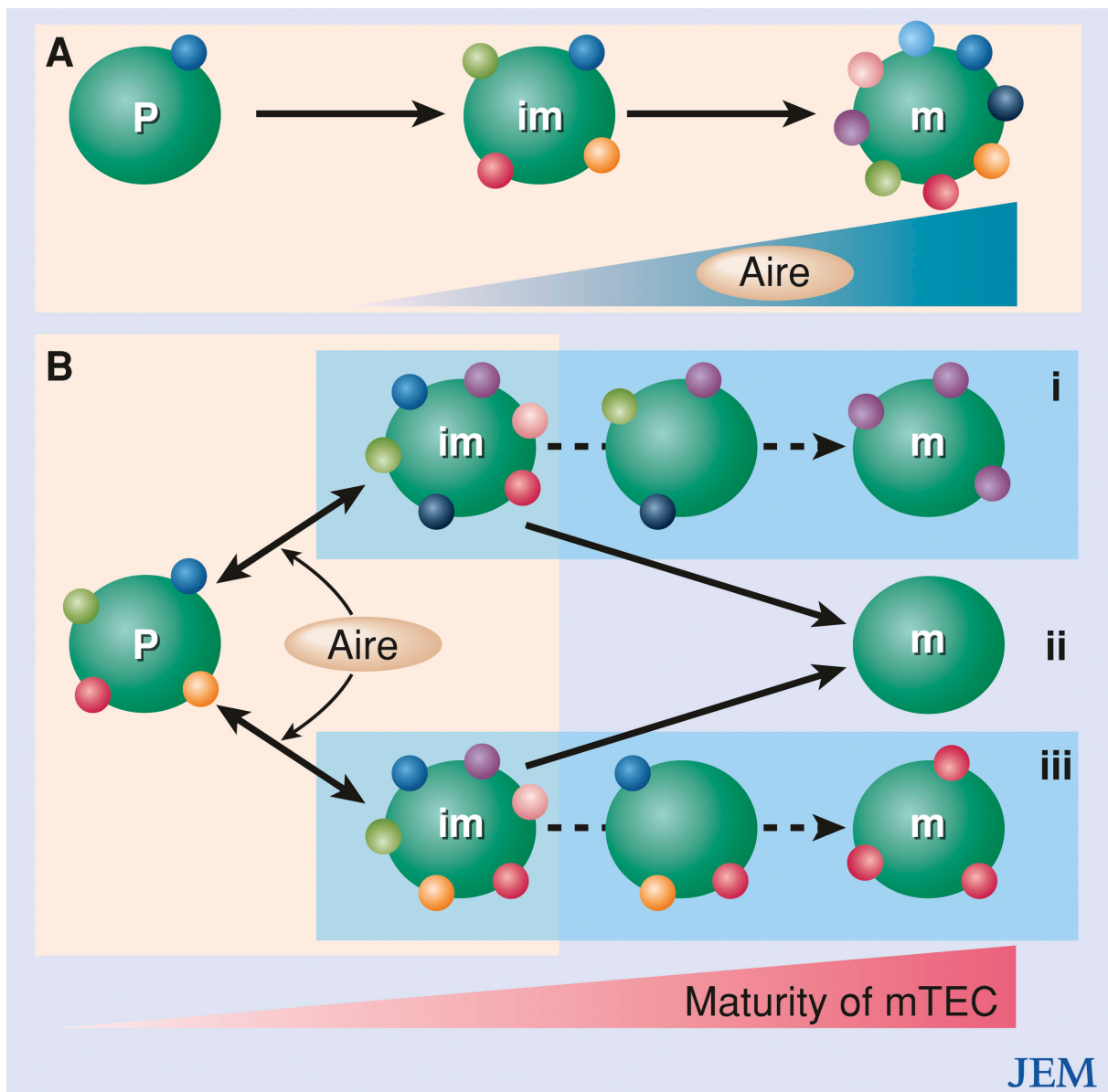


Figure 3 : Mécanismes potentiels permettant l'expression d'antigène ectopiques par les mTECs, d'après Gillard et Farr [84].

A : modèle de différenciation terminale ; la cellule devient progressivement capable d'exprimer Aire et des transcrits d'origines diverses. Ce modèle est actuellement privilégié.

B : modèle de restriction progressive ; les progéniteurs pluripotents se différencient progressivement pour n'exprimer le programme que d'un sous-type cellulaire donné (i ou iii), ou pour perdre tous les régulateurs périphériques et exprimer finalement un programme indéterminé (ii).

3- AIRE et cellules T régulatrices

Rappelons tout d'abord qu'il existe au moins deux grands types de cellules T régulatrices. D'une part, les **cellules T régulatrices adaptatives ou induites** : leur genèse est liée à des interactions, en périphérie, de cellules T naïves avec des CD. Ces dernières peuvent en effet favoriser des réponses tolérogènes en fonction de la qualité des signaux membranaires adressés aux cellules T et/ou de la production de médiateurs (cytokines immuno-régulatrices, ...). Ainsi, les cellules Tr1 (Type 1 T regulatory) et les cellules Th3 ont des propriétés de cellules régulatrices. Elles produisent respectivement de l'interleukine 10 ou du TGF- β . D'autre part, les **cellules T régulatrices naturelles**, constitutivement présentes, et d'origine thymique : il s'agit de cellules CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ qui inhibent *in vitro* et *in vivo* la prolifération et la réponse effectrice des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. Comme décrit plus haut, leur déficit chez l'homme est à l'origine du syndrome IPEX. Ces cellules sont sélectionnées au niveau thymique, tout comme les cellules T auto-réactives naïves dont elles vont contrôler la prolifération en périphérie ; l'équilibre entre ces cellules T régulatrices et T effectrices est maintenu en permanence de manière dynamique, en situation physiologique [85].

Certains auteurs ont remis en cause le fait que les mTECs (qui constituent un nombre restreint de cellules) puissent à elles seules épurer l'ensemble du répertoire T à fort potentiel auto-réactif. Ils ont ainsi évoqué la possibilité d'un rôle de AIRE dans la sélection positive des cellules T régulatrices. Des résultats contradictoires ont été obtenus à partir de différents modèles d'études. D'une part, les données expérimentales dans les modèles murins n'ont pas apporté d'arguments permettant d'évoquer une implication des T régulateurs. A l'inverse, des études cliniques plaident pour des altérations quantitatives et qualitatives des T régulateurs dans la PEA1.

Chez les souris Aire $-/-$, le nombre et la fonction *in vitro* des lymphocytes T régulateurs CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ en périphérie ne semblent pas altérés [86, 87]. Il a été montré, en comparant les modèles murins Aire $+/+$ et Aire $-/-$ double transgènes (TCR et son antigène « cognate », décrit plus haut), que le défaut d'expression de Aire n'avait aucun effet sur le nombre de cellules T régulatrices Foxp3⁺ [80, 81, 87]. De plus, la comparaison des répertoires du TCR de cellules T régulatrices issues de souris Aire $+/+$ et Aire $-/-$ a mis en évidence leur similarité, laissant penser que la sélection positive et le répertoire global des cellules T régulatrices ne sont pas Aire-dépendant [88].

A contrario, une altération qualitative et quantitative des cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺ a été constatée, chez les patients atteints de PEA1 [89]. Ceci constitue une explication potentielle au fait que le phénotype clinique des patients atteints de PEA1 apparaît plus sévère que celui des souris Aire $-/-$. Ainsi, la proportion de ces cellules serait diminuée chez ces patients [90]. De plus, elles présenteraient des altérations qualitatives du répertoire auto-réactif de leur TCR (plus polyclonal que chez les témoins). Il a été noté par ailleurs une diminution significative de l'expression de FOXP3 (ARNm et protéine), et une expression préférentielle de AIRE dans la périphérie des corpuscules de Hassall thymiques [89], impliqués dans la sélection positive des cellules T régulatrices [91]. Toutefois, d'autres auteurs soulignent que cette diminution relative du nombre de cellules T régulatrices dans la PEA1 pourrait être secondaire aux infections chroniques par le *Candida albicans*, par séquestration au niveau des sites inflammatoires [66]. Enfin, il existerait physiologiquement un réservoir de cellules T régulatrices naïves en périphérie, appelé « recent thymic emigrants » ou RETs ; chez les patients atteints de PEA1, ce réservoir de cellules T régulatrices naïves périphériques aurait un turn-over accéléré, entraînant une déplétion de celui-ci au profit de cellules T régulatrices activées [92]. Or ces cellules T régulatrices activées des patients souffrant de PEA1 expriment moins FOXP3 que les sujets sains [89, 92], et l'on sait que le niveau d'expression de FOXP3 serait corrélé à l'activité suppressive de ces cellules. L'ensemble de ces données plaide en faveur d'une altération à la fois qualitative et quantitative des cellules T régulatrices CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ dans la PEA1.

Ainsi, l'homéostasie de ce pool de cellules régulatrices semble perturbée chez le patient atteint de PEA1, alors qu'elle apparaît relativement conservée dans le modèle murin Aire $-/-$. Ce constat pourrait expliquer la différence entre les atteintes relativement modérées du modèle murin, et le phénotype clinique gravissime de certains patients atteints de syndrome APECED. Toutefois, l'interprétation des processus liés à cette dérégulation reste mal définie.

4- AIRE et tolérance périphérique

a. Cellules hématopoïétiques périphériques

Le rôle de la protéine Aire au niveau des monocytes et des CD en périphérie est controversé. Si Aire y est effectivement exprimée, le nombre de transcrits y est dix fois inférieur à celui retrouvé dans les mTECs [68]. Toutefois, certains auteurs ont montré que les CD des souris Aire^{-/-} induisaient une prolifération lymphocytaire T CD4⁺ plus importante que celles des souris Aire^{+/+}, de manière indépendante de l'expression du CMH de classe II. Ce caractère « immunogène » des CD serait liée à la surexpression de molécules co-stimulatrices comme le VCAM-1 à leur surface [93]. De plus, le nombre de cellules présentatrices d'antigène (CPA) sanguines, spléniques et ganglionnaires serait augmenté chez les souris Aire^{-/-} [93]. D'autres auteurs n'ont pu confirmer ces données [87].

b. Cellules stromales périphériques

Plus récemment une population de cellules stromales exprimant également des transcrits ectopiques a attiré l'attention de deux équipes. Lee *et al.* ont rapporté leur présence au niveau ganglionnaire, et leur capacité à exprimer Aire, sans apporter la preuve du lien entre la présence de ces transcrits ectopiques et celle de Aire [94]. Par la suite, Gardner *et al.* ont confirmé l'expression de Aire en périphérie dans ces cellules stromales (appelées eTACs, pour « extra-Thymic Aire expressing Cells » dans leur travail), dans les ganglions et la rate, au niveau des zones de jonction entre cortex et para-cortex. Ces cellules stromales exprimeraient le CMH de classe II, et Aire y jouerait également un rôle transcriptionnel. De nombreux gènes sont ainsi « up-régulés » par Aire dans les eTACs, mais ils s'avèrent différents de ceux dont AIRE module l'expression dans les mTECs (Figure 4). Il s'agit majoritairement de gènes codant pour des protéines le plus souvent ubiquitaires, impliquées dans l'adhésion inter-cellulaire (VCAM-1 ; ICAM-1, ...) ou dans la présentation de l'Ag (LAMP-1, CMH de classe 2, ...), suggérant une interaction avec les lymphocytes T. Les eTACs joueraient ainsi en périphérie un rôle similaire à celui des mTECs au niveau thymique permettant ainsi l'expression d'auto-Ag et la délétion clonale de lymphocytes T auto-réactifs [69]. Ce système constituerait ainsi un réseau secondaire de tolérance en périphérie. Aire ne semble toutefois pas la seule protéine impliquée dans ce réseau de tolérance périphérique. En effet, il a été récemment montré que l'expression d'autres antigènes ectopiques dans d'autres cellules comme les-cellules endothéliales des ganglions semble Aire-indépendante [95].

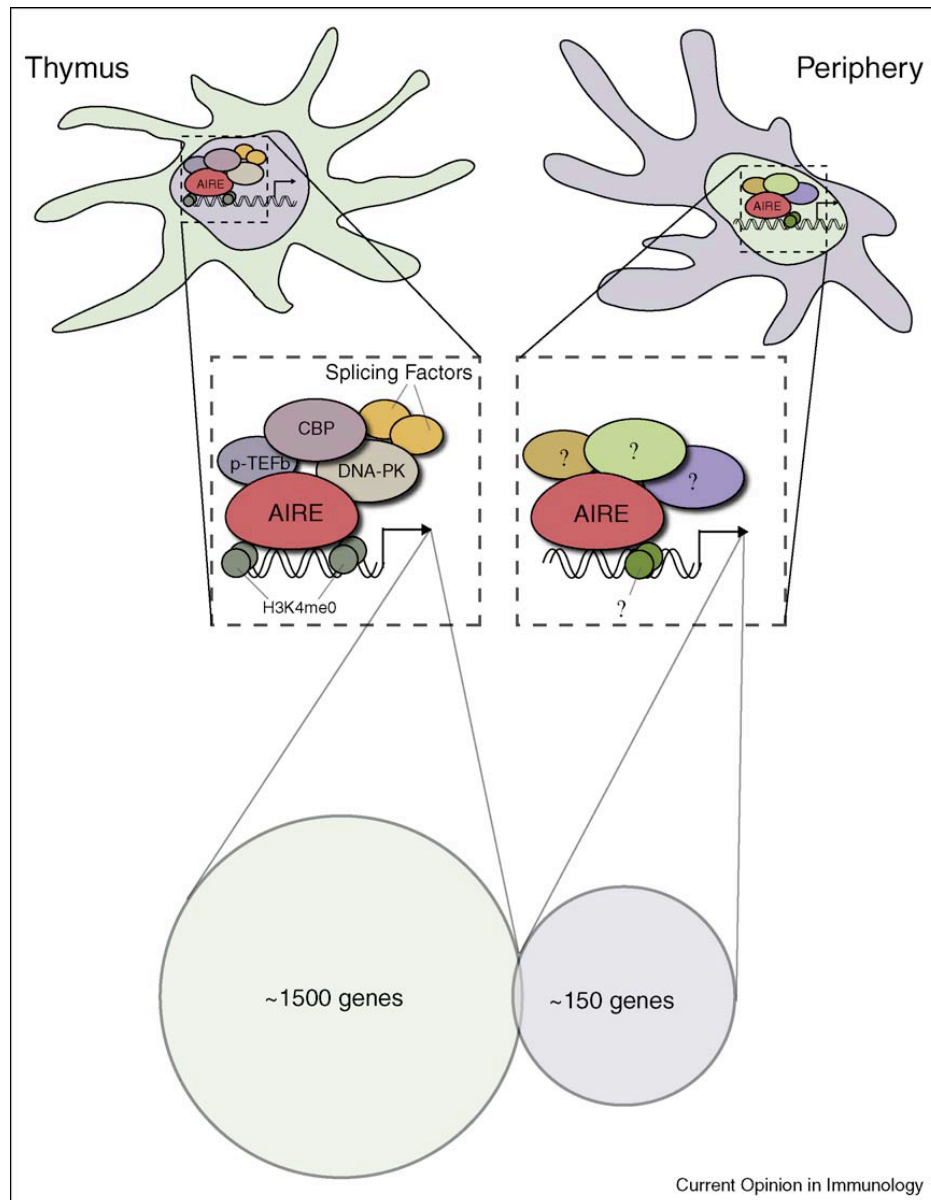


Figure 4 : L'activité transcriptionnelle de Aire s'exerce à la fois au niveau thymique (mTECs) et en périphérie (eTACs), d'après Gardner [63].

Les gènes dont la transcription est sous l'influence de Aire dans les eTACS sont le plus souvent différents des gènes Aire-dépendants dans les mTECs; de plus, le nombre de gènes sous la dépendance de Aire dans les eTACs y demeure moins important.

Dans la mTEC, les co-facteurs de transcription se liant à Aire sont bien connus, (CBP, pTEFb, DNA-PK). Le domaine PHD1 de AIRE se lie de manière spécifique à la chromatine (implication de l'histone H3K4 non méthylé). En revanche, les mécanismes inhérents à l'activité transcriptionnelle de AIRE dans les eTACs demeurent méconnus.

5- Mécanismes effecteurs en périphérie

a. Rôles respectifs des lymphocytes B et T

Deux théories s'opposent pour tenter d'expliquer la relation entre ce défaut de tolérance centrale et ses conséquences réelles sur les mécanismes effecteurs périphériques, conduisant aux maladies auto-immunes multiples présentes chez la souris Aire^{-/-} et dans la PEA1.

Ainsi des souris Aire^{-/-} déficientes en cellules T (par invalidation du gène codant la chaîne α du TCR) ne développent pas de maladie auto-immune, alors que des souris Aire^{-/-} μ MT^{-/-} (modèle dans lequel il existe un blocage de la maturation cellulaire B au stade pré-B) présentent des infiltrats inflammatoires tissulaires proches de ceux présents chez la souris Aire^{-/-}, bien qu'un peu atténués. De plus, dans cette étude, un transfert à des souris SCID de populations lymphocytaires issues de souris Aire^{-/-} déplétées en populations CD8⁺ n'empêche pas l'apparition d'infiltrats tissulaires inflammatoires. En revanche, si l'on transfère à ces souris SCID des populations lymphocytaires Aire^{-/-} déplétées en lymphocytes CD4⁺, la maladie auto-immune ne se développe pas chez ces souris. Ainsi, seul le compartiment T CD4⁺ (et non CD8⁺) apparaît indispensable au développement de la maladie. Les auteurs montrent que ces cellules T CD4⁺ ont une polarisation de type Th 1. De plus, l'administration d'un AC monoclonal anti-CD4 aux souris Aire^{-/-} diminue nettement les processus auto-immuns. Dans cette étude, le rôle des cellules T CD4⁺ apparaît prépondérant. Le rôle des lymphocytes B y semble ici secondaire, puisque les souris Aire^{-/-} μ MT^{-/-} y développent la maladie, toutefois de manière un peu atténuée [96].

Une autre équipe utilisant deux modèles distincts de déplétion en lymphocytes B rapporte des résultats différents. Là encore, les souris Aire^{-/-} μ MT^{-/-} développent la maladie de manière atténuée, alors que les souris Aire^{-/-} Jh^{-/-} (modèle dans lequel l'absence de région jonctionnelle de chaîne lourde donc de BCR résulte dans le blocage de maturation de cellules proB en préB, soit un blocage complet dans la différenciation cellulaire B) présentent des infiltrats inflammatoires mineurs [97]. Ces données mettent ici en exergue l'importance de l'implication des lymphocytes B. L'apparente discordance entre ces deux modèles d'étude pourrait être liée au fait que le modèle μ MT^{-/-} est à l'origine d'un blocage de la lignée B moins complet que le modèle Jh^{-/-} [66, 98]. Dans ces travaux qui mettent l'accent sur le rôle des lymphocytes B, les auteurs soulignent que les auto-AC ne seraient pas directement pathogènes, et que les cellules B ne participeraient pas à la phase effectrice. Toutefois, l'administration précoce à des souris Aire^{-/-} d'AC monoclonal anti-CD20 permet de diminuer

la survenue d'événements auto-immuns [97]. Ainsi les cellules B pourraient aussi avoir un rôle régulateur précoce dans le « priming » puis dans l'expansion de la réponse cellulaire T.

b. Implication des cellules iNKT

Jusqu'il y a peu, le rôle des cellules NK (Natural Killers) et iNKT (invariant NKT « restreintes » au CD1) n'avait été que peu abordé, aussi bien dans le modèle murin Aire $-/-$, que dans la PEA1. Seule une étude avait évoqué l'implication de Aire dans le développement thymique des cellules iNKT [99], mais les auteurs s'étaient ensuite rétractés en raison d'inexactitudes, tout en maintenant leurs conclusions [100]. Récemment deux études se sont à nouveau intéressées à ces cellules de l'immunité dite « intermédiaire ». Ainsi, il semble que le nombre de cellules iNKT soit réduit dans le thymus et les organes périphériques chez les souris Aire $-/-$. De plus le nombre de cellules iNKT circulantes chez les patients atteints de PEA1 serait diminué [101]. En revanche, le nombre de cellules NK ne serait pas affecté chez les souris Aire $-/-$, chez qui ces cellules se différencieraient normalement [101]. Ainsi l'hypothèse selon laquelle le développement des cellules iNKT pourrait être influencé par Aire est à nouveau émise. Suite à ces résultats, d'autres auteurs se sont interrogés sur le rôle de ces cellules dans la survenue des candidoses. Ils ont montré que la diminution du nombre de iNKT se vérifiait chez tous les patients atteints de candidoses, qu'ils soient atteints de PEA1 ou non (22 patients étudiés, dont 9 PEA1). De plus, in vitro, ils n'ont pas mis en évidence d'induction de la prolifération des iNKT par des souches de *Candida* inactivées par la chaleur. Ils en concluent que la diminution des iNKT serait plutôt une conséquence de la candidose, qu'une de ses causes [102]. Ceci n'est toutefois pas une explication satisfaisante à la diminution du nombre de ces cellules chez les souris Aire $-/-$, qui sont quant à elles indemnes d'infections candidosiques.

En conclusion, au travers des premières données rappelées dans ce chapitre introductif, si le défaut de tolérance centrale semble bien défini dans la PEA1, il n'apparaît pas aujourd'hui si simple d'en comprendre les conséquences sur le déroulement global de la réponse immune, notamment sur l'implication de l'immunité innée, et sur les dysrégulations éventuelles induites entre réponses innées et réponses adaptatives. Il apparaît surtout difficile d'objectiver des liens précis permettant de rattacher l'apparition de certains processus pathogènes induits et/ou associés à cette mutation (exemple de la candidose, dont le mécanisme d'apparition est loin d'être complètement élucidé). C'est pour tenter de répondre à certaines de ces questions que nous avons souhaité mener une étude sur l'exploration du répertoire B dans un tel contexte. Nous disposions en effet au laboratoire d'un modèle d'analyse d'immuno-protéomique de référence ; nous avons en parallèle collecté les sérums de patients atteints de PEA1, modèle clinique de référence.

III. Objectifs

Dans nos travaux antérieurs, les résultats obtenus dans la sclérose en plaques [5, 7, 8] ou dans les formes neuro-psychiatriques de lupus érythémateux aigu disséminé [6] ont mis l'accent sur l'intérêt d'une démarche sans *a priori* pour étudier ce répertoire B, et en particulier les profils d'auto-réactivité sérique IgG. Ainsi, il a été montré que ces profils pouvaient constituer une « signature sérologique » de ces maladies auto-immunes, puisqu'on retrouvait une singularité du répertoire B propre aux patients atteints et distincte de celui des sujets contrôles. Toutefois les cibles antigéniques identifiées étaient majoritairement ubiquitaires dans des pathologies tissus-spécifiques. La méthodologie utilisée par le laboratoire permettait ainsi d'évaluer, de façon intégrative, « l'empreinte humorale » d'une réaction auto-immune sans préjuger de son caractère T-dépendant ou T-indépendant. Pour faciliter la compréhension et la signification de ces immuno-empreintes, notamment l'éventuelle part de l'auto-réactivité naturelle, et le caractère de dépendance vis-à-vis des lymphocytes T, nous souhaitons disposer d'un modèle de référence. C'est dans cette perspective que nous avons orienté nos travaux sur l'étude de la PEA1 dans laquelle, de façon remarquable, l'altération du répertoire T est caricaturale, au moins si l'on en juge par les premières publications sur ce thème [68, 78, 80]. Dans un premier temps, nous avons constitué des bases de données clinico-biologiques indispensables à notre étude en coordonnant un réseau d'abord inter-régional puis national depuis 2009 dans le cadre d'un Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC). Une collection d'échantillons sériques précieux nous a permis la réalisation ultérieure d'études d'immuno-empreinte sans *a priori* dans la PEA1 et dans d'autres pathologies testées à titre de contrôles. Nous verrons que nos résultats ouvrent de nouvelles perspectives sur la physiopathologie de l'APECED qui n'apparaît plus strictement dépendante des lymphocytes T.

A. Analyse clinique, immunologique et génétique de la population étudiée

Pour cela nous avons, dans un premier temps, collecté le sérum de patients atteints de cette pathologie exceptionnelle, jusque là non explorée en France. Grâce à la collaboration des centres hospitaliers de l'Inter-région Nord-Ouest, nous avons pu recenser 19 patients atteints. Les caractéristiques clinico-biologiques précises ont été documentées pour chacun de ces cas. Un séquençage du gène *AIRE* a permis d'en identifier les mutations. Les différents auto-anticorps tissus-spécifiques susceptibles d'être présents dans le sérum de ces patients ont été recherchés. Le génotypage HLA de classe 2, dont on sait qu'il influe sur le phénotype clinique des patients [59], a été analysé. Un premier immuno-phénotypage lymphocytaire (T, B, NK) a

également été réalisé afin de préciser les altérations quantitatives secondaires potentiellement liées au défaut de sélection négative des lymphocytes T auto-réactifs (Article 1).

B- Analyse des profils d'auto-réactivité IgG des patients atteints de PEA1

Par la suite, nous avons étudié les profils d'auto-réactivité sériques IgG de ces patients atteints de PEA1. Par technique d'immuno-empreinte, nous avons comparé leurs profils à ceux obtenus chez 2 groupes de sujets contrôles (sujets sains ou atteints d'autres endocrinopathies auto-immunes). Nous avons choisi d'étudier l'auto-réactivité sérique IgG vis à vis d'homogénats de tissus potentiellement atteints dans la PEA1 : les tissus surrénalien, parathyroïdien, thyroïdien, pancréatique, gastrique, ovarien et cutané. En cas d'altérations constatées du répertoire B prouvées par analyse statistique, nous avons caractérisé, par une démarche d'immuno-protéomique, les antigènes permettant de distinguer les patients atteints de PEA1 des sujets contrôles. Nous avons présenté les résultats obtenus avec des tissus surrénaliens et pancréatiques qui se sont avérés les plus représentatifs (Article 2).

C- Analyse des profils d'auto-réactivité IgM des patients atteints de PEA1

Les résultats obtenus grâce à l'étude des profils d'auto-réactivité IgG ont permis de montrer que ces patients présentaient bien une auto-réactivité vis à vis d'antigènes tissus-spécifiques. De manière moins attendue, une auto-réactivité discriminante vis à vis de cibles antigéniques ubiquitaires a aussi été observée. Or, les auto-anticorps de classe IgG peuvent être aussi des auto-anticorps naturels. Il nous est ainsi apparu judicieux de poursuivre notre enquête avec l'analyse des profils dépendants d'auto-anticorps de classe IgM pour mieux interpréter la T-dépendance ou la T-indépendance des profils préalablement obtenus. En effet, un répertoire auto-réactif naturel IgM est qualitativement normal chez les souris déficientes en lymphocytes T [103]. De plus, les auto-anticorps naturels IgM peuvent être détectés en l'absence de toute immunisation connue. Ainsi lors de la vie fœtale se constitue un répertoire auto-réactif humoral de type IgM sélectif et très conservé entre les individus [104].

Comme dans l'étude précédente, nous avons donc étudié les profils d'auto-réactivité sériques IgM des patients atteints de PEA1 en comparaison à 2 groupes contrôles. La recherche d'une altération de ces profils a été suivie de la caractérisation des antigènes cibles, afin de déterminer s'il s'agissait de cibles spécifiques aux IgM, ou des mêmes cibles que celles reconnues par les IgG (Article 2).

D- Etude des sous-populations lymphocytaires B

Ces premiers résultats ont permis de mettre en évidence dans la PEA1 une auto-réactivité dépendante d'IgG et d'IgM dirigée contre des cibles antigéniques tissus-spécifiques, mais aussi ubiquitaires. La présence d'une auto-réactivité IgG vis à vis d'antigènes tissus-spécifiques chez les patients atteints de PEA1 était attendue. Elle peut être la conséquence d'une coopération T-B qui favorise les phénomènes d'hypermutation somatique et de commutation isotypique. Un défaut de sélection de cellules T auto-réactives pourrait en effet favoriser l'activation des cellules B auto-réactives dans le cadre d'une aide « cognate » ou connexe dans les organes lymphoïdes secondaires. En revanche, la présence d'une auto-réactivité IgG vis à vis d'antigènes ubiquitaires s'est avérée plus surprenante. Ce résultat pourrait témoigner de l'implication d'autres populations lymphocytaires B auto-réactives, T-indépendantes. Par ailleurs, il existe des auto-anticorps naturels de classe IgG. Cette hypothèse de T-indépendance est renforcée par certaines données expérimentales récentes. Ainsi, les souris Aire $-/-$ âgées présentent des infiltrats tissulaires de 2 types, B folliculaires et B issus de la zone marginale de la rate (dits MZ chez la souris, MZ-like chez l'homme) [105]. Elles développent également des lymphomes de cette zone marginale [105]. Or, ces populations sont à l'origine d'une auto-réactivité naturelle T-indépendante. Les patients atteints de PEA1 pourraient ainsi présenter à la fois une activation des populations B folliculaires mais également des populations B de type MZ-like, à l'origine d'une altération de l'auto-réactivité adaptative mais également naturelle. Nous avons donc caractérisé les sous-populations lymphocytaires B de ces patients (notamment MZB-like et folliculaires), en comparaison de celles observées dans d'autres polyendocrinopathies auto-immunes et chez des sujets sains.

PARTIE II : RESULTATS

I. Caractéristiques de la population étudiée

La polyendocrinopathie auto-immune de type 1 demeure une pathologie exceptionnelle, tant par son mécanisme physiopathologique, que par sa rareté au plan épidémiologique. Aucune étude n'avait jusque là tenté de rassembler les cas français, de les caractériser au plan clinique, immunologique et génétique. Ainsi, grâce à la collaboration des praticiens endocrinologues et pédiatres des centres hospitaliers généraux et universitaires de l'Inter-région Nord-Ouest (Nord-Pas-de-Calais, Picardie, Haute et Basse Normandie), nous avons pu recenser 19 patients atteints dans cette Inter-région.

A. Recueil des données cliniques

Tout d'abord, le phénotype clinique des patients a pu être décrit précisément, en particulier dans les formes sévères de la maladie nécessitant la mise sous immunosuppresseurs.

B. Méthodes d'analyse des données immunologiques

La présence d'auto-anticorps tissus-spécifiques habituellement retrouvés dans cette pathologie a été recherchée. L'immuno-fluorescence indirecte a été utilisée pour détecter la présence d'AC anti-parathyroïde, anti-îlots de Langerhans, anti-ovaire, anti-cellules pariétales gastriques, anti-LKM1 et anti-muscles lisses (avec confirmation en immuno-dot pour les 2 derniers si nécessaire). Les AC anti-récepteur sensible au calcium ont été recherchés par technique d'immuno-transfert, en utilisant un polypeptide recombinant correspondant aux acides aminés 1-603 du domaine extra-cellulaire du récepteur sensible au calcium [33] (grâce à l'aimable collaboration du Dr Nicole Fabien, Unité Fonctionnelle d'Auto-Immunité, Centre Hospitalier Lyon-Sud). Les AC anti-21 hydroxylase, anti-IA2, anti-GAD65 ont été dosés par technique radio-immunologique (RIA). Les AC anti-thyroglobuline et anti-thyroperoxydase ont été mesurés soit par RIA, soit par ELISA en fonction des centres hospitaliers où le patient a été prélevé. Les AC anti-facteur intrinsèque ont été recherchés soit par immuno-dot, soit par ELISA.

Un immuno-phénotypage lymphocytaire a permis d'étudier quantitativement les différentes sous-populations lymphocytaires T, B et NK. Les phénotypes CD3, CD4, CD8, CD19 et CD56 ont été étudiés. Cette analyse a été réalisée dans le laboratoire référent de chaque centre hospitalier concerné.

Le génotypage HLA de classe II des patients a été également déterminé, du fait de son influence dans les pathologies auto-immunes en général, et en cas de déficit de AIRE, aussi bien chez la souris que chez l'homme [59, 79]. Il a été réalisé par technique de PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism). La dénomination des allèles a été réalisée grâce à la nomenclature établie par le comité de nomenclature de l'OMS. Là encore, cette analyse a été réalisée dans le laboratoire référent de chaque centre hospitalier.

C. Séquençage du gène *AIRE*

Le diagnostic clinique a été confirmé par séquençage du gène *AIRE* (grâce à l'aimable collaboration du Dr Pascale Saugier-Véber, Laboratoire de Génétique Moléculaire, INSERM U614, Rouen). Le diagnostic moléculaire de PEA1 a été réalisé en deux étapes : dans un premier temps, un séquençage des exons 6 et 8 du gène *AIRE*, où siègent la majorité des mutations, a été réalisé. Si aucune mutation n'était identifiée dans ces deux exons ou qu'une mutation unique était mise en évidence, le criblage était poursuivi par le séquençage des 12 autres exons du gène *AIRE*.

D. Recherche de corrélation génotype-phénotype clinique

Devant la très grande variabilité des phénotypes cliniques, et ce au sein-même de fratries, nous avons recherché quels facteurs pouvaient influencer l'apparition des différentes manifestations de la maladie. En particulier, nous nous sommes interrogés quant à l'existence d'une corrélation entre le phénotype clinique de nos patients, et les mutations du gène *AIRE*. L'étude statistique a été réalisée grâce à un test de Fisher exact. Nous avons également recherché une corrélation entre le phénotype clinique de nos patients et leur génotypage HLA de classe II ; toutefois, cette analyse n'a pu être faite qu'au cas par cas, du fait du faible effectif de la population en regard du nombre de sous-groupes HLA.

Au total, cette première étape s'est avérée indispensable à la poursuite de l'étude, puisqu'elle nous a permis de caractériser précisément la population étudiée et de collecter les sérums nécessaires à l'étude du répertoire B auto-réactif dans la PEA1. De plus, elle a été le point de départ d'une étude beaucoup plus large, financée depuis 2009 par un PHRC national, intitulé : « **Présentation et pronostic du syndrome APECED : recensement national** ».

Article 1

Autoimmune Polyendocrine Syndrome Type 1 in North-Western France: *AIRE* Gene Mutation Specificities and Severe Forms Needing Immunosuppressive Therapies.

Horm Res Paediatr 2010;74:275–284

II. Dérégulation de l'homéostasie B naturelle et adaptative dans la PEA1

Outre la dimension descriptive au plan clinique et génétique de la première partie de ce travail, son intérêt résidait également dans l'étude de phénomènes auto-réactifs T-dépendants bien connus dans la PEA1. En effet, l'atteinte auto-immune des différents organes en périphérie semble être directement liée au défaut de sélection négative des thymocytes auto-réactifs en l'absence de AIRE [68, 80]. Les auto-AC dirigés contre des antigènes tissus-spécifiques détectés dans cette pathologie, connus de longue date [19, 38], sont vraisemblablement les témoins de cette altération de tolérance centrale, et témoignent donc probablement d'une altération du répertoire B auto-réactif T dépendant.

Toutefois, ce type d'approche ne permet d'étudier qu'une partie très restreinte de l'auto-réactivité B. Afin d'élargir notre étude à l'ensemble du répertoire B auto-réactif, à la fois T-dépendant mais également T-indépendant, nous avons choisi d'utiliser la technique sans *a priori* du western blot, couplé à une approche immuno-protéomique avec caractérisation moléculaire des cibles discriminantes par analyse en spectrométrie de masse.

A. Etude des profils sériques auto-réactifs IgG et IgM

Dans un premier temps, nous avons étudié les profils sériques d'auto-réactivité IgG vis à vis de différents tissus par technique d'immuno-empreinte en une dimension (1D). Nous avons initialement étudié les profils d'auto-réactivité vis à vis des principaux tissus cibles d'une atteinte auto-immune dans la PEA1 : tissus surrénalien, parathyroïdien, thyroïdien, pancréatique, gastrique, ovarien et cutané (travail réalisé dans le cadre d'un Master 2 Recherche, E. Proust-Lemoine). Nous avons choisi de présenter uniquement les résultats les plus représentatifs, obtenus avec les tissus pancréatiques et surrénaliens. Nous avons donc comparé les profils auto-réactifs sériques IgG vis à vis de ces 2 tissus cibles en utilisant le sérum de nos patients atteints de PEA1 et celui de sujets contrôles (patients atteints d'autres types d'endocrinopathies auto-immunes et sujets sains).

Ayant constaté une altération de ces profils auto-réactifs IgG dans la PEA1 par rapport aux groupes contrôles, nous nous sommes secondairement intéressés aux profils sériques d'auto-réactivité IgM, pour les raisons développées dans le chapitre introductif. A nouveau, une altération des profils auto-réactifs IgM a été constatée, grâce à la comparaison des

immuno-empreintes en 1D obtenus chez nos patients PEA1 et ceux obtenus dans nos 2 groupes contrôles.

B. Comparaison des profils et analyse statistique

Afin de déterminer quels étaient les antigènes cibles de cette auto-réactivité spécifique de la PEA1, nous avons analysé les profils d'auto-réactivité de manière qualitative, par alignement, en notant pour chaque sérum la présence ou l'absence de chaque bande antigénique (sans tenir compte de son intensité). Cette détection et cet alignement ont été réalisés grâce au logiciel Diversity Database 2.2. Les profils auto-réactifs sériques IgG et IgM ont été analysés de manière indépendante. S'en est suivie une étude statistique par test de Chi-2, permettant de déterminer quelles bandes antigéniques faisaient l'objet d'une auto-réactivité plus spécifique de la PEA1.

C. Approche immuno-protéomique

Une approche immuno-protéomique a complété ce travail, afin de caractériser les protéines antigéniques cibles de cette auto-réactivité spécifique. Elle a été réalisée en 3 étapes :

- électrophorèse bidimensionnelle permettant l'obtention d'une carte protéique en 2 dimensions pour chaque tissu étudié
- superposition de cette carte avec l'immuno-empreinte en 2D d'un sérum d'intérêt
- caractérisation moléculaire des antigènes d'intérêt par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization- time of flight- time of flight).

Article 2

Distortion of serum IgG and IgM self-reactive responses against tissue-specific and ubiquitous antigens in autoimmune polyendocrine syndrome type 1

Soumis à Clinical Immunology

III. Dérèglement de l'homéostasie B dans la PEA1, résultats préliminaires

Après la mise en évidence d'une altération de la réponse humorale significative chez les patients atteints de PEA1, ciblant des antigènes non seulement tissus-spécifiques mais aussi ubiquitaires, et de la découverte chez la souris Aire -/- âgée de la survenue de lymphomes de la zone marginale de la rate, il nous est apparu légitime d'engager une étude sur l'homéostasie des lymphocytes B circulants dans le PEA1.

Nos premières analyses réalisées sur un faible nombre de patients montrent des modifications notables dans l'équilibre des sous-populations lymphocytaires circulantes dans la PEA1. On note en effet une diminution du nombre des cellules B naïves et des cellules B transitionnelles chez ces patients. Cette dernière anomalie a déjà été mise en évidence au laboratoire dans d'autres pathologies auto-immunes spécifiques d'organe comme la sclérose en plaques [106]. En revanche, un accroissement d'une population cellulaire MZB-like circulante est aussi observé dans tous les cas de PEA1 étudiés.

L'ensemble de ces résultats sera intégré dans une prochaine publication lorsque nous disposerons d'un nombre suffisant de cas pour la réalisation d'études statistiques. Cette démarche s'inscrit dans les objectifs du PHRC national, dans lequel nous poursuivons nos inclusions.

Dans les chapitres suivants sont présentés le matériel et méthodes (A) puis les premiers résultats obtenus (B).

A. Methods : Analysis of naïve and memory B cells using multiparameter flow cytometry.

Unprocessed whole blood samples were stained with fluorochrome-labeled murine monoclonal antibodies according to the manufacturers' instructions. Analysis was performed using an FC500 flow cytometer (Beckman Coulter). Reagents and instrumentation were obtained from Beckman Coulter (Miami, FL, USA), Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA) and Dako (Glostrup, Denmark). Absolute and relative numbers of CD19+ B lymphocytes were determined using monoclonal antibodies. Unprocessed whole blood samples were stained with direct conjugates of fluorochrome-labeled using a four-color assay and antibodies to CD19-PC5 and CD45-PC7. Flow-Count fluorospheres were added and

acquired without washing along with the lymphocyte events (defined as CD45^{bright}, low side scatter). The naïve, memory and MZ-like subsets of CD19⁺ B cell populations were detected using four-color staining with antibodies to CD19-PC5 in combination with CD27-PC5, IgDPE and IgM-FITC and transitional subsets were detected using CD19-PC5, IgM-FITC and CD38-PE. Red cell lysis was carried out using an automatic workstation (TQ-Prep), after which the cells were washed twice prior to acquisition. Naïve and memory B cell subsets were expressed percentages of total CD19 B cell counts. Their absolute counts were calculated by multiplying the specific subset percentage by the absolute CD19⁺ B lymphocyte count. Four APS1 patients were compared with 4 patients with OAE and with age-matched healthy controls (9 controls aged 5–10 years and 76 controls aged 20–60 years).

B. First results : Change in the distribution of circulating B cell subsets in APS1 patients

We phenotypically characterized the various circulating CD19⁺ B cell subsets from late-immature (CD19⁺ CD38^{high}) to memory-switched B cells (CD19⁺ CD27⁺ IgM⁻ IgD⁻) in 4 APS1 patients compared with 2 control groups (age-matched OAE and healthy subjects; Table 1). Representative histograms are shown in Figure 1 for one patient with APS1, one patient with OAE and one age-matched control. We did not perform statistical analyses because of the difference in the number of patients among the 3 populations.

However, some aspects were common to all 4 APS1 patients. The proportions of CD27⁻ IgD⁺ IgM⁺ subsets (naïve B cells) and CD38⁺ IgM⁺ subsets (transitional B cells) were reduced in APS1 patients compared with age-matched healthy controls and OAE controls. In addition, the prevalence of CD27⁺ IgM⁺ IgD⁺ subsets (MZ B-like cells) was higher in APS1 patients compared with healthy controls and OAE patients. Results for 3 adults with APS1, 4 age-matched OAE patients and 76 healthy controls are summarized in Table 1A. We observed the same trend for patient 1 (aged 6 years), who was compared with 9 children aged 5–10 years (Table 1B). The prevalence of CD27⁺ IgD⁻ IgM⁺ and CD27⁺ IgD⁻ IgM⁻ (memory B cells) subsets in APS1 patients and the control populations were similar (data not shown).

Figure 1

Representative histogram of the elevated circulating MZ B-like subpopulation in 1 APS1 patient compared with 1 OAE patient and 1 healthy donor.

A higher proportion of MZ B-like subsets in the blood of the APS1 patient is evident compared with the age-matched OAE patient and the age-matched healthy control. This B cell subset expressed CD19+ CD27+ IgD+, as shown by the histogram (grey gate) and also expressed IgM (top window).

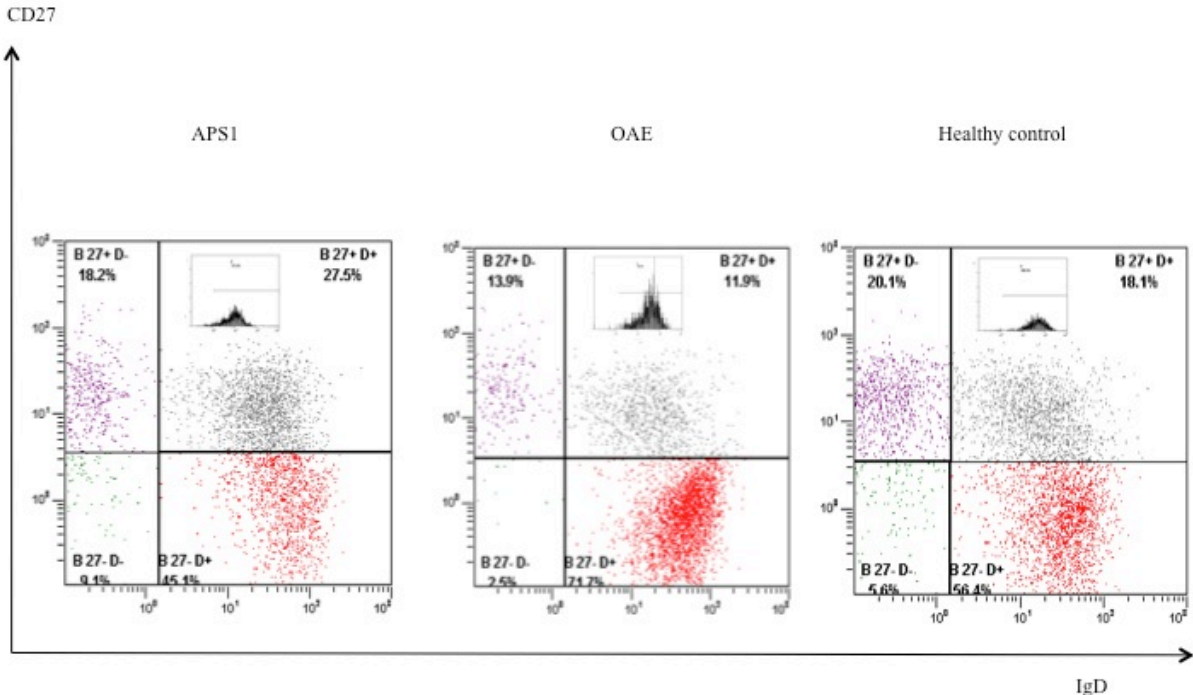


Table 1: Repartitioning of B cells subset:

1A: in 3 APS1 patients compared with 4 OAE patients and 76 age-matched healthy controls (relative values).

	Healthy subjects (n = 76)			OAE (n=4)				APS1 (n=3)		
	20 to 60 years old			26 to 40 years old				28 to 42 years old		
	Mean	SEM	95% CI	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6	Patient 7
Transitional B cells										
CD19+ CD38+ IgM+ (%)	5.37	0.32	4.74-6.00	2.4	2.1	5	2.8	0.4	0.8	3.9
Naive B cells										
CD19+ CD27- IgD+ IgM+ (%)	64.2	1.73	60.75-67.65	89.5	71	67	87.5	15.7	45.8	41
MZ B like cells										
CD19+ CD27+ IgD + IgM + (%)	15.12	1.03	13.07-17.17	3.7	11.6	14.5	4.9	21.6	22.1	27.5

1B: One APS1 child compared with 9 age-matched healthy controls (relative values).

	Healthy subjects			APS1
	5-10 years old (n=9)			6 year old
	Mean	SEM	95% CI	
Transitional B cells				
CD19+ CD38+ IgM+ (%)	11.67	1.5	10.52-12.82	4.1
Naive B cells				
CD19+ CD27- IgD+ IgM+ (%)	80.89	10.65	72.70-89.07	66.9
MZ B like cells				
CD19+ CD27+ IgD + IgM + (%)	7.56	4.16	4.36-10.75	18.3

PARTIE III : DISCUSSION

Le concept d'auto-réactivité physiologique et pathologique fait encore l'objet de débats. On décrit une auto-réactivité dite **physiologique ou naturelle** qui serait très conservée au cours de la vie de l'individu et qui se constituerait au cours de l'ontogénie des lymphocytes B. C'est dans ce cadre que s'inscrit l'« homonculus immunologique » décrit par Cohen [1]. La présence d'auto-anticorps de classe IgM, mais aussi d'isotypes IgA et IgG avant tout contact antigénique, atteste de l'existence de ce répertoire « primordial » naturellement présent chez le nouveau-né [107]. Le répertoire auto-réactif IgM naturel est très restreint et homogène dès la naissance [104], et demeure conservé à l'âge adulte [2, 4, 108], même s'il tend à se diversifier [2, 109]. Les cibles de cette auto-réactivité sérique IgM mises en évidence chez le nouveau-né sont retrouvées à l'âge adulte [2]. Le répertoire auto-réactif IgM ne dépend pas de celui de la mère, puisque les IgM ne passent pas la barrière placentaire. Il est donc propre au nouveau-né, différent du répertoire maternel, et reste très conservé d'un individu à l'autre [109]. Le répertoire auto-réactif IgA ne dépend pas non plus du répertoire maternel (ce type d'Ig ne passe pas non plus la barrière placentaire). Il demeure également très homogène d'un nouveau-né à l'autre [104]. Enfin, le répertoire auto-réactif dépendant des IgG est également restreint et conservé d'un individu à l'autre [3], et demeure stable à l'âge adulte [108]. Celui-ci contraste avec l'hétérogénéité inter-individuelle du répertoire IgG dirigé contre des antigènes étrangers, dont la diversité augmente avec l'âge [110]. En revanche, chez le nouveau-né, le répertoire auto-réactif sérique IgG est très proche de celui de sa mère, du fait du passage trans-placentaire des IgG [104]. A côté de ce répertoire auto-réactif physiologique naturel présent dès la naissance et conservé à l'âge adulte, il existerait un répertoire **auto-réactif physiologique homéostatique** maintenant chez l'individu un état de tolérance permanent vis à vis des stimulations antigéniques extérieures [3, 111]. Dans le maintien de ces équilibres, le rôle du réseau idiotype/anti-idiotype serait déterminant. Enfin, chez certains individus se développe un répertoire auto-immun **pathologique** lié à une rupture de tolérance, à l'origine de la survenue de maladies auto-immunes. L'un des enjeux essentiel aujourd'hui est d'appréhender les mécanismes en cause dans ces processus de rupture de tolérance. Ceux-ci impliquent-ils une dérégulation de l'auto-réactivité naturelle (exemple de la dérégulation du réseau idiotype) et/ou dépendent-ils d'événements liés à l'environnement (rôle de l'immunité innée et des signaux de danger, notion de mimétisme moléculaire, altération du pool de

cellules régulatrices dans la théorie « hygiéniste » ...)? L'existence de perturbations du répertoire IgG sérique auto-réactif dans des maladies auto-immunes telles que la sclérose en plaques ou le neuro-lupus a été largement étudiée lors de travaux antérieurs de notre équipe [5-7], mais leur signification physiopathologique demeurerait incertaine, notamment du fait d'une auto-réactivité dirigée majoritairement contre des cibles ubiquitaires, dans des pathologies spécifiques du système nerveux central. S'agissait-il de perturbations du répertoire B auto-réactif naturel, majoritairement T-indépendant, ou bien d'altérations du répertoire B auto-réactif adaptatif, T-dépendant ?

Dans la PEA1, liée aux mutations du gène *AIRE*, se développent de nombreuses maladies auto-immunes spécifiques d'organe, en raison d'une rupture de tolérance d'origine essentiellement thymique centrale liée à un défaut de délétion de clones lymphocytaires T auto-réactifs [68, 80]. Nous avons donc choisi ce « modèle » humain afin de mieux appréhender les phénomènes de distorsion du répertoire B auto-réactif constaté dans d'autres pathologies auto-immunes. Notre travail a permis non seulement de confirmer qu'il existait des anomalies du répertoire B d'origine T-dépendante comme attendu, mais également de montrer qu'il existait probablement des anomalies du répertoire B T-indépendant. Cette dernière observation ouvre, bien entendu, de nouvelles perspectives physiopathologiques.

Nous allons discuter de chacun de ces aspects en développant dans un premier temps l'ensemble des éléments qui confirment dans notre étude la T-dépendance de PEA1 puis ensuite les arguments qui suggèrent une T-indépendance de certains événements associés à PEA1.

Tout d'abord, la présence de nombreux anticorps de classe IgG spécifiques d'organe chez les souris Aire ^{-/-} [68, 78] et chez les patients atteints de PEA1 a été largement démontrée [36, 38], de manière le plus souvent corrélée à l'atteinte clinique correspondante. Nous l'avons confirmé dans notre série de patients (article 1), par des techniques conventionnelles utilisées dans les différents laboratoires d'Immunologie. Il est à noter que certains auto-AC peuvent être présents en dehors de toute atteinte clinique correspondante [36]. L'exemple des AC anti-thyroglobuline et anti-thyropéroxydase, présents dans la PEA1 dans environ 1/3 des cas, alors que la thyroïdite y est rare de manière patente (moins de 10% des cas) illustre bien cette notion de l'existence de « marqueurs biologiques d'auto-

immunité » asymptomatique [38]. La présence de certains AC, notamment anti-21 hydroxylase, peut toutefois être prédictive de la survenue de l'atteinte clinique correspondante [38]. *A contrario*, certains patients présentant une atteinte clinique ne possèdent pas les auto-AC correspondants dans leur sérum, comme dans l'atteinte surrénalienne ou le diabète de type 1, notamment lorsque la pathologie est installée depuis plusieurs années [20]. En effet, le processus inflammatoire régresse vraisemblablement, faisant place à de la fibrose, et les auto-AC initialement présents finissent par disparaître.

Notre étude immuno-protéomique (article 2) n'a pas permis la mise en évidence des auto-AC décrits habituellement dans la maladie d'Addison comme cibles d'une auto-réactivité spécifique chez nos patients atteints de PEA1: AC anti-21 hydroxylase [112, 113], anti-17 α hydroxylase [114], anti-enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol [115, 116]. Ceci est vraisemblablement dû au fait que nous avons choisi pour groupe contrôle des patients atteints d'autres poly-endocrinopathies auto-immunes, notamment de type 2. Or dans cette pathologie où la maladie d'Addison est particulièrement fréquente les auto-AC retrouvés sont les mêmes que dans la PEA1 [113], d'où l'absence de discrimination détectable par notre test statistique. De plus, dans notre approche, nous avons choisi de ne pas sélectionner les patients en fonction des atteintes cliniques présentées, mais de les traiter de manière globale en groupe 1 : PEA1 liée aux mutations du gène *AIRE*, et groupe 2 : autres endocrinopathies auto-immunes [27]. La même remarque concernant une discrimination indétectable par notre approche peut-être faite pour les antigènes cibles habituels d'une auto-réactivité spécifique dans le diabète de type 1. D'une part, cette atteinte du pancréas endocrine est relativement peu fréquente dans la PEA1 [19, 21] ; d'autre part, elle est également présente dans la PEA2, plus souvent que dans la PEA1 [117].

En revanche, notre étude des profils auto-réactifs sériques IgG a mis en évidence une auto-réactivité spécifique chez les patients atteints de PEA1 vis à vis de l'aldose réductase. Quoique considérée comme ubiquitaire, cette enzyme de la voie des polyols est largement exprimée dans le tissu surrénalien [118]. Cette expression singulière est liée au fait que cette enzyme y sert de réductase à l'isocaproaldéhyde, produit issu de la stéroïdogénèse après action de l'enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol. Elle y jouerait un rôle régulateur de la stéroïdogénèse en réponse à un stimulus de stress induit par les catécholamines [119]. De manière très intéressante, il a été montré dans le modèle murin Aire-/- que son expression thymique était sous le contrôle de Aire [68]. Or nous savons que la

perte d'expression d'un antigène Aire-dépendant au niveau thymique peut avoir pour conséquence l'apparition d'AC ciblant cet antigène en périphérie (exemple de la mucine-6 ou de l'IRBP, interphotoreceptor retinoid-binding protein) [120, 121]. Si on ne peut extrapoler directement que l'expression thymique d'un gène sous la dépendance de Aire chez la souris le soit aussi chez l'homme, cette hypothèse reste cependant plausible et mériterait d'être vérifiée.

Notre approche immuno-protéomique a également permis de caractériser d'autres cibles antigéniques tissus-spécifiques dans la PEA1, jusque là non connues comme telles. Il s'agissait de l'amylase pancréatique (cible d'AC d'isotype IgG), de la lipase pancréatique (cible à la fois d'AC d'isotype IgG et IgM), ainsi que de la pancreatic regenerating protein 1 α (cible d'AC de classe IgM). La découverte de telles cibles pourrait avoir un intérêt clinique potentiel. En effet, les patients souffrant de PEA1 sont fréquemment atteints de malabsorption très invalidante [21], pour laquelle plusieurs hypothèses diagnostiques ont été évoquées. Une atteinte auto-immune des cellules entérochromaffines gastro-intestinales a été décrite [42, 122]. Par ailleurs, une atteinte auto-immune du pancréas exocrine a aussi été mise en évidence [123], sans que les cibles antigéniques précises soient définies. La présence d'AC anti-amylase et anti-lipase pourrait témoigner d'une atteinte auto-immune du pancréas exocrine dans la PEA1, et constituer ainsi une explication alternative à la malabsorption. Cette hypothèse est d'autant plus séduisante que certains patients sont résistants à l'apport exogène d'extraits pancréatiques [124, 125]. De plus, chez la souris Aire $-/-$, l'atteinte du pancréas exocrine prédomine largement sur l'atteinte endocrine [68], même chez les souris NOD Aire $-/-$ [79]. Par ailleurs, la pancreatic regenerating protein 1 α (Reg1A) est également une protéine du pancréas exocrine ; elle constitue un facteur de croissance spécifique du pancréas endocrine, et y joue un rôle anti-apoptotique sur les cellules β de Langherans [126]. Elle est par ailleurs impliquée dans la physiopathologie de cancers de l'appareil digestif [127-129]. La mise en évidence d'une auto-réactivité anti-Reg1A dans la PEA1 où la fréquence du diabète de type 1 peut atteindre 10% des patients mérite d'être soulignée.

Ainsi, la découverte de nouvelles cibles antigéniques tissus-spécifiques (amylase, lipase, Reg1A pancréatiques) ou restreintes à quelques tissus (aldose réductase) dans la PEA1 semble bien d'origine T-dépendante. La présence combinée d'AC d'isotypes à la fois IgM

et/ou IgG dirigée contre ces cibles est vraisemblablement liée à un processus de commutation de classe. La réalisation d'une analyse sur prélèvements séquentiels permettrait d'évaluer les modalités d'apparition respective de ces anticorps et leur signification.

Pour compléter notre approche sur la T-dépendance des événements liée aux mutations du gène *AIRE*, nous avons exploré l'homéostasie des lymphocytes circulants chez nos patients (article 1). Nous avons mis en évidence chez 9 patients atteints de PEA1 une élévation du taux moyen de lymphocytes CD4⁺ et une baisse du taux moyen de lymphocytes T CD8⁺ par rapport aux normes établies dans une population témoin, se traduisant par une élévation moyenne du ratio CD4/CD8 chez les patients APECED. Ces données sont conformes aux données antérieures qui retrouvaient une hyperlymphocytose T CD4⁺ et une lymphopénie CD8⁺ par rapport à un groupe témoin [16, 130], ainsi qu'une élévation du ratio CD4/CD8 [16]. Notre travail corrobore donc ces résultats, même si dans ces 3 études, l'analyse a été réalisée sur de petits effectifs inférieurs à 20 patients. Or il a été montré que les populations T CD4⁺ humaines exprimaient constitutionnellement le gène *AIRE* (contrairement aux cellules T CD8⁺), et de manière plus marquée après une stimulation antigénique ou par l'IL2 [131]. Par ailleurs, chez la souris *Aire*^{-/-}, la surexpression de molécules co-stimulatrices (tel le VCAM-1) à la surface des cellules dendritiques est à l'origine d'une prolifération lymphocytaire T CD4⁺ plus importante que chez les souris *Aire*^{+/+} [93]. Enfin et surtout, les cellules effectrices à l'origine du développement d'infiltrats inflammatoires dans les tissus sont les cellules CD4⁺ (polarisées Th1), alors que les cellules T CD8⁺ semblent y jouer un rôle secondaire) [96]. Ainsi, l'élévation des lymphocytes T CD4⁺ chez les patients atteints de syndrome APECED pourrait être la résultante d'anomalies fonctionnelles intrinsèques de ces cellules privées de l'expression de *AIRE*, d'une altération de la construction de leur répertoire au niveau thymique, et d'une activation exagérée par des cellules dendritiques présentant des anomalies au niveau de leurs molécules de surface. La lymphopénie T CD8⁺ pourrait être la conséquence directe de l'augmentation du pool des cellules T CD4⁺ (régulation homéostatique ?). Toutefois, il est également probable que les anomalies d'éducation thymique aient un retentissement sur le répertoire de ces cellules T CD8⁺, comme le suggère la description d'une prolifération monoclonale T CD8⁺ chez l'un de nos patients (article 1) et dans la littérature [24, 132]. Le lien avec la lymphopénie reste à éclaircir.

L'ensemble de ces éléments souligne la T-dépendance des événements observés dans la PEA1. Le défaut d'expression thymique de AIRE a donc de multiples conséquences à la fois **qualitative** sur le répertoire T (en particulier celui des cellules T régulatrices [89, 92]), sur la prolifération de lymphocytes T auto-réactifs en périphérie (parfois de manière clonale conduisant des leucémies [24, 132]), et **quantitative** sur les populations lymphocytaires T. Les données antérieures de la littérature ainsi que les éléments sus-cités dans notre travail attestent d'une altération du répertoire B thymo-dépendant, directement liée à ce défaut de tolérance thymique centrale. Des éléments complémentaires obtenus au cours de notre étude mettent aussi l'accent sur l'existence probable d'évènements T-indépendants.

Ainsi, de manière moins attendue, notre travail a permis de montrer l'existence d'une auto-réactivité discriminante vis à vis de cibles antigéniques ubiquitaires chez les patients atteints de PEA1, telles que la peroxyredoxine-2 (ciblée à la fois par des IgG et des IgM), ou la heat shock cognate 71 kDa protein ou HSP71 (ciblée par des IgM). Nous avons discuté plus haut du cas, selon nous particulier, de l'aldose réductase détectée par des IgG.

Il n'y avait jusque là eu que très peu d'antigènes ubiquitaires détectés comme cibles d'une auto-réactivité spécifique dans la PEA1. Seuls les AC anti-interféron de type 1 [48, 133] ou anti-IL-17 et IL-22 [31, 51] ont été récemment détectés dans le sérum des patients atteints de ces patients. La présence d'AC anti-cytokines de polarisation Th17 pourrait être en lien avec la survenue des candidoses cutanéomuqueuses observées chez ces patients, comme vu plus haut.

La peroxyredoxine-2, comme l'HSP71 sont des protéines ubiquitaires impliquées dans la protection cellulaire contre le stress oxydatif. Ainsi, la peroxyredoxine-2 a une fonction anti-oxydante, réductrice des peroxydes. Des AC anti-peroxyredoxine ont déjà été détectés dans des maladies auto-immunes systémiques, de type lupus ou autres vascularites systémiques [134-136]. Il a été évoqué que la peroxyredoxine serait exprimée et relarguée par les cellules apoptotiques dans ces maladies auto-immunes. De plus la peroxyredoxine est capable d'activer la sécrétion de nombreuses cytokines, et jouerait donc un rôle dans l'induction de processus inflammatoires [135]. L'HSP-71 appartient quant à elle à la famille des HSP-70. L'HSP-70 a également une fonction protectrice de la cellule contre le stress

oxydatif, et s'avère augmentée en cas de stress, de situation pathologique à l'origine d'une inflammation, de nécrose cellulaire ... Elle se lie alors aux protéines endommagées. L'expression de l'HSP-70 est ainsi augmentée au cours de certaines maladies auto-immunes telles que le lupus [137]. Des AC contre cette protéine ont été détectés dans le purpura thrombopénique auto-immun [138] ou dans les lupus d'expression neuro-psychiatrique [6]. De plus les HSP jouent un rôle important dans l'immunorégulation. L'HSP70 aurait la capacité de promouvoir l'auto-immunité in vivo ; elle peut fonctionner comme un signal de danger endogène, agissant sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) [139]. Nous savons en effet que les PRRs (Pattern Recognition Receptors) ont la capacité de les reconnaître; l'HSP70 mimerait ainsi la présence de PAMPs (Pathogen-Associated Molecular patterns) microbiens et entraînerait une réponse inflammatoire du système immunitaire inné [140].

La présence d'AC dirigés contre des antigènes ubiquitaires dans la PEA1 n'a été que rarement rapportée, et a plusieurs explications potentielles. En effet, comme décrit plus haut, Aire ne commande pas uniquement l'expression d'antigènes ectopiques tissus-spécifiques au niveau des mTECs. Cette protéine est également responsable de l'expression d'autres antigènes, beaucoup plus largement distribués, au sein des eTACs, cellules stromales ganglionnaires ou spléniques [69]. Toutefois ces antigènes ubiquitaires sont principalement des antigènes impliquant la présentation de l'antigène ou la communication inter-cellulaire [69]. Ainsi, la présence de certains AC dirigés contre des cibles plus ubiquitaires pourrait être liée à une rupture de tolérance Aire-dépendante en périphérie, au niveau splénique et/ou ganglionnaire.

Par ailleurs, d'autres arguments plaident pour la T-indépendance de certains événements observés dans la PEA1. La présence d'AC discriminants de classe à la fois IgM ou IgG dirigés contre des cibles ubiquitaires le suggère. Les anomalies du répertoire B T-indépendant pourraient être par exemple liées à des signaux inappropriés délivrés par des PRRs, ou à l'implication d'un certain type de sous-populations lymphocytaires B.

Ainsi, ces signaux inappropriés peuvent être associés à une anomalie soit de l'engagement des PRRs, soit des signaux de transduction [141]. Les mutations du gène *CARD9* à l'origine d'anomalies de la transduction du signal PRRs sont également responsables de candidoses [142]. En effet , les glucannes et mannanes, situés à la surface des

Candida constituent des PAMPs reconnus par les PRRs de la famille des TLRs (Toll-Like Receptors 2, 4 et 9) ou de celle des CTL (C-Type lectin) [143]. La dectine-1, comme la dectine-2, appartiennent à cette dernière famille ; elles jouent un rôle primordial dans la reconnaissance du Candida. Suite à cette reconnaissance est enclenchée la voie de Syk/CARD9 [144-146], conduisant à l'activation du NFκB et de la voie des MAP-kinases (Mitogen Activated Protein) au sein de cellules myéloïdes. En découle la sécrétion de cytokines (TNF-α, IL-6, IL-23) qui vont conduire des lymphocytes T naïfs à développer un profil de type Th17 [144, 147]. Ces voies sont ainsi primordiales dans la protection vis à vis du Candida [49]. Toutefois, le niveau d'expression de ces différents PRRs ne serait pas modifié dans les cellules dendritiques immatures des patients atteints de PEA1 en réponse au Candida, par rapport au contrôle [148]. En revanche, les cellules dendritiques issues de patients souffrant de candidoses (APECED et non APECED) ne parviendraient pas à « down-réguler » l'expression de l'ARN messager des PRRs en réponse au Candida, contrairement à des CD de sujets sains [149]. Ce défaut de rétro-contrôle négatif traduirait un défaut de maturation de ces cellules dendritiques, affectant la régulation de l'expression des PRRs en réponse au Candida ; ces anomalies de transduction de signaux PRR pourraient être responsables, au moins en partie, des difficultés de ces patients à se défendre vis à vis des candidoses [148]. Ce défaut de maturation des cellules dendritiques dans la PEA1 avait déjà été souligné par les mêmes auteurs, qui avaient montré une hyperactivation de ces cellules en réponse au Candida, avec hypersécrétion de cytokines (IFN-γ, IL-2, TNF-α, IL-13) [150]. Cette hyperactivation des CD pourrait être réactionnelle à une altération de la réponse lymphocytaire T au Candida, en particulier de polarisation Th17. Quoiqu'il en soit, la présence d'AC anti-HSP 70 pourrait également, nous l'avons vu précédemment, plaider pour des anomalies d'activation des PRRs et donc de l'immunité innée dans la PEA1. Les anomalies de développement de la lignée iNKT décrits récemment dans la PEA1 sont un argument supplémentaire pour des anomalies de l'immunité innée dans la PEA1 [101].

Enfin, plusieurs arguments permettent d'évoquer aussi l'implication de sous-types cellulaires B T-indépendants dans la PEA1. Nous avons en effet détecté une augmentation de la sous-population cellulaire MZB-like chez 4 patients atteints de syndrome APECED, alors que les cellules B transitionnelles et naïves seraient diminuées (données préliminaires). Dans la littérature, plusieurs arguments sont également en faveur d'une implication de ce sous-type cellulaire. En effet, les souris Aire -/- développent des lymphomes de la zone marginale de la

rate et des infiltrats lymphocytaires B hépatiques suggérant une activation exagérée de ces lymphocytes en périphérie [105]. Or les cellules B de la zone marginale (MZB) sont capables de proliférer de manière T-indépendante. De plus, il existe, chez ces souris Aire $-/-$, une augmentation des taux de cytokine BAFF (B cell Activating Factor of the TNF family) qui contribue à l'activation des lymphocytes B notamment les MZB les rendant plus enclins à la production d'auto-anticorps et à la présentation d'antigènes [151]. Chez l'homme, 20% des cellules B matures expriment des auto-anticorps de faible affinité. Durant la lymphopoïèse B, plusieurs points de contrôle situés à différentes étapes de la maturation permettraient de reconnaître et d'éliminer les cellules B auto-réactives [152]. Un ou plusieurs de ces points de contrôle semblent être pris à défaut dans certaines pathologies auto-immunes, comme le lupus [153]. La différenciation des cellules B transitionnelles en cellules B MZB-like s'accompagne d'un passage par un point de contrôle responsable d'une chute du nombre de cellules autoréactives [154]. Un des éléments régulateurs de cette transition entre cellules B immatures et matures est la cytokine BAFF. En effet, à l'état physiologique, une compétition s'opèrerait entre cellules auto-réactives et cellules non auto-réactives en fonction de la concentration de BAFF. L'excès de production de BAFF pourrait être responsable d'un défaut d'élimination des cellules B autoréactives et plus particulièrement des cellules MZB-like. Or, chez les patients atteints de syndrome APECED, les taux sériques de BAFF sont accrus [151], ce qui pourrait contribuer à l'activation des cellules B de type MZ, aux dépens des cellules B naïves et transitionnelles.

PARTIE IV: CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La PEA1 constitue, par son origine monogénique, un excellent modèle pour la compréhension de l'auto-immunité spécifique d'organe. Initialement supposée T-dépendante, cette pathologie apparaît beaucoup plus complexe aujourd'hui. Elle semble impliquer d'autres cellules immunocompétentes de l'immunité innée ou adaptative. Nous avons surtout orienté nos travaux sur l'analyse des B lymphocytes et sur le répertoire B. Nos résultats sont en faveur d'une telle hypothèse.

Si la présence d'AC vis à vis de nouvelles cibles antigéniques tissus-spécifiques est un argument supplémentaire qui confirme bien l'existence de perturbations du répertoire B d'origine T-dépendante, la présence d'AC vis à vis de cibles ubiquitaires plaide en revanche pour une altération du répertoire B T-indépendant. Ces perturbations touchent à la fois le répertoire systémique auto-réactif IgG et systémique IgM. A la lumière de nos premiers résultats, une activation inappropriée des signaux de danger ou une hyperactivation des sous-populations lymphocytaires de type MZ-B like peuvent être suggérées. Dans ce contexte, il n'est pas exclu que les anomalies T-indépendantes dans la PEA1 mises en évidence impliquent une atteinte de l'immunité naturelle.

A la suite de ce travail, plusieurs perspectives de recherche peuvent être envisagées, grâce notamment à la mise en place d'un PHRC national sur cette thématique en 2009. Il ouvre en effet les perspectives d'un recrutement plus large de patients dans cette pathologie rare, en tentant de rassembler l'ensemble des cas français. Nous espérons ainsi confirmer ces résultats sur une cohorte plus représentative de patients, mais également élargir les axes de recherche à la fois à visée fondamentale, mais également en vue d'applications cliniques.

A. Poursuite du travail débuté sur les immuno-empreintes

1. Confirmation des résultats d'immuno-empreintes en IgM et IgG

Grâce au PHRC national débuté depuis juillet 2009 dans lequel une cinquantaine de patients est attendue, nous comptons donc poursuivre la réalisation d'immuno-empreintes IgM et IgG afin de confirmer nos résultats. Nous envisageons surtout la réalisation d'analyses

séquentielles afin d'estimer la stabilité de ce répertoire dans le temps puisque les patients vont être prélevés de manière annuelle pendant au moins 3 années consécutives. Ceci pourrait également nous permettre d'évaluer de manière qualitative l'évolution de l'auto-réactivité IgG et IgM respective vis à vis des Ag cibles mis en évidence par la présente analyse, et de mieux en comprendre la signification. Si l'effectif s'avérait suffisant, nous pourrions également effectuer une analyse par sous groupes, constitués selon les atteintes cliniques des patients.

2. Poursuite de l'étude de l'auto-réactivité parathyroïdienne

Nous poursuivrons également l'analyse des immuno-empreintes qui ont été débutées sur le tissu parathyroïdien. Les cibles de l'auto-réactivité parathyroïdienne dans la PEA1 et dans d'autres hypoparathyroïdies autoimmunes sont encore mal connues à l'exception du récepteur sensible au calcium et de NALP5. La recherche de nouveaux antigènes candidats par l'analyse des profils d'auto-réactivité IgG et IgM a été initiée, les cibles antigéniques d'une auto-réactivité spécifique seront caractérisées par les techniques d'immuno-protéomique.

En parallèle, un projet d'identification des épitopes cibles d'auto-réactivité au sein du récepteur sensible au calcium et de NALP5 par puces protéiques (Innobiochips) est mené dans le cadre du PHRC. Les premiers résultats sont en cours d'interprétation.

3. Etude des profils sérologiques anti-Candida albicans

Les récentes découvertes concernant la participation des mécanismes auto-immuns impliquant des AC dirigés contre les cytokines de type IL-17 (défaillance des processus de défense) nous incite à étudier les profils de réactivité sérologique vis-à-vis de différents antigènes candidosiques chez des patients ayant une candidose, avec ou sans PEA1. Dans cette perspective, une collaboration avec le laboratoire du Pr Poulain, par l'intermédiaire du Dr Boualem Sendid (U 799, Physiopathologie des Candidoses) a été engagée.

B. De l'immunité humorale à l'homéostasie B

Nous souhaiterions confirmer les données préliminaires concernant les cellules B naïves et transitionnelles, mais aussi les cellules MZB-like qui semblent être activées dans la PEA1. Cet état de « priming » pourrait induire une production inappropriée d'auto-AC. Chez ces patients, les taux de BAFF sont également augmentés en comparaison des taux observés chez les sujets sains. Nous proposons donc de poursuivre des immunophénotypages lymphocytaires B chez les patients atteints de PEA1, en les comparant à 2 groupes contrôles appariés pour l'âge et le sexe (groupe de PEA2 déjà constitué, et cohorte de sujets sains récemment établie au laboratoire [106]). Conjointement, un dosage de BAFF sérique par test ELISA sera réalisé à la recherche d'une corrélation entre les taux de BAFF et le nombre de cellules MZB-like.

Le modèle murin Aire^{-/-} constitue une aide précieuse à la compréhension de la PEA1. Il est envisageable de réaliser une étude séquentielle du répertoire auto-réactif naturel de ces souris notamment avant et après l'apparition des signes cliniques et des infiltrats lymphocytaires. Cette analyse accompagnée de dosages de BAFF et d'immunophénotypages lymphocytaires B (MZ) permettrait de déterminer si les modifications du répertoire précèdent l'apparition de la pathologie ou y sont associées. Cette approche nécessitera la mise en place d'une collaboration avec des équipes internationales avec lesquelles des contacts ont déjà été engagés.

C. Du laboratoire à la clinique

L'utilisation de protéines recombinantes devrait nous permettre de confirmer la présence d'une auto-réactivité vis à vis de ces cibles pancréatiques tissus-spécifiques (amylase, lipase, Reg1A) et surrénaliennes (aldose réductase) dans la PEA1. Une collaboration avec une cellule de biotechnologie associée à l'Université de Lille 2 est en cours, pour la réalisation de « micro-arrays » (Innobiochips). Dans un second temps, après la validation des antigènes cibles à valeur diagnostique et/ou pronostique, la mise en place de tests ELISA nous autoriserait à réaliser cette recherche de manière plus aisée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Cohen IR, *The cognitive paradigm and the immunological homunculus*. Immunol Today, 1992. **13**: p. 490-4.
2. Mouthon L, Nobrega A, Nicolas N, Kaveri SV, Barreau C, Coutinho A, Kazatchkine MD, *Invariance and restriction toward a limited set of self-antigens characterize neonatal IgM antibody repertoires and prevail in autoreactive repertoires of healthy adults*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**: p. 3839-43.
3. Mouthon L, Haury M, Lacroix-Desmazes S, Barreau C, Coutinho A, Kazatchkine MD, *Analysis of the normal human IgG antibody repertoire. Evidence that IgG autoantibodies of healthy adults recognize a limited and conserved set of protein antigens in homologous tissues*. J Immunol, 1995. **154**: p. 5769-78.
4. Mouthon L, Lacroix-Desmazes S, Nobrega A, Barreau C, Coutinho A, Kazatchkine MD, *The self-reactive antibody repertoire of normal human serum IgM is acquired in early childhood and remains conserved throughout life*. Scand J Immunol, 1996. **44**: p. 243-51.
5. Lefranc D, Almeras L, Dubucquoi S, de Seze J, Vermersch P, Prin L, *Distortion of the self-reactive IgG antibody repertoire in multiple sclerosis as a new diagnostic tool*. J Immunol, 2004. **172**: p. 669-78.
6. Lefranc D, Launay D, Dubucquoi S, de Seze J, Dussart P, Vermersch M, Hachulla E, Hatron PY, Vermersch P, Mouthon L, Prin L, *Characterization of discriminant human brain antigenic targets in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus using an immunoproteomic approach*. Arthritis Rheum, 2007. **56**: p. 3420-32.
7. Zéphir H, Lefranc D, Dubucquoi S, de Seze J, Boron L, Prin L, Vermersch P., *Serum IgG repertoire in clinically isolated syndrome predicts multiple sclerosis*. Mult Scler, 2009. **15**: p. 593-600.
8. Almeras L, Lefranc D, Drobecq H, de Seze J, Dubucquoi S, Vermersch P, Prin L, *New antigenic candidates in multiple sclerosis: identification by serological proteome analysis*. Proteomics, 2004. **4**: p. 2184-94.
9. Scholz C, Patton KT, Anderson DE, Freeman GJ, Hafler DA, *Expansion of autoreactive T cells in multiple sclerosis is independent of exogenous B7 costimulation*. J Immunol, 1998. **160**: p. 1532-8.
10. Aaltonen J, Bjorses P, Sandkuijl L, Perheentupa J, Peltonen L, *An autosomal locus causing autoimmune disease: autoimmune polyglandular disease type I assigned to chromosome 21*. Nat Genet, 1994. **8**: p. 83-7.
11. Rosatelli MC, Meloni A, Meloni A, Devoto M, Cao A, Scott HS, Peterson P, Heino M, Krohn KJ, Nagamine K, Kudoh J, Shimizu N, Antonarakis SE. , *A common mutation in Sardinian autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy patients*. Hum Genet, 1998. **103**: p. 428-34.
12. Zlotogora J, Shapiro MS., *Polyglandular autoimmune syndrome type I among Iranian Jews*. J Med Genet, 1992. **29**(11): p. 824-6.
13. Wolff AS, Erichsen MM, Meager A, Magitta NF, Myhre AG, Bollerslev J, Fougner KJ, Lima K, Knappskog PM, Husebye ES,

- Autoimmune polyendocrine syndrome type 1 (APS I) in Norway - phenotypic variation, autoantibodies and novel mutations in the autoimmune regulator (AIRE) gene.* J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**: p. 595-603.
14. Podkrajsek KT, Bratanic N, Krzisnik C, Battelino T, *Autoimmune regulator-1 messenger ribonucleic acid analysis in a novel intronic mutation and two additional novel AIRE gene mutations in a cohort of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy patients.* J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**: p. 4930-35.
 15. Stolarski B, Pronicka E, Korniszewski L, Pollak A, Kostrzewa G, Rowinska E, Wlodarski P, Skorka A, Gremida M, Krajewski P, Ploski R, *Molecular background of polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy syndrome in a Polish population: novel AIRE mutations and an estimate of disease prevalence.* Clin Genet, 2006. **70**: p. 348-54
 16. Dominguez M, Crushell E, Ilmarinen T, McGovern E, Collins S, Chang B, Fleming P, Irvine AD, Brosnahan D, Ulmanen I, Murphy N, Costigan C, *Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) in the Irish population.* J Pediatr Endocrinol Metab, 2006. **19**: p. 1343-52.
 17. Whitaker J, Landing BH, Esselborn VM, Williams RR, *The syndrome of familial juvenile hypoadrenocorticism, hypoparathyroidism and superficial moniliasis.* J Endocrinol, 1956. **16**: p. 1374-87.
 18. Perheentupa J, *Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy.* J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**: p. 2843-50.
 19. Ahonen P, Myllarniemi S, Sipila I, Perheentupa J, *Clinical variation of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) in a series of 68 patients.* N Engl J Med, 1990. **322**: p. 1829-36.
 20. Betterle C, Greggio NA, Volpato M, *Clinical review 93: Autoimmune polyglandular syndrome type 1.* J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**: p. 1049-55.
 21. Proust-Lemoine E, Wémeau JL, *APECED or Auto-immune Polyglandular syndrome type 1: an update.* Press Med, **37**: p. 1158-71.
 22. Myhre AG, Halonen M, Eskelin P, Ekwall O, Hedstrand H, Rorsman F, Kampe O, Husebye ES, *Autoimmune polyendocrine syndrome type 1 (APS I) in Norway.* Clin Endocrinol (Oxf), 2001. **54**(2): p. 211-17.
 23. Nishikawa Y, H.F., Yano M, Kitajima H, Miyazaki J, Kawamoto H, Mouri Y, Matsumoto M, *Biphasic Aire expression in early embryos and in medullary thymic epithelial cells before end-stage terminal differentiation.* J Exp Med, 2010. **207**: p. 963-71.
 24. Hervier B, Rimbart M, Maisonneuve H, Hamidou MA, *Large granular lymphocyte leukemia with pure red cell aplasia associated with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy: an unfortuitous association?* Int J Immunopathol Pharmacol, 2010. **23**: p. 947-50.
 25. Neufeld M, Maclaren N, Blizzard R, *Autoimmune polyglandular syndromes.* Pediatr Ann, 1980 **9**: p. 154-162

26. Betterle C, Zanchetta R, *Update on autoimmune polyendocrine syndromes (APS)*. Acta Biomed Ateneo Parmense, 2003. **74**: p. 9-33.
27. Michels AW, Eisenbarth GS, *Autoimmune polyendocrine syndrome type 1 (APS-1) as a model for understanding autoimmune polyendocrine syndrome type 2 (APS-2)*. J Intern Med, 2009. **265**: p. 530-40.
28. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD, *The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3*. Nat Genet, 2001. **27**: p. 20-21.
29. Cheng MH, Fan U, Grewal N, Barnes M, Mehta A, Taylor S, Husebye ES, Murphy EJ, Anderson MS, *Acquired autoimmune polyglandular syndrome, thymoma, and an AIRE defect*. N Engl J Med, 2010. **362**: p. 764-6.
30. Meloni A, Furcas M, Cetani F, Marcocci C, Falorni A, Perniola R, Pura M, Bøe Wolff AS, Husebye ES, Lilic D, Ryan KR, Gennery AR, Cant AJ, Abinun M, Spickett GP, Arkwright PD, Denning D, Costigan C, Dominguez M, McConnell V, Willcox N, Meager A., *Autoantibodies against type I interferons as an additional diagnostic criterion for autoimmune polyendocrine syndrome type I*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**: p. 4389-97.
31. Kisand K, Boe Wolff AS, Podkrajsek KT, Tserel L, Link M, Kisand KV, Ersvaer E, Perheentupa J, Erichsen MM, Bratanic N, Meloni A, Cetani F, Perniola R, Ergun-Longmire B, Maclaren N, Krohn KJ, Pura M, Schalke B, Ströbel P, Leite MI, Battelino T, Husebye ES, Peterson P, Willcox N, Meager A, *Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines*. J Exp Med, 2010 **207**: p. 299-308.
32. Marx A, Willcox N, Leite MI, Chuang WY, Schalke B, Nix W, Ströbel P, *Thymoma and paraneoplastic myasthenia gravis*. Autoimmunity., 2010. **43**: p. 413-27.
33. Mayer A, Ploix C, Orgiazzi J, Desbos A, Moreira A, Vidal H, Monier JC, Bienvenu J, Fabien N, *Calcium-sensing receptor autoantibodies are relevant markers of acquired hypoparathyroidism*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**: p. 4484-8.
34. Li Y, Song YH, Rais N, Connor E, Schatz D, Muir A, Maclaren N, *Autoantibodies to the extracellular domain of the calcium sensing receptor in patients with acquired hypoparathyroidism*. J Clin Invest, 1996. **97**: p. 910-14
35. Alimohammadi M, Björklund P, Hallgren A, Pöntynen N, Szinnai G, Shikama N, Keller MP, Ekwall O, Kinkel SA, Husebye ES, Gustafsson J, Rorsman F, Peltonen L, Betterle C, Perheentupa J, Akerström G, Westin G, Scott HS, Holländer GA, Kämpe O, *Autoimmune polyendocrine syndrome type 1 and NALP5, a parathyroid autoantigen*. N Engl J Med, 2008. **358**: p. 1018-28.
36. Soderbergh A, Myhre AG, Ekwall O, Gebre-Medhin G, Hedstrand H, Landgren E, Miettinen A, Eskelin P, Halonen M, Tuomi T, Gustafsson J, Husebye ES, Perheentupa J, Gylling M, Manns MP, Rorsman F,

- Kampe O, Nilsson T *Prevalence and clinical associations of 10 defined autoantibodies in autoimmune polyendocrine syndrome type I*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**: p. 557-62.
37. Chen S, Sawicka J, Betterle C, Powell M, Prentice L, Volpato M, Rees Smith B, Furmaniak J, *Autoantibodies to steroidogenic enzymes in autoimmune polyglandular syndrome, Addison's disease, and premature ovarian failure*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**: p. 1871-1876.
38. Perniola R, Falorni A, Clemente MG, Forini F, Accogli E, Lobreglio G, *Organ-specific and non-organ-specific autoantibodies in children and young adults with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED)*. Eur J Endocrinol, 2000. **143**: p. 497-503.
39. Bensing S, Fetisov SO, Mulder J, Perheentupa J, Gustafsson J, Husebye ES, Oscarson M, Ekwall O, Crock PA, Hokfelt T, Hulting AL, Kampe O, *Pituitary autoantibodies in autoimmune polyendocrine syndrome type I*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(3): p. 949-954.
40. O'Dwyer DT, Mac Elduff P, Peterson P, Perheentupa J, Crock PA., *Pituitary autoantibodies in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED)*. Acta Biomed, 2007. **78**: p. 248-54.
41. Ekwall O, Hedstrand H, Haavik J, Perheentupa J, Betterle C, Gustafsson J, Husebye E, Rorsman F, Kampe O, *Pteridin-dependent hydroxylases as autoantigens in autoimmune polyendocrine syndrome type I*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**: p. 2944-50.
42. Skoldberg F, Portela-Gomes GM, Grimelius L, Nilsson G, Perheentupa J, Betterle C, Husebye ES, Gustafsson J, Ronnblom A, Rorsman F, Kampe O, *Histidine Decarboxylase, a Pyridoxal Phosphate-Dependent Enzyme, Is an Autoantigen of Gastric Enterochromaffin-Like Cells*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**: p. 1445-52.
43. Obermayer-Straub P, Perheentupa J, Braun S, Kayser A, Barut A, Loges S, Harms A, Dalekos G, Strassburg CP, Manns MP, *Hepatic autoantigens in patients with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy*. Gastroenterology, 2001. **121**: p. 668-77.
44. Hedstrand H, Perheentupa J, Ekwall O, Gustafsson J, Michaelsson G, Husebye E, Rorsman F, Kampe O, *Antibodies against hair follicles are associated with alopecia totalis in autoimmune polyendocrine syndrome type I*. J Invest Dermatol, 1999. **113**: p. 1054-58.
45. Hedstrand H, Ekwall O, Haavik J, Landgren E, Betterle C, Perheentupa J, Gustafsson J, Husebye E, Rorsman F, Kampe O, *Identification of tyrosine hydroxylase as an autoantigen in autoimmune polyendocrine syndrome type I*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **267**: p. 456-61.
46. Hedstrand H, Ekwall O, Olsson MJ, Landgren E, Kemp EH, Weetman AP, Perheentupa J, Husebye E, Gustafsson J, Betterle C, Kampe O, Rorsman F, *The transcription factors SOX9 and SOX10 are vitiligo autoantigens in autoimmune polyendocrine syndrome type I*. J Biol Chem, 2001. **276**: p. 35390-5.

47. Alimohammadi M, Dubois N, Sköldbberg F, Hallgren A, Tardivel I, Hedstrand H, Haavik J, Husebye ES, Gustafsson J, Rorsman F, Meloni A, Janson C, Vialettes B, Kajosaari M, Egner W, Sargur R, Pontén F, Amoura Z, Grimfeld A, De Luca F, Betterle C, Perheentupa J, Kämpe O, Carel JC, *Pulmonary autoimmunity as a feature of autoimmune polyendocrine syndrome type 1 and identification of KCNRG as a bronchial autoantigen*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**: p. 4396-4401.
48. Meager A, Visvalingam K, Peterson P, Moll K, Murumagi A, Krohn K, Eskelin P, Perheentupa J, Husebye E, Kadota Y, Willcox N, *Anti-Interferon Autoantibodies in Autoimmune Polyendocrinopathy Syndrome Type 1*. PLoS Med, 2006 **3**: p. e289
49. Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P., *Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice*. J Infect Dis, 2004. **190**: p. 624-31.
50. Netea MG, M.L., *Innate immune mechanisms for recognition and uptake of Candida species*. Trends Immunol, 2010. **31**: p. 346-53.
51. Puel A, Döffinger R, Natividad A, Chrabieh M, Barcenas-Morales G, Picard C, Cobat A, Ouachée-Chardin M, Toulon A, Bustamante J, Al-Muhsen S, Al-Owain M, Arkwright PD, Costigan C, McConnell V, Cant AJ, Abinun M, Polak M, Bougnères PF, Kumararatne D, Marodi L, Nahum A, Roifman C, Blanche S, Fischer A, Bodemer C, Abel L, Lilic D, Casanova JL., *Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type 1*. J Exp Med, 2010. **207**: p. 291-7.
52. Consortium, T.F.-G.A., *An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. The Finnish-German APECED Consortium. Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy*. Nat Genet, 1997. **17**: p. 399-403.
53. Nagamine K, Peterson P, Scott HS, Kudoh J, Minoshima S, Heino M, Krohn KJ, Lalioti MD, Mullis PE, Antonarakis SE, Kawasaki K, Asakawa S, Ito F, Shimizu N *Positional cloning of the APECED gene*. Nat Genet., 1997. **17**: p. 393-8.
54. Heino M, Peterson P, Kudoh J, Nagamine K, Lagerstedt A, Ovod V, Ranki A, Rantala I, Nieminen M, Tuukkanen J, Scott HS, Antonarakis SE, Shimizu N, Krohn K and *Autoimmune regulator is expressed in the cells regulating immune tolerance in thymus medulla*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **257**: p. 821-5.
55. Kogawa K, Nagafuchi S, Katsuta H, Kudoh J, Tamiya S, Sakai Y, Shimizu N, Harada M, *Expression of AIRE gene in peripheral monocyte/dendritic cell lineage*. Immunol Lett, 2002. **80**: p. 195-8.
56. Ferguson BJ, Alexander C, Rossi SW, Liiv I, Rebane A, Worth CL, Wong J, Laan M, Peterson P, Jenkinson EJ, Anderson G, Scott HS, Cooke A, Rich T, *AIRE's CARD revealed, a new structure for central tolerance provokes transcriptional plasticity*. J Biol Chem, 2008. **283**: p. 1723-31.

57. Bjorses P, Halonen M, Palvimo JJ, Kolmer M, Aaltonen J, Ellonen P, Perheentupa J, Ulmanen I, Peltonen L, *Mutations in the AIRE gene: effects on subcellular location and transactivation function of the autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy protein* Am J Hum Genet, 2000. **66**: p. 378-92.
58. Pitkanen J, Vahamurto P, Krohn K, Peterson P, *Subcellular localization of the autoimmune regulator protein. characterization of nuclear targeting and transcriptional activation domain.* J Biol Chem, 2001. **276**: p. 19597-602.
59. Halonen M, Eskelin P, Myhre AG, Perheentupa J, Husebye ES, Kampe O, Rorsman F, Peltonen L, Ulmanen I, Partanen J, *AIRE mutations and human leukocyte antigen genotypes as determinants of the autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy phenotype.* J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**: p. 2568-74.
60. Pitkanen J, Doucas V, Sternsdorf T, Nakajima T, Aratani S, Jensen K, Will H, Vahamurto P, Ollila J, Vihinen M, Scott HS, Antonarakis SE, Kudoh J, Shimizu N, Krohn K, Peterson P, *The autoimmune regulator protein has transcriptional transactivating properties and interacts with the common coactivator CREB-binding protein.* J Biol Chem, 2000. **275**: p. 16802-9
61. Oven I, Brdicková N, Kohoutek J, Vaupotic T, Narat M, Peterlin BM., *AIRE recruits P-TEFb for transcriptional elongation of target genes in medullary thymic epithelial cells.* Mol Cell Biol, 2007. **27**: p. 8815-23.
62. Liiv I, Rebane A, Org T, Saare M, Maslovskaja J, Kisand K, Juronen E, Valmu L, Bottomley MJ, Kalkkinen N, Peterson P., *DNA-PK contributes to the phosphorylation of AIRE: importance in transcriptional activity.* Biochim Biophys Acta, 2008. **1783**: p. 74-83.
63. Gardner JM, Fletcher AL, Anderson MS, Turley SJ, *AIRE in the thymus and beyond.* Curr Opin Immunol, 2009. **21**: p. 582-9.
64. Chakravarty S, Zheng L, Zhou MM., *Structure and site-specific recognition of histone H3 by the PHD finger of human autoimmune regulator.* Structure, 2009. **17**: p. 670-9.
65. Uchida D, Hatakeyama S, Matsushima A, Han H, Ishido S, Hotta H, Kudoh J, Shimizu N, Doucas V, Nakayama KI, Kuroda N, Matsumoto M, *AIRE functions as an E3 ubiquitin ligase.* J Exp Med, 2004. **199**: p. 167-72.
66. Mathis D, Benoist C, *Aire.* Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 287-312.
67. Johnnidis JB, Venanzi ES, Taxman DJ, Ting JP, Benoist CO, Mathis DJ, *Chromosomal clustering of genes controlled by the aire transcription factor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**: p. 7233-8
68. Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, von Boehmer H, Bronson R, Dierich A, Benoist C, Mathis D, *Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein.* Science, 2002. **298**: p. 1395-401.
69. Gardner JM, DeVoss JJ, Friedman RS, Wong DJ, Tan XT, Zhou X, Johannes KP, Su MA, Chang HY, Krummel MF, Anderson MS, *Deletional tolerance mediated by extrathymic Aire-expressing cells.* Science, 2008. **321**: p. 843-47.

70. Derbinski J, Pinto S, Rosch S, Hexel K, Kyewski B, *Promiscuous gene expression patterns in single medullary thymic epithelial cells argue for a stochastic mechanism.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**: p. 657-62.
71. Villaseñor J, Besse W, Benoist C, Mathis D, *Ectopic expression of peripheral-tissue antigens in the thymic epithelium: probabilistic, monoallelic, misinitiated.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**: p. 15854-59.
72. Chin RK, Lo JC, Kim O, Blink SE, Christiansen PA, Peterson P, Wang Y, Ware C, Fu YX, *Lymphotoxin pathway directs thymic Aire expression.* Nat Immunol, 2003. **4**: p. 1121-7.
73. Boehm T, Scheu S, Pfeffer K, Bleul CC, *Thymic medullary epithelial cell differentiation, thymocyte emigration, and the control of autoimmunity require lympho-epithelial cross talk via LTbetaR.* J Exp Med, 2003. **198**: p. 757-69.
74. Seach N, Ueno T, Fletcher AL, Lowen T, Mattesich M, Engwerda CR, Scott HS, Ware CF, Chidgey AP, Gray DH, Boyd RL, *The lymphotoxin pathway regulates Aire-independent expression of ectopic genes and chemokines in thymic stromal cells.* J Immunol, 2008. **180**: p. 5384-92.
75. Akiyama T, Maeda S, Yamane S, Ogino K, Kasai M, Kajiura F, Matsumoto M, Inoue J, *Dependence of self-tolerance on TRAF6-directed development of thymic stroma.* Science, 2005. **308**: p. 248-51.
76. Akiyama T, Shimo Y, Yanai H, Qin J, Ohshima D, Maruyama Y, Asaumi Y, Kitazawa J, Takayanagi H, Penninger JM, Matsumoto M, Nitta T, Takahama Y, Inoue J, *The tumor necrosis factor family receptors RANK and CD40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance.* Immunity, 2008. **29**: p. 423-37.
77. Derbinski J, Schulte A, Kyewski B, Klein L, *Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self.* Nat Immunol, 2001. **2**: p. 1032-9
78. Ramsey C, Winqvist O, Puhakka L, Halonen M, Moro A, Kampe O, Eskelin P, Pelto-Huikko M, Peltonen L, *Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response.* Hum Mol Genet, 2002. **11**: p. 397-409.
79. Jiang W, Anderson MS, Bronson R, Mathis D, Benoist C, *Modifier loci condition autoimmunity provoked by Aire deficiency.* J Exp Med, 2005. **202**: p. 805-15.
80. Liston A, Lesage S, Wilson J, Peltonen L, Goodnow CC, *Aire regulates negative selection of organ-specific T cells.* Nat Immunol, 2003. **4**: p. 350-4.
81. Liston A, Gray DH, Lesage S, Fletcher AL, Wilson J, Webster KE, Scott HS, Boyd RL, Peltonen L, Goodnow CC, *Gene dosage-limiting role of Aire in thymic expression, clonal deletion, and organ-specific autoimmunity.* J Exp Med, 2004. **200**: p. 1015-26.
82. Gray DHD, Abramson J, Benoist C, Mathis D, *Proliferative arrest and rapid turnover of thymic epithelial cells expressing Aire.* J Exp Med, 2007. **204**: p. 2521-28.

83. Farr AG, Dooley JL, Erickson M, *Organization of thymic medullary epithelial heterogeneity: implications for mechanisms of epithelial differentiation*. Immunol Rev, 2002. **189**: p. 20-7.
84. Gillard GO, Farr AG, *Contrasting models of promiscuous gene expression by thymic epithelium*. J Exp Med, 2005. **202**: p. 15-9.
85. Wing K, Sagakuchi S, *Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity*. Nat Immunol, 2010. **11**: p. 7-13.
86. Kuroda N, Mitani T, Takeda N, Ishimaru N, Arakaki R, Hayashi Y, Bando Y, Izumi K, Takahashi T, Nomura T, Sakaguchi S, Ueno T, Takahama Y, Uchida D, Sun S, Kajiura F, Mouri Y, Han H, Matsushima A, Yamada G, Matsumoto M *Development of autoimmunity against transcriptionally unrepressed target antigen in the thymus of Aire-deficient mice*. J Immunol, 2005. **174**: p. 1862-70.
87. Anderson MS, Venanzi ES, Chen Z, Berzins SP, Benoist C, Mathis D, *The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance*. Immunity, 2005. **23**: p. 227-39.
88. Daniely D, K.J., Cebula A, Ignatowicz L., *Diversity of TCRs on natural Foxp3+ T cells in mice lacking Aire expression*. J Immunol, 2010. **184**: p. 6865-73.
89. Kekalainen E, Tuovinen H, Joensuu J, Gylling M, Franssila R, Pontynen N, Talvensaari K, Perheentupa J, Miettinen A, Arstila TP, *A defect of regulatory T cells in patients with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy*. J Immunol, 2007. **178**(2): p. 1208-1215.
90. Wolff AS, Oftedal BE, Kisand K, Ersvaer E, Lima K, Husebye ES, *Flow cytometry study of blood cell subtypes reflects autoimmune and inflammatory processes in autoimmune polyendocrine syndrome type I*. Scand J Immunol., 2010. **71**: p. 459-67.
91. Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito T, Wang YH, Cao W, Liu YJ, *Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus*. Nature, 2005. **436**: p. 1181-85.
92. Laakso SM, Laurinolli TT, Rossi LH, Lehtoviita A, Sairanen H, Perheentupa J, Kekäläinen E, Arstila TP, *Regulatory T cell defect in APECED patients is associated with loss of naive FOXP3(+) precursors and impaired activated population*. J Autoimmun, 2010. **35**: p.251-7.
93. Ramsey C, Hassler S, Marits P, Kampe O, Surh CD, Peltonen L, Winqvist O, *Increased antigen presenting cell-mediated T cell activation in mice and patients without the autoimmune regulator*. Eur J Immunol, 2006. **36**: p. 305-17.
94. Lee JW, Epardaud M, Sun J, Becker JE, Cheng AC, Yonekura AR, Heath JK, Turley SJ, *Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes T cell tolerance to intestinal self*. Nat Immunol, 2007. **8**: p. 181-90.
95. Cohen JN, Guidi CJ, Tewalt EF, Qiao H, Rouhani SJ, Ruddell A, Farr AG, Tung KS, Engelhard VH., *Lymph node-resident lymphatic endothelial cells mediate peripheral tolerance via Aire-independent direct antigen presentation*. J Exp Med, 2010. **207**: p. 681-8.

96. Devoss JJ, Shum AK, Johannes KP, Lu W, Krawisz AK, Wang P, Yang T, Leclair NP, Austin C, Strauss EC, Anderson MS, *Effector mechanisms of the autoimmune syndrome in the murine model of autoimmune polyglandular syndrome type 1*. J Immunol, 2008. **181**: p. 4072-79.
97. Gavanescu I, Benoist C, Mathis D, *B cells are required for Aire-deficient mice to develop multi-organ autoinflammation: a therapeutic approach for APECED patients*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**: p. 13009-14.
98. Hasan M, Polic B, Bralic M, Jonjic S, Rajewsky K, *Incomplete block of B cell development and immunoglobulin production in mice carrying the muMT mutation on the BALB/c background*. Eur J Immunol, 2002 **32**: p. 3463-71.
99. Mi QS, Deng ZB, Joshi SK, Wang ZZ, Zhou L, Eckenrode S, Joshi R, Ly D, Yi B, Delovitch TL, She JX, *The autoimmune regulator (Aire) controls iNKT cell development and maturation*. Nat Med, 2006. **12**: p. 624-6.
100. Mi QS, Deng ZB, Joshi SK, Wang ZZ, Zhou L, Eckenrode S, Joshi R, Ly D, Yi B, Delovitch TL, She JX, *Retraction*. Nat Med, 2006 **12**: p. 624-6.
101. Lindh E, Rosmaraki E, Berg L, Brauner H, Karlsson MC, Peltonen L, Höglund P, Winqvist O, *AIRE deficiency leads to impaired iNKT cell development*. J Autoimmun, 2010. **34**: p. 66-72.
102. Ng WF, Tudhope SJ, von Delwig A, Lilic D, *Invariant natural killer T (iNKT) cell deficiency in chronic mucocutaneous candidiasis - A consequence or a cause?* Immunol Lett, 2010. **Oct 12**. [Epub ahead of print].
103. Malanchère E, Marcos MA, Nobrega A, Coutinho A., *Studies on the T cell dependence of natural IgM and IgG antibody repertoires in adult mice*. Eur J Immunol., 1995. **25**: p. 1358-65.
104. Merbl Y, Zucker-Toledano M, Quintana FJ, Cohen IR, *Newborn humans manifest autoantibodies to defined self molecules detected by antigen microarray informatics*. J Clin Invest, 2007. **117**: p. 712-8.
105. Hassler S, Ramsey C, Karlsson MC, Larsson D, Herrmann B, Rozell B, Backheden M, Peltonen L, Kampe O, Winqvist O, *Aire deficient mice develop hematopoietic irregularities and marginal zone B cell lymphoma*. Blood, 2006. **108**: p. 1941-48.
106. Lee-Chang C, Lefranc D, Salleron J, Faveeuw C, Allet C, Vermersch P, Oxombre B, Prin L, *Susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis is associated with altered B-cell subsets distribution and decreased serum BAFF levels*. Immunol Lett, 2010. **Sous presse**.
107. Coutinho A, Kazatchkine M, Avrameas S., *Natural autoantibodies*. Curr Opin Immunol, 1995. **7**: p. 812-8.
108. Lacroix-Desmazes S, Mouthon L, Kaveri SV, Kazatchkine MD, Weksler ME. *Stability of natural self-reactive antibody repertoires during aging*. Stability of natural self-reactive antibody repertoires during aging. J Clin Immunol, 1999. **19**: p. 26-34.
109. Madi A, Hecht I, Bransburg-Zabary S, Merbl Y, Pick A, Zucker-Toledano M, Quintana FJ, Tauber AI, Cohen IR, Ben-Jacob E,

- Organization of the autoantibody repertoire in healthy newborns and adults revealed by system level informatics of antigen microarray data.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**: p. 14484-9.
110. Lacroix-Desmazes S, Mouthon L, Coutinho A, Kazatchkine MD, *Analysis of the natural human IgG antibody repertoire: life-long stability of reactivities towards self antigens contrasts with age-dependent diversification of reactivities against bacterial antigens.* Eur J Immunol, 1995. **25**: p. 2598-604.
 111. Plotz PH, *The autoantibody repertoire: searching for order.* Nat Rev Immunol., 2003 **3**: p. 73-8.
 112. Song YH, Connor EL, Muir A, She JX, Zorovich B, Derovanesian D, Maclaren N, *Autoantibody epitope mapping of the 21-hydroxylase antigen in autoimmune Addison's disease.* J Clin Endocrinol Metab, 1994. **78**: p. 1108-12.
 113. Uiho R, Aavik E, Peterson P, Perheentupa J, Aranko S, Pelkonen R, Krohn KJ, *Autoantibodies to cytochrome P450 enzymes P450_{scc}, P450_{c17}, and P450_{c21} in autoimmune polyglandular disease types I and II and in isolated Addison's disease* J Clin Endocrinol Metab, 1994. **78**: p. 323-28.
 114. Krohn K, Uiho R, Aavik E, Peterson P, Savilahti K, *Identification by molecular cloning of an autoantigen associated with Addison's disease as steroid 17 alpha-hydroxylase.* Lancet, 1992. **339**: p. 770-73.
 115. Winqvist O, Gustafsson J, Rorsman F, Karlsson FA, Kampe O, *Two different cytochrome P450 enzymes are the adrenal antigens in autoimmune polyendocrine syndrome type I and Addison's disease.* J Clin Invest, 1993. **92**: p. 2377-85.
 116. Winqvist O, Gebre-Medhin G, Gustafsson J, Ritzen EM, Lundkvist O, Karlsson FA, Kampe O, *Identification of the main gonadal autoantigens in patients with adrenal insufficiency and associated ovarian failure.* J Clin Endocrinol Metab, 1995. **80**: p. 1717-1723
 117. Michels AW, Gottlieb PA, *Autoimmune polyglandular syndromes.* Nat Rev Endocrinol, 2010. **6**: p. 270-7.
 118. Mathur EJ, Grimshaw CE, *Immunoquantitation of aldose reductase in human tissues.* Anal Biochem, 1989. **176**: p. 66-71.
 119. Lambert-Langlais S, Pointud J, Lefrançois-Martinez AM, Volat F, Manin M, Coudoré F, Val P, Sahut-Barnola I, Ragazzon B, Louiset E, Delarue C, Lefebvre H, Urade Y, Martinez A, *Aldo keto reductase 1B7 and prostaglandin F2alpha are regulators of adrenal endocrine functions.* PLoS One, 2009. **4**: p. e7309.
 120. Gavanescu I, Kessler B, Ploegh H, Benoist C, Mathis D, *Loss of Aire-dependent thymic expression of a peripheral tissue antigen renders it a target of autoimmunity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**: p. 4583-87.
 121. Devoss J, Hou Y, Johannes K, Lu W, Liou GI, Rinn J, Chang H, Caspi R, Fong L, Anderson MS, *Spontaneous autoimmunity prevented by thymic expression of a single self-antigen.* J Exp Med, 2006. **203**: p. 2727-35.
 122. Ekwall O, Hedstrand H, Grimelius L, Haavik J, Perheentupa J, Gustafsson J, Husebye E, Kampe O, Rorsman F, *Identification of*

- tryptophan hydroxylase as an intestinal autoantigen*. Lancet, 1998. **352**: p. 279-83.
123. Scire G, Magliocca FM, Cianfarani S, Scalamandre A, Petrozza V, Bonamico M, *Autoimmune polyendocrine candidiasis syndrome with associated chronic diarrhea caused by intestinal infection and pancreas insufficiency*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1991. **13**: p. 224-7.
 124. Ward L, Paquette J, Seidman E, Huot C, Alvarez F, Crock P, Delvin E, Kampe O, Deal C, *Severe autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy in an adolescent girl with a novel AIRE mutation: response to immunosuppressive therapy*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**: p. 844-52.
 125. Hogenauer C, Meyer RL, Netto GJ, Bell D, Little KH, Ferries L, Santa Ana CA, Porter JL, Fordtran JS, *Malabsorption due to cholecystokinin deficiency in a patient with autoimmune polyglandular syndrome type I*. N Engl J Med, 2001. **344**: p. 270-74.
 126. Okamoto H, *The Reg gene family and Reg proteins: with special attention to the regeneration of pancreatic beta-cells*. J Hepatobiliary Pancreat Surg., 1999. **6**: p. 254-62.
 127. Zhou L, Zhang R, Wang L, Shen S, Okamoto H, Sugawara A, Xia L, Wang X, Noguchi N, Yoshikawa T, Uruno A, Yao W, Yuan Y, *Upregulation of REG Ialpha accelerates tumor progression in pancreatic cancer with diabetes*. Int J Cancer, 2010. **127**: p. 1795-803.
 128. Astrosini C, Roeffzaad C, Dai YY, Dieckgraefe BK, Jöns T, Kemmner W, *REGIA expression is a prognostic marker in colorectal cancer and associated with peritoneal carcinomatosis*. Int J Cancer, 2008. **123**: p. 409-13.
 129. Hayashi K, Motoyama S, Sugiyama T, Izumi J, Anbai A, Nanjo H, Watanabe H, Maruyama K, Minamiya Y, Koyota S, Koizumi Y, Takasawa S, Murata K, Ogawa J, *REG Ialpha is a reliable marker of chemoradiosensitivity in squamous cell esophageal cancer patients*. Ann Surg Oncol, 2008. **15**: p. 1224-31.
 130. Perniola R, Lobreglio G, Rosatelli MC, Pitotti E, Accogli E, De Rinaldis C, *Immunophenotypic characterisation of peripheral blood lymphocytes in autoimmune polyglandular syndrome type I: clinical study and review of the literature*. J Pediatr Endocrinol Metab, 2005. **18**: p. 155-164.
 131. Nagafuchi S, Katsuta H, Koyanagi-Katsuta R, Yamasaki S, Inoue Y, Shimoda K, Ikeda Y, Shindo M, Yoshida E, Matsuo T, Ohno Y, Kogawa K, Anzai K, Kurisaki H, Kudoh J, Harada M, Shimizu N, *Autoimmune Regulator (AIRE) Gene Is Expressed in Human Activated CD4(+) T-Cells and Regulated by Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway*. Microbiol Immunol, 2006. **50**: p. 979-87.
 132. Dhodapkar MV, Lust JA, Phylly RL, *T-cell large granular lymphocytic leukemia and pure red cell aplasia in a patient with type I autoimmune polyendocrinopathy: response to immunosuppressive therapy*. Mayo Clin Proc, 1994 **69**: p. 1085-1088.
 133. Zhang L, Barker JM, Babu S, Su M, Stenerson M, Cheng M, Shum A, Zamir E, Badolato R, Law A, Eisenbarth GS, Anderson MS, *A robust immunoassay for anti-interferon autoantibodies that is highly specific*

- for patients with autoimmune polyglandular syndrome type 1. Clin Immunol, 2007. **125**: p. 131-7.
134. Karasawa R, Ozaki S, Nishioka K, Kato T, *Autoantibodies to peroxiredoxin I and IV in patients with systemic autoimmune diseases*. Microbiol Immunol, 2005. **49**: p. 57-65.
 135. Karasawa R, Kurokawa MS, Yudoh K, Masuko K, Ozaki S, Kato T, *Peroxiredoxin 2 is a novel autoantigen for anti-endothelial cell antibodies in systemic vasculitis*. Clin Exp Immunol, 2010. **Jul 14**. [Epub ahead of print].
 136. Iwata Y, Ogawa F, Komura K, Muroi E, Hara T, Shimizu K, Hasegawa M, Fujimoto M, Tomita Y, Sato S, *Autoantibody against peroxiredoxin I, an antioxidant enzyme, in patients with systemic sclerosis: possible association with oxidative stress*. Rheumatology (Oxford), 2007. **46**: p. 790-795.
 137. Dhillon VB, Mac Callum S, Norton P, Twomey BM, Erkeller-Yuksel F, Lydyard P, Isenberg DA, Latchman DS, *Differential heat shock protein overexpression and its clinical relevance in systemic lupus erythematosus*. Ann Rheum Dis, 1993 **52**: p. 436-42.
 138. Xiao C, Chen S, Yuan M, Ding F, Yang D, Wang R, Li J, Tanguay RM, Wu T, *Expression of the 60 kDa and 71 kDa heat shock proteins and presence of antibodies against the 71 kDa heat shock protein in pediatric patients with immune thrombocytopenic purpura*. BMC Blood Disord, 2004. **4**: p.1.
 139. Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones E, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, Koo GC, Calderwood SK, *HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependent pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine*. Nat Med, 2000. **6**: p. 435-42.
 140. Millar DG, Garza KM, Odermatt B, Elford AR, Ono N, Li Z, Ohashi PS, *Hsp70 promotes antigen-presenting cell function and converts T-cell tolerance to autoimmunity in vivo*. Nat Med, 2003 **9**: p. 1469-76.
 141. Capolunghi F, Cascioli S, Giorda E, Rosado MM, Plebani A, Auriti C, Seganti G, Zuntini R, Ferrari S, Cagliuso M, Quinti I, Carsetti R, *CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies*. J Immunol, 2008. **180**: p. 800-8.
 142. Glocker EO, Hennigs A, Nabavi M, Schäffer AA, Woellner C, Salzer U, Pfeifer D, Veelken H, Warnatz K, Tahami F, Jamal S, Manguiat A, Rezaei N, Amirzargar AA, Plebani A, Hanneschläger N, Gross O, Ruland J, Grimbacher B, *A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections*. N Engl J Med, 2009. **361**: p. 1727-35.
 143. Glocker E, Grimbacher B, *Chronic mucocutaneous candidiasis and congenital susceptibility to Candida*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2010. **10**: p. 542-50.
 144. Ruland J, *CARD9 signaling in the innate immune response*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1143**: p. 35-44.
 145. Gross O, Gewies A, Finger K, Schäfer M, Sparwasser T, Peschel C, Förster I, Ruland J, *Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity*. Nature, 2006. **442**: p. 651-6.

146. Robinson MJ, Osorio F, Rosas M, Freitas RP, Schweighoffer E, Gross O, Verbeek JS, Ruland J, Tybulewicz V, Brown GD, Moita LF, Taylor PR, Reis e Sousa C, *Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection*. J Exp Med, 2009. **206**: p. 2037-51.
147. LeibundGut-Landmann S, Gross O, Robinson MJ, Osorio F, Slack EC, Tsoni SV, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Brown GD, Ruland J, Reis e Sousa C, *Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17*. Nat Immunol, 2007. **8**: p. 630-8.
148. Hong M, Ryan KR, Arkwright PD, Gennery AR, Costigan C, Dominguez M, Denning DW, McConnell V, Cant AJ, Abinun M, Spickett GP, Swan DC, Gillespie CS, Young DA, Lilic D, *Pattern recognition receptor expression is not impaired in patients with chronic mucocutaneous candidiasis with or without autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy*. Clin Exp Immunol, 2009. **156**: p. 40-51.
149. Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM., *Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells*. J Immunol, 2001. **166**: p. 249-55.
150. Ryan KR, Hong M, Arkwright PD, Gennery AR, Costigan C, Dominguez M, Denning D, McConnell V, Cant AJ, Abinun M, Spickett GP, Lilic D, *Impaired dendritic cell maturation and cytokine production in patients with chronic mucocutaneous candidiasis with or without APECED*. Clin Exp Immunol, 2008. **154**: p. 406-14.
151. Lindh E, Lind SM, Lindmark E, Hässler S, perheentupa J, Peltonen L, Winquist O, Karlsson MCI, *AIRE regulates T-cell-independent B-cell responses through BAFF*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**: p. 18466-71.
152. Wardemann H, Nussensweig MC, *B-cell self-tolerance in humans*. Adv Immunol, 2007. **95**: p. 83-110.
153. Yurasov S, Wardemann H, Hammersen J, Tsuiji M, Meffre E, Pascual V, Nussenzweig MC, *Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus*. J Exp Med, 2005. **201**: p. 703-11.
154. Tsuiji M, Yurasov S, Velinzon K, Thomas S, Nussenzweig MC, Wardemann H, *A checkpoint for autoreactivity in human IgM+ memory B cell development*. J Exp Med, 2006. **20**: p. 393-400.

RESUME

Répertoire B auto-réactif T-dépendant et T-indépendant dans la Polyendocrinopathie Auto-immune de type 1

La polyendocrinopathie auto-immune de type 1 (PEA1) est liée aux mutations du gène *AIRE*. En l'absence de *AIRE* se développe un défaut de tolérance immune centrale, à l'origine de pathologies auto-immunes multiples spécifiques d'organe. Notre objectif était d'évaluer l'effet d'une altération « exemplaire » du répertoire T sur les empreintes auto-réactives humorales. Les données cliniques et immunologiques ont été recueillies chez des patients atteints de PEA1, qui ont bénéficié du séquençage du gène *AIRE*. Chez ces patients ont été analysés les profils d'auto-réactivité sérique IgG et IgM vis à vis des tissus pancréatique et surrénalien, en comparaison à des patients atteints d'autres endocrinopathies auto-immunes, et à des sujets sains. Les bandes antigéniques discriminantes ont été sélectionnées grâce à un test de Chi-2, et une approche immuno-protéomique a permis leur caractérisation moléculaire. Dix-neuf patients atteints de PEA1 ont pu être étudiés. Ils présentaient de 1 à 10 manifestations cliniques liées à la maladie. Quatre mutations du gène *AIRE* différentes ont été identifiées, et la délétion 13-bp dans l'exon 8 (c.967-979del13) s'est avérée la plus fréquente. L'étude en immuno-empreinte a permis d'identifier 6 antigènes préférentiellement reconnus par les patients atteints de PEA1. Leur caractérisation par approche immuno-protéomique a montré qu'il s'agissait à la fois d'antigènes tissu-spécifiques (lipase pancréatique reconnue à la fois par les IgM et les IgG, amylase pancréatique reconnue par les IgG, Regenerating Protein 1 alpha pancréatique ciblée par les IgM) mais également ubiquitaires (péroxyredoxine-2 reconnue à la fois par les IgG et les IgM, Heat Shock cognate 71kDa Protein ciblée par les IgM, aldose réductase reconnue par les IgG). Ainsi, une altération majeure du répertoire T auto-réactif, telle que celle liée aux mutations du gène *AIRE*, affecte de manière importante les réponses humorales auto-réactives dépendantes d'IgG, mais également d'IgM. Ces modifications touchent à la fois des antigènes tissu-spécifiques et ubiquitaires, nous faisant évoquer un rôle au moins partiel de *AIRE* dans des phénomènes T-indépendants et /ou des altérations de l'immunité naturelle.

Mots clés : *AIRE*, Polyendocrinopathie auto-immune de type 1, distorsion du répertoire auto-réactif, Immunoglobulines G et M, T-dépendance, T-indépendance

SUMMARY

Self-reactive B repertoire and Auto-immune Polyendocrine Syndrome type 1

Autoimmune polyendocrine syndrome type 1 (APS1) is caused by mutations in the *AIRE* gene that induce central tolerance breakdown which results in tissue-specific autoimmune diseases. Our objective was to evaluate the effect of a well-defined T cell repertoire impairment on humoral systemic self-reactive footprints. Clinical and immunological data were collected, and pathological mutations in the *AIRE* gene were identified by DNA sequencing. Comparative serum self-IgG and self-IgM reactivities, directed towards pancreatic and adrenal protein extracts, of APS1 patients, patients suffering from other autoimmune endocrinopathies and healthy subjects, were tested using Western blotting. Discriminant protein bands were selected using the Chi-square test and molecular characterization of these bands was conducted using a proteomic approach. Nineteen patients were identified with APS1. Clinical manifestations varied greatly, showing 1 to 10 components. Four different *AIRE* gene mutations were identified, and the 13-bp deletion in exon 8 (c.967-979del13) was the most prevalent. A singular distortion of seric self-IgG and self-IgM repertoires was noted in APS1 patients. IgG and IgM antibodies recognized significantly one tissue-specific (pancreatic triacylglycerol lipase) and one ubiquitous antigens (peroxyredoxin-2). IgM recognized one tissue specific (Pancreatic regenerating protein 1 α) and one ubiquitous antigen (Heat Shock cognate 71kDa Protein). IgG also recognized one tissue-specific (pancreatic amylase) and one ubiquitous antigen (aldose reductase). As expected, a well-defined self-reactive T cell repertoire impairment affected the tissue-specific self-IgG repertoire but also self-IgM repertoire. Our study also reveals discriminant responses against ubiquitous antigens with IgG and IgM antibodies. Some common discriminant antigenic targets were found for IgG and IgM. All these data suggest that T cell-dependent but also T cell-independent mechanisms are involved in APS1. The potent involvement of complementary events related to potent dysfunction in the innate immune response is discussed.

Keywords: *AIRE*, APS1, self-IgG, self-IgM repertoire distorsion, T-dependence, T-independence

Discipline – Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie – Immunologie