



HAL
open science

Etude par génomique fonctionnelle des conséquences de la surexpression de TRIB1 et FKBP11 dans les lymphocytes B au cours du lupus érythémateux systémique

Léa Simoni

► **To cite this version:**

Léa Simoni. Etude par génomique fonctionnelle des conséquences de la surexpression de TRIB1 et FKBP11 dans les lymphocytes B au cours du lupus érythémateux systémique. Immunologie. Université de Strasbourg, 2015. Français. NNT : 2015STRAJ063 . tel-01681659

HAL Id: tel-01681659

<https://theses.hal.science/tel-01681659v1>

Submitted on 11 Jan 2018

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.

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé (ED414)

THÈSE

Présentée par **Léa SIMONI**

Soutenue publiquement le **23 Octobre 2015**

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

Discipline : **Sciences de la Vie et de la Santé**

Spécialité : **Immunologie**

**ÉTUDE PAR GÉNOMIQUE FONCTIONNELLE DES CONSÉQUENCES DE LA
SUREXPRESSIION DE *TRIB1* ET *FKBP11* DANS LES LYMPHOCYTES B AU
COURS DU LUPUS ÉRYTHÉMATEUX SYSTÉMIQUE**

THÈSE dirigée par :

Madame Pauline SOULAS-SPRAUEL

Directrice de Thèse

CNRS UPR3572, Immunologie et Chimie Thérapeutique, IBMC, Strasbourg

MEMBRES DU JURY :

Madame le Docteur Anne Durandy

Rapporteur externe

Inserm UMR1163, Institut Imagine, Paris (75)

Monsieur le Professeur Eric Oksenhendler

Rapporteur externe

Département d'Immunologie Clinique, Hôpital Saint-Louis, Paris (75)

Madame le Docteur Susan Chan

Examineur interne

Département de génomique fonctionnelle et cancer, IGBMC, Illkirch (67)

| Léa SIMONI • l.simoni@ibmc-cnrs.unistra.fr |

| Université de Strasbourg-CNRS • UPR3572 • Tolérance lymphocytaire B et autoimmunité |

| Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire • 15, Rue René Descartes • 67084 Strasbourg Cedex • France |

•Remerciements•

Je souhaite commencer par remercier chaleureusement Madame le Docteur Susan Chan, Madame le Docteur Anne Durandy et Monsieur le Professeur Eric Oksenhendler pour avoir accepté de lire et juger mon travail de thèse.

Puis je tiens à remercier Madame le Professeur Sylviane Muller de m'avoir permis d'intégrer son laboratoire à la rentrée 2011.

En 2011 débute mon histoire au « labo » qui commence par ma rencontre avec Pauline, jeune chercheur sympa, plutôt bien organisée (c'est ce que j'ai pensé !) et qui allait devenir ma « Chef ». Tu as été un coach fait sur mesure pour moi. Tu as su me faire confiance, m'écouter, me rebooster quand j'en avais besoin, tu as toujours su trouver les mots et tu as toujours été là malgré les épreuves. Ton calme, ta diplomatie, ta rigueur et ta justesse dans tout ce que tu dis et entreprends sont des qualités que j'admire chez toi. Je te remercie pour tout le temps que tu as passé à corriger ce manuscrit, « d'une part », mais aussi pour tous ces moments de décompression, « d'autre part ». Aquagym et manucure, soirées et congrès, ainsi que ces instants « blondes » (non promis je ne m'étalerai pas sur la Handi Run.. ! ☺). Ce fût un réel honneur pour moi d'être ta « première » thésarde (les suivants ne savent pas encore la chance qu'ils ont !). Pour tout ça, Merci.

Et puis j'ai fait la connaissance des autres « Chefs » : Thierry, Anne-Sophie et Jean-Louis. Merci pour tous vos conseils, idées, moments de réflexion lors de nos « Teammeetings », mais aussi pour votre sympathie et vos encouragements. Un merci spécial à Jean-Louis pour avoir été si patient lors de cet appel téléphonique interminable à modifier diapo par diapo ma présentation de MRT, la veille au soir de l'envoi final ! (Et aussi pour ce selfie à l'animalerie !!)

Vient la rencontre avec les gens de l'équipe : très vite je me suis retrouvée encadrée par deux sages thésards. Jean-Nicolas, c'est bien grâce à toi que j'ai si vite réussi à manipuler les souris et merci pour tous ces petits « trucs&astuces » que tu m'as donnés avant ton départ. Julie, merci d'avoir été là pendant ma première année de thèse et de m'avoir conseillée pour mes premières manips. On aura fait du bon travail ensemble !! Belle continuation à tous les deux !

Et puis j'ai rencontré celle qui allait devenir ma colocataire du labo bleu, Anne. Je me rappelle l'une des premières phrases que tu m'as dite « Tu as beaucoup à apprendre de moi mais j'ai aussi beaucoup à apprendre de toi », de mon côté cette phrase s'est vérifiée, j'espère que pour toi aussi... Et je te remercie pour toute l'aide que tu m'as apportée au cours de ces années.

« MacGyver », « la boîte à outil », elle en aura eu des surnoms ! J'en rajoute un : « Dr. Cells » ! *Anne-Marie*, toujours prête pour nous aider à résoudre les mystères de la science, à soigner nos cellules mais aussi pour discuter entre deux centris et nous apprendre que Matt Pokora est une Rockstar ! Merci pour tout ça !! Et j'espère que tu auras toujours une petite pensée pour moi quand tu iras faire de la barre à terre... ☺

Je remercie également Dana (ma roumaine préférée !), Aurélie, Sylvia et Myriam pour avoir fait de cette période entre LIPettes, une période plus que mémorable, faite de rires et de chansons. Félicitations Dr² Ghergus ! Merci pour toutes tes jolies expressions comme « la chambre 89 » ou « la moule au frigo » qui resteront gravées dans le petit livre jaune (et dans ma mémoire !). Je te souhaite beaucoup de bonheur.

Merci aussi à toi, Christiane, et ta bonne humeur quotidienne !

-« Léa, tu vas travailler avec des souris » -« Ah oui ?? ». Merci à David, Itto et Karine pour s'occuper de nos animaux au quotidien et à *Monique* et *Delphine* pour m'avoir donné un coup de main pendant ces longues heures de dissection, de sevrage et de typage.

J'ai très rapidement rencontré tous les autres membres de l'UPR3572. Merci à ceux avec qui j'ai pu partager : mes questions techniques, des infections de souris, des séances de TP, quelques blagues, une danse à la fête de Noël, ou encore une discussion au détour d'un couloir ou autour d'un verre... Je pense particulièrement à Fred, *Fanny*, *Hélène*, *Chris*, *Pierre*, *Jean-Daniel*, *Maud*, *Cécile*, *Julie*, *Astrid*, **Matthieu**, *Hayet*, *Olivier*, *Vincent* et *Nicolas*.

Puis me voilà en route pour ma première année de thèse et mes premiers stagiaires. Je pense notamment à Gaëtan. Merci de t'être autant investi pendant ton stage de M1 chez nous et bon courage pour ta thèse.

Et puis j'ai accueilli une stagiaire pas comme les autres : ma *Zandra*. Ça a très vite collé entre nous, je définirais ça comme un coup de foudre amical. Comme tu le dis si bien « On a tout partagé même les chaussettes »... Meeerci d'être passée par là, tu es l'une de mes plus belles rencontres ici. #Dkussy

Pendant ces 3 années, j'ai eu le privilège de m'essayer à l'enseignement (ce qui n'a fait que confirmer une vocation née depuis bien longtemps). Merci à Christian Bergman pour m'avoir permis d'enseigner à l'IUT Louis Pasteur. Merci également à Dominique et *Amelle* pour m'avoir épaulée lors de ces TP BISTR à rebondissements ! Je remercie Sylvie Fournel pour m'avoir intégrée dans l'équipe d'enseignement d'immuno, et Samuel et Fred mes supers collègues de TP. Merci encore à toi Fred pour les heures passées à expliquer à la jeune « prof » que j'étais, les subtilités des cours à enseigner. Tu es un enseignant patient, passionné et passionnant. Merci à Christine, une institutrice extra, et à son adorable classe de CE2. Grâce à vous, le compost n'a plus de secret pour moi. Enfin, merci à tous les étudiants. Je re-signe quand vous voulez.

J'ai aussi eu l'occasion de jouer la G.O (Gentille Organisatrice) du labo. Merci Sylviane de m'avoir fait entièrement confiance pour l'organisation des fêtes de Noël, barbecues et autres jeux de piste. Merci *Isabelle* pour ta gentillesse, ta disponibilité, ta prévoyance et ton aide lors de nos missions courses ! Merci Christian pour les petits conseils administratifs ! Merci Pauline pour m'avoir laissée jouer ce rôle et merci à **Matthieu** de reprendre le flambeau.

Puis un groupe de gais lurons s'est formé tout naturellement au labo ! Soirées, restos, week-ends, camping, merci à toute la fine équipe du week-end au Luxembourg : Maxime, *Olga*, *Carole*, Diane, *Sandra*, Benjamin et Adrien. On aura passé de beaux moments de vie ensemble.

A partir de ma 2^{ème} année, j'ai eu l'occasion de rencontrer de nouvelles personnes. Je parle évidemment de mon équipe d'accueil à l'IGBMC !! Merci Bernardo pour tes conseils toujours justes, merci Isabelle pour le temps que tu m'as accordé, merci Vincent pour ta patience que j'ai mise à rude épreuve (« Alors ça, j'ai encore jamais vu ! ») et merci *Léa* pour toutes ces discussions à propos de notre avenir !! On se retrouvera peut-être dans quelques années (si tu vois ce que je veux dire :)), en attendant, bon courage pour ta dernière année. Ca a été un plaisir de travailler avec vous tous. Vous m'avez énormément appris. Bonne continuation à tous.

L'équipe 1 a aussi beaucoup changé au cours des années, avec l'arrivée de 4 nouveaux garçons. Un peu réservés au départ, puis tous plus cools les uns que les autres à l'arrivée. Vincent, Aurélien, Mich-Mich et François, merci pour cette bonne ambiance quotidienne ! Aurélien, la chanson du vendredi m'aura manquée pendant cette dernière année.. !! Et puis il y a eu l'arrivée de cette petite M1, cette adorable M2 devenue future doctorante. *Delphine*, on a formé un beau duo toutes les 2 et travailler avec toi a été une vraie brise de bonheur lors de ma dernière année de thèse. Tu as cette motivation, cette volonté, et cette envie d'avancer (SiSi ! Crois-moi !) qui feront de toi une SuperDoctorante. Je suis fière du chemin que tu as parcouru. Et garde ta bonne humeur communicative, elle te va si bien !

Ces 4 années passées au labo ont aussi permis de former des liens spéciaux avec certaines personnes qui sont maintenant bien plus que des collègues. *Carole*, c'était pas gagné entre nous 2 ! Mais tu m'as laissée voir ce qu'il y avait derrière cette carapace : une personne entière, sincère, à l'écoute, pleine de vie et avec de très belles valeurs. Merci de nous avoir supportés chaque dimanche soir pendant presque 2 années. Merci pour ta confiance. Tu me manques déjà (-Mode serpillère ON-). Diane, le 4^{ème} membre de la MadisonTeam et non des moindres. On est arrivées ensemble au labo et tu m'as tout de suite plu ! Ton sourire, ton humour, ta gentillesse, ton déhanché, ta ponctualité (hmm !) font de toi une amie unique. A toutes les deux, merci pour cette amitié vraie. J'espère (et je pense) que notre quatuor de choc a encore de nombreuses années à vivre devant lui... Ma SofSof, je ne te remercierai jamais assez d'avoir été là pendant toute cette aventure. Des dissections de souris aux courses dans la boue en passant par un essayage de robe de mariée et beaucoup de confidences, #onavécudebeauxmomentsensemble#. Je sais que notre amitié se prolongera après le labo. Et

puis d'autres week-ends sportifs nous attendent. Je compte sur **François** pour nous trouver une autre ville pour un futur défi (sans pluie si possible !! ☺). Belle vie à vous, les futurs mariés !

Et puis il y a Ceux* qui ont vécu cette thèse de l'extérieur, qui ont été présents tout du long et qui étaient déjà présents avant. Je parle évidemment de mes amis et de ma famille.

Merci au « Groupe » pour avoir répondu présent pendant toutes ces années, certains pour déjà plus de 20 ans. Merci Nathou, **Popo**, Benou, Cécé, Jojo, DriDri, Yannick, Momo, *Aude*, Lulu, Karen, Lora, Flo pour ces franches parties de rigolade, ces moments d'exception et pour avoir essayé de comprendre ce que je pouvais bien faire pendant mes longues heures passées au labo (la page d'après a spécialement été concoctée pour vous). Merci 4**** pour mes WonderCopines, *Aude*, Lulu, Momo et Lora pour vos preuves de soutien et pour notre si belle amitié. On vieillira ensemble, soyez-en sûres. <3

-Je vous aime les z'oiseaux !-

Je remercie chaleureusement toute la famille Arnold pour les bons moments passés ensemble ! **Sylvie**, Jean-Marie, Julian et Joëlle, vous êtes une belle-famille en or.

« On choisit pas sa famille », pourtant j'ai eu la chance de naître dans cette belle famille qui est la nôtre. Merci à mes mamies d'être aussi chouettes, à en accepter les sorties McDo et les selfies-photos ! J'espère vous voir le jour de ma soutenance ! Merci à *Albin*, d'avoir été ce grand frère parfait que toutes mes copines rêvaient d'avoir. Merci de m'avoir guidée sur le chemin de la science, c'est un peu grâce à toi si j'en suis là aujourd'hui. Et merci à toi et Lauriane pour vos encouragements. **Maman**, **Papa**, je vous remercie tout particulièrement pour m'avoir fait confiance et m'avoir soutenue pendant toutes ces années d'étude. Merci d'être comme vous êtes et de laisser encore la porte grande ouverte chaque week-end. Il n'y a pas que l'air de la montagne qui m'aide à me ressourcer, il y a aussi les personnes que j'y retrouve... **Papa**, merci d'avoir contribué à l'amélioration de mon intro vulgarisée, ça m'a beaucoup touché et **Maman**, pour le temps à relire mon intro (avec motivation en plus !) et à noter une à une toutes ces abréviations en charabia, **MERCI** (Ma-maman Est une Réelle Championne de l'Immuno). Vous êtes tout simplement au Top.

Et puis, sur ce long et sinueux chemin qu'est la thèse, le destin m'a donné la chance de rencontrer mon âme soeur. On était fait pour se rencontrer, j'en reste persuadée. Un énorme merci à celui qui me supporte et chouchoute chaque jour, qui sait me rassurer et me faire rire en toutes situations. **Johan**, merci d'être ce que tu es. Il me tarde d'affronter la Vie avec toi.

Carpe Idem

A ma famille et mes amis, pour qui l'« immunologie » est plus un mot abstrait qu'une science...

J'ai bien conscience que comprendre le sujet de thèse d'un doctorant n'est pas chose simple, (pour moi-même avoir du mal avec certains sujets de mes collègues.. !). Alors, rien que pour vous, voilà un bref résumé des 100 pages d'introduction qui suivent pour vous présenter le projet sur lequel j'ai travaillé pendant plus de 3 années.

Bonne Lecture

Pour commencer, voici quelques définitions :

La génétique : On appelle génétique, tout ce qui est relatif aux informations codées par notre ADN dans nos gènes. L'ADN est présent dans les gènes de chacune des 10^{13} cellules (soit environ 10 000 milliards) qui constituent notre corps. Il est propre à chaque individu (mais évidemment se transmet, en partie, de génération en génération) et va définir chaque détail de notre organisme. Par exemple, certains gènes vont décider de la couleur de vos yeux, de la taille de vos pieds ou encore de la couleur de votre peau. D'autres gènes, moins sympas et souvent « mal construits » vont rendre la personne susceptible au développement de certaines maladies dites « génétiques » (exemple : Alzheimer, Parkinson,..).

Le système immunitaire : Le système immunitaire a été plutôt bien représenté dans les épisodes de « Il était une fois la vie », c'est-à-dire comme une armée de globules blancs visant à protéger l'organisme contre des « envahisseurs » tels que les bactéries ou encore les virus. Dans cette armée, il y a l'infanterie des lymphocytes qui comprend les lymphocytes T (LT) et les lymphocytes B (LB). Les LB ont fait l'objet de ma thèse. Ce sont des cellules plutôt sympas qui peuvent produire des anticorps. Vous savez, ces mêmes anticorps que votre organisme est « forcé » à produire après un vaccin. Ils sont là pour faciliter la bataille face à leurs cibles, comme les microbes (ex : contre le virus de la rougeole). On peut, en quelque sorte, considérer les anticorps comme des munitions.

L'autoimmunité : Ah ! Ce fameux mot, qui a toujours été placé lors de ma première phrase de réponse face à la question : « Tu travailles sur quoi ?? ». Quand on entend le mot « autoimmunité », on peut s'imaginer quelque chose de cool, du genre : « ouais, j'ai pas besoin de vaccins moi, j'ai une auto-immunité qui me permet de me défendre naturellement contre beaucoup de choses !! ». Le souci, c'est que le « beaucoup de choses » désigne exclusivement des composants appartenant à notre organisme. Je m'explique. Au lieu d'avoir un système immunitaire vous protégeant des agents extérieurs : les bactéries présentes sur les poignées de porte, le virus du copain qui a la grippe, etc... Dans le cas d'une autoimmunité, le système immunitaire **s'attaque** aux propres composants de votre organisme comme par exemple : les cellules du pancréas (produisant l'insuline) dans le cas du diabète de type I ou les cellules de la gaine des nerfs dans le cas de la sclérose en plaque, et mène à l'endommagement de ces tissus.

Le lupus érythémateux systémique (LES): Le LES est, comme son nom l'indique, une maladie auto-immune systémique, c'est-à-dire qu'elle n'est pas spécifique d'un seul organe comme le diabète de type I, spécifique du pancréas. En effet, les manifestations symptomatiques sont très variables d'un patient lupique à un autre et peuvent atteindre différents organes comme les reins, les articulations, la peau, le cœur ou encore le système nerveux. Et c'est pour ça que Dr. House a bien du mal à identifier les cas de lupus puisque les symptômes ne sont pas clairement définis et peuvent être confondus avec bien d'autres maladies.

Les causes du lupus sont multiples et sont, à ce jour, encore nombreuses à ne pas avoir été identifiées. Il y a des causes génétiques (anomalies de gènes) et environnementales (exposition aux UV, infections virales, hormones...). La compréhension des causes de la maladie pourraient améliorer la prise en charge des patients ainsi que leurs traitements. Parce que non, pour le moment, aucun « remède » miracle n'a encore été trouvé pour le lupus.

Voilà, avec tout ça, je pense que maintenant vous êtes prêts à comprendre mon sujet :

« ETUDE PAR GENOMIQUE FONCTIONNELLE DES CONSEQUENCES DE LA SUREXPRESSION DE
TRIB1 ET *FKBP11* DANS LES LYMPHOCYTES B AU COURS DU LUPUS ERYTHEMATEUX
SYSTEMIQUE »

Pas encore ? Alors on va décomposer, mais en prenant les parties de ce titre une par une, et en commençant par la fin :

- 1) **Les lymphocytes B au cours du lupus** : Comme je vous l'ai dit : les LB produisent des anticorps. Dans le lupus, ils produisent des anticorps dirigés contre des composants de

l'organisme et participent donc grandement à la maladie. Il doit donc y avoir dans les gènes de ces LB quelque chose qui ne tourne pas rond !

Une étude faite sur les gènes des LB de patients lupiques a détecté quelques anomalies pour certains de ces gènes. Ce qui nous mène à la suite :

- 2) **Surexpression de *TRIB1* et *FKBP11*** : En effet, les gènes dénommés *TRIB1* et *FKBP11* ont été trouvés surexprimés chez les patients (c'est-à-dire, présents en trop grande quantité). Arrive la question : est-ce que cette surexpression joue un rôle dans la maladie ???

- 3) **Etude par génomique fonctionnelle** : ce qui veut dire plus simplement, « étude de la fonction des gènes ». Pour étudier le rôle de ces 2 gènes dans les LB, nous avons produit des modèles de souris qui, comme les patients, surexpriment l'un ou l'autre de ces gènes et ceci, spécifiquement dans les LB.

Le but de ma thèse a donc été d'analyser ces souris et de comprendre pourquoi ces 2 gènes ont été retrouvés surexprimés chez les patients lupiques. Facile finalement, non ? ☺

Résumé

ÉTUDE PAR GÉNOMIQUE FONCTIONNELLE DES CONSÉQUENCES DE LA SUREXPRESSION DE *TRIB1* ET *FKBP11* DANS LES LYMPHOCYTES B AU COURS DU LUPUS ÉRYTHEMATEUX SYSTÉMIQUE

Le **lupus érythémateux systémique** est une maladie auto-immune systémique caractérisée par des lésions multiviscérales et la production d'autoanticorps (ex : anticorps anti-ADN double brin (db)) par les lymphocytes B (LB), qui jouent un rôle central dans la physiopathologie lupique. L'étiologie du lupus est à la fois environnementale et génétique. **Dans le but d'identifier des anomalies génétiques intrinsèques aux LB**, le laboratoire a réalisé une analyse transcriptomique sur les LB de patients lupiques en phase quiescente et a montré une surexpression des gènes *TRIB1* et *FKBP11* comparé aux sujets sains.

Afin d'étudier les conséquences de la surexpression de ces gènes sur la fonction des LB et le développement d'une autoimmunité, nous avons généré une lignée murine conditionnelle spécifique, surexprimant *Trib1* dans les LB à partir du stade précoce pro-préB et une lignée murine transgénique surexprimant *Fkbp11* de façon ubiquitaire. **La surexpression de *Trib1*** ne modifie pas l'homéostasie lymphocytaire mais induit une diminution de **la production de certaines Ig** : 1) les IgG1 dans le sérum à l'état basal et après une stimulation de LB *in vitro* ; 2) les IgM anti-OVA (Ovalbumine) après immunisation *in vivo* avec de l'OVA ; 3) les IgM anti-ADNdb dans le cas d'une immunisation par le LPS. Cette anomalie de la production des Ig semble provenir d'un **défaut de sécrétion**. De plus nous avons généré une lignée cellulaire B surexprimant *Trib1* qui nous a permis de confirmer le phénotype et d'identifier des partenaires potentiels de *Trib1* par technique de protéomique. **La surexpression du gène *Fkbp11***, est, quant à elle, suffisante à induire des signes de la maladie lupique chez la souris âgée de 8 mois, tels qu'une **rupture de tolérance** (caractérisée par la production d'autoanticorps) et une **initiation de la différenciation plasmocytaire**.

En conclusion, *Trib1* pourrait exercer un **rôle d'immunosupresseur** et sa surexpression dans les LB lupiques pourrait constituer un nouveau mécanisme de régulation des LB pendant la phase de rémission du lupus, alors que ***Fkbp11*** semble **contribuer à la pathologie lupique**. La description de ces deux nouvelles voies biologiques pourrait mener à une meilleure compréhension de la maladie et conduire à de potentielles applications thérapeutiques.

MOTS-CLES : *Lupus Erythémateux Systémique, Lymphocyte B, Trib1, Fkbp11, modèles murins, génomique fonctionnelle*

Abstract

FUNCTIONAL GENOMIC STUDY OF *TRIB1* AND *FKBP11* OVEREXPRESSION IN B CELLS GENES DURING SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSOUS

Systemic Lupus Erythematosous (SLE) is an autoimmune disease characterized by an inflammation of various tissues and a high production of autoantibodies (autoAb) (for example: anti-double-stranded (ds) DNA) by B cells, central actors in the physiopathology of lupus. The etiology of SLE includes both genetics and environmental factors. **Looking for B cell genetic abnormalities during lupus**, our B cell microarray analysis in quiescent SLE patients pointed to the overexpression of *TRIB1* and *FKBP11* compared to B cells from healthy controls.

In order to study the consequences of these expression deregulations on B cell function and autoimmunity development, we generated a B-cell specific Trib1-KI mouse line, overexpressing *Trib1* in B cells, starting from a very immature stage (pro-pre B) and a transgenic mouse overexpressing *Fkbp11* ubiquitously. ***Trib1* overexpression** induces a normal B cell homeostasis but a decrease in **the production of some immunoglobulins** (Ig): 1) IgG1 subclass in the serum, at a basal level and after an *in vitro* stimulation of splenic B cells; 2) Anti-OVA (Ovalbumine) IgM after immunization *in vivo* with OVA; 3) Anti-dsDNA IgM after immunization with LPS. This abnormal production of Ig seems to be linked to a **defect in Ig secretion process**. In addition, we developed a murine B cell line overexpressing *Trib1* that let us to confirm the Ig production deficiency and to identify potential Trib1's partners in B cells. In contrast, ***Fkbp11* overexpression**, leads to some features of lupus disease in 8-month-aged-mice, including a **tolerance breakdown** (characterized by autoantibody production) and **the initiation of plasma cell differentiation**.

In conclusion, ***Trib1*** could exert an **immunosuppressive role** and its overexpression in SLE could constitute a new mechanism of B cell regulation during remission phases, whereas ***Fkbp11*** seems rather to **contribute to lupus physiopathology**. Thus, the description of these two biological pathways could bring new insights into the comprehension of lupus disease and could also potentially lead to the development of new therapeutic applications.

Key words: *Systemic Lupus Erythematosous, B cell, Trib1, Fkbp11, murine models, functional genomics*

•TABLE DES MATIÈRES•

Table des illustrations	1
Liste des abréviations.....	7
Introduction	15
Partie A. Les lymphocytes B : ontogénèse dans la moelle osseuse et activation en périphérie.....	15
A1. Développement B dans la moelle osseuse.....	16
A1.1 Établissement de l'identité d'un lymphocyte B	16
A1.2 Premiers stades de développement B dans la moelle osseuse	18
A1.3 Réarrangement des gènes des immunoglobulines.....	19
A1.4 Mécanismes de tolérance B centrale	21
A2. Différenciation et activation des cellules B en périphérie	24
A2.1 Vers la différenciation en lymphocyte B folliculaire ou de la zone marginale ?.....	24
A2.2 Voies impliquées dans l'activation de la cellule B.....	30
A2.3. Le centre germinatif : lieu de prolifération et de sélection des LB, et plus si affinité.....	37
A2.4. Différenciation terminale des lymphocytes B.....	43
A2.5. Autres sous-populations de lymphocytes B périphériques.....	55
A2.6 Mécanismes de tolérance B périphérique.....	56
Partie B. Le lupus : prototype des maladies autoimmunes systémiques dépendantes des autoanticorps.....	63
B1. Les origines du lupus érythémateux disséminé.....	64
B2. Physiopathologie du lupus	65
B2.1 Caractéristiques de la maladie lupique	65

B2.2 Hétérogénéité épidémiologique du lupus	71
B3. Présentation des principaux modèles murins lupiques	72
B3.1 Les modèles murins de lupus spontané	72
B3.2 Les modèles induits de lupus	74
B4. Présentation des différents acteurs du lupus et leur rôle dans la pathologie	74
B4.1 Acteurs de l'immunité innée.....	74
B4.2 Acteurs de l'immunité adaptative.....	79
B5. Les lymphocytes B, acteurs centraux de la maladie lupique	81
B5.1 Mise en évidence du rôle des lymphocytes B dans le lupus par l'étude de modèles murins	81
B5.2 Les lymphocytes B présentent un phénotype hyperactivé au cours du lupus	82
B5.3 Les lymphocytes B, sources de la production d'autoanticorps.....	84
B5.4 Répartition anormale des sous-populations B au cours du lupus.....	92
B6. Les traitements de la maladie lupique	94
B6.1 Traitements conventionnels administrés aux patients	94
B6.2 Les biothérapies ciblant les lymphocytes B	95
B6.3 L'évolution des soins	96
B7. Le lupus : une maladie aux mécanismes étiologiques divers	97
B7.1 Les facteurs environnementaux dans le développement du lupus	97
B7.2 Implication des mécanismes épigénétiques	102
B7.3 Les facteurs génétiques de la maladie lupique.....	105
Partie C. Présentation du projet de thèse	127
C1. Présentation du gène <i>Fkbp11</i>	129
C1.1 La famille des FKBP.....	129

C1.2 La fonction PPIase	129
C1.3 Présentation de la protéine FKBP19.....	131
C2. Présentation du gène <i>Trib1</i>	133
C2.1 Les Tribbles	133
C2.2 Fonctions des protéines Trib2 et Trib3.....	135
C2.3 La protéine Trib1	137
C2.4 Implication des Tribbles dans certaines pathologies	141
Matériel et Méthodes	143
D1. Génération des lignées murines Fkbp11 et Trib1.....	143
D1.1 Production du modèle lentigénique Fkbp11	143
D1.2 Production des modèles conditionnels Trib1-KI.....	143
D2. Validation des modèles Trib1-KI conditionnels.....	146
D2.1. Isolement des cellules lymphoïdes	146
D2.2. Évaluation de la surexpression de <i>Trib1</i>	147
D2.3. Évaluation de la délétion de la cassette STOP	148
D2.4. Visualisation de la GFP par cytométrie en flux	148
D3. Analyse des cellules lymphoïdes par cytométrie en flux	148
D3.1. Marquage des cellules lymphoïdes.....	148
D3.2. Tri des cellules lymphocytaires par cytométrie en flux.....	149
D3.3. Analyse du phénotype des cellules après stimulation <i>in vitro</i>	149
D4. étude de la réponse anticorps <i>in vivo</i>	152
D4.1. Dosage des immunoglobulines totales et sous-classes d'IgG par ELISA	152
D4.2. Immunisations expérimentales	153

D4.3. La réponse anticorps face à des agents infectieux	155
D4.4. Induction de la production d'autoanticorps par le LPS.....	156
D4.5. Technique d'analyse des ELISA permettant la détection d'Ig spécifiques d'antigènes	157
D5. À la recherche des partenaires de Trib1	157
D5.1. Production du modèle cellulaire CH12F3-Trib1.....	157
D5.2. Étude du phénotype des CH12F3 transduites	160
D5.3. Identification des partenaires de Trib1 par protéomique.....	160
Résultats	165
Partie E. Étude des conséquences de la surexpression de <i>Fkbp11</i> dans les lymphocytes B	167
E.1 Commentaires.....	167
E.2 Article 1 : Overexpression of <i>Fkbp11</i> , a feature of lupus B cells, leads to B cell tolerance breakdown and initiates plasma cell differentiation.	168
Partie F. Étude des conséquences de la surexpression de <i>Trib1</i> dans les lymphocytes B	169
F1. Analyse de l'expression de <i>Trib1</i> dans les LB de patients lupiques et de différentes lignées murines lupiques ou sauvages.....	169
F1.1 L'expression de <i>TRIB1</i> est augmentée dans les LB de patients lupiques quiescents	169
F1.2 Étude de la surexpression de <i>Trib1</i> dans les sous-populations B murines	170
F2. Étude des effets de la surexpression de <i>Trib1</i> par le phénotypage du modèle Trib1-KI-Bimm.	173
F2.1 Génération du modèle Trib1-KI-Bimm.....	174
F2.2 Choix de la lignée murine contrôle.....	174
F2.3 Validation du modèle Trib1-KI-Bimm	175
F2.4. Étude phénotypique du modèle Trib1-KI-Bimm à l'état basal	178
F2.5 Étude de la production d'anticorps après stimulation <i>in vitro</i>	183
F2.6 Conclusion	185

F3. Étude de la réponse anticorps <i>in vivo</i> chez les souris Trib1-KI-Bimm	185
F3.1 Étude de la réponse anticorps <i>in vivo</i> après immunisation des souris Trib1-KI-Bimm avec un antigène de type T-dépendant	186
F3.2 Étude de la réponse anticorps <i>in vivo</i> après immunisation des souris Trib1-KI-Bimm avec un antigène de type T-indépendant	188
F3.3 Étude de la réponse anticorps <i>in vivo</i> après infection des souris Trib1-KI-Bimm avec <i>Borrelia burgdorferi</i>	189
F3.4 Étude de la réponse autoimmune dans le modèle Trib1-KI-Bimm	191
F3.5 Conclusion	193
F4. Le phénotype des souris Trib1-KI-Bimm dépend-il du stade de développement à partir duquel <i>Trib1</i> est surexprimé ?.....	193
F4.1 Validation du modèle Trib1-KI-Bmat	193
F4.2 Étude phénotypique du modèle Trib1-KI-Bmat	197
F4.3 Conclusions sur le modèle Trib1-KI-Bmat	200
F5. Quelles sont les conséquences d'une surexpression de <i>Trib1</i> spécifiquement dans les lymphocytes T ?	200
F5.1 Validation du modèle Trib1-KI-Tmat	200
F5.2 Étude phénotypique du modèle Trib1-KI-Tmat.....	202
F5.3 Conclusion sur le modèle Trib1-KI-Tmat.....	204
F6. Étude du mécanisme responsable de la diminution de production des anticorps en cas de surexpression de <i>Trib1</i> dans les lymphocytes B	204
F6.1 La diminution de production des Ig est-elle intrinsèque aux lymphocytes B ?.....	205
F6.2 La diminution de la production d'Ig est-elle associée à une mortalité augmentée ou une prolifération diminuée des lymphocytes B surexprimant <i>Trib1</i> ?	206
F6.3 Est-ce que les lymphocytes B surexprimant <i>Trib1</i> présentent un défaut d'activation ?	207

F6.4 La surexpression de <i>Trib1</i> entraîne-t-elle des modifications dans le programme transcriptionnel de la différenciation plasmocytaire ?	208
F6.5 La surexpression de <i>Trib1</i> entraîne-t-elle un défaut de commutation de classe ?	210
F6.6 La surexpression de <i>Trib1</i> induit-elle un défaut de sécrétion des immunoglobulines ?	211
F6.7. Étude de l'activation des voies de signalisation des lymphocytes B	212
F7. À la recherche des partenaires de Trib1 dans les lymphocytes B	215
F7.1 Principe de la méthode	215
F7.2 Choix du modèle	215
F7.3 Validation des modèles cellulaires	216
F7.4 Identification des partenaires de Trib1 dans la lignée Trib1-Cter	219
F7.5 Études complémentaires réalisées à la plateforme de protéomique de l'IBMC.....	230
Conclusions générales et Perspectives	233
G.1 Retour sur le Projet de thèse	233
G.2 Étude transcriptomique de LB de patients	234
G.3 Étude des conséquences de la surexpression de <i>Fkbp11</i>	234
G.4 Étude des conséquences de la surexpression de <i>Trib1</i>	236
G.5 Conclusion générale	244
Bibliographie	247

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Structure d'une immunoglobuline de type IgG.....	15
Figure 2 : Vision générale simplifiée des grandes étapes de développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse, et de différenciation dans les organes lymphoïdes secondaires.	16
Figure 3 : Etablissement de l'identité B dans la moelle osseuse.....	17
Figure 4 : Les différentes étapes de la recombinaison VDJ.....	20
Figure 5 : Points de contrôle de la tolérance centrale et périphérique chez des individus sains.	22
Figure 6 : Vue d'ensemble des différents points de contrôle de la tolérance B centrale et périphérique.....	23
Figure 7 : Contrôle intrinsèque de l'apoptose des cellules autoréactives.	24
Figure 8 : Structure des organes lymphoïdes secondaires spléniques et ganglionnaires.....	25
Figure 9 : Différenciation et survie des LB folliculaires et de la zone marginale.....	27
Figure 10 : Activation des LB de la zone marginale, de façon dépendante et indépendante des cellules T, dans la rate.	29
Figure 11 : Représentation schématique de l'activation de la voie calcique et des voies PI3K, MAPK et NF- κ B, après activation du BCR.	31
Figure 12 : Schéma simplifié des voies de signalisation des voies TLRs.....	34
Figure 13 : Principaux régulateurs négatifs des voies d'activation du LB.	36
Figure 14 : Etapes de la formation d'un centre germinatif au sein d'un follicule lymphoïde.	38
Figure 15 : La réaction du centre germinatif (GC) comprend des étapes de sélection des LB par les cellules dendritiques folliculaires (FDC) et les LT folliculaires helper (LTFH), de délétion et de diversification des anticorps.....	39
Figure 16 : Schéma représentatif du mécanisme d'hypermutation somatique.....	41
Figure 17 : Schéma représentatif du mécanisme de commutation de classe.....	42
Figure 18 : Niveau d'expression des principaux gènes contrôlant la différenciation plasmocytaire.	44
Figure 19 : Contrôle transcriptionnel de la différenciation en cellule sécrétrice d'anticorps.....	44
Figure 20 : Voies de l'Unfolded Protein Response.....	48
Figure 21 : XBP1, à l'intersection de l'UPR et de la différenciation plasmocytaire.	50
Figure 22 : Les formes membranaires et sécrétées des immunoglobulines sont générées par épissage alternatif.....	51
Figure 23 : Mécanisme de sécrétion des anticorps.	53
Figure 24 : Vue d'ensemble des différents points de contrôle de la tolérance B centrale et périphérique.....	59

Figure 25 : Frise chronologique reportant les principaux scientifiques qui ont contribué à la découverte et à la caractérisation du LES.	65
Figure 26 : Schéma de la physiopathologie du lupus.....	66
Figure 27 : Principaux symptômes retrouvés au cours du lupus.....	67
Figure 28 : Représentation schématique des principales anomalies cellulaires rencontrées au cours du LES.	79
Figure 29 : Schéma de la co-activation des voies BCR et TLR9 dans les cellules B autoréactives exprimant un BCR de type FR.....	83
Figure 30 : Des lymphocytes B auto- et poly-réactifs sont présents parmi les cellules B transitionnelles (new emigrant) et matures naïves chez les patients souffrant d'autoimmunité.....	87
Figure 31 : Des autoanticorps sont présents bien avant le déclenchement de la maladie lupique.	90
Figure 32 : Illustration des 3 modes de constitution des dépôts de complexes immuns au niveau des glomérules rénaux.	92
Figure 33 : Illustration du mode d'action de 3 biothérapies dirigées contre les lymphocytes B : le Belimumab, le Rituximab et l'Abatacept.....	95
Figure 34 : Représentation schématique des mécanismes par lesquels les agents infectieux peuvent déclencher une autoimmunité.	98
Figure 35 : Exemple de mécanismes épigénétiques potentiellement impliqués dans le LES : la méthylation de l'ADN, la modification des histones et la régulation par les ARN (miRNA, siRNA). ...	104
Figure 36 : Frise chronologique illustrant les découvertes en génétique humaine (à droite) et la description des gènes de susceptibilité au développement du LES (à gauche).	106
Figure 37 : Schéma de la physiopathologie de lupus avec la localisation des principaux gènes associés à la maladie.	119
Figure 38 : Dendrogramme obtenu après clusterisation des résultats des microarrays des 17 patients et des 9 contrôles.	126
Figure 39 : Structure des protéines FKBP.....	130
Figure 40 : L'isomérisation Cis/Trans du pont Gly237-Pro238-Phe239 de la protéine CrkII est catalysée par les PPlases.	131
Figure 41 : Le niveau de surexpression de Trib3 module la phosphorylation de Erk dans les cellules Hela. Les doses (µg) correspondent à la quantité de plasmide hTrib3 transfecté dans les cellules. ...	135
Figure 42 : Représentation schématique de la structure protéique de Trib1.....	137
Figure 43 : Trib1 interagit avec MEK1 et MKK4 dans les cellules HeLa.....	138
Figure 44 : Trib1 (Trb-1) et Trib3 (Trb-3) inhibent l'activité d'AP-1 de manière dépendante du type cellulaire.....	138
Figure 45 : Résumé des fonctions de Trib1 décrites dans la littérature.	140

Figure 46 : Carte de la partie du vecteur CTV permettant l'insertion ciblée du transgène contenant la séquence de Trib1 par recombinaison homologue dans le locus ROSA.	143
Figure 47 : Schéma récapitulatif de la cinétique d'injection et de prélèvement du sérum lors de l'immunisation à l'OVA avec l'adjuvant de Freund.	153
Figure 48 : Schéma récapitulatif de la cinétique d'injection et de prélèvement du sérum lors de l'immunisation à l'OVA avec l'Alum.	154
Figure 49 : Schéma récapitulatif de la cinétique d'injection et de prélèvement du sérum lors de l'immunisation avec NP-KLH.	154
Figure 50 : Schéma récapitulatif de la cinétique d'injection et de prélèvement du sérum lors de l'immunisation avec NP-LPS.	155
Figure 51 : Schéma récapitulatif de la cinétique d'injection et de prélèvement du sérum lors de l'infection à <i>Borrelia burgdorferi</i>	155
Figure 52 : Schéma récapitulatif de la cinétique d'injection et de prélèvement du sérum lors de l'injection de LPS.	156
Figure 53 : Carte du vecteur pMX-Pie (Puromycin Ires eGFP).	158
Figure 54 : Description des données analysées pour chacune des protéines identifiées par spectrométrie de masse.	165
Figure 55 : Expression de <i>TRIB1</i> dans les LB de sujets sains, des 17 patients lupiques quiescents et du sous-groupe de 5 patients.	169
Figure 56 : Expression de <i>Trib1</i> dans les sous-populations B de la moelle osseuse et de la rate de souris B6 (n=1) et BALB/c (n=2) âgées de 4 mois.	171
Figure 57 : Expression de <i>TRIB1</i> dans les sous-populations B matures chez l'Homme.	171
Figure 58 : Expression de <i>Trib1</i> après stimulation de LB spléniques de souris B6 triés, avec un anticorps anti-IgM, du LPS ou une combinaison de LPS et IL-4.	172
Figure 59 : <i>Trib1</i> n'est pas surexprimé dans les LB du modèle (NZBxNZW)F1.	173
Figure 60 : Mise en évidence de la cassette STOP au niveau de l'ADN des LB Trib1-KI-Bimm.	175
Figure 61 : Expression de <i>Trib1</i> dans plusieurs populations et organes lymphoïdes de souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm.	176
Figure 62 : Visualisation de l'expression de la GFP dans les différents organes lymphoïdes par cytométrie en flux.	177
Figure 63 : Répartition des sous-populations lymphocytaires B et T dans les organes lymphoïdes primaires et secondaires des souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm.	180
Figure 64 : La surexpression de <i>Trib1</i> n'induit pas de modification de l'activation basale des LB ganglionnaires et spléniques des souris Trib1-KI-Bimm et Trib1-KI âgées de 3 mois.	181

Figure 65 : Dosage des IgM, des IgG totales et des sous-classes IgG1, IgG2b et IgG3 par ELISA dans le sérum des souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm, âgées de 3 mois (A), 6 mois (B) et 12 mois (C).	182
Figure 66 : Dosage des immunoglobulines par ELISA dans le surnageant de culture de cellules spléniques totales de souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm, incubées pendant 72h avec différents stimuli.	184
Figure 67 : Dosage des immunoglobulines par ELISA dans le sérum de souris Trib1-KI-Bimm et Trib1-KI immunisées avec de l'ovalbumine et de l'adjuvant de Freund.	186
Figure 68 : Dosage des immunoglobulines par ELISA dans le sérum de souris Trib1-KI-Bimm et Trib1-KI immunisées avec de l'ovalbumine associée à de l'hydroxyde d'aluminium.	187
Figure 69 : Dosage des immunoglobulines par ELISA dans le sérum de souris Trib1-KI-Bimm et Trib1-KI immunisées avec du NP-KLH.	188
Figure 70 : Dosage des immunoglobulines par ELISA dans le sérum de souris Trib1-KI-Bimm et Trib1-KI immunisées avec du NP-LPS.	189
Figure 71 : Validation de l'infection des souris Trib1-KI-Bimm et Trib1-KI par <i>Borrelia burgdorferi</i> et dosage des immunoglobulines spécifiques.	190
Figure 72 : Dosage des autoanticorps IgM et IgG anti-ADNdb dans le sérum des souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm à 3 et 6 mois.	191
Figure 73 : La surexpression de <i>Trib1</i> induit une diminution de la production d'IgM anti-ADNdb à J28 après injection de LPS.	192
Figure 74 : Mise en évidence de la délétion de la cassette STOP au niveau de l'ADN des LB de souris Trib1-KI-Bmat.	194
Figure 75 : Expression de <i>Trib1</i> dans plusieurs populations et organes lymphoïdes de souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bmat.	195
Figure 76 : Visualisation de l'expression de la GFP dans les différents organes lymphoïdes des souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bmat par cytométrie en flux.	196
Figure 77 : Répartition des sous-populations lymphocytaires B et T dans les organes lymphoïdes primaires et secondaires des souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bmat à 3 mois.	197
Figure 78 : Les animaux Trib1-KI-Bmat ne présentent pas de défaut de production d'IgG1 sériques à l'âge de 6 mois.	198
Figure 79 : Dosage des Ig dans le surnageant de culture de splénocytes de souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bmat, stimulés avec une combinaison de LPS et d'IL-4 pendant 72 heures.	199
Figure 80 : Les animaux Trib1-KI-Bmat ne présentent pas de défaut d'IgM anti-OVA 20 jours après une immunisation à l'ovalbumine.	199
Figure 81 : Visualisation de l'expression de la GFP dans les différents organes lymphoïdes ((A) thymus et rate et (B) GG) des souris Trib1-KI et Trib1-KI-Tmat par cytométrie en flux.	201

Figure 82 : Répartition des sous-populations lymphocytaires B et T dans les organes lymphoïdes primaires et secondaires des souris Trib1-KI et Trib1-KI-Tmat à 3 mois.....	202
Figure 83 : Dosage des immunoglobulines (IgM, IgG, IgG1) par ELISA dans le sérum de souris Trib1-KI-Tmat et Trib1-KI âgées de 6 mois.	203
Figure 84 : La stimulation de LB triés (CD43 ⁻) par du LPS et de l'IL-4 induit une diminution de la production des IgG1 dans le surnageant de culture.....	205
Figure 85 : Analyse de la mortalité des splénocytes et de la prolifération des LB Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm, après stimulation <i>in vitro</i>	206
Figure 86 : L'activation des LB surexprimant <i>Trib1</i> n'est pas modifiée après stimulation <i>in vitro</i>	208
Figure 87 : Etude de la différenciation plasmocytaire.	209
Figure 88 : Etude de la commutation de classe vers IgG1 et IgG3.	211
Figure 89 : Analyse des IgG1 intracytoplasmiques par cytométrie en flux.	212
Figure 90 : Etude de l'activation des voies Erk et NF-κB après une stimulation avec un anticorps anti-IgM ou une combinaison LPS/IL-4.	214
Figure 91 : Vérification de la transduction des lignées cellulaires CH12F3-Vide, CH12F3-Cter et CH12F3-Nter.....	216
Figure 92 : Analyse de la commutation de classe et de la production d'IgA des CH12F3 après stimulation <i>in vitro</i>	217
Figure 93 : Vérification de la transduction et phénotypage de la lignée CH12F3-Trib1.	218
Figure 94 : Schéma récapitulatif des 3 expériences de colP effectuées.	221
Figure 95 : Plan de découpage des gels utilisés pour les analyses n°4 et n°5.	222
Figure 96 : Répartition (en %) des 368 protéines totales retrouvées au cours des 5 analyses par spectrométrie de masse.....	224
Figure 97 : Répartition (en %) des 50 protéines retrouvées dans au moins 3 des 5 analyses de spectrométrie de masse réalisées sur les échantillons Trib1-Cter, et non retrouvées dans les échantillons GFP-HA-Flag.	227
Figure 98 : Vérification par Western-Blot de la présence de Stk40 et Trib1-HA-Flag après colP anti-STK40.....	230
Figure 99 : 6 protéines sont retrouvées communes entre les analyses faites à l'IGBMC et à l'IBMC.	231
Figure 100 : Représentation schématique de la progression de la maladie lupique, partagée entre des phases d'activité et de quiescence.	245

Tableau 1 : Liste non exhaustive de maladies autoimmunes (MAI) spécifiques ou non spécifiques d'organes.....	64
Tableau 2 : Critères de diagnostique du LES établis par l'American College of Rheumatology (ACR), d'après la réévaluation de 1997.	67
Tableau 3 : Description des manifestations cliniques chez le patient et leurs valeurs qui, additionnées déterminent le score SLEDAI.	69
Tableau 4 : Présentation de différents modèles murins lupiques spontanés et induits.	73
Tableau 5 : Tableau représentant les principaux autoanticorps au cours du LES, leur prévalence et leur rôle pathologique.	89
Tableau 6 : Liste des autoanticorps corrélés avec l'activité de la maladie.	89
Tableau 7 : Description des cas de lupus monogéniques dus à des déficits en protéines du complément.	112
Tableau 8 : Récapitulatif des principaux gènes associés au LES, leur localisation chromosomique, leur fonction ainsi que l'odd ratio correspondant, s'il est connu.....	120
Tableau 9 : Caractéristiques cliniques, activité de la maladie et médicaments apportées aux patients au moment de l'étude.	125
Tableau 10 : Récapitulatif des partenaires interagissant avec Trib2 et Trib3.	136
Tableau 11 : Tableau récapitulatif des programmes de PCR utilisés pour génotyper les souris.....	146
Tableau 12 : Tableau récapitulant le pourcentage moyen de cellules exprimant la GFP dans les différents organes lymphoïdes des souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm à partir de l'analyse par cytométrie en flux.....	178
Tableau 13 : Tableau récapitulant le pourcentage moyen de cellules exprimant la GFP dans les différents organes lymphoïdes des souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bmat à partir de l'analyse par cytométrie en flux.....	195
Tableau 14 : Présentation des 50 protéines spécifiquement retrouvées dans les échantillons Trib1-Cter dans au moins 3 des 5 analyses effectuées par MS.	226
Tableau 15 : Liste des 33 protéines candidates finales.....	228

LISTE DES ABREVIATIONS

A

AAV : Associated Vasculitis
 ACC : Acétyl CoA Carboxylase
 ACR : American College of Rheumatology
 ADN : Acide DésoxyriboNucléique (db : double brin ; sb : simple brin)
 AID : Activation-Induced cytidine Deaminase
 AKAP 8 : A-Kinase Anchor Protein 8
 AKR/J : Lignée murine
 Alum : Hydroxyde d'Aluminium
 AML : Leucémie Myéloïde Aiguë
 AP-1 : Activator Protein-1
 APOBEC1 : AID/apolipoProtein B mRNA-Editing enzyme-Catalytic
 ARN : Acide RiboNucléique (ARNm : ARN messenger)
 ASC : Cellule Sécrétrice d'Anticorps
 ATF4/6 : Activating Transcription Factor 4/6
 ATG5 : AuTophagy protein 5
 ATP : Adenosine TriPhosphate

B

B6 : C57BL/6 : Lignée murine
 Bach2 : BTB and CNC homology 2
 BAFF : B-cell Activating Factor (aussi appelé BlyS)
 BAFF-R : Récepteur de BAFF
 Balb/c : Lignée murine
 BANK1 : B-cell scaffold protein with AnKyrin repeats 1
Bb : *Borrelia burgdoferi*
 BCAP : B-Cell phosphoinositide 3-kinase Adaptor Protein
 Bcl-2/6 : B-cell lymphoma 2/6
 BCMA : B cell Maturation Antigen
 BCR : B Cell Receptor
 BER : Base Excision Repair
 BILAG : British Isles Lupus Assessment Group
 Bim : BCL-2 interacting mediator of cell death
 BiP : Binding immunoglobulin Protein
 Blimp1 : (ou Prdm1) B lymphocyte-induced maturation protein-1
 Blk : B lymphocyte kinase
 Btk : Bruton's tyrosine kinase
 BXSb : Lignée murine lupique

C

C3H/HeJ : Lignée murine
 CAG : Chicken beta-actin promoter with CMV enhancer
 CARD11 : CAspase Recruitment Domain family member 11
 CD : Cluster of Differentiation
 cDC : Cellule Dendritique conventionnelle
 CDR3 : Complementary Determining Region 3
 C/EBP : CCAAT-Enhancer Binding Protein
 CH12F3 : Lignée cellulaire lymphocytaire B murine
 CHOP : C/EBP HOmologous Protein
 CLP : Progéniteur Lymphoïde Commun
 CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
 CNV : Copy Number Variant
 colP : ColImmunoPrécipitation
 CREB : C-AMP Response Element-binding protein
 CREM α : C-AMP Response Element Modulator α
 Crk : CT10 regulator of kinase
 CSH : Cellule Souche Hématopoïétique
 CTLA4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4
 CTV : CAG-STOP-EGFP-ROSA Targeting vector
 CXCL : Chemokine Ligand
 CXCR : Chemokine Receptor

D

DAG : DiAcyl Glycerol
 DAMP : Damage-Associated Molecular Pattern
 DC : Cellule Dendritique
 DICV : Déficit Immunitaire Commun Variable
 DILE : Drug-Induced Lupus Erythematosus
 DL-1 : Delta-like 1 Ligand
 DNase : Désoxyribonucléase
 DNMT1 : DNA méthyltransférase 1

E

Ebf1 : Early B cell factor 1
 EBNA1 : Epstein-Barr Nuclear Antigen 1
 EBV : Virus de l'Epstein Barr
 ECLAM : European Consensus Lupus Activity Measurement
 Egr-1 : Early growth response protein 1
 eIF2 α : eukaryotic translation Initiation Factor 2 α
 ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
 EPN4 : aussi appelé Clint1 pour Clathrin interacting protein localized in the trans-Golgi region
 ERAD : ER-Associated-Degradation

Erk1/2 : Extracellular signal-regulated kinase

Ets1 : Avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog-1

F

Fc : Fragment constant

FcR : Récepteur au Fragment constant

FDC : Cellule Dendritique Folliculaire

FKBP : FK506-Binding Protein

Flt3L : Fms-related tyrosine kinase 3 Ligand

Foxo1 : Forkhead box protein O1

FR : Facteur Rhumatoïde

FYB : Fyn-Binding Protein

G

G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor

GADD34 : Growth Arrest and DNA Damage-inducible Protein

GFP : Green Fluorescent Protein

GG : Ganglions

GN : GloméruloNéphrite

Grb2 : Growth factor receptor-bound protein 2

GRP : Glucose-Regulated Proteins

GWAS : Genome Wide Association Study

H

HA : Hémagglutinine

HEK293T : Lignée de cellules épithéliales humaines

HEL : Hen Egg Lysozyme

HeLa : Henrietta Lacks, lignée de cellules épithéliales humaines

HLA : Human Leukocyte Antigen

Hmgb1 : High mobility group protein b1

HTLV : Human T-cell Leukemia Virus

I

ICAM1 : InterCellular Adhesion Molecule 1

ICOS : Inducible COStimulator

IFIT3 : InterFeron-Induced protein with Tetratricopeptide repeats 3

IFN : InterFéron (-I de type 1)

IFNAR : Récepteur à l'IFN-I

Ig : Immunoglobuline

IKK α : I κ B-Kinase α

IL : InterLeukine

IP3 : Inositol Triphosphate

IPEX : Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome

IRAK4 : IL-1 Receptor-Associated Kinase 4

Ire1 α : Inositol requiring enzyme 1 α

IRES : Internal Ribosome Entry Site
Irf4/5/7/8 : Interferon regulatory factor 4/5/7/8
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITGAM : Integrin Alpha M
ITIM : Immunoreceptor Tyrosine based Inhibitory Motif

J

JNK : c-Jun N-terminal Kinase

K

KI : Knock-In
KO : Knock-Out

L

LAP2 : aussi appelée Erbin pour ErbB2-interacting protein
LB : Lymphocyte B
LB Fo : Lymphocyte B Folliculaire
LB MZ : Lymphocyte B de la Zone Marginale
LBreg : Lymphocyte B régulateur
LES : Lupus Erythémateux Systémique
LFA1 : Lymphocyte Function-associated Antigen 1
LPS : LipoPolySaccharide
Lpr : Lymphoprolifération
LT : Lymphocyte T
LT_{FH} : LT helper folliculaire
LTh : Lymphocyte T helper
LTi : Lymphoid Tissue-inducer
LTreg : Lymphocyte T régulateur

M

MAI : Maladie AutoImmune
MALT1 : Mucosa Associated Lymphoid tissue lymphoma Translocation protein 1
MAMP : Microbe-Associated Molecular Pattern
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MBL : Mannose Binding Lectin
MBP : Myelin Basic Protein
MC : Membrane Coding
miRNA (miR) : micro ARN
MKK : MAP Kinase Kinase
MLV : Murine Leukemia Virus
MMR : MisMatch Repair
MO : Moelle Osseuse
MRL^{*lpr/lpr*} : Lignée murine lupique
MS : Spectrométrie de Masse

MSH2/5/6 : MutS Homolog 2/5/6
mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
MyD88 : Myeloid Differentiation primary response gene 88
MZ : Zone Marginale

N

NAc : Anticorps Naturel
NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide PHosphate-oxidase
NBH : Neutrophiles B-cell helper
ND : Non Déterminé
NET : Neutrophil Extracellular Trap
NFAT : Nuclear Factor of Activated T cells
NF-κB : Nuclear Factor- κB
NHEJ : Non-Homologous End Joining
NK : Natural Killer
NLR : NOD-Like Receptor
NP : 4-hydroxy-3-NitroPhenylacetyl (NP-KLH : NP- Keyhole Limpet Hemocyanin)
NS : Non Stimulé
NZBxNZW F1 : Lignée murine lupique New Zealand Black x New Zealand White génération F1

O

OR : Odd Ratio
OVA : Ovalbumine

P

Pax5 : Paired box protein 5
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell
PB : Plasmablaste
PC : Plasmocyte
PCh : Phosphorylcholine
PCR : Polymerase Chain Reaction
PD-1 : Programmed cell Death 1
PD-L1 : Programmed cell Death-Ligand 1
pDC : Cellule Dendritique plasmacytoïde
PERK : PRKR-Like Endoplasmic Reticulum Kinase
PGA : Physician Global Assessment
PH : Domaine homologue à la pleckstrine (substrat de la protéine Kinase C)
PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase
PIP₂ : Phosphatidylinositol-(4,5)-diPhosphate
PIP₃ : Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triPhosphate
PKA : Protein Kinase A
PLCγ2 : PhosphoLipase Gamma 2
PMA : Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PPARγ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ
PPIase : Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerase

PR : Polyarthrite Rhumatoïde
Prdm1 (ou Blimp1) : PR domain containing 1
pré-BCR : pré-Récepteur de la Cellule B
PRKC B/D : protéine kinase C β/δ
PRR : Pattern Recognition Receptors
PTEN : Phosphatase and TENSin homolog
PTP1B : Protein Tyrosin Phosphatase 1B
PTPN : Protein Tyrosine Phosphatase Non-receptor type

Q

qRT-PCR : quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

R

RAG : Recombinating Activating Gene
RAR α : Retinoic Acid Receptor α
RasGRP3 : Ras Guanyl Releasing Protein 3
RE : Réticulum Endoplasmique (RER : RE rugueux)
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
RIDD : Regulated IRE1-Dependant Decay
RNase : RiboNucléase
RNP : RiboNucléoProtéine
Ro : Ribonucléoprotéine Ro
ROS : Reactive Oxygen Species
RPA : Replicative Protein A
RS : Recombining Sequence
RSS : Séquence Signal de Recombinaison
RXR : Retinoid X Receptor

S

S1P : Sphingosine-1-Phosphate
S1PR1 : Sphingosine-1-phosphate receptor 1
SACQ : Sérologiquement Actif Cliniquement Quiescent
SAVI : Sting-Associated Vasculopathy with onset in Infancy
SC : Secretion-Coding
SCID : Severe Combined ImmunoDeficiency
SELENA : Safety of Estrogens in Lupus Erythematosus National Assessment
SHIP : SH2-domain containing Inositol 5' Phosphatases
SHP1 : SH2-domain containing Phosphatase 1
shRNA : short hairpin RNA
SI : Système Immunitaire
SLAM : Systemic Lupus Activity Measure
SLEDAI : Systemic Lupus Disease Activity Index
SLICC : Systemic Lupus Index Collaborating Clinical

SNP : Single Nucleotide Polymorphism
SPRED 1-2 : Sprouty-related EVH1 domain-containing protein 1-2
SRP : Signal Recognition Particle
STAT4 : Signal Transducers and activators of Transcription 4
STING : Stimulator of Type I IFN Gene
STR : Short Tandem Repeats
Syk : Spleen tyrosine kinase

T

T1/T2/T3 : Lymphocyte B Transitionnel 1/2/ 3
TACI (TNFRSF13B) : Transmembrane Activator and CAML Interactor
Tcf 3/4/12 : Transcription factor 3/12
TCR : T Cell Receptor
TD : T-Dépendant
TdT : Terminal deoxynucleotidyl Transferase
TG : TriGlycérides
TGF- β : Transforming Growth Factor- β
THP-1 : Lignée cellulaire humaine monocytaire
TI : T-Indépendant
TLR : Toll-Like-Receptors
TNF : Tumor Necrosis Factor
TNFAIP3 (A20) : Tumor Necrosis Factor, Alpha-Induced Protein 3
TNIP1 : TNFAIP3 Interacting Protein 1
TPR : TetratricoPeptide Repeat
TREX1 : Three Prime Repair Exonuclease 1
TYK2 : Tyrosine Kinase 2

U

UBE2L3 : UBiquitin-conjugating enzyme E2 L3
UNG : Uracil-DNA Glycosylase
UPR : Unfolded Protein Response
UV : Ultra-Violet

V

VCAM1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VLA4 : Very Late Antigen 4

X

Xbp1 : X-box protein 1

Z

ZAP70 : Zeta-chain-Associated Protein 70



INTRODUCTION



INTRODUCTION

PARTIE A. LES LYMPHOCYTES B : ONTOGÉNÈSE DANS LA MOELLE OSSEUSE ET ACTIVATION EN PÉRIPHÉRIE

Les **lymphocytes B** (LB) sont des composants majeurs du système immunitaire qui possèdent un récepteur qui leur est propre, capable de reconnaître l'antigène. Ce récepteur spécifique, appelé **BCR** pour « B cell Receptor », correspond à une immunoglobuline de surface, composée de deux chaînes lourdes et deux chaînes légères (**Figure 1**). Les LB sont divisés en deux grandes familles. Les **LB B1** font partie de l'immunité innée et sont capables de sécréter des immunoglobulines (Ig) de faible affinité, ils seront décrits en fin de cette première partie. Les LB de type **B2** aussi appelés « conventionnels » font partie de l'immunité adaptative et plus particulièrement de l'immunité responsable de la réponse **humorale**. Cette première partie vise essentiellement à détailler les différentes étapes du développement et de l'activation des LB dits « conventionnels » dans un contexte physiologique (**Figure 2**).

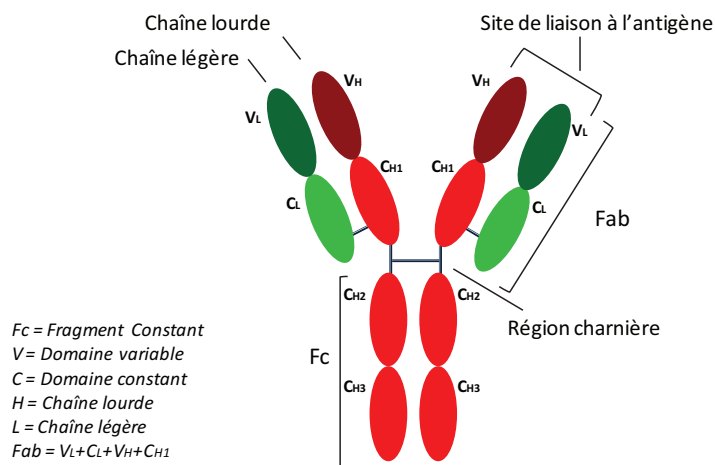


Figure 1 : Structure d'une immunoglobuline de type IgG.

Figure personnelle.

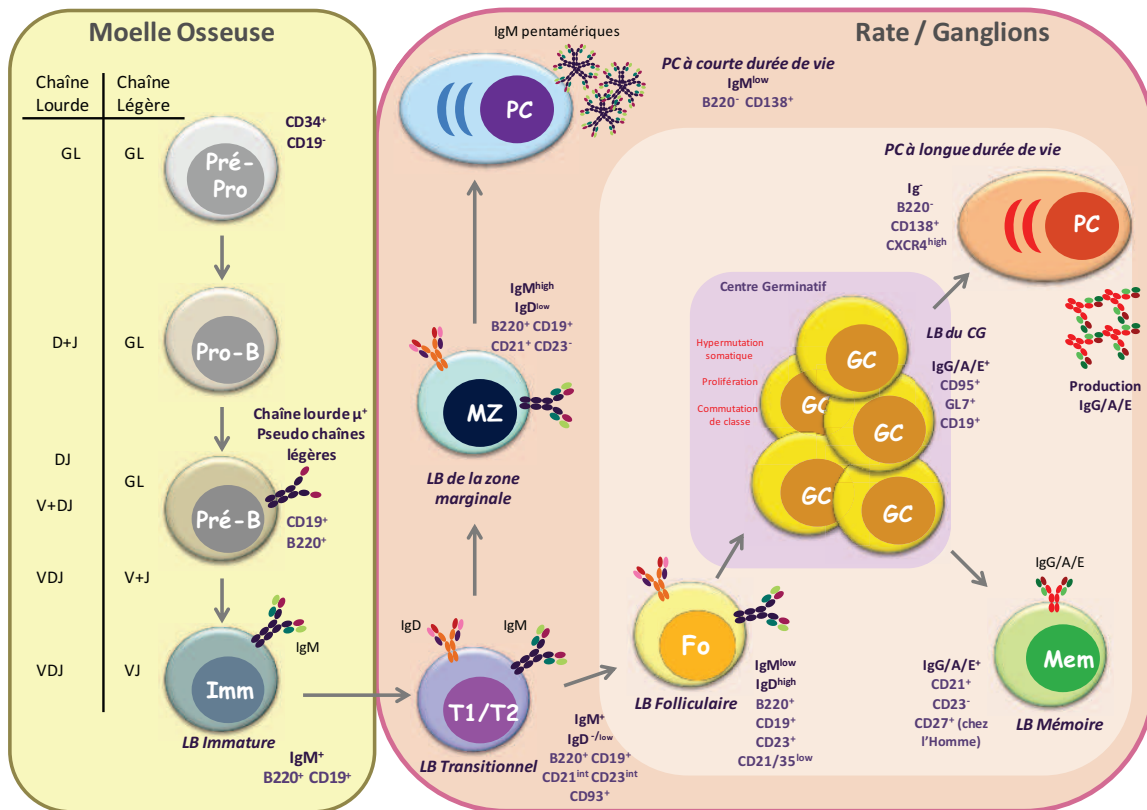


Figure 2 : Vision générale simplifiée des grandes étapes de développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse, et de différenciation dans les organes lymphoïdes secondaires.

GL : Gènes en configuration germinale. Adapté de (Pieper et al., 2013).

A1. DÉVELOPPEMENT B DANS LA MOELLE OSSEUSE

A1.1 ÉTABLISSEMENT DE L'IDENTITÉ D'UN LYMPHOCYTE B

Les cellules de la lignée lymphoïde sont dérivées d'un progéniteur lymphoïde commun (CLP), lui-même issu de plusieurs étapes de différenciation des cellules souches hématopoïétiques (CSH) multipotentes, au sein de la moelle osseuse (MO), organe lymphoïde primaire. La cellule CLP peut donner naissance aux cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), aux cellules lymphoïdes innées (dont les cellules NK (Natural Killer) ou les cellules LTi ((Lymphoid Tissue-inducer)), ainsi qu'aux lignées lymphocytaires B (LB) et T (LT) (Miyazaki et al., 2014). L'engagement du progéniteur lymphoïde commun vers la différenciation de l'un ou l'autre type cellulaire va dépendre d'un vaste réseau transcriptionnel, probablement orienté par le microenvironnement de la niche médullaire (Rothenberg, 2014).

Il est maintenant bien établi que le développement lymphocytaire B est méticuleusement supporté par l'activité de plusieurs régulateurs clés. Tout d'abord, les protéines E de classe I, E12 et E47, codées par le **locus E2A** (aussi appelé Tcf3 pour Transcription factor 3), jouent un rôle essentiel dans la lymphopoïèse. Ces protéines font partie de la famille des protéines à hélice-boucle-hélice et

sont capables d'activer des facteurs de transcription en se fixant à leurs séquences régulatrices « E-box ». Dans le développement B, la déplétion d'E47 bloquerait la différenciation lymphoïde au stade CLP (*Beck et al., 2009*) et privilégierait le développement de la lignée myéloïde (*Cochrane et al., 2009*). L'expression d'E47 et de la protéine E Tcf12 (Transcription factor 12) agirait ensuite de concert pour activer la protéine **Foxo1** (Forkhead box protein O1) conduisant à l'expression d'**Ebf1** (Early B cell factor 1). L'expression d'Ebf1 permet alors de désactiver le programme génique de différenciation en cellules lymphoïdes innées, d'une part, et, conjointement à l'expression d'E2A et Foxo1, d'induire l'expression de **Pax5** (Paired box protein 5), étape importante dans l'établissement de l'identité B, d'autre part. En effet, il est maintenant admis que **l'expression de Pax5 induit une différenciation B irréversible** (*Nutt and Kee, 2007*) (**Figure 3**). A contrario, les LT proviendraient de CLP incapables d'activer Foxo1 et Ebf1. Cette hypothèse propose donc que la différenciation des LT serait finalement une voie engagée « par défaut ». Mais un modèle alternatif suggère que **la localisation nucléaire des facteurs Ebf1 et Foxo1** pourrait être critique dans le choix de la CLP entre devenir un LB ou un LT. Ainsi, une localisation de ces facteurs dans le compartiment nucléaire euchromatinien conduirait au développement B, alors qu'une localisation au niveau de l'hétérochromatine conduirait au développement T (**Figure 3A**).

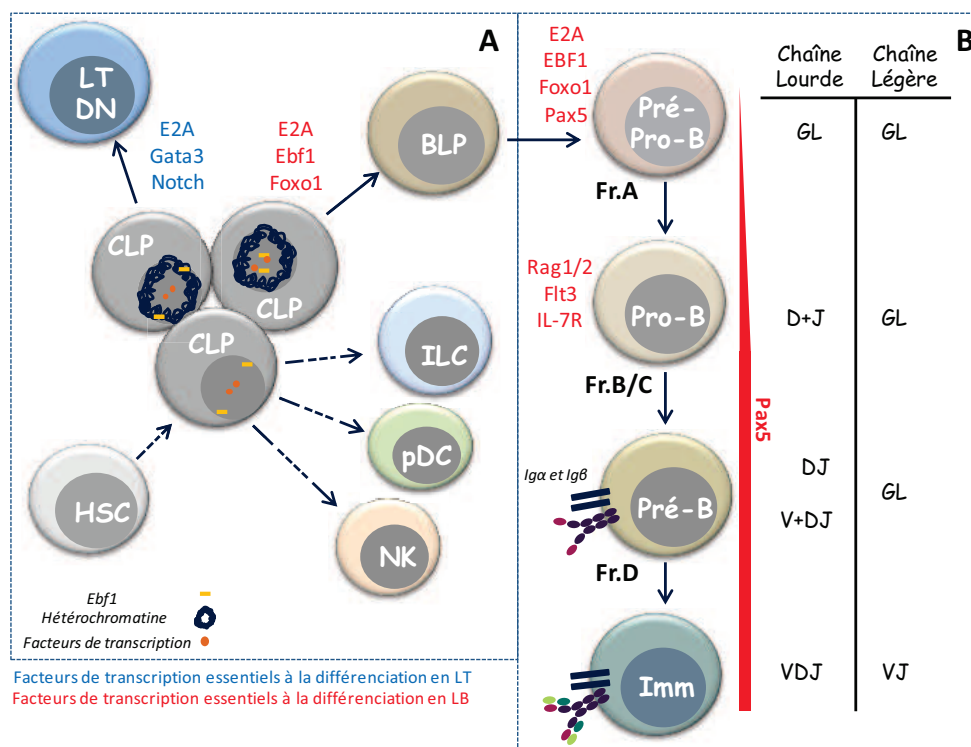


Figure 3 : Etablissement de l'identité B dans la moelle osseuse.

(A) Etablissement de l'identité B à partir du CLP ; (B) Premiers stades de développement B. CLP : Précurseur Lymphoïde Commun ; NK : Natural Killer ; ILC : Cellule Lymphoïde Innée, pDC : Cellule Dendritique plasmacytoïde ; BLP : B-cell biased Lymphoid Precursor ; GL : gènes des immunoglobulines en configuration Germinale ; Fr. A/B/C/D : Fractions des précurseurs B d'après (*Hardy and Hayakawa, 2001*). Adapté de (*Miyazaki et al., 2014*) (*Rothenberg, 2014*).

A1.2 PREMIERS STADES DE DÉVELOPPEMENT B DANS LA MOELLE OSSEUSE

En 1991, les travaux de Hardy et *al.* chez la souris ont permis de définir les précurseurs B comme des cellules ne présentant pas d'immunoglobulines (Ig) de surface mais exprimant le marqueur de la lignée B : B220 (Hardy et *al.*, 1991). Ces précurseurs ont été divisés en **quatre fractions appelées A, B, C et D**, différenciées par leurs marqueurs de surface et leur statut concernant le réarrangement des Ig (**Figure 3B**). La fraction A a été identifiée comme la plus précoce et a été nommée « **pré-pro-B** ». Cette population exprimerait peu Pax5 et pourrait ainsi se différencier en d'autres sous-populations que les LB, incluant les NK ou les pDC (Balciunaite et *al.*, 2005, Pelayo et *al.*, 2005). Des études *in vitro* ont démontré que plusieurs composants microenvironnementaux au niveau de la MO étaient essentiels pour le développement des précurseurs B. Par exemple, il a été montré que la chimiokine CXCL12, produite par les cellules stromales réticulaires, serait cruciale pour retenir dans la MO les précurseurs exprimant son récepteur, CXCR4 (Egawa et *al.*, 2001).

Les fractions cellulaires B et C sont des cellules proliférantes, en réponse à l'action synergique de Flt3L (Fms-related tyrosine kinase 3 Ligand) et de l'IL-7. Ces facteurs, notamment produits par les cellules stromales de la MO, sont essentiels puisque des souris déficientes pour Flt3 (récepteur du Flt3L) (Dolence et *al.*, 2014) (Sitnicka et *al.*, 2003) ou pour l'IL-7R (von Freeden-Jeffry et *al.*, 1995) présentent des défauts sévères de développement B ou B et T, respectivement. Ces fractions B et C correspondent au stade **pro-B**, stade où le réarrangement génique de la chaîne lourde du récepteur aux cellules B (BCR) a lieu. Ce processus nécessite l'expression de plusieurs protéines clés telles que les **recombinases Rag1 et Rag2**, induites par les facteurs Ebf1 et E2A. Le réarrangement primaire de la chaîne lourde s'effectue sur les deux chromosomes. Ce réarrangement, appelé « **VDJ** », est fractionné en deux grandes étapes : la première consiste en l'association d'un segment génique D_H (D pour Diversité, H pour chaîne lourde), et d'un segment génique J_H (J pour Jonction) ; la seconde étape correspond à l'association du segment DJ déjà réarrangé, avec un segment génique V_H (V pour Variable). La recombinaison VDJ sera expliquée en **A1.3.1**.

Le **réarrangement des gènes de la chaîne lourde** (qui débute toujours pour une chaîne lourde de type IgM aussi appelée « μ ») permet ensuite la **formation du complexe du pré-BCR** (pré-récepteur de la cellule B) par l'association de la chaîne lourde à des chaînes légères de substitution (pseudo-chaîne légère) et aux protéines invariantes transmembranaires Ig α et Ig β (CD79a et CD79b), associées en dimères. Ces deux protéines transmembranaires permettent la transduction du signal du pré-BCR et du futur BCR, et sont exprimées à partir du stade pro-B jusqu'au stade terminal de différenciation en cellule sécrétrice d'anticorps (ASC) ou jusqu'à la mort de la cellule. Toutes les cellules pro-B n'ayant pas réussi à synthétiser une chaîne lourde fonctionnelle sont éliminées alors

que les autres sont sélectionnées positivement pour le stade suivant : le stade **pré-B**, correspondant à la fraction D (*Hardy and Hayakawa, 2001*).

A partir du stade pré-B, la cellule **réarrange les chaînes légères de l'Ig** en associant un segment V_L (L pour chaîne légère) avec un segment J_L . Ce réarrangement se produit tout d'abord sur le locus κ puis, si les différentes tentatives de réarrangement n'aboutissent pas à l'expression d'une chaîne légère fonctionnelle, le processus continue sur le locus λ . Dès que la cellule pré-B est capable de présenter une Ig d'isotype μ (IgM) fonctionnelle et entière, c'est-à-dire composée de deux chaînes légères et de deux chaînes lourdes, elle est qualifiée de cellule **immature**. Un réarrangement productif pour les deux allèles pourrait mener à la synthèse de deux BCR différents pour une même cellule B. Le mécanisme d'**exclusion allélique**, proposé par Burnet il y a plus de 50 ans, a été, depuis, très étudié, et consisterait notamment en la régulation négative des enzymes Rag, ou en une régulation de l'accessibilité de la chromatine au niveau des loci des Ig. Il permettrait ainsi l'expression d'un BCR unique par cellule B (*Vettermann and Schlissel, 2010*).

Afin d'éliminer toute possibilité de laisser des cellules autoréactives, c'est à dire reconnaissant un antigène du soi (donc potentiellement dangereuses pour l'organisme), rejoindre la circulation, une première sélection au niveau de la MO, appelée **tolérance centrale**, est mise en place au stade immature. Les mécanismes de tolérance seront expliqués dans le paragraphe **A1.4**. Les cellules ayant passé ce premier point de contrôle sont aptes à atteindre la circulation et les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate, les ganglions ou les amygdales, notamment, tout en continuant leur différenciation post-médullaire.

A1.3 RÉARRANGEMENT DES GÈNES DES IMMUNOGLOBULINES

A1.3.1 MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DE LA RECOMBINAISON V(D)J

Le réarrangement des gènes des Ig est un phénomène précoce et essentiel du développement B et consiste en une recombinaison de segments géniques appelée « **recombinaison VDJ** », ayant pour but de former les régions variables des chaînes lourdes et légères (*Schatz and Ji, 2011*). La région variable de la chaîne lourde est composée de 3 segments : V_H , D_H et J_H , et la région variable de la chaîne légère de 2 segments : V_L et J_L . Le complexe protéique nommé « **RAG** » (Recombination Activating Gene), composé des endonucléases Rag1 et Rag2, est l'acteur principal de la recombinaison. Ce complexe est capable de reconnaître des séquences signal de recombinaison (RSS) spécifiques, situées au niveau de chaque segment V, D ou J, pour ensuite conduire à leur rapprochement. Les séquences RSS ont soit une longueur de 12bp, soit de 23bp. Un segment flanqué d'une RSS de 12pb ne peut s'associer qu'avec un segment flanqué de 23pb, ceci, pour éviter par exemple, qu'un segment V ne puisse s'associer à un autre segment V : c'est la règle 12/23.

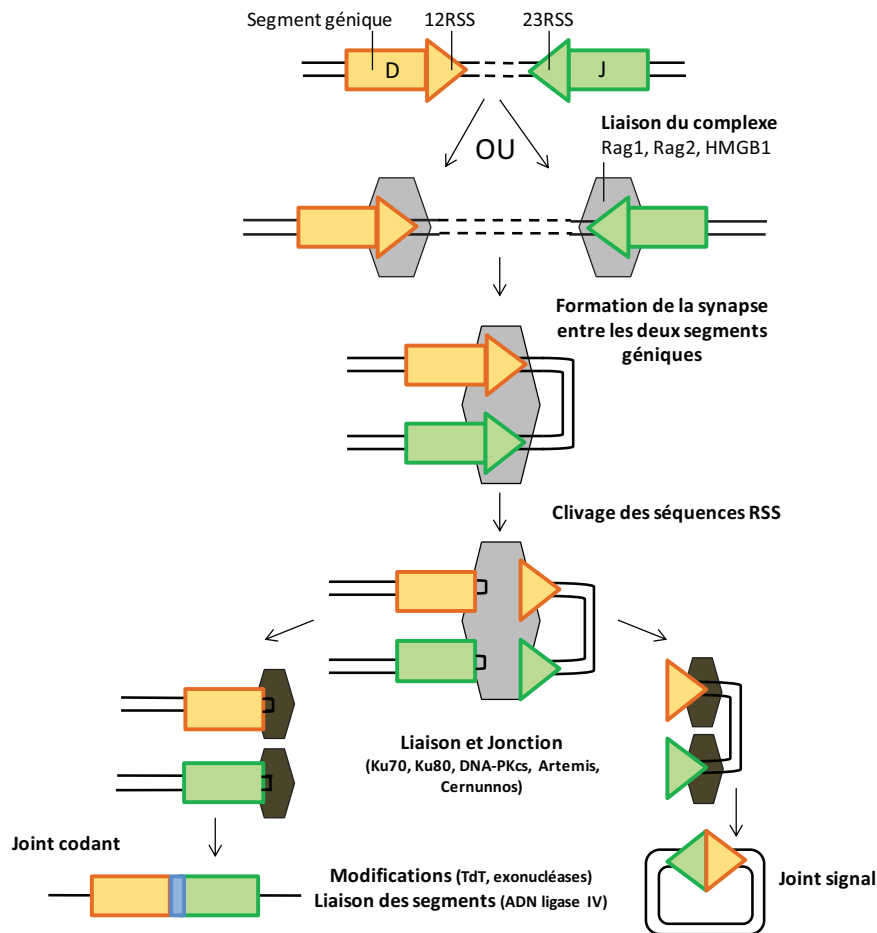


Figure 4 : Les différentes étapes de la recombinaison VDJ.

PK : protéine Kinase. Adapté de (Schatz and Ji, 2011).

La première étape consiste à la reconnaissance d'une première séquence RSS (ex : 23bp), par le complexe RAG associé à la protéine Hmgb1 (High Mobility Group protein B1) et à la « capture » de la deuxième séquence RSS (ex : 12bp) pour former une synapse entre les deux segments. Les enzymes Rag introduisent alors des doubles cassures d'ADN entre chaque gène et sa propre séquence RSS. Puis les protéines Rag coopèrent avec les facteurs de réparation de l'ADN de la famille du NHEJ (non homologous end joining, pour « réparation des extrémités non homologues »), spécifique des cassures d'ADN double brin (ADNdb), afin de joindre les extrémités des séquences d'ADN. Lors de cette étape, des modifications sont réalisées au niveau des extrémités. En effet, des nucléotides peuvent être ajoutés par la TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transferase) ou supprimés par certaines exonucléases. Enfin, la dernière étape est réalisée par l'ADN ligase IV qui permet la ligation finale des deux segments (**Figure 4**).

A1.3.2 LA DIVERSITÉ DU RÉPERTOIRE

Le réarrangement des gènes aux premiers stades du développement B génère **une immense diversité d'Ig**, due à deux processus principaux. Tout d'abord, il existe de multiples copies pour chaque segment V, D et J. Chez l'Homme par exemple, on dénombre, pour la chaîne lourde, une quarantaine de segments géniques V, une vingtaine de segments géniques D et environ 6 segments géniques J, ce qui offre un très grand nombre de combinaisons possibles pour la constitution de la région variable de la chaîne. A ceci s'ajoute le fait que l'association aléatoire des chaînes lourdes aux chaînes légères ajoute à nouveau un nombre considérable de possibilités. Ceci forme la **diversité combinatoire**. De plus, il existe une **diversité jonctionnelle** qui résulte en l'addition ou/et la suppression aléatoire de nucléotides entre les différents segments lors de leur assemblage, par la TdT et des exonucléases, respectivement. Additionnés les uns aux autres, ces mécanismes permettraient l'émergence d'au moins 10^{11} BCR différents, exprimés à la surface des LB naïfs à raison d'un seul type de BCR par cellule. A cela, s'ajoute le processus **d'hypermutation somatique** qui concerne les LB matures activés par l'antigène et consiste à augmenter l'affinité qu'ils ont pour leur antigène, en générant des mutations dans les régions variables du BCR. Ce thème sera abordé plus loin, au cours de la partie **A2.3**.

A1.4 MÉCANISMES DE TOLÉRANCE B CENTRALE

La diversité du répertoire a des avantages considérables dans la lutte contre les pathogènes extérieurs puisqu'elle entraîne la production d'une vaste quantité d'anticorps différents. Néanmoins, cet avantage peut s'avérer délétère car lors du développement B, la recombinaison VDJ peut générer entre 20 et 50% de LB immatures exprimant un BCR autoréactif. Ceci a notamment été démontré par Meffre *et al.*, qui en 2008, étudient le pourcentage de cellules B autoréactives pour des antigènes anti-nucléaires chez des personnes saines. Ce pourcentage s'élève à plus de 70% à un stade très immature et à environ 40% au stade immature, dans la MO (**Figure 5**) (Meffre and Wardemann, 2008). Ainsi, afin d'empêcher le développement de ces lymphocytes autoréactifs, des stratégies cellulaires de tolérance sont mises en place dans la MO : **l'édition du récepteur**, qui vise à réarranger à nouveau les régions variables du BCR, afin de produire un nouveau BCR, potentiellement non autoréactif, et **la délétion clonale** qui aboutit à la mort cellulaire de la cellule B par apoptose (Goodnow *et al.*, 2005, Basten and Silveira, 2010) (**Figure 6**). Les mécanismes de tolérance périphérique seront, quant à eux, détaillés en partie **A2.6**.

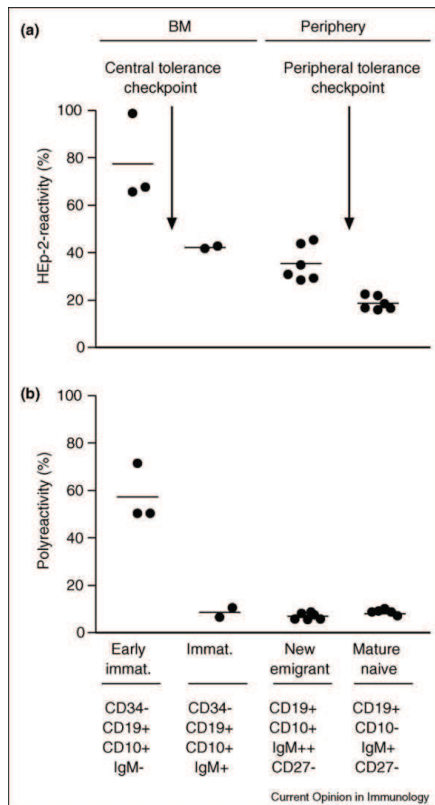


Figure 5 : Points de contrôle de la tolérance centrale et périphérique chez des individus sains.

Présentation du pourcentage de cellules B réagissant contre des autoantigènes nucléaires (réactivité sur cellules Hep2) (a) ou présentant une polyréactivité (testée par ELISA) (b) à différents stades de leur développement dans la MO (BM) ou en périphérie. (Meffre and Wardemann, 2008).

A1.4.1 L'ÉDITION DU RÉCEPTEUR

L'édition du récepteur est le mécanisme **prédominant** de la tolérance centrale (Halverson et al., 2004). Il a lieu dans la MO, au stade immature, lorsque le LB exprime une IgM de surface entière (Figure 6, n°2). Dans le cas où ce LB présente un récepteur avec une trop forte affinité pour un antigène du soi, le BCR est rapidement internalisé et la cellule arrête temporairement sa maturation (Figure 6, n°1) (Luning Prak et al., 2011). Cela induit plusieurs événements au niveau de la cellule : tout d'abord les récepteurs de « homing » (ex : CD62L) ne sont plus exprimés, empêchant ainsi l'attraction de la cellule B vers les organes lymphoïdes secondaires ; puis l'expression des récepteurs de BAFF (B-cell Activating Factor), cytokine importante pour la survie des LB, est diminuée ; enfin, les gènes *Rag1* et *Rag2*, codant pour les enzymes responsables de la recombinaison VDJ, restent exprimés, permettant la mise en place de réarrangements VDJ secondaires (Goodnow et al., 2005). Ces réarrangements secondaires permettent, dans la plupart des cas, d'éliminer le locus réarrangé de la région variable de la chaîne légère et plus rarement de la chaîne lourde responsable de l'autoréactivité, et de le remplacer par un autre. Le réarrangement continue jusqu'à ce qu'un récepteur non autoréactif soit produit ou jusqu'à ce que plus aucun segment génique ne soit disponible pour une recombinaison secondaire. Dans le cas où la cellule reste autoréactive, un programme de mort cellulaire, appelé **délétion clonale**, est induit dans les 2 jours suivants, soit dans la MO, soit rapidement après son arrivée dans la rate.

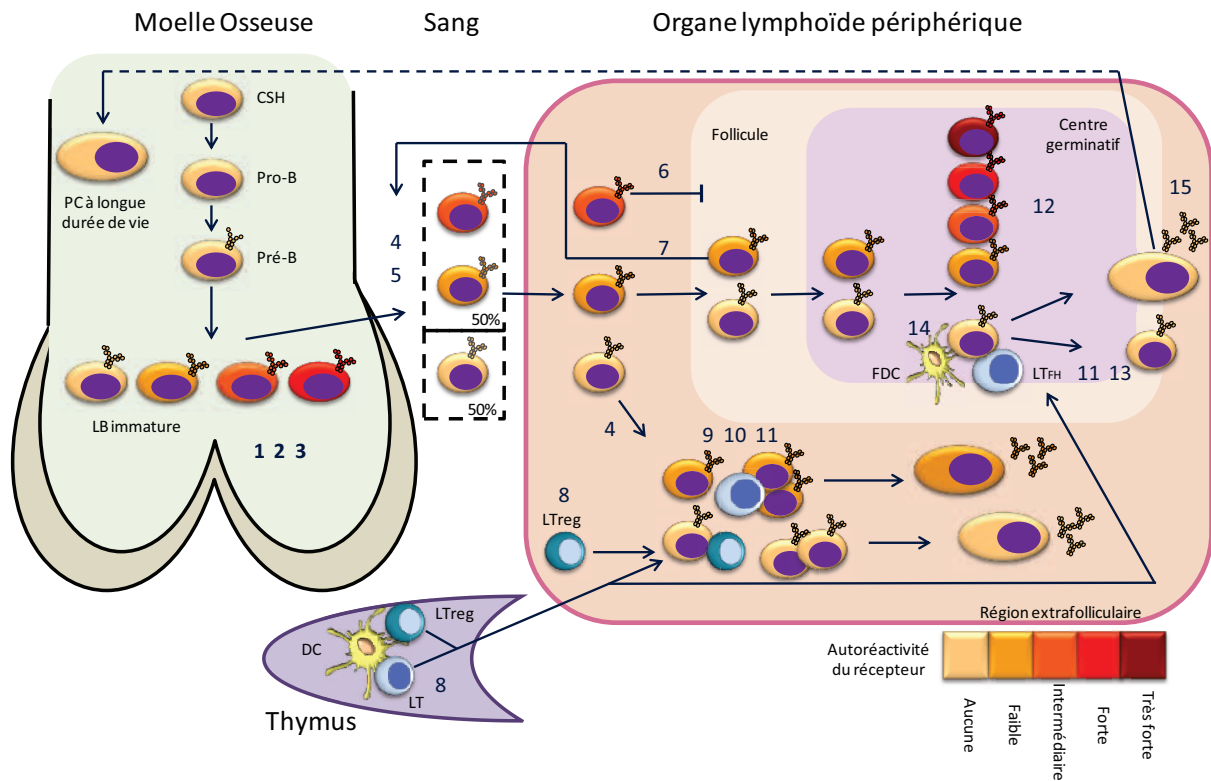


Figure 6 : Vue d'ensemble des différents points de contrôle de la tolérance B centrale et périphérique.

- 1 = Arrêt de la maturation des cellules B immatures
- 2 = Edition du récepteur (principalement des chaînes légères)
- 3 = Délétion clonale
- 4 = Anergie en cas d'affinité intermédiaire pour l'autoantigène
- 5 = Ignorance en cas de très faible affinité pour l'autoantigène
- 6 = Exclusion folliculaire
- 7 = Compétition pour BAFF, retour dans la circulation
- 8 = Différenciation des LTregs
- 9 = Contrôle de l'aide des LThelper
- 10 = Contrôle des voies de signalisation TLR
- 11 = Mort des LB par apoptose induite par les LT via FasL ou par les LTregs via PD-1
- 12 = Mort des LB induite par la voie du BCR
- 13 = Compétition pour l'aide des LTFH
- 14 = Présentation constante de l'antigène par les FDC pour la sélection des LB de haute affinité
- 15 = Contrôle de l'accumulation des autoanticorps et de l'inflammation des tissus

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique ; DC : Cellule Dendritique ; FDC : Cellule Dendritique Folliculaire ; LTFH : Lymphocyte T folliculaire helper ; PC : plasmocyte. Les mécanismes de tolérance périphérique seront exposés dans la partie A2.6 (Figure 24, page 59). Adapté de (Goodnow et al., 2005, Luning Prak et al., 2011).

Néanmoins, ce mécanisme présente des limites puisque, parfois, il n'est pas capable de corriger l'autoréactivité de certains récepteurs et notamment lorsque c'est la chaîne lourde qui est autoréactive. En effet, lors d'un remplacement du segment V de la chaîne lourde, la CDR3 (Complementary Determining Region, ou région hypervariable) est bien souvent conservée et permet ainsi la préservation du caractère autoréactif de la chaîne (Zhang et al., 2004). De plus, le réarrangement secondaire concerne plus fréquemment les chaînes légères que les chaînes lourdes.

Mais étant donné que la spécificité de l'(auto)anticorps est majoritairement définie par la chaîne lourde (*Radic et al., 1993*), le réarrangement de la chaîne légère, dans certains cas, ne suffit pas à abroger le caractère autoréactif du récepteur

A1.4.2 LA DÉLÉTION CLONALE

La **délétion clonale** résulte de la suppression de certains signaux de survie, comme ceux dépendant de BAFF, via une diminution ou une suppression de l'expression de ses récepteurs (BAFF-R, TACI, BCMA) à la surface des cellules B en développement ; il résulte aussi du déclenchement de la **mort programmée par apoptose**. La délétion clonale est à la fois un mécanisme de tolérance centrale (dans la MO) (**Figure 6, n°3**) mais aussi périphérique (dans les organes lymphoïdes secondaires) (voir **A2.6**). Au niveau central, la délétion clonale peut avoir lieu lorsqu'un LB exprime un récepteur très affiné pour un autoantigène après la mise en place des réarrangements primaires, ou lorsque l'édition du récepteur a échoué. L'apoptose y est induite par sa voie intrinsèque (ou mitochondriale), suite au relargage de facteurs pro-apoptotiques tels que Bim, Bak et Bad, capables d'inhiber les facteurs anti-apoptotiques de la famille des BCL-2 (**Figure 7**) (*Strasser and Bouillet, 2003*). L'apoptose conduit à la fragmentation de l'ADN par les caspases.

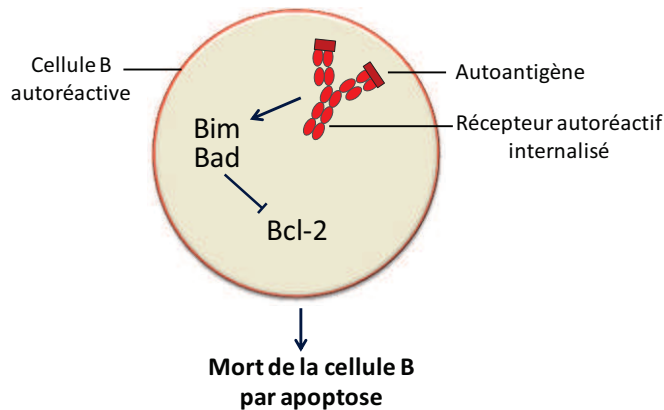


Figure 7 : Contrôle intrinsèque de l'apoptose des cellules autoréactives.

Adapté de (*Goodnow et al., 2005*).

A2. DIFFÉRENCIATION ET ACTIVATION DES CELLULES B EN PÉRIPHÉRIE

A2.1 VERS LA DIFFÉRENCIATION EN LYMPHOCYTE B FOLLICULAIRE OU DE LA ZONE MARGINALE ?

A la sortie de la MO, les LB se dirigent vers les **organes lymphoïdes secondaires**, notamment la rate et les ganglions lymphatiques. La structure de ces organes **consiste en des follicules** entourés du sinus marginal (**Figure 8**) autour duquel, uniquement pour la rate, se situe la **zone marginale (MZ)**. Cette zone particulière est composée de macrophages MZ et de LB MZ (LB de la zone marginale de la rate) qui sont les premiers à être en contact avec l'antigène transporté par la circulation sanguine. Les LB MZ s'activent majoritairement de façon T-indépendante. Au contraire, au sein des follicules

ganglionnaires et spléniques, les LB folliculaires (Fo) sont activés de manière T-dépendante et participent à la formation du centre germinatif, lieu de commutation de classe des Ig, d'hypermutation somatique et de sélection des LB ayant une forte affinité pour leur antigène (maturation d'affinité) (voir partie A2.3).

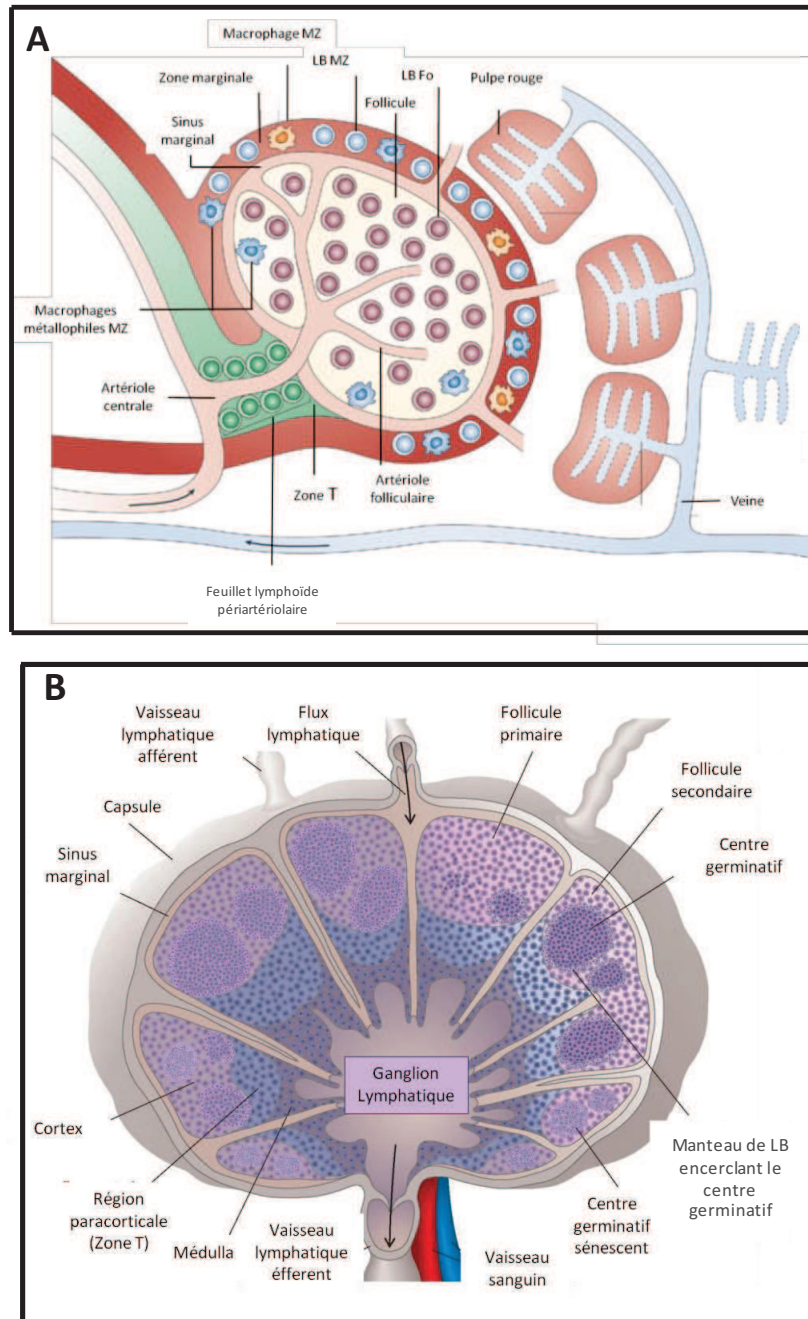


Figure 8 : Structure des organes lymphoïdes secondaires spléniques et ganglionnaires.

(A) Représentation schématique d'un follicule splénique, de ses différents compartiments et composants cellulaires – (B) Représentation schématique de l'ensemble d'un ganglion lymphatique. LB MZ : Lymphocyte B de la Zone Marginale ; LB Fo : Lymphocyte B folliculaire. Adaptés de (Pillai and Cariappa, 2009) et (How-when-what.com).

A2.1.1 LA FORCE DU SIGNAL DU BCR PARTICIPE À LA DIFFÉRENCIATION

Comme nous l'avons vu précédemment, la force du signal du BCR permet l'élimination des cellules B ayant une trop forte affinité pour des antigènes du soi, laissant les cellules peu ou pas autoréactives continuer leur développement. Un modèle reposant sur **la force du signal du BCR induite par des autoantigènes** a été décrit comme intervenant dans la différenciation des LB immatures en LB de type Fo (IgM^{low}IgD^{high}B220⁺CD19⁺CD23⁺CD21^{low}) ou LB MZ (IgM^{high}IgD^{low}B220⁺CD19⁺CD21⁺CD23⁻) (Pillai and Cariappa, 2009). En effet, une réactivité intermédiaire du BCR mènerait vers la différenciation en LB Fo (**Figure 9A**), alors qu'une réactivité plus faible, engagerait la différenciation en LB MZ. La liaison BCR/autoantigène intermédiaire activerait la kinase BTK et inhiberait la voie Notch2, voie capitale pour la différenciation en LB de la MZ (**Figure 9B**). En effet, la stimulation de LB immatures avec le ligand DL-1 (Delta-like 1 Ligand), activateur de la voie Notch2 et présent sur les cellules endothéliales au niveau de la zone marginale, résulte en la différenciation en LB MZ (Roundy et al., 2010) et le modèle murin délété pour Notch2 spécifiquement dans les LB présente une absence totale de LB MZ (Saito et al., 2003). Ce modèle reposant sur la force du BCR n'est, cependant pas entièrement accepté. De plus, une réactivité trop forte pour l'autoantigène induit l'apoptose de la cellule.

A2.1.2 SURVIE ET MAINTIEN DES LB MATURES NAÏFS

Les cellules MZ ou Fo nouvellement différenciées requièrent des signaux de survie, majoritairement assurés par la liaison de **la cytokine BAFF**, à son récepteur BAFF-R (Stadanlick et al., 2008). BAFF est un membre de la famille du TNF (Tumor Necrosis Factor) et est principalement produit par les cellules dendritiques folliculaires (FDC) présentes dans les follicules, qui ont un rôle crucial dans la sélection des LB ayant un récepteur de haute affinité lors de la réaction du centre germinatif.

Le signal intermédiaire BCR/autoantigène des LB Fo agit de concert avec la voie de BAFF-R pour la survie de la cellule, puisque l'activation de la voie du BCR permet l'augmentation de l'expression du précurseur p100 de NF-κB (Nuclear Factor-κB), substrat d'IKKα, (IκB-Kinase α), kinase activée par la voie BAFF-R (Stadanlick et al., 2008)(**Figure 9**).

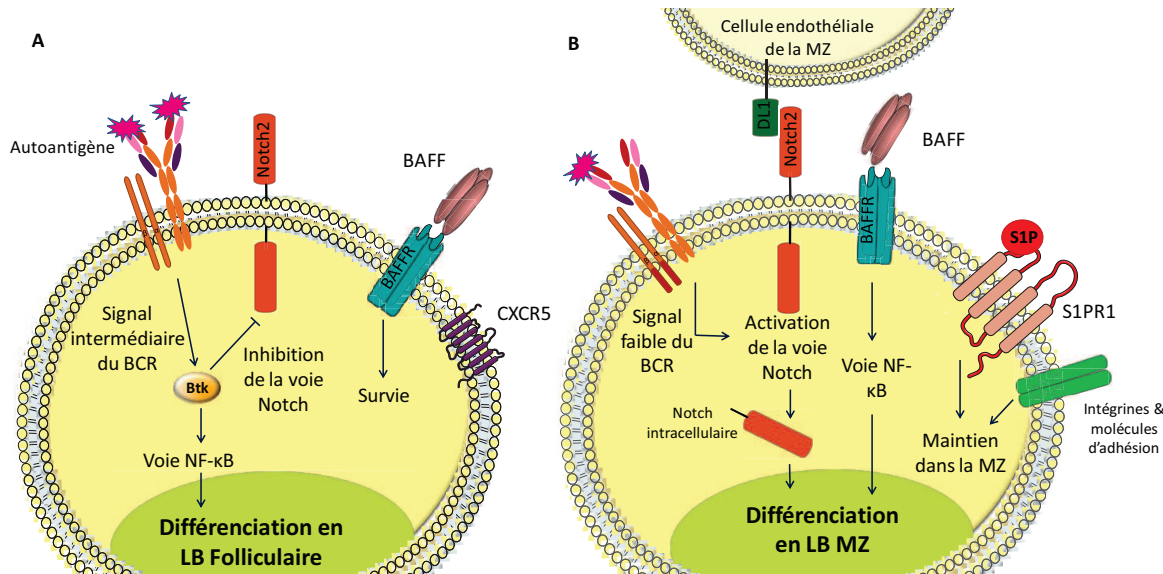


Figure 9 : Différenciation et survie des LB folliculaires et de la zone marginale.

L'intensité du signal du BCR pour l'antigène du soi permet ou inhibe la voie de signalisation Notch, responsable de l'orientation de la différenciation en LB folliculaire (A) ou en LB de la zone marginale (MZ) (B). La survie des deux types de cellules dépend du facteur BAFF, et la migration des cellules dans leur compartiment dépendra de CXCR5 pour les LB folliculaire et de S1PR1 et d'intégrines pour les LB MZ. MZ : Zone Marginale ; DL1 : Delta-like ligand 1 ; S1P : Sphingosine-1-phosphate ; S1PR1 : Sphingosine-1-phosphate receptor 1. Adapté de (Pillai and Cariappa, 2009).

De plus, afin de maintenir leur localisation, les cellules MZ et Fo vont exprimer différents récepteurs. Tout d'abord, l'attraction vers les follicules commence dès le stade transitionnel et reste maintenue pour les LB Fo. Elle résulte en l'expression de **CXCR5**, récepteur de la chimiokine chimioattractante CXCL13, majoritairement produite par les LT_{FH} (LT folliculaires helper) situés dans les follicules. Au contraire, pour migrer et rester au sein de la MZ, les LB MZ expriment le **récepteur S1PR1** (Sphingosine-1-phosphate receptor 1) qui leur permet de contrer l'attraction vers les follicules. Le récepteur S1PR1 se lie à son unique ligand, S1P (Sphingosine-1-phosphate), présent dans le sang qui traverse notamment la zone marginale (Cinamon et al., 2004). D'autres facteurs, telles que les molécules d'adhésion LFA1 (Lymphocyte Function-associated Antigen 1), ICAM1 (InterCellular Adhesion Molecule 1), VCAM1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) et l'intégrine $\alpha 4\beta 1$, participent aussi à la rétention des LB de la MZ au niveau de la zone marginale (Lu and Cyster, 2002) (Figure 9).

A2.1.3 FONCTIONS DES LYMPHOCYTES B FOLLICULAIRES ET DE LA ZONE MARGINALE

Au moment de la rencontre avec l'antigène dans les organes lymphoïdes secondaires, les LB matures vont s'activer et subir des étapes supplémentaires de différenciation, dépendamment ou indépendamment des cellules T.

A2.1.3.1 DEVENIR DU LYMPHOCYTE B DE LA ZONE MARGINALE

Les LB MZ sont majoritairement activés par des **signaux T-indépendants**. Ils peuvent reconnaître directement de petits antigènes apportés par le sang, ou indirectement de plus gros antigènes préalablement capturés par les DC et les granulocytes circulant dans le sang périphérique, ou par les macrophages situés dans la rate (**Figure 10**). En présence de signaux de stimulation, tels que BAFF ou encore l'engagement des voies des TLRs, par exemple par le LPS (Lipopolysaccharide) bactérien (ligand du TLR4), les LB MZ se différencient rapidement en **plasmablastes à courte durée de vie, sécréteurs d'IgM** (Cerutti *et al.*, 2013). Néanmoins, les LB MZ peuvent aussi participer aux réponses dites « **T-dépendantes** » (TD) face à des protéines de la membrane bactérienne, par exemple. Après que le LB MZ ait capturé l'antigène protéique fixé par les protéines du complément via le récepteur CR2 (CD21), l'expression du récepteur membranaire S1PR1, nécessaire à sa localisation dans la MZ, va diminuer et favoriser l'expression de CXCR5 (**Figure 10**). L'expression de CXCR5 permet au LB MZ de migrer vers le follicule et d'entrer dans le centre germinatif (Cinamon *et al.*, 2004). Après avoir « relargué » l'antigène aux FDC au sein du centre germinatif, les LB MZ réexpriment S1PR1 et retournent dans la MZ (Cinamon *et al.*, 2008).

D'autre part, de manière extrafolliculaire, les LB MZ peuvent également présenter des antigènes TD aux LT CD4⁺ et rapidement se différencier en ASC sécrétant des IgG1 de faible affinité. L'expression d'AID et le déclenchement du processus d'hypermutation somatique et de commutation de classe vers IgG ou IgA peuvent être favorisées par une coopération entre les LB MZ et les Neutrophiles B-cell helper (N_{BH}), comme cela a été montré chez l'Homme (Puga *et al.*, 2012).

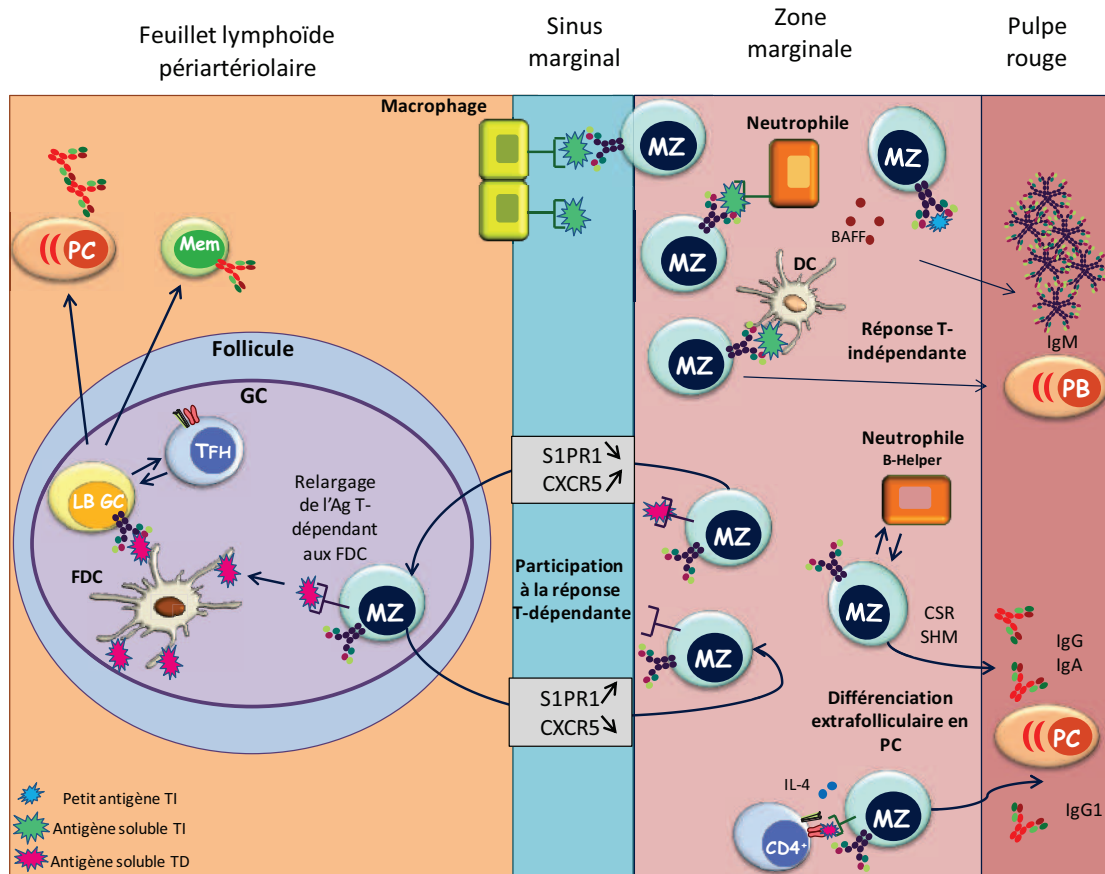


Figure 10 : Activation des LB de la zone marginale, de façon dépendante et indépendante des cellules T, dans la rate.

Les LB MZ s'activent seuls face à des petits antigènes ou des antigènes présentés par les macrophages, neutrophiles ou cellules dendritiques (DC) ne nécessitant pas l'aide des LT (TI pour T-indépendant) et se différencient rapidement en plasmablastes sécrétant d'IgM. Les LB MZ peuvent aussi s'activer de manière dépendante des LT (TD, pour T-dépendant) en migrant vers les follicules. Ils peuvent également atteindre le centre germinatif afin de relarguer l'antigène TD aux cellules dendritiques folliculaires (FDC) et augmenter la sélection des LB Fo spécifiques et très affins pour l'antigène. D'autre part, les LB MZ sont capables de changer de classe d'Ig et ainsi de sécréter des Ig d'isotype IgA et IgG. PC : Plasmocyte ; Mem : LB mémoire ; CSR : Class-switch recombination pour commutation de classe ; SHM : Somatic Hypermutation pour hypermutation somatique ; GC : Centre germinatif ; LB GC : LB du centre germinatif. Adapté de (Cerutti et al., 2013).

A2.1.3.2 DEVENIR DU LYMPHOCYTE B FOLLICULAIRE

Les LB folliculaires constituent environ 80% des cellules B de la rate et ont la capacité de recirculer entre les différents organes lymphoïdes secondaires, le sang, ainsi que la MO. Après exclusion des LB ayant un fort pouvoir autoréactif, les cellules B Fo ont la capacité, après activation par leur antigène et avec l'aide des LT, de participer à **la formation du centre germinatif**, lieu de prolifération et d'expansion cellulaire, mais aussi de commutation de classe et d'hypermutation somatique du BCR. Le fonctionnement et l'organisation de cette structure complexe impliquant de nombreux types cellulaires de l'immunité seront discutés en partie **A2.3**.

A2.2 VOIES IMPLIQUÉES DANS L'ACTIVATION DE LA CELLULE B

La reconnaissance de l'antigène est la première étape de l'activation d'un LB mature naïf. La reconnaissance des antigènes TI ou TD par les LB se fait majoritairement via le BCR. L'interaction antigène/BCR induit l'activation de voies importantes, responsables de la prolifération, de la survie et de la différenciation de la cellule B dans le but d'éliminer au mieux l'antigène détecté. Pour certains types d'antigènes TI (comme par exemple la flagelline, le LPS bactérien ou les acides nucléiques), la reconnaissance se fait par des récepteurs appelés « PRR » (Pattern Recognition Receptors), tels que les TLR (Toll-Like-Receptors), situés à la surface de la cellule (par exemple : le TLR4) ou à la surface des endosomes (par exemple : le TLR9).

A2.2.1 ACTIVATION DE LA VOIE DU BCR

Le complexe du BCR est formé d'une Ig transmembranaire, associée à l'hétérodimère Ig α /Ig β (CD79a/CD79b) possédant des motifs ITAM qui permettent la transduction du signal. Après liaison de l'antigène au BCR, ces motifs sont rapidement phosphorylés au niveau des tyrosines par des kinases à tyrosine (Tyr kinases) de la famille Src, telles que Lyn, Blk ou Fyn (Hobeika *et al.*, 2015). Les sites de phosphorylation ainsi présents permettent le recrutement et l'activation de la kinase Syk (Spleen Tyrosine Kinase) (Figure 11). L'activation de cette kinase est essentielle à l'induction de la phosphorylation du co-récepteur CD19 et à l'activation de voies maîtresses du LB comme la voie PI3K, la voie calcique, la voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) ou la voie NF- κ B.

A2.2.1.1 LE CO-RÉCEPTEUR CD19

L'engagement de la voie du BCR induit notamment la phosphorylation de multiples tyrosines de la partie intracellulaire du co-récepteur CD19, par la kinase Lyn qui entraîne l'activation de la voie PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase) (Figure 11). En effet, la sous-unité régulatrice p85 α de la PI3K se lie aux motifs YXXM phosphorylés de CD19 et fait de ce co-récepteur un régulateur majeur de cette voie (Wang *et al.*, 2002). Néanmoins, CD19 n'est pas indispensable à l'activation de la voie PI3K dans les LB, et la protéine adaptatrice BCAP (B-Cell Phosphoinositide 3-kinase Adaptor Protein), après sa phosphorylation par les kinases Syk et Btk (Bruton's tyrosine kinase), est aussi capable de fournir des sites de liaison aux sous-unités de la PI3K (Okada *et al.*, 2000).

A2.2.1.2 VOIE PI3K ET VOIE CALCIQUE

Les PI3K de classe I sont impliquées dans les réponses immunes et sont notamment importantes pour la survie et l'activation des cellules B matures (Srinivasan *et al.*, 2009). Ces enzymes sont des hétérodimères formés d'une sous-unité catalytique (p110 α , β ou δ) et d'une sous-unité régulatrice (p85 α , p85 β , p55 γ , p55 α ou p50 α). Les 2 sous-unités se dimérisent après

recrutement à la membrane via les protéines CD19 ou BCAP, et forment alors la kinase PI3K fonctionnelle, capable de catalyser la conversion du produit PIP₂ (phosphatidylinositol-(4,5)-diphosphate) en PIP₃ (phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphate). Le PIP₃ permet le recrutement et l'activation de protéines ayant un domaine PH (domaine homologue à la pleckstrine, substrat de la protéine Kinase C) comme la kinase Btk, la PLCγ2 (Phospholipase gamma 2) ou encore Akt (protéine kinase B), kinase essentielle à la survie et à la prolifération des LB (**Figure 11**). Le recrutement de la PLCγ2 via la kinase Btk, ou directement via le PIP₃, donne lieu à la conversion du PIP₂ en IP₃ et DAG. Ce dernier produit active la protéine Kinase C, qui elle-même engage **la voie des MAPK** au niveau de Ras (*Pauls et al., 2012*). D'autre part, la liaison de l'IP₃ au récepteur IP₃R localisé au niveau du RE induit un **relargage de Ca²⁺** dans le milieu intracellulaire et provoque en même temps une entrée de Ca²⁺ extracellulaire via le canal calcique Orai (*Baba and Kurosaki, 2011*). Cette augmentation du Ca²⁺ mène à l'activation de plusieurs facteurs de transcription tels que Erk1/2 (extracellular signal-regulated kinase), NF-κB ou encore NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) (*Baba and Kurosaki, 2011*), via l'activation de Ras, la PKC et le duo calmoduline/calcineurine, respectivement. Le flux calcique régule aussi le réarrangement du cytosquelette d'actine nécessaire à l'expansion et à l'adhésion des LB puisque la quantité de Ca²⁺ serait directement liée à la production des filaments d'actine (*Maus et al., 2013*).

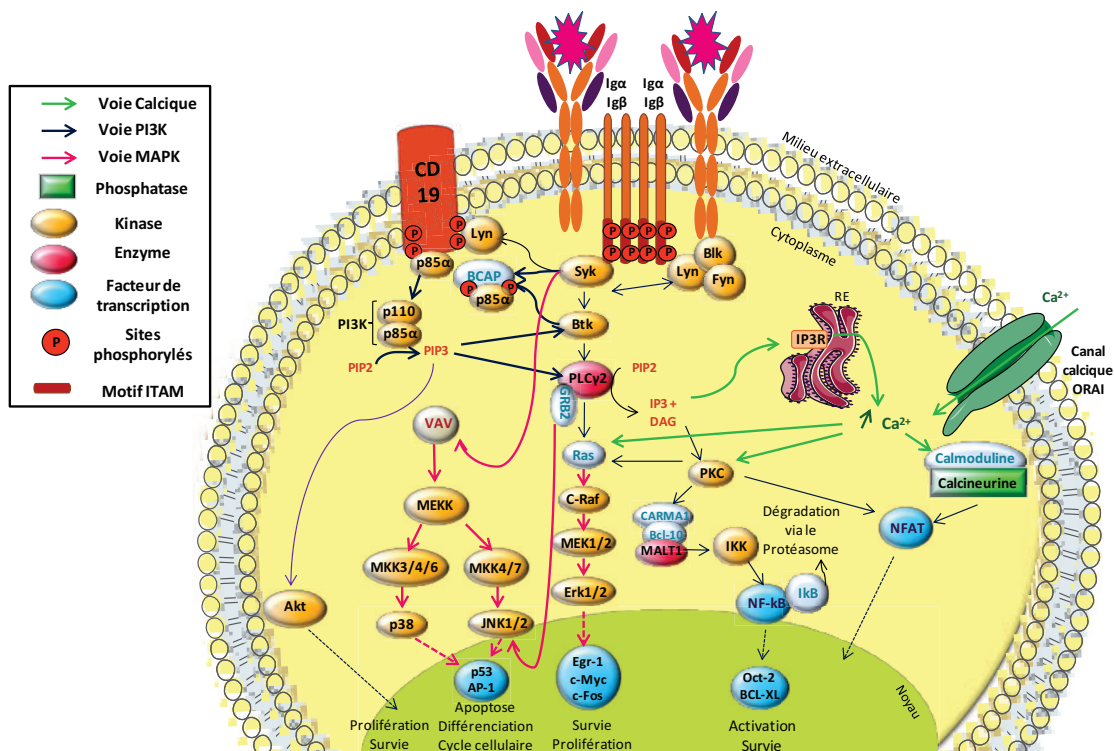


Figure 11 : Représentation schématique de l'activation de la voie calcique et des voies PI3K, MAPK et NF-κB, après activation du BCR.

Figure personnelle.

A2.2.1.3 VOIE DES MAPK

L'activation de la **voie des MAPK** suite à la liaison du BCR à son antigène est engagée suite à l'augmentation des quantités de Ca^{2+} et de DAG intracellulaires, elles-mêmes dues à l'activation initiale de la PI3K. Ceci conduit à l'activation des facteurs RasGTP qui vont eux-mêmes activer la cascade Ras-Raf-Mek-Erk (*Genot and Cantrell, 2000*). Il a aussi été montré que la protéine adaptatrice Grb2 (Growth factor Receptor-Bound protein 2) contribuerait à l'activation de Ras et à la régulation spécifique de JNK (c-Jun N-terminal Kinase) (*Ackermann et al., 2011*). La voie des MAPK mène, en fin de cascade, à la phosphorylation de trois protéines importantes : **Erk1/2, p38 et JNK1, 2, 3** (**Figure 11**). Leur activation et leur translocation dans le noyau cellulaire vont permettre l'activation ou l'inhibition de facteurs de transcription. On retrouve par exemple : l'activation par Erk1/2 d'Egr-1 (Early Growth Response protein 1), c-Myc et c-Fos impliqués dans la **différenciation** et la **prolifération cellulaire**, l'activation par p38 et JNK de la protéine p53 impliquée dans le **cycle cellulaire** et l'**apoptose**, et le facteur AP-1 impliqué dans la **différenciation**, la **prolifération** et la **mort cellulaire**.

A2.2.1.4 VOIE NF-KB

La protéine **NF-κB** est un homo ou hétérodimère formé à partir des 5 sous-unités : p50, p52, p65(RelA), RelB et c-Rel. L'hétérodimère p50-p65 est la forme la plus classique. Toutes ces sous-unités sont composées d'un domaine de liaison à l'ADN, d'un domaine de dimérisation, d'un signal de localisation nucléaire mais aussi d'un site de fixation à la protéine inhibitrice IκB. Ces sous-unités sont retrouvées dans le cytoplasme sous forme inactive et peuvent être activées via la **voie canonique** (pour p50, p65 et c-Rel), par exemple dans le cas de l'activation de la voie du BCR, ou **non-canonique** (pour p52 et RelB), dans le cas d'une activation par des ligands de la famille TNF (Tumor necrosis Factor) tels que CD40L ou BAFF (*Li and Verma, 2002*).

Après activation du BCR, la voie canonique de NF-κB se déclenche en aval de l'activation de la PKC par le recrutement du complexe CBM composé de CARD11 (Caspase Recruitment Domain family member 11, aussi appelé Carma1) et des protéines adaptatrices BCL-10 et MALT1 (Mucosa Associated Lymphoid Tissue Lymphoma Translocation protein 1) (**Figure 11**). Le complexe CBM est responsable de l'activation du complexe IKK (composé d'IKKα, IKKβ et IKKγ), lui-même responsable de la phosphorylation d'IκB. Cette phosphorylation permet l'ubiquitination et ainsi la reconnaissance et la dégradation d'IκB par le protéasome (*Li and Verma, 2002*). NF-κB est ensuite relargué puis transloqué dans le noyau afin d'activer différents facteurs de transcription tels que BCL-XL impliqué dans la **réponse anti-apoptotique**, ou Oct-2 important pour l'**activation du LB** (**Figure 11**).

A2.2.2 ACTIVATION DE LA VOIE DES TLRs

Les **récepteurs Toll-like** (TLR) font partie de la famille des PRR (Pattern Recognition Receptors) et permettent la reconnaissance de molécules de type **MAMPs** (Microbe-Associated Molecular Patterns) telles que des molécules virales ou bactériennes ou **DAMPs** (Damage-Associated Molecular Patterns) correspondant à certaines protéines du soi (ADN, Heat Shock Proteins,..). Les TLRs sont des glycoprotéines transmembranaires et sont au nombre de 13 pour l'ensemble des mammifères : 9 sont exprimés à la membrane plasmique (TLR1, 2, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13) et 4 sont exprimés à la membrane des endosomes (TLR3, 7, 8 et 9) (**Figure 12**). Seuls 10 d'entre eux sont retrouvés chez l'Homme (les TLR11, 12 et 13 étant absents).

Chez l'Homme, les LB naïfs expriment faiblement les TLRs 1, 6, 7, 9 et 10, contrairement aux LB mémoires, et les plasmocytes expriment des TLRs additionnels : les TLRs 3 et 4. Par contre, chez la souris, la plupart des sous-populations B expriment les TLRs 1, 2, 4, 6, 7 et 9 (*Buchta and Bishop, 2014*). De plus, bien que l'expression du TLR3 soit très faible pour les compartiments LB Fo et LB B1, car elle est quasiment restreinte au compartiment des LB MZ, la stimulation de LB spléniques murins totaux par du poly I:C, fort agoniste du TLR3, réussit à induire une bonne activation des LB (*Marshall-Clarke et al., 2007*). L'activation de la voie des TLRs est impliquée dans plusieurs fonctions des LB telles que la **prolifération**, la **présentation antigénique**, la **production de cytokines anti-bactériennes et anti-virales** comme l'IL-1 et l'IL-6, la **sécrétion d'anticorps**, et joue un rôle dans l'orientation de la **commutation de classe des Ig**. En effet, les différentes voies TLR engagées par un agent pathogène peuvent moduler ce dernier processus pour engager la réponse humorale la plus adaptée pour la réponse immunitaire contre ce pathogène. Ainsi, chez la souris, l'activation de la voie TLR4 seule, par liaison avec le LPS bactérien, entraîne la commutation vers les IgG2b et IgG3 ; l'ajout d'IL-4 au LPS entraîne une réponse de type Th2, entraînant la commutation vers IgG1 ou IgE ; enfin, l'activation du TLR9 endosomal par de l'ADN à îlots CpG hypométhylés (CpG-DNA) retrouvés chez les virus, bactéries et champignons, entraîne la commutation vers une réponse de type Th1 en favorisant la commutation en IgG2a ou IgG3 (*Pone et al., 2012*). Cependant, les TLRs jouent aussi un rôle dans l'autoimmunité puisqu'un engagement concomitant de la voie du BCR et des TLR endosomaux 7 ou 9, a été associé à l'activation de cellules B autoréactives anti-ARN, et anti-ADN, respectivement (*Green and Marshak-Rothstein, 2011*).

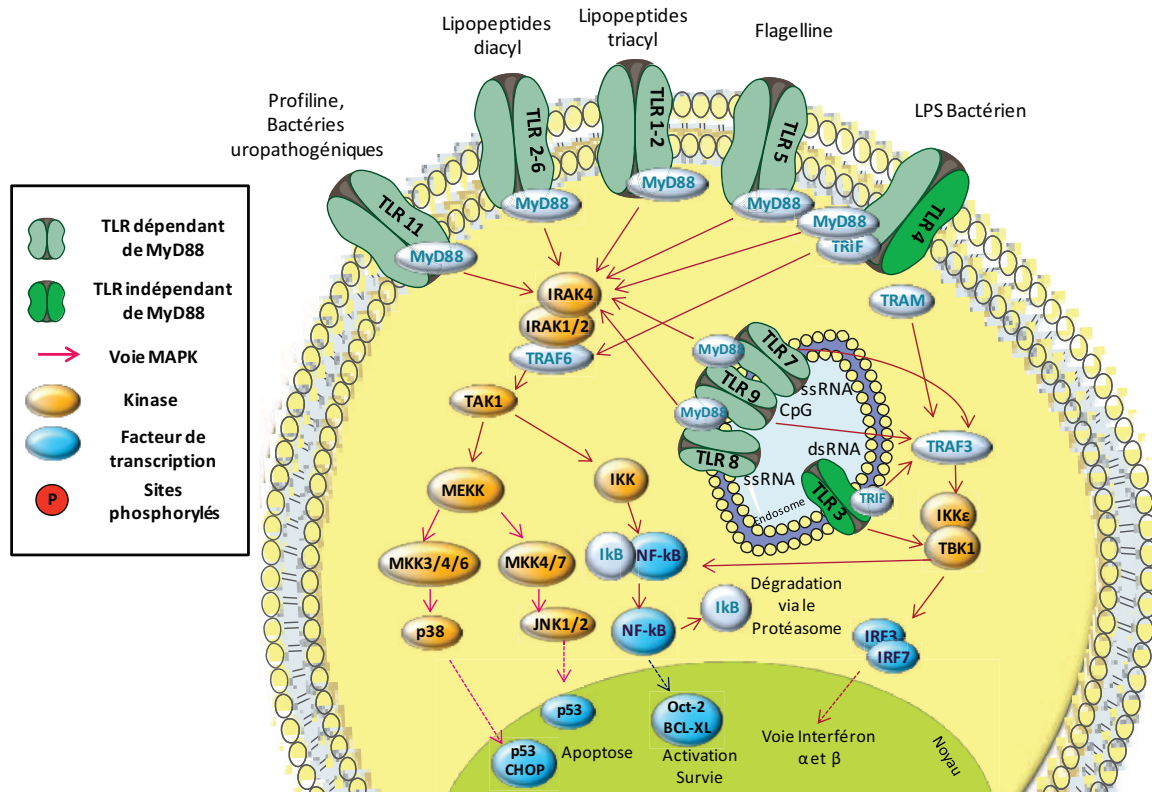


Figure 12 : Schéma simplifié des voies de signalisation des voies TLRs.

Figure personnelle.

De façon globale, les TLR dépendants de la voie MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88), c'est-à-dire les TLR 1-2, 2-6, 4, 5, 7, 8, 9 et 11, se dimérisent et recrutent la protéine MyD88 après liaison de leur ligand. La protéine IRAK4 (IL-1 Receptor-Associated Kinase 4) s'active en se liant à MyD88 et active ensuite les protéines IRAK1/2. Ce complexe se lie à TRAF6, qui permet l'activation de TAK1. TAK1 est capable d'activer les voies NF-κB, JNK et p38 (**Figure 12**). D'autre part, les TLR ne dépendant pas de MyD88 (TLR3 et 4) ainsi que les TLR7 et 9, sont capables d'activer la voie IFN-I via TRAF3. Cette voie mène à l'activation des facteurs IRF3 et IRF7, responsables de la transcription des **gènes liés à l'IFNβ et l'IFNα**, respectivement (**Figure 12**).

A2.2.3 RÉGULATION NÉGATIVE DE L'ACTIVATION DU LYMPHOCYTE B

Les voies d'activation des LB sont contrôlées par des régulateurs négatifs qui ont le potentiel de contrer l'activité des enzymes activatrices ou de réguler la stabilité et/ou la localisation des membres importants des cascades de signalisation (*Hobeika et al., 2015*).

A2.2.3.1 LES LB POSSÈDENT DES RÉCEPTEURS INHIBITEURS À LEUR SURFACE

Les cellules B expriment à leur surface de nombreux **récepteurs inhibiteurs** qui leur permettent de réguler leur activation. Le récepteur aux fragments Fc des Ig, **FcγRIIB** (CD32), est l'un d'entre eux. C'est un récepteur qui reconnaît les IgG sous forme soluble ou complexée avec leur antigène. D'autres protéines membranaires comme la glycoprotéine **CD22** (de la sous-classe des sialoadhésines), le récepteur **PD1**, ainsi que la protéine transmembranaire **CD72** (de la famille des lectines de type C), présentent aussi un rôle de régulateurs négatifs des voies du LB (**Figure 13**). Toutes ces molécules possèdent un **motif ITIM** (Immunoreceptor Tyrosine based Inhibitory Motif) commun au niveau de leur partie intracytoplasmique. Après liaison avec leurs ligands (Fragment Fc d'une IgG pour FcγRIIB, CD100 pour CD72, α2,6-linked sialic acid (2,6Sia) pour CD22 et PD-L pour PD-1), ces molécules vont s'autophosphoryler (CD22, PD1), se déphosphoryler (CD72) ou être phosphorylées par la kinase Lyn (dans le cas de FcγRIIB et CD22) au niveau de leurs motifs ITIM, et vont ainsi pouvoir recruter des phosphatases (*Tsubata, 2012*).

A2.2.3.2 LES PHOSPHATASES, PRINCIPALES MÉDIATRICES DE LA RÉGULATION NÉGATIVE DES VOIES DU LB

La phosphatase **SHP1** (SH2-domain containing phosphatase 1) peut notamment être recrutée via son domaine SH2 lors de la phosphorylation des motifs ITIM du récepteur CD22, ou peut être activée après sa dissociation de la protéine CD72 lorsque cette dernière est déphosphorylée. SHP1 est ensuite capable de **déphosphoryler des protéines clé de la signalisation du BCR** comme Syk et Btk et maintenir l'état déphosphorylé des motifs ITAM des Ig α et β, et mène ainsi à l'extinction du signal (*Pao et al., 2007*). **SHP2** est une seconde phosphatase de la même famille, exprimée de manière ubiquitaire et connue pour induire l'activation de la voie des MAPK dans les cellules, mais agirait tel un inhibiteur dans les LB. En effet, son recrutement par le récepteur inhibiteur PD1 induit la **déphosphorylation de l'Igβ, Syk ou la PLCγ2** (*Okazaki et al., 2001*). Ces deux phosphatases sont donc très importantes pour la régulation négative de la voie du BCR. Une autre phosphatase, **Lyp**, codée par le gène **PTPN22**, est aussi capable **d'inhiber la phosphorylation de certaines kinases** clés de la voie du BCR, telles que Syk et Akt (*Arechiga et al., 2009*) (**Figure 13**).

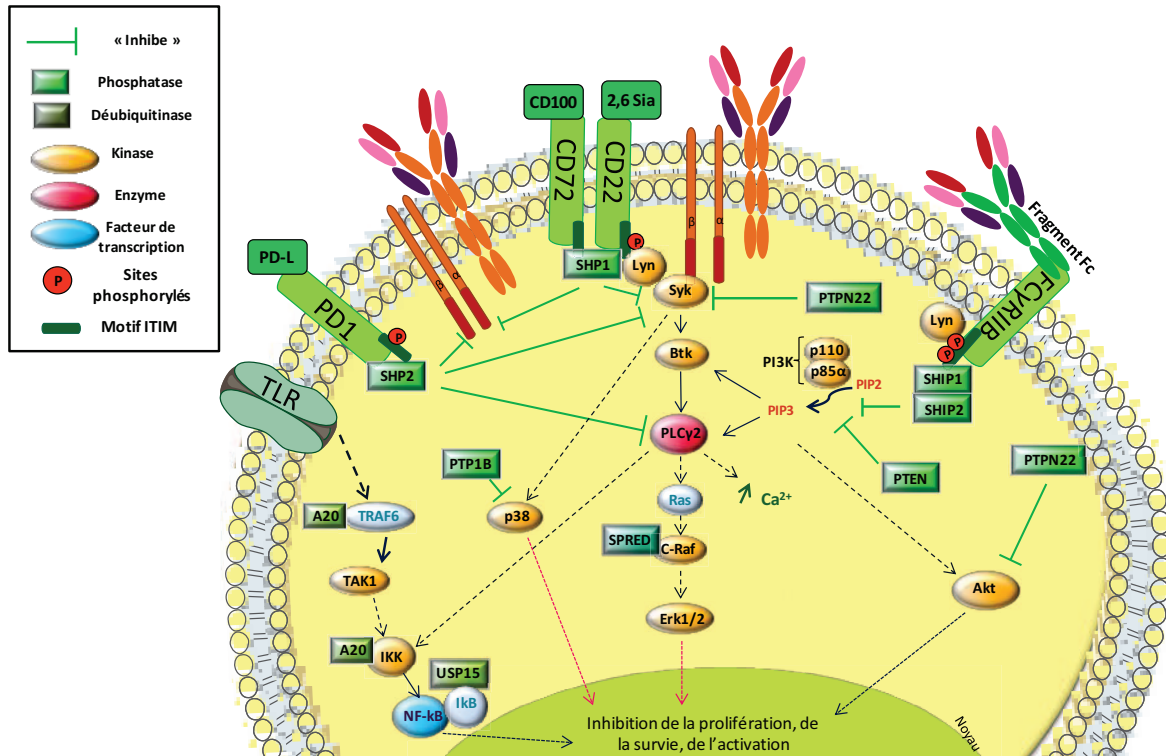


Figure 13 : Principaux régulateurs négatifs des voies d'activation du LB.

Figure personnelle.

La famille des SHIP (SH2-domain containing inositol 5' phosphatases), composée de **SHIP1** et **SHIP2**, constitue aussi une famille de régulateurs négatifs du LB. Ces deux phosphatases sont principalement recrutées par la voie négative enclenchée par le récepteur FcγRIIb. Elles sont toutes deux capables de déphosphoryler le produit PIP3 en PIP2, donc indirectement, contrecarrent l'action de la PI3K (*Kerr, 2011*). La diminution de PIP3 impacte sur l'activation de la kinase Btk et de la PLCγ2 (**Figure 13**), ce qui **réduit considérablement la quantité de Ca²⁺ intracellulaire** et induit une **inhibition de la voie Ras**. La protéine **PTEN** (Phosphatase and TENSin homolog), induite par la voie de signalisation relative à FcγRIIb (*Brown et al., 2004*) a aussi la capacité d'hydrolyser le PIP3 et contribue ainsi à la régulation négative des voies PI3K et calcique.

Enfin, la famille **PTPN** (Protein Tyrosine Phosphatase Non-receptor type) participe, de manière importante, à la régulation négative des voies des MAPK. Notamment, il semble que le membre **PTP1B** (Protein Tyrosin Phosphatase 1B) peut induire la **déphosphorylation de la kinase p38** après son activation via la voie du TLR4 (*Medgyesi et al., 2014*).

A2.2.3.3 AUTRES PROTÉINES IMPLIQUÉES DANS LA RÉGULATION NÉGATIVE DES LB

D'autres protéines, qui ne sont pas classées dans le groupe des phosphatases, jouent un rôle dans la régulation négative des LB. Les protéines **SPRED1** et **SPRED2** (Sprouty-related EVH1 domain-containing protein 1/2) font partie de la famille des protéines SPROUTY/SPRED, substrats de kinases

à tyrosines. En 2001, elles ont été identifiées comme des protéines régulatrices de la voie Raf-Ras-Erk (*Wakioka et al., 2001*). En effet, cette étude démontre que ces protéines sont capables d'interagir directement avec Raf et d'**inhiber sa phosphorylation par Ras** au niveau de la sérine 338 qui est requise pour son activation (**Figure 13**).

La protéine **A20** (TNFAIP3) est une enzyme déubiquitinase et constitue **un régulateur négatif important de la voie NF-κB** dont l'expression est induite par la voie NF-κB elle-même. Cette protéine est capable de déubiquitinyler les protéines TRAF6 et IKKγ ce qui empêche le recrutement de TAK1 par TRAF6, d'une part, et du complexe IKK (composé d'IKKα, IKKβ et IKKγ), d'autre part. Ceci inhibe ainsi la phosphorylation et donc l'ubiquitinylation d'IκB. Le processus d'ubiquitinylation d'IκB peut également être directement inhibé grâce à la déubiquitinase **USP15** (**Figure 13**). A20 et USP15 participent donc largement à la régulation négative de la voie NF-κB (*Sun, 2008*).

Ainsi, l'ensemble de ces récepteurs et facteurs contribuent à la régulation de l'activation des LB.

A2.3. LE CENTRE GERMINATIF : LIEU DE PROLIFÉRATION ET DE SÉLECTION DES LB, ET PLUS SI AFFINITÉ

A2.3.1 FORMATION DU CENTRE GERMINATIF

A2.3.1.1 PRÉSENTATION DES ACTEURS DU CENTRE GERMINATIF

Les centres germinatifs sont des structures transitoires qui se forment au niveau des organes lymphoïdes secondaires en réponse à un antigène T-dépendant. La formation de ce type de structure se déroule **au sein des follicules**. Trois grands acteurs vont permettre la formation et la réaction du centre germinatif. Tout d'abord, au sein des follicules se trouvent les **LB folliculaires naïfs** ainsi qu'un réseau de **cellules dendritiques folliculaires** (FDC). Les FDC, contrairement aux DC conventionnelles, ont une origine stromale et, au lieu de présenter l'antigène apprêté aux LT, présentent l'ensemble du complexe immun (IC) anticorps/antigène aux LB (*Aguzzi et al., 2014*). Puis, dans la zone T se trouvent des LTCD4⁺ naïfs qui après activation vont se différencier en **LT folliculaire helper** (LT_{FH}). Les FDC et les LT_{FH} permettent alors la sélection des LB présentant une très haute affinité pour l'antigène au niveau du centre germinatif.

A2.3.1.2 ETAPES DE LA FORMATION DU CENTRE GERMINATIF

Si on prend le cas de l'immunisation d'une souris avec un antigène, la mise en place d'un centre germinatif prend environ 1 semaine (*De Silva and Klein, 2015*). Au jour 1, après reconnaissance de l'antigène, les LT CD4⁺ (préalablement activés par les CD via la présentation

antigénique par le CMHII) et les LB Fo migrent vers la zone interfolliculaire. C'est dans cette zone que les deux types cellulaires prolifèrent et interagissent via les interactions CMHII/TCR et CD40/CD40L. A ce stade, une partie des LB Fo se différencie directement en **plasmablastes à courte durée de vie**, l'autre partie entrera dans le centre germinatif (**Figure 14**). Aux jours 3 et 4, les LTCD4⁺, à ce moment différenciés en LT_{FH} (CXCR5⁺, PD1⁺, GL7⁺) (*Ramiscal and Vinuesa, 2013*), ainsi que les LB Fo activés précurseurs du centre germinatif, migrent au centre du follicule pour former un **centre germinatif précoce**. C'est aux jours 5 et 6 après immunisation que le centre germinatif s'agrandit, notamment grâce à la prolifération accrue des LB, et deux microenvironnements spécifiques sont établis au jour 7 : **la zone claire et la zone sombre (Figure 14)**.

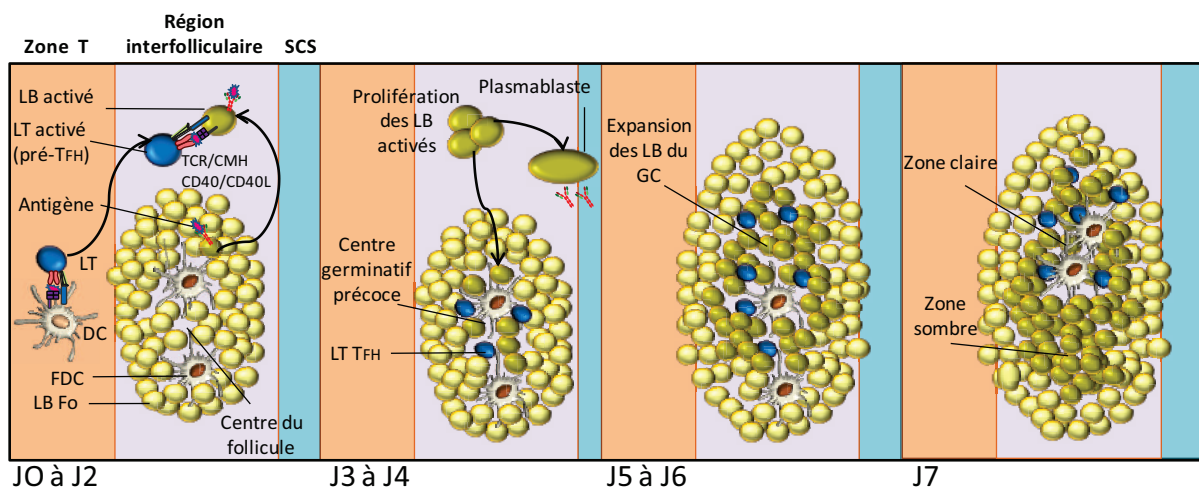


Figure 14 : Etapes de la formation d'un centre germinatif au sein d'un follicule lymphoïde.

Adapté de (*De Silva and Klein, 2015*).

La zone sombre contient des cellules B activées hautement proliférantes (**centroblastes**, CXCR4⁺⁺⁺) et la zone claire contient des cellules B moins proliférantes (**centrocytes**, CXCR4⁺), des cellules T_{FH} et des FDC. C'est dans la zone sombre que les processus d'**hypermutation somatique** et de **commutation de classe** ont lieu (**Figure 15**). Ils permettent l'augmentation de l'affinité d'une part et la modification de la chaîne lourde du récepteur d'autre part. En réintégrant la zone claire, les LB sont sélectionnés par les LT_{FH} et les FDC, suivant leur affinité pour l'antigène. Les FDC sont chargées de présenter l'antigène aux LB via leurs dendrites et les LT_{FH} vont reconnaître les LB les plus affins puisque l'affinité du BCR pour son antigène est directement liée à une meilleure capture et donc à une forte densité de complexes CMH/peptide, présentés à la membrane, aux LT_{FH} (*Victoria et al., 2010*). Les LB sélectionnés pourront réintégrer la zone sombre afin de se diviser en grand nombre pour ensuite continuer leur différenciation en cellule B mémoire ou sécrétrices d'anticorps (ASC) notamment grâce aux signaux apportés par l'IL-4 et l'IL-21 sécrétées par les LT_{FH} dans le centre germinatif. Les LB non sélectionnés pourront soit recirculer à travers la zone sombre pour subir de

nouvelles modifications ou seront éliminés par apoptose via la voie Fas (Takahashi *et al.*, 2001). Les débris apoptotiques sont ensuite éliminés par les macrophages à corps tingible (Figure 15).

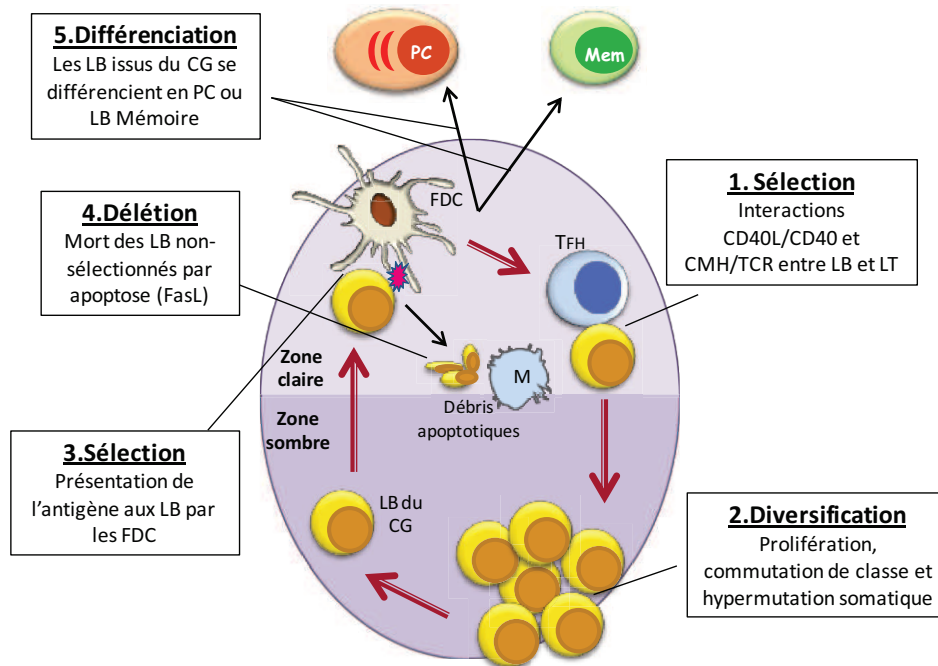


Figure 15 : La réaction du centre germinatif (GC) comprend des étapes de sélection des LB par les cellules dendritiques folliculaires (FDC) et les LT folliculaires helper (LTFH), de délétion et de diversification des anticorps.

M : Macrophages à corps tingibles ; *PC* : Plasmocytes ; *Mem* : LB mémoires. Adapté de (McHeyzer-Williams *et al.*, 2012).

A2.3.2 PROCESSUS D'HYPERMUTATION SOMATIQUE ET DE COMMUTATION DE CLASSE : VERS UN RÉCEPTEUR DE HAUTE AFFINITÉ À FONCTIONS EFFECTRICES VARIÉES

Durant l'étape de prolifération intense dans la zone sombre du centre germinatif, le récepteur du BCR subit deux types de modifications : une seconde diversification des régions variables par hypermutation somatique et une commutation de classe de la chaîne lourde. Ces deux mécanismes, bien qu'ils soient différents, consistent en une recombinaison délétionnelle impliquant la substitution de nucléotides, tous deux initiés par la même enzyme : la **déaminase AID** (Activation Induced Deaminase). Ils permettent respectivement l'augmentation de l'affinité de l'anticorps pour son antigène, et la modulation de la fonction effectrice de l'anticorps.

A2.3.2.1 AID, ENZYME MAÎTRESSE DE LA DIVERSIFICATION DU RÉPERTOIRE

L'enzyme **AID**, codée par le gène *aicda*, a été découverte par Honjo et ses collaborateurs en 1999 (Muramatsu *et al.*, 1999) et a rapidement été reliée aux processus d'**hypermutation somatique** et de **commutation de classe** puisque sa délétion est capable d'abolir ces mécanismes. D'ailleurs, des patients déficients pour AID développent un syndrome hyper-IgM où ils ne présentent aucune forme d'anticorps d'isotype IgG, IgA ou IgE et sont profondément susceptibles au développement d'infections bactériennes (Revy *et al.*, 2000). La séquence d'AID se rapproche de la protéine APOBEC1 (AID/apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic), une cytidine déaminase des ARNm. Néanmoins, le substrat d'AID ne consiste pas en de l'ARN mais bien en de l'**ADN**. De plus, cette enzyme n'étant capable de se fixer que sur de l'ADNsb (Petersen-Mahrt *et al.*, 2002), il a été suggéré que son activité est étroitement **liée au phénomène de transcription** puisque ce dernier permet l'éloignement des deux brins d'ADN et facilite l'accès pour un des deux brins. Bien que le mécanisme du ciblage du génome par AID ne soit pas encore complètement connu, certains « hotspots » ont été identifiés comme motifs préférentiels d'AID tels que les motifs RGYW (R=purines (A/G), Y=pyrimidines (T/C), W=A/T) (Martin *et al.*, 2002), AGCT ou WGCW (A/T-G-C-A/T) (Han *et al.*, 2011). Après fixation au brin d'ADN, AID est notamment **phosphorylée par la PKA** (Protéine Kinase A) au niveau de la Serine 38 et peut ensuite interagir avec la **protéine RPA** (Replicative Protein A), protéine notamment nécessaire pour la stabilisation de l'ADNsb lors de l'hypermutation somatique (Cheng *et al.*, 2009). Ensuite, la déaminase AID pourra provoquer la **déamination d'une cytidine en uridine** dans la séquence ADN, changeant ainsi une complémentarité G/C en G/U, qui aboutira soit à l'introduction de points de mutation lors de l'hypermutation somatique, soit en une cassure d'ADN double brin pendant la commutation de classe (Kumar *et al.*, 2014).

A2.3.2.1 HYPERMUTATION SOMATIQUE

L'hypermutation somatique est une **seconde diversification des anticorps** qui consiste en l'introduction de points de mutations au niveau des régions variables des chaînes légères et lourdes et a pour but de créer une Ig de très haute affinité. Les mésappariements G:U induits par AID peuvent ensuite être traités de différentes manières (Chen and Wang, 2014)(**Figure 16**) :

- 1) Lors de la réplication cellulaire, le U est interprété comme une thymine (T), donc l'une des cellules filles acquerra une mutation de transition de C > T.
- 2) L'enzyme UNG (Uracil-DNA Glycosylase) peut reconnaître et exciser l'Uracile, laissant à la place un site dit « abasique ». A cet emplacement, une des ADN polymérase telle que Rev1 peut incorporer aléatoirement l'un des 4 nucléotides A, T, G ou C, ce qui pourra introduire une mutation.

- 3) Les composants MSH2/MSH6 (MutS Homolog 2/6) de la voie de réparation MMR (MisMatch Repair) peuvent reconnaître le mésappariement G:U et exciser le brin porteur du U. Les polymérases sont ensuite recrutées pour réparer la lésion causée à l'ADN en ajoutant des nucléotides au niveau du brin excisé et peuvent ainsi potentiellement introduire des mutations.
- 4) Après la reconnaissance par UNG ou MMR, des systèmes de réparation peuvent aussi corriger la mutation et remplacer un C à la place du U, ce qui ne générera au final aucune mutation.

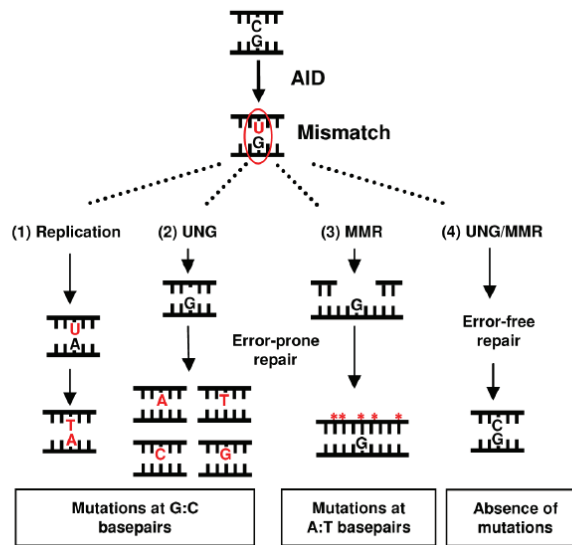


Figure 16 : Schéma représentatif du mécanisme d'hypermutation somatique.

UNG : Uracil-DNA Glycosylase ; MMR : Mismatch repair ; AID : Activation induced deaminase. Adapté de(Chen and Wang, 2014).

Ainsi, les mutations sont initiées par les déaminations d'AID mais réalisées par UNG, des polymérases et le système de réparation MMR.

Dans le cas où les mutations ont un impact négatif sur la reconnaissance de l'antigène original lors de la sélection dans la zone claire (parce que la cellule ne reconnaît plus l'antigène de départ ou parce que d'autres clones B reconnaissent l'antigène plus intensément), la cellule B est éliminée par apoptose ou retourne dans la zone sombre pour subir de nouvelles mutations. Les corps apoptotiques sont éliminés par les macrophages appelés « macrophages à corps tingible » (**Figure 15**).

A2.3.2.2 LA COMMUTATION DE CLASSE

Les différentes classes d'anticorps, aussi appelées « isotypes », sont déterminées par la région constante de la chaîne lourde. C'est cette région qui se fixe aux différents récepteurs Fc situés

à la surface de différents types cellulaires (macrophages, cellules NK, cellules épithéliales,...) et a le pouvoir d'influencer le type de réponse en fonction de son affinité pour le récepteur. La commutation de classe d'IgM (chaîne lourde μ) en une autre classe (γ pour IgG, α pour IgA et ϵ pour IgE), consiste en une recombinaison d'ADN irréversible, initiée par AID, entre la région de switch (région S) μ (placée en amont du gène C μ) et la région de switch de la nouvelle classe (placée en amont du gène C de la nouvelle classe d'Ig), modifiant ainsi le fragment constant de l'Ig (Stavnezer and Schrader, 2014).

Les régions de switch sont sensibles à l'action d'AID puisque ce sont des régions riches en G et en motifs WGCW (A/T-G-C-A/T), cibles préférentielles d'AID. La commutation de classe est initiée par le processus de transcription par la polymérase II (PolII) qui permet l'écartement des deux brins d'ADN. Les transcrits germinaux nouvellement générés, forment alors une structure appelée « R-loop » avec le brin d'ADN transcrit ce qui laisse le brin non transcrit accessible (Yu *et al.*, 2003). AID et la PKA sont recrutées au niveau des régions de switch où la PKA va phosphoryler AID. L'uridine, générée par la déamination de la cytidine par AID, est ensuite éliminée par l'enzyme UNG. Le recrutement de l'endonucléase APE1 (Apurinic/aprimidinic (AP) endonuclease) permet une cassure sur les deux brins d'ADN. Le système de réparation de l'ADN, dont notamment le système NHEJ (Non-Homologous End Joining), se charge de la recombinaison des deux régions d'ADN (Figure 17). Toute la séquence d'ADN se trouvant entre ces deux régions est ensuite éliminée, formant un transcrite circulaire.

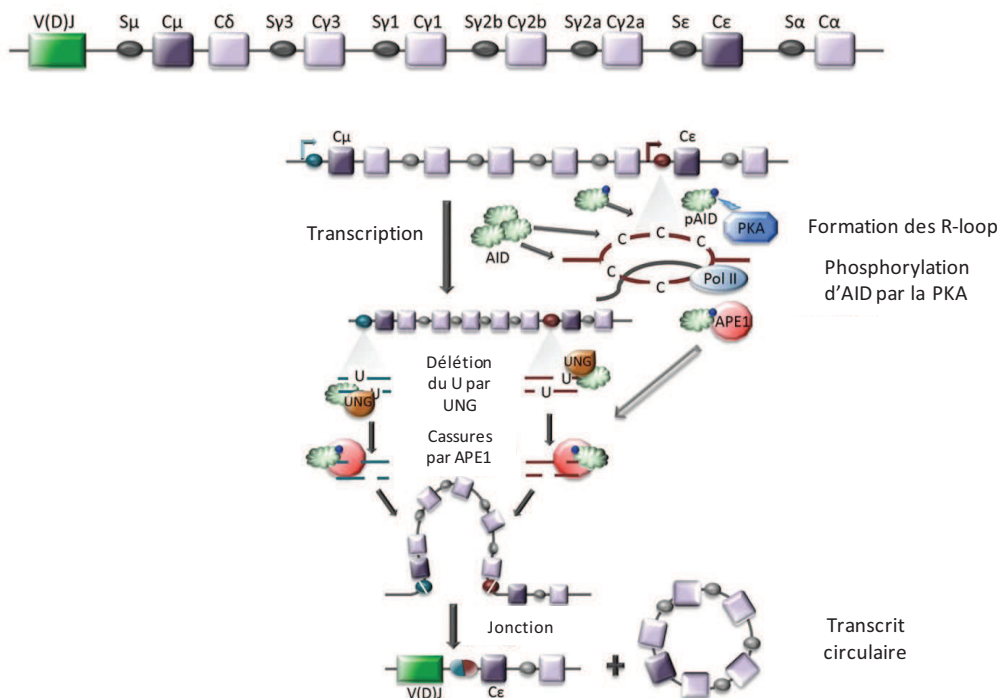


Figure 17 : Schéma représentatif du mécanisme de commutation de classe.

Dans cet exemple, la commutation de classe se fait d'IgM en IgE. Adapté de (Kumar *et al.*, 2014).

Le « choix » de la nouvelle classe est dirigé par les signaux reçus par les LB (voie du CD40, des TLRs,..) et par les cytokines relarguées au niveau du centre germinatif notamment par les LT_{FH} et les DC. En effet, en amont des régions S se trouvent des promoteurs de transcription qui vont être activés suite à ces signaux.

Ainsi, chez la souris, l'IL-4 induit préférentiellement une commutation en IgG1 (γ_1) ou IgE (ϵ) ; le TGF- β (Transforming Growth Factor- β) en IgG2b (γ_{2b}) ou IgA (α) ; l'IL-5 en IgA (α) et l'IFN- γ (Interféron γ) en IgG2a (γ_{2a}) ou IgG3 (γ_3). Contrairement aux IgM pentamériques et de faible affinité produites durant la première réponse, les Ig switchées sont en général de haute affinité (car l'hypermutation somatique se produit conjointement à la commutation de classe) et monomériques (ou dimérique pour les IgA) ce qui leur permet d'atteindre plus facilement les tissus.

A2.4. DIFFÉRENCIATION TERMINALE DES LYMPHOCYTES B

A2.4.1 DIFFÉRENCIATION EN CELLULE B MÉMOIRE

L'ensemble des cellules B mémoires représente la **mémoire humorale** qui est rapidement réactivée lors d'une seconde rencontre avec un même antigène, et mène à la **production massive d'anticorps spécifiques**. Les cellules B mémoires peuvent être issues du centre germinatif et dans ce cas elles présentent à leur surface un BCR de très haute affinité et de classe différente de l'IgM (*Kurosaki et al., 2015*). Lors d'une réactivation, ces cellules sont rapidement capables d'activer le programme transcriptionnel de la différenciation plasmocytaire afin de devenir des **cellules sécrétrices d'anticorps de forte affinité**. Néanmoins, des cellules B mémoires d'isotype IgM donc n'ayant pas subi la commutation de classe représentent également un grand compartiment de la mémoire humorale (*Takemori et al., 2014*). Toutes les cellules mémoires ont bénéficié d'une aide T au niveau du follicule lors de leur activation via le CD40L, mais une interaction trop courte avec les LT_{FH} ou une absence de production d'IL-21 de leur part, peut empêcher certains LB d'entrer dans le centre germinatif (*Linterman et al., 2010*). Ceci génère alors une différenciation rapide en **LB mémoire d'isotype IgM**. Des cellules B mémoires sont aussi retrouvées dans la cavité péritonéale et sont issues de la différenciation des LB B1a caractérisés par l'expression du marqueur CD5.

Quoiqu'il en soit, les cellules mémoires possèdent des caractéristiques qui leur sont uniques. Elles présentent une **longue durée de vie**, elles ont une grande capacité à **répondre rapidement** à l'antigène, et efficacement en se différenciant et enfin, ces cellules peuvent se re-diversifier en réintégrant le centre germinatif (notamment pour les cellules mémoires IgM⁺).

A2.4.2 LA DIFFÉRENCIATION PLASMOCYTAIRE : TOUT UN PROGRAMME TRANSCRIPTIONNEL

La différenciation terminale en **cellules sécrétrices d'anticorps** (ASC), incluant les stades intermédiaires **plasmablastes** (PB), B220^{low} CD138⁺, et les **plasmocytes** (PC), B220⁻ CD138⁺, est associée à de profondes altérations dans la morphologie, la durée de vie ainsi que dans le profil d'expression des gènes par rapport aux LB non différenciés. Il existe 3 types majeurs de LB matures : les **LB MZ**, les **LB B1**, dont nous parlerons en partie **A2.5**, et les **LB Fo**. Les LB MZ et B1 sont capables de répondre rapidement à des antigènes de façon T-indépendantes et vont majoritairement se différencier en plasmocytes à courte durée de vie et sécréteurs d'IgM ou d'IgA. Face à des antigènes dits « T-dépendants », les LB folliculaires vont produire des anticorps face à deux types de réponse. La première, appelée, « réponse extrafolliculaire » consiste en une différenciation rapide du LB du centre germinatif en PB à courte durée de vie qui peut avoir subi les processus de commutation de classe et d'hypermutation somatique. Cette première réponse permet la production des premiers anticorps protecteurs. La seconde réponse fait suite à la réaction du centre germinatif et permet la **génération de PC de haute affinité et à longue durée de vie** qui vont ensuite rejoindre les niches de survie comme la MO. Ces deux types de réponse dépendent cependant de programmes transcriptionnels proches.

A2.4.2.1 CONTRÔLE TRANSCRIPTIONNEL DE LA DIFFÉRENCIATION PLASMOCYTAIRE

La transition du stade LB mature activé au stade plasmocyte, en passant par le stade plasmablaste, requiert la **régulation de l'expression de centaines de gènes** par des facteurs de transcription impliqués dans la maintenance de l'identité B et dans la différenciation plasmocytaire. Les mieux décrits sont présentés dans cette partie. En **figure 18** est illustrée la variation de l'expression génique des principaux gènes impliqués dans cette étape de différenciation (*Nutt et al., 2015*).

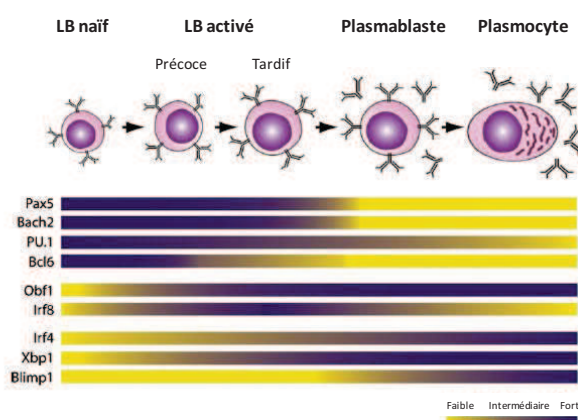


Figure 18 : Niveau d'expression des principaux gènes contrôlant la différenciation plasmocytaire.
(*Nutt et al., 2011*).

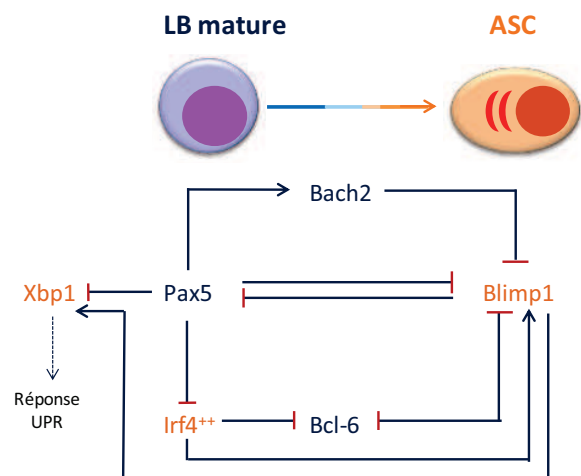


Figure 19 : Contrôle transcriptionnel de la différenciation en cellule sécrétrice d'anticorps.

Les facteurs impliqués dans le maintien de l'identité B sont présentés en bleu, les facteurs impliqués dans la différenciation en ASC sont présentés en orange. Figure personnelle.

A2.4.2.1.1 FACTEURS IMPLIQUÉS DANS LE MAINTIEN DE L'IDENTITÉ B

Tout d'abord, un groupe de facteurs de transcription **assure l'identité B** au cours du stade mature en assurant un programme d'expression de gènes impliqués dans la reconnaissance de l'antigène et la capacité à interagir avec les LT tout en empêchant la différenciation en ASC. Ces facteurs doivent donc être réprimés au cours de la différenciation plasmocytaire (représentés en bleu dans la **figure 19**). Les mieux décrits sont présentés dans ce paragraphe :

Pax5 : L'expression de *Pax5* est requise au cours de l'ontogénie B dans la MO dès le stade pro-B puis son expression est **maintenue tout au long du développement B** et dans toutes les sous-populations B. Dans les LB matures, *Pax5* contrôle l'expression de gènes codant pour de nombreux composants comme l'Igα du complexe du BCR, CD19, CD21 ou encore pour des facteurs de transcriptions tels que : Irf4, Irf8, Bach2, Blimp1 et Xbp1 (*Schebesta et al., 2007, Pridans et al., 2008*). Son expression doit néanmoins être réprimée pour permettre la différenciation plasmocytaire, puisqu'une expression forcée de *Pax5* dans les LB empêche leur différenciation en PC (*Usui et al., 1997, Lin et al., 2002*).

Bach2 : Bach2 (BTB and CNC homology 2) est un répresseur transcriptionnel, **exprimé durant la différenciation B** et régulé de façon positive par Pax5 (**Figure 19**). Une des cibles majeures de Bach2 est Blimp1 (B lymphocyte-induced maturation protein-1) (aussi appelé *prdm1* pour PR domain containing 1) (*Ochiai et al., 2006, Ochiai et al., 2008*). En effet, lors de l'activation du LB mature et en absence de Bach2, Blimp1 est exprimé prématurément par la cellule, ce qui induit une répression précoce d'*aicda* (codant pour l'enzyme AID) et une différenciation accélérée en PC (*Muto et al., 2010*).

Bcl-6 : Bcl-6 (B-cell lymphoma 6) est aussi un répresseur transcriptionnel qui est **hautement exprimé dans les centres germinatifs** et est nécessaire pour leur formation. Il facilite la prolifération des LB au sein des centres germinatifs en se liant aux régions régulatrices de certains gènes comme par exemple ceux codant pour les protéines p21 et p53, toutes deux impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (*Phan and Dalla-Favera, 2004*). L'expression de *Bcl-6* serait notamment induite par l'IL-21, sécrétée par les T_{FH} dans le centre germinatif, et par le facteur Irf8 (Interferon regulatory factor 8), mais serait réprimée par Irf4 et Blimp1. Bcl-6 serait d'ailleurs lui-même un répresseur de Blimp1 (**Figure 19**).

A2.4.2.1.2 FACTEURS IMPLIQUÉS DANS LA DIFFÉRENCIATION PLASMOCYTAIRE

La génération d'ASC nécessite un programme transcriptionnel adapté, c'est-à-dire qui permette à la fois la répression des gènes maintenant le stade de LB mature, et l'induction des gènes de la différenciation plasmocytaire, comprenant ceux intervenant dans la production abondante

d'anticorps, la survie et la recirculation vers les niches de survie. Les mieux caractérisés sont présentés dans la suite de ce paragraphe :

Irf4 : l'action d'Irf4 est nécessaire au niveau du centre germinatif, pour la commutation de classe mais aussi pour la différenciation en ASC. Ses fonctions sont dépendantes de son niveau d'expression. Ainsi, un faible niveau d'expression d'Irf4 facilite la commutation de classe en induisant notamment l'expression d'*aicda* et *Bcl-6*, alors qu'un haut niveau d'expression d'*IRF4* permet de réprimer *Bcl-6* et d'activer *Blimp1* en faveur d'une différenciation plasmocytaire (Sciammas et al., 2006, Ochiai et al., 2013).

Blimp1 : Blimp1 est un répresseur transcriptionnel de plus de 250 gènes (Shaffer et al., 2002) et participe à la différenciation terminale des LB et LT. Ainsi, dans la lignée B, **Blimp1 est exclusivement exprimé dans les ASC** mais de façon distinguable entre les plasmablastes (PB) qui expriment un niveau intermédiaire de *Blimp1* et les plasmocytes à longue durée de vie qui expriment un haut niveau de *Blimp1* (Kallies et al., 2004). Ce facteur est induit par activation de la voie relative à CD40 et des voies cytokiniques via l'activation des MAPK. De plus, *Blimp1* requiert l'expression d'Irf4 et induit la répression de facteurs clés du programme des LB comme *Bcl-6* et *Pax5* (Figure 19). Néanmoins, Blimp1 n'est pas nécessaire ni suffisant à l'initiation du programme de différenciation des ASC, puisque son absence permet tout de même la génération de cellules pré-plasmablastiques (Lin et al., 2002, Shaffer et al., 2002).

Xbp1 : Etant donné leur production et sécrétion intense d'anticorps, les ASC sont très sensibles au stress du réticulum endoplasmique (RE). Le facteur de transcription Xbp1 (X-box protein 1) est un des médiateurs de la voie Ire1 α (Inositol requiring enzyme 1 α) de l'« unfolded protein response » (UPR), réponse initiée pour contrer le stress du RE. Bien que l'absence d'Xbp1 n'empêche pas la formation d'ASC, l'expression d'Xbp1 semble très **importante pour l'expansion de l'appareil sécrétoire** ainsi qu'indispensable pour la production et la sécrétion d'Ig (Iwakoshi et al., 2003, Shaffer et al., 2004). Son expression serait d'ailleurs inhibée par Pax5 mais induite par Blimp1.

A2.4.2.2 LES VOIES DE L'« UNFOLDED PROTEIN RESPONSE » DANS LA DIFFÉRENCIATION PLASMOCYTAIRE

A2.4.2.2.1 LE PROCESSUS DE L'UPR

La majorité des protéines membranaires et sécrétées par la cellule sont **assemblées et repliées dans le RER** (réticulum endoplasmique rugueux), situé dans le cytosol (Walter and Ron, 2011). Un stress du RE se produit lorsque la machinerie du RE s'emballe et que la quantité de protéines mal repliées est trop importante. Un « contrôle qualité » est donc nécessaire afin

d'engager une réponse adaptée dans le but de restaurer l'homéostasie des protéines correctement repliées et c'est notamment le cas pour les ASC, véritables fabriques d'Ig. Cette réponse, appelée **UPR**, est contrôlée par 3 senseurs : **IRE1 α** , **ATF6** (Activating Transcription Factor 6) et **PERK** (PKR-Like Endoplasmic Reticulum Kinase). Elle a 4 conséquences : une diminution de la traduction des ARNm codant pour les protéines à produire ; une augmentation dans la capacité à replier correctement les protéines ; l'engagement de la dégradation des protéines mal repliées par « ERAD » (ER-Associated-Degradation) ou par autophagie ; et enfin, l'initiation de l'apoptose lorsque le stress du RE ne peut être résolu (*Janssens et al., 2014*) (**Figure 20**).

La voie ATF6 : ATF6 est une protéine transmembranaire du RE. Alors que son extrémité N-terminale est située dans le cytosol, son extrémité C-terminale se trouve dans la lumière du RE et contient un domaine de reconnaissance des protéines mal repliées. L'activation d'ATF6 se fait suite à la détection directe de l'accumulation de protéines mal repliées ou au détachement de la protéine chaperonne BiP au niveau de son extrémité C-terminale. **BiP** (Binding immunoglobulin Protein, GRP78) est une protéine chaperonne du RE qui permet la reconnaissance des protéines mal repliées. Elle s'associe à différents senseurs via leur extrémité située dans la lumière du RE, et inhibe leur activité. Lors d'un stress du RE, BiP est recruté au niveau des protéines mal repliées, se détache des senseurs et permet leur activation (*Bertolotti et al., 2000*). ATF6 activé est ensuite transloqué vers l'appareil de Golgi via des vésicules de transport et y subit des modifications incluant le clivage de son extrémité C-terminale et de la partie transmembranaire d'ancrage à la membrane (**Figure 20**). Ces clivages sont réalisés par les protéases S1P et S2P (*Walter and Ron, 2011*). Ceci permet alors le relargage du domaine N-terminal cytosolique d'ATF6, capable d'entrer dans le noyau et d'activer certains gènes cibles de l'UPR, codant pour des protéines notamment impliquées dans **l'expansion de la membrane du RE**, dans le **repliement des protéines**, ou dans **les voies de dégradation « ERAD »** (*Janssens et al., 2014*).

La voie PERK : La protéine **PERK** est une kinase transmembranaire du RE capable de se dimériser et de s'autophosphoryler lorsqu'elle est activée par le **détachement de BiP** ou après interaction directe avec des protéines mal repliées. Ceci permet la phosphorylation et l'activation de son substrat spécifique, le facteur d'initiation eIF2 α (eukaryotic translation Initiation Factor 2 α). eIF2 α entraîne une inhibition quasi-totale du processus de traduction sauf pour quelques transcrits qui vont être induits, comme *ATF4* (*Su et al., 2008*). ATF4 a la capacité d'induire l'expression de *CHOP* (C/EBP Homologous Protein) (*Palam et al., 2011*) et *Trib3* (*Ohoka et al., 2005*), gènes impliqués dans **l'induction de l'apoptose**, ainsi que *GADD34* (*Growth Arrest and DNA Damage-inducible Protein*)

(*Novoa et al., 2003*), impliqué dans la régulation de la phosphorylation d'eIF2 α . La voie ATF4 conduit également à l'induction de la **réponse anti-oxydante** et à la **synthèse de protéines chaperonnes** (Figure 20).

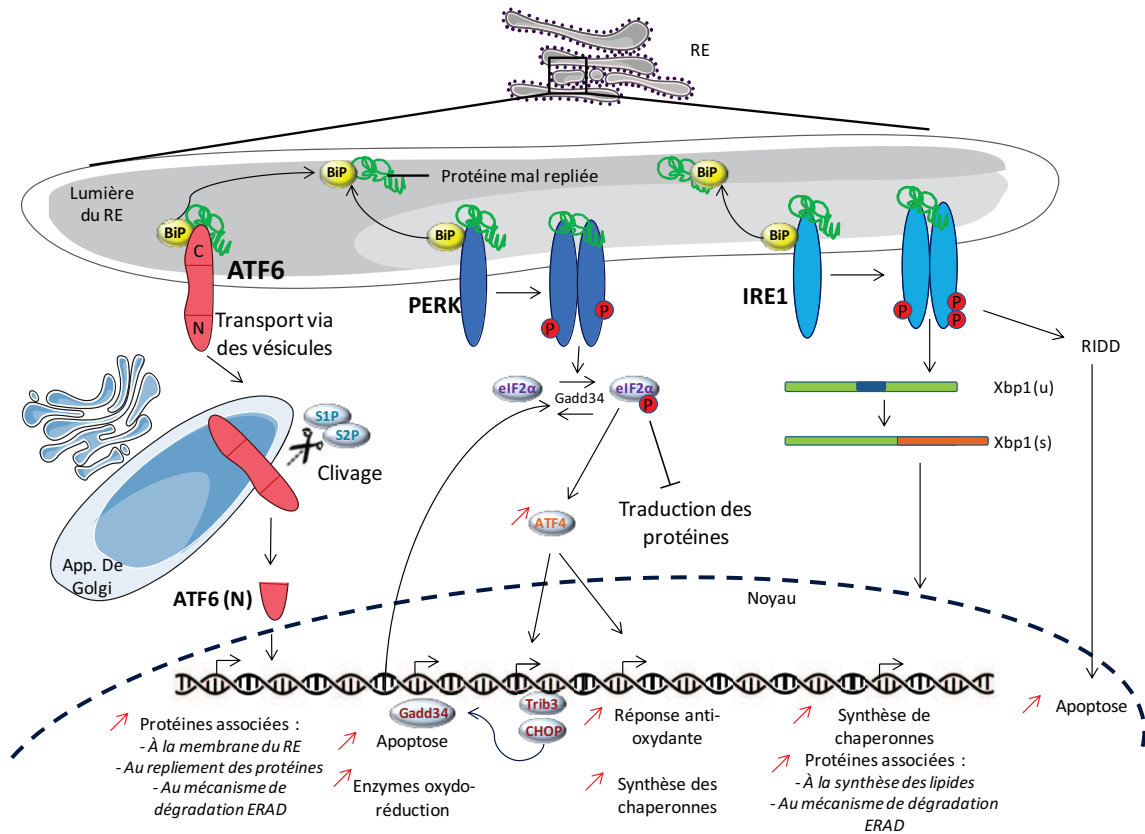


Figure 20 : Voies de l'Unfolded Protein Response.

RE : Réticulum endoplasmique ; RIDD : Régulateur IRE1-Dépendent Déca ; ERAD : ER-Associates-Dégradation ; C : extrémité C-terminale ; N : extrémité N-terminale ; (u) : unspliced, non-épissé ; (s) : spliced, épissé. Figure personnelle.

↗ : Augmentation

La voie IRE1 α : IRE1 représente la voie de l'UPR la plus étudiée, notamment car cette kinase/endoribonucléase membranaire du RE est très conservée au cours de l'évolution. IRE1 α dérive de HAC-1 retrouvé chez la levure. Chez le mammifère, IRE1 est retrouvé sous deux isoformes : IRE1 α , présent de façon ubiquitaire, et IRE1 β , spécifiquement retrouvée dans les cellules épithéliales intestinales (*Tsuru et al., 2013*) et pulmonaires (*Martino et al., 2013*). La reconnaissance de protéines mal repliées, ou le détachement de la protéine BiP, au niveau du domaine situé dans la lumière du RE, induit sa dimérisation et l'activation de son domaine « RNase », **responsable du clivage de son substrat spécifique : l'ARNm d'*Xbp1***. Ce clivage correspond à un épissage alternatif du transcrit

d'*Xbp1* et aboutit à la production d'un transcrit plus long d'*Xbp1*, nommé *Xbp1(s)* (pour « spliced ») comparé au transcrit de départ *Xbp1(u)* (pour « unspliced ») (**Figure 20**). *Xbp1(s)* induit l'expression de composants majeurs de la réponse UPR, comme des protéines chaperonnes ou des protéines impliquées dans la synthèse des lipides ou encore au mécanisme de dégradation par ERAD. Dans le cas où la restauration de l'homéostasie échoue, IRE1 α cesse de cliver *Xbp1* et réprime la réponse UPR en initiant l'apoptose cellulaire par le mécanisme de dégradation dépendant d'IRE1, nommé « RIDD » (Regulated IRE1-Dependent Decay) (*Hollien et al., 2009*). En effet, ce mécanisme induit des modifications post-transcriptionnelles de différents substrats, comme par exemple de pré-ARN anti-apoptotiques, participant à l'activation de la caspase 2 et à l'initiation de l'apoptose (*Chen and Brandizzi, 2013*). Contrairement aux deux autres voies décrites précédemment, la voie IRE1 α /*Xbp1* est la seule impliquée dans la différenciation plasmocytaire. En effet, comme nous le verrons dans le chapitre suivant, *Xbp1* est essentiel à l'expansion de l'appareil sécrétoire ainsi qu'à la production et à la sécrétion d'Ig.

A2.4.2.2.2 XBP1, FACTEUR DE TRANSCRIPTION A L'INTERSECTION DE L'UPR ET DE LA DIFFÉRENCIATION PLASMOCYTAIRE

Au stade plasmocytaire, l'augmentation de la production des chaînes d'Ig en vue de leur sécrétion implique une augmentation de la capacité du RE à générer ces protéines grâce à l'activation de l'UPR. La connexion entre l'UPR et la différenciation plasmocytaire a été identifiée chez la souris par Glimcher et ses collaborateurs (*Reimold et al., 2001*). En effet, ils ont montré que la délétion du facteur de transcription *Xbp1* dans des LB est capable d'interrompre leur différenciation juste avant le stade plasmocytaire. Ces cellules sont cependant toujours compétentes pour former un centre germinatif en réponse à l'activation par un antigène. L'étude de Shaffer *et al.*, montre qu'*Xbp1(s)* induirait la régulation de l'expression de gènes impliqués à toutes les étapes du processus de sécrétion des protéines dont des Ig. Ceci inclut des **protéines du RE** (comme *srp9* ou *rpn1*), des **facteurs impliqués dans la translocation des protéines à travers la membrane du RE** (comme *ssr1* ou *ssr3*), **dans leur repliement** (*grp58*, *BiP*, *fkbp11*) ou encore dans **la voie de dégradation ERAD**, importante pour la réponse UPR (*Shaffer et al., 2004*). Ainsi, *Xbp1(s)* est essentiel à l'expansion de l'appareil sécrétoire (*Todd et al., 2009*), incluant l'augmentation du nombre de ribosomes, une expansion des compartiments du RE et de l'appareil de Golgi, mais aussi l'augmentation de la masse mitochondriale qui permet de fournir de l'énergie à la cellule ainsi qu'un accroissement de la taille globale de la cellule (**Figure 21**). En effet, son expression forcée dans une lignée cellulaire B est suffisante à amplifier la taille et le nombre de tous ces organelles (*Shaffer et al., 2004*).

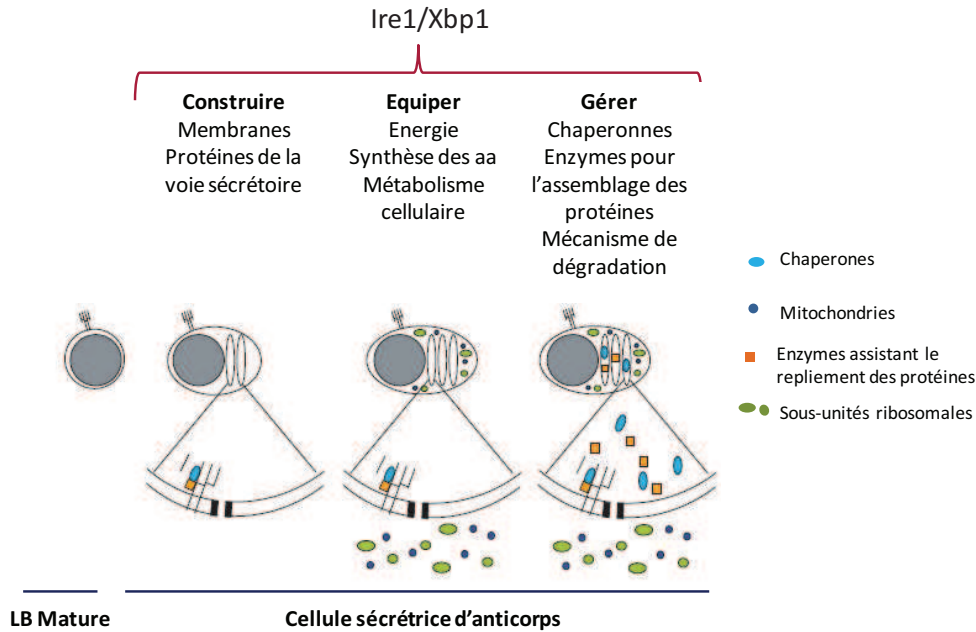


Figure 21 : XBP1, à l'intersection de l'UPR et de la différenciation plasmocytaire.

La voie Ire1/Xbp1 permet le remodelage de la cellule B mature vers le stade de cellule sécrétrice d'anticorps (ASC). Adapté de (Brewer and Hendershot, 2005).

Seule la forme d'*Xbp1* épissée (*Xbp1(s)*) intervient dans la différenciation plasmocytaire, puisque sa restauration, dans des LB déficients pour *Xbp1*, réinitie la différenciation alors que l'introduction de la forme non épissée (*Xbp1(u)*) ne le permet pas (Iwakoshi et al., 2003). Deux études ont montré que l'expression d'*Xbp1* peut être induite par le facteur ATF6 durant la réponse UPR normale (Yoshida et al., 2001, Lee et al., 2002). Néanmoins, en 2012, Brewer et son équipe démontrent que la déficience en ATF6 dans des LB n'affecte pas le développement des ASC et que la réponse UPR engagée est alors exclusivement contrôlée par la voie IRE1-Xbp1 et indépendante de la voie ATF6 (Aragon et al., 2012). En effet, dans le cas de la différenciation en ASC, l'expression d'*Xbp1* est principalement régulée par les facteurs Blimp1 et IRF4, ou encore par l'IL-4, cytokine produite par les LT helper (He et al., 2010).

A2.4.2.3 MÉCANISME DE SYNTHÈSE, DE TRANSPORT ET DE SÉCRÉTION DES ANTICORPS

Dès leurs premiers stades de développement, les LB présentent à leur surface un Ig de type membranaire. Une fois différenciées en ASC, les cellules B perdent l'expression de leur Ig membranaire au profit des Ig sécrétées. Alors que les plasmablastes produisent à la fois des Ig membranaires, toujours présentes à leur surface, et des Ig sécrétées, les plasmocytes en phase terminale de différenciation produisent exclusivement des Ig sécrétées.

La différence entre les formes membranaires et sécrétées des Ig se situe au niveau de l'extrémité C-terminale de la chaîne lourde. La forme membranaire possède un **domaine transmembranaire hydrophobe** d'environ 25 acides aminés qui permet l'ancrage à la membrane (codé par l'exon MC pour « Membrane Coding ») alors que l'extrémité C-terminale de la forme sécrétée consiste en **une queue sécrétoire hydrophile** (codée par l'exon SC pour « Secretion-Coding ») (*Kehry et al., 1980*). Les deux formes sont issues d'une même séquence d'ADN mais dont l'ARNm aura subi un épissage alternatif différent (*Early et al., 1980*). La **figure 22** présente l'épissage alternatif des formes membranaires et sécrétées d'une IgM, mais le mécanisme est identique pour tous les isotypes. Les exons SC et MC sont situés en aval des gènes C de la chaîne lourde, et sont chacun précédés d'un **site d'épissage**, et suivis d'un **site de polyadénylation** (pA(sc) après l'exon SC et pA(mb) après l'exon MC). L'ARNm codant pour la forme sécrétée est issu d'un épissage entre C μ 4 et l'exon SC, puis d'un clivage de l'ARNm au niveau du premier site de polyadénylation, pA(sc). Au contraire, l'ARNm codant pour la forme membranaire est issu d'un épissage entre C μ 4 et les exons MC, qui va alors éliminer la séquence intermédiaire comprenant l'exon SC et le site de polyadénylation pA(sc), permettant alors à l'ARNm d'être clivé au niveau du site de polyadénylation pA(mb) (**Figure 22**) (*Peterson and Perry, 1989*). Ainsi, dans les plasmocytes sécréteurs d'anticorps, les transcrits sont apprêtés pour donner la forme sécrétée plutôt que la forme membranaire.

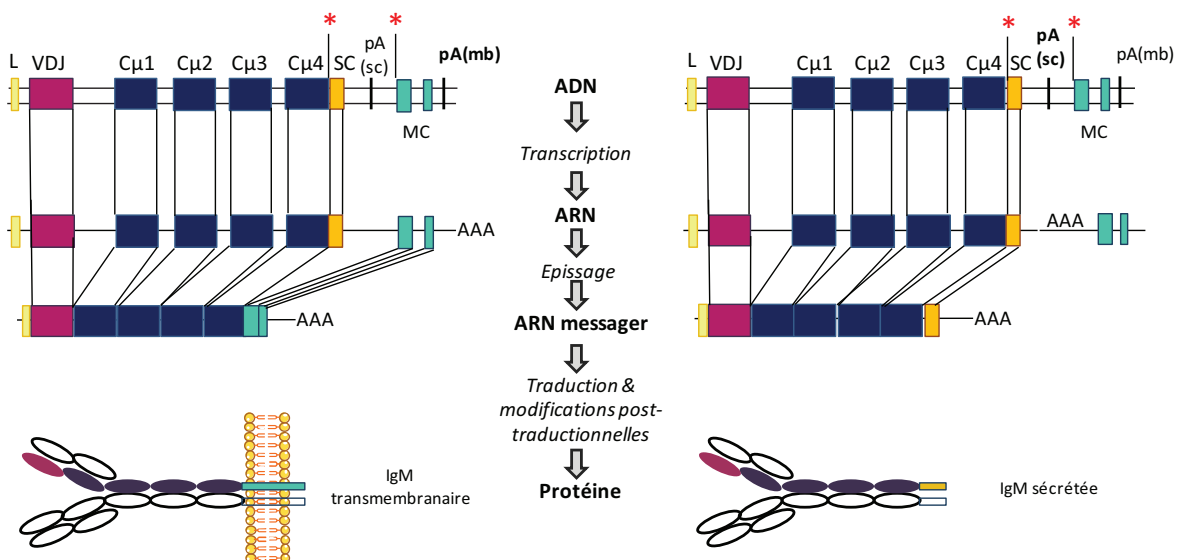


Figure 22 : Les formes membranaires et sécrétées des immunoglobulines sont générées par épissage alternatif.

pA : Site de polyadénylation ; (s) : forme sécrétée ; (m) : forme membranaire ; * : Sites d'épissage permettant l'excision de la séquence SC. Adapté de Janeway, 8^{ème} édition, p.178.

Le choix entre l'épissage conduisant à la forme sécrétée ou à la forme membranaire serait notamment influencé par le **facteur ELL2**, qui lorsqu'il s'associe au promoteur de la chaîne lourde, favoriserait l'épissage entre C μ 4 et l'exon SC, et conduirait à la production d'Ig sécrétées. L'expression de ce facteur serait contrôlée par le facteur Blimp1, induit lors de la différenciation plasmocytaire (Martincic et al., 2009).

Les transcrits codant pour les 2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères de l'Ig sont traduites par les ribosomes formant des chaînes polypeptidiques. Ces chaînes sont ensuite transportées à travers le RER grâce à la présence du peptide signal SRP (Signal Recognition Particle), situé à leur extrémité N-Terminale (**Figure 23**). La présence de ce peptide leur permet une liaison avec le récepteur SRP et ainsi leur transport vers la lumière du RER à travers un pore aqueux nommé Sec61 (Dudek et al., 2015). Une fois dans la lumière du RER, les quatre chaînes lourdes et légères sont assemblées par des ponts disulfures, de manière spontanée. En effet, aucune enzyme spécifique n'a été montrée comme nécessaire à leur assemblage. Néanmoins, il semblerait que la protéine chaperonne BiP facilite le repliement des chaînes lourdes, avant leur association avec les chaînes légères. Le RER est le premier lieu de modification post-traductionnelle des protéines comme la **N-glycosylation** qui correspond à l'addition d'un oligosaccharide au niveau du site NH₂ d'une asparagine. Une fois assemblées et correctement repliées, les Ig sont transportées vers l'appareil de Golgi via des vésicules de transport (**Figure 23**). L'appareil de Golgi est essentiel dans la voie de sécrétion de protéines puisqu'il fait le lien entre le RE et la membrane plasmique et régule le transport des protéines. Une fois arrivées dans l'appareil de Golgi, les Ig subissent encore quelques étapes de maturation, comme par exemple une **glycosylation additionnelle** des domaines CH₂ de la chaîne lourde. Les modifications post-traductionnelles opérées dans le RER ou dans l'appareil de Golgi vont influencer leurs fonctions effectrices, leur localisation, leur solubilité ou encore leur stabilité (Arnold et al., 2007). Après avoir traversé l'appareil de Golgi de l'extrémité cis à l'extrémité trans, les Ig atteignent les vésicules du « Post-Golgi » afin d'être sécrétées. Peu d'études sur le mécanisme détaillé de la sécrétion des Ig sont répertoriées dans la littérature, mais il semblerait que la sécrétion des Ig résulterait en la fusion des vésicules post-golgiennes avec la membrane cytoplasmique, c'est à dire par un **processus classique d'exocytose**.

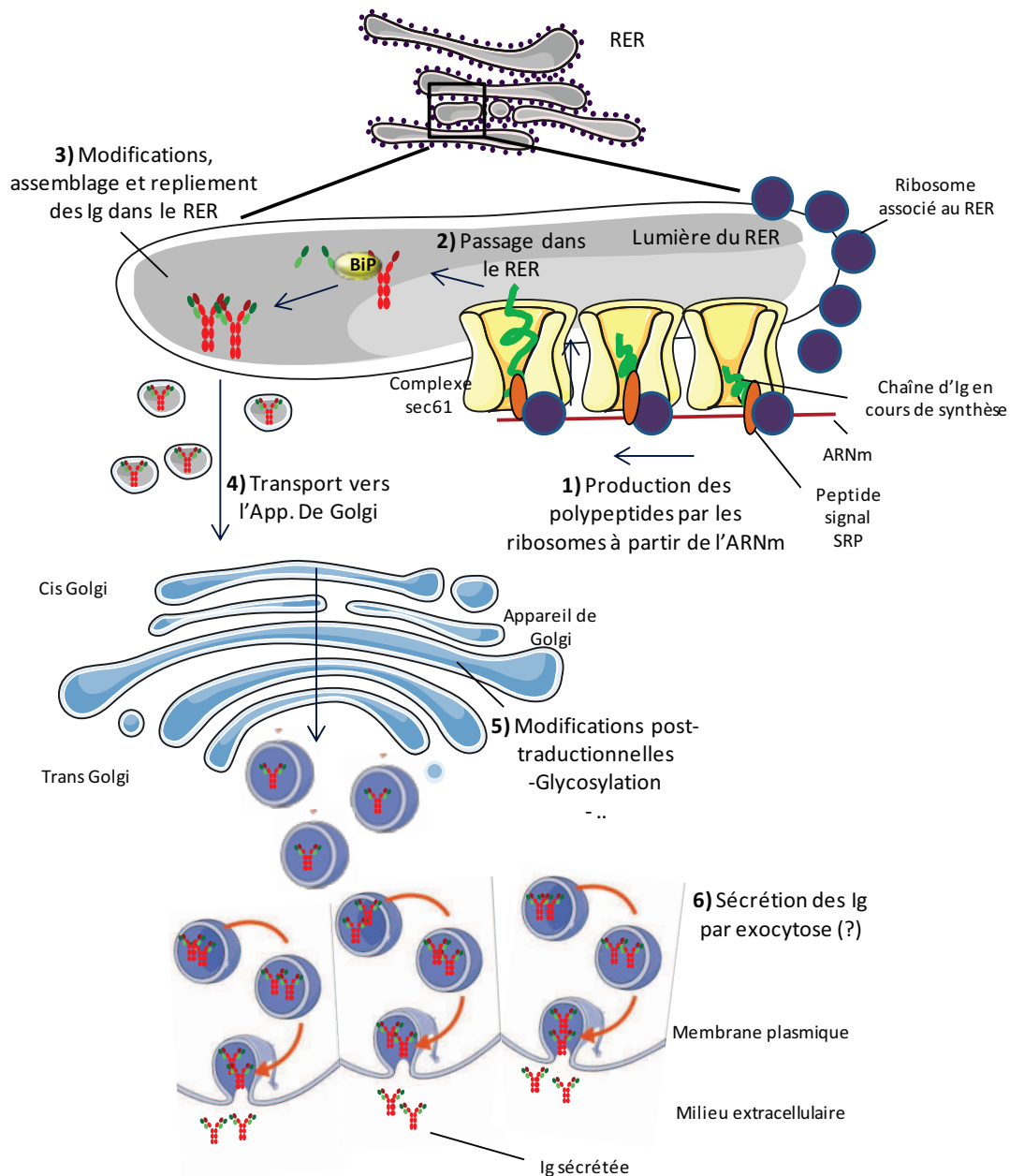


Figure 23 : Mécanisme de sécrétion des anticorps.

RER : Réticulum Endoplasmique Rugueux. Figure Personnelle.

A2.4.2.4 « HOMING » ET SURVIE DES CELLULES SÉCRÉTRICES D'ANTICORPS

Le terme « cellule plasmocytaire » (PC) est appliqué pour des cellules sécrétrices d'anticorps, échappant au cycle cellulaire et possédant un appareil sécrétoire largement développé. Après leur différenciation à partir des plasmablastes, les PC se dirigent vers des **niches de survie** où ils pourront survivre pendant des années grâce à un **microenvironnement particulier**. On parle alors de plasmocytes à longue durée de vie (*Kometani and Kurosaki, 2015*).

A2.4.2.4.1 « HOMING » DES PLASMOCYTES VERS LA MO

Après leur génération au niveau du follicule, une partie des PC quitte l'organe lymphoïde secondaire en direction de la MO afin de recevoir des signaux de survie leur garantissant une longue durée de vie. La sous-expression de CXCR5 et la surexpression de CXCR4 permettent aux PC de quitter le follicule et de migrer vers les niches de survie, principalement retrouvées dans la MO. Pour cela, les PC atteignent tout d'abord les vaisseaux lymphatiques, et puisque la MO n'est pas directement connectée au réseau lymphatique, migrent ensuite au sein des vaisseaux sanguins. Cette migration vers la MO est dépendante de plusieurs facteurs comme le récepteur S1PR1 (*Kabashima et al., 2006*), l'intégrine CD18 (*Pabst et al., 2005*) ou encore la protéine transmembranaire CD37 (*van Spriël et al., 2012*). En effet, des souris déficientes pour chacune de ces trois protéines présentent une accumulation d'ASC dans la rate mais une absence totale de PC à longue durée de vie dans la MO.

A2.4.2.4.2 SURVIE DES PLASMOCYTES DANS LES NICHES DE SURVIE

Un ensemble de facteurs intrinsèques et extrinsèques au niveau des niches de survie va permettre aux PC de bénéficier de signaux de survie intenses. Tout d'abord, le modèle de ces niches consisterait en une batterie de **facteurs extrinsèques** incluant la présence de **cellules stromales réticulaires** CXCL12⁺VCAM1⁺CD80⁺ (*Tokoyoda et al., 2004*), exprimant les ligands respectifs des récepteurs CXCR4, VLA4 (Very late antigen 4) et CD28 exprimés par l'ASC, et de **cellules hématopoïétiques** sécrétant le facteur de survie des LB APRIL. Des études menées par *Chu et al.*, montrent que les plus gros producteurs du facteur APRIL sont en réalité les polynucléaires éosinophiles, suivis par les monocytes et les mégacaryocytes (*Chu et al., 2011*). Le facteur APRIL est très important puisque la ligation à son récepteur, BCMA, permet l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1, essentielle à la survie des ASC (*Peperzak et al., 2013*). La régulation de l'expression de BCMA dans les PC n'est pas connue, bien que ce mécanisme ait été montré comme indépendant de Blimp1. Les cytokines IL-6 et TNF- α ont aussi été proposées comme médiatrices de la survie plasmocytaire dans la MO (*Cassese et al., 2003*). Enfin, le maintien de la survie dépendrait aussi de **certaines facteurs intrinsèques aux PC**. De manière évidente, la délétion de Blimp-1 réduit de manière significative le nombre de PC dans la MO. D'autre part, des études récentes ont montré que le facteur de transcription ZBTB20 (Zinc Finger and BTB domain containing 20), contrôlé par IRF4, est essentiel pour la survie des PC à longue durée de vie (*Chevrier et al., 2014*). En conclusion, le modèle de niche de survie des PC est largement accepté et repose sur la présence de cellules exprimant des molécules d'adhésion et sécrétant des cytokines requises pour le recrutement et la survie des PC à

longue durée de vie, d'une part, et sur l'expression de certains facteurs intrinsèques aux PC, d'autre part.

A2.5. AUTRES SOUS-POPULATIONS DE LYMPHOCYTES B PÉRIPHÉRIQUES

A2.5.1 LES CELLULES B1

L'existence des **cellules B1** a été mise en évidence à partir des années 1980 (*Montecino-Rodriguez and Dorshkind, 2012*). Des études chez la souris notamment par Kantor et Herzenberg en 1993 a permis de diviser cette population en 2 sous-populations : les LB1-a (CD5⁺) et les LBB1-b (CD5⁻) (*Herzenberg and Kantor, 1993*). Les cellules B1 sont principalement localisées dans les **cavités pleurales et péritonéales** et sont capables de **sécréter des IgM et des IgA**. Les B1 ne proviendraient pas du même précurseur que les cellules B2 : la divergence entre les deux types cellulaires se produirait dès le stade du progéniteur lymphoïde commun (CLP) (*Esplin et al., 2009*). Néanmoins, une étude réalisée chez la souris en 2011 par Montecino-Rodriguez *et al.*, propose que les B1 pourraient aussi se développer à partir des cellules transitionnelles présentes dans la rate durant les 2 premières semaines après la naissance (*Montecino-Rodriguez and Dorshkind, 2011*). Par contre, il est admis que les progéniteurs des B1 seraient déjà présents au niveau du sac vitellin dès le jour 9 de l'embryogénèse, comme le détaillent Yoshimoto *et al.* (*Yoshimoto et al., 2011*). Les cellules B1 sont capables de **sécréter des IgM de façon spontanée**, appelées **anticorps naturels** (NAc) (voir partie **B5.3.1**) et qui constituent une barrière de défense efficace contre les pathogènes, avant l'établissement d'une réponse immune spécifique. De plus, les B1 ont le potentiel de produire la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (*O'Garra et al., 1992*). Ainsi, ce type cellulaire possède des **fonctions régulatrices** contribuant à la réponse anti-inflammatoire. Enfin, dans certains tissus comme les muqueuses intestinales, elles sont aussi capables de produire des IgA polypécifiques (*Suzuki et al., 2010*).

A2.5.2 LES CELLULES B RÉGULATRICES

Depuis les années 2000, des fonctions régulatrices ont été attribuées à une sous-population particulière de LB, appelées « **Breg** ». Ces cellules sont caractérisées par une **grande production d'IL-10**, cytokine anti-inflammatoire. Bien que cette fonction dépendante de l'IL-10 soit la plus étudiée, d'autres fonctions de ces cellules sont aujourd'hui proposées. Ceci inclut la maintenance des LTreg, la production de TGF- β et d'IL-35, ou encore l'expression de facteurs pro-apoptotiques tels que FasL ou PD-L1 (*Ray et al., 2015*). Il est à signaler qu'à ce jour, chez l'Homme et chez la souris, différentes

sous-populations de Breg ont été identifiées. Ainsi, ces cellules seraient retrouvées parmi les compartiments B1, MZ, PB ou PC (*Mauri and Menon, 2015*).

A2.6 MÉCANISMES DE TOLÉRANCE B PÉRIPHÉRIQUE

Parmi les LB transitionnels (dites « new emigrant ») qui migrent de la MO vers la périphérie, vont se retrouver des LB autoréactifs, soit car ils ont échappé aux mécanismes de tolérance centrale dans la MO, soit car ils ont acquis une autoréactivité face à des antigènes présents en périphérie mais qui n'étaient pas exprimés et présentés dans la MO. Des mécanismes de tolérance dits « **périphériques** » sont donc essentiels à leur contrôle, comme le montre la **figure 6 (page 23)**, puisque le pourcentage de cellules B présentant une autoréactivité en périphérie passe de 35% à 20% entre le stade transitionnel à mature naïf (*Meffre and Wardemann, 2008*). Mis à part le phénomène de **délétion par apoptose**, déjà cité précédemment pour la tolérance centrale, d'autres processus tels que l'**anergie**, l'**ignorance** ou la **tolérance induite par les LT** s'ajoutent en périphérie (**Figure 24**).

A2.6.1 L'ANERGIE

L'un des premiers modèles murins ayant permis d'étudier la tolérance périphérique a été créé par l'équipe de Goodnow. En effet, dans les années 1980s, Goodnow *et al.* ont montré, grâce à ce modèle, que des cellules B autoréactives pouvaient se loger dans les organes lymphoïdes secondaires mais dans un état d'anergie. Pour cela, ils croisèrent des souris transgéniques MD4, exprimant un BCR ayant une haute affinité pour le lysozyme d'œuf de poule (Hen Egg Lysozyme, HEL) avec des souris transgéniques ML5, capables de produire de l'HEL soluble. Le **modèle (ML5xMD4)F1** permet la migration des cellules B autoréactives dans les organes lymphoïdes secondaires. Néanmoins, l'exposition chronique de l'autoantigène en périphérie va induire un phénotype anergique notamment caractérisé par une diminution de l'expression de l'IgM à la membrane et une absence d'autoanticorps anti-HEL de type IgM dans le sérum des souris (*Goodnow et al., 1988*).

L'**anergie** est définie comme un **état d'inactivation de la cellule** et concerne les cellules transitionnelles tout juste sorties de la MO et présentant une autoréactivité d'intensité faible à intermédiaire (*Yarkoni et al., 2010*) (**Figure 24 n°4**). D'après les hypothèses émises par Peter Bretscher et Mel Cohn en 1970, qui stipulent que les LB ont besoin de trois types de signaux principaux pour être activés : 1) la liaison antigène/BCR, 2) les signaux de costimulation avec les LT (CD28/CD80-86 et CD40L/CD40) ou les ligands de TLR, 3) les signaux cytokiniques (*Bretscher and Cohn, 1970*), l'état de non réponse de la cellule B anergique serait notamment du à une absence des

signaux de costimulation par les LT. Ce fait serait notamment la conséquence du mécanisme **d'exclusion folliculaire**, établi par Cyster et Goodnow dès 1994 dans le modèle HEL (Cyster *et al.*, 1994) (**Figure 24 n°6**). La migration des LB anergiques serait stoppée à l'entrée des organes lymphoïdes secondaires, notamment car l'expression du récepteur CXCR5 (récepteur à la chimiokine CXCL13), nécessaire à la migration des LB vers les follicules serait réduite (Ekland *et al.*, 2004). Les LB anergiques seraient donc incapables d'interagir physiquement avec les LT.

De plus, une des caractéristiques importantes des cellules B anergiques est une **durée de vie réduite** : environ 5 jours pour un LB anergique contre 40 jours pour un B folliculaire non autoréactif. Ce mécanisme n'est pas encore très bien compris, bien qu'il y ait plusieurs pistes. D'une part, il semblerait y avoir une compétition pour BAFF, partie intégrante du 3^{ème} signal, entre les cellules anergiques et non anergiques, en faveur des cellules non anergiques (Lesley *et al.*, 2004) (**Figure 24 n° 7**). D'autre part, les cellules anergiques seraient prédisposées à mourir puisqu'elles exprimeraient fortement Bim (Bcl-2 interacting mediator of cell death), une protéine pro-apoptotique appartenant à la famille Bcl-2 (Oliver *et al.*, 2006).

Plusieurs études se sont attachées à disséquer les mécanismes moléculaires de l'anergie. L'activation de la voie du BCR par la liaison de son autoantigène serait incomplète dans le LB anergique comparé à une cellule B non autoréactive activée par son antigène. Ceci serait notamment caractérisé par une diminution du flux calcique intracellulaire et la non activation des voies JNK et NF- κ B. Les facteurs Erk et NFAT seraient néanmoins mobilisés. L'ensemble résulterait en un **défaut de prolifération**, de **migration**, de **différenciation** ainsi qu'à une **survie réduite** des LB anergiques, comparé aux LB non autoréactifs (Mathis and King, 2002). De plus, il a été montré que la phosphorylation des tyrosines des motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) du complexe Ig α /Ig β du BCR serait augmentée dans les cellules B anergiques, ce qui pourrait être dû à une occupation chronique du BCR par l'autoantigène. Cette phosphorylation permettrait notamment à la kinase Lyn d'être activée et de générer un signal inhibiteur (Hibbs *et al.*, 1995, Chan *et al.*, 1997). D'autres protéines inhibitrices semblent être impliquées dans la maintenance de l'anergie des LB telles que PTEN (Browne *et al.*, 2009) ou CD72 (Li *et al.*, 2008) : 1) la délétion de la phosphatase PTEN dans le modèle murin de tolérance périphérique (ML5xMD4)F1 où les LB sont spécifiques du HEL (Hen Egg Lysozyme), induit une activation anormale de la voie PI3K, une élévation de la quantité du produit PIP3 et confère à la cellule autoréactive un état d'activation et non d'anergie ; 2) de façon similaire, la délétion de CD72 dans le modèle de tolérance périphérique anti-HEL entraîne une prolifération et une survie anormale des cellules anergiques, ainsi qu'une production anormale d'autoanticorps chez ces souris. Ainsi les protéines PTEN et CD72 seraient en

partie responsables de la maintenance de l'état d'anergie en limitant l'activation de la voie PI3K et de la voie du BCR, respectivement.

En conclusion, d'un point de vue phénotypique, les cellules B anergiques sont des cellules B dans lesquelles est induit, au stade transitionnel, **un programme de non réponse à l'antigène**. Chez la souris, cette population est appelée **T3** (pour transitionnelles 3) et exprime les marqueurs de LB « matures » tels que CD23, CD21, IgM^{low} et IgD mais maintient l'expression du marqueur immature CD93. Une étude récente de Teague *et al.*, réalisée sur des modèles murins lupiques, a montré que la population anergique dite « T3 » est considérablement réduite dans les modèles murins lupiques (NZBxNZW)F1 et NZM2410 comparé aux lignées sauvages contrôles (Teague *et al.*, 2007). Chez l'Homme, la population **CD19⁺IgD⁺IgM^{low/neg}CD27⁻** semble correspondre à une population anergique (Duty *et al.*, 2009).

Cependant, **l'état d'anergie n'est pas un phénomène irréversible**. En effet, le travail de Goodnow *et al.* a permis de montrer que la stimulation *in vitro* de cellules B anergiques provenant du modèle (ML5xMD4) avec du LPS ligand du TLR4, permet à ces cellules de se réactiver et de proliférer (Rui *et al.*, 2006).

Il est donc possible que dans certaines circonstances, des cellules autoréactives anergiques puissent à nouveau s'activer et engendrer une réponse autoimmune, dans le laps de temps de survie dont elles disposent.

A2.6.2 L'IGNORANCE

Un autre état de tolérance, appelé **ignorance**, consiste en l'incapacité des LB à répondre à leur autoantigène en raison de la trop faible affinité qu'ils ont pour celui-ci (**Figure 24 n°5**). Elles ont des caractéristiques proches de l'anergie, mais à l'inverse des cellules B anergiques, ces cellules peuvent cependant être activées par une voie indépendante du BCR (voie des TLRs par exemple). Ces cellules sont presque considérées comme non autoréactives et ainsi présentent une demi-vie et une maturation normales, mais peuvent devenir pathogéniques en cas d'activation et potentiellement de maturation d'affinité de leur BCR (Aplin *et al.*, 2003).

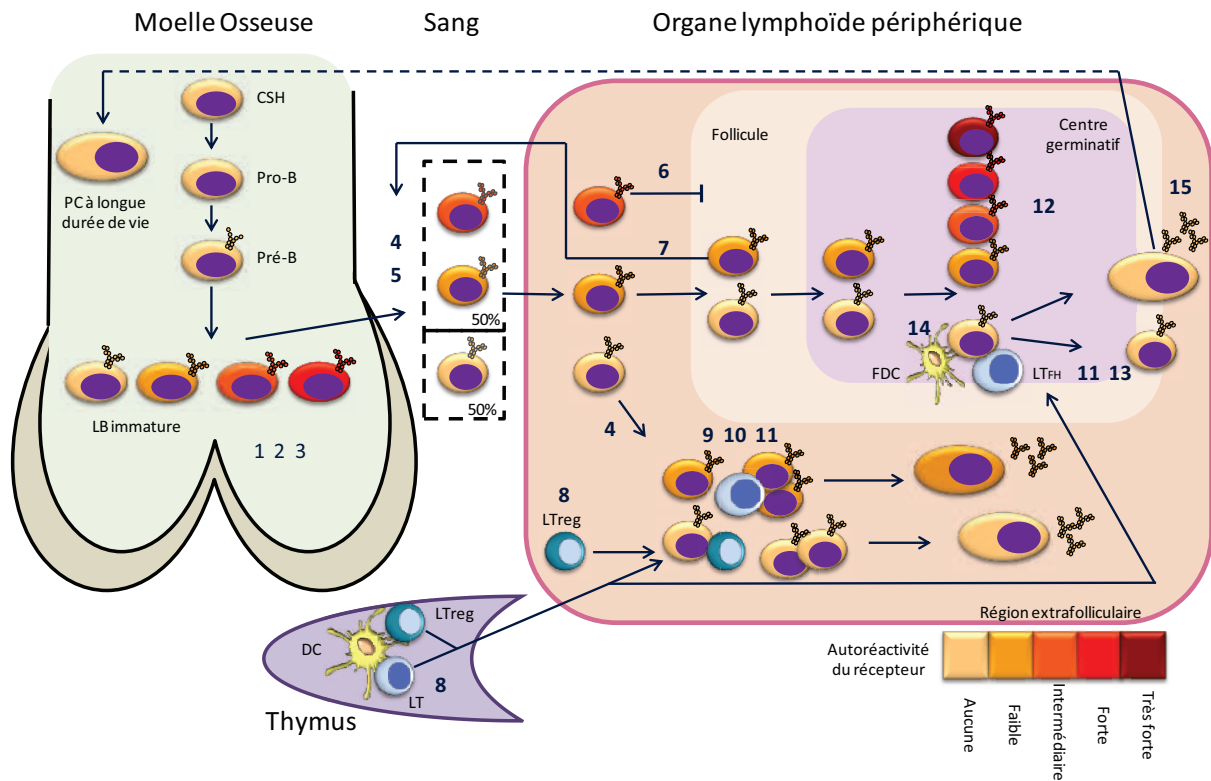


Figure 24 : Vue d'ensemble des différents points de contrôle de la tolérance B centrale et périphérique.

1 = Arrêt de la maturation des cellules B immatures

2 = Edition du récepteur (principalement des chaînes légères)

3 = Délétion clonale

4 = Anergie en cas d'affinité intermédiaire pour l'autoantigène

5 = Ignorance en cas de très faible affinité pour l'autoantigène

6 = Exclusion folliculaire

7 = Compétition pour BAFF, retour dans la circulation

8 = Différenciation des LTregs

9 = Contrôle de l'aide des LThelper

10 = Contrôle des voies de signalisation TLR

11 = Mort des LB par apoptose induite par les LT via FasL ou par les LTregs via PD-1

12 = Mort des LB induite par la voie du BCR

13 = Compétition pour l'aide des LTFH

14 = Présentation constante de l'antigène par les FDC pour la sélection des LB de haute affinité

15 = Contrôle de l'accumulation des autoanticorps et de l'inflammation des tissus

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique ; DC : Cellule Dendritique ; FDC : Cellule Dendritique Folliculaire ; LTFH : Lymphocyte T folliculaire helper ; PC : plasmocyte. Les mécanismes de tolérance centrale sont exposés dans la partie A1.4 (Figure 6, page 23). Adapté de (Goodnow et al., 2005, Luning Prak et al., 2011).

A2.6.3 TOLÉRANCE PÉRIPHÉRIQUE INDUITE PAR LES LYMPHOCYTES TREG

Une mutation du gène *FOXP3*, codant pour le facteur de transcription spécifique de la majorité des LT régulateurs (LTreg), entraîne un syndrome d'immunodéficiency accompagné de symptômes autoimmuns sévères, nommé IPEX (Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked). De nombreux autoanticorps sont retrouvés dans le sérum des patients atteints d'un IPEX, suggérant un rôle des LTreg dans la tolérance B. Il existe deux sous-populations de

Treg, les LTreg naturels qui se différencient dans le thymus grâce à la présentation antigénique opérée par les cellules dendritiques (DC) thymiques, et les LTreg induits qui se différencient en périphérie lorsqu'ils sont exposés à l'antigène (**Figure 24 n°8**). Ainsi, de façon indirecte, les DC jouent aussi un rôle dans la tolérance B puisque sans éducation des LT, il y aurait sans nul doute un défaut de LTreg.

Concernant le mode d'action des LTreg dans l'établissement de la tolérance B en périphérie, une étude de 2012 en propose deux différents. Le premier consisterait en **l'élimination directe des LB** autoréactifs PD1⁺ par apoptose via les LTreg, et ceci par l'interaction PD-1/PD1-L (*Gotot et al., 2012*) (**Figure 24 n°11**). Ce résultat est supporté par une autre étude montrant l'apparition de symptômes autoimmuns lors d'une déficience de PD1. De plus, les LTreg seraient aussi capables de supprimer l'aide des LT helper fournie aux LB en périphérie (*Kinnunen et al., 2013*). Ce résultat a notamment été montré dans un modèle murin lupique où la production d'autoanticorps serait proportionnelle à la résistance des LT effecteurs face aux LTreg (*Hondowicz et al., 2008*).

A2.6.4 TOLÉRANCE AU SEIN DES CENTRES GERMINATIFS

Le phénomène d'hypermutation somatique se déroulant dans les centres germinatifs est une seconde source de diversification du répertoire (**voir A2.3**) donc potentiellement de genèse de nouveaux BCR autoréactifs. En effet, ce mécanisme est une réelle menace pour le développement d'une autoimmunité, et cela pour plusieurs raisons. Premièrement, le processus d'hypermutation somatique augmente l'affinité des anticorps pour leur antigène, pouvant être des autoantigènes ; deuxièmement, la passage des LB via le centre germinatif va générer leur différenciation en LB mémoires ou plasmocytes, cellules à longue durée de vie ; troisièmement, l'ADN, un des autoantigènes les plus importants, est présent en grande quantité dans ces centres germinatifs en raison de la grande quantité de cellules apoptotiques (*Basten and Silveira, 2010*). Un rôle essentiel est donc tenu par : 1) les LT_H qui vont donner aux LB soit **le signal de continuer leur prolifération et leur différenciation**, via l'interaction CMHII/TCR, CD40/CD40L (et autres signaux de costimulation) puis via la sécrétion de cytokines, soit **le signal de mort par apoptose** via la présentation de FasL (*Takahashi et al., 2001, Herve et al., 2007*) ; 2) les FDC qui participent à la sélection des LB de haute affinité en présentant de manière constante l'antigène ; 3) les macrophages à corps tingibles, responsables de l'élimination des corps apoptotiques (**Figure 24 n°11 et 14**). Un défaut du nombre ou de fonction de l'un de ces types cellulaires peut ainsi prédisposer ainsi au développement d'une autoimmunité (*Vinuesa et al., 2009*).

D'autres mécanismes de tolérance périphérique sont illustrés dans la **Figure 24** mais ne seront pas détaillés ici comme le contrôle des voies des TLRs (**n°12**) ou la mort induite par le BCR (**n°14**).

PARTIE B. LE LUPUS : PROTOTYPE DES MALADIES AUTOIMMUNES SYSTÉMIQUES DÉPENDANTES DES AUTOANTICORPS

Le phénomène de réarrangement des gènes codant pour le récepteur à l'antigène des lymphocytes, se produisant au cours des premières étapes de leur développement, est aléatoire et a des possibilités quasi infinies. Il paraît donc inévitable que certains lymphocytes développent une affinité pour des antigènes du soi, appelés **autoantigènes**. Afin d'éviter une réponse non désirée et exagérée contre des agents du soi, des mécanismes de régulation dits de « **tolérance centrale et périphérique** » sont mis en place au cours du développement lymphocytaire (**Parties A1.4 et A2.6**). **Une défaillance de ces mécanismes de tolérance peut conduire au développement d'une pathologie de type autoimmune.**

A ce jour, environ 80 maladies autoimmunes (MAI) sont répertoriées avec une prévalence de 5% sur la population mondiale, faisant apparaître les MAI comme le **troisième grand groupe de maladies** après les cancers et les maladies cardio-vasculaires.

Le **tableau 1** (*Hayter and Cook, 2012*) présente une liste non exhaustive des MAI les plus fréquentes divisées en deux groupes : celles spécifique d'organes et celles atteignant l'organisme de façon systémique. Dans ce tableau sont exposées la prévalence, la ou les cible(s) moléculaires des autoanticorps présents au cours de la maladie, ainsi que le pourcentage de femmes atteintes parmi les patients. Les femmes ont en effet un risque 2,7 fois plus élevé de développer une MAI que les hommes et cette atteinte majoritairement féminine est commune à 78% des MAI. Plusieurs facteurs tels que les hormones sexuelles, des gènes situés sur le chromosome X, et certains facteurs environnementaux, pourraient davantage sensibiliser les femmes au développement d'une MAI (*Rubtsov et al., 2010*). La plupart des MAI sont la **conséquence de multiples causes**, associant un **terrain génétique** favorable à des **facteurs déclencheurs environnementaux** comme les infections, les médicaments ou des mauvaises habitudes de vie (tabac, intense exposition aux UV,...).

Le **lupus érythémateux systémique** (LES) est une MAI qui regroupe la majorité des caractéristiques citées ci-dessus, à savoir : une **rupture de tolérance**, la présence d'**autoanticorps**, une **atteinte préférentielle des femmes** et une **étiologie multifactorielle**. Cette pathologie, encore mal comprise à ce jour, a été le point de départ de mon projet de thèse.

	Maladie	Autoanticorps	Cibles	Femmes (%)	Prévalence (pour 100 000)	Âge moyen d'apparition de la maladie (ans)
MAI non spécifiques d'organes	Polyarthrite rhumatoïde	Facteurs Rhumatoïdes Anti-CCP	Fibrinogène $\alpha\beta$	75	860 (>18 ans)	20-29
	Syndrome de Gougerot-Sjögren	Multiples	Multiples	90	100 à 500	45-55
	Sclérose en plaques	Anti-MOG Anti-Protéolipide	Multiples	64	58.3	30-39
	Lupus érythémateux systémique	Multiples	Multiples	88	32	30-39
	Sclérodermie	Anti-TopI Anti-ARNpolIII Anti-centromères	Topoisomérase/ ARNPol/ Centromères	75	20	30-50
MAI spécifiques d'organes	Thyroïdite autoimmune d'Hashimoto	Anti-TPO Anti-ThG	Thyro-péroxydase	95	791.7 (>18 ans)	50-59
	Diabète de type I	Anti-GAD Anti-Insuline Anti-ICA512 Anti-IA2B	Insuline/ GAD65	45	480	0-9

Tableau 1 : Liste non exhaustive de maladies autoimmunes (MAI) spécifiques ou non spécifiques d'organes.

CCP : Peptides Cycliques Citrullinés ; MOG : Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein ; TopI : Topoisomérase I ; TPO : Thyro-péroxydase ; ThG : Thyroglobuline ; GAD : Glutamate acide décarboxylase ; ICA : Islet cell autoantigen ; IA-2B : Tyrosine phosphatase IA2B ; ARNpol : ARN polymérase. Adapté de (Hayter and Cook, 2012).

B1. LES ORIGINES DU LUPUS ÉRYTHÉMATEUX DISSÉMINÉ

Le mot « *lupus* » est un mot latin voulant dire « loup », ce qui à l'origine voulait désigner « une maladie qui vous mange, vous dévore ». Hippocrate (460-375 Avt JC) a été le premier à décrire les ulcères cutanés sous le nom de « *herpes esthiomenos* » (éruption bulleuse rongeanche) (Smith and Cyr, 1988, Tsokos, 2010). Puis, d'après les écrits, Herbernus, en 916, a été le premier à allier le mot « lupus » à une maladie de type dermatologique. Il a fallu attendre le 18^{ème} siècle pour enfin distinguer les lésions vésiculaires de la peau (« herpès ») et les lésions ulcérales et destructives atteignant principalement le visage (« lupus »). Ces classifications, proposées par Robert Willan (1757-1812), ont ensuite été mieux affinées par ses élèves comme Alphée Cazenave (1802-1877) (Figure 25). En effet, en 1833, Alphée Cazenave est la première personne à associer l'adjectif « érythémateux » à la pathologie, alors appelée « *erythema centrifugum* ». Puis, en 1851, il étend la description de l'érythème centrifuge, en notant les lésions cutanées avec atrophie, une télangiectasie, un érythème fixe et modifie ainsi l'appellation en « lupus érythémateux » (Lipsker D., 2013). En 1846, Ferdinand Von Hebra (1816-1880) utilisa les mots « éruption en forme d'aile de papillon » qui s'utilise encore de nos jours, et illustra pour la première fois un érythème cutané lupique dans le livre « Atlas of skin diseases » (Figure 25). C'est en 1872 que Morets Kaposi discerna la forme discoïde du lupus, exclusivement cutanée, de la forme disséminée associant des complications viscérales. Il aura fallu ensuite 80 ans pour que les scientifiques de l'époque

comprennent le **caractère autoimmun** de la maladie, tout d'abord par la découverte par Malcolm Hargraves, en 1948, des cellules « LE » (pour Lupus Erythémateux), correspondant à des polynucléaires neutrophiles ayant phagocyté le noyau d'une autre cellule. Puis en 1957, Maxime Seligmann montra que l'incubation de sérum de patients lupiques avec de l'ADN forme un précipité. Ceci fut confirmé par Helmut Deisher en Allemagne et Ruggero Ceppellini en Italie. Ainsi, les **autoanticorps anti-ADN** (plus tard décrits comme anti-ADNdb) sont devenus des marqueurs spécifiques de la pathologie lupique.

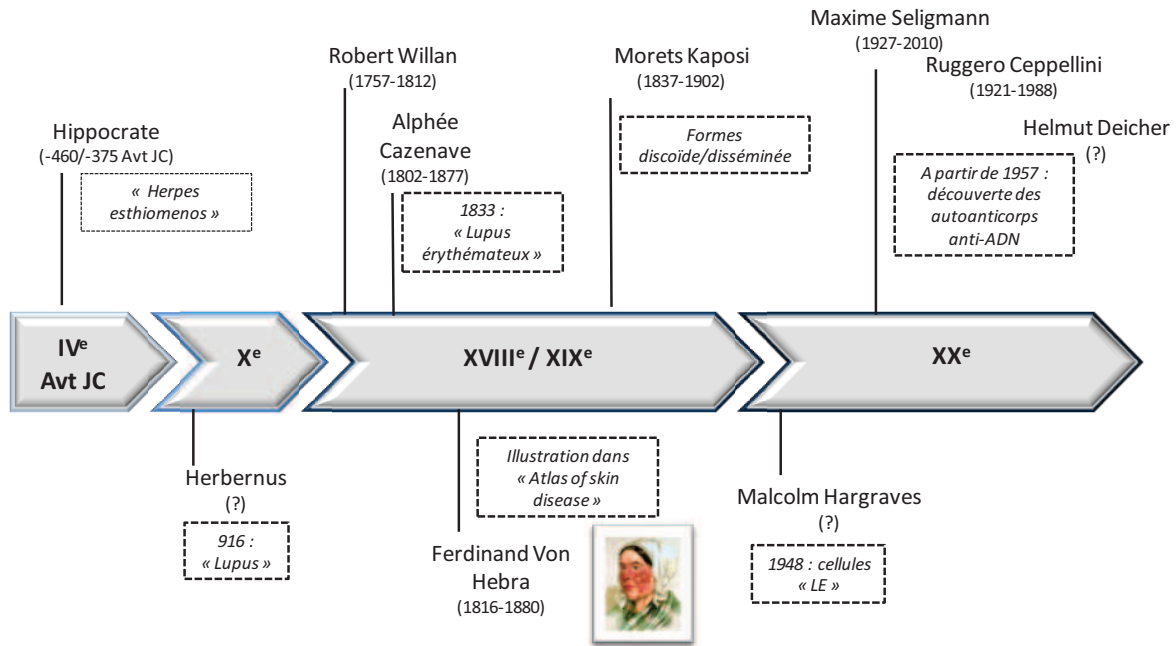


Figure 25 : Frise chronologique reportant les principaux scientifiques qui ont contribué à la découverte et à la caractérisation du LES.

LE : Lupus érythémateux. Figure personnelle.

B2. PHYSIOPATHOLOGIE DU LUPUS

B2.1 CARACTÉRISTIQUES DE LA MALADIE LUPIQUE

Le LES est le **prototype des MAI systémiques dépendante des autoanticorps**. Dans la majorité des cas, c'est une maladie **polygénique**, bien souvent déclenchée par l'intervention de **facteurs environnementaux**, et qui se manifeste sous forme de **poussées** (phases actives de la maladie) entrecoupées de phases de **quiescence** (rémission). Une rupture de tolérance va engager la production **d'autoanticorps pathologiques**, la formation de **complexes immuns** et une **inflammation chronique** menant au **dommage** d'un ou plusieurs organes, comme par exemple les reins, souvent atteints d'une **glomérulonéphrite (GN)** (**Figure 26**) (*O'Neill and Cervera, 2010, Tsokos, 2011*).

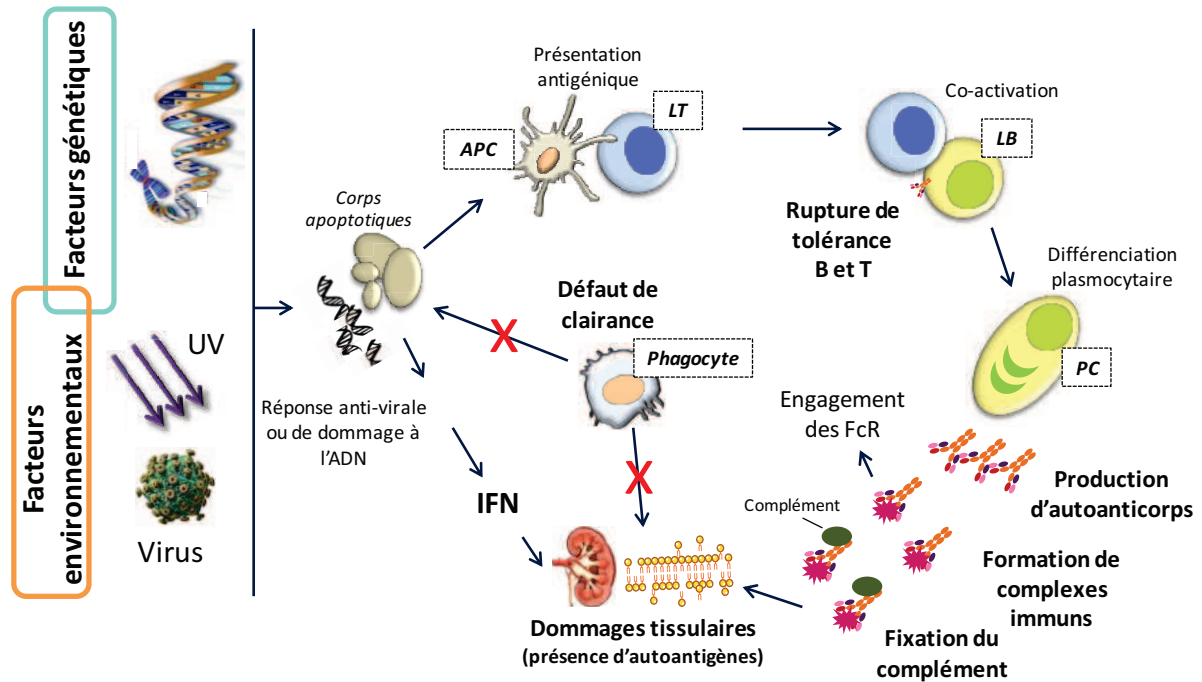


Figure 26 : Schéma de la physiopathologie du lupus.

APC : Cellule présentatrice d'antigène ; IFN : Interféron ; FcR : Récepteur aux fragments Fc ; PC : Plasmocyte.
Adapté de (Crampton et al., 2014).

B2.1.1 LE LUPUS, UNE MALADIE DE TYPE SYSTÉMIQUE

Bien que le caractère « érythémateux » ait été associé très tôt au lupus durant le 19^e siècle, il aura fallu environ 100 ans pour qualifier la pathologie de « **systémique** », c'est-à-dire une pathologie qui affecte plusieurs organes (**Figure 27**). En effet, ceci a été un défi pour les cliniciens, puisque le lupus pouvait facilement être confondu avec de nombreuses autres MAI (avec la PR lors d'atteintes articulaires fortes par exemple). Il a donc fallu établir des critères pour caractériser le LES, ce qui a été proposé pour la première fois par l'ACR (American College of Rheumatology), en 1982. Ces critères ont été mis à jour en 1997 et sont au nombre de 11 (**Tableau 2**) (Hochberg, 1997). Une personne est considérée comme atteinte d'un lupus **lorsqu'elle présente au moins 4 de ces critères** de façon successive ou simultanée au cours de son suivi médical.

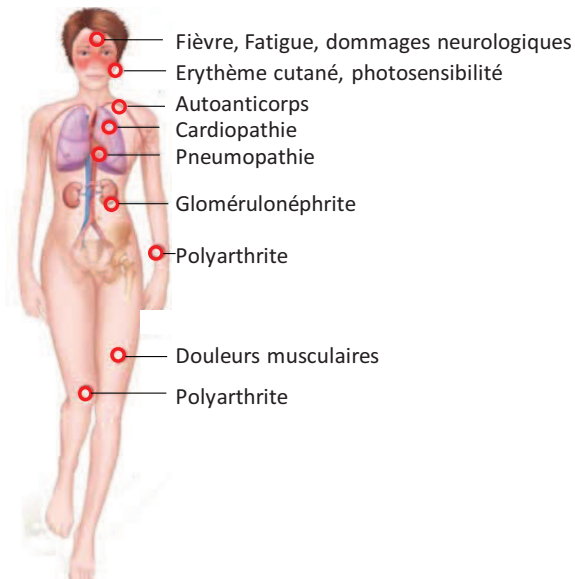


Figure 27 : Principaux symptômes retrouvés au cours du lupus.

Adapté de (O'Neill and Cervera, 2010).

Critères de diagnostique	Caractéristiques
1. Rash malaire	Erythème fixe
2. Lupus discoïde	
3. Photosensibilité	
4. Ulcérations orales ou nasopharyngées	
5. Polyarthrite	Non-érosive ; touchant au moins 2 articulations périphériques ; caractérisée par une douleur, un gonflement ou un épanchement
6. Pleurésie ou péricardite	
7. Troubles rénaux / Protéinurie persistante	Protéinurie > 0,5g/jour
8. Convulsions ou psychose	
9. Atteinte hématologique Anémie hémolytique ou Leucopénie ou Lymphopénie ou Thrombopénie	< 4000/mm ³ , constatée à 2 reprises ou plus < 1500/mm ³ , constatée à 2 reprises ou plus < 100 000/mm ³ , en absence de médicaments cytopéniants
10. Titre anormal d'autoanticorps anti-nucléaires	
11. Troubles immunologiques Anti-ADNdb (natif) Anti-Sm Anti-phospholipides	Titre anormal d'anticorps anti-ADNdb (natif) Présence d'anticorps anti-Sm

Tableau 2 : Critères de diagnostique du LES établis par l'American College of Rheumatology (ACR), d'après la réévaluation de 1997.

Adapté de (O'Neill and Cervera, 2010).

Malgré les différences de manifestations cliniques de la maladie entre les patients, la majorité des patients lupiques produisent des **anticorps dirigés contre l'ADNdb** (ou anti-ADN natif) dans 70 à 80% des cas, et des anticorps dirigés contre les nucléosomes dans 60 à 90% des cas. La présence des anticorps anti-ADNdb est d'ailleurs une spécificité du lupus puisqu'ils ne sont retrouvés que dans moins de 0.5% des cas dans les autres MAI (*Rahman and Isenberg, 2008*). Ces autoanticorps sont retrouvés dans le sérum des patients **bien avant la survenue des symptômes** (environ 3 ans et demi avant) (*Arbuckle et al., 2003*) et seraient notamment responsables de l'inflammation des organes tels que la peau mais aussi les reins. En effet, ces autoanticorps pathogéniques (lorsqu'ils sont d'isotype IgG et de forte affinité) se fixent à leur antigène pour former ce que l'on appelle un complexe immunitaire. La reconnaissance de ces complexes par le système du complément est largement responsable de la réponse inflammatoire engagée au niveau des organes.

La cohorte européenne « Euro-Lupus » d'environ 1000 patients a été suivie pendant 10 années, de 1990 à 2000. Grâce à cette étude, on a pu observer que les manifestations les plus fréquentes retrouvées chez les patients lorsqu'ils ont intégré l'étude sont : un érythème cutané (58%), une photosensibilité (45%), une arthrite (84%), des lésions discoïdes (10%), des arthrites (28.6%) (*Cervera et al., 2002*). Cette étude a aussi permis de constater que l'efficacité, et sans doute la pertinence des traitements, ont été améliorées tout au long de ces 10 ans. Par exemple, 22.2% des patients de la cohorte souffraient de néphropathie au début de l'étude pour seulement 6.8% à la fin de l'étude (*O'Neill and Cervera, 2010*).

B2.1.2 UNE MALADIE EN DIFFÉRENTES PHASES

B2.1.2.1 EVALUATION DE L'ACTIVITÉ DE LA MALADIE

La maladie lupique se manifeste par des **périodes de poussées** correspondant aux phases d'activité de la maladie, entrecoupées de **périodes de quiescence**, d'inactivité. L'activité de la maladie est mesurée par différents index tels que le SLEDAI (Systemic Lupus Disease Activity Index), le BILAG (British Isles Lupus Assessment Group), le PGA (Physician Global Assessment), l'ECLAM (European Consensus Lupus Activity Measurement), le SLAM (Systemic Lupus Activity Index) (*Castrejon et al., 2014*). Les plus utilisés sont les indices SLEDAI et BILAG. Le **SLEDAI** permet d'évaluer globalement l'activité de la maladie en attribuant un système de point par type de symptômes déclarés par le patient, et qui sont au nombre de 24 (**Tableau 3**) (*Bombardier et al., 1992*). Un patient est considéré comme « quiescent », lorsque son score SLEDAI est inférieur ou égal à 4 et « actif » pour un score de SLEDAI supérieur ou égal à 8. Le système **BILAG** permet d'évaluer l'atteinte de chaque organe (établis au nombre de 9) par un système de note allant de A à E ainsi que la fréquence des poussées. Les scores SLEDAI et BILAG seraient tous deux corrélés.

Manifestations	Définition	Valeur
Convulsion	Apparition récente. Exclusion des causes métaboliques infectieuses ou médicamenteuses.	8
Psychose	Perturbation de l'activité normale en rapport avec une altération sévère de la perception de la réalité. Comprend : hallucinations, incohérence, appauvrissement du contenu de la pensée, raisonnement illogique, comportement bizarre, désorganisé. Exclusion d'une insuffisance rénale ou d'une cause médicamenteuse.	8
Atteinte cérébrale	Altération des fonctions mentales avec troubles de l'orientation, de la mémoire ou autre apparition brutale et d'évolution fluctuante. Comprend : troubles de la conscience avec réduction des capacités de concentration, incapacité à rester attentif avec en plus, au moins 2 des manifestations suivantes : troubles perceptifs, discours incohérent, insomnie ou somnolence diurne, augmentation ou diminution de l'activité psychomotrice.	8
Troubles visuels	Atteinte rétinienne du lupus. Comprend : nodules dysoriques, hémorragies rétiniennes, exsudats séreux, ou hémorragies choroïdiennes, névrite optique. Exclusion d'une cause hypertensive, infectieuse ou médicamenteuse.	8
Nerfs crâniens	Neuropathie sensitive ou motrice d'apparition récente touchant un nerf crânien	8
Céphalées	Céphalées sévères et persistantes, pouvant être migraineuses mais résistantes aux traitements antalgiques majeurs.	8
AVC	Accident vasculaire cérébral d'apparition récente. Artériosclérose exclue.	8
Vascularite	Ulcérations, gangrène, nodules digitaux douloureux, infarctus péri-unguéaux ou preuve histologique ou artériographie de vascularite	8
Arthrite	Plus de 2 articulations douloureuses avec des signes inflammatoires locaux (douleur, tuméfaction ou épanchement articulaire)	4
Myosite	Douleur/faiblesse musculaire proximale associée à une élévation des CPK et/ou aldolases ou à des modifications électromyographiques ou à une biopsie montrant des signes de vascularites	4
Cylindres urinaires	Cylindres de globules rouges	4
Hématurie	>5 GR / champ en l'absence de lithiase, d'infection ou d'une autre cause	4
Protéinurie	>0.5g/24h. Apparition récente ou majoration récente de plus de 0.5g/24h	4
Pyurie	>5 GB / champ en l'absence d'infection	4
Alopécie	Apparition récente ou récurrence d'une alopécie en plaque ou diffuse	2
Ulcères muqueux	Apparition récente ou récurrences d'ulcérations orales ou nasales	2
Pleurésie	Douleur thoracique d'origine pleurale avec frottement ou épanchement ou épaississement pleural	2
Péricardite	Douleur péricardique avec au moins l'une des manifestations suivantes : frottement, épanchement ou confirmation électrographique ou échographique	2
Complément	Diminution du CH50, du C3, ou du C4	2
Anti-ADN	Taux supérieur au seuil de positivité	2
Fièvre	>38°C en l'absence de cause infectieuse	1
Thrombopénie	< 100 000 plaquette/mm ³	1
Leucopénie	< 3000 GB/mm ³ en l'absence de cause médicamenteuse	1

Tableau 3 : Description des manifestations cliniques chez le patient et leurs valeurs qui, additionnées déterminent le score SLEDAI.

Adapté de (Bombardier et al., 1992).

B2.1.2.2 LE MYSTÈRE DES PHASES DE QUIESCENCE

Alors que les phases de poussées semblent être déclenchées par des facteurs environnementaux variés (exposition aux UV, hormones sexuelles, prise de certains médicaments,..) engendrant ainsi un emballement du système immunitaire et une réaction inflammatoire, **les phases de quiescence ont été relativement peu étudiées**. Bien qu'un traitement approprié ait pour but de maintenir le patient en phase quiescente le plus longtemps possible, à ce jour, aucun mécanisme physiologique n'a été associé à ces phases de rémission. Il existe quelques cas de patients qui entrent

en phase de rémission sans aucun traitement et d'autres pour lesquels les traitements ne sont plus du tout nécessaires en phase de quiescence.

Seules quelques études cliniques, phénotypiques ou génétiques ont été entreprises sur des patients lupiques en phase quiescente. Une étude thaïlandaise très récente a suivi pendant près de 5 ans une cohorte de près de 70 femmes atteintes d'un lupus, dans le but d'établir les facteurs influençant la durée des périodes de quiescence (*Kasitanon et al., 2015*). Les résultats obtenus par cette étude proposent que **la durée des phases de quiescence dépendrait de l'âge auquel est fait le diagnostic** (donc finalement plus ou moins l'âge de survenue des symptômes), et du type de traitement pris par le patient. Ainsi, les femmes diagnostiquées à un âge supérieur à 25 ans et traitées par des anti-malariques (chloroquine, hydroxychloroquine) présentent des phases de quiescence plus longues que les femmes diagnostiquées avant 25 ans et sans traitement de type anti-malarique. Une seconde étude, plus ancienne, a été réalisée sur des patients dits « SACQ » pour « sérologiquement actifs » (quantité anti-ADNdb>50 unités/mL) mais « cliniquement quiescents » (BILAG<6) (*Ng et al., 2006*). Sur 290 patients lupiques, seulement 27 d'entre eux étaient SACQ. L'étude clinique de ces 27 patients a, cependant, permis de mettre en évidence **une corrélation entre un fort taux d'anticorps anti-nucléosomes et une durée plus courte des phases de quiescence**, faisant de ce type d'autoanticorps de bons prédicteurs quant à la survenue des poussées futures. Néanmoins, ces études ne permettent pas de conclure quant aux régulations physiologiques durant les phases de quiescence.

En 2010, une étude a été réalisée par notre laboratoire afin d'évaluer le phénotype du compartiment B de patients lupiques quiescents comparé à des personnes saines, par cytométrie en flux (*Korganow et al., 2010*). Les résultats énoncent tout d'abord une quantité plus importante de plasmocytes chez les patients lupiques quiescents comparé aux contrôles (mais moins importante comparé à des sujets lupiques actifs). De plus, une sous-expression de la protéine CD19 membranaire, impliquée dans l'activation du LB, est observée pour les LB de l'ensemble des patients lupique. Ceci n'étant pas la conséquence d'une altération de l'expression du gène codant pour CD19, il a été suggéré que cette diminution d'expression de CD19 à la membrane pourrait correspondre à un **phénotype particulier qu'adopteraient les LB pendant la phase quiescente**.

Enfin, quelques études transcriptomiques ont comparé l'expression de gènes entre des patients en phase active et d'autres en phase quiescente. Deux d'entre elles seront décrites dans la partie **B7.3.5** consacrée aux études transcriptomiques. Néanmoins, aucune d'entre elle ne s'attarde sur les gènes retrouvés surexprimés chez les patients en phase inactive comparé aux patients actifs (*Rus et al., 2004*).

En conclusion, très peu d'études ont été entreprises pour comprendre les mécanismes physiologiques et génétiques à l'origine de la mise en place et du maintien des phases de rémission, qui pourrait néanmoins apporter de nouvelles données pour une meilleure compréhension de la pathologie.

B2.2 HÉTÉROGÉNÉITÉ ÉPIDÉMIOLOGIQUE DU LUPUS

D'un point de vue ethnique, il apparaît que l'incidence et la prévalence du LES est relativement plus importante chez les personnes d'**origine africaine**, bien que cette maladie ne soit rencontrée que dans très rares cas sur le continent africain. Pour exemple, une étude menée au Royaume-Uni a montré que, pour un âge identique, la prévalence pour des personnes d'origine afro-caribéenne était de 112 pour 100 000 comparé à 21 pour 100 000 pour des sujets européens caucasiens. Cette étude a aussi souligné la haute prévalence qu'a la **population asiatique** de contracter la maladie : 47 cas pour 100 000 (*Johnson et al.*, 1995). D'autres études confirment que les personnes d'origine africaine ou asiatique auraient 2 à 3x plus de risque de développer un lupus que les personnes d'origine caucasienne (*McCarty et al.*, 1995).

Le plus grand facteur de risque pour développer un lupus est le genre sexuel : en moyenne, la pathologie est **développée 9 fois sur 10 par des femmes** (9:1). De plus, l'âge de survenue de la maladie se situe entre 18 et 65 ans avec une moyenne en Europe de 30 ans, âge correspondant à la période de fertilité des femmes. Cela suggère donc un rôle des hormones féminines dans le développement de la maladie. Alors que le lien entre les **œstrogènes** et le développement d'un lupus est accepté et prouvé (*Bernier et al.*, 2009) (*Roubinian et al.*, 1978) (*Lang*, 2004), le rôle de la progestérone reste encore controversé bien que majoritairement, un rôle protecteur lui soit accordé chez la souris (*Hughes et al.*, 2009) et chez l'Homme (*Chabbert-Buffet et al.*, 2011).

La prédominance féminine suggère aussi un **rôle du chromosome X** dans le développement du LES. Des preuves de cette théorie ont été notamment soulevées en étudiant des hommes souffrant du syndrome de Klinefelter, aneuploïdie chromosomique caractérisée par la présence d'un chromosome X supplémentaire (XXY). La proportion des hommes atteints de ce syndrome est 14 fois plus élevée parmi la population masculine lupique que le reste de la population masculine. Néanmoins, la réciproque n'est pas vraie, tous les hommes souffrant d'un lupus, ne possèdent pas cette aneuploïdie (*Scofield et al.*, 2008). Ainsi, la présence d'un double chromosome X n'est ni essentielle ni suffisante au développement d'un lupus. Cependant, le lien entre le chromosome X et le développement du LES repose principalement sur des **facteurs de type génétique**, puisque le chromosome X est porteur de gènes impliqués dans la susceptibilité à développer un lupus tel que le

gène *CD40L*, très important pour la coopération LB/LT, ou encore le gène *TLR7*, récepteur de l'immunité innée reconnaissant l'ARN, mais aussi de **type épigénétique**, car l'épigénétique gouverne (par méthylation de l'ADN) l'inactivation de l'un des 2 chromosomes X chez la femme. Le rôle du chromosome X dans la pathologie lupique sera expliqué plus en détail au cours de la **partie B7.3.4.4**.

B3. PRESENTATION DES PRINCIPAUX MODELES MURINS LUPIQUES

Afin d'identifier et d'étudier les gènes de susceptibilité au développement du lupus ou les facteurs environnementaux impliqués dans le déclenchement de la maladie, **de nombreux modèles murins ont été utilisés**. On distinguera deux types de modèles : les **modèles spontanés** qui, naturellement, développent des symptômes lupiques, et les **modèles induits** qui nécessitent une exposition à un ou plusieurs facteurs déclencheurs. Le **tableau 4** présente les principaux modèles murins spontanés de lupus et leurs caractéristiques, ainsi que le modèle murin induit par le LPS, auquel j'ai eu recours pendant ma thèse.

B3.1 LES MODÈLES MURINS DE LUPUS SPONTANÉ

B3.1.1 LE MODÈLE (NZBXNZW)F1

Le **modèle (NZBxNZW)F1**, décrit en 1961 par Helyer et Howie, est le modèle murin de lupus spontané le plus ancien et correspond à la première génération d'un croisement entre la lignée NZB (New Zealand Black) et la lignée NZW (New Zealand White) toutes deux caractérisées par des traits limités d'autoimmunité (*Huston and Steinberg, 1979*). La génération F1 développe, quant à elle, une **maladie lupique sévère** caractérisée par une lymphadénopathie, une splénomégalie, des quantités élevées d'autoanticorps anti-nucléaires sériques, incluant des IgG anti-ADNdb, et une GN, médiée par le dépôt de complexes immuns (majoritairement d'isotype IgG2a), qui apparaissant entre 5 et 6 mois et mènent à la mort de l'animal vers 10-12 mois (contre 2 à 3 ans pour une souris de laboratoire saine) (*Theofilopoulos and Dixon, 1985*) (**Tableau 4**). De façon similaire à l'Homme, la maladie lupique, pour ce modèle, se développe uniquement chez les femelles, ce qui a été relié à des niveaux élevés d'oestrogènes.

B3.1.2 LE MODÈLE BXS-B-YAA

Quasiment 100% des **souris BXS-B** développent une pathologie de type lupique, avec des traits plus sévères pour les mâles. Le phénotype inclut une hyperplasie des organes lymphoïdes secondaires, une hypergammaglobulinémie, une production d'autoanticorps anti-nucléaires et anti-érythrocytes, et une GN engendrée par le dépôt de complexes immuns. La moyenne de survie est de 5 mois pour les mâles et 14 mois pour les femelles (*Murphy and Roths, 1979*) (**Tableau 4**). La sévérité de la maladie observée chez les mâles est expliquée par l'occurrence d'une **translocation du**

chromosome X sur le Y, appelée « **Yaa** », résultant en la **duplication de 16 gènes** dont le gène codant pour le TLR7 (*Subramanian et al., 2006*). L'activité du TLR7 a d'ailleurs été associée au développement du lupus chez l'Homme. Chez la souris BXSB mâle, la délétion du gène *Tlr7* endogène situé sur le chromosome X empêche l'apparition de certains traits autoimmuns comme la GN, la splénomégalie et augmente le taux de survie des souris (*Santiago-Raber et al., 2008*). Néanmoins, le fond génétique de la souris BXSB présente d'autres loci de susceptibilité puisque la translocation Yaa sur un fond CBA n'induit pas le développement de la maladie (*Hudgins et al., 1985*).

B3.1.3 LA MUTATION *LPR* SUR FOND MRL ET C57BL/6

Le fond MRL est un fond génétique complexe issu de différentes souches consanguines LG/J (75%), AKR/J (12.6%), C3H/HeJ (12.1%) et C57BL/6 (0.3%). Une des lignées obtenues après plusieurs croisements aléatoires, appelée « **MRL^{*lpr/lpr*}** », développe un phénotype de type lupique caractérisé par une lymphadénopathie due à l'accumulation de LT B220⁺ doubles négatifs (CD4⁻CD8⁻), une hypergammaglobulinémie G et M, la présence d'autoanticorps de type anti-nucléaires (anti-ADNdb, anti-ADNsb,..) (*Cohen and Eisenberg, 1991*). Ces souris possèdent une mutation autosomale récessive sur le chromosome 19 nommée « ***lpr*** » pour « lymphoprolifération », responsable de **l'altération de l'expression du récepteur Fas** (*Reap et al., 1995*). L'altération du récepteur Fas induit un défaut d'apoptose donc un défaut des mécanismes de tolérance. Contrairement au modèle (NZBxNZW)F1, la pathologie affecte les mâles et les femelles avec la même fréquence, bien que la maladie soit plus sévère chez les femelles (**Tableau 4**).

La mutation *lpr* sur un fond génétique C57BL/6 provoque un phénotype plus modéré et retardé par rapport aux souris MRL^{*lpr/lpr*}. Le principal intérêt de ces souris est que la mutation *lpr* soit présente sur un fond génétique B6, fond commun à la plupart des souris génétiquement modifiées utilisées de nos jours. Cela facilite ainsi les croisements.

	Nom du modèle	Autoanticorps	Splénomégalie	Lymphadénopathie	GN	Dermatite	Ratio F/M	Mortalité moyenne (pour le genre le plus touché)
Spontanés	(NZBxNZW)F1	ANA, Anti-ADBdb,sb	+++	+	+++	0	F>M	12 mois
	BXSB-Yaa	ANA, Anti-ADBdb,sb	++	0	+++	0	M	10 mois
	MRL ^{<i>lpr/lpr</i>}	ANA, Anti-ADBdb, sb, FR	+++	+++	+++	++	F=M	5 mois (pour F)
	B6 ^{<i>lpr/lpr</i>}	ANA, Anti-ADBdb, sb, FR	++	++	+	0	F=M	12 mois
Induit	B6 / LPS	ANA, Anti-ADNdb, FR	0	0	0	0	F=M	-

Tableau 4 : Présentation de différents modèles murins lupiques spontanés et induits.

GN : Glomérulonéphrite ; ANA : Anticorps anti-nucléaire ; db : double brin ; sb : simple brin ; FR : Facteur rhumatoïde ; LPS : Lipopolysaccharide ; F : Femelle ; M : Mâle. Tableau personnel.

B3.2 LES MODÈLES INDUITS DE LUPUS

Contrairement aux modèles murins cités ci-dessus qui développent spontanément une pathologie de type lupique dû à un ou plusieurs facteurs génétiques causaux, les modèles induits développent la maladie après exposition à certains facteurs environnementaux déclencheurs. Ces facteurs peuvent inclure des hormones, des autoantigènes en grande quantité (ex : l'injection de cellules apoptotiques), certains composants microbiens (ex : le lipide A bactérien, de l'ARN/ADN bactérien, le LPS bactérien) mais aussi des médicaments (Fluorouracil) ou encore des composants chimiques (Pristane) (Perry *et al.*, 2011). Les effets induits par chacun de ces facteurs environnementaux dépendent aussi du fond génétique des souris exposées. Seul l'exemple de **l'administration de LPS par injection** à des souris B6 sera détaillé lors de ce paragraphe.

Il est bien connu que le LPS peut induire des lésions tissulaires *in vivo*, et il a été observé que l'injection de LPS à des souris saines provoque un relargage d'ADN dans la circulation et la production d'autoanticorps anti-ADN (Fournie *et al.*, 1974) (Tableau 4). **L'injection de LPS** provenant de *S. typhimurium* à des souris B6 conduit au **relargage d'ADN** dans la circulation, à la **production d'IgM anti-ADNdb/sb** et de **facteurs rhumatoïdes** (« FR », correspondant à des IgM anti-IgG) dès le 3^{ème} jour post-injection, ainsi qu'un léger dépôt de complexes immuns au niveau des glomérules rénaux, deux semaines post-injection (Izui *et al.*, 1977, Izui *et al.*, 1979). Cet ADN relargué, responsable de la formation d'autoanticorps et de complexes immuns, semble provenir de cellules endommagées par le LPS.

Ainsi, le modèle de lupus-induit par le LPS mène à l'apparition de quelques traits d'autoimmunité mais non à une maladie lupique complète.

B4. PRÉSENTATION DES DIFFÉRENTS ACTEURS DU LUPUS ET LEUR RÔLE DANS LA PATHOLOGIE

Le lupus est une maladie complexe, systémique et inflammatoire. De nombreux acteurs de l'immunité, innée et adaptative, participent à la pathogénèse et à l'activité de la maladie (Figure 27).

B4.1 ACTEURS DE L'IMMUNITÉ INNÉE

B4.1.1 LES POLYNUCLÉAIRES NEUTROPHILES

Les **polynucléaires neutrophiles** représentent 65% de l'ensemble des leucocytes, et participent aux premières lignes de défense contre les micro-organismes. L'élimination des microbes par ces cellules consiste principalement en une destruction par phagocytose, en un relargage de granules ou de ROS (Reactive Oxygen Species) mais aussi en une formation de « pièges » extracellulaires (NETose), appelés NET pour « Neutrophil Extracellular Traps » (Kaplan, 2011). Des

études menées sur le rôle des neutrophiles dans la pathogénèse lupique a permis de montrer que bien qu'elles présentent **un défaut dans leur fonction de phagocytose**, elles présentent un **profil hyperactivé**, chez les patients lupiques actifs, caractérisé par une surexpression des molécules d'adhésion CD11b/CD18 (correspondant au CR3 (Récepteur du Complément)) (*Molad et al., 1994*). De plus, la quantité de **défensines α et β** synthétisées par les neutrophiles serait retrouvée en plus fortes concentrations dans le sérum de patients lupiques comparé à des personnes saines (*Froy and Stoeber, 2009*). Ce type de protéines participe à l'amplification de la réponse inflammatoire, notamment en favorisant la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 ou le TNF α (**Figure 28**).

Néanmoins, **la neutropénie** est une manifestation clinique caractéristique du lupus. En effet, un nombre considérable de neutrophiles apoptotiques circulants serait retrouvé chez les patients lupiques (*Ren et al., 2003*) (**Figure 28**). Les raisons potentielles comprennent : 1) la présence d'autoanticorps déplétants dirigés contre les neutrophiles, par exemple les ANCA (Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody) ou contre des facteurs de croissance propres aux neutrophiles, par exemple contre le G-CSF ; 2) une mort par apoptose, potentiellement due à une augmentation de l'expression de Fas et une diminution du marqueur d'activation CD44 (qui permet entre autre la reconnaissance des corps apoptotiques par les macrophages et permet leur élimination); 3) une mort des neutrophiles par NETose (**Figure 28**). **La NETose** consiste au relargage intégral du contenu cellulaire du neutrophile, englobant aussi bien les granules cytoplasmiques que les fibres de chromatines associées à des histones ou de l'ADNdb libre. L'ADN, très collant, engluerait les pathogènes pour faciliter la phagocytose. L'activité de la nucléase DNase I permet la dégradation de ce contenu afin d'éviter son exposition prolongée en milieu extracellulaire. Chez certains patients lupiques, **la dégradation des NETs par la DNase I est défectueuse** soit car il existe des inhibiteurs de la DNase I, soit parce que des anticorps anti-NET bloquent l'accès de la DNase I, soit enfin parce qu'un défaut génétique altère la fonction de l'enzyme (*Bosch, 2011*). Ceci devient alors une source d'autoantigènes nucléaires (ADN, chromatine..) exposée au milieu extracellulaire. Lorsque le relargage des autoantigènes suite au processus de NETose, survient au niveau des reins par exemple, ceci participe à l'inflammation rénale entraînée par la reconnaissance des autoantigènes par le système du complément (*Hakkim et al., 2010*).

B4.1.2 LES MONOCYTES ET LES MACROPHAGES

Le monocyte est un acteur clé du SI inné mais aussi largement impliqué dans la régulation de l'immunité adaptative. En effet, le monocyte, différencié en macrophage une fois dans les tissus, est capable d'effectuer de multiples fonctions telles que : 1) d'activer des senseurs du SI inné de type PRR (Pathogen Recognition Receptor) comme les TLRs ou les NLRs (NOD-Like receptors) ; 2) de

produire des cytokines et chimiokines très variées leur permettant d'initier l'inflammation et de recruter d'autres cellules du SI (ex : IL-1, IL-12) ; 3) de présenter l'antigène aux LT via le CMHII ; 4) de garantir la clairance des corps apoptotiques par activité phagocytaire (*Li et al., 2010*).

Il existe différentes sous-populations de monocytes définies par leurs marqueurs de surface : la population CD14⁺⁺CD16⁻ (FcγRIII) qui correspond à la majorité des monocytes circulants, et la population CD14⁺CD16⁺, population moins importante mais qui est responsable de l'importante production de cytokines après stimulation.

Etant donné le rôle important qu'ils jouent dans la réponse immunitaire, les monocytes et macrophages ont été étudiés dans le contexte lupique. Tout d'abord, leur nombre et la proportion des sous-populations ont été analysés par plusieurs équipes. Mais alors que certains n'observent pas de différence significative, d'autres retrouvent une expansion de la sous-population monocyttaire CD14⁺CD16⁺ et d'autres encore présentent un nombre réduit de monocytes totaux mais avec une proportion entre les sous-populations équivalente. Par ailleurs, les monocytes expriment à leur surface **le récepteur FcγRI** (CD64), récepteur du fragment Fc des IgG de type activateur. Ce marqueur a été retrouvé surexprimé sur les monocytes du sang périphérique de patients lupiques comparé à des personnes saines, et serait d'autant plus exprimé chez les patients atteints d'une maladie rénale (*Li et al., 2009*). De plus, les monocytes des patients lupiques exprimeraient plus fortement **la protéine ICAM-1**, molécule impliquée dans la migration de ces cellules, comparé aux monocytes de personnes saines (*Funauchi et al., 1993*). Ces dérégulations d'expression peuvent ainsi mener à une **hyperactivation** et à une **migration exagérée** des monocytes. Enfin, **une surexpression de CD40L** à la surface des monocytes observée chez d'autres patients (*Katsiari et al., 2002*), conduirait à l'activation et à la prolifération des LB.

De plus, les monocytes et les macrophages produisent la source majeure des cytokines contribuant à l'activation de l'immunité adaptative. Des quantités élevées d'**IL-6** et d'**IL-10** ont d'ailleurs été retrouvées dans le sérum de patients lupiques (*Llorente et al., 1993*). Ces cytokines sont connues pour jouer un rôle dans la survie, le développement et la différenciation des LB, notamment en ASC. Ainsi, lors d'une rupture de tolérance, ces cellules permettent l'amplification de la production d'autoanticorps. De plus, **le facteur BAFF**, très important pour la survie des LB, est aussi en majorité produite par les monocytes et les macrophages. Une étude a montré une production élevée de ce facteur chez des patients lupiques (*Zhang et al., 2001*) (**Figure 28**).

Enfin, la **fonction phagocytaire** des monocytes et macrophages est indispensable pour l'élimination des cellules nécrosées ou apoptotiques et s'avère être déficiente chez les patients lupiques (**Figure 28**). Tandis que durant la nécrose, le contenu cellulaire relargué peut

potentiellement induire une réponse inflammatoire de par sa reconnaissance via les senseurs de l'immunité innée (TLR,..), les corps apoptotiques n'induisent normalement pas d'inflammation. Les phosphatidylsérines présentées par la cellule en apoptose permettent sa reconnaissance par le macrophage qui engage alors la phagocytose de la cellule mourante tout en générant un signal anti-inflammatoire. Ces effets anti-inflammatoires sont notamment induits par la synthèse de TGF- β 1 ou encore de prostaglandine E2. D'autres récepteurs des monocytes et macrophages ont été impliqués dans l'élimination des corps apoptotiques chez la souris, comme CD14, c-Mer, ou le récepteur à la vitronectine. Néanmoins, leur rôle chez l'Homme n'est pas encore clair. Ainsi, une déficience pour l'un ou l'autre de ces récepteurs peut compromettre la capacité des monocytes et macrophages à éliminer les débris cellulaires et potentiellement favoriser l'exposition d'autoantigènes et le développement d'une MAI, telle que le LES.

B4.1.3 LES CELLULES DENDRITIQUES

B4.1.3.1 LES CELLULES DENDRITIQUES CONVENTIONNELLES

Caractérisées par l'expression du marqueur CD11c, **les cellules dendritiques conventionnelles** (cDC) possèdent un grand pouvoir phagocytaire à l'état immature, et une capacité à sécréter de grandes quantités de cytokines comme l'IL-6, l'IL-12, l'IL-1 ou l'IL-10, à l'état mature (*Mackern-Oberti et al., 2015*). De plus, les cDC sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, capables d'activer les LT, donc finalement se situent à l'interface entre le SI inné et le SI adaptatif.

Premièrement, au stade immature, les cDC jouent un grand rôle dans la **tolérance lymphocytaire T** puisqu'en présentant des antigènes via le CMHII, elles permettent de tolérer les LT CD4⁺ et ainsi de provoquer la délétion des LT CD4⁺ autoréactifs, mais aussi d'induire la différenciation de LT CD4⁺ en LTreg. D'ailleurs, la délétion des DC chez la souris résulte en une rupture de tolérance des LT CD4⁺ et au développement d'une autoimmunité (*Ohnmacht et al., 2009*). Par ailleurs, un défaut de tolérisation des DC chez des patients lupiques, caractérisée par une capacité réduite des DC à interagir avec des corps apoptotiques, a été montré par Berkun *et al.*, en 2008 (*Berkun et al., 2008*) (**Figure 28**). Il a été suggéré que la mise en présence d'un antigène donné avec des DC peut permettre de tolérer les LT envers cet antigène. C'est ainsi que Kang *et al.*, ont montré que l'injection d'un peptide faiblement concentré, correspondant à une portion de l'histone H4, dans des souris lupiques, améliorerait les symptômes de la maladie dont la maladie rénale, se traduisant notamment par une diminution de la production d'autoanticorps anti-ADNdb et anti-nucléosomes (*Kang et al., 2007*). Le mécanisme serait dû à la capacité des DC (dont les pDC, dont nous parlerons

dans la prochaine partie) à tolérer les LT envers les composants nucléaires grâce à la présentation du peptide d'histone et ainsi induire l'expansion de LTregs, producteurs de TGF- β , et de diminuer la production d'IL-17.

La maturation des DC est ensuite assurée via l'échange des signaux CD40/CD40L avec les LT, ou par la liaison d'un MAMP ou DAMP au niveau de leurs PRR. Dans le cas du lupus, le défaut de clairance des corps apoptotiques par les macrophages permet à ceux-ci d'atteindre le stade tardif de l'apoptose, stade proche de la nécrose, et ainsi de relarguer une quantité importante de DAMPs. Il a été montré que ces **DAMPs** provenant des blebs apoptotiques (partie de la membrane plasmique en décomposition) des cellules mourantes **activent les DC**, et permettent leur maturation (*Fransen et al., 2009*). Les DC ainsi activées produisent de l'**IL-6**, cytokine pro-inflammatoire, qui participe à **l'activation des LT helper 17** (LTh17, cellules caractérisées par leur production d'IL-17, cytokine pro-inflammatoire) d'une part, et qui **inhibe la différenciation des LTreg**, d'autre part (**Figure 28**).

Enfin, mis à part les LT, les cDC interagissent aussi avec les LB. Une étude de Teichman *et al.*, réalisée en 2010, montre que la délétion des cDC, chez la souris lupique MRL^{*lpr/lpr*}, atténue les symptômes de la maladie. Cette délétion entraîne non seulement une diminution de l'expansion des LT effecteurs, mais également une diminution de la quantité de plasmablastes ainsi que de la production d'autoanticorps (*Teichmann et al., 2010*). Ceci souligne donc **le rôle des DC dans la production d'autoanticorps pathologiques** au cours de la maladie lupique.

B4.1.3.2 LES CELLULES DENDRITIQUES PLASMACYTOÏDES

Les **cellules dendritiques plasmacytoïdes**, notamment caractérisées par l'expression de CD123, sont les principales **cellules productrices d'IFN de type I**, dont l'IFN- α . La présence d'IFN-I en grande quantité est une des signatures de la maladie lupique, puisque les taux retrouvés dans le sérum de certains patients sont corrélés à l'activité de la maladie (*Crow, 2014*). Cette sécrétion est induite par la reconnaissance de stimuli endogènes ou exogènes par les senseurs de l'immunité innée et principalement par les TLRs endosomaux, c'est-à-dire les TLR3, -7, -8 et -9, qui reconnaissent spécifiquement les acides nucléiques (ARN et ADN). La stimulation de pDC humains avec les ligands du TLR9 (ADN à îlots CpG hypométhylés) (*Xu et al., 2012*) ou TLR7 (ARN) (*Yu et al., 2010*) induit leur activation, la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- α , l'IL-6 et l'IL-12 et conduit à l'expansion des cellules LTh17.

Les pDC sont, comme les cDC, capables de tolérer les LT et d'interagir avec les LB. D'ailleurs, via leur production d'IFN- α et d'IL-6, les pDC pourraient directement contribuer à l'induction de la commutation de classe des LB (*Poock et al., 2004*). De plus, la délétion du facteur de transcription

Tcf4, essentiel à la fonction des pDC, dans un modèle murin lupique, abolit les manifestations clés de la maladie, à savoir la production d'autoanticorps anti-ADN et le développement de la GN (Sisirak et al., 2014).

Ainsi, les cellules de l'immunité innée, via leur capacité à phagocyter, à sécréter des cytokines et à moduler l'immunité adaptative, sont pleinement impliquées dans la pathologie lupique.

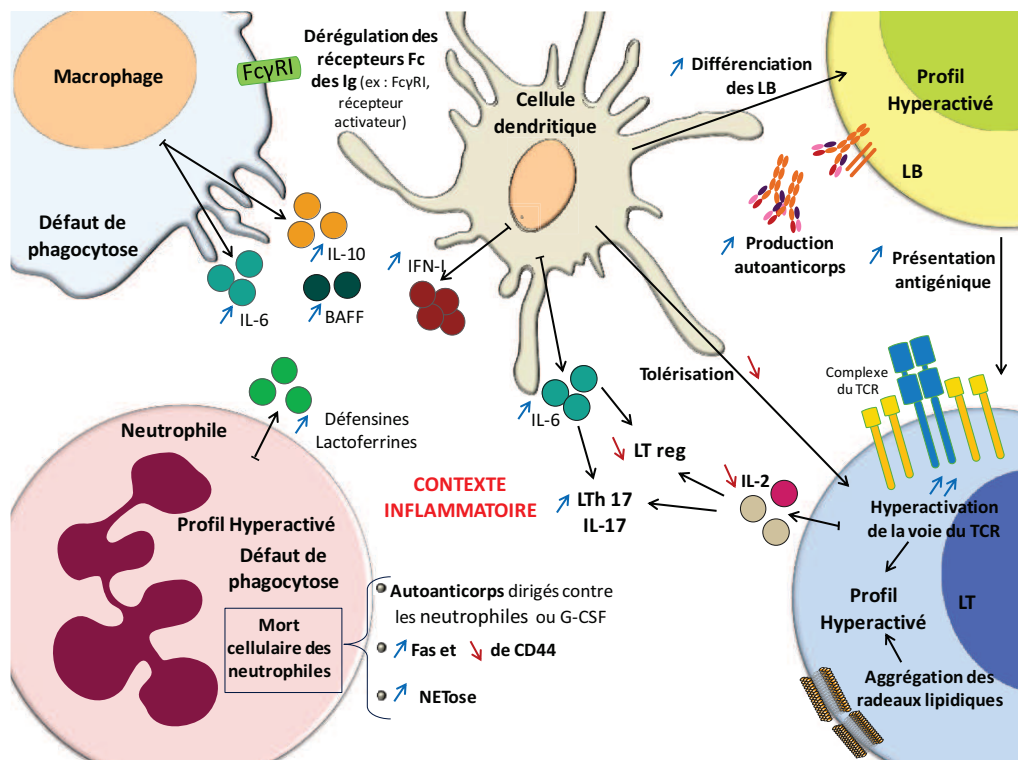


Figure 28 : Représentation schématique des principales anomalies cellulaires rencontrées au cours du LES.
Figure personnelle.

B4.2 ACTEURS DE L'IMMUNITÉ ADAPTATIVE

B4.2.1 LES LYMPHOCYTES T

La maladie lupique est caractérisée par la présence d'autoanticorps, produits par les LB selon une réponse essentiellement T-dépendante. Les LT possèdent un récepteur majeur à leur surface nommé TCR (T Cell Receptor) capable de reconnaître l'antigène et d'engager l'activation de la cellule T. Il existe deux types de TCR, le TCR $\gamma\delta$ propre aux LT qui portent le même nom (représentant entre 1 et 5% de la totalité des LT) et le TCR $\alpha\beta$ propre aux LT dits « conventionnels », qui font l'objet de ce paragraphe. Le TCR $\alpha\beta$ est composé d'un hétérodimère formé par les chaînes α et β , qui s'associent

avec le complexe CD3 formé lui-même des sous-unités δ , ϵ , γ et ζ . En cas de liaison de l'antigène au TCR, la sous-unité ζ du CD3 s'associe à la protéine ZAP70 (Zeta-chain-Associated Protein 70), ce qui permet la transduction du signal. Cette étape est néanmoins absente dans les LT de patients lupiques puisque l'expression de la sous-unité ζ du CD3 est diminuée dans ces cellules (Konya *et al.*, 2014). Cette interaction est alors substituée par une liaison entre la chaîne intracytoplasmique du récepteur Fc γ , situé au niveau de la membrane des LT, et la kinase Syk. Cette liaison est, en termes de transduction du signal, 100 fois plus forte que la liaison entre CD3 ζ et ZAP-70 car elle induit une **augmentation considérable du flux calcique dans la cellule** (Ghosh *et al.*, 2012). C'est une des raisons pour lesquelles les LT ont un **phénotype hyperactivé** au cours du lupus (Figure 27). Un autre phénomène s'opérant dans les LT de patients lupiques est l'**agrégation des radeaux lipidiques à la membrane**. En effet, les LT sains ont, à l'état basal, une répartition proportionnelle des radeaux lipidiques à la membrane alors que les LT lupiques présentent des agrégats de radeaux lipidiques, ce qui entraîne une hyperactivation de la cellule (Figure 28). Il a d'ailleurs été montré chez la souris lupique que la perturbation des agrégats de radeaux lipidiques par du méthyl- β -cyclodextrin (capable de dépléter le cholestérol, ici contenu dans les radeaux lipidiques) retardait l'apparition des symptômes (Deng and Tsokos, 2008).

L'une des premières observations faite sur le phénotype des LT en contexte lupique était la **diminution de production d'IL-2**. Alors que l'IL-2 est indispensable pour le développement et la survie des LTreg, cette cytokine inhibe la différenciation des LT CD4⁺ en LTh17. La population des LTregs, importante pour la tolérance B périphérique ainsi que pour la régulation de l'activation et la différenciation des LT CD4⁺ et LT CD8⁺, est retrouvée en proportion réduite au cours du LES (Humrich *et al.*, 2010). Au contraire, un pourcentage plus haut de LTh17 (Yang *et al.*, 2009) et une augmentation de la quantité d'IL-17 (Crispin *et al.*, 2008) sont retrouvés dans le sang de patients lupiques comparé à des personnes saines et corrèlerait avec l'activité de la maladie (Figure 28). La production de l'IL-2 par les LT est contrôlée au niveau transcriptionnel par différents facteurs incluant CREB, CREM α , AP-1 ou encore NFAT. L'équilibre entre CREB qui induit la transcription du gène codant pour l'IL-2, et CREM α qui la réprime, est altérée au cours du lupus en faveur de CREM α , donc en défaveur de la production d'IL-2 (Solomou *et al.*, 2001). La **diminution du nombre de LTregs** au cours du LES peut aussi s'expliquer par une hyperactivation de la voie mTOR suite au stress oxydatif induit dans les LT (Perl, 2013). En effet, l'activation de la voie mTOR aboutit à une diminution d'activité de la DNA méthyltransférase 1 (DNMT1). Cette enzyme, responsable de la méthylation de gènes cibles, est incapable de méthyler correctement le promoteur du gène *Foxp3* et indirectement empêche la transcription du gène, notamment indispensable à la différenciation d'une catégorie de LTreg.

Enfin, la population des LT_{FH} (CD4⁺CXCR5⁺) est retrouvée augmentée dans la circulation sanguine de certains patients lupiques serait corrélée avec la diversité des autoanticorps présents et avec la sévérité des manifestations cliniques (*Simpson et al., 2010*).

Ainsi, l'hyperactivation des LT effecteurs et la diminution des LTregs contribuent notamment à la pathologie du lupus.

B4.2.2 LES LYMPHOCYTES B

Les **LB**, en duo avec les LT, ont un **rôle central dans la pathogénèse du lupus**. Ces cellules sont non seulement **les cellules productrices d'anticorps et d'autoanticorps**, mais participent aussi à l'inflammation par leur capacité à **produire des cytokines** et à **stimuler les LT** via la présentation antigénique (**Figure 28**). Etant donné que les LB ont fait l'objet de mon projet de thèse, je consacrerai la partie **B5** à leur rôle dans la pathologie lupique.

B5. LES LYMPHOCYTES B, ACTEURS CENTRAUX DE LA MALADIE LUPIQUE

B5.1 MISE EN ÉVIDENCE DU RÔLE DES LYMPHOCYTES B DANS LE LUPUS PAR L'ÉTUDE DE MODÈLES MURINS

Les chercheurs ont montré depuis longtemps que les LB portent des **défauts intrinsèques** au cours du lupus.

Tout d'abord, plusieurs études conduites par Steinberg et *al.* dès les années 1980, ont montré que l'autoimmunité observée chez les modèles murins lupiques (NZBxNZW)F1 et MRL^{lpr/lpr} était notamment due à des **défauts portés par les LB**. En effet, la déplétion de la majorité des LB par la mutation *xid*, consistant en l'inactivation de la kinase Btk, essentielle pour le développement et l'activation des LB, induit chez ces deux modèles lupiques une atténuation de la maladie, qui se traduit par une diminution du taux d'autoanticorps dans le sérum et le développement d'une GN beaucoup moins sévère (*Steinberg et al., 1982, Steinberg et al., 1983*). Ce même résultat a été retrouvé chez la souris (NZBxNZW)F1 plus récemment, en utilisant un inhibiteur spécifique de la Btk, le RN486 (*Mina-Osorio et al., 2013*). Une autre étude, effectuée en 1989, montre que l'administration d'anticorps anti-IgM à des souris B6^{lpr/lpr}, dès la naissance, réduit le nombre de LB, mais aussi la quantité d'autoanticorps produite (*Cerny et al., 1989*). Enfin, en 1992, Reininger et *al.*, montrent que **les défauts des LB au cours du lupus pourraient être intrinsèques** car le transfert de cellules pré-B foetales de souris (NZBxNZW)F1 dans des souris SCID, dépourvues de LT et LB, induit le développement de quelques traits autoimmuns caractéristiques de la souris (NZBxNZW)F1 adulte et malade. Cela inclut la production de titres élevés d'autoanticorps anti-nucléaires de type IgG, et le développement d'une protéinurie (*Reininger et al., 1992*). Ces études mettent en avant la **fonction**

sécrétrice d'anticorps des LB au cours de la pathologie. Néanmoins, les LB possèdent aussi des fonctions indépendantes de la sécrétion d'anticorps, qui participent tout autant à la maladie.

En effet, les LB sont d'importantes **cellules présentatrices d'antigènes** et **productrices de cytokines après activation**. Elles sont donc, en partie, essentielles à l'activation et à la différenciation des LT. Dans un contexte lupique, il a été montré que la déficience en LB, par la délétion du locus J de la chaîne lourde, empêchant ainsi l'assemblage du BCR et le développement des LB, dans des souris $MRL^{lpr/lpr}$, conduisait à un nombre réduit de LT activés et mémoires, $CD4^+$ et $CD8^+$ (*Chan and Shlomchik, 1998*). Ce phénotype est retrouvé chez la (NZBxNZW)F1 porteuse d'un transgène pour une chaîne lourde lui conférant un répertoire très limité de LB. Ce modèle présente une durée de vie supérieure aux souris (NZBxNZW)F1 sauvages et l'activation des LT, qui normalement corrobore avec l'activité de la maladie chez la souris (NZBxNZW)F1 sauvage, est largement diminuée (*Wellmann et al., 2001*). D'autre part, en 1999, Shlomchik *et al.* publie une étude sur un nouveau modèle murin dans lequel les LB sont bien présents, mais expriment un transgène codant pour une Ig capable d'être présentée à la membrane mais incapable d'être sécrétée. Ce modèle, produit sur le fond $MRL^{lpr/lpr}$, développe tout de même une GN, indiquant ainsi que les LB ont le pouvoir d'exercer un rôle pathogénique indépendamment de leur fonction sécrétrice d'anticorps. En effet, ces LB, en partie fonctionnels, participent à la maladie **en présentant l'autoantigène aux LT** et/ou **contribuant directement à l'inflammation** locale par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires lorsqu'elles sont activées (*Chan et al., 1999*).

B5.2 LES LYMPHOCYTES B PRÉSENTENT UN PHÉNOTYPE HYPERACTIVÉ AU COURS DU LUPUS

Au cours du lupus, les LB, bien que souvent présents en nombre réduit, présentent un **phénotype hyperactivé**, notamment causé par des altérations dans certaines de leurs voies de signalisation. Tout d'abord, les LB de patients lupiques présentent une augmentation de la phosphorylation globale des tyrosines et une augmentation du flux calcique après stimulation du BCR, comparé à des sujets sains (*Liossis et al., 1996, Taher et al., 2010*). La voie du BCR peut être hyperactivée suite à diverses anomalies incluant un défaut d'expression des récepteurs inhibiteurs (ex : $Fc\gamma RIIb$, $CD22$), ou de la kinase inhibitrice Lyn ou de la phosphatase SHP1, ou encore une surexpression des molécules activatrices comme $CD19$ (*Kil and Hendriks, 2013*). Ces anomalies sont notamment dues à des altérations géniques qui seront décrites en **partie B7.3.4.3.1**. En soi, l'activation seule du BCR est suffisante pour rompre la tolérance de LB autoréactifs. Mais d'après le modèle de Bretscher et Cohn, 2 signaux additionnels (signal de costimulation et cytokines) sont indispensables à l'activation complète de la cellule B lors d'une activation T-indépendante. Les récepteurs de l'immunité innée, tels que les TLR endosomaux dont l'expression est retrouvée

aberrante au cours du lupus (Celhar *et al.*, 2012), peuvent substituer ces deux signaux. En effet, **l'engagement simultané des voies BCR et TLR** par des complexes immuns ou des autoantigènes peut parfaire l'activation du LB autoréactif. Par exemple, un LB possédant un récepteur autoréactif de type IgM spécifique pour le Fc des IgG (Facteur Rhumatoïde, FR), peut reconnaître les complexes immuns circulants, comme par exemple un complexe IgG anti-ADNdb/ADNdb. Après internalisation du complexe FR/IgG/ADNdb, la cellule peut activer de surcroît la voie du TLR9 endosomal spécifique de l'ADN, lorsque l'endosome contenant le complexe FR/IgG/ADNdb fusionne avec le compartiment endosomal TLR9⁺. L'activation simultanée des voies BCR et TLR entraîne une hyperactivation de la cellule B, une production d'IFN-I et une production d'autoanticorps, maintenant le contexte inflammatoire (**Figure 29**) (Leadbetter *et al.*, 2002).

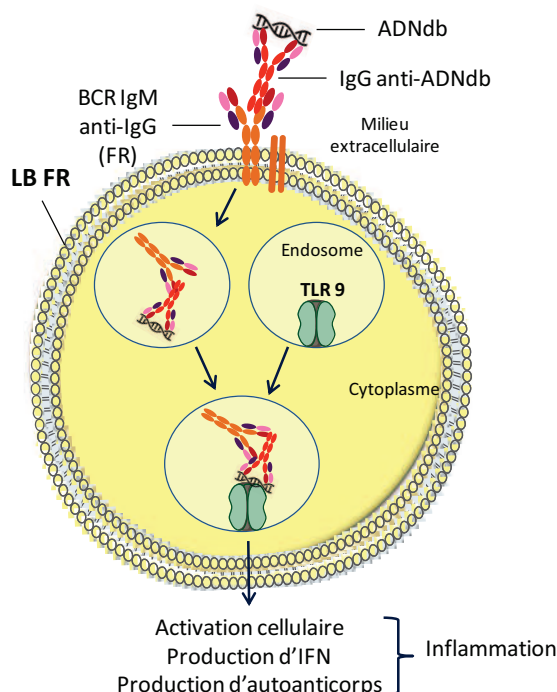


Figure 29 : Schéma de la co-activation des voies BCR et TLR9 dans les cellules B autoréactives exprimant un BCR de type FR.

Adapté de (Green and Marshak-Rothstein, 2011).

Comme toutes cellules présentatrices d'antigène, les LB sont capables d'activer et de participer à la différenciation des LT. Ainsi, leur phénotype hyperactivé ne peut qu'amplifier cette activation, notamment concernant la population des LT_{FH} qui nécessitent un signal B pour pleinement se différencier.

B5.3 LES LYMPHOCYTES B, SOURCES DE LA PRODUCTION D'AUTOANTICORPS

B5.3.1 DE LA PRODUCTION D'AUTOANTICORPS NATURELS...

B5.3.1.1 NOUS NAISSONS TOUS AVEC DES AUTOANTICORPS NATURELS

Des autoanticorps de classe IgM sont fréquemment retrouvés chez les sujets sains et cela dès la naissance (*Meffre and Salmon, 2007, Merbl et al., 2007*). Ces autoanticorps « physiologiques » sont appelés **autoanticorps naturels** puisqu'ils apparaissent spontanément, sans stimulus exogène et ont même été retrouvés chez des souris axéniques (*Haury et al., 1997*). Chez la souris, les cellules B responsables de la production de ces autoanticorps sont **les cellules B1**, retrouvées majoritairement dans les cavités péritonéales et pleurales. Ces cellules exprimeraient un répertoire particulier d'anticorps avec des associations chaîne lourde/chaîne légère préférentielles, incluant notamment des segments V_H souvent associés à une autoréactivité, comme par exemple le V_H11Vk9 contre la phosphatidylcholine (*Rowley et al., 2007*). Chez l'Homme, cette population a aussi été identifiée et serait également capable de sécréter des IgM spontanément (*Griffin et al., 2011*).

Les autoanticorps naturels comportent donc principalement des anticorps de classe IgM, mais aussi de classe IgA. Ces deux types d'Ig sont d'ailleurs retrouvés aussi bien dans le SI adulte que dans le cordon ombilical des nouveaux nés (*Griffin et al., 2011, Rogosch et al., 2012*). Cela suggère que ces anticorps naturels participent à notre **première ligne de défense** contre l'extérieur au cours de la vie, mais aussi que la présence d'autoanticorps doit être nécessaire à d'autres fonctions physiologiques essentielles.

B5.3.1.2 LES AUTOANTICORPS NATURELS : DES IGM AUTORÉACTIVES AU RÔLE PROTECTEUR

Chez un homme adulte sain, des centaines de milliards de cellules meurent chaque jour par apoptose du fait d'une sénescence naturelle, de dommages induits à la cellule ou simplement pour maintenir l'homéostasie cellulaire. Ces corps apoptotiques doivent ensuite être éliminés rapidement par les phagocytes pour éviter une quelconque réaction inflammatoire. Des études ont montré que, de façon surprenante, une grande fraction des autoanticorps naturels de type IgM présents chez le nouveau-né sont réactifs pour certains composants comme la PCh exposée par les cellules apoptotiques, ou le malondialdéhyde associé au stress oxydatif (*Chou et al., 2009*). La liaison de l'anticorps à ce type de composants va engendrer le recrutement de facteurs du complément comme la MBL (Mannose Binding Lectin) et le facteur C1q. Ces recrutements vont **accélérer l'efférocytose** (correspondant à l'élimination des cellules mortes par les phagocytes) en favorisant la synapse entre le phagocyte et la cellule mourante (*Chen et al., 2009*). Ainsi, **ces autoanticorps naturels favorisent l'élimination des corps apoptotiques.**

En effet, que ce soit chez l'Homme ou la souris, des études ont montré que **les autoanticorps naturels de type IgM peuvent prévenir du développement d'une autoimmunité ou de maladie inflammatoire** (*Gronwall and Silverman, 2014*). Par exemple, des souris de fond B6 délétées pour la partie sécrétoire des IgM, donc incapables de sécréter des IgM, seraient plus prédisposées à développer une autoimmunité. Comparées aux souris B6 contrôles, ces souris génétiquement modifiées sont caractérisées par une plus grande quantité d'autoanticorps anti-ADNdb de type IgG au niveau basal (à l'âge de 12 mois) et après injection de LPS (à l'âge de 3 mois). La quantité d'autoanticorps anti-ADNdb est corrélée avec le dépôt d'IgG et de la protéine C3 du complément au niveau des reins (*Ehrenstein et al., 2000*).

De plus, ces autoanticorps naturels de type IgM spécifiques pour des autoantigènes peuvent aussi **reconnaître des molécules homologues produites par des microbes**. Par exemple, une étude de 2012 montre que des autoanticorps naturels de type IgM, spécifiques du malondialdéhyde, sont aussi capables de reconnaître des épitopes de la bactérie *Porphyromonas gingivalis*, bactérie Gram-négative responsable de parodontites (*Turunen et al., 2012*) et pourrait ainsi faciliter son élimination.

Les FR sont des autoanticorps reconnaissant la partie Fc des IgG et sont le plus fréquemment d'isotype IgM (FR-IgM) et de façon plus rare d'isotype IgG ou IgA (FR-IgG, FR-IgA). Ils ont été nommés ainsi car peu après leur identification en 1940 par Waaler, ils ont été associés à la polyarthrite rhumatoïde puisque la majorité des patients atteints par cette maladie étaient positifs pour les FR (*Nowak and Newkirk, 2005*). Alors que les FR-IgG et FR-IgA, de haute affinité, peuvent avoir un effet délétère pour l'organisme, **les FR-IgM**, naturels, de faible affinité et retrouvés chez l'individu sain (dans 1 à 3% de la population caucasienne) semblent avoir des **propriétés protectrices**. En effet, les LB FR-IgM⁺ sont capables de reconnaître des complexes immuns circulant, formés par un antigène fixé à une IgG spécifique. Rappelons que les LB sont d'efficaces cellules présentatrices d'antigènes. Ainsi, les LB FR-IgM⁺, après reconnaissance du complexe immunitaire, peuvent l'internaliser et ainsi activer les LT spécifiques de l'antigène via la présentation d'un peptide antigénique (*Roosnek and Lanzavecchia, 1991*). De plus, les FR-IgM sécrétés réagissent très peu avec les IgG non-complexées mais se lient beaucoup plus à une IgG complexée à une surface solide, comme par exemple à une paroi bactérienne. La fixation du FR-IgM sécrété sur un complexe immunitaire déjà pré-formé permet une amplification du signal et ainsi une meilleure clairance du complexe (*Hogben and Devey, 1986*). Ce rôle est principalement important pour les FR reconnaissant les sous-classes d'IgG qui ne fixent pas le complément (IgG4 humaines) ou peu les récepteurs Fc (IgG2 et IgG4 humaines).

B5.3.1.3 AUTOANTICORPS NATURELS DE CLASSE IGG

Le terme « naturel » a aussi été parfois appliqué aux IgG, lorsque l'on a pu retrouver des autoanticorps de type IgG ou des LB autoréactifs IgG⁺ chez des personnes ne présentant pas d'autoimmunité. Ainsi, en 2007, le groupe de Wardemann a évalué le répertoire des cellules mémoires IgG⁺ de 3 personnes saines. De façon surprenante, une portion importante de ces cellules mémoires (environ 10%) réagit contre des autoantigènes nucléaires (*Tiller et al., 2007*). Une étude plus récente, réalisée sur 166 personnes (comprenant des personnes saines et des personnes malades (maladie d'Alzheimer ou de Parkinson, sclérose en plaque et cancer du sein)) à l'aide d'une technique de « protein microarray », montre que tous ces individus présentent des autoanticorps d'isotype IgG dans leur sérum, ciblant des protéines impliquées dans le métabolisme ou la transduction du signal, par exemple. La composition de ces autoanticorps dépendrait de l'âge, du sexe et de l'état de santé de la personne (*Nagele et al., 2013*).

B5.3.2 VERS LA PRODUCTION D'AUTOANTICORPS PATHOLOGIQUES : NOTION DE RUPTURE DE TOLÉRANCE

Comme nous l'avons vu dans la **partie A**, les processus de tolérance B, permettant l'élimination des cellules autoréactives de forte affinité, sont nombreux et répartis tout au long du développement B. Ceci présente l'avantage de limiter la survie et la maturation de ces cellules dangereuses, mais cela signifie aussi qu'un dysfonctionnement dans l'un de ces processus peut engendrer **une rupture de la tolérance B au niveau central ou périphérique**.

Ainsi, les patients lupiques (comme les patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde) présentent des LB autoréactifs appartenant au compartiment des cellules transitionnelles (qui sortent de la MO) en nombre plus important que des sujets sains, comme le montre la **figure 30** (*Meffre and Wardemann, 2008*). Ceci indique des **défauts de tolérance au niveau central**. Des **défauts de tolérance périphériques** sont également retrouvés puisque la proportion de LB matures naïfs polyréactifs ou réagissant contre des antigènes nucléaires sont d'autant plus présents dans les deux groupes de patients, comparé aux contrôles sains. Les facteurs responsables de cette rupture de tolérance peuvent être intrinsèques à l'individu, comme nous allons le voir au cours de cette partie, et/ou issus de l'environnement extérieur, point qui sera abordé en **partie B7.1**.

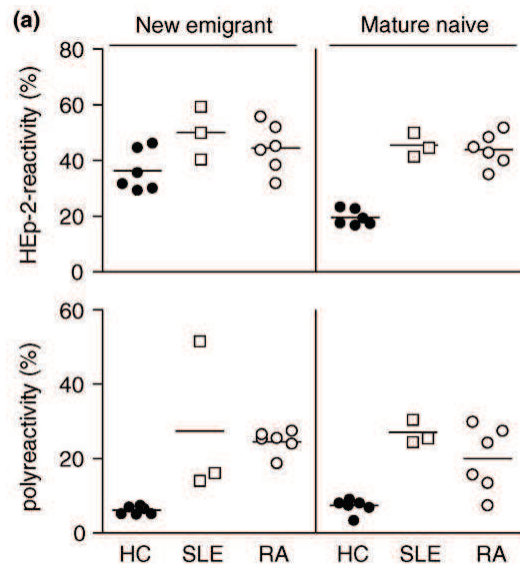


Figure 30 : Des lymphocytes B auto- et poly-réactifs sont présents parmi les cellules B transitionnelles (new emigrant) et matures naïves chez les patients souffrant d'autoimmunité.

La technique par les cellules HEp2 permet d'identifier des anticorps anti-nucléaires. HC : Contrôle sain ; SLE : Lupus systémique érythémateux ; RA : Polyarthrite Rhumatoïde. (Meffre and Wardemann, 2008).

B5.3.2.1 ATTEINTE DES PROCESSUS CENTRAUX DE TOLÉRANCE

B5.3.2.1.1 DÉFAUTS DE SIGNALISATION DU BCR

Comparé aux contrôles sains, les patients lupiques possèdent des LB autoréactifs au sein du compartiment des cellules transitionnelles (nouvelles émigrantes) (**Figure 30**) dénotant un défaut de tolérance centrale.

La **signalisation du BCR est essentielle** pour la détection des LB immatures autoréactifs et pour la décision de leur devenir : délétion par apoptose, édition du récepteur, anergie. Des défauts de signalisation de cette voie peuvent mener au développement d'une autoimmunité. En effet, des symptômes autoimmuns sont souvent développés par des personnes atteintes de déficits immunitaires. Prenons l'exemple de patients atteints de la maladie de Bruton (d'agammaglobulinémie liée à l'X). Ces patients sont déficients pour la protéine kinase Btk et souffrent d'une profonde lymphopénie B, puisque les LB restent bloqués au stade de différenciation pré-B. Néanmoins, quelques LB réussissent à se développer et à migrer en périphérie et comparé à des personnes saines, le répertoire B périphérique de ces patients est largement enrichi en récepteurs autoréactifs (Ng *et al.*, 2004). Il semblerait que le contact entre l'antigène du soi avec le récepteur autoréactif puisse compenser l'absence de la kinase Btk, et favoriser la survie de ces cellules autoréactives. Un deuxième exemple concerne la protéine tyrosine kinase Lyp, codée par le gène *PTPN22* qui a un rôle de régulateur négatif dans la signalisation de la voie du BCR. Le

polymorphisme R620W de ce gène est associé à une diminution de la signalisation du BCR ainsi qu'à l'émergence de cellules B nouvelles émigrantes et mature naïves à caractère autoréactif. Ce polymorphisme a d'ailleurs été associé à plusieurs MAI dont le lupus (*Kyogoku et al., 2004*).

B5.3.2.1.2 DÉFAUT DE L'ÉDITION DU RÉCEPTEUR

Il a été montré, dans le cas du LES, que certains BCR ne subissent pas de second réarrangement des gènes VDJ suggérant un **défaut de l'édition du récepteur**. En effet, le premier réarrangement peut engendrer environ 50% de BCR autoréactifs donc quasiment autant de cellules qui subissent une édition de leur récepteur. Or, certains patients lupiques présentent un nombre réduit de LB possédant un BCR édité, c'est à dire constitué de segments V situés en amont et de segments J en aval de ceux utilisés lors du premier réarrangement (*Bensimon et al., 1994, Suzuki et al., 1996*). D'autre part, une autre étude a montré en 2008, dans le modèle murin lupique MRL^{lpr/lpr}, un défaut de réarrangement secondaire des chaînes légères, en quantifiant le segment RS (recombining sequence) (appelé KDE chez l'homme pour « k deleting element ») situé sur le locus *k* (*Panigrahi et al., 2008*). La quantification de ce segment permet d'évaluer le niveau d'édition des chaînes légères. Dans le cadre de la même étude, le défaut de réarrangement des chaînes légères a aussi été démontré chez des patients lupiques.

B5.3.2.2 ATTEINTES DES PROCESSUS PÉRIPHÉRIQUES DE TOLÉRANCE

Nous avons cité au cours de la **partie A** que les LT jouaient un rôle important dans l'élimination des LB autoréactifs en périphérie via leurs interactions CMHII/TCR ; CD40/CD40L ou encore Fas/FasL. L'étude de patients déficients pour le CMHII ou le CD40L ont permis de mettre en évidence que ces protéines ne sont pas nécessaires à la tolérance centrale, puisque la réactivité des cellules B transitionnelles est identique à celle observée chez des personnes saines (*Herve et al., 2007*). Par contre, la proportion de LB autoréactifs correspondant au compartiment des LB matures naïfs est plus importante chez ces patients. Ces protéines sont donc essentielles au maintien de la tolérance en périphérie. De plus, chez ces mêmes patients, **un nombre réduit de LTreg** est retrouvé en périphérie, comparé aux contrôles. Cette population cellulaire, importante pour la tolérance B et T périphérique, est aussi retrouvée diminuée chez les patients atteints de LES (*Crispin et al., 2003*).

Ainsi, une rupture de tolérance B centrale ou périphérique initie l'échappement des cellules B autoréactives et peut amorcer le développement d'une autoimmunité de type lupique, comprenant une hyperactivation cellulaire menant à la production d'autoanticorps et finalement, aux dommages d'organes.

B5.3.3 LES AUTOANTICORPS AU COURS DE LA MALADIE LUPIQUE

B5.3.3.1 TYPES D'AUTOANTICORPS RETROUVÉS CHEZ LES PATIENTS LUPIQUES

Dans la liste des critères de classification établie par l'ACR, apparaissent les items suivants : « niveaux anormaux d'anticorps anti-ADN, anti-Sm, anti-phospholipides ou d'anticorps anti-nucléaires ». **Les anticorps anti-ADNdb sont les plus caractéristiques de la maladie** puisqu'ils sont retrouvés dans 70 à 80% des cas de lupus mais sont présents dans moins de 0.5% pour l'ensemble des autres MAI. Contrairement à la plupart des autres MAI, le lupus implique de nombreux autoantigènes. Bien que certains soient retrouvés de manière très fréquente (**Tableau 5**), certains ne sont toujours pas identifiés. Ainsi, une étude bibliographique très récente s'est intéressée à la recherche de tous les articles scientifiques publiés, pouvant décrire des autoanticorps trouvés au cours du LES. Cette recherche a recensé plus de 12 000 articles, tous publiés entre 1960 et 2011 en anglais. Le but de cette étude a été de décrire **l'immense variété d'autoanticorps retrouvés au cours de la maladie**, les propriétés des autoantigènes associés, la prévalence de chaque autoanticorps et de déterminer si leur présence ou leur titre corrobore avec la sévérité de la maladie (*Yaniv et al., 2015*). Ceci a permis l'identification de 180 autoanticorps dont environ 25 semblent corrélés avec l'activité de la maladie et 4 corrélés à l'inverse avec l'activité de la maladie (**Tableau 6**). Une centaine de ces autoanticorps semble être associée à certaines atteintes spécifiques d'organes (ex : anticorps anti-Vitamine D lors d'atteintes cutanées ; anticorps anti-thromboplastine lors de thrombose).

Autoantigène	Prévalence (%)	Principales atteintes cliniques
ADNdb*	70-80	Rénale et cutanée
Nucléosomes*	60-90	Rénale et cutanée
Ro*	30-40	Rénale, cutanée, cardiaque
La*	15-20	Cardiaque
Sm*	10-30	Rénale
Récepteur NMDA*	33-50	Neurologique
Phospholipides*	20-30	Thrombose, fausse couche
Actinine α*	20	Rénale
C1q*	40-50	Rénale
Globule rouge	-	Anémie hémolytique
Plaquettes (GpIIb/IIIa)	-	Thrombopénie auto-immune

Tableau 5 : Tableau représentant les principaux autoanticorps au cours du LES, leur prévalence et leur rôle pathologique.

Les données concernant ces autoantigènes proviennent au minimum d'une étude clinique associée à une étude conduite sur les tissus de patients lupiques ou une étude sur un modèle animal. *NMDA* : *N-methyl-D-aspartate*. Adapté de (*Rahman et al., 2008*)

Association with disease activity	Inverse association with disease activity
Adenosine deaminase	Tumor necrosis factor
Alpha actinin	Anti-idiotypes
Alpha 1,6 glucan	La (SS-B)
Apolipoprotein A1	Prolactin
Beta-2-microglobulin	
C1 inhibitor	
C1Q	
Collagen-like region of C1Q	
dsDNA	
Endothelial cells	
Entactin	
HMG17	
Histones hnRNP-heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles	
Idiotypes	
JA	
Ki	
Laminins	
N-homocysteinylated albumin	
Nucleosides/nucleotides	
Nucleosomes	
Poly (ADP-ribose) polymerase	
Proteasome 20S	
Serum amyloid component P	
Z-DNA	

Tableau 6 : Liste des autoanticorps corrélés avec l'activité de la maladie.

Adapté de (*Yaniv et al., 2015*).

B5.3.3.2 LES AUTOANTICORPS SONT PRÉSENTS AVANT LE DÉCLENCHEMENT DE LA MALADIE

Arbuckle *et al.*, ont montré que sur une cohorte de 130 patients lupiques, 115 d'entre eux (88%) présentaient **au moins un type d'autoanticorps, en moyenne 3 ans et demi avant le diagnostic de la maladie** (Arbuckle *et al.*, 2003). Des autoanticorps anti-nucléaires étaient présents dans 78% des cas, des anti-ADNdb dans 55% des cas et des anticorps anti-Ro dans 47% des cas. De manière globale, dans le cas de cette étude, 6 ans avant le diagnostic de la maladie, les patients lupiques présentaient environ 1.5 types d'autoanticorps sur les 7 étudiés (anti-nucléaire, anti-Ro, anti-La, anti-phospholipides, anti-ADNdb, anti-Sm et anti-ribonucléoprotéine). Ce nombre s'élève à 2.6 lors des premiers symptômes et à 3.0 lors du diagnostic. Bien que certains de ces autoanticorps soient assez communs puisqu'ils sont retrouvés dans le sérum des personnes saines, les autoanticorps les plus fréquents au cours du LES tels que les anti-ADNdb, anti-Sm et anti-ribonucléoprotéine sont très rares dans la population normale (**Figure 31**). Ainsi, cette étude révèle qu'il existe une période de temps importante entre la rupture de tolérance lymphocytaire et l'apparition des symptômes, dont la longueur dépend de facteurs propres à l'individu et sans doute des facteurs environnementaux qui l'entourent.

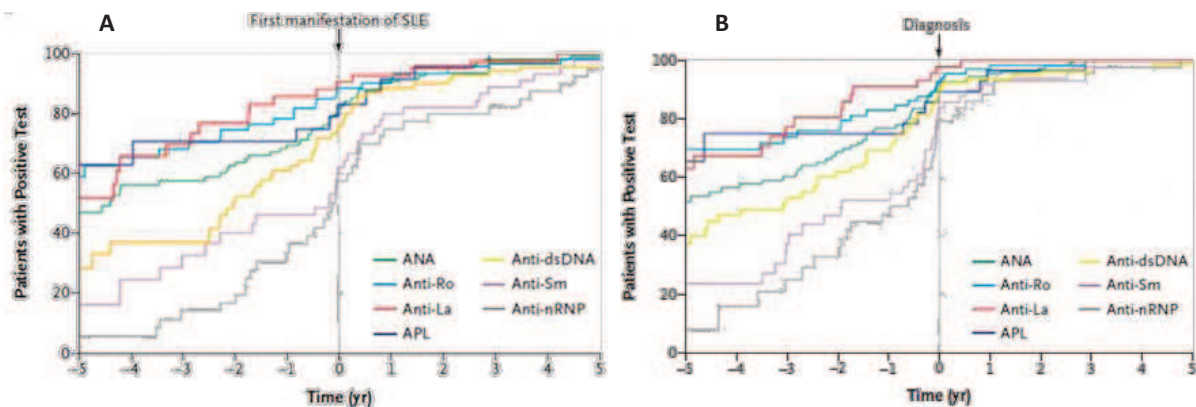


Figure 31 : Des autoanticorps sont présents bien avant le déclenchement de la maladie lupique.

Représentation graphique de la proportion des patients lupiques positifs pour différents autoanticorps en fonction du temps correspondant à l'apparition des premiers symptômes ou à la pose du diagnostic du LES. Graphiques représentant le pourcentage de sérum de patients positifs pour plusieurs autoanticorps (ANA : anti-nucléaire, anti-Ro, anti-La : anti-laminine, APL : anti-phospholipides, anti-dsDNA : anti-ADNdb, anti-Sm : anti-protéine Smith, anti-nRNP : anti-nuclear ribonucleoprotein) en fonction du temps (exprimé en années) avant ou après les premiers signes cliniques (A) ou le diagnostic (B). (Arbuckle *et al.*, 2003).

B5.3.4 LA FORMATION DE COMPLEXES IMMUNS MÈNE AUX DOMMAGES TISSULAIRES : EXEMPLE DE LA NÉPHRITE LUPIQUE

Les autoanticorps sécrétés sont retrouvés dans la circulation sanguine et forment des **complexes immuns** en s'associant avec leur autoantigène cible. Les complexes immuns ont un rôle central dans les dommages tissulaires observés au cours du lupus, comme par exemple au niveau des reins. L'inflammation des reins au cours du lupus, nommée « **néphrite lupique** », concerne 40 à 50% des patients et mène à une détérioration de l'organe, traduite par une protéinurie (présence de protéines dans l'urine) et dans certains cas, conduit à une insuffisance rénale. Trois théories ont émergé quant aux mécanismes du dépôt de ces complexes immuns au niveau des reins (**Figure 32**) :

- 1)** certains autoanticorps peuvent se fixer directement au niveau des antigènes glomérulaires, (comme par exemple à l' α -actinine, essentielle à la fonction des podocytes rénaux) ;
- 2)** les autoanticorps se fixent à leur autoantigène, lui-même complexé à des antigènes glomérulaires ;
- 3)** les complexes immuns sont préalablement formés dans la circulation et se déposent au niveau du glomérule rénal (*Shlomchik and Madaio, 2003, Ronco and Debiec, 2012, Yap and Lai, 2015*). La présence de complexes immuns active ensuite : 1) les cellules inflammatoires via l'interaction Fc-FcR (des cellules phagocytaires, par exemple) ; 2) la voie classique du complément, via la reconnaissance du fragment Fc de l'autoanticorps par le complexe C1. Cette voie du complément facilite l'opsonisation du complexe immun par les cellules phagocytaires, d'une part, et permet le recrutement accru de cellules inflammatoires tels que les polynucléaires neutrophiles, éosinophiles, les monocytes ou encore les LT, d'autre part. Cet environnement inflammatoire créé au niveau de l'organe active le relargage de ROS et de cytokines pro-inflammatoires par les phagocytes et participe majoritairement aux dommages tissulaires (*Sterner et al., 2014*).

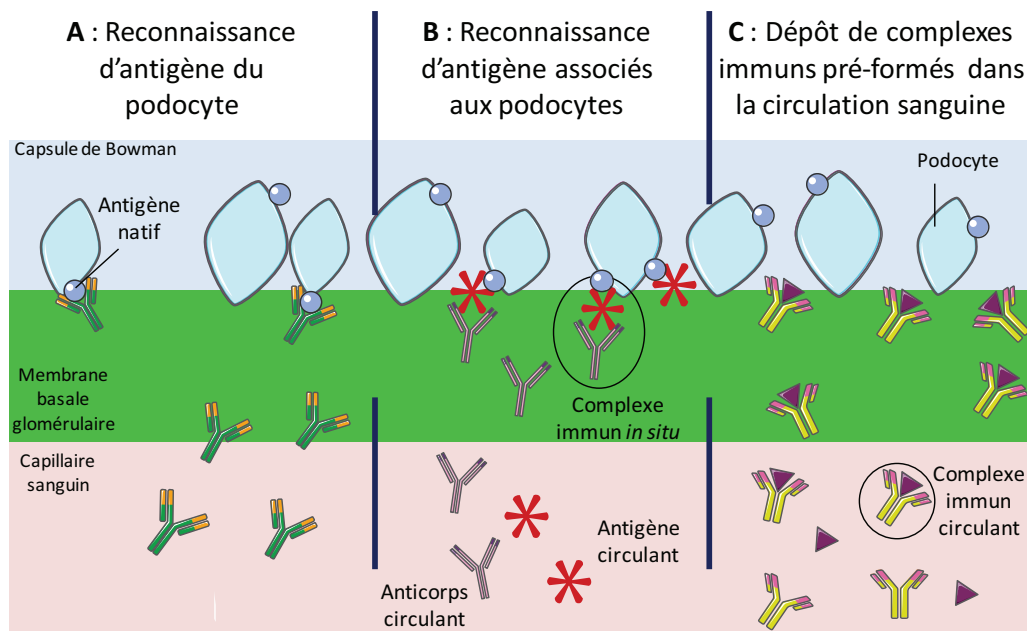


Figure 32 : Illustration des 3 modes de constitution des dépôts de complexes immuns au niveau des glomérules rénaux.

(A) Des autoanticorps circulants traversent la membrane basale glomérulaire et reconnaissent un antigène présent sur la membrane plasmique des podocytes ; (B) Le complexe immun se forme in situ lorsqu'un autoanticorps circulant reconnaît son autoantigène, lui-même associé à un antigène podocytaire ; (C) Les complexes immuns solubles sont formés dans la circulation sanguine et migrent jusqu'aux glomérules rénaux. Adapté de (Ronco and Debiec, 2012).

B5.4 RÉPARTITION ANORMALE DES SOUS-POPULATIONS B AU COURS DU LUPUS

Au cours de la maladie lupique, le compartiment B est réduit de manière globale, et présente également des anomalies dans la répartition des sous-populations B. Les principales anomalies sont présentées dans cette partie.

B5.4.1 LES CELLULES B MZ

C'est majoritairement chez la souris que les études sur les **LB MZ dans le lupus** ont été conduites. **Ce compartiment est décrit comme très étendu** dans certains modèles murins comme le modèle lupique (NZBxNZW)F1 (Schuster et al., 2002) (20% contre 7% chez les BALB/c), la souris congénique B6.NZBc13 (de fond B6, possédant une partie du chromosome 13 de la NZB, impliqué dans le développement de traits autoimmuns) (14% contre 8% chez la souris contrôle) (Wither et al., 2005) ou un modèle induit de lupus (par l'administration d'oestrogènes à des souris BALB/c transgéniques exprimant une chaîne lourde spécifique de l'ADNdb) (20% contre 8% chez les contrôles) (Grimaldi et al., 2001). Ces cellules seraient d'ailleurs largement impliquées dans la production d'autoanticorps d'isotype IgM. Néanmoins, cette expansion n'est pas généralisée puisque par exemple, le modèle BSXB démontre un nombre réduit de LB MZ (Amano et al., 2003). De plus,

l'expansion des cellules MZ retrouvée chez le modèle (NZBxNZW)F1 n'est pas directement liée aux dommages tissulaires (Schuster *et al.*, 2002).

B5.4.2 LES CELLULES B1

La population **B1**, caractérisée par sa capacité à produire des autoanticorps naturels, est retrouvée en abondance dans la cavité péritonéale des souris NZM2410 (modèle murin lupique dérivé des (NZBxNZW)F1) (représente 64% des cellules B220⁺ chez la souris NZM2410 contre 34% chez la souris B6) à 6 mois (Mohan *et al.*, 1998). Leur délétion par un choc hypotonique réalisé par une injection intrapéritonéale d'eau distillée hebdomadaire (de 100µL à l'âge de 2 semaines à 2mL à 2 mois), dans le modèle (NZBxNZW)F1, résulterait en une atténuation de la maladie (Murakami *et al.*, 1995). Chez les patients lupiques, une expansion d'une sous-population B1 exprimant le marqueur CD11b a été retrouvée dans une étude (31.5% contre 13.5% pour les contrôles). Ces cellules B1 présentent un profil activé (augmentation de l'expression de CD86) et une sous-population des B1 induirait notamment la prolifération des LT CD4⁺ lors d'expériences de co-culture entre les deux types cellulaires (Griffin and Rothstein, 2011). Cependant, le rôle des B1 au cours de la pathologie lupique n'est pas encore clair.

B5.4.3 LES CELLULES B MÉMOIRES

Il a été montré que le **compartiment B mémoires** (CD19⁺CD27⁺) des patients lupiques en phase active et inactive représente un pourcentage plus grand de la population B totale (environ 50%), comparé à celui de personnes saines (environ 30%), bien que le nombre absolu soit de loin inférieur à la normale (environ 2 fois moins) (Odendahl *et al.*, 2000). Cette proportion plus élevée de cellules B mémoires serait dû à une réduction du compartiment naïf et non pas à une expansion des LB mémoires. Une autre étude, plus récente, confirme l'augmentation du compartiment mémoire CD27⁺ et repèrent également une augmentation d'une population CD27⁻ IgD⁻ CD95⁺, considérées comme une population de cellules B mémoires, chez les patients lupiques comparé aux contrôles. L'expansion de ces cellules corrèlerait avec l'augmentation du score SLEDAI (Jacobi *et al.*, 2008).

B5.4.4 LES CELLULES SÉCRÉTRICES D'ANTICORPS

Le nombre d'**ASC** est retrouvé augmenté chez les patients lupiques en phase d'activité. **Cette expansion est proportionnelle à l'activité de la maladie** (évaluée par le score SLEDAI) et aux titres sériques de certains autoanticorps (anti-ADNdb, anti-Ro, anti-Sm, anti-La, anti-histone). Cette proportion d'ASC ne serait ni dépendante de l'âge ni du sexe des patients mais plutôt de la durée et de la sévérité des phases d'activité, ainsi que du traitement administré (Jacobi *et al.*, 2003). **Un nombre élevé d'ASC est corrélé à un SLEDAI élevé (>8)**. Parallèlement à ces résultats, une étude faite en 2013 sur l'ARNm de PBMC de patients lupiques et de personnes saines, a permis de mesurer

l'expression du facteur *Blimp1*, nécessaire à la différenciation plasmocytaire. Les résultats démontrent une expression 2,3 fois plus élevée chez des patients très actifs (SLEDAI>8), comparés aux contrôles. De plus, cette expression est corrélée à l'activité de la maladie et au titre d'anticorps anti-nucléaires (Luo et al., 2013).

B5.4.5 LES CELLULES BREG

Xiao et al., ont étudié le rôle des **LBregs** en 2012, en croisant le modèle $B6^{lpr/lpr}$ et le modèle murin déficient pour *Tim1* (gène codant pour une glycoprotéine transmembranaire), caractérisé par un profond défaut de production d'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire notamment produite par les LBreg). Ce croisement provoque le développement accéléré de symptômes autoimmuns chez la souris $B6^{lpr/lpr}Tim1^{-/-}$ comparé aux $B6^{lpr/lpr}$ contrôles incluant une splénomégalie, une hypergammaglobulinémie et une production importante d'autoanticorps anti-ADNdb (Xiao et al., 2012). Concernant les patients, une étude de 2009 a comparé les capacités fonctionnelles des LBreg, dont le phénotype chez l'Homme est $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}IL-10^+$, entre des patients lupiques et des personnes saines. Après stimulation *in vitro* avec un anticorps anti-CD40, les LBregs sains sont capables de sécréter de l'IL-10 et ainsi de supprimer la différenciation des Th1, alors que cette même population B provenant de patients lupiques, ne l'est pas (Blair et al., 2010).

B6. LES TRAITEMENTS DE LA MALADIE LUPIQUE

B6.1 TRAITEMENTS CONVENTIONNELS ADMINISTRÉS AUX PATIENTS

De façon générale, l'**hydroxychloroquine** (un anti-malarique) est toujours administrée en traitement de fond pour tous les patients, pour prévenir des poussées de la maladie. En raison du trop grand nombre d'effets indésirables, les corticoïdes ne sont administrés à forte dose qu'en cas de poussées. Les manifestations ostéo-articulaires sont généralement traitées par des anti-inflammatoires non stéroïdiens, de l'hydroxychloroquine ou en cas de résistance à l'hydroxychloroquine, par du **méthotrexate** (immunosuppresseur). La maladie rénale est, quant à elle, préférentiellement traitée par une bithérapie, associant des corticoïdes et un **immunosuppresseur** (ex : cyclophosphamide, méthotrexate, mycophénolate mofétil, azathioprine).

S'ajoute à cela de nombreuses thérapies innovantes en cours de développement comme les anticorps monoclonaux, administrés à des cas très restreints.

B6.2 LES BIOTHÉRAPIES CIBLANT LES LYMPHOCYTES B

Dans le traitement du lupus, les biothérapies ne sont envisagées qu'en cas d'échec avec les traitements conventionnels, sont peu nombreuses et ont des indications très restreintes. Trois exemples de biomédicaments ciblant les LB sont présentés dans cette partie.

B6.2.1 INHIBER LA SURVIE DES LYMPHOCYTES B : EXEMPLE DU BELIMUMAB

Le **belimumab** a constitué la première et l'unique biothérapie approuvée par la « Food and Drug Administration » pour le traitement du lupus. C'est un anticorps monoclonal complètement humanisé, d'isotype IgG1. Cet anticorps est spécifique de la forme soluble du facteur de survie BAFF. Le belimumab permet ainsi la « capture » de BAFF et l'empêche de se fixer à ses récepteurs physiologiques présents à la surface des LB, à savoir TACI, BAFF-R et BCMA (Figure 33). Il a obtenu l'AMM en France en 2011 pour le traitement de patients présentant des auto-anticorps et une activité élevée de la maladie, malgré la prise d'un traitement standard (Horowitz and Furie, 2012). Il est proscrit pour tout patient présentant des atteintes rénales ou neurologiques. L'efficacité du belimumab reste cependant modeste et n'est observable qu'après 52 semaines de traitement.

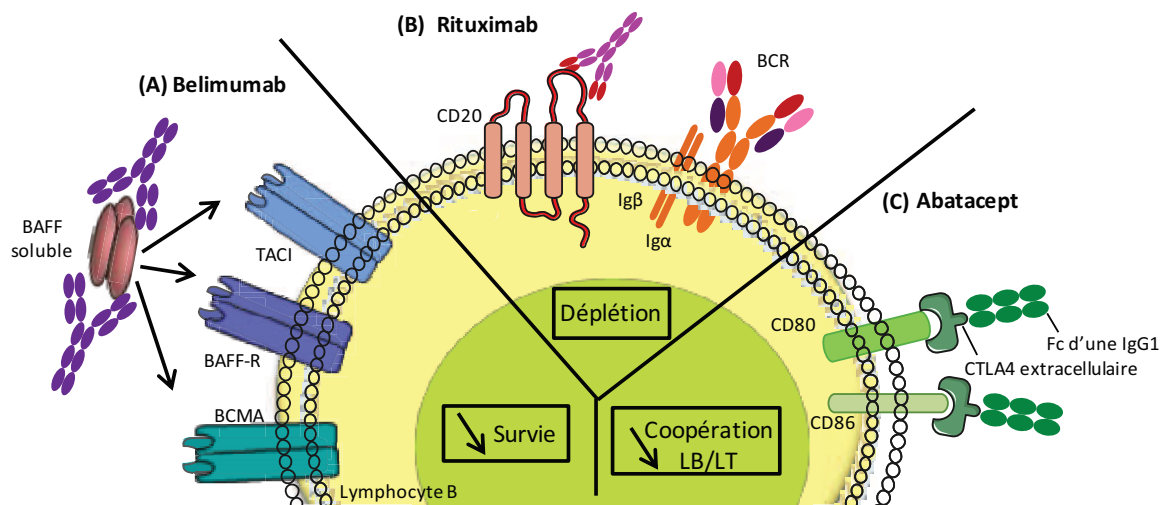


Figure 33 : Illustration du mode d'action de 3 biothérapies dirigées contre les lymphocytes B : le Belimumab, le Rituximab et l'Abatacept.

(A) Le Belimumab est un anticorps monoclonal capable de capturer la cytokine BAFF soluble et d'empêcher sa fixation sur l'un de ses trois récepteurs : BAFF-R, TACI et BCMA. C'est le seul anticorps monoclonal autorisé par la FDA dans le traitement du lupus ; (B) Le Rituximab est un anticorps qui déplete des cellules B en reconnaissant spécifiquement le CD20 ; (C) L'Abatacept est composé d'une région Fc et de la partie extracellulaire de CTLA-4, un ligand inhibiteur des molécules de costimulation CD80 et CD86. Figure personnelle.

B6.2.2 DÉPLÉTER LES LYMPHOCYTES B: EXEMPLE DU RITUXIMAB

Le **rituximab** est un anticorps monoclonal chimérique (souris/humain) dirigé contre la protéine CD20, spécifiquement exprimée par les LB à partir du stade pré-B jusqu'au stade mémoire, excepté par les PC. Cet anticorps a été utilisé pour la première fois en 1997, en tant que traitement pour des lymphomes B. Il **permet la déplétion des cellules CD20⁺** via les mécanismes de cytotoxicité dépendante des anticorps et du complément, par induction directe de l'apoptose, ou encore par induction de la phagocytose (**Figure 33**). Au cours des années suivantes, le rituximab a été utilisé pour la thérapie de certains cas de MAI telles que la PR ou le syndrome de Sjögren, résistants aux traitements conventionnels (*Liao et al., 2015*). Le rituximab est accepté dans le cas d'impasse thérapeutique pour les formes de lupus réfractaire aux corticoïdes et aux immunosuppresseurs.

B6.2.3 DÉSTABILISER LES MOLÉCULES DE CO-STIMULATION: EXEMPLE DE L'ABATACEPT

La coopération B/T contribue sérieusement à la pathologie lupique via notamment la présentation antigénique. Le LB activé exprime en surface des molécules de costimulation telles que CD80 et CD86 capables de se lier à leur ligand, CD28, exprimé à la surface des LT. Cette interaction activatrice permet l'expression d'une molécule de surface cette fois inhibitrice : CTLA4. Cette dernière, est aussi capable d'interagir avec CD80/86. Ayant une meilleure affinité que CD28 pour ses ligands, CTLA4 favorise l'inhibition de l'activation du LT. L'**abatcept** est une protéine qui consiste en la fusion de la partie Fc d'une IgG1 et du domaine extracellulaire de CTLA4. De ce fait, cette molécule **permet un blocage de la collaboration entre les LB et les LT** via le signal CD80/86-CD28 (**Figure 33**). Cet anticorps est toujours en phase d'essais cliniques dans le traitement du lupus (*Bernal et al., 2015*).

B6.3 L'ÉVOLUTION DES SOINS

L'amélioration des soins apportés aux patients leur permet un temps de vie plus long après le déclenchement de la maladie. En effet, alors que le pourcentage de survie 5 ans après le diagnostic de la maladie était inférieur à 50% en 1955, il est aujourd'hui de 85%, 10 ans après le diagnostic (*O'Neill and Cervera, 2010*). L'étude Euro-lupus indique que le nombre croissant de complications liées aux traitements ainsi que des manifestations thrombotiques sont responsables de la mort de certains patients. En effet, environ 27% de ces patients sont morts suite à des complications de thromboses, notamment dûes à la présence d'anticorps anti-phospholipides. Enfin, parmi les patients lupiques en fin de vie, nombreux sont ceux présentant des symptômes multisystémiques (rénaux, cardiaques, pulmonaires ou hématologiques), parfois accompagnés d'autres complications dues aux traitements, telles que les infections.

B7. LE LUPUS : UNE MALADIE AUX MÉCANISMES ÉTIOLOGIQUES DIVERS

Bien que quelques rares cas de lupus monogéniques existent, la pathologie lupique résulte, généralement, d'une addition d'anomalies génétiques. Le taux de concordance pour la maladie lupique entre des jumeaux monozygotes est estimé entre 30 et 57%. Les facteurs environnementaux rassemblent les raisons pour lesquelles ce taux est inférieur à 100%. Certains facteurs environnementaux sont bien souvent responsables de la rupture des phases de quiescence et du déclenchement des phases de poussées.

B7.1 LES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX DANS LE DÉVELOPPEMENT DU LUPUS

B7.1.1 LES FACTEURS INFECTIEUX

Les infections virales, bactériennes et parasitaires peuvent être responsables d'une réponse immunitaire aberrante chez l'individu sain. Plusieurs études ont donc examiné l'association entre infection et autoimmunité. Plusieurs mécanismes médiés par les agents infectieux peuvent conduire à l'activation de LB ou LT autoréactifs.

B7.1.1.1 LES INFECTIONS VIRALES IMPLIQUÉES DANS L'AUTOIMMUNITÉ

Le processus dit de « **mimétisme moléculaire** », basé sur des homologies de structure entre des épitopes d'antigènes exogènes et d'autoantigènes (**Figure 34**), peut entraîner une rupture de la tolérance des lymphocytes autoréactifs, c'est à dire leur activation et la production d'autoanticorps par les LB. Ce mécanisme fut pour la première fois proposé par Fujinami *et al* (*Fujinami et al., 1983*). Grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux fluorescents, ils démontrèrent que ces anticorps initialement conçus pour réagir contre le virus de la rubéole et le virus de l'herpes simplex I, se fixait également sur certains filaments intermédiaires du cytosquelette. Ils arrivent ainsi à expliquer pourquoi des autoanticorps sont produits lors de l'infection par ces virus.

Dans le LES, ce type de réaction est notamment observé pour **la protéine EBNA1 du virus de l'Epstein Barr (EBV)**. En effet, des études ont montré que les anticorps anti-EBNA1 interagissent de façon croisée avec les ribonucléoprotéines Ro et Sm, autoantigènes associés au lupus (*McClain et al., 2005*). De plus, des études ont reporté que 99.5% des patients lupiques adultes avaient été infectés par EBV contre 95% des individus sains. De la même façon, la protéine U1snRNP, autoantigène cibles de certains autoanticorps au cours du lupus, présente un épitope partagé avec la protéine gag p30 exprimée par la plupart des rétrovirus de type C (ex : HTLV (Human T-cell Leukemia Virus), MLV (Murine Leukemia Virus) (*Francis and Perl, 2010*).

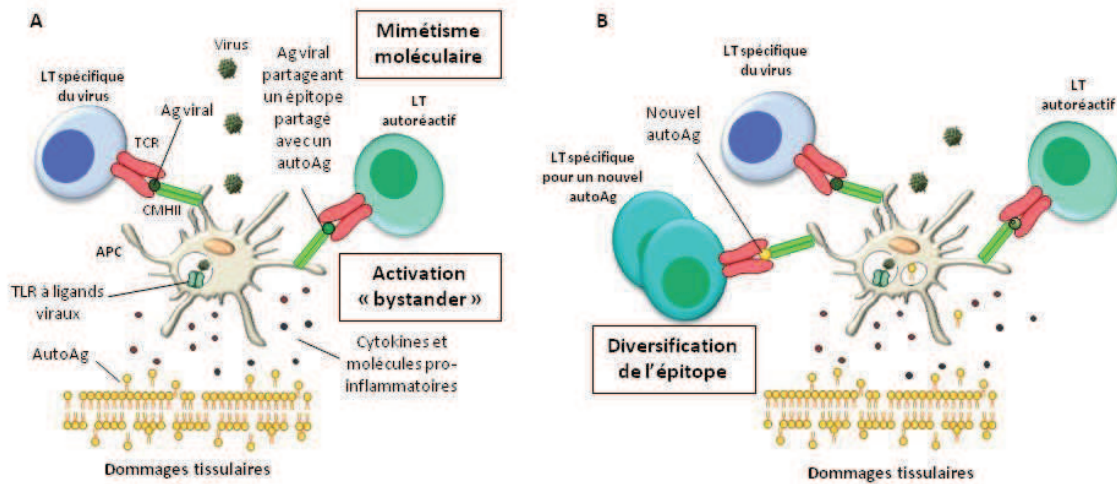


Figure 34 : Représentation schématique des mécanismes par lesquels les agents infectieux peuvent déclencher une autoimmunité.

Le mimétisme moléculaire correspond à des homologies de structure entre un autoantigène et un antigène (par ex ici : particule virale) et l'activation « bystander » correspond à une activation non spécifique des LT, dépendante notamment de cytokines (A). La diversification des épitopes (« epitope spreading ») peut mener à la reconnaissance de nouveaux épitopes autoantigéniques (B). *Ag* : Antigène ; *AutoAg* : Autoantigène ; *APC* : Cellule présentatrice d'antigène. Adapté de (Munz *et al.*, 2009).

D'une manière plus générale, la reconnaissance des virus à ARN ou ADN par les TLRs endosomaux déclenche une réponse inflammatoire importante. En effet, la stimulation des DC et des macrophages engage la voie IFN-I et provoque la production d'autres cytokines (ex : IL-12) qui vont participer à l'activation des LT et LB autoréactifs aux alentours. Une activation des LT en absence de stimulation spécifique du TCR est appelée « **activation bystander** » et permet aux LT de contourner les checkpoints de tolérance (Figure 34). Ce mécanisme est notamment observé chez les patients lors d'une poussée provoquée par une infection. Ce phénomène est souvent associé à une diversification des épitopes reconnus par les LT et LB vers des épitopes plus immunogènes. Cette diversification, appelée « **epitope spreading** » permet, dans la réponse anti-infectieuse, d'empêcher l'échappement du virus s'il vient à modifier ses protéines de surface. Cependant, ceci peut s'avérer délétère lorsque les nouveaux épitopes reconnus tendent à être des autoantigènes (Figure 34), comme ceci a été montré par Lehmann *et al.* en 1992 (Lehmann *et al.*, 1992). Dans le modèle murin de l'encéphalite expérimentale autoimmune, l'injection de MBP (Myelin Basic Protein) induit l'immunogénicité d'épitopes cryptiques (ici de la myéline). Enfin, les infections peuvent entraîner une mort cellulaire importante et favoriser un relargage abondant d'autoantigènes nucléaires.

 B7.1.1.2 INFECTIONS BACTÉRIENNES IMPLIQUÉES DANS L'AUTOIMMUNITÉ

L'injection de toxine cholérique B, de *Vibrio cholerae*, entraîne chez la souris lupique MRL^{lpr/lpr} une augmentation de la production d'autoanticorps ainsi qu'une GN. Il semblerait que l'infection entraîne une augmentation de l'aggrégation des radeaux lipidiques à la membrane des LT et induirait ainsi une hyperstimulation des cellules T (voir partie **B4.2.1**) (*Deng and Tsokos, 2008*). La bactérie *Helicobacter pylori* est responsable de gastrites chroniques et semble être impliquée dans le développement de gastrites autoimmunes, et de MAI en général. L'infection de souris BALB/c par *H. pylori* induit la production d'autoanticorps anti-ADNs_b et de facteurs rhumatoïdes, particulièrement par les LB B1 (*Yamanishi et al., 2006*). Chez l'Homme, une étude épidémiologique a montré que la fréquence d'anticorps anti-*H.pylori* est identique entre des patients lupiques et contrôles. Au contraire, une étude plus ancienne démontre une association inverse entre l'infection par *H. pylori* et le développement d'un LES, puisque la prévalence de séropositivité pour la bactérie est plus faible pour les femmes lupiques d'origine afro-américaine que pour les femmes contrôles (*Sawalha et al., 2004*).

 B7.1.1.3 EFFETS PROTECTEURS DES INFECTIONS

Certaines études ont montré que certaines infections pouvaient avoir un rôle protecteur contre le développement du LES (*Praprotnik et al., 2008*). Par exemple, l'infection de souris lupiques (NZBxNZW)F1 par le parasite *Toxoplasma gondii* diminue la production d'autoanticorps anti-ADN (db et sb), le dépôt d'IgM, d'IgG et de la protéine C3 du complément au niveau des glomérules rénaux, et retarde la maladie rénale (*Chen et al., 2004*). De façon globale, le taux de survie à 9 mois des souris infectées par le parasite est beaucoup plus élevé (100%) que celui des (NZBxNZW)F1 sauvages (20%). Un autre exemple concerne la malaria. Cette maladie, provoquée par un parasite de la famille des **plasmodium**, semble avoir un effet protecteur sur le développement du lupus. Premièrement, en Afrique, les cas de LES sont les plus rares là où la malaria est très commune. Il semble que l'infection parasitaire entraîne une grande production de TNF- α dans le but premier d'activer les macrophages et neutrophiles pour lutter contre le parasite, mais qui dans un second temps protégerait l'individu contre le développement d'une autoimmunité (*Butcher, 1991*). Il est reporté que, bien que le TNF- α soit une cytokine pro-inflammatoire, il aurait des vertus protectrices envers le développement d'une autoimmunité de type lupique, comme le démontre cette étude de Jacob *et al.*, qui montre que l'injection de TNF- α recombinant à des souris lupiques (NZBxNZW)F1, connues pour être de faibles productrices de TNF- α , retarderait la maladie rénale (*Jacob and McDevitt, 1988*). Une étude récente, parue cette année, a consisté à infecter des souris lupiques (NZBxNZW)F1 avec le parasite *Plasmodium chabaudi*. Les auteurs montrent que l'infection parasitaire diminue les taux d'IgG2 et IgG3 sériques, le taux d'autoanticorps anti-ADN_{db}, le taux de CXCL12, l'expression de CXCR4 à la

surface des LB, ainsi que la phosphorylation des voies Erk, Akt et NF- κ B au sein des LB, comparé aux contrôles (NZBxNZW)F1 non infectées. En effet, tous ces traits phénotypiques sont retrouvés augmentés chez la souris lupique (NZBxNZW)F1. Ainsi, l'infection par plasmodium protégerait du développement d'une autoimmunité en modulant l'axe CXCR4/CXCL12, important pour les plasmocytes, mais rétablirait aussi l'activation des voies Erk, Akt et NF- κ B à un niveau « normal ». L'ensemble mènerait à la diminution de la production d'anticorps et d'autoanticorps (*Badr et al.*, 2015).

B7.1.2 LES HORMONES

Comme énoncé précédemment, le ratio femme : homme pour la maladie lupique est en moyenne de 9 : 1 dans les différentes cohortes étudiées. La prédominance féminine est moins prononcée pour les lupus très précoces ou tardifs. Ceci suggère donc **un rôle pour les oestrogènes** dans le développement du LES (*Lang*, 2004). Comme évoqué dans le début de cette partie, le SI est sensible aux hormones et notamment aux oestrogènes. En effet, la plupart des cellules du SI, dont les LB, LT CD8⁺, monocytes, neutrophiles ou cellules NK, expriment le récepteur aux oestrogènes. Ainsi, il semble logique que des variations des taux d'oestrogènes puissent avoir un impact sur des processus tels que la présentation antigénique, la prolifération des cellules B et T ou encore la production d'anticorps (*Rubtsov et al.*, 2010). D'ailleurs, des études ont été réalisées depuis longtemps sur le modèle lupique (NZBxNZW)F1, modèle dans lequel les femelles développent une maladie lupique plus précoce et plus sévère que les mâles. Ces études ont révélé que, lorsque les femelles sont déficientes pour le récepteur aux oestrogènes, la sévérité de la maladie rénale est diminuée et leur survie est augmentée (*Bynote et al.*, 2008). De la même façon, une castration des mâles (NZBxNZW)F1, combinée à une administration d'oestrogènes, entraîne 90% de mortalité des mâles à l'âge de 8 mois contre 45% pour les mâles sauvages (*Roubinian et al.*, 1978). Quant aux femelles, leur castration associée à une administration d'androgènes induit environ 60% de survie à 1 an comparé à un taux de 20% pour les femelles sauvages. Ces résultats suggèrent donc une fonction « accélératrice de la maladie » des oestrogènes féminines mais aussi une fonction « protectrice » des androgènes masculines. L'hypothèse reposerait sur la capacité qu'ont les oestrogènes à réguler positivement le promoteur de l'IFN- γ (*Fox et al.*, 1991). En effet, la production d'IFN- γ est étroitement liée à la production d'IgG2a, isotype majoritairement responsable de la GN dont souffre le modèle (NZBxNZW)F1.

B7.1.3 LES MÉDICAMENTS

La prise de certains médicaments peut déclencher le développement d'une maladie de type lupique, appelée « **drug-induced lupus erythematosus** » (DILE), bien qu'il soit établi qu'un certain degré de susceptibilité génétique soit tout de même requis. L'incidence de ce type d'autoimmunité a largement augmenté durant ces 10 dernières années et, à ce jour, plus de 90 médicaments ont été mis en cause. Les médicaments dont la prise confère le plus haut risque de développer un DILE sont la **procaïnamide**, un antiarythmique, et l'**hydralazine**, utilisée pour traiter l'hypertension, dont 20% et 5 à 8% des patients traités pendant au moins 1 an ont développé un DILE, respectivement (*Rubin, 2005*). Ces deux médications induiraient vraisemblablement des modifications épigénétiques de la méthylation de l'ADN, ayant un impact sur l'expression de certains gènes (*Pretel et al., 2014*). Cet aspect sera discuté dans le prochain paragraphe (**B3.4.2.4**). Avec un risque beaucoup plus faible, on peut citer les traitements par anticorps monoclonaux **anti-TNF α** , utilisés pour traiter la maladie de Crohn ou la PR, par exemple, qui peuvent conduire au développement d'un lupus. Plusieurs hypothèses sont émises quant aux mécanismes de déclenchement d'un lupus, après traitement par anticorps anti-TNF α . Notons, tout d'abord que le lupus est associé à de faibles taux sériques de TNF α . Ainsi, l'apoptose des LT cytotoxique médiée par le TNF α , étant un mécanisme régulateur négatif important, l'administration d'anticorps anti-TNF peut inhiber ce mécanisme. De plus, la diminution du TNF α modulerait la balance Th1/Th2 en faveur de la production de cytokines de type Th2 qui joueraient un rôle dans l'activation des LB. Enfin, des infections bactériennes facilitées par l'absence de TNF α pourraient stimuler les LB de façon polyclonale et induire la production d'anticorps (*Katz and Zandman-Goddard, 2010*).

B7.1.4 LES HABITUDES DE VIE

D'autres facteurs, liés de façon générale au mode de vie des gens, ont été associés à la pathologie lupique. L'exposition aux rayonnements **Ultra Violets** (UVs), en particulier les UV-A1 et UV-B, induit une poussée de la maladie chez les patients présentant des lésions cutanées. N'ayant pas la même longueur d'onde, les différents types de rayonnement UV agiraient via différents mécanismes. Les UV-B exacerberaient l'apoptose des kératinocytes en endommageant leur ADN, et participeraient au relargage d'autoantigènes au niveau de la peau. De plus, les UV-B permettraient l'expression de molécules pro-inflammatoires comme l'IL-1. Les UV-A, de longueur d'onde plus longue, pénètrent plus profondément au niveau de la peau, c'est-à-dire jusqu'à la couche profonde du derme. Ces rayonnements induisent l'apoptose des kératinocytes mais via un stress oxydatif mitochondrial, générant un excès de ROS. Des cytokines pro-inflammatoires sont aussi retrouvées élevées au niveau de la peau après une longue exposition aux UV-A, par exemple l'IL-1 et l'IL-6 (*Kim and Chong, 2013*)

Bien que des agents toxiques soient contenus dans le **tabac de cigarette**, l'association tabac/lupus est très controversée. Une étude suédoise de 2014 compare 3 groupes de patients lupiques : les fumeurs, les ex-fumeurs et les patients qui n'ont jamais fumé. Les 3 groupes présentent le même profil pour différents points : le score SLEDAI (d'environ 3,5), le score SLICC/ACR (Systemic Lupus Index Collaborating Clinical/American College of Rheumatology) (d'environ 1,75) et la quantité d'anticorps anti-C3. Par contre, les patients lupiques fumeurs présentent des titres plus faibles d'anticorps anti-ADNdb que les patients ex-fumeurs ou n'ayant jamais fumé (*Eklom-Kullberg et al., 2014*). Une autre étude, réalisée en 2003, démontrait que les patients fumeurs avaient un SLEDAI plus élevé que les non ou ex-fumeurs (*Ghaussy et al., 2003*). En conclusion, il est difficile de dire l'impact qu'a le tabac sur la pathologie lupique. Certains proposent que les agents toxiques contenus dans le tabac peuvent entraîner des dommages à l'ADN et mener à des mutations génétiques, d'autres pensent que le tabac pourrait plutôt réduire l'efficacité des traitements comme les anti-malariques (*Ezra and Jorizzo, 2012*).

Enfin, des **substances chimiques** pouvant être rencontrées au quotidien peuvent aussi être liées au développement d'un lupus. Plusieurs études, dont une menée en Amérique du Nord, a conclu qu'une exposition aux poussières de silice cristalline, présentes dans la majorité des industries de manufacture et de construction, conférait un risque de développer un LES (*Makol et al., 2011*). En Asie, la contamination de l'huile de riz avec des composés phénols polychlorés augmenterait la fréquence de LES (*Mak and Tay, 2014*).

B7.2 IMPLICATION DES MÉCANISMES ÉPIGÉNÉTIQUES

B7.2.1 DÉFINITION DE L'ÉPIGÉNÉTIQUE

L'**épigénétique** est définie comme une modification de l'expression des gènes n'impliquant aucune altération au niveau de la séquence nucléotidique. Les phénomènes épigénétiques sont très sensibles aux stimuli extérieurs, tels que les UV ou encore le régime alimentaire. Les principaux mécanismes de régulation épigénétique englobent **la méthylation de l'ADN**, contrôlée par des DNMT, **la modification des histones** principalement par acétylation ou méthylation, et **la régulation des gènes par les ARN non codants**, appelés siRNA ou miRNA (**Figure 35**) (*Miceli-Richard, 2015*). Ainsi, des anomalies ou des modifications de ces mécanismes peut avoir un impact sur la pathologie lupique. Ci-dessous sont présentées quelques études ayant permis de décrire les défauts de ces processus de régulation.

B7.2.2 IMPACT DE LA MÉTHYLATION DE L'ADN

L'une des premières preuves de l'implication de la méthylation de l'ADN dans le développement du LES à été l'observation de cas de lupus induits par certains médicaments (hydralazine et procainamide, par exemple). Des études ont démontré que ces deux médicaments avaient la capacité d'inhiber la DNMT1 dans les LT donc ainsi d'inhiber la méthylation globale des gènes des LT (*Deng et al.*, 2003).

De plus, de nombreuses études concernant la méthylation ont été réalisées sur les LT de patients lupiques par technique de séquençage de l'ADN. Ainsi, certains promoteurs de gènes des LT CD4⁺ présenteraient une hypométhylation lors de la pathologie lupique, tels que le promoteur du gène codant pour la perforine (*Kaplan et al.*, 2004) ou l'IL-10 et l'IL-13 (*Zhao et al.*, 2010) (**Figure 35**). **L'hypométhylation des promoteurs résulterait en une surexpression du gène.** Par exemple, les auteurs suggèrent qu'une surexpression de la perforine pourrait être responsable de la mort spontanée des monocytes/macrophages retrouvée au cours du LES.

Plus récemment, une étude de méthylation d'ADN sur génome entier a été réalisée sur les LT CD4⁺ de 12 patients lupiques de SLEDAI variable (de 0 à 10), et 12 personnes contrôles (*Jeffries et al.*, 2011). La méthylation des cytosines a été quantifiée au niveau de plus de 27 000 sites CG situés dans plus de 14 000 promoteurs de gènes. Comparé aux LT CD4⁺ contrôles, les LT CD4⁺ de patients lupiques présentent 236 CG hypométhylés et 105 CG hyperméthylés. Parmi les gènes portant des sites CG hypométhylés, on retrouve notamment le gène codant pour CD9, protéine située à la surface des LT et correspondant à un signal de co-stimulation échangé avec le LB. Cette hypométhylation de *CD9* pourrait être associée à l'hyperactivation des LT observée au cours du lupus. Enfin, parmi les gènes hyperméthylés étaient retrouvés des gènes impliqués dans la biosynthèse des folates, processus important pour la méthylation de l'ADN.

De plus, n'oublions pas que **la méthylation est le mécanisme contrôlant l'inactivation de l'un des deux chromosomes X chez la femme.** Des modifications de méthylation peuvent induire une mauvaise inactivation de l'un des chromosomes et induire, par exemple, l'expression à partir des deux allèles, de gènes participant ou déclenchant la maladie lupique (*TLR7, CD40L*,..).

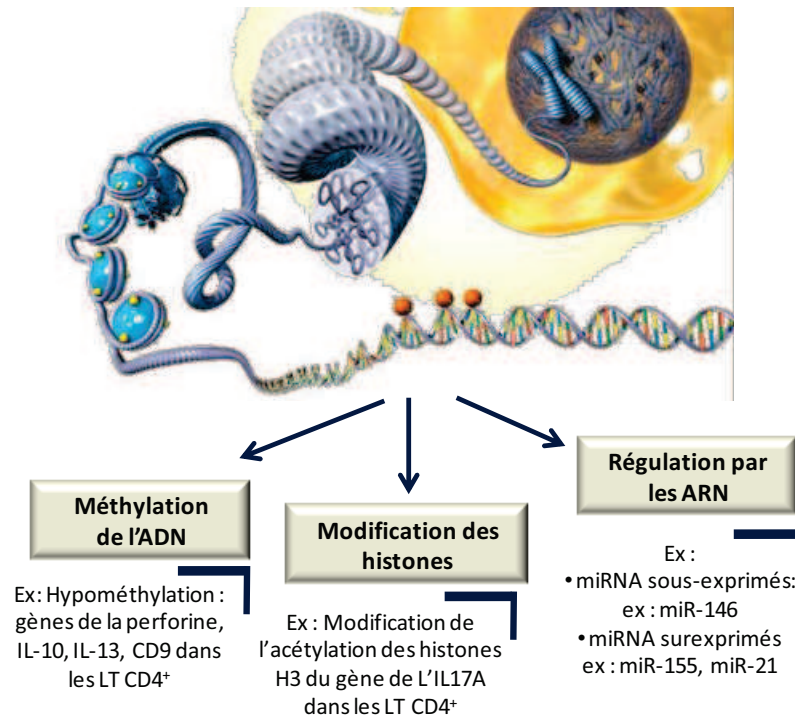


Figure 35 : Exemple de mécanismes épigénétiques potentiellement impliqués dans le LES : la méthylation de l'ADN, la modification des histones et la régulation par les ARN (miRNA, siRNA).

Quelques exemples retrouvés au cours de la maladie lupique pour chaque mécanisme sont indiqués. Figure personnelle - Image : <http://celgene.com>.

B7.2.3 ETUDES DES MODIFICATIONS D'HISTONES

Les modifications d'histones telles que l'acétylation ou la méthylation permettent de remodeler la structure chromatinienne. Les monocytes de patients lupiques montrent de façon globale une **hyperacétylation de l'histone H4**, comparé aux monocytes de sujets contrôles, au niveau de gènes régulés par IRF1 (ex : *IFIT3*, Interferon-induced Protein 3) donc en relation avec la voie IFN-I (Sullivan *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2010) comme par exemple le locus contenant le gène codant pour le TNF- α [144].

Une autre étude plutôt récente, effectuée sur des LT CD4⁺ de patients lupiques, a montré qu'une **modification des histones H3** au niveau de certains acides aminés du gène de l'IL-17A (hypométhylation du H3 de la lysine 27 et hyperacétylation de du H3 de la lysine 18) induirait une meilleure accessibilité de la chromatine (Figure 35). Ceci faciliterait la transcription du gène *IL-17A* et une surproduction de cette cytokine pro-inflammatoire (Rauen *et al.*, 2011, Hedrich *et al.*, 2012).

B7.2.4 ETUDES D'EXPRESSION DE MIRNA

Les **microARNs** (miRNA) sont connus pour moduler l'expression de gènes impliqués dans de multiples processus cellulaires dont l'immunité. Pour mieux comprendre le rôle qu'ils jouent dans le

LES, la technologie des microarrays a été utilisée pour étudier leur expression au niveau des cellules effectrices et des organes atteints au cours de la maladie. Lors d'une étude de comparaison de l'expression de miRNA dans des PBMCs de patients, comparé à des contrôles, un profil distinct d'expression de miRNA chez les patients a été mis en évidence (*Stagakis et al., 2011*). Ces miRNA sont prédits pour réguler des gènes impliqués dans l'apoptose, dans les processus de régulation épigénétique mais aussi dans le développement lymphocytaire B. Afin d'identifier les compartiments cellulaires responsables de ces différences, une analyse a été refaite sur des LT CD4⁺ et des LB CD19⁺ triés. Trois miRNA ont été retrouvés surexprimés à la fois dans les LB et dans les LT parmi lesquels miR-21, dont la surexpression semble être corrélée à l'activité de la maladie. Parmi les cibles de miR-21, on peut citer les régulateurs négatifs *PTEN* et *SPRED-1* ou le facteur anti-apoptotique *BCL-2*. On peut imaginer qu'en inhibant l'expression de ces gènes, miR-21 contribue à la survie et à l'activation des LT CD4⁺ chez les patients lupiques.

Pan *et al.* ont confirmé la surexpression de miR-21 dans des LT CD4⁺ de patients lupiques comparé à des contrôles (**Figure 35**). Ils ont également identifié une surexpression de miR-155 dans les LT CD4⁺ et LT CD4⁺CD25⁺ qui diminuerait la stabilité des LTreg, ou encore une sous-expression de miR-146 dans les LTCD4⁺ qui augmenterait la réponse IFN-I (*Pan et al., 2010*).

B7.3 LES FACTEURS GÉNÉTIQUES DE LA MALADIE LUPIQUE

La **génétique** est un pan essentiel de l'étiologie du lupus ; supporté par le fait qu'un rapport de risque élevé est reporté entre deux personnes de la même famille ($\lambda_s = 8-29$), que l'hérédité de la maladie est importante ou encore que le taux de concordance entre des jumeaux homozygotes (30-57%) est supérieur à celui des jumeaux hétérozygotes (2-5%) (*Moser et al., 2009*).

Bien qu'il existe de rares cas de LES monogéniques, il est maintenant admis que le LES est majoritairement polygénique et se transmet selon un **mode génétique complexe**. D'ailleurs, selon l'origine ethnique par exemple, différents gènes ou allèles seront impliqués avec des impacts variés.

Depuis les années 1970, différentes approches ont été utilisées afin d'identifier ces gènes de susceptibilité au développement du LES, des études d'association aux analyses transcriptomiques, en passant par les GWAS (Genome Wide Association Study). Ces études, présentant chacune des avantages et des inconvénients, ont contribué à une meilleure compréhension de la génétique lupique (**Figure 36**).

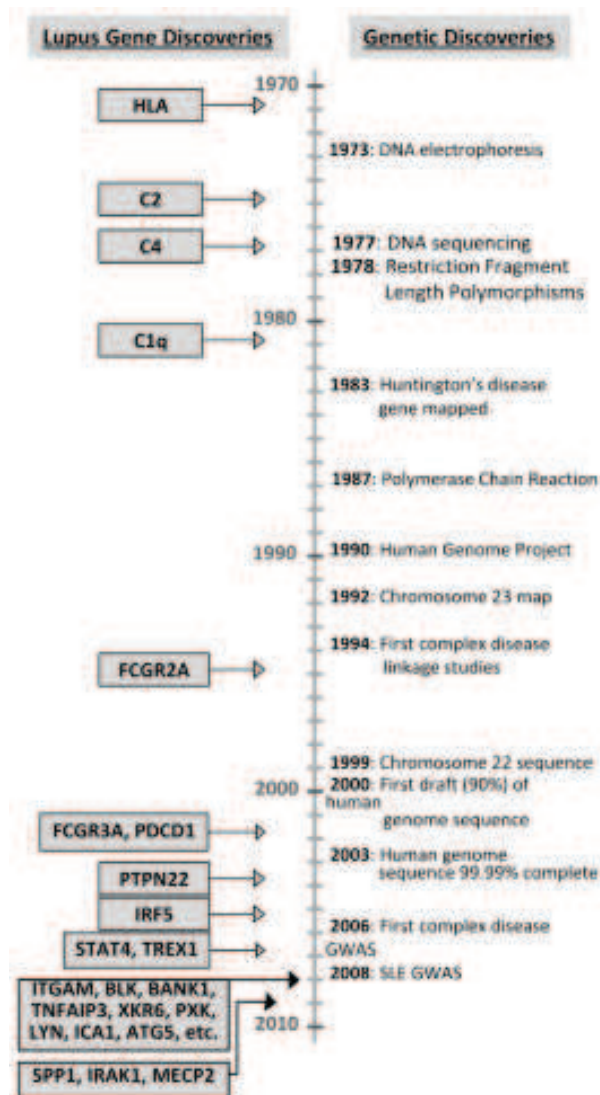


Figure 36 : Frise chronologique illustrant les découvertes en génétique humaine (à droite) et la description des gènes de susceptibilité au développement du LES (à gauche).

(Moser *et al.*, 2009).

B7.3.1 GÉNÉTIQUE & LUPUS : NOTIONS DE GÈNE DE SUSCEPTIBILITÉ, POLYMORPHISMES ET ODD RATIO

Un **gène de susceptibilité** au développement d'une pathologie correspond à un gène potentiellement impliqué dans la prédisposition génétique de la maladie. Il peut être sélectionné pour différentes raisons : 1) selon sa fonction (stratégie du gène candidat), ce gène pourrait jouer un rôle crucial dans la pathologie ; 2) par homologie : il a été mis en cause dans un modèle murin lupique donc est candidat pour la pathologie humaine ; 3) il se situe à proximité d'une région chromosomique identifiée par analyse de liaison comme région de prédisposition au développement du lupus ; 4) un polymorphisme associé à ce gène est retrouvé plus fréquemment chez les personnes malades comparé aux personnes saines.

En effet, une des stratégies actuelles d'étude de la génétique du lupus consiste en l'identification de variants de gènes par la recherche de marqueurs génétiques hautement polymorphes et répartis sur l'ensemble du génome. Il existe différents types de polymorphismes :

- **Les STR** (Short Tandem Repeats) ou microsatellites correspondent à une séquence d'ADN assez courte (2 à 5 paires de bases) répétée un nombre aléatoire de fois suivant les individus.
- **Le RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphism) est un polymorphisme dû à des différences de longueur de fragment issus de la digestion de l'ADN par des enzymes de restriction.
- **Un SNP** (Single Nucleotide Polymorphism) correspond à un nucléotide unique qui diffère entre deux séquences d'ADN. Ce dernier type de polymorphisme est le plus utilisé de nos jours dans les études génétiques.

Dans les études d'association, des polymorphismes sélectionnés vont être séquencés chez un groupe de malades et un groupe contrôle, puis on va rechercher leur association avec la pathologie concernée. Ces études permettent le calcul d'une mesure statistique appelée « Odd Ratio » (OR). L'OR d'un allèle correspond au degré de risque qu'a un individu possédant cet allèle de contracter la maladie. Si l'OR est égal à 1, l'allèle est aussi fréquent chez les patients que chez les personnes saines ; plus l'OR est supérieur à 1, plus l'allèle est associé au développement de la maladie.

B7.3.2 DES PREMIÈRES ÉTUDES D'ASSOCIATION AUX GWAS

B7.3.2.1 PREMIÈRES ÉTUDES : LES ÉTUDES D'ASSOCIATION ET DE LIAISON

Les premières **études d'association** pour le LES ont été faites à partir de l'année 1971 sur les **gènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I** (*Waters et al., 1971*). A l'époque, le choix du gène candidat se faisait par rapport aux hypothèses émises quant à sa fonction et son rôle potentiel dans la pathologie. Pour le cas du CMH-I, des évidences de son implication avaient déjà été démontrées pour la leucémie lymphoïde et la maladie de Hodgkin. La technique d'identification des gènes du CMH-I reposait sur la technique de microlymphotoxicité qui consistait à incuber les lymphocytes des patients et contrôles avec des séras contenant des anticorps anti-HLA spécifique. Ces premières études permettaient la détection de plus de 20 CMH-I spécifiques. L'étude réalisée par Goldberg en 1976 comptabilisait 120 patients lupiques et 120 contrôles. Ce scientifique a permis de mettre en évidence une fréquence plus importante de l'allèle HLA-A1 chez les patients lupiques d'origine africaine (14% versus 0% pour les contrôles) et une fréquence plus importante de l'allèle HLA-A8 pour les patients d'origine non-africaine (35% versus 12% pour les contrôles).

Etant donné la proche localisation génétique avec les gènes du CMH-I, les gènes codant pour les protéines **C2** et **C4** (C4A et C4B) **du complément**, situés dans le locus du CMH-III, ainsi que des gènes codant pour des molécules de **CMH-II** (HLA-DR3 et DR2), ont rapidement été associés à la maladie lupique, suivis de peu par la découverte du gène codant pour la protéine **C1q** ou le récepteur **FcyRIIa** (CD32).

A partir des années 1990, la possibilité d'utiliser les premières cartes de marqueurs qui couvrent le génome murin ou humain (recensant 5264 microsatellites chez l'Homme (*Dib et al.*, 1996)) ont révolutionné l'étude des gènes dits « non-CMH » qui prédisposent au LES. Les polymorphismes peuvent être utilisés dans des **analyses de liaison** pour cartographier les positions des loci liés à la maladie et qui contiennent les gènes de susceptibilité. Ces études ont notamment été réalisées sur des cohortes de patients, des cas familiaux de lupus ou des modèles murins lupiques. Ces études ont permis **l'identification de nouvelles régions chromosomiques de susceptibilité** (*Moser et al.*, 1998) et la confirmation de l'implication de gènes préalablement identifiés comme le locus du CMH (*Gaffney et al.*, 1998), ou des gènes codant pour des protéines du complément (*Huang et al.*, 1995).

De plus, des études réalisées sur des groupes ethniques particuliers a permis de conclure quant à l'importance de l'origine de l'individu. En effet, pour exemple, l'étude de *Shai et al.* démontre que, parmi 80 familles lupiques comprenant autant de membres mexicains-américains que de caucasiens, certains gènes de susceptibilité associés au LES ne sont retrouvés que chez les malades d'origine mexicaine (*Shai et al.*, 1999).

La limite de ces études, d'autant plus quand elles sont réalisées sur un nombre insuffisant de patients, est qu'elles vont permettre de ne trouver que des gènes à impact fort sur le développement de la pathologie (comme par exemple les gènes du complément).

B7.3.2.2 ETUDES D'ASSOCIATION SUR GÉNOME ENTIER (GWAS)

B7.3.2.2.1 PRINCIPE DES GWAS

Les grandes avancées technologiques concernant le séquençage du génome humain entier et à haut débit, ont permis le développement de nouvelles analyses de liaison appelées « **GWAS** ». Ce type d'étude a pour objet de **séquencer des milliers de SNP** au sein d'un même échantillon. Il a été calculé qu'environ 10 millions de sites dans le génome sont polymorphiques avec une fréquence significative. De ce fait, une sorte de « catalogue » des variations génétiques les plus fréquentes chez l'Homme a été érigé afin de pouvoir les cartographier sur le génome. En effet, des variations

génétiques physiquement proches sur le génome tendent à être héritées ensemble sous forme d'haplotype. C'est ainsi qu'en 2005 a été développé le projet « HapMap » afin de caractériser les haplotypes les plus courants parmi 4 populations originaires de diverses parties du monde (2005). Ce projet a été complété par le 1000 genome project qui permet de décrire les variants présents dans moins de 1% de la population (Abecasis *et al.*, 2010).

L'approche par les GWAS a accéléré la découverte des variations génétiques contribuant au LES. Alors que 9 gènes avaient été découverts par les premières études d'associations et de liaison (HLA, C2, C4, C1q, FcγRIIa, FcγRIIIa, PTPN22, PDCD1, IRF5) les résultats de 8 GWAS (4 cohortes européennes et 4 cohortes asiatiques) réalisés entre 2008 et 2014 ont permis de mettre en évidence une trentaine d'associations génétiques et sont, pour la plupart décrits dans la partie **B7.3.4** (Deng and Tsao, 2014).

B7.3.2.2 ANALYSE CRITIQUE DE L'APPROCHE PAR LES GWAS

L'approche par les GWAS a été essentielle pour la découverte de nouveaux gènes de susceptibilité au développement du LES. Néanmoins, seulement une **quarantaine de gènes** ont été identifiés ce qui est probablement très en-dessous du nombre réel de gènes impliqués dans le lupus. En effet, les GWAS ont principalement permis l'identification de gènes dont les variations étaient retrouvées à haute fréquence parmi les populations étudiées (Odd ratios élevés). Ainsi, des études supplémentaires réalisées sur un plus grand nombre d'individus et sur des ethnies différentes, seront nécessaires pour définir de nouveaux gènes de susceptibilité au développement du LES par cette approche. De plus, afin d'englober tous types de polymorphismes, des études assez récentes s'intéressant **au nombre de copies d'un gène donné** (CNV (Copy Number Variant)) ont été investiguées. Ceci a déjà permis de confirmer qu'un nombre de copie bas du gène C4 (par exemple 0 ou 1 copie sur 6 possibles) induit un lupus alors qu'un nombre de copie élevé de ce gène (à partir de 3 copies) protégerait du lupus (Yang *et al.*, 2007). Enfin, il faut ajouter que les polymorphismes déterminés par les études de GWAS ne se traduisent pas forcément par des variations d'expression ou des gains/pertes de fonction de la protéine codée par le gène d'intérêt. C'est pour cette raison que de nombreux modèles murins transgéniques (transgénique classique, Knock-out, Knock-In) sont utilisés afin d'aller plus loin dans la compréhension de la génétique du lupus et d'évaluer la fonction des gènes de susceptibilité dans le développement et l'évolution de la maladie.

B7.3.3 LE SÉQUENÇAGE D'EXOME : NOUVELLE TECHNIQUE D'IDENTIFICATION DE GÈNES DE SUSCEPTIBILITÉ

L'**exome** regroupe tous les exons du génome, c'est-à-dire l'ensemble des régions codantes et constitue de ce fait l'information génétique la plus proche du phénotype protéique. On recense environ 180 000 exons qui représentent à peine 1% du génome mais contiendraient environ 85% des

mutations impliquées dans les maladies en général (*Lalonde et al., 2010*). Ainsi la nouvelle technique de « whole exome sequencing » permet **le séquençage de toutes les parties codantes de l'ADN** et ainsi de contribuer à la compréhension de maladies dont les causes ne sont pas encore identifiées.

Cette technique se déroule de la même manière que le séquençage du génome entier si ce n'est qu'avant l'étape de séquençage à haut débit, une étape d'enrichissement des régions codantes est réalisée. Cette étape d'enrichissement est effectuée grâce à un large panel de sondes biotinylées spécifiques des exons. Néanmoins, ce panel ne comprend pas la reconnaissance de 100% des exons et peut ainsi représenter une limite de la technique.

Une étude réalisée en 2014, a permis d'identifier le variant R97H de l'endonucléase **TREX1** (cf **B7.3.4.1.3**), a une qui a un rôle dans la dégradation de l'ADN endogène, chez une petite fille de 4 ans souffrant d'un LES précoce et avec des atteintes cérébrales. Ce mutant activité exonucléase 20 fois plus faible que la normale, et se retrouve associé à une réponse inflammatoire forte traduite par un niveau élevé d'IFN-I. La caractérisation de la mutation a permis de guider et d'améliorer le traitement de l'enfant vers une thérapie ciblant l'IFN-I (*Ellyard et al., 2014*). Une seconde étude réalisée la même année s'est intéressée à 4 membres d'une même famille, tous souffrant d'un syndrome inflammatoire nommé « SAVI » (pour Sting-Associated Vasculopathy with onset in Infancy) accompagné par des traits autoimmuns de type lupique (*Jeremiah et al., 2014*). En effet, le séquençage de l'exome de ces 4 patients a mis en évidence une mutation V155M dans le gène **TMEM173**, codant pour le senseur d'ADN STING (Stimulator of Type I IFN gene) en amont de la voie IFN-I. Cette mutation s'avère être une mutation gain-de-fonction, induisant une activation constitutive de STING qui explique la quantité élevée d'IFN-I retrouvée dans le sérum des patients. Cette même mutation a été retrouvée par un autre groupe de chercheurs chez d'autres patients présentant le même type de syndrome (*Liu et al., 2014*). Une autre mutation, concernant le gène **PRKCD** (codant pour la protéine kinase δ , impliquée dans la voie de signalisation du BCR) et préalablement identifiée par les analyses de liaison, a été identifiée dans une autre famille où 3 frères et sœurs (3 à 10 ans) souffraient de symptômes de type lupique très sévères. Cette mutation induirait une diminution de l'expression de la PRKCD qui inhiberait l'apoptose des LB et induirait leur prolifération (*Belot et al., 2013*).

Ainsi, le séquençage d'exome permet une approche fine et personnalisée de l'identification de variants délétères rares et permet d'améliorer les choix thérapeutiques. Dans le cas du lupus, elle a été jusqu'à présent fructueuse dans la découverte de nouveaux gènes de susceptibilité, dans l'analyse de familles multiplex de lupus, et présentant un lupus à priori monogénique.

B7.3.4 GÈNES DE SUSCEPTIBILITÉ AU DÉVELOPPEMENT DU LES

L'ensemble des résultats des études précédemment citées, parfois complétées grâce au développement de modèles murins génétiquement modifiés (transgéniques classiques, Knock-In, Knock-Out), ont permis de classer tous les autres gènes de susceptibilité en fonction du type de réponse immunitaire dans lesquelles ils sont impliqués : 1) la **clairance des cellules apoptotiques et des complexes immuns** ; 2) la **réponse immunitaire innée** ; 3) la **réponse immunitaire adaptative** (LB, LT) (**Figure 37 p.119 et Tableau 8 p.120**). Les mutations de certains de ces gènes sont responsables de formes monogéniques de lupus, correspondant à des formes pédiatriques, plus sévères que la forme adulte, suggérant que les mutations dans ces gènes ont un impact fort sur la pathologie.

B7.3.4.1 GÈNES DE SUSCEPTIBILITÉ AU LES IMPLIQUÉS DANS LA CLAIRANCE DES COMPLEXES IMMUNS ET CORPS APOPTOTIQUES

De nombreuses protéines impliquées dans le phénomène d'élimination d'autoantigènes présents dans la circulation ou localement dans les tissus, aussi appelé « **clairance** », ont été identifiées comme participant à la pathogénèse du lupus. Ce matériel provient majoritairement de cellules apoptotiques ou des complexes immuns. Si ce matériel n'est pas éliminé rapidement, il peut être responsable de l'initiation d'une réponse autoimmune.

B7.3.4.1.1 GÈNES RELATIFS À L'OPSONISATION : COMPLÉMENT ET RÉCEPTEURS FC

L'**opsonisation** des corps apoptotiques par les molécules du complément est essentielle au processus de clairance. Les gènes codant pour les facteurs du **complément** ont été parmi les premiers, après le locus du CMH, à être étroitement liée au LES (*Leffler et al., 2014*) et correspondent notamment aux quelques rares formes de lupus monogéniques, représentant moins de 1% des cas de LES (*Belot and Cimaz, 2012*). Un déficit en C1q est responsable dans 93% des cas du développement d'un lupus (OR=10), un déficit en C4 dans 75% des cas (C4A, OR=2 ; C4B, OR =6.5), un déficit en C1r/s dans 60 à 66% des cas et un déficit en C2 (C2, OR=5) dans 30 à 33% des cas. Ces formes de lupus sont héritées selon un mode de transmission autosomale récessive, se développent très tôt durant l'enfance et sans prédominance de sexe. Les principaux symptômes sont une photosensibilité ainsi qu'une glomérulonéphrite (**Tableau 7**). Un déficit en protéines du complément engendre notamment une clairance défaillante des corps apoptotiques (donc d'autoantigènes) ainsi que de complexes immuns. De plus, la présence d'auto-anticorps anti-C1q au cours du lupus est très fréquente et serait notamment corrélée à la néphrite lupique dans une cohorte de patients lupiques chinois (*Yang et al., 2012*). Ces auto-anticorps pourraient mimer une déficience en C1q et ainsi déstabiliser la clairance des corps apoptotiques par exemple.

Déficit en complément	Fréquence des manifestations lupiques	Principales atteintes cliniques	Mode de transmission
C1q	93%	GN, atteinte du SNC, photosensibilité	Autosomal récessif
C1r/C1s	57%	GN dans 30% des cas, atteinte systémique	Autosomal récessif
C4	75%	GN dans 30% des cas, atteinte systémique	Autosomal récessif
C2	10-25%	Photosensibilité et arthrite prédominantes, GN rare, anticorps anti-Ro fréquents et ANA faibles	Autosomal récessif

Tableau 7 : Description des cas de lupus monogéniques dus à des déficits en protéines du complément.
 ANA : Autoanticorps anti-nucléaires ; SNC : Système Nerveux Central. Adapté de (Belot and Cimaz, 2012).

Les récepteurs du complément telle que l'intégrine $\alpha M\beta 2$ (aussi appelée Mac-1 ou **CR3**) sont majoritairement présents sur les phagocytes (macrophages, neutrophiles, monocytes), vrais « nettoyeurs » de l'organisme. Ils sont capables de fixer et phagocyter les complexes recouverts des protéines du complément (ex : cellule mourante). Les GWAS menés sur des patients lupiques en Europe ont reporté un SNP sur le locus de la sous-unité **ITGAM** (CD11b) de récepteur CR3 (*rs1143679*) (Nath et al., 2008). Une méta-analyse des données de 21 études examinant l'association de ce variant avec le lupus, a permis de le valider en tant que gène candidat dans différentes populations : européenne (13 études), asiatique (2 études), latino-américaine (4 études) et africaine (1 étude) (Lee and Bae, 2015).

Les récepteurs aux fragments Fc, localisés sur les cellules myéloïdes, permettent aussi la reconnaissance des complexes immuns et leur élimination par phagocytose. Des défauts de ces récepteurs sont retrouvés au cours du lupus et seront décrits dans la partie concernant l'immunité innée (**Partie B7.3.4.2**)

B7.3.4.1.2 GÈNE RELATIF À LA NETOSE

Mises à part les cellules apoptotiques, le phénomène de **NETose**, propre aux neutrophiles, est aussi une source d'exposition de matériel du soi, puisque les NETs comprennent aussi bien des granules que de l'ADN ou des histones. L'enzyme responsable de la dégradation de ces produits est la DNase I (Hakkim et al., 2010). La délétion de la **DNase I** chez la souris induit la production d'autoanticorps anti-nucléaires et le dépôt de complexes immuns au niveau des gloméruli (Napirei et al., 2000). Chez l'Homme, deux cas de lupus juvénile, appartenant à deux familles différentes, ont été reportés avec une mutation de la DNase I (172A → T), et présentaient des taux élevés d'autoanticorps anti-nucléosomes (Yasutomo et al., 2001). Une seconde étude, menée en Espagne démontre, que l'activité de l'enzyme est bien moindre chez les patients lupiques que chez contrôles. Ils recensent aussi 3 nouvelles mutations dans le gène de la DNase I qui aurait pour conséquence de réduire ses fonctions (Bodano et al., 2004).

B7.3.4.1.3 GÈNE IMPLIQUÉ DANS LE MÉTABOLISME DE L'ADN

Les autoantigènes principalement ciblés par les autoanticorps au cours du lupus sont principalement des autoantigènes nucléaires dont font partie les acides nucléiques. Un lien a été établi entre un déficit pour une endonucléase à ADN, un excès d'ADN et une production importante d'IFN α . En effet, un déficit pour l'endonucléase **TREX1** entraîne un excès d'ADN dans les cellules et une activation de la voie IFN α , de façon indépendante des TLR. Chez l'homme, les mutations homozygotes de *TREX1* sont responsables du syndrome d'Aicardi Gouttière (encéphalopathie précoce, leucodystrophie, hyperproduction d'IFN α). Les mutations hétérozygotes de *TREX1*, sont, quant à elles, responsables d'un lupus engelure, une forme de lupus exclusivement cutanée à transmission autosomale dominante et caractérisée par des lésions ulcéreuses chroniques des extrémités (*Lee-Kirsch et al., 2007*). Les cas de lupus relatifs à une mutation de *TREX1* sont cependant extrêmement rares (0.5 à 2% des LES) (*Namjou et al., 2011*).

B7.3.4.2 GÈNES DE SUSCEPTIBILITÉ AU LES IMPLIQUÉS DANS LA RÉPONSE IMMUNITAIRE INNÉE

B7.3.4.2.1 GÈNES DE LA VOIE INTERFÉRON

Une **signature IFN** est retrouvée chez les patients lupiques. En effet, en 2003, Pascual et ses collaborateurs démontrent par une technique de microarray faite sur l'ARN de PBMCs de patients, que parmi une quarantaine de gènes retrouvés surexprimés chez les patients, plus de 30 d'entre eux font partie des cibles de l'IFN (*Bennett et al., 2003*). De plus, les taux d'IFN-I (α et β), principalement produits lors d'une réponse anti-virale par les cellules myéloïdes telles que les monocytes et surtout les pDC, sont retrouvés élevés chez les patients lupiques.

Plus tard, des SNP situés dans les gènes **TYK2** (Tyrosine kinase 2) et **STAT4** (Signal transducers and activators of transcription 4) codant pour des protéines situées en aval du récepteur aux IFN-I (IFNAR), ont été décrits comme plus fréquemment associés au LES (*Cui et al., 2013*). De façon intéressante, les patients lupiques (de type caucasien ou asiatique) portant le variant *rs7574865* de *STAT4* semblent développer la maladie plus précocement, sont plus préposés à développer une néphrite et à produire une plus grande quantité d'autoanticorps anti-ADNdb comparé aux autres patients (*Taylor et al., 2008*). Néanmoins, l'impact qu'a ce variant sur l'expression de *STAT4* n'est pas encore clair, bien que chez la souris lupique, il ait été montré que la déficience en *Stat4* diminuait la néphrite, suggérant donc que ce soit un gain de fonction de *STAT4* qui pourrait être lié au développement d'un LES (*Jacob et al., 2003*).

D'autre part, des variants associés au LES ont été trouvés au niveau des gènes codant pour les facteurs de transcription **IRF5** et **IRF7**, requis pour la transcription des gènes liés à la voie de l'IFN- α . Ces facteurs sont situés en aval des voies des TLR endosomaux, tels que le TLR7 et TLR9, notamment sollicités lors d'une infection virale. Ces variants « gain de fonction » de IRF5 et IRF7 induisent non seulement une augmentation de l'IFN- α sérique mais seraient aussi associés à la production d'autoanticorps (*Salloum and Niewold, 2011*). De plus, plusieurs études ont montré une expression altérée des TLR7 et 9 chez les patients lupiques, ainsi qu'une forte corrélation entre une forte expression des TLR7 et TLR9 et une production élevée d'IFN α (*Komatsuda et al., 2008*).

B7.3.4.2.2 GÈNES DE LA VOIE NF- κ B

Certains gènes impliqués dans la voie NF- κ B, voie impliquée dans les réponses immunitaires, la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire notamment, ont aussi été associés à une susceptibilité accrue à développer un lupus. Par exemple, des SNP au niveau des gènes codant pour **TNFAIP3 (A20)** (*Wang et al., 2013*) ou **TNIP1** (*Gateva et al., 2009*), régulateurs négatifs de la voie NF- κ B, ont été associés au LES. Ces variants induisent une diminution de l'expression des deux protéines. A l'inverse, un variant du gène codant pour l'ubiquitine ligase **UBE2L3** (enzyme capable d'activer la voie NF- κ B), retrouvé plus fréquemment chez des patients lupiques, induit une surexpression de la protéine (*Zuo et al., 2014*). Ainsi, l'ensemble de ces variations génétiques favorise l'activation de la voie NF- κ B. Des SNP identifiés dans le gène codant pour **IRAK1**, kinase impliquée très en amont de la voie NF- κ B et dont le gène est situé sur le chromosome X, ont également été identifiés mais les conséquences fonctionnelles de ces variants ne sont pas encore comprises (*Kaufman et al., 2013*).

B7.3.4.2.3 GÈNES DES RÉCEPTEURS DES FRAGMENTS Fc DES Ig

Enfin, les récepteurs des fragments Fc des Ig représentent une famille de récepteurs importante pour les cellules myéloïdes, aussi bien pour leur activation (FC γ RIIA, IIIA, IIIB) et leur inhibition (FC γ RIIB), que pour leur rôle dans la clairance des corps apoptotiques ou des complexes immuns. De multiples membres de cette famille ont été associés au LES. Tout d'abord, des SNP associés au LES ont été identifiés au niveau des gènes codant pour les récepteurs activateurs **FC γ RIIA** (CD16a, exprimé sur les NK, macrophages et monocytes) et **FC γ RIIB** (CD16b, exprimé sur les neutrophiles). Ces SNP diminuent l'affinité des récepteurs pour les Ig. En effet, pour exemple, le variant F158 de CD16a retrouvé associé à la maladie lupique a une affinité plus faible pour les IgG1 et IgG3 que le variant V158 (*Koene et al., 1997*) (*Karassa et al., 2003*). De plus, des études menées sur la recherche de CNV ont montré qu'un nombre plus faible de copies du gène *FCGR11B* était corrélé à la maladie (*Morris et al., 2010*). En effet, le risque de LES augmente avec la perte d'affinité du récepteur

pour les Ig, puisqu'une diminution de la clairance dépendante des récepteurs Fc contribuerait au développement de la néphrite lupique.

D'autre part, un variant du récepteur négatif **FcγRIIB** (T232) a été recensé. Ce récepteur joue également un rôle très important dans la régulation négative des LB, en plus des cellules myéloïdes. Le variant décrit serait issue d'une délétion, rendant le récepteur négatif non-fonctionnel, donc incapable de transduire le signal inhibiteur dans la cellule (*Floto et al., 2005*). D'ailleurs la diminution de FcγRIIB dans le modèle lupique (NZBxNZW)F1 résulte en la production plus importante d'anticorps anti-nucléaire, une splénomégalie, une glomérulonéphrite et une augmentation de la mortalité (*Crampton et al., 2014*).

B7.3.4.3 GÈNES DE SUSCEPTIBILITÉ AU DÉVELOPPEMENT DU LES IMPLIQUÉS DANS LA RÉPONSE IMMUNITAIRE ADAPTATIVE

Les LB et LT sont finalement les acteurs principaux de la pathogénèse lupique notamment de par leur implication dans la production d'autoanticorps et leur action pro-inflammatoire. Il n'a donc pas été étonnant de retrouver des gènes impliqués dans leurs voies de signalisation et d'activation lors des études génétiques réalisées chez des patients lupiques.

B7.3.4.3.1 GÈNES RELATIFS AUX LB

Tout d'abord, un certain nombre de gènes impliqués dans la voie de signalisation du BCR ont été associés au LES. Pour exemple : **BANK1**, protéine adaptatrice des LB et capable de moduler l'activation de la cellule via le flux calcique et **LYN**, protéine à activité tyrosine kinase, partenaire de BANK1 et capable d'inhiber l'activation de la cellule B. En effet, des polymorphismes de leurs gènes (4 pour *BANK1*, associés à une surexpression de la protéine et 1 pour le gène *LYN*, associé à une diminution de son activité de régulateur négatif) ont été retrouvés chez des patients lupiques de cohortes européennes, et ont été associés à l'hyperactivation des LB au cours du LES (*Harley et al., 2008, Kozyrev et al., 2008*). Ces mêmes polymorphismes ne sont, en revanche, pas retrouvés au sein des cohortes asiatiques.

Par contre, deux SNPs reportés pour **BLK**, kinase importante pour le développement du LB, ainsi que pour son activation, ont été associés à la fois pour les populations européennes et asiatiques (*Harley et al., 2008, Deng and Tsao, 2010*). Le variant *rs13277113* serait associé à une diminution de son expression. Le rôle précis de ce polymorphisme dans la maladie n'est pas encore clairement identifié.

Plus en aval de la signalisation du BCR, les protéines **PRKCB** (Protéine kinase C bêta, impliquée dans la voie du BCR) et **RasGRP3** (protéine associée à la prolifération des LB et à la

production d'anticorps via son rôle dans la voie de signalisation Erk/Ras), ont plus récemment été associées au lupus. La première en 2011, après une ré-analyse du GWAS de 2009 réalisé sur une population chinoise ainsi que par séquençage d'exome d'une famille malade, et la seconde en 2013 après une analyse statistique effectuée sur l'ensemble des résultats d'un GWAS asiatique et de 3 cohortes caucasiennes (finlandaise, suédoises et USA). Ainsi, la dérégulation de ces deux protéines au cours du lupus tendrait à engager les voies activatrices du LB.

Enfin, **PTPN22** (ayant des fonctions de régulateur négatif) a été impliqué dans plusieurs MAI dont le lupus. Le variant R620W est le plus associé au lupus chez l'Homme. Le variant homologue murin (R619W) a été étudié grâce au développement d'un modèle murin exprimant ce variant spécifiquement dans les LB. Cette modification est suffisante pour conduire des signes d'autoimmunité, à savoir une splénomégalie, la production d'anticorps anti-ADNdb et des lésions glomérulaires (*Dai et al.*, 2013). Bien que la protéine PTPN22 puisse moduler la voie du BCR, elle est plus connue comme étant un régulateur négatif de la voie du TCR en induisant la déphosphorylation des kinases Lck, Fyn et ZAP70.

B7.3.4.3.2 GÈNES RELATIFS AUX LT

Comme énoncé ci-dessus, le variant le plus connu de **PTPN22** dans le lupus est la mutation R620W qui correspond à un gain de fonction. Ce variant a été reporté dans plusieurs populations à travers le monde (ex : Suède, Espagne, Pologne, Amérique du Nord et Egypte)(*AS et al.*, 2014). Ce gain de fonction peut augmenter le seuil de la sélection au niveau thymique, donc favoriser la présence de cellules T autoréactives et conjointement faciliter la production d'autoanticorps.

Le gène codant pour **FYB** (FYN Binding-Protein, capable d'activer la voie Ras des MAPK) a été trouvé sous-exprimé dans les LT de patients lupiques actifs et quiescents, et certains de ses variants ont été associés au lupus et à certaines de ses manifestations cliniques, comme la production d'autoanticorps anti-ADNdb (*Addobbati et al.*, 2013). FYB serait notamment impliqué dans le contrôle de l'expression de l'IL-2.

B7.3.4.3.3 GÈNES RELATIFS À LA COOPÉRATION LB/LT

Le locus du CMH contient plus de 200 gènes chez l'Homme. Il est divisé en 3 grands segments, les segments du CMH-I et CMH-II, codant pour les molécules du CMH-I et CMH-II, et le segment du CMH-III codant notamment pour certaines protéines du complément ou certaines

cytokines comme le TNF- α . Rappelons que les LB sont d'importantes cellules présentatrices d'antigènes pour les LT CD4⁺ via le CMH-II.

Les loci présents dans le locus du CMH ont été les premiers à être associés à la maladie lupique. Une méta-analyse de tous les résultats obtenus sur les gènes du locus du CMH depuis les années 1970 a permis d'identifier les allèles **HLA-DR2**, **HLA-DR3** comme les associations les plus fortes avec le développement du LES (*Fernando et al., 2007*). Les associations impliquant les différents allèles peuvent être expliquées par un modèle dans lequel la sensibilité à développer une autoimmunité serait dictée par les différences dans la capacité des différents variants alléliques des molécules de CMH à présenter des peptides autoantigéniques à des LT potentiellement autoréactifs. En effet, une étude a montré que le variant *rs2187668* du locus HLA-DR3 est fortement associé à la production d'anticorps dirigés contre l'ADNdb chez l'Homme (*Chung et al., 2011*). Une étude plus ancienne, basée sur la génération de modèles murin lupiques possédant l'allèle humaine HLA-DR2 ou HLA-DR3 démontre, au contraire, que l'allèle HLA-DR2 et non l'allèle HLA-DR3 est capable d'induire une augmentation de la production d'anticorps anti-ADNdb.

Enfin, les différents couples de **molécules de co-stimulation**, tels que CD28/CD80, CD40/CD40L et OX40/OX40L (TNFSF4), sont aussi extrêmement importants pour les échanges entre LB et LT. Un SNP se trouvant dans le gène codant pour **OX40L** a été trouvé (variant *rs2205960*) et aurait pour conséquence d'augmenter l'expression d'OX40L et ainsi de favoriser l'interaction OX40/OX40L et maintenir l'activation du LT (*Cunningham Graham et al., 2008*). Il y a quelques mois, un nouveau rôle du signal OX40/OX40L dans le lupus a été identifié. Ce serait de promouvoir la différenciation des LTh CD4⁺ en LT_{FH} (*Jacquemin et al., 2015*). Cette même étude suggère que la surexpression d'OX40L à la surface des monocytes pourrait être la conséquence d'une activation du TLR7 par de l'ARN endogène.

B7.3.4.3.4 GÈNES IMPLIQUÉS DANS LE DÉVELOPPEMENT DE CELLULES EFFECTRICES

Enfin, l'activation des LB et des LT mène au développement de **cellules effectrices** telles que **les LT CD4⁺ Th17** (rôle pro-inflammatoire) et **les PC** (production d'(auto)anticorps). Le gène **Ets1** (Avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog-1) code pour un facteur de transcription notamment impliqué dans la régulation négative de la différenciation des LTh17 et des LB. Ets1 a été identifié comme un nouveau locus de susceptibilité au développement du lupus au sein de la population Han chinoise (*Han et al., 2009*). Le variant *rs6590330* serait associé à une diminution de l'expression d'*Ets1*. Un article très récent explique que ce variant favoriserait la liaison de pSTAT1 à

son site de liaison, qui, associée à la diminution d'Ets-1, induirait la différenciation terminale des LB en cellules sécrétrices d'IgM (Lu *et al.*, 2015).

Blimp1, impliqué dans la différenciation terminale des LB en PC, et *ATG5*, protéine clé du mécanisme autophagique également essentiel à la différenciation des LB, peuvent potentiellement avoir un rôle dans la pathogénie lupique, étant donné leurs fonctions biologiques. La région génique **BLIMP1-ATG5** (chromosome 6) a été retrouvée associée à la pathologie dans différentes populations (chinoise (Han *et al.*, 2009), caucasienne (Gateva *et al.*, 2009)). Le variant *rs548234*, correspondant à un SNP au niveau de la région intergénique est le plus fortement associé à la pathologie. Il aurait pour conséquence d'augmenter l'expression d'*ATG5* et de favoriser la différenciation plasmocytaire (Zhou *et al.*, 2011).

B7.3.4.4 RÔLE D'ANOMALIES DU CHROMOSOME X DANS LE LUPUS

Un certain nombre des gènes cités ci-dessus comme étant associés au lupus ont une localisation bien particulière : ils se situent au niveau du chromosome X. C'est notamment le cas des gènes codant pour **IRAK1**, kinase médiatrice de la voie NF-κB, **CD40L**, ou encore le **TLR7**. Une mauvaise inactivation de l'un des deux chromosomes X chez la femme (par exemple due à un défaut de méthylation, voir partie B7.2.2) peut potentiellement induire une surexpression de l'un ou l'autre gène et promouvoir le développement d'une autoimmunité (Kaufman *et al.*, 2013) (Lu *et al.*, 2007).

C'est le cas de la protéine de co-stimulation **CD40L**, fréquemment retrouvée surexprimée à la surface des LT CD4⁺ chez les femmes lupiques. Cette surexpression serait la conséquence d'une déméthylation du chromosome X normalement inactivé. En effet, au lieu de présenter un gène CD40L déméthylé (actif) et un gène méthylé (inactif), les patientes lupiques auraient une double méthylation d'où une double expression de *CD40L* (Lu *et al.*, 2007). Ces données ne sont pas retrouvés chez les hommes lupiques, qui eux présentent une expression « normale » de CD40L. Ce résultat a été confirmé et complété en 2013 par une étude visant à identifier les gènes surexprimés dans les LT CD4⁺ de femmes lupiques, causé par une déméthylation du chromosome X. Ajouté à la surexpression de CD40L, les surexpressions de CXCR3 ou encore de certains miRNA (miR-98 et miR-421) ont été identifiées. Ces miRNA auraient en partie pour cible commune la protéine CBL (c-CBL, E3 ubiquitin-protein ligase CBL), ayant pour fonction de diminuer l'activation des LT, notamment en inhibant la protéine ZAP70, importante dans la voie du TCR (Hewagama *et al.*, 2013).

B7.3.4.5 AUTRES GÈNES DE SUSCEPTIBILITÉ AU LUPUS

Considérant leur rôle pro-inflammatoire, les ROS ont été impliqués dans l'initiation des MAI dont le lupus. Plusieurs SNPs dans le gène humain *NCF2*, codant pour une sous-unité de l'oxydase

NADPH, ont été identifiés chez des patients lupiques d'origines ethniques différentes. Certains de ces polymorphismes pourraient altérer les fonctions de l'oxydase NADPH (Kim-Howard *et al.*, 2014).

Néanmoins, un certain nombre de gènes associés au lupus ont encore **une fonction inconnue** dans le SI, comme par exemple : UHRF1BP1 ou CLEC16A, pour lesquels des études fonctionnelles plus larges doivent être effectuées (Dai *et al.*, 2014).

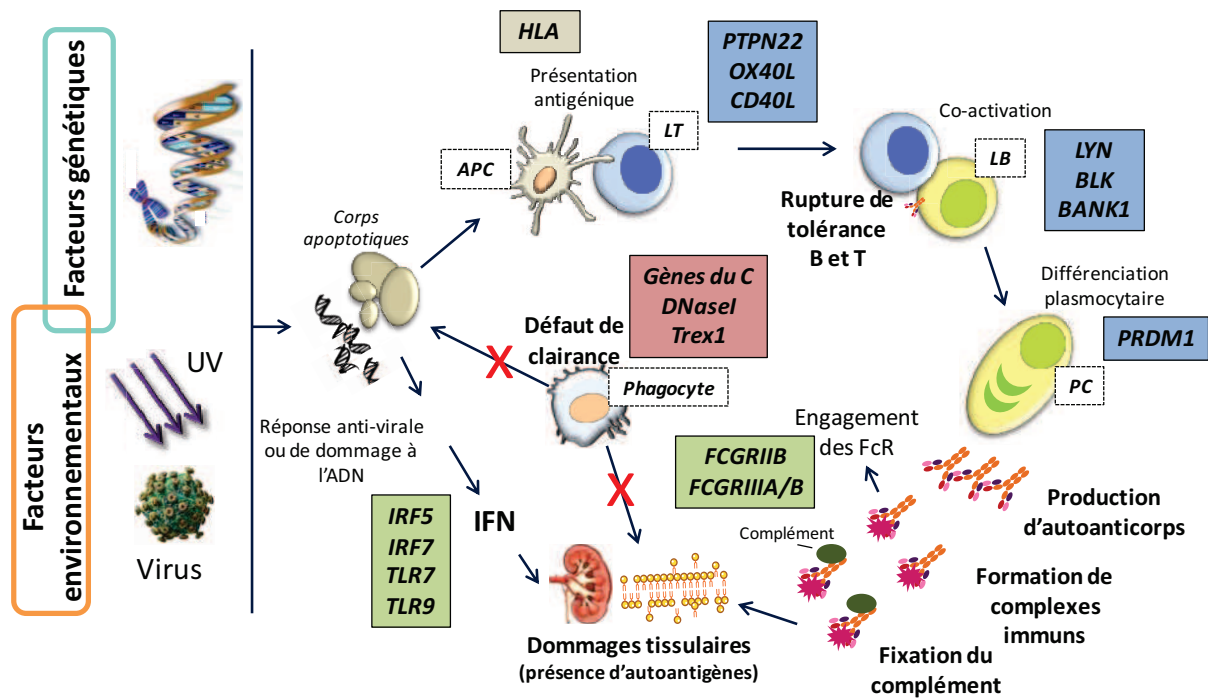


Figure 37 : Schéma de la physiopathologie de lupus avec la localisation des principaux gènes associés à la maladie.

Gènes de l'immunité innée, gènes de l'immunité adaptative, cas de lupus monogénique. Gènes du C : gènes codant pour les protéines du complément. Adapté de (Crampton *et al.*, 2014).

	Nom du gène	Position	Fonction	Odd ratio
<i>Clairance des corps apoptotiques</i>	C1Q	1p36	Protéine du complément	Env. 10
	C4A	6p21	Protéine du complément	6.5
	C4B	6p21	Protéine du complément	2.0
	C2	6p21	Protéine du complément	Env. 5
	ITGAM	16p11.2	Intégrine (sous-domaine de CR3)	1.3-2.1
	DNase1	16p13.3	Endonucléase	Mutation rare
	ATG5	6q21	Protéine impliquée dans la formation des vésicules autophagiques	1.2-1.3
	TREX1	3p21.31	Exonucléase	25 rare
<i>Immunité innée</i>	TYK2	19p13	Tyrosine kinase, famille des JAK (Expression de cytokine)	1.6
	STAT4	2q32	Facteur de transcription (voie de l'IL-12 & différenciation des LT helper)	1.4-1.8
	IRF5	7q32	Facteur de transcription (Induction des IFN-I)	1.3-1.9
	IRF7	11p15	Facteur de transcription (Induction des IFN-I)	1.3-2.0
	TLR7	Xp22	TLR endosomal, reconnaissance de l'ARN simple brin	1.2-2.3
	TLR9	3p21.3	TLR endosomal, reconnaissance des séquences CpG hypométhylées	-
	TNFAIP3	6q23	Protéine inhibitrice de la voie NF-kB	1.7-2.3
	TNIP1	5q33.1	Interagit avec TNFAIP3, inhibiteur de la voie NF-kB	1.2-1.4
	IRAK1	Xq28	Serine/Thréonine kinase (Voies TLR & IL-1R)	1.1-1.6
	UBE2L3	22q11.21	Enzyme E2 ubiquitine ligase	1.2-1.4
	FCGR1IB	1q23	Récepteur de surface des fragment FC des IgG (Phagocytose & clairance)	1.3-2.5
	FCGR3IA	1q23	Récepteur de surface des fragment FC des IgG (Phagocytose & clairance)	1.2-1.5
	FCGR3IB	1q23	Récepteur de surface des fragment FC des IgG (Phagocytose & clairance)	1.7-2.3
<i>Immunité adaptative</i>	BANK1	4q24	Protéine adaptatrice des LB (Voie du BCR)	1.2-1.4
	LYN	8q13	Protéine à tyrosine kinase (Voie du BCR)	1.2-1.3
	BLK	8p23	Protéine kinase (prolifération & différenciation des LB)	1.2-1.6
	PRKCB	16p11.2	Protéine à serine/thréonine kinase (Activation des LB)	1.2
	RasGRP3	2p25-p24	Fonction GTPase/ Activateur de Ras	1.2-1.4
	PTPN22	1p13.2	Protéine phosphatase (voie du BCR et TCR)	1.4-2.4
	FYB	5p13.1	Protéine adaptatrice de FYN et LCP2	2
	HLA-DR2	6p21	CMH de classe II (Présentation antigénique)	2
	HLA-DR3	6p21	CMH de classe II (Présentation antigénique)	2.2
	OX40L (TNFSF4)	1q25	Cytokine de la famille TNF – ligand de OX40	1.2-1.5
	Ets1	11q24	Facteur de transcription impliqué dans la différenciation des LTh17 et des LB	2
	PRDM1	6q21	Répresseur transcriptionnel (Différenciation des LB en PC)	1.2
	CD40L	Xq26	Molécule de costimulation	-
	<i>Autres</i>	NCF2	1q25	Sous-unité de la NADPH (Voie des pentoses phosphates)
UHRF1BP1		6p21	Interragit avec l'ubiquitine ligase UHRF1	2.2-4.4
CLEC16A		16p13.13	Protéine à domaine lectine de type C	1.2

Tableau 8 : Récapitulatif des principaux gènes associés au LES, leur localisation chromosomique, leur fonction ainsi que l'odd ratio correspondant, s'il est connu.

Adapté de (Cui *et al.*, 2013, Deng and Tsao, 2014).

B7.3.5 LES ANALYSES TRANSCRIPTOMIQUES

Les études transcriptomiques sont apparues très intéressantes suite au développement des puces à ADN/ARN (« Microarrays »), qui permettent la détection de dizaines de milliers de transcrits simultanément. Au début de leur utilisation, ces études d'expression de gènes constituaient un outil intéressant dans l'identification de marqueurs diagnostiques et pronostiques, notamment en

oncologie. Puis cet outil a été rapidement appliqué aux MAI. Contrairement aux cas de cancers, où le tissu à analyser est évident (tissu cancéreux), pour l'étude du LES, le choix des échantillons à analyser est plus délicat compte tenu du nombre d'organes et de cellules impliqués dans la pathologie. Les études transcriptomiques recensées à ce jour ont majoritairement été effectuées sur du sang périphérique, échantillon facile et rapide à prélever. Ceci permet d'analyser 1) les PBMCs (ensemble de cellules immunitaires mononucléées du sang périphérique incluant lymphocytes (75% LT, 1-10% LB et 15-24% NK), monocytes, macrophages et cellules dendritiques) ; 2) un type cellulaire spécifique, après isolation par tri. Ce type d'analyse s'avère être complémentaire aux GWAS puisque les variations géniques identifiées par les GWAS (polymorphismes) ne pourraient représenter qu'un nombre réduit des variations géniques réelles. En effet, des variations d'expression d'un gène ne sont pas toujours les conséquences d'une modification nucléotidique dans ce même gène. Ainsi les études transcriptomiques peuvent affiner et élargir l'identification de nouvelles anomalies de gènes.

B7.3.5.1 ETUDES TRANSCRIPTOMIQUES À PARTIR DE PBMCs DE PATIENTS LUPIQUES

Deux grands types d'analyses transcriptomiques réalisées à partir de PBMCs ont été réalisées : celles comparant des patients lupiques quiescents ou actifs à des personnes saines, et celles comparant des patients en phase active de la maladie à des patients en phase inactive. Il est à noter que, dans certaines études, des patients souffrant d'une autre MAI que le lupus sont ajoutés afin de repérer des anomalies spécifiques du LES.

- Patients lupiques versus contrôles

En 2003, Baechler *et al.* reportent une étude transcriptomique réalisée sur les PBMCs de 48 patientes lupiques actives traitées (25/48 avec un anti-malarique, 30/48 avec du prednisone et 14/48 avec un immunosuppresseur de type cyclophosphamide), et 41 contrôles sains (Baechler *et al.*, 2003). Sur 4500 gènes analysés par les puces, 161 gènes sont dérégulés chez les patients. Parmi les 161 gènes, certains gènes du SI s'avèrent être surexprimés pour l'ensemble des patients, comme par exemple ceux codant pour : CD69, Fas, FCγRIIA ou l'IL-1β, et d'autres sous-exprimés dont certains gènes spécifiques des LT comme ceux codant pour : Lck, TCRδ, TCRβ. De plus la moitié des patients présentent une signature IFN (de type I et II), qui, de plus, serait corrélée avec l'activité de la maladie (basée sur les critères ACR).

- Patients actifs versus patients inactifs

Une étude de 2004, incluant 14 patients actifs et 12 patients inactifs a permis d'identifier, parmi 375 gènes analysés dans leurs PBMCs, une surexpression de 14 gènes et une sous-expression

de 15 gènes durant la phase inactive. Les gènes retrouvés sous-exprimés en phase inactive sont des gènes qui ont un rôle dans l'activité de la maladie comme par exemple ceux codant pour la cytokine IL-17 ou le récepteur au TNF, TNF-RII. Néanmoins, cette équipe ne discute pas des gènes retrouvés surexprimés lors de la phase d'inactivité. Ces gènes pourraient pourtant potentiellement jouer un rôle dans la phase de quiescence (*Rus et al., 2004*).

Une autre étude, cette fois-ci réalisée sur les cellules mononucléées de la MO de 11 patients lupiques actifs et 9 inactifs, a montré un large panel de gènes surexprimés chez les patients actifs comparés aux patients inactifs (*Nakou et al., 2008*). Cela inclut des gènes codant pour des protéines impliquées dans la présentation antigénique (ex : CD74, HLA-A & HLA-C) ; dans la granulopoïèse (ex : ELA2) ou encore dans la réponse immunitaire (ex : LYN et CXCR4).

B7.3.5.2 ETUDES TRANSCRIPTOMIQUES À PARTIR DE POPULATIONS CELLULAIRES TRIÉES DE PATIENTS LUPIQUES

Ainsi, face aux problèmes d'hétérogénéité observés au cours des analyses de transcriptome de PBMCs, mais aussi face à la volonté d'élucider le rôle de chaque composant cellulaire au cours de la pathologie, des analyses transcriptomiques réalisées sur cellules triées ont été développées.

- PBMCs versus cellules triées

Dans les études précédentes réalisées sur les PBMCs, des différences dans la proportion des sous-populations présentes dans les PBMCs de patients par rapport aux contrôles ont été soulevées. Afin de vérifier l'importance de ce fait sur la signature génique particulière des patients, Lyons *et al.* ont effectué une analyse comparative de l'expression des gènes entre des PBMCs et différents types cellulaires triés (LB CD19⁺, LT CD4⁺, LT CD8⁺, monocytes CD14⁺ et neutrophiles CD16⁺) à partir de ces mêmes PBMCs. La cohorte utilisée pour cette étude est composée de 25 personnes saines et 13 femmes en phase active de la maladie lupique, mais ayant été diagnostiquées peu de temps avant l'étude donc n'étant pas encore sous médication, ou avec de très faibles doses de médicaments (*Lyons et al., 2010*).

Il en résulte de cette étude :

- 1) Le transcriptome des PBMCs met en évidence une signature IFN, qui serait d'origine granulocytaire et plasmablastique. La signature granulocytaire s'explique par une contamination de granulocytes immatures parmi les PBMCs des patientes testées, malgré un tri par Ficoll. Ces cellules seraient de type granulocytaire mais auraient une morphologie de type monocyte. Les potentielles raisons de cette contamination ne sont pas expliquées. La

signature plasmablastique au sein des LB CD19⁺ et présente chez 2/3 des patientes, est corrélée à l'hypergammaglobulinémie de type IgG et aux taux d'autoanticorps anti-ADNdb sériques, mais aussi à l'activité de la maladie (mesurée par le score BILAG).

- 2) Alors que le nombre de gènes différentiellement exprimés entre les patients et les contrôles s'élève à 229 pour le transcriptome des PBMCs, plus de 1600 gènes différentiellement exprimés sont identifiés avec les transcriptomes des cellules purifiées. Il y a donc peu de recoupement entre l'analyse transcriptomique des PBMCs et des cellules isolées (86% des gènes de l'analyse des cellules triées ne sont pas retrouvés dans l'analyse des PBMCs). D'ailleurs les signatures plasmablastique et granulocytaire ne sont pas ni retrouvées au sein des LB ni des neutrophiles isolés, respectivement. Cela suggère que ces signatures sont probablement dues à la composition anormale des PBMCs chez les patients et non pas à une différence d'expression des gènes propres à ces cellules. Cependant, la signature IFN est présente dans toutes les populations cellulaires et grâce au tri, une signature d'hyperactivation des LT CD4⁺ est apparue.

- Etude transcriptomique sur des LT CD8⁺ triés de patients lupiques

Une étude transcriptomique initialement réalisée sur des LT CD8⁺ de patients atteints de AAV (Associated Vasculitis) avait permis de distinguer deux sous-groupes de patients suivant leur profil d'expression génique. En effet, une partie des patients (sous-groupe 1) présentaient en commun une surexpression de gènes impliqués dans la signalisation du TCR, dans la voie de l'IL-7R et dans la différenciation des LT mémoires. Il s'est avéré que ce sous-groupe 1 souffrait d'une maladie plus sévère et bénéficiait de périodes de quiescence moins longues que le sous-groupe 2 (*McKinney et al., 2010*). Afin d'évaluer si ce type de résultats étaient transposables à d'autres MAI, la même étude sur des LT CD8⁺ de patients lupiques a été réalisée. De façon équivalente, un sous-groupe présentant une surexpression des gènes impliqués dans la voie du TCR, de l'IL-7R et de la différenciation des cellules mémoires était le groupe le plus concerné par des poussées sévères de la maladie. Les auteurs suggèrent que ce type de signature génique pourrait servir de marqueur pronostique des deux maladies.

- Etude transcriptomique sur des LB CD19⁺ triés de patients lupiques

Concernant les LB, une seule étude utilisant des puces à ADN, démontre l'existence de 8 gènes dérégulés dans des LB CD19⁺ triés à partir de 6 patients lupiques et de 6 contrôles. Ces gènes, dont le nom n'est pas mentionné dans la publication, seraient situés dans des loci préalablement identifiés comme susceptibles au développement du LES et d'autres MAI (*Trevisan et al., 2006*).

 B7.3.5.3 PRÉSENTATION DE L'ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE RÉALISÉE AU LABORATOIRE SUR LES LYMPHOCYTES B DE PATIENTS LUPIQUES

- But de l'étude

Comme cela a été énoncé auparavant, de nombreux acteurs cellulaires sont mis en jeu dans la pathogénèse complexe du lupus, parmi lesquels les LB jouent un rôle central. Dans la partie **B5**, nous avons mis en évidence un rôle intrinsèque des LB dans la susceptibilité à développer un LES. En effet, par exemple, rappelons que le simple transfert de cellules pré-B provenant du modèle lupique (NZBxNZW)F1 dans une souris SCID immunodéficientes entraîne le développement de traits autoimmuns (*Reininger et al., 1992*).

Durant les dernières années, le phénotype des LB en contexte lupique a montré des anomalies de sous-populations des compartiments naïf, B1, mémoire et des cellules sécrétrices d'anticorps. De plus, les GWAS ont permis de mettre en évidence des gènes de susceptibilité au développement de la maladie, dont certains sont liés à la fonction des LB (*BANK1, LYN, BLK,..*) . Néanmoins, une seule étude s'est portée sur les anomalies d'expression géniques intrinsèques aux LB. Ces anomalies pourraient pourtant largement contribuer à une meilleure compréhension du rôle de ces cellules dans le LES. C'est pourquoi, **une analyse transcriptomique** de LB périphériques de patients lupiques en phase inactive de la maladie et sans traitement immunosuppresseur a été réalisée, en 2010, par notre laboratoire (*Garaud et al., 2011*).

- Caractéristiques de l'étude

Pour cette étude, 17 patients lupiques (15 femmes et 2 hommes) présentant un SLEDAI ≤ 4 et sous faible médication et 10 contrôles sains (8 femmes et 2 hommes) ont été choisis. Les patients ont été sélectionnés en phase quiescente (depuis au moins 6 mois) dans le but de mimer la période précédant la maladie et d'identifier les gènes dérégulés de façon intrinsèque, et d'éviter ainsi de détecter des anomalies d'expression des gènes qui pourraient être dues à l'activité de la maladie (**Tableau 9**).

Après prélèvement du sang périphérique de chacune des 27 personnes, les LB CD19⁺ ont été triés par cytométrie en flux, puis l'analyse des transcrits a ensuite été faite grâce à des puces à ARN pangénomiques recensant plus de 54 000 sondes. Dans les LB, un signal positif pour 18 000 d'entre elles a été mesuré.

Patient n°	Age	Sex	Duration of disease (years)	SLEDAI	IgG levels (g/l)	ANAs titre	Anti-dsDNA	Steroids	Chloroquine
1	36	F	3	0	8.49	1/160	-	-	-
2	59	F	20	3	8.15	1/1280	+	-	+
3	38	F	18	0	8.29	1/1280	-	-	+
4	37	F	9	2	7.3	1/640	+	+	+
5	36	F	8	4	7.22	1/1280	+	-	-
6	36	F	9	0	10.2	1/160	-	-	-
7	41	M	9	0	11.2	1/640	-	-	-
8	55	F	15	4	13.8	1/320	-	-	-
9	47	F	9	0	15.9	1/320	-	-	-
10	36	F	12	4	7.68	1/1280	+	-	-
11	37	F	8	2	9.47	1/1280	+	+	+
12	53	F	19	0	9.76	1/1280	-	+	+
13	30	F	2	0	7.8	1/160	-	-	+
14	41	F	7	0	11.9	1/1280	-	+	+
15	23	M	8	4	7.3	1/640	+	-	+
16	37	F	18	4	8.07	1/1280	+	-	+
17	50	F	26	0	10.5	1/640	-	-	+

Disease and treatment were stable for at least 6 months. SLEDAI: Systemic Lupus erythematosus disease activity index; IgG normal range: 7–14 g/l, ANA: antinuclear antibodies.

Tableau 9 : Caractéristiques cliniques, activité de la maladie et médications apportées aux patients au moment de l'étude.

(Garaud et al., 2011).

- Analyse des résultats de l'étude transcriptomique

Dans un premier temps, les résultats montrent que parmi les 18 000 gènes, après une analyse statistique très stringente, seulement 14 sont différenciellement exprimés entre l'ensemble des patients lupiques et l'ensemble des contrôles sains. Huit d'entre eux présentent une surexpression, et les six autres une sous-expression. Parmi les gènes sous-exprimés nous retrouvons notamment des gènes impliqués dans l'immunité innée comme ceux codant pour le TLR10 et CD1c.

Dans un deuxième temps, l'analyse des gènes a permis de réaliser une « clusterisation » des profils d'expression des personnes. C'est ainsi qu'un sous-groupe de 5 patients a été identifié, car ils présentaient le même profil d'expression, comparé aux personnes saines mais aussi aux autres patients (**Figure 38**). L'analyse statistique suggère qu'environ 800 gènes sont différenciellement exprimés chez ce sous-groupe. Des études complémentaires ont été menées afin d'évaluer les causes de ce profil d'expression particulier. Il en résulte que ce profil identique n'est dû ni à : 1) un phénotype clinique partagé entre les 5 patients ; 2) à une anomalie identique de la répartition des sous-populations B, en comparaison aux 12 autres patients.

Enfin, afin de ne repérer que des défauts intrinsèques aux LB, le laboratoire a souhaité affiner la liste des 800 gènes en « éliminant » les gènes dont la dérégulation d'expression pourrait potentiellement être due à l'activation de du LB par des facteurs extrinsèques. Pour cela, ils se sont basés sur une étude de transcriptome, réalisée par Zhu *et al.* qui s'intéressait aux gènes dont

l'expression est dérégulée dans des LB stimulés *in vitro* par 33 ligands différents, par exemple l'IL-4, le CD40L, ou encore le LPS (Zhu *et al.*, 2004).

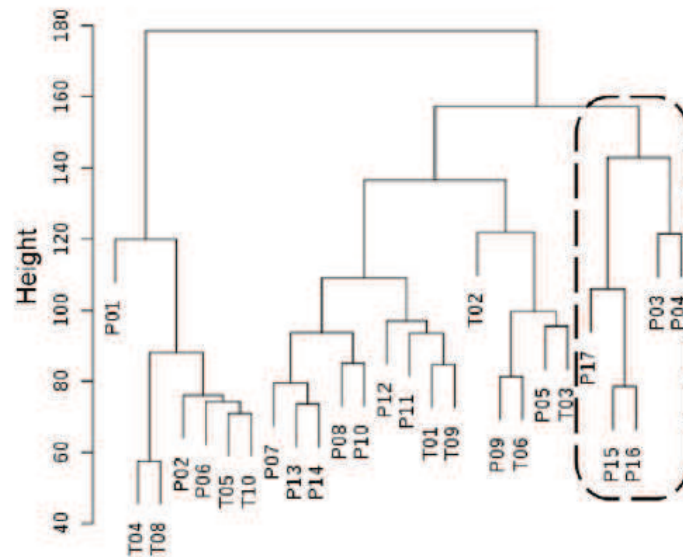


Figure 38 : Dendrogramme obtenu après clusterisation des résultats des microarrays des 17 patients et des 9 contrôles.

Un sous-groupe de 5 patients (entouré) se distingue des autres patients avec un profil d'expression commun. (Garaud *et al.*, 2011).

- Conclusion de cette analyse transcriptomique

Lorsque l'analyse statistique est réalisée sur l'ensemble des patients lupiques en phase quiescente, il ressort une importante similarité au niveau transcriptomique entre des LB de patients et des LB de personnes saines. Une seconde analyse par clusterisation hiérarchique a permis de regrouper les patients en fonction de leur profil d'expression dont un sous-groupe de 5 patients présentant un profil transcriptomique similaire, caractérisé par une signature IL-4 et une expression anormale de gènes liés aux fonctions du RE et notamment impliquées dans l'UPR.

Afin d'évaluer les conséquences de ces dérégulations géniques, le laboratoire a choisi de générer des modèles murins reproduisant certaines de ces anomalies. Les gènes ***FKBP11*** et ***TRIB1***, retrouvés surexprimés dans ce sous-groupe de 5 patients, et choisis pour leurs valeurs statistiques fortes et leurs fonctions connues dans la littérature, ont fait l'objet de mon projet de thèse.

PARTIE C. PRÉSENTATION DU PROJET DE THÈSE

Les **patients lupiques** souffrent d'une maladie **grave**, très **complexe** d'un point de vue étiologique, et les traitements actuels, qui visent principalement à limiter l'activité globale du système immunitaire, sont encore loin d'être optimaux. Les **LB** font partie des acteurs centraux de la maladie, caractérisés notamment par leur capacité à produire des **autoanticorps pathologiques**. Des modifications dans des gènes spécifiques des LB ont été identifiées comme associées à la maladie (BLK, LYN,..) par les techniques de GWAS. Bien que ces modifications puissent potentiellement avoir un impact fort sur le développement de la maladie (puisque les conséquences fonctionnelles de ces variants ne sont pas encore connues), elles sont retrouvées peu fréquemment dans la population lupique. **D'autres types d'analyses** peuvent être envisagées afin de mieux comprendre leur rôle dans la pathologie.

Ainsi, l'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse, a choisi de se focaliser sur : 1) l'étude de **la population B** au cours de la maladie lupique ; 2) l'identification de **variations d'expression de gènes intrinsèques** aux LB **en contexte lupique**, en plaçant l'étude à un moment précis de la maladie : la **phase quiescente**.

Ainsi, en 2010, une analyse du transcriptome des LB CD19⁺ du sang périphérique de patients lupiques en phase quiescente et de personnes saines a été réalisée à l'aide de puces à ARN pangénomiques. Cette étude a permis d'établir une liste de gènes présentant une dérégulation d'expression (sous-expression ou une surexpression) dans les LB de patients comparés aux LB contrôles. Le choix des gènes à étudier a été réalisé par la prise en compte de plusieurs critères : 1) la **fonction biologique** du gène (rôle connu dans les LB ? dans la tolérance ? dans l'autoimmunité ?) ; 2) la **valeur statistique** de la dérégulation d'expression pour ce gène (faible FDR (False Discovery Rate), forte significativité statistique).

- Le sujet principal de mon projet de thèse a consisté à comprendre quelles sont les conséquences, sur le phénotype des LB et le développement d'une autoimmunité, d'une surexpression du gène **TRIB1**, codant pour une protéine pseudokinase, par ailleurs identifiée dans les LB de patients lupiques en phase quiescente ($p^{***}=0.001$). Pour ce faire, j'ai entrepris l'étude d'un modèle murin transgénique Knock-In conditionnel reproduisant la surexpression de *Trib1* spécifiquement dans les LB.

- Par ailleurs, l'étude d'un autre gène retrouvé surexprimé chez les patients lupiques en phase quiescente ($p^{***}=0.001$), nommé ***FKBP11*** et codant pour une protéine chaperonne à activité PPlase, a été entreprise au laboratoire. Ce projet a été initié et très majoritairement investigué par une ancienne doctorante, Julie Ruer-Laventie. Mon travail a consisté à terminer cette étude jusqu'à sa publication (*Ruer-Laventie et al., 2015*).

La présentation de ces deux gènes sera faite au sein de cette même partie, puis les méthodes utilisées, et les résultats obtenus quant à la fonction des gènes *Fkbp11* et *Trib1* grâce à l'étude de modèles murins transgéniques, seront décrits en parties D, E et F, respectivement.

C1. PRÉSENTATION DU GÈNE *FKBP11*

C1.1 LA FAMILLE DES FKBP

Les protéines FKBP (FK506-Binding Protein) font partie de la famille des **immunophilines**, très largement conservée à travers le règne animal et végétal. Ces protéines ubiquitaires ont des fonctions de **protéine chaperonne** et sont caractérisées par un **domaine peptidyl-prolyl cis/trans isomerase** (PPIase) qui leur permet de participer au repliement des polypeptides à proline. Certains membres de cette famille sont connus pour interagir avec les molécules immunosuppressives FK506 et la rapamycine. Depuis leur découverte en 1989 (*Siekierka et al., 1989*), plusieurs membres ont été caractérisés et l'on dénombre à ce jour 15 FKBP chez l'Homme. Cette famille a été subdivisée en 4 sous-groupes discriminés selon leur structure protéique (**Figure 39**) (*Blackburn and Walkinshaw, 2011*). Ainsi nous retrouvons :

- Les FKBP **cytoplasmiques 12 et 12.6** : possèdent un unique domaine PPIase.
- Les FKBP **nucléaires 25 et 133** : possèdent un unique domaine PPIase ainsi que des signaux de localisation nucléaire.
- Les FKBP à **domaine TPR** (Tetratricopeptide Repeats) **36, 38, 51 et 52** : possèdent un ou deux domaines PPIase et de nombreux domaines TPR. Les domaines TPR sont souvent impliqués dans des interactions protéines-protéines (*Das et al., 1998*).

Les FKBP **de la voie sécrétoire 13, 19, 22, 23, 60, 65** : possèdent un ou 4 domaines PPIases ainsi qu'une séquence signal de localisation dans le RE.

C1.2 LA FONCTION PPIASE

C1.2.1 LES FKBP SONT DES IMMUNOPHILINES

La molécule **FK506**, connue sous le nom de tacrolimus, est produite par la bactérie *Streptomyces tsukubaensis*, et a été découverte à la fin des années 1980 au Japon comme ayant un rôle immunosuppresseur (*Goto et al., 1987*). Ses cibles, des immunophilines autrement appelées « PPIases », sont communes à d'autres immunosuppresseurs comme la rapamycine ou la cyclosporine A. Parmi ces PPIases, on retrouve la famille des **FKBP** qui, comme leur nom l'indique, lient la molécule FK506 mais aussi la rapamycine, et la famille des **cyclophilines**. Cependant, une dernière famille de PPIases existe : les parvulines. Ces protéines sont par contre incapables de se lier aux immunosuppresseurs. La protéine sérine/thréonine kinase mTOR est, en revanche, la seule protéine non-PPIase à pouvoir se fixer à la rapamycine.

FK506 peut exercer son pouvoir immunosuppresseur via une interaction avec un des membres des FKBP spécifiquement. Il s'agit de la protéine FKBP12. Le mécanisme d'action de cet

immunosuppresseur n'implique cependant pas l'inhibition de l'activité enzymatique de FKBP12. En effet, FK506 possède deux domaines : un premier domaine de liaison à FKBP12 et un second qui lie la calcineurine. Le complexe des 3 protéines ainsi créé permet l'inhibition de l'activité phosphatase de la calcineurine (Liu *et al.*, 1991). Cette dernière est donc incapable de déphosphoryler le facteur NFAT cytoplasmique, bloque ainsi sa translocation nucléaire et son activité de facteur de transcription. Dans les LT, FK506 empêche ainsi la transcription du gène de l'IL-2, bloquant l'activation et la survie cellulaire des LT.

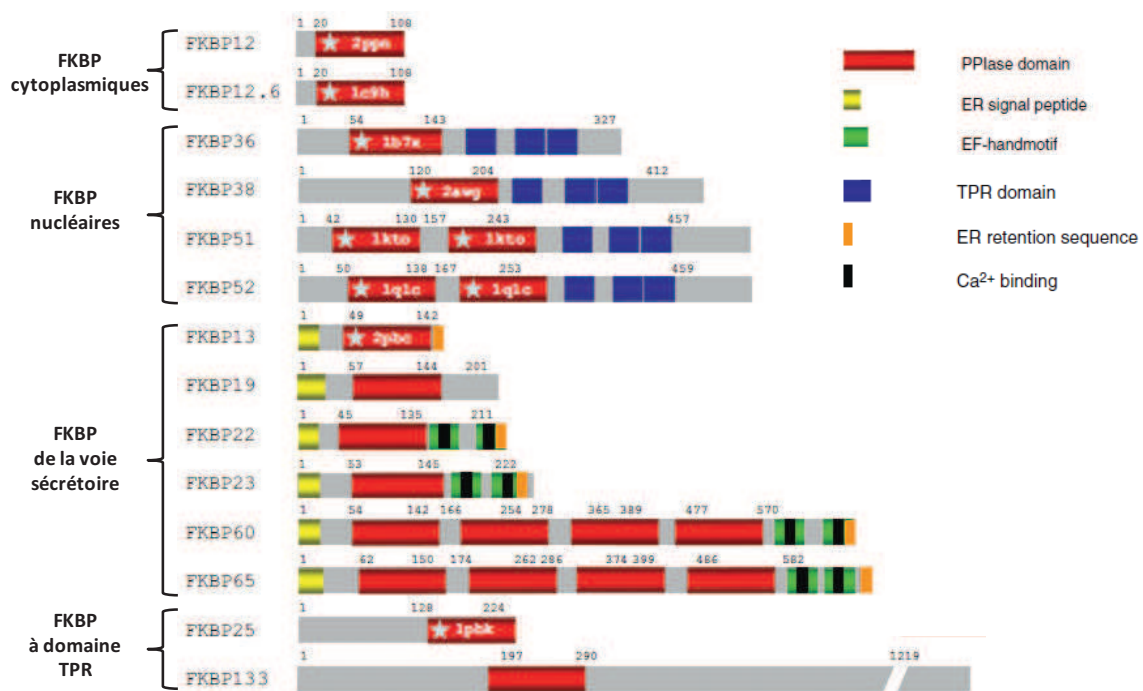


Figure 39 : Structure des protéines FKBP.

Les étoiles correspondent aux domaines PPIases dont les structures cristallographiques sont répertoriées au sein de la Protein Data Bank, et sont suivies du numéro d'accèsion du domaine sur cette base de donnée. (Blackburn and Walkinshaw, 2011).

C1.2.2 L'ACTIVITÉ PPIASE

C1.2.2.1 DESCRIPTION

Les PPIases sont des protéines chaperonnes impliquées dans le **repliement de protéines** au niveau des résidus prolines. Elles permettent la modification conformationnelle de *cis* à *trans*, ou inversement, de la liaison peptidique située en position N-terminale d'une proline. Plusieurs études ont montré que les isomères protéiques *cis* et *trans* pouvaient avoir des fonctions différentes pour différents processus biologiques. En effet, les protéines nouvellement synthétisées adopteraient tout d'abord une conformation *trans*. Alors que la majorité des protéines matures garderaient cette conformation énergétiquement favorable, 5 à 7% des protéines qui possèdent une liaison peptidyl-

prolyl changeraient en conformation *cis*, qui serait plus adaptée pour leur repliement ou encore leur transport (Nath and Isakov, 2015).

C1.2.2.2 EXEMPLE MOLÉCULAIRE DE PEPTIDYL-PROLYL ISOMÉRISATION

Les protéines régulatrices de la famille Crk (CT10 Regulator of Kinase) sont impliquées dans la transduction du signal. Via leurs domaines SH2 et SH3, elles peuvent notamment se lier à des protéines importantes dans la signalisation lymphocytaire comme par exemple à ZAP70 dans les LT. La protéine CrkII possède 2 domaines SH3 séparés par une séquence « linker » composée d'un résidu tyrosine et de plusieurs résidus proline. Il a été montré que l'activation de cette protéine est régulée par la phosphorylation du résidu tyrosine, d'une part, et par le contrôle du motif riche en prolines par les PPIases (incluant les FKBP et les cyclophilines), d'autre part. En effet, il a été montré que la forme *Trans* de la Pro²³⁸ confère à la protéine CrkII un aspect structural replié et inactif, alors que la forme *Cis* de cette même Pro²³⁸ confère à la protéine une conformation active et ouverte, la permettant d'interagir avec ses protéines partenaires (Figure 40) (Sarkar et al., 2011).

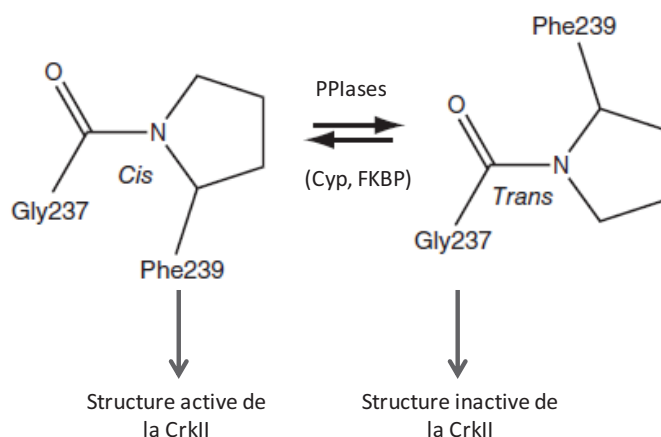


Figure 40 : L'isomérisation Cis/Trans du pont Gly237-Pro238-Phe239 de la protéine CrkII est catalysée par les PPIases.

Cyp : Cyclophilines. Adapté de (Sarkar et al., 2011).

C1.3 PRÉSENTATION DE LA PROTÉINE FKBP19

C1.3.1 EXPRESSION ET STRUCTURE DE FKBP19

La protéine FKBP19 est codée par *FKBP11*. Ce gène est présent sur le chromosome 12 chez l'Homme et le chromosome 15 chez la souris. Un seul article publié par Rulten *et al.* en 2006 traite spécifiquement de la protéine FKBP19, chez l'Homme (Rulten *et al.*, 2006). Cette protéine de 22kDa possède une séquence signal clivable d'adressage au RE (de 3kDa), générant une protéine mature de 19kDa, lui attribuant son nom. FKBP19 est le seul membre de son sous-groupe qui ne possède pas de motif de rétention au sein du RE (« ER retention sequence », motif HDEL ou RDEL). L'ARNm de

FKBP11 est préférentiellement exprimé dans certains organes sécréteurs comme le pancréas ou l'estomac, mais est aussi exprimé dans la rate, le thymus, les leucocytes périphériques, les ganglions lymphatiques et la MO (<http://amazonia.transcriptome.eu/expression.php?genelid=Hs.655103>).

C1.3.2 IMPLICATION DE FKBP11 DANS CERTAINES PATHOLOGIES

Dans une étude de 2008, *Fkbp11* a été retrouvé surexprimé dans les îlots pancréatiques d'un modèle murin de diabète de type II (Lu et al., 2008). D'autre part, *FKBP11* a été décrit comme un biomarqueur du carcinome hépatocellulaire par Lin et al., en 2013. En effet, l'expression de *FKBP11* a été mesurée chez plus de 100 patients et 29 personnes saines. Les tissus tumoraux de chaque patient ont été comparés aux tissus non tumoraux de la même personne et aux tissus de personnes saines. Les résultats montrent que premièrement, l'expression de *FKBP11* est plus élevée dans les tissus tumoraux comparés aux non-tumoraux appariés, et deuxièmement, que cette surexpression est aussi observée pour les tissus non tumoraux comparés aux sujets sains (Lin et al., 2013).

C1.3.3 FKBP19 DANS LA DIFFÉRENCIATION PLASMOCYTAIRE

Enfin, plusieurs études montrent qu'une augmentation de l'expression de *FKBP11* est observée dans les cellules plasmocytaires. La première consiste en l'analyse transcriptomique de cellules B à différents stades de leur différenciation à l'aide de puces affymetrix. Les cellules B utilisées dans cette étude étaient soit des cellules B folliculaires (CD38⁺ IgD⁻) triées à partir des amygdales, soit correspondaient à une lignée cellulaire plasmocytaire. La surexpression de certains gènes codant pour des chaperonnes, dont *FKBP11*, est observée dans les PC en comparaison aux LB folliculaires (Nakayama et al., 2006). Une seconde étude consistant à la différenciation *in vitro* de LB mémoires humains en plasmocytes, montre que l'expression de *FKBP11* est augmentée dans les PC comparé aux cellules non différenciées (Jourdan et al., 2009). Enfin, une équipe a publié en 2012 une étude comparative du transcriptome de PC isolés des PBMCs de sujets sains et de patients lupiques actifs (Lugar et al., 2012). L'expression de *FKBP11* se voit augmentée dans les PC isolés des patients lupiques actifs comparés aux cellules naïves et mémoires du même patient. Néanmoins, *FKBP11* n'est pas différentiellement exprimé entre les PC des patients lupiques actifs et les PC des sujets sains.

C2. PRÉSENTATION DU GÈNE *TRIB1*

C2.1 LES TRIBBLES

C2.1.1 LA FAMILLE DES TRIBBLES : L'ORIGINE

Le gène *tribbles* a été initialement identifié chez la drosophile comme **un régulateur négatif de la prolifération cellulaire et de la migration** (Yokoyama and Nakamura, 2011). Le nom des nouveaux gènes découverts chez la drosophile étant décidés en fonction du phénotype qu'ils induisent chez l'insecte, celui-ci a été choisi car les embryons mutants pour ce gène ressemblaient aux « Tribbles » (Tribbles en anglais), créatures inoffensives se présentant sous la forme de petites boules de poil et retrouvées dans l'univers de la série américaine Star Trek (Dobens and Bouyain, 2012).

Chez la Drosophile, *tribbles* est un régulateur négatif de *String* (cdc25, cyclin dépendant kinase 25), gène associé à la mitose lors du développement précoce de l'insecte (Grosshans and Wieschaus, 2000). En effet, Seher *et al.* ont montré que la surexpression de *tribbles* engendrait une inhibition de la mitose induite par le blocage de *string* à un niveau post-traductionnel (Seher and Leptin, 2000). De plus, Mata *et al.* ont montré que l'inhibition de *string* par *tribbles* serait finalement due à sa dégradation via la voie du protéasome (Mata *et al.*, 2000).

Des homologues de *tribbles* ont été identifiés chez les mammifères tels que le chien, les rongeurs et l'Homme. A ce jour, la famille des **Tribbles** chez les mammifères se compose de trois membres : **Trib1, Trib2 et Trib3**. Cette famille de protéines est caractérisée par leur domaine central pseudokinase qui semble être conservé durant l'évolution. L'identité de la séquence en acides aminés des Tribbles est d'ailleurs bien conservée entre l'Homme et la souris : 97.5% pour Trib1, 99.2% pour Trib2 et 81.2% pour Trib3. D'autre part, les membres de cette famille ont un pourcentage d'homologie élevé, à savoir : Trib1/Trib2 : 71.3%, Trib1/Trib3 : 53.3% et Trib2/Trib3 : 53.7% (Yokoyama and Nakamura, 2011). La génération de modèles murins knock-out pour chacun de ces 3 gènes ne révèle aucune altération de la viabilité. Les investigateurs postulent que la viabilité de chaque knock-out peut être reliée à la compensation des autres membres de la famille, bien qu'aucune surexpression des deux autres membres n'ait été observée lors de la délétion du troisième (Cunard, 2013).

C2.1.2 LES TRIBBLES : MODULATEURS ET MÉDIATEURS DU SIGNAL

C2.1.2.1 LOCALISATION CELLULAIRE DES TRIBBLES

Suivant le type cellulaire étudié, les protéines Tribbles sont localisées de façon variable entre le cytoplasme et le noyau. En effet, les 3 membres possèdent dans leur région N-Terminale une séquence conservée de la Drosophile qui correspond au signal de localisation nucléaire. Dans le

cytoplasme de types cellulaires variés, il a été reporté que les Tribbles induisaient la dégradation, via le protéasome, de protéines clés comme ACC1 (sous-unité de l'Acétyl CoA Carboxylase) ou certains facteurs de transcription comme la famille FoxO (Forkhead Box), en partie impliquée dans le cycle cellulaire ou l'apoptose, et enfin la famille C/EBP (CCAAT-Enhancer Binding Protein), impliquée dans la prolifération, le métabolisme ou encore l'immunité. Elles peuvent aussi se lier à d'autres protéines pour les inactiver telles que certaines MKKs (MAP Kinase Kinase) ou Akt (*Dobens and Bouyain, 2012*). De plus, bien qu'elles ne possèdent pas de site de fixation à l'ADN, les Tribbles auraient des fonctions de co-activateurs ou de co-répresseurs transcriptionnels dans le noyau. Pour exemple, Trib3 est capable d'interagir directement avec PPAR γ 2 via sa partie C-terminale et de réprimer son activité transcriptionnelle (*Takahashi et al., 2008*), ou encore est capable d'inhiber la transcription de gènes, comme par exemple *CHOP* (CCAAT-enhancer binding protein homologous protein), impliqué dans les voies de l'UPR (voir partie **A2.4.2.2**), grâce à son interaction avec le facteur de transcription ATF4 (*Jousse et al., 2007*).

C2.1.2.2 STRUCTURE GÉNÉRALE DES TRIBBLES

Les protéines Tribbles contiennent un domaine dit « **pseudokinase** » composé de 12 sous-domaines (I à V, VIA, VIB et VII à XI) qui appartiennent à la superfamille des domaines de protéines kinases. D'ailleurs, la structure 3-D prédite pour les Tribbles correspond à celle d'une protéine à fonction sérine/thréonine kinase. Néanmoins, plusieurs séquences consensus nécessaires à la fonction de phosphorylation sont manquantes, comme par exemple la séquence peptidique GXGX₂GXV dans le sous-domaine I, sous-domaine nécessaire à l'englobement de la partie triphosphate de l'ATP, ou encore l'Histidine (H) et l'Asparagine (N) de la séquence HRDLKX₂N du sous-domaine VIB, nécessaires à la phosphorylation du substrat. Etant données ces caractéristiques de séquences, il est établi qu'**aucune des protéines Tribbles ne possède d'activité kinase** et les données expérimentales effectuées sont cohérentes avec cette interprétation. En position C-terminale, deux motifs importants ont été identifiés : un site de liaison à l'ubiquitine ligase **COP1** et un site de liaison à la kinase **MEK1** de la voie des MAPK. Ces deux sites ont été recensés pour les 3 membres (*Hegedus et al., 2007*). Par ailleurs, les Tribbles seraient des protéines relativement instables. Une demi-vie d'environ 1h a été évaluée pour la protéine Trib2 (*Wilkin et al., 1997*) et l'ARNm de Trib1 aurait une demi-vie de moins d'une heure (*Sharova et al., 2009*).

C2.1.2.3 LA MODULATION DE LA VOIE DES MAPK PAR LES TRIBBLES EST DÉPENDANTE DU TYPE CELLULAIRE

Le besoin constant de répondre aux changements de l'environnement est commun à tous les êtres vivants et un certain nombre de systèmes intracellulaires ont évolué pour répondre à ce besoin. La voie des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) est l'une des plus anciennes voies de

signalisation, partagée par l'ensemble des cellules eucaryotes. Cette voie est notamment impliquée dans la prolifération des cellules, la réponse au stress ou aux hormones, ou encore l'inflammation. De multiples mécanismes ont été mis en place afin de la contrôler. La famille des Tribbles a été identifiée comme l'un de ces mécanismes. Kiss-Toth *et al.* ont ainsi montré que les **Tribbles pouvaient réguler l'activation de Erk, JNK et p38** en interagissant avec certaines MAPKK. Néanmoins, Sung *et al.* précisent que les réponses cellulaires provoquées par un même stimulus sont fortement dépendantes du type cellulaire (Sung *et al.*, 2006). En effet, l'étude de la voie JNK/AP-1 dans différents types cellulaires, lorsque l'une des Tribbles est surexprimée, montre que l'inhibition d'AP1 est observée dans une lignée de cellules épithéliales (HeLa) mais pas dans la lignée de fibroblastes (NIH3T3). Une autre preuve du caractère complexe de la régulation de la voie des MAPK par les Tribbles est soulignée également par Kiss-Toth *et al.*, qui montrent que le niveau de surexpression des Tribbles va influencer le type de réponse. Par exemple : à faible dose, Trib3 induit l'activation de JNK et Erk mais inhibe p38, alors qu'à forte dose, les 3 voies sont inhibées (exemple pour phospho-Erk : **Figure 41**) (Kiss-Toth *et al.*, 2004). Ainsi, **les Tribbles modèleraient la voie des MAPK**, mais ceci dépendrait de leur niveau d'expression, ainsi que du type cellulaire.

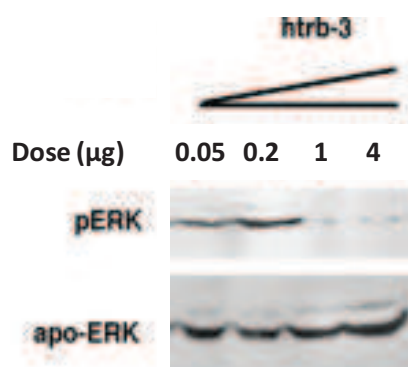


Figure 41 : Le niveau de surexpression de Trib3 module la phosphorylation de Erk dans les cellules HeLa. Les doses (µg) correspondent à la quantité de plasmide hTrib3 transfecté dans les cellules.

(Kiss-Toth *et al.*, 2004).

C2.2 FONCTIONS DES PROTÉINES TRIB2 ET TRIB3

Trib3 est le membre le plus étudié de cette famille (Cunard, 2013). Tout d'abord, plusieurs études ont notamment suggéré son implication dans la **réponse inflammatoire**. Morse *et al.* ont émis l'hypothèse que Trib3 inhiberait la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires dans le rein (Morse *et al.*, 2010). De plus, Kuo *et al.* ont montré que la délétion de Trib3 dans une lignée lymphoblastique de rat induit une augmentation de l'expression de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-6 et l'IL-4 (Kuo *et al.*, 2012). Enfin, Trib3 aurait la capacité d'interagir

avec la protéine p65, protéine activatrice du facteur NF- κ B, et d'inhiber sa phosphorylation (*Wu et al.*, 2003). Ainsi Trib3 pourrait contrôler négativement l'expression des gènes induits par le facteur NF- κ B. De plus, Trib3 a aussi été associé au **métabolisme des protéines et des lipides** chez la souris, puisque Trib3 inhiberait l'activation de la kinase hépatique S6K1 (impliquée dans la régulation de la synthèse des protéines) (*Matsushima et al.*, 2006) d'une part, et stimulerait la lipolyse au niveau du foie en favorisant la dégradation de l'Acétyl Coenzyme-A Carboxylase (ACC), qui intervient dans la première étape de la synthèse des lipides (*Qi et al.*, 2006), d'autre part. Cette dégradation s'effectuerait par la voie du protéasome après ubiquitination de l'ACC par l'Ubiquitine ligase COP1 recrutée par Trib3. Par ailleurs, la surexpression de *Trib3* dans des cellules musculaires squelettiques de rat (L6), impacterait la voie des MAPK en induisant la diminution de la phosphorylation des kinases Akt et Erk après stimulation avec de l'insuline (*Liu et al.*, 2010). Enfin, comme évoqué précédemment, l'expression de *Trib3* en cas de stress cellulaire serait induite par la voie ATF4, en aval de la voie PERK de l'UPR (voir **partie A2.4.2.2**)(*Ord and Ord*, 2005). (**Tableau 10**)

Contrairement à Trib3, peu d'études ont été réalisées sur **Trib2**. Néanmoins, l'une d'entre elles a montré que la régulation de son expression **est hautement dépendante du type cellulaire** dans lequel elle est exprimée, comme pour les deux autres membres. En effet, lors d'une stimulation par de l'IL-1 β pendant 6h, l'expression de *Trib2* serait augmentée dans des monocytes mais diminuée dans des fibroblastes synoviaux (*Sung et al.*, 2006).

Protéine	Tribbles	Mode d'interaction	Effet biologique de l'interaction
COP1	Trib2&3	Interaction via le site de liaison en C-terminal des Tribbles	Dégradation des protéines cibles
C/EBPα-β	Trib2	Dégradation via le protéasome	α : Induction de la leucémie myéloïde β : Inhibition de la différenciation adipocytaire / Modification de la signalisation des TLR
ATF4	Trib3	Dégradation via le protéasome	Suppression du signal de stress en contexte d'hypoxie cellulaire
CHOP	Trib3	Interaction	Induction de l'apoptose en cas de stress du RE
ACC	Trib3	Interaction via le N-terminal de CHOP	Suppression de l'adipogénèse
MEK1	Trib2&3	Interaction via le site de liaison en C-terminal des Tribbles	Induction de la phosphorylation de Erk et induction de l'AML
MKK4	Trib3	Interaction via le site de liaison en C-terminal des Tribbles	Suppression de la migration des cellules musculaires lisses
MKK7	Trib2&3	Interaction via le domaine pseudokinase des Tribbles	Suppression de la production d'IL-8 par les monocytes après inhibition de la phosphorylation de JNK et ERK
AKT1/2	Trib2&3	Inhibition de l'activité kinase d'Akt	Suppression de la différenciation adipocytaire / perturbation de la signalisation de l'insuline dans les tissus adipeux

Tableau 10 : Récapitulatif des partenaires interagissant avec Trib2 et Trib3.

AML : Leucémie Myéloïde Aiguë ; TLR : Toll-Like-Receptors ; RE : Réticulum Endoplasmique. Adapté de (*Yokoyama and Nakamura*, 2011).

C2.3 LA PROTÉINE TRIB1

C2.3.1 STRUCTURE ET EXPRESSION DE TRIB1

Le gène codant pour la protéine **Trib1** est localisé sur le chromosome 8 en position q24.13 chez l'Homme, et sur le chromosome 15 chez la souris. Trib1 est exprimé de façon **ubiquitaire** mais préférentiellement dans les poumons, la thyroïde, la prostate ou encore dans les leucocytes (<http://amazonia.transcriptome.eu/expression.php?genelid=Hs.444947>). Cette protéine est composée de 372 acides aminés (chez l'Homme et la souris) pour un poids moléculaire d'environ 41kDa, et possède trois grands domaines : un domaine N-terminal, un domaine pseudokinase et un domaine C-terminal. Au niveau du domaine N-terminal se trouve la séquence signal, riche en proline, permettant sa localisation nucléaire. La localisation cellulaire de Trib1 et des Tribbles en général n'est pas beaucoup documentée bien que quelques expériences de surexpression montrent une **localisation nucléaire prédominante**. Mais cette localisation nucléaire est loin d'être exclusive puisqu'elles sont capables d'interagir avec les partenaires qui leur sont décrits aussi bien dans le noyau (ex pour Trib1 : RAR α) que dans le cytoplasme (ex pour Trib1 : MEK1, MKK4) (Yokoyama and Nakamura, 2011).

Le **domaine pseudokinase**, découpé en 12 sous-domaines, **n'est pas fonctionnel** puisque comme énoncé auparavant, certains motifs importants à l'activité kinase sont manquants. Dans la littérature, le domaine C-terminal de Trib1, ainsi que celui des deux autres membres de la famille, sont décrits comme lieu d'interaction protéique avec d'une part un site de liaison à la MAPKK MEK1, et d'autre part un site de liaison à l'ubiquitine ligase E3 COP1 (**Figure 42**). De plus, Trib1 est aussi capable d'interagir avec les facteurs C/EBP α et C/EBP β et d'induire leur dégradation via la voie du protéasome, notamment dans les cellules myéloïdes.

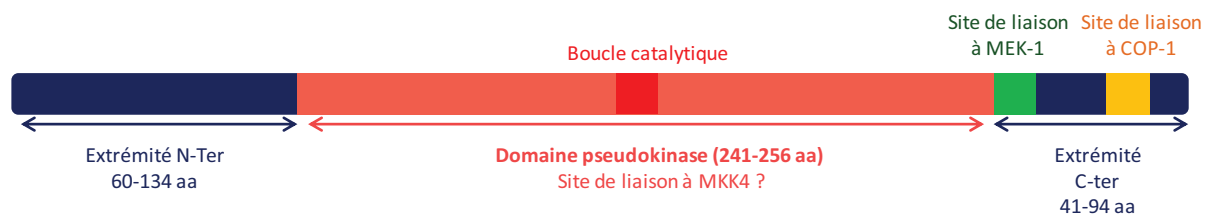


Figure 42 : Représentation schématique de la structure protéique de Trib1.

Adapté de (Yokoyama and Nakamura, 2011).

Chez la drosophile, *snail* et *swift* semblent avoir une action régulatrice sur *tribbles* durant la mitose (Mata et al., 2000), mais chez le mammifère, aucun régulateur de Trib1 n'a pour le moment été identifié.

C2.3.2 ASPECTS FONCTIONNELS DE TRIB1

C2.3.2.1 TRIB1 ET LA VOIE DES MAPK

Une étude de 2004, publiée par Kiss-Toth *et al.*, a montré, grâce à des expériences de coimmunoprécipitation sur des cellules HeLa, une interaction directe entre Trib1 et deux MAPKK intervenant au niveau intermédiaire de la cascade des MAPK : **MEK1**, qui conduit à l'activation de la kinase Erk, et **MKK4**, qui conduit à l'activation de la kinase JNK (**Figure 43**) (Kiss-Toth *et al.*, 2004). Cette étude démontre aussi que la surexpression de *Trib1* dans des cellules HeLa induit une diminution de l'activité du facteur de transcription AP-1, situé en aval de la voie JNK, ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation de Erk. La capacité de Trib1 à inhiber AP-1 a été confirmée par Sung *et al.* dans des cellules musculaires lisses de l'aorte (Sung *et al.*, 2007), dans la lignée cellulaire épithéliale HeLa, mais n'est retrouvée ni pour des fibroblastes synoviaux ni pour les macrophages THP-1 (Sung *et al.*, 2006). Les résultats sont légèrement différents pour Trib3 (Sung *et al.*, 2006) (**Figure 44**). De plus, la surexpression de *Trib1* dans les cellules musculaires lisses de l'aorte inhiberait leur capacité à migrer, probablement via une régulation négative de la voie JNK, qui pourrait être induite suite à son interaction avec MKK4. En revanche, dans ces cellules musculaires, la surexpression de *Trib1* n'altère pas la phosphorylation de Erk. En 2010, Yokoyama *et al.* confirment l'hyperphosphorylation de Erk provoquée par la surexpression de *Trib1* dans la lignée cellulaire de leucémie myéloïde aigüe, NH112. En générant des mutants de Trib1, ils montrent aussi que ce mécanisme est dépendant de son interaction avec MEK1 du côté C-terminal.

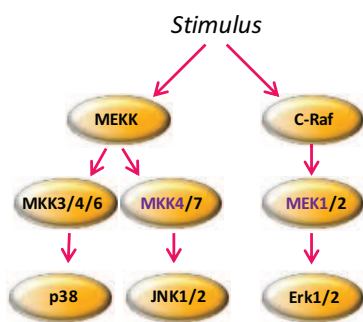


Figure 43 : Trib1 interagit avec MEK1 et MKK4 dans les cellules HeLa.

MKK4 et MEK1 ont été identifiés comme interagissant avec Trib1 dans les cellules HeLa. Figure personnelle

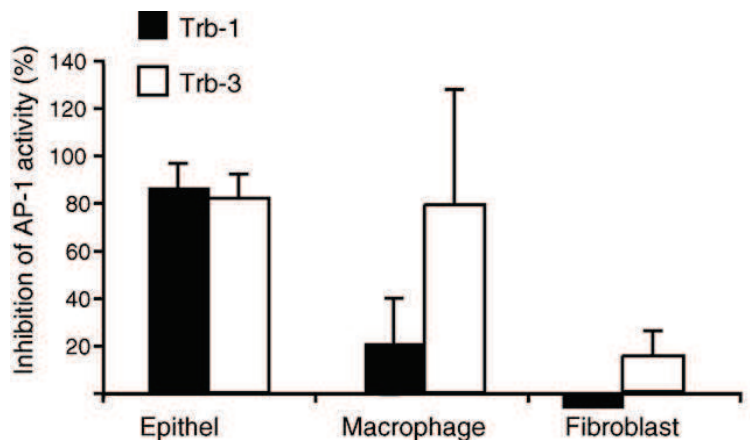


Figure 44 : Trib1 (Trb-1) et Trib3 (Trb-3) inhibent l'activité d'AP-1 de manière dépendante du type cellulaire.

Epithéliale (HeLa), Macrophages (Raw264.7), Fibroblaste (NIH3T3). (Sung *et al.*, 2005).

Ainsi, l'ensemble de ces études souligne le fait que la protéine **Trib1 semble capable de moduler la voie des MAPK** et, de ce fait, de participer à de multiples processus cellulaires importants (**Figure 45**). Cependant, son rôle n'est pas encore clairement défini et dépend probablement du type cellulaire dans lequel cette protéine est exprimée. D'autre part, une étude de 2013 suggère, à l'inverse, que l'activation de la voie des MAPK serait responsable de la régulation de Trib1. En effet, Soubeyrand et ses collaborateurs montrent que la phosphorylation des protéines Erk, p38 et JNK, précède le niveau maximal d'expression de *TRIB1* dans une lignée d'hépatocytes humains (*Soubeyrand et al., 2013*).

C2.3.2.2 TRIB1 ET LA LIPOGÉNÈSE

Trib1 a été identifié au cours d'études de GWAS réalisées chez des **patients atteints d'hyperlipidémie**, comme l'un des hits les plus robustes et les plus reproductibles parmi plusieurs groupes ethniques (*Ishizuka et al., 2014*). Deux études différentes, réalisées sur des souris KO pour Trib1 dans les hépatocytes, ont montré que **Trib1 semble réguler négativement la production de cholestérol et de triglycérides (TG)**. En effet, les souris KO pour Trib1 montrent des concentrations de TG et de cholestérol beaucoup plus élevées que les souris contrôles (*Burkhardt et al., 2010, Ishizuka et al., 2014*). Ces résultats sont confirmés par un modèle transgénique consistant en la surexpression de *Trib1* spécifiquement dans les hépatocytes, qui, au contraire, affiche des concentrations beaucoup plus faibles de lipides, comparé aux souris contrôles. Le mécanisme par lequel la surexpression de *Trib1* mène à ce phénotype semble impliquer la diminution d'expression de plusieurs gènes importants dans le métabolisme lipidique. Ceci comprends entre autres : *Scd1*, *Gpat2* et *Dgat2*, importants pour la biosynthèse des TG, *C/EBP α* et *C/EBP β* , impliqués dans la biosynthèse des lipides, ainsi que MLXIPL, senseur de glucose et impliqué dans la liponéogénèse (**Figure 45**) (*Ishizuka et al., 2014*). Cependant, le mécanisme précis induisant la diminution d'expression de ces différentes protéines n'est pas encore identifié à ce jour.

En revanche, *Trib1* a été retrouvé très exprimé dans les adipocytes du tissu blanc adipeux de souris obèses. La protéine serait reliée à l'activation de la sous-unité RelA du facteur NF- κ B et favoriserait l'induction de cytokines pro-inflammatoires, connues pour participer aux complications de l'obésité. En effet, la déficience de *Trib1* dans les adipocytes diminuerait la réponse inflammatoire induite par la voie NF- κ B et protégerait les souris de l'obésité (*Ostertag et al., 2010*).

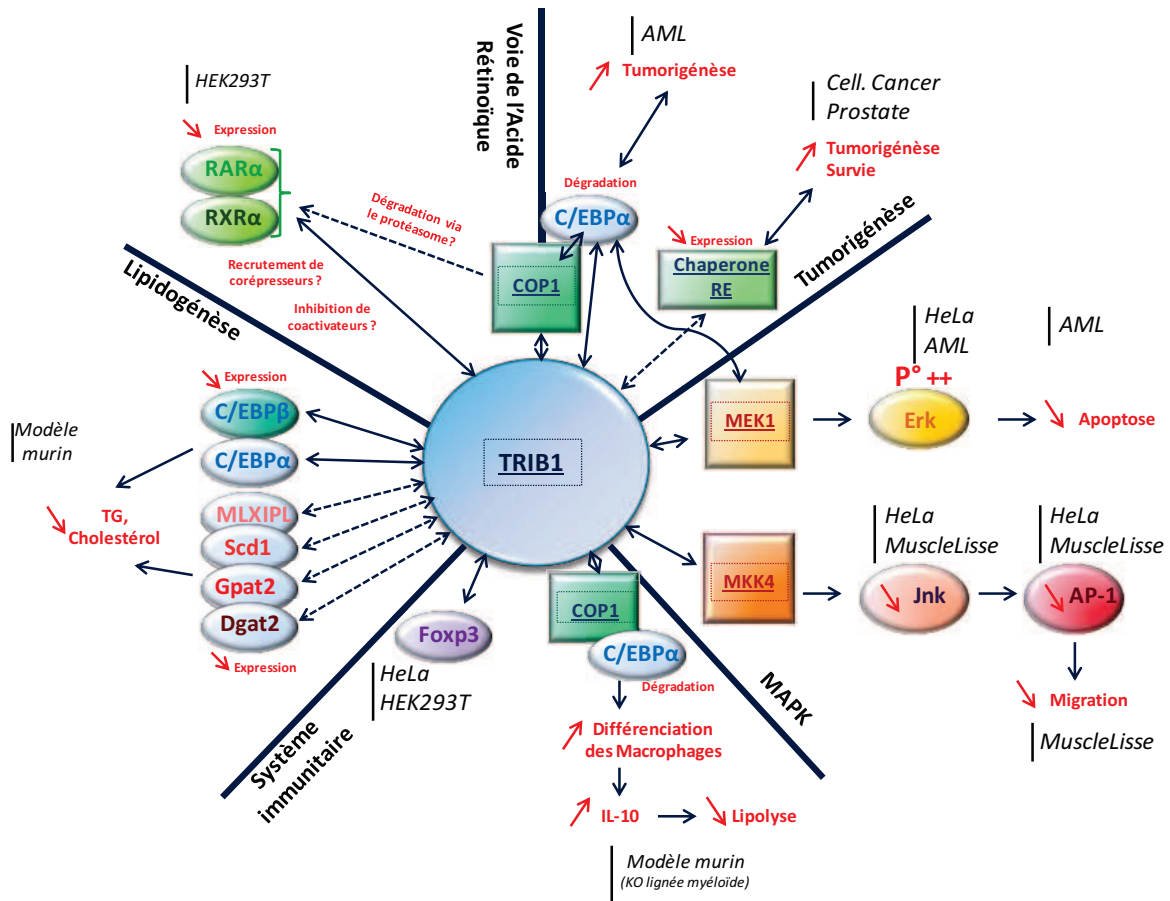
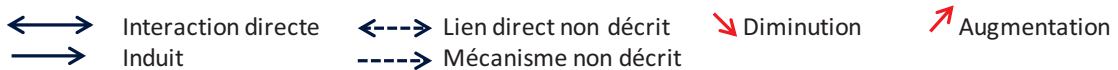


Figure 45 : Résumé des fonctions de Trib1 décrites dans la littérature.

AML : Leucémie Myéloïde Aiguë ; HEK293T : Lignée de cellules épithéliales humaines ; Cell CanPros : Lignée cellulaire de cancer de la prostate ; HeLa : Lignée de cellules épithéliales humaines ; CmusL : Lignée de cellules musculaires lisses ; TG : Triglycérides. Figure personnelle.



C2.3.2.3 TRIB1 A D'AUTRES FONCTIONS CELLULAIRES

Trib1 semble impliquée dans d'autres fonctions dans un contexte physiologique ou pathologique. Tout d'abord, Trib1 a été identifiée comme **régulateur négatif de la voie du récepteur de l'acide rétinolique** (impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaire) dans des fibroblastes (*Imajo and Nishida, 2010*). En effet, cette équipe a montré que Trib1 pouvait directement interagir avec les récepteurs nucléaires de l'acide rétinolique, RARα et RXRα, via son domaine pseudokinase (**Figure 45**). Plusieurs hypothèses ont été émises quant au mécanisme de régulation de la voie de l'acide rétinolique par Trib1 : 1) l'interaction directe avec RARα et RXRα empêche la liaison de co-activateurs de la voie de l'acide rétinolique ; 2) Trib1 permet le recrutement de co-répresseurs de la voie de l'acide rétinolique ; ou 3) Trib1 engage la dégradation par le protéasome de certaines protéines clés de cette voie, grâce à son interaction connue avec l'ubiquitine ligase COP1. De plus, Trib1 a été retrouvé régulé positivement par STAT3 dans des

cellules humaines HEK293T (Marie et al., 2012). L'engagement de la voie STAT3 suite à l'activation de la voie des lectines par une infection parasitaire (*E. histolytica*), augmenterait l'expression de *Trib1*. Enfin, dans un contexte de cancer de la prostate, *Trib1* a été associé à la régulation de l'expression de chaperonnes du RE comme GRP78, GRP94 ou encore GRP170. Cette association *Trib1*/Chaperonne du RE serait avantageuse pour la tumorigénèse et la survie des cellules cancéreuses (Figure 45) (Mashima et al., 2014).

C2.3.3 TRIB1 ET LE SYSTÈME IMMUNITAIRE

Seules deux études ont été réalisées sur *Trib1* et sa fonction dans le SI. La première traite de l'étude de la protéine *Trib1* dans les **LTreg** et la seconde du rôle de *Trib1* dans la différenciation des **macrophages « M2-like »** résidents dans les tissus. La première étude relate de l'interaction physique entre *Trib1* et du facteur de transcription spécifique de certains LTreg : *Foxp3* (Dugast et al., 2013). Les résultats montrent un haut niveau d'expression de *Trib1* dans les LTreg CD4⁺CD25⁺CD127⁻ humains, et CD4⁺CD25⁺ murins, comparé aux cellules non régulatrices humaines et murines CD4⁺CD25⁻, respectivement. De plus, les auteurs démontrent une interaction entre *Trib1* et *Foxp3* dans deux lignées cellulaires immortalisées : les lignées épithéliales HEK293T et HeLa (Figure 45).

La seconde étude présente *Trib1* comme un régulateur positif de la différenciation myéloïde puisque des souris déficientes pour *Trib1*, spécifiquement dans la lignée myéloïde, montrent une diminution du nombre de macrophages « M2-like » (Sato et al., 2013). La différenciation de ces cellules serait dépendante de la liaison *Trib1*/COP1 puisque COP1 permet la dégradation du facteur C/EBP α , ce qui favoriserait leur différenciation (Figure 45). Parallèlement, ce défaut de différenciation provoquerait une lipolyse anormale et donc une diminution de la masse adipeuse chez les souris déficientes. En effet, il semblerait que la diminution du nombre de macrophages « M2-like » induise un défaut de production d'IL-10 au niveau des tissus, ce qui favoriserait la lipolyse et provoquerait une perte du tissu adipeux.

C2.4 IMPLICATION DES TRIBBLES DANS CERTAINES PATHOLOGIES

Les protéines Tribbles ont été associées à de multiples pathologies chez l'Homme, incluant le diabète, certains cancers, des maladies cardiovasculaires, des désordres liés au métabolisme des lipides ou encore certaines MAI (Kiss-Toth, 2011, Yokoyama and Nakamura, 2011).

La première étude à associer un membre des Tribbles à une maladie a été publiée par le groupe de M. Montminy en 2003, qui suggérait une régulation négative de la signalisation de l'insuline par *Trib3* et associait ainsi cette protéine au développement du **diabète de type 2** (Du et al., 2003). D'autre part, un lien intéressant entre *Trib2* et certaines MAI a été fait. *Trib2* a tout d'abord

été identifié comme un potentiel autoantigène dans les **uvéites autoimmunes** (Zhang *et al.*, 2005), mais à ce jour aucune étude supplémentaire n'a pu confirmer cette hypothèse. Puis en 2010, plusieurs études réalisées sur des patients atteints de **narcolepsie** ont mis en évidence la présence d'autoanticorps anti-Trib2 chez ces patients (Cvetkovic-Lopes *et al.*, 2010). Néanmoins, les mécanismes par lesquels ces anticorps anti-Trib2 contribuent au développement de la maladie restent non identifiés.

D'autre part, étant donné la fonction originelle de *tribbles* chez la *drosophile* comme régulateur du cycle cellulaire, les protéines Tribbles sont vite apparues comme associées à différents type de **cancer**. Ainsi, Trib3 a été retrouvé surexprimé dans des tumeurs de **cancer du poumon**, du **colon** ou encore du **sein**, Trib2 dans le cas de **mélanomes** ou de **cancer du poumon**, et Trib1 dans des **carcinomes folliculaires thyroïdiens** (Puskas *et al.*, 2005) et le **cancer des ovaires** (Puiffe *et al.*, 2007). De plus, Trib2 et surtout Trib1 ont été associés à la **leucémie myéloïde aigüe (AML)**. En effet, *TRIB1* a notamment été retrouvé surexprimé dans les cellules médullaires d'une patiente atteinte d'AML (Rothlisberger *et al.*, 2007). De plus, une étude réalisée chez la souris montre que Trib1 semble coopérer avec *Hoxa9* et *Meis1*, gènes favorisant la leucémogénèse myéloïde, et favoriserait la phosphorylation de Erk et ainsi une inhibition de l'apoptose (Jin *et al.*, 2007). De plus, sa surexpression dans les cellules médullaires est capable d'induire une AML chez la souris en induisant la dégradation spécifique de C/EBP α , facteur impliqué dans la différenciation myéloïde, via l'ubiquitine ligase COP1 (Yoshida *et al.*, 2013). Enfin, une mutation gain de fonction R107L dans la séquence de *TRIB1* a été identifiée dans la **leucémie aiguë mégacaryocytaire** associée au syndrome de Down (Trisomie 21) (Yokoyama *et al.*, 2012). Néanmoins, une étude parue en 2010 présente des conclusions contraires qui suggèrent un rôle de suppresseur de tumeurs pour Trib1 mais aussi pour Trib2. Elles seraient toutes deux capables d'inhiber la voie JNK et d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses (Gilby *et al.*, 2010).

De plus, comme évoqué précédemment, de nombreuses études génétiques, comprenant des dizaines de milliers patients provenant de populations différentes, ont recensé des variants de *TRIB1* comme influençant le **métabolisme des lipides**. Ainsi, des variants de *TRIB1* ont été associés, entre autres, à un niveau anormal de TG (Jaromi *et al.*, 2011) et de cholestérol (Turner *et al.*, 2011) ou encore au risque de maladie cardiaque ischémique (Varbo *et al.*, 2011) ou coronarienne (2011).

Finalement, il est tout à fait concevable que les différences d'expression des partenaires de Trib1 retrouvées dans les différents types cellulaires, puissent expliquer pourquoi Trib1 apparaît comme un facteur inhibiteur dans certains cas et comme un facteur activateur dans d'autres cas.



MATÉRIEL ET MÉTHODES



MATÉRIEL ET MÉTHODES

D1. GÉNÉRATION DES LIGNÉES MURINES FKBP11 ET TRIB1

D1.1 PRODUCTION DU MODÈLE LENTIGÉNIQUE FKBP11

D1.1.1 CLONAGE DE LA SÉQUENCE CODANTE DE MFKBP11 DANS LE VECTEUR PLASMIDIQUE LENTIVIRAL PTRIP

Ce clonage a été réalisé par Julie Ruer-Laventie, doctorante de l'équipe entre octobre 2008 et décembre 2012. Les méthodes de clonage sont détaillées dans l'article n°1 (partie E)

D1.1.2 INFECTION DES EMBRYONS ET OBTENTION DES SOURIS TRANSGÉNIQUES LENTIVIRALES FONDATRICES

Ces étapes ont été réalisées par le SEAT (Service des Animaux Transgéniques, CNRS, Villejuif).

D1.2 PRODUCTION DES MODÈLES CONDITIONNELS TRIB1-KI

L'ensemble des étapes de clonage et de sélection des fondateurs « Trib1-KI » a été réalisé par Julie Ruer-Laventie, doctorante de l'équipe entre octobre 2008 et décembre 2012. Le modèle consiste en une insertion ciblée de la séquence codante de *Trib1* dans le locus ROSA26 (codant pour un ARN non-codant). Elle est réalisée par recombinaison homologue entre le vecteur de recombinaison (ici le vecteur CTV, produit dans le laboratoire du Dr Klaus Rajewsky (Xiao *et al.*, 2007, Xiao *et al.*, 2008) et le locus cible (ROSA26) (Figure 46).

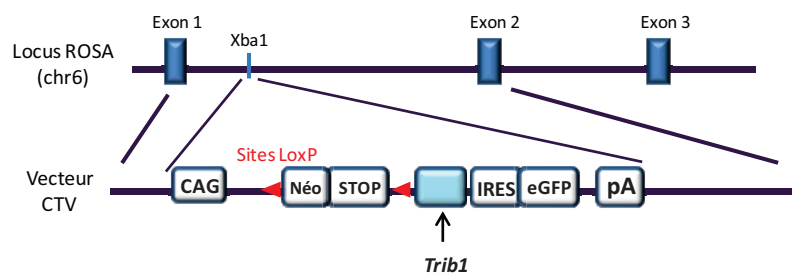


Figure 46 : Carte de la partie du vecteur CTV permettant l'insertion ciblée du transgène contenant la séquence de Trib1 par recombinaison homologue dans le locus ROSA.

D1.2.1 CLONAGE DE TRIB1 DANS LE VECTEUR PLASMIDIQUE CTV

D1.2.1.1 AMPLIFICATION ET SOUS-CLONAGE DE LA SÉQUENCE CODANTE DE TRIB1

La séquence codante (CDS) du gène *Trib1* murin (1118pb, NM144549.4) a été amplifiée par PCR à partir de l'ADNc de splénocytes totaux de souris C57BL/6. Les séquences des primers qui ont été utilisés sont : pour le primer sens : 5'-ATGCGGGTCGGTCCCGTGCG-3' et anti-sens : 5'-CTAGCAGAAGAAGGAAGTTATGTCACTG-3' (Eurogentec). Les conditions de PCR étaient les suivantes : 94°C 5 min ; 35 cycles : 94°C 30 sec, 56°C-60°C 30 sec, 72°C 1 min ; 72°C 7 min. Le produit de PCR a été sous-cloné dans le vecteur pCR2.1 TA cloning vector (Invitrogen) et séquencé afin de vérifier l'absence de mutations. Le vecteur obtenu a été appelé pCR2.1-mTrib1.

D1.2.1.2 AJOUT DE DEUX SITES DE RESTRICTION ASCI EN AMONT ET EN AVAL DE LA CDS DE *MTRIB1*

Une PCR a été réalisée sur le vecteur pCR2.1-mTrib1 afin de rajouter 2 sites de restriction Asc1. La séquence du primer sens utilisé est : 5'-AAAGGCGCGCCGCGCAGATCCAGGGATTACAAGCCGGGGCCGCTCCGGCCAGGGCCGCGATGCGGGTCGGTCCC-3' et celle du primer anti-sens est : 5'-AAAGGCGCGCCCTAGCAGAAGAAGGA-3'. Les conditions de PCR étaient les suivantes : 94°C 5 min ; 30 cycles : 94°C 30 sec, 60°C 30 sec, 72°C 45 sec ; 72°C 7 min. Le produit de PCR, nommé Trib1⁺ a été sous-cloné dans le vecteur pCR2.1 TA cloning vector (Invitrogen) et séquencé afin de vérifier toute absence de mutations. Le vecteur obtenu a été appelé pCR2.1Trib1⁺.

D1.2.1.3 VECTEUR DE SUREXPRESSION CTV-TRIB1+

Dix µg du vecteur CTV (16kb) (Xiao et al., 2007, Xiao et al., 2008) ont été digérés par l'enzyme Ascl (30U) (Biolabs) dans un volume final de 50µl, pendant 2h à 37°C en présence de tampon NEB4 1x. Après dépôt du produit de digestion sur gel d'agarose 1%, le fragment de haut poids moléculaire, correspondant au vecteur digéré, a été purifié. De la même manière, le vecteur pCR2.1Trib1⁺ a été digéré avec Ascl, puis, après dépôt du produit de digestion sur gel d'agarose 1%, le fragment correspondant à la taille de mTrib1⁺, a été purifié. L'insert (I) et le vecteur (V) digérés ont ensuite été ligués (Invitrogen) dans un rapport moléculaire de 1:1 et 3:1 (I/V), à 4°C pendant toute une nuit. Le vecteur final CTV-Trib1⁺ est ensuite séquencé afin de vérifier l'insertion de mTrib1.

D1.2.2 INFECTION DES CELLULES ET PRODUCTION DU MODÈLE TRIB1-KI

Ces étapes ont été réalisées par l'Institut Clinique de la Souris (ICS, IGBMC, Illkirch). Brièvement, les cellules ES (issues d'embryons de souris C57BL/6) ont été électroporées avec le vecteur CTV-Trib1⁺. Les cellules ayant inséré le transgène par recombinaison homologue au locus ROSA26, ont été sélectionnées positivement par ajout de néomycine dans le milieu de culture, puisque le transgène contient le gène de résistance à cet antibiotique. La localisation de l'insertion a ensuite été vérifiée

par la technique de Southern-Blot. Les cellules positives sélectionnées ont ensuite été transférées dans un blastocyste de souris C57BL/6, puis l'ensemble a été implanté dans une souris femelle pseudogestante. Les chimères mâles issues de cette réimplantation d'embryons ont été croisées avec des femelles de fond C57BL/6, et les petits ayant intégré le transgène (souris fondatrices) ont été sélectionnés par une PCR de génotypage.

Deux mâles fondateurs, nommés Trib1-KI, avaient été reçus dans notre animalerie afin de développer la lignée Trib1-KI.

D1.2.3 PRODUCTION DES MODÈLES CONDITIONNELS

Les souris Trib1-KI sont maintenues sur fond C57BL/6 par croisement avec des souris C57BL/6. En absence de croisement avec des souris transgéniques exprimant la Cre, les souris Trib1-KI ne montrent pas de surexpression de *Trib1* puisque l'expression est réprimée par la présence de la cassette STOP. Ainsi, afin d'induire la surexpression de *Trib1* de façon conditionnelle spécifique, les souris Trib1-KI sont croisées avec des souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle de différents promoteurs. Les souris Mb1-Cre, CD21Cre et Lck-Cre, possèdent le transgène codant pour la Cre sous le contrôle des promoteurs des gènes Mb1, CD21 et Lck permettant la surexpression spécifique de Trib1 dans les LB à partir d'un stade très immature, des LB matures ou des LT matures, respectivement. Les lignées murines Mb1-Cre (*Kraus et al., 2004*), CD21-Cre (*Hobeika et al., 2006*) et dLck-Cre (n°3779) (*Zhang et al., 2005*) ont été fournies par Dr M.Reth (Allemagne), Pr. K. Rajewsky (USA) et Dr. N. Killeen (Allemagne), respectivement. Les croisements ont été effectués au sein de l'animalerie rattachée à l'UPR3572.

D1.2.4 GÉNOTYPAGE DES DIFFÉRENTES SOURIS TRANSGÉNIQUES

D1.2.4.1 EXTRACTION DE L'ADN GÉNOMIQUE DE QUEUE DE SOURIS

L'ADN génomique est extrait à partir d'environ 5mm de biopsie de queue de souris, grâce à l'utilisation d'un kit d'extraction d'ADN (Sigma). Les biopsies de queues contenues dans des microtubes sont incubées 10 min à température ambiante (TA) dans un mélange composé de 100µL de solution d'extraction (« extraction solution A », Sigma) et 25µL de solution de préparation de tissu (« tissue preparation », Sigma). Après 3 min d'incubation à 95°C, 200µL de solution neutralisante diluée au demi (« neutralization solution B », Sigma) sont ajoutés à l'ensemble. L'ADN est ensuite conservé à 4°C.

D1.2.4.2 PCR DE GÉNOTYPAGE

Les PCR des lignées Trib1-KI sont réalisées avec le mastermix GoTaq (Promega). Un mix de 12.5µL de GoTaq MasterMix, 0.8 µL des oligonucléotides sens et anti-sens spécifiques du fragment d'intérêt, à une concentration de 10µM (Eurogentec), 9.5µL d'eau stérile ainsi que 2µL d'extrait d'ADN sont

déposés par tube, dans des barrettes à PCR (Sarstedt). Après amplification, les produits de PCR sont déposés sur gel d'agarose 1% (Sigma) contenant 0.005% d'intercalant d'ADN (GelRed, Biotium). Le gel est ensuite révélé aux UV après migration à 250V pendant environ 30 minutes. Le **tableau 11** résume les caractéristiques de chaque PCR de géotypage.

Transgènes	Programmes PCR					Séquences des oligonucléotides sens (F) et anti-sens (R)	Taille du fragment attendue (pb)
	I. 94°C	II. Cycles		III. 72°C	IV. 8°C		
		Description	Nbr				
Trib1	5 min	94°C 30 sec 56°C 30 sec 72°C 1min30sec	30	7 min	∞	F: 5'-ACGACCAAGTGACAGCAATG-3' R: 5'-CTCGACCAGTTTAGTTACCC-3'	538pb
Mb1Cre	5 min	94°C 30 sec 58°C 30 sec 72°C 1 min	30	10 min		F: 5'-ACCTCTGATGAAGTCAGGAAGAAC-3' R: 5'-GCAGATGTCCTTCACTCTGATTCT-3'	500pb
CD21Cre	5 min	94°C 30 sec 62°C 30 sec 72°C 1min40sec	30	10 min		F: 5'-GTGGTTTGCCAAACTCATC-3' R: 5'-ATTCCCATTAAACACTACC-3'	350pb
dLckCre	5 min	94°C 30 sec 58°C 30 sec 72°C 1 min	30	10		F: 5'-ATGGTGCCCAAGAAGAAGAG-3' R: 5'-CAGGTGCTGTTGGATGGTCT-3'	500pb

Tableau 11 : Tableau récapitulatif des programmes de PCR utilisés pour géotyper les souris.

D2. VALIDATION DES MODÈLES TRIB1-KI CONDITIONNELS

D2.1. ISOLEMENT DES CELLULES LYMPHOÏDES

D2.1.1 PRÉLÈVEMENT DES ORGANES LYMPHOÏDES PRIMAIRES ET SECONDAIRES

Les organes lymphoïdes primaires (thymus et MO) et secondaires (rate, ganglions (GG) inguinaux et axillaires) sont prélevés puis dilacérés et écrasés sur un tamis de 0.4µm. La totalité des cellules sont récupérées dans du RPMI 1640 puis le culot est repris dans un tampon composé de NH₄Cl et Tris 1M pH7.6 afin de lyser les globules rouges. Après un dernier lavage, les cellules sont reprises dans du RPMI pour être comptées au microscope grâce à une cellule de Malassez.

D2.1.2 TRI DES LB CD43⁻ DE LA RATE

Les LB matures naïfs de la rate sont triés grâce à l'utilisation d'un anticorps anti-CD43 couplé à des billes magnétiques (CD43 (Ly-48) microbeads mouse, Miltenyi Biotec). Pour cela, les splénocytes totaux, déplétés des globules rouges, sont incubés 15 minutes avec des billes magnétiques couplées à l'anticorps anti-CD43, à raison de 10µl de billes et 90µL de PBE (PBS (NaH₂PO₄ 18mM, NaH₂PO₄ 84mM, NaCl 1.81mM), BSA 0.5%, EDTA 2mM) pour 10.10⁶ de cellules pendant 15min à 4°C. Après un lavage au PBE, les cellules sont déposées sur une colonne MACS Large Separation (LS), fixée à un aimant (Miltenyi Biotec). Les cellules CD43⁺ marquées par l'anticorps (LT, monocytes, granulocytes, NK, LB B1) sont retenues dans la colonne grâce à l'aimant. Les cellules non marquées (LB matures

naïfs) sont éluées dans le PBE dans la première fraction. Les cellules restées dans la colonne, appelées non-B (NB), peuvent être récupérées en décrochant la colonne de l'aimant. Les cellules sont lavées puis centrifugées. Une efficacité de tri supérieure à 95% est généralement obtenue par cette méthode.

D2.2. ÉVALUATION DE LA SUREXPRESSION DE *TRIB1*

Les cellules totales de plusieurs organes lymphoïdes (MO, thymus) ainsi que des cellules triées de la rate (LB, Non-LB) ont été utilisées pour valider la surexpression de l'ARNm de *Trib1*.

D2.2.1 EXTRACTION DES ARN

L'extraction des ARN est réalisée grâce au kit RNeasy Mini kit (Qiagen) à partir de culots de 0.5 à 4M de cellules, stockés à -80°C. Ce kit permet de lyser le culot cellulaire et de purifier l'ARN par l'utilisation de colonnes QIAamp. Des étapes de lavage et une étape d'incubation à la DNase I vont permettre d'éliminer l'ADN génomique. L'ARNm extrait est ensuite dosé à l'aide du NanoDrop2000c (Thermo Scientific) avant d'être transformé en ADNc.

D2.2.2 PRÉPARATION DES ADNC

Les ADNc sont synthétisés à partir d'ARN extraits grâce au kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Un volume de 10µL de mix est ajouté à 10µL d'ARN (de concentration ≤ 200ng/µL) pour procéder à la réaction. Après amplification (10 min à 25°C, 120 min à 37°C, 5 min à 85°C), l'ADNc peut être utilisé directement ou peut être conservé à -20°C.

D2.2.3 ANALYSE PAR RT-PCR QUANTITATIVE EN TEMPS RÉEL

Le taux de cDNA est quantifié par RT-PCR quantitative en temps réel grâce à la technologie Taqman®. La réaction d'amplification est réalisée dans des plaques 96 puits (Applied Biosystems) où sont déposés par puits : 4µL d'ADNc à 2,5ng/µL, 5µL de mix Taqman (Applied Biosystems), 0.25µL de sonde (*Trib1* (Mm00457875_m1), *Hprt1* (Mm01318743_m1), *Aicda* (Mm00507774_m1), *Bach2* (Mm00464379_m1), *Bcl-6* (Mm00477633_m1), *Irf4* (Mm00516431_m1), *Pax5* (Mm00435501_m1), *Blimp1* (Mm01187285_m1), *Xbp1* (Mm00457357_m1); Applied Biosystems) et 0.75µL d'H₂O stérile. La plaque est centrifugée puis placée dans l'appareil StepOnePlus (Applied Biosystems). L'amplification est réalisée par le programme suivant : 2 min à 50°C et 40 cycles : 5 s à 95°C et 1 min à 60°C. L'expression de *Trib1* est calculée de façon comparative grâce au logiciel StepOnePlus, par rapport au gène de ménage *Hprt1*, selon la méthode des $\Delta\Delta Ct$. Le taux d'expression (RQ, $\Delta\Delta Ct$) de *Trib1* dans les cellules des souris *Trib1-KI-Bimm*, *Trib1-KI-Bmat* ou *Trib1-KI-Tmat* a été comparé à celui des cellules *Trib1-KI*.

D2.3. ÉVALUATION DE LA DÉLÉTION DE LA CASSETTE STOP

D2.3.1 EXTRACTION D'ADN À PARTIR DE CULOTS CELLULAIRES CONGELÉS

L'ADN est extrait à partir de culot de cellules médullaires totales, de cellules B matures spléniques triées et de cellules « non-B » spléniques triées, conservés à -80°C en culot sec, grâce à l'utilisation du kit Wizard genomic DNA purification (Promega). Ce kit consiste en une lyse du noyau des cellules, suivie d'une précipitation et de l'élimination des protéines puis de la récupération de l'ADN. L'ADN extrait est ensuite conservé à 4°C.

Des amorces spécifiques du transgène ont été choisies dans le but de mettre en évidence la délétion de la cassette Néomycine STOP. Une amorce sens « Fdel » (5'-ATTGTGCTGTCTCATCATTTT-3' ; Eurogentec) s'hybridant juste avant le premier site loxP, et une amorce anti-sens « R1 » (5'-ATTCCCATTAACACTACC-3' ; Eurogentec) s'hybridant sur la séquence codante de Trib1, permettent l'amplification d'un fragment de 522pb quand l'excision est opérée par la Cre. Dans le cas contraire, le fragment mesure environ 3000pb. Pour cela, de la même façon qu'en **D2.4.2**, 2µL d'ADN extrait sont ajoutés au mix de 8µL de RedExtract (Sigma), des amorces et d'H₂O stérile. Le programme d'amplification est le suivant : 5 min à 94°C, 30 cycles : 30s à 94°C, 30s à 54.8°C, 1min30 à 72°C, puis 7 min à 72°C. Les produits de PCR sont migrés sur gel d'agarose 1% puis révélés aux UVs.

D2.4. VISUALISATION DE LA GFP PAR CYTOMETRIE EN FLUX

Les cellules totales de rate et de MO ont été récupérées, comptées puis reprises à raison de 5.10^5 cellules par 20µL de tampon « Facs Wash » (PBS, 2% sérum de veau foetal (FAN), 10mM Azide de Sodium (Sigma)). L'expression transgénique de la GFP, couplée à l'expression de l'IgM et du B220, marqueurs spécifiques des LB, a été visualisée par cytométrie en flux, sur l'appareil FACS Calibur (BD Biosciences), après marquage des cellules avec des anticorps anti-IgM et anti-B220 de souris La technique d'immunomarquage des cellules sera expliquée en **partie D3.1**.

D3. ANALYSE DES CELLULES LYMPHOÏDES PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX

D3.1. MARQUAGE DES CELLULES LYMPHOÏDES

Le marquage des cellules est réalisé avec des anticorps couplés à des fluorochromes en plaque 96 puits (Greiner), chaque puits contenant 5.10^5 cellules dans 20µL. Les cellules sont incubées avec différentes combinaisons d'anticorps anti-souris (parmi lesquels : anti-B220, -CD44, -CD86, -CD19, -CMHII , -CD3, -CD8, -CD4, -CD21, -CD23, -CD93, -CD24, -CD95, , -GL7, -IgM, -IgA, BD Biosciences) couplés à un fluorochrome (PE, PerCp, APC ou Cy5), à raison de 50µL d'anticorps dilué pour 20µL de cellules. Après 15 min d'incubation à 4°C, la plaque est centrifugée pendant 5 min à 1500 rpm, puis le culot cellulaire est lavé avec 150µl de Facs Wash. Les cellules sont ensuite reprises dans 200µL de

Facs Wash puis sont analysées par le cytomètre en flux FACS Calibur (BD Biosciences). L'analyse des données a été réalisée grâce au logiciel FlowJo7.6.5.

D3.2. TRI DES CELLULES LYMPHOCYTAIRES PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX

Après récupération des organes d'intérêt (à savoir rate et MO, voir **D2.1**), les cellules sont comptées et ramenées à une concentration de $10 \cdot 10^6$ cellules/mL de tampon PBE pour être marquées. Le marquage des cellules est effectué en tube avec les combinaisons d'anticorps anti-B220, -IgM (BD Biosciences) pour les cellules médullaires et anti-IgM, -CD21 et -CD23 (BD Biosciences) pour les cellules spléniques. Après 15 minutes d'incubation avec les anticorps, les cellules sont lavées dans 7mL de PBE puis reprises à raison de $40 \cdot 10^6$ cellules/mL de PBE. Le tri cellulaire est effectué au sein de la plateforme de cytométrie à l'IGBMC (Illkirch) sur un FACS Aria (BD Biosciences). Les cellules triées sont ensuite lavées au PBS, et le culot sec est congelé à -80°C en vue d'une extraction d'ARN.

D3.3. ANALYSE DU PHÉNOTYPE DES CELLULES APRÈS STIMULATION *IN VITRO*

D3.3.1 STIMULATION DES CELLULES SPLÉNIQUES *IN VITRO*

Les splénocytes totaux ou LB CD43⁻ triés sont repris à une concentration de $2 \cdot 10^6$ cellules par mL dans un milieu de culture composé de RPMI1640 avec ultraglutamine (Lonza), 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (FAN), 50 μM de β -mercaptoéthanol (Gibco), 10mM Hepes (Lonza), 1mM pyruvate de sodium (Lonza), et pénicilline/streptomycine (respectivement 100U/mL et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Lonza). Les cellules sont ensuite réparties dans des plaques 6 puits (Falcon) à une concentration finale de $1 \cdot 10^6$ cellules/mL par puits, puis sont incubées avec un anticorps anti-IgM (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, anticorps F(ab')₂ de chèvre anti-IgM de souris, Jackson Immunoresearch) ; du LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, produit par *Salmonella typhosa*, Sigma) ; une combinaison de LPS de *Salmonella typhosa* (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma) et d'IL-4 (10ng/mL, Sigma) ; un agoniste du TLR3 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Poly I :C, Invivogen) ; un agoniste du TLR9 (5 μM , ODN2395, Invivogen) ; un agoniste du TLR7 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Imiquimod, Invivogen) ; un agoniste du TLR1/2 (250ng/mL, PAM3CSK4, Invivogen) ; ou du milieu de culture seul. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C pour une durée variable de 48h, 72h ou 96h selon les expériences.

D3.3.2 ANALYSE DES CELLULES STIMULÉES PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX

D3.3.2.1 ANALYSE DES MARQUEURS MEMBRANAIRES D'ACTIVATION ET DE DIFFÉRENCIATION

Après une durée variable d'incubation à 37°C , le surnageant est récupéré et conservé à -20°C afin d'être analysé en ELISA pour sa composition en Ig, et les cellules sont lavées dans du tampon Facs Wash, puis marquées avec les anticorps d'intérêt de la même façon que décrit en partie C.1. Elles sont ensuite analysées au FACS Calibur (BD Biosciences).

D3.3.2.2 ANALYSE DE MARQUEURS INTRACYTOPLASMIQUES

Evaluation de la prolifération par marquage du Ki67

Le marquage intracytoplasmique est réalisé en tubes de 5mL (Falcon), à raison de 1.10^6 cellules par tube. Après un marquage membranaire classique (décrit en partie C.1) avec un anticorps anti-B220, les cellules sont fixées et perméabilisées avec 90 μ L de la solution de fixation du kit de perméabilisation « cytofix/cytoperm » (BD Biosciences) durant une incubation de 20 minutes à 4°C. Après 2 lavages avec la solution « permwash », le noyau est perméabilisé grâce à une incubation de 10 minutes à 4°C avec 90 μ L du tampon Cytoperm plus buffer. Deux lavages successifs sont réalisés puis l'anticorps anti-Ki67, dilué au 1/30^e est ajouté aux cellules à raison de 50 μ L par tube. Les cellules sont à nouveau lavées puis reprises dans 200 μ L de Facs Wash. Elles sont ensuite analysées au FACS Calibur (BD Biosciences).

Etude de l'expression des IgG1 intracytoplasmiques

Le marquage des IgG1 intracytoplasmiques est réalisé sur 1.10^6 cellules dans des tubes de 5mL (Falcon) et en tampon PBE. La première étape consiste au marquage du B220 membranaire associé à une étape de saturation avec 5 μ g/mL d'anticorps de chèvre anti-IgG de souris (Jackson immunoresearch), qui permet de saturer l'ensemble des IgG membranaires. Le tout est incubé 30 minutes à 4°C et à l'abri de la lumière. Après un lavage avec 1mL de PBE, les cellules sont fixées avec le kit de fixation/perméabilisation (eBioscience). Pour cela, les cellules sont reprises avec 100 μ L de tampon de fixation (eBioscience) et sont incubées 20 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière. Les cellules sont ensuite lavées et perméabilisées grâce à 2 lavages successifs avec 2mL de la solution de perméabilisation (eBioscience). Puis 10 μ L d'anticorps de chèvre anti-IgG1 de souris couplé au fluorochrome PE (Southern Biotech) dilué sont ajoutés par tube, puis incubés 30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Après un lavage avec le tampon de perméabilisation puis un autre avec du PBE, les cellules sont reprises dans 200 μ L de PBE et peuvent être analysées par le FACS Calibur (BD Biosciences).

Etude de la mort cellulaire

Juste avant l'analyse au FACS, les cellules sont reprises dans du Facs Wash contenant 2,5 μ g/mL d'Iodure de Propidium (IP) (Sigma). L'IP s'intercale au sein de l'ADN des cellules n'ayant plus de membrane intègre, et permet ainsi de discriminer les cellules vivantes des cellules mortes ou en train de mourir.

D3.3.3 ANALYSE DES PROTÉINES PAR WESTERN-BLOT

D3.3.3.1 EXTRACTION DES PROTÉINES TOTALES

Les cellules sont récoltées, lavées avec du PBS froid et centrifugées pendant 5 minutes à 1500 rpm. Le culot cellulaire est repris dans du tampon de lyse « TNE » (50mM Tris pH8, 1% (v/v) NP-40, 2mM EDTA) additionné extemporanément d'une pastille d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche). Le tout est incubé 15 minutes sur glace puis centrifugé 10 minutes à 4°C à 13 000 rpm. Le surnageant contenant les protéines est récolté, puis la concentration protéique est dosée par la technique BCA (Thermo Scientific).

D3.3.3.2 WESTERN-BLOT

Les protéines sont ajoutées à un volume de bleu de dépôt 5x (0,6M Tris HCl pH 6.8, 50% (v/v) glycérol, 170 mM SDS, 50mM DTT, bleu de bromophénol), puis les échantillons sont chauffés pendant 5 minutes à 105°C. Un marqueur de poids moléculaire (Thermo scientific) ainsi que chaque échantillon sont déposés sur un gel de polyacrylamide n% selon le poids de la protéine étudiée, fait-maison (n% (v/v) acrylamide (Biorad), 1.5M Tris pH 6.8, 0.2% (v/v) APS, 0.05% (v/v) TEMED) ou commercial (Biorad). La migration est réalisée à 150 V pendant 1h dans un tampon de migration (25mM Tris pH 8.3, 192mM Glycine, 0.1% (v/v) SDS). Une fois l'électrophorèse terminée, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (Biorad) par un électrotransfert à 1,3A pendant 7 minutes (Biorad). La membrane est ensuite incubée dans un tampon de saturation (5% lait (Régilait), 100mM Tris-HCl pH 7.2, 50mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20) à température ambiante pendant 2 heures afin de bloquer les sites aspécifiques. Après cette étape de saturation, selon les cas, la membrane est incubée pendant 2 heures à température ambiante ou sur la nuit à 4°C :

- Avec un anticorps primaire directement couplé à la HRP : anticorps de chèvre anti-Actine (sc-1615, Santa-Cruz, utilisé au 1/5000) ou anti-Flag (A8592, Sigma, utilisé au 1/1000).
- Avec un anticorps primaire non couplé à la HRP : anticorps de lapin anti-PhosphoErk (#9101, Cell signaling, utilisé au 1/1000), anticorps de lapin anti-Erk Total (#9102, Cell signaling, 1/1000), anticorps de souris anti-PhosphoIkb (#9246, Cell signaling, utilisé au 1/1000), anticorps de lapin anti-Ikb Total (#9242, Cell signaling, utilisé au 1/1000), un anticorps de lapin anti-STK40 (sc-368883, Santa Cruz, utilisé au 1/2000). Après 45 minutes de lavages (3x15minutes) avec du tampon de lavage TBST (100mM Tris-HCl pH 7.2, 50mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20), un anticorps secondaire couplé à la HRP est ajouté : anticorps d'âne anti-IgG de lapin (A9340V/AF, GE Healthcare, 1/10000), anticorps de souris anti-chaînes légères de lapin (ab99697, Abcam, 1/40000) ou anticorps de chèvre anti-IgG de souris (115-036-071,

Jackson immunoresearch, 1/10000). Ce second marquage est réalisé pendant une incubation d'une heure à température ambiante.

Les membranes sont à nouveau lavées dans du TBST pendant 45 minutes puis l'immunoempreinte est révélée grâce à une solution d'ECL (Enhanced ChemiLuminescence) (GE Healthcare).

D4. ÉTUDE DE LA RÉPONSE ANTICORPS *IN VIVO*

D4.1. DOSAGE DES IMMUNOGLOBULINES TOTALES ET SOUS-CLASSES D'IGG PAR ELISA

Le dosage des IgM ou IgG totales ainsi que certaines sous-classes d'IgG a été fait sur le sérum des souris ou sur le surnageant de culture des cellules après stimulation *in vitro*.

D4.1.1 RÉCUPÉRATION DU SÉRUM DES SOURIS ET DES SURNAGEANTS DE CULTURE

Le sérum est récupéré suite à une double centrifugation du sang total à 7000 rpm pendant 10 minutes. Le sérum, correspondant au surnageant après centrifugation, est isolé dans un nouveau tube puis conservé à -20°C. Les surnageants de culture sont récupérés après stimulation *in vitro*, centrifugés afin de les débarrasser des cellules, et stockés à -20°C.

D4.1.2 DOSAGE DES IGM ET IGG TOTALES

La première étape, consistant au coating des 96 puits de la plaque ELISA (Nunc) correspond à une incubation de 50µL d'anticorps anti-IgG murines (F(ab')₂ de chèvre anti-IgG de souris, 2.5µg/mL, Jackson immunoresearch) ou anti-IgM murines (F(ab')₂ de chèvre anti-IgM de souris, 5µg/mL, Jackson immunoresearch) dilués en tampon carbonate/bicarbonate (0.1M pH 9.5 (Na₂CO₃, NaHCO₃, NaN₃), pendant 1h à 37°C. Après lavage des plaques au PBS, les puits sont saturés avec 100µL de PBS BSA 1% (BSA : albumine sérique bovine, Euromedex) pendant 45 min à 37°C. Des dilutions croissantes d'échantillons (sérum de souris ou surnageants de culture) et d'IgG ou d'IgM de concentrations connues, servant de courbe standard, sont réalisées en tampon PBS-Tween 0.1%, gélatine 1%. 50µL de ces dilutions sont déposées par puits puis les plaques sont incubées pendant 2h à 37°C. Après lavage au PBS-Tween 0.1% (PBS-T) un anticorps de chèvre anti-IgG ou anti-IgM murin couplé à la peroxydase (Jackson immunoresearch), dilué au 1/10000^e dans du PBS-T, est incubé 1 heure à 37°C. Les plaques sont à nouveau lavées au PBS-T puis révélées en ajoutant un des substrats de la peroxydase, l'OPD (Otho-Phénylène-Diamine, Sigma), pendant 20 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. La réaction enzymatique entre la peroxydase et son substrat est arrêtée par l'ajout d'une solution de H₂SO₄-2N-Sulfite de Na 0.5%. Enfin, l'absorbance est mesurée à 492nm par le lecteur Multiskan FC (Thermoscientific). Les taux d'IgG totales et IgM sont calculés à partir des courbes standardes.

D4.1.3 DOSAGE DES SOUS-CLASSES IGG1, IGG2B ET IGG3

Les étapes sont les mêmes qu'en C3.2 : pour le coating, les anticorps sont utilisés à des concentrations de 2,5µg/mL pour l'anticorps de chèvre anti-IgG1 de souris et de 5µg/mL pour les anticorps de chèvre anti-IgG2b et anti-IgG3 de souris (Southern Biotech). Quant aux révélations, elles sont réalisées avec des anticorps de chèvre anti-IgG1, -IgG2b ou -IgG3 de souris, couplés à la peroxydase (Southern Biotech), dilués respectivement au 1/20000^e, 1/15000^e et 1/10000^e, dans du PBS-T.

D4.2. IMMUNISATIONS EXPÉRIMENTALES

D4.2.1 IMMUNISATIONS AVEC DES ANTIGÈNES T-DÉPENDANTS

D4.2.1.1 IMMUNISATION AVEC DE L'OVALBUMINE

L'ovalbumine associée à l'adjuvant de Freund

Des souris de 6 mois ont été injectées par voie intra-péritonéale (IP) aux jours 0, 10 et 20 avec 100 µg d'ovalbumine (OVA, Sigma). La première injection d'OVA à J0 est injectée en présence de l'adjuvant complet de Freund (Sigma), la seconde injection à J10, en présence de l'adjuvant incomplet de Freund (Sigma) et la troisième à J20 dans du PBS. Avant chaque injection, ainsi qu'aux jours 6 et 30, le sang des animaux est prélevé au niveau rétro-orbitale dans le but de récupérer le sérum.

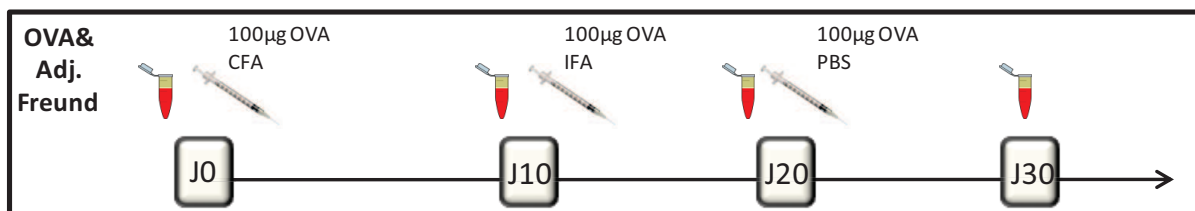


Figure 47 : Schéma récapitulatif de la cinétique d'injection et de prélèvement du sérum lors de l'immunisation à l'OVA avec l'adjuvant de Freund.

L'ovalbumine associée à l'hydroxyde d'aluminium

Les immunisations ont été réalisées de la même façon que dans le précédent paragraphe, excepté que les 100 µg d'OVA ont été injectés en présence de 250 µg d'hydroxyde d'aluminium (« alum ») à J0, J10 et J20. Une injection supplémentaire a été effectuée 12 semaines (84 jours) après la première. Le sérum a été collecté avant chaque injection ainsi qu'aux jours 6, 30 et 89.

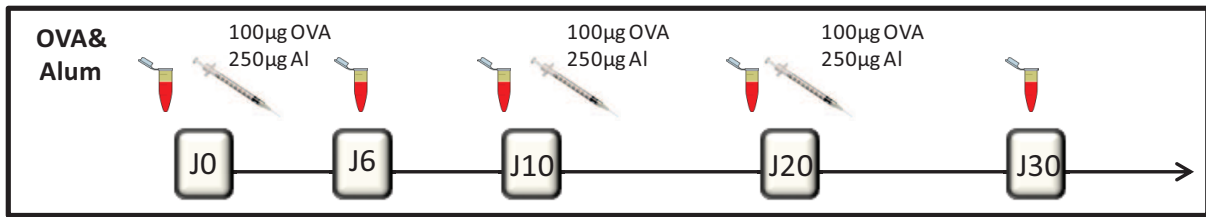


Figure 48 : Schéma récapitulatif de la cinétique d'injection et de prélèvement du sérum lors de l'immunisation à l'OVA avec l'Alum.

Dosage des IgM et IgG anti-OVA

Pour la détection des anticorps anti-OVA, le coating est réalisé avec 50µL d'OVA à 50µg/mL (Sigma) dilué dans du tampon carbonate/bicarbonate pendant 1h30. Les étapes suivantes de saturation, dépôts des échantillons et de révélation sont réalisées de la même façon qu'en **partie D4.1**.

D4.2.1.2 IMMUNISATION AVEC DU NP-KLH

Des souris âgées de 6 mois ont été injectées avec du NP-KLH (4-hydroxy-3-Nitrophenylacetyl-Keyhole Limpet Hemocyanin) (Biosearch technologies) par voie IP. Deux injections ont été réalisées, la première à J0 avec 100 µg de NP-KLH associé à 250 µg d'Alum, la seconde à J23 avec 10 µg de NP-KLH et 250µg d'Alum. Le sérum a été récupéré avant chaque injection ainsi qu'aux jours 6, 10 et 29.

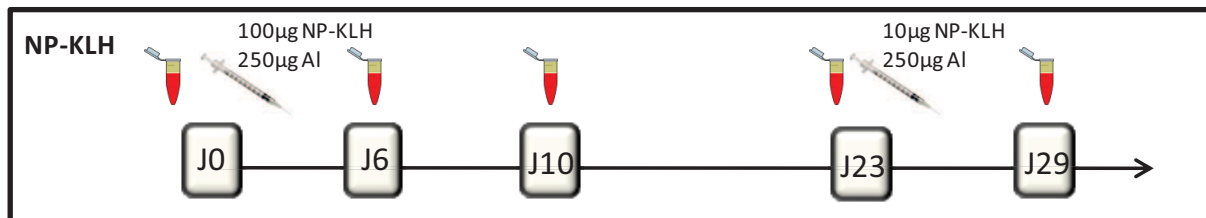


Figure 49 : Schéma récapitulatif de la cinétique d'injection et de prélèvement du sérum lors de l'immunisation avec NP-KLH.

Dosage des IgM et IgG anti-NP

Pour la détection des anticorps anti-NP, le coating est réalisé avec 50µL de NP-BSA (Ratio 1-9 ; Biosearch technologies) à 5µg/mL dilué dans du tampon carbonate/bicarbonate pendant 1h30 à 37°C. Les étapes suivantes de saturation, dépôt des échantillons et de révélation sont réalisées dans les mêmes conditions qu'en **D4.1**.

D4.2.2 IMMUNISATION AVEC UN ANTIGÈNE T-INDÉPENDANT : LE NP-LPS

Des souris âgées de 6 mois ont été injectées par voie IP aux jours 0, 10 et 20 avec 100µg de NP-LPS (Biosearch technologies) dilués dans du PBS. Le sérum a été récupéré aux jours 0, 6, 10, 20 et 30.

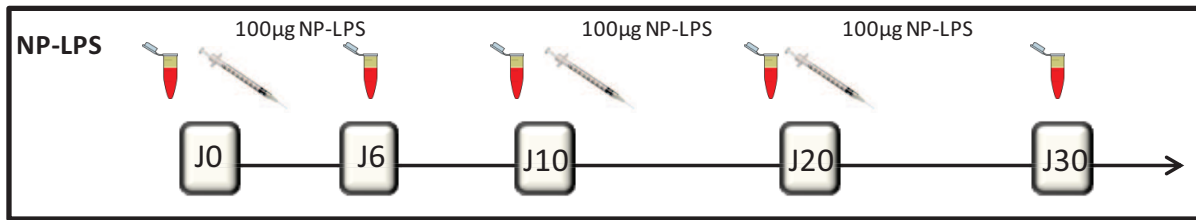


Figure 50 : Schéma récapitulatif de la cinétique d'injection et de prélèvement du sérum lors de l'immunisation avec NP-LPS.

La détection des anticorps anti-NP est réalisée selon le même protocole que lors de l'immunisation avec NP-KLH.

D4.3. LA RÉPONSE ANTICORPS FACE À DES AGENTS INFECTIEUX

D4.3.1 INFECTION BACTÉRIENNE PAR *BORRELIA BURGENDORFERI*

L'infection des souris a eu lieu au sein de l'équipe dirigée par le Pr. B. Jaulhac (EA4438 « Physiopathologie et Médecine translationnelle », équipe « Borréliose de Lyme », Faculté de Médecine de Strasbourg et Centre National de Référence des *Borrelia* – Laboratoire associé, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg).

La culture de *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (souche N40) est réalisée à faible passage (P8, afin de maintenir la pathogénicité de la souche sur l'animal) en milieu liquide Barbour-Stoenner-Kelly (BSK-K, Sigma) enrichi avec 6% de sérum de lapin normal (Sigma) et à 33°C.

Les lignées Trib1-KI-Bimm et Trib1-KI sont infectées à l'âge de 4 semaines, avec un inoculum moyen de 1.10^5 spirochètes par injection dans un volume de 100µL, par voie intradermique au niveau de la base du dos après rasage. Les souris utilisées comme contrôle de l'infection sont injectées avec un volume équivalent de milieu de culture stérile BSK-H seul. Les animaux infectés et témoins sont hébergés à l'animalerie de l'institut de Bactériologie de Strasbourg. Leur sérum est récupéré à J0 avant l'infection et chaque semaine jusqu'à leur sacrifice, 4 semaines après injection.

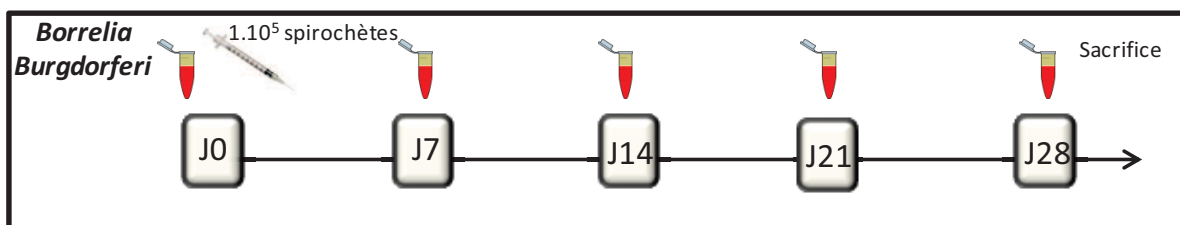


Figure 51 : Schéma récapitulatif de la cinétique d'injection et de prélèvement du sérum lors de l'infection à *Borrelia burgdorferi*.

D4.3.1.1 CONTRÔLE DU STATUT INFECTIEUX DES ANIMAUX

PCR quantitative du gène de la flagelline de *Borrelia Burgdorferi*

La PCR quantitative du gène de la flagelline (*fla*) a été réalisée par l'équipe du Pr. B. Jaulhac (EA4438 « Physiopathologie et Médecine translationnelle », équipe « Borréliose de Lyme », Faculté de Médecine de Strasbourg). Après extraction et purification d'ADN isolé à partir de l'articulation de la patte arrière gauche des animaux, le gène *fla* spécifique de Bb est amplifié par la technologie Taqman (Applied Biosystems). Le gène codant pour la *gapdh* murine (glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase) a été choisi comme gène de référence. Etant donné qu'il n'existe qu'une seule copie du gène *fla* par bactérie, il est possible d'évaluer de façon précise le nombre de spirochètes dans l'échantillon tissulaire. Ce nombre a ensuite été normalisé par rapport au gène de la *gapdh* selon la méthode des $\Delta\Delta Ct$.

D4.3.1.2 DÉTECTION DES IG SPÉCIFIQUES DE *BORRELIA BURGENDORFERI*

Pour la détection des anticorps anti-Bb, le coating est réalisé avec 1.5µg/mL de Bb soniqué et dilué dans du tampon carbonate/bicarbonate pendant 90 minutes à TA. L'étape de saturation est ensuite faite avec une solution de PBS-lait 3% durant 1h à TA, puis les séra à tester sont dilués et ajoutés aux puits et laissés incubés 45 minutes à 37°C. Après ajout de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase, le tout est révélé grâce à une solution de TMB (tétraméthylbenzidine, autre substrat de la peroxydase). La réaction enzymatique est stoppée par ajout de HCl 1M. Les DO sont lues à une longueur d'onde de 450nm.

D4.4. INDUCTION DE LA PRODUCTION D'AUTOANTICORPS PAR LE LPS**D4.4.1 IMMUNISATION DES SOURIS AVEC LE LPS**

Du LPS de *Salmonella typhimurium* (Sigma) dilué dans du PBS a été injecté à des souris âgées de 3 mois en IP à raison de 50µg par souris à J0, et 25µg aux J7 et J14. Des souris contrôles ont été injectées avec du PBS. Un prélèvement sanguin a été effectué avant chaque injection ainsi qu'au jour 28.

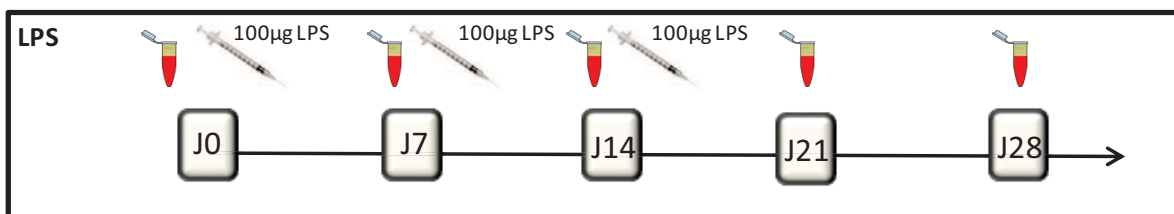


Figure 52 : Schéma récapitulatif de la cinétique d'injection et de prélèvement du sérum lors de l'injection de LPS.

D4.4.2 DÉTECTION DES IGM ANTI-ADN DOUBLE BRIN PAR ELISA

Pour la détection des autoanticorps anti-ADNdb, le coating des puits est réalisé par incubation de la plaque ELISA avec 50µL d'ADN de thymus de veau (Calf Thymus DNA, Sigma) dilués à 0.1µg/mL dans du tampon HCl (Tris HCl 50mM, EDTA 10mM, pH 7.5), pendant 1 heure à 37°C. Une étape de digestion avant l'étape de saturation à la BSA est nécessaire pour permettre la dégradation de l'ADNsb. Pour cela, une solution contenant de la S1 nucléase (Promega), diluée en tampon Acétate de Sodium (50mM Na Acétate, 50mM NaCl, 1mM ZnSO₄, 5% Glycérol, pH 4.5), est ajoutée. Les plaques sont ensuite incubées pendant 1h à 37°C, puis lavées au PBS. Les étapes suivantes : saturation, dépôt des échantillons et révélation sont réalisées dans les mêmes conditions **qu'en D4.1**, excepté que l'incubation des échantillons est faite à température ambiante sur la nuit entière.

D4.5. TECHNIQUE D'ANALYSE DES ELISA PERMETTANT LA DÉTECTION D'IG SPÉCIFIQUES D'ANTIGÈNES

Pour tous les ELISA spécifiques d'antigène, comme nous ne pouvons pas réaliser de courbe standard, les résultats sont calculés en titres (inverse de la dilution nécessaire pour atteindre une densité optique (DO) choisie).

D5. À LA RECHERCHE DES PARTENAIRES DE TRIB1

D5.1. PRODUCTION DU MODÈLE CELLULAIRE CH12F3-TRIB1

D5.1.1 CLONAGE DE LA SÉQUENCE TRIB1 DANS LE VECTEUR PLASMIDIQUE PMX-PIE

D5.1.1.1 AMPLIFICATION ET SOUS-CLONAGE DE LA CDS DE TRIB1

La CDS de *Trib1* murin (1120pb, NM144549.4) a été amplifiée par deux PCR successives à partir du vecteur CTV-Trib1 utilisé pour la génération du modèle murin Trib1-KI. Les primers utilisés pour l'amplification ont été conçus pour ajouter deux étiquettes successives : HA et Flag, soit du côté C-terminal, soit N-terminal de la séquence de Trib1. Ainsi, deux constructions ont été produites à partir de deux couples de primers différents (Eurogentec). Les couples sens (n)/anti-sens (n') **1/1'** ou **2/3'** permet l'ajout de l'étiquette **HA** et le couple **1/2'** ou **3/3'**, l'étiquette **Flag**. Pour la première construction, nommée **Trib1-HA-Flag** (étiquette en C-terminal) les séquences des primers sont : sens **1** : 5'-CGGGATCCACCATGCGGGTCCGTCCTTGC-3' ; anti-sens **1'** : 5'-GAGGCTAGCATAATCAGGAACATCATAACGGATAGCAGAAGAAGGAACTTATGTCAC-3' ; anti-sens **2'** : 5'ATGCGGCCGCCTTACTTGTTCATCGTCCTTGTAGTCCATTCCTCCGAGGCTAGCATAATCAGGAACATCATACGGATA ; pour la seconde construction, nommée **Flag-HA-Trib1** (étiquette en N-Terminal) les séquences de primers sont : sens **2** : 5'CGGGATCCACCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGGGAGGATATCCGTATGATGTTCTGATTATGCTAGCCTC-3' ; sens **3** : 5'-TATCCGTATGATGTTCTGATTATGCTAGC

CTCGGAGGAATGCGGGTCGGTCCCGTGCCTTTGC-3' ; anti-sens **3'** : 5'ATGCGGCCGCCTAGCAGAAGAA GGAACTTATGTCAC-3. Ces primers permettent aussi l'ajout des sites de restrictions des enzymes **Not1** et **BamHI**, de séquences respectives GCGGCCGC et GGATCC. Les conditions d'amplification par PCR correspondent à : 94°C 2 minutes ; 15 cycles : 94°C 30 secondes, 60°C 30 secondes, 68°C 70 secondes puis 68°C 5 minutes. Les produits de PCR de 1195pb sont ensuite purifiés, sous-clonés dans le vecteur pCR2.1 TA cloning vector (Invitrogen), puis séquencés afin de vérifier l'absence de mutations.

La construction Trib1-sans-étiquette a été réalisée de la même façon si ce n'est que l'étape d'amplification a été réalisée en une seule étape avec le couple de primers sens/anti-sens **1/3'** (Eurogentec). Ceci a permis l'ajout des sites de restriction pour le clonage ultérieur dans le vecteur pMX-Pie, mais d'aucun type d'étiquette.

D5.1.1.2 CLONAGE DANS LE VECTEUR PMX-PIE

Une quantité de 10µg de vecteur pMX-Pie (*Barreto et al., 2003*) (**Figure 53**) a été digérée par les enzymes de restriction NotI (50U) et BamHI (20U) (Biolabs) dans un volume total de 50µL, pendant 2h à 37°C en présence de tampon NEB3 1x. De la même façon, les vecteurs pCR2.1-Trib1-Cter et pCR2.1-Trib1-Nter ont été digérés avec les mêmes enzymes afin d'en extraire les fragments mTrib1-HA-Flag et Flag-HA-mTrib1, constituant les futurs inserts. Le vecteur pMX-Pie et les inserts digérés sont ensuite ligués dans un rapport moléculaire de 1:1 et 2:1 (vecteur:insert). Ainsi, 80ng de vecteur sont ajoutés à 13,5ng ou 27ng d'insert et à 80U de T4 DNA ligase diluée dans son tampon (Promega), pour un volume final de 20µL. L'ensemble est ensuite incubé à 4°C sur toute la nuit.

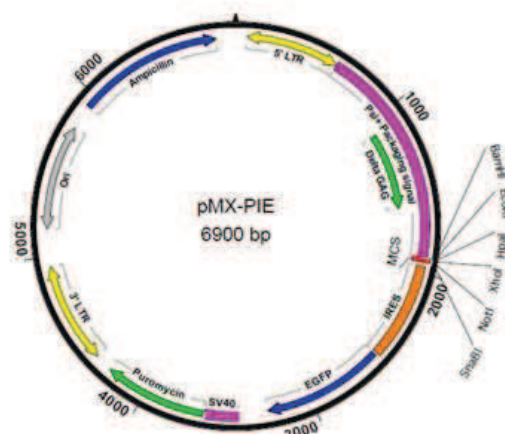


Figure 53 : Carte du vecteur pMX-Pie (Puromycin Ires eGFP)

D5.1.1.3 SÉLECTION DES CLONES POSITIFS

Les produits de ligation sont ajoutés à 100µL de bactéries compétentes One shot® TopTen (chemically competent *E.Coli*, Invitrogen) et l'ensemble est incubé sur glace pendant 30 minutes. Après un choc thermique de 90 secondes à 42°C et 2 minutes supplémentaires d'incubation sur glace, 800µL de milieu SOC (20% Tryptone, 5% Extrait de levure, 0,5% NaCl, 1.25mM KCl, 2.5mM MgCl₂, 10mM glucose) sont ajoutés. Les bactéries sont ensuite étalées sur des boîtes de gélose LB agar contenant 50µg/mL d'ampicilline, ensuite incubées à 37°C toute la nuit. Les colonies présentes sur les boîtes sont criblées afin d'identifier celles qui ont inséré le produit de ligation. La colonie est prélevée avec un cône en plastique stérile, infusée dans 100µL d'H₂O, puis la PCR de criblage est réalisée avec le couple de primer sens **1** : 5'-CGGGATCCACCATGCGGGTCGGTCCCGTTCGTTTTGC-3' et anti-sens **R1** : 5'-CTCGACCAGTTTAGTTACCC-3' (Eurogentec) sur 20µL de la solution H₂O/bactéries avec le kit GoTaq Flexi DNA polymérase (Promega). L'ADN amplifié des colonies positives est ensuite extrait du gel puis séquencé afin de vérifier l'insertion dans le vecteur.

D5.1.2 INFECTION RÉTROVIRALE DES CELLULES CH12F3

D5.1.2.1 PRODUCTION DES VIRIONS RÉTROVIRAUX

Une quantité de $1.5 \cdot 10^5$ cellules fibroblastiques humaines BOSC (dérivées des cellules 293T) sont mises en culture dans des plaques 6 puits dans un **milieu A** composé de DMEM (4,5g/L de glucose, (Gibco)), 10% de sérum de veau foetal décomplémenté, 10mM HEPES, 1mM pyruvate de sodium, pénicilline/streptomycine (respectivement 100U/mL et 100µg/mL), et incubées à 37°C. Après 24h de culture, les cellules atteignent entre 50 et 60% de confluence. Le mix décrit ci-après est tout d'abord incubé 15 minutes à température ambiante, puis ajouté goutte à goutte sur les cellules : il contient 94µL de milieu Optimem (Gibco), 6µL d'agent Fugene6 (Promega), 1.2µg du plasmide pMX-pie contenant la construction mTrib1 choisie, et 0.8 µg du plasmide d'assemblage pCL-Amphotropic contenant les gènes de l'enveloppe (*env*), d'encapsidation (*gag*) et de l'ADN polymérase (*pol*). Les cellules BOSC sont ensuite incubées pendant 48h à 37°C, pour permettre la production des virions.

D5.1.2.2 INFECTION DES CELLULES CH12F3

Les cellules CH12F3 (Nakamura *et al.*, 1996) sont réparties dans des tubes de 15mL à raison de 1.10^6 cellules/tube puis centrifuguées. Puis le surnageant des cellules BOSC est récupéré à 48h post-transduction, filtré à travers un filtre de 0.45µm et additionné de 10µg/mL de polybrène (Sigma) et 20mM d'HEPES. Le tout est utilisé pour resuspendre les culots de cellules CH12F3. Les cellules CH12F3 sont ensuite incubées en plaques 6 puits et l'infection est initiée par centrifugation de la plaque à 2500 rpm pendant 90 minutes. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h, ensuite l'infection est arrêtée. Pour cela, les cellules CH12F3 sont récupérées et lavées dans le **milieu B** composé de RPMI1640, 10% de sérum de veau foetal décomplémenté, 10mM Hepes, 1mM

pyruvate de sodium, 50 μ M de β -mercaptoéthanol et pénicilline/streptomycine (respectivement 100U/mL et 100 μ g/mL). Puis les cellules ayant intégré le plasmide sont sélectionnées par ajout de puromycine (0,5 μ g/mL ; Sigma) au milieu de culture, puisque le vecteur pMX-Pie contient un gène de résistance à cet antibiotique. Les cellules transduites sont ensuite cultivées de façon standard dans le **milieu B**, additionné de puromycine à 0.5 μ g/mL, ce qui permet le maintien de la lignée CH12F3 à 96% de cellules transduites. Les cellules CH12F3 sont diluées au 1/10^e tous les 2 jours environ.

Les étapes de transfection des BOSC et d'infection des CH12F3 sont vérifiées par la visualisation de la GFP par cytométrie en flux (FACS Calibur, BD Biosciences).

D5.2. ÉTUDE DU PHÉNOTYPE DES CH12F3 TRANSDUITES

D5.2.1 VALIDATION DE LA SUREXPRESSION DE *TRIB1*

La surexpression de *Trib1* dans les cellules CH12F3-Trib1 a été analysée par RT-PCR quantitative en temps réel, comme décrit au cours du paragraphe B2.

D5.2.2 STIMULATION DES CH12F3

Les cellules CH12F3 sont réparties dans des plaques de culture 6 puits à raison de 2.10⁵ cellules/puits, dans 2 mL de **milieu B** supplémenté de 5ng/mL d'IL-4 (Sigma), 1ng/mL de TGF- β (R&D System) et 200ng/mL d'anti-CD40 (BD Pharmingen) et incubées 72h à 37°C. Des contrôles de stimulation ont été réalisés et consistaient en l'incubation d'une même quantité de cellules avec du **milieu B** seul, sans stimuli.

D5.2.3 VÉRIFICATION DE LA COMMUTATION DE CLASSE EN IGA

Les cellules CH12F3 sont récupérées, lavées dans du tampon FACS Wash, puis reprises à une concentration de 25.10⁶ cellules par mL. Les cellules sont ensuite marquées de la même façon qu'en **C1**, avec un anticorps anti-IgA de souris (Southern Biotech) puis sont analysées au FACS Calibur.

D5.2.4 DOSAGE DES IGA DANS LE SURNAGEANT DE CULTURE

Le dosage des IgA est basé sur le même protocole qu'expliqué en C.2 excepté que l'étape de coating a été réalisé avec 2,5 μ g/mL d'anticorps anti-IgA de souris et l'étape de révélation est faite avec un anticorps de chèvre anti-IgA de souris couplé à la peroxydase utilisé au 1/10000^e.

D5.3. IDENTIFICATION DES PARTENAIRES DE *TRIB1* PAR PROTÉOMIQUE

La recherche des partenaires de *Trib1* a été effectuée sur la lignée CH12F3-Trib1-Cter et la lignée CH12F3-GFP-F2, qui a servi de lignée contrôle.

D5.3.1 PRÉSENTATION DE LA LIGNÉE CONTRÔLE CH12F3-GFP-F2

La lignée CH12F3-GFP-F2 a été transduite avec la même construction avec un vecteur rétroviral pMX-Pie contenant une séquence codant pour GFP-HA-Flag. Cette lignée a été gracieusement fournie par B. Reina San Martin (IGBMC, Illkirch).

D5.3.2 EXTRACTION DES PROTÉINES

D5.3.1.1 EXTRACTION DES PROTÉINES CYTOPLASMIQUES

L'extraction protéique a été réalisée sur un nombre de 6 milliards de cellules de chacune des deux lignées, préalablement cultivées en ballon de 6L au service de culture de l'IGBMC. Les cellules sont tout d'abord centrifugées 15 minutes à 2500rpm à 4°C, puis le culot est lavé dans 5 fois son volume de PBS froid. Après centrifugation à 3000 rpm pendant 10 minutes, le volume du culot cellulaire est noté (= Volume 1x) puis ce dernier est repris doucement avec 4 volumes de tampon A (tampon hypotonique, 10mM Tris pH 7.3, 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl, 1mM DTT, 0.5mM PMSF). Les cellules sont ensuite incubées sur glace pendant 10 minutes, puis centrifugées 10 minutes à 2000 rpm, et à nouveau reprises dans 2 volumes de tampon A. Le contenu cytoplasmique est récupéré suite à une lyse mécanique réalisée avec un « douncer ». Après une centrifugation, le surnageant contenant les protéines cytoplasmiques est aliquoté. Le culot restant est, quant à lui, à nouveau traité pour en extraire les protéines nucléaires.

D5.3.1.2 EXTRACTION DES PROTÉINES NUCLÉAIRES

Le culot restant, contenant les noyaux intègres et les restes de membranes cytoplasmiques est repris dans 1 volume de tampon B (tampon hypertonique, 20mM Tris pH 7.3, 25% Glycérol, 1.5mM MgCl₂, 500 mM KCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM DTT, 0.5mM PMSF). Les noyaux sont ensuite éclatés grâce à une méthode de lyse mécanique réalisée avec un dounce et retransvasé dans un tube. Ce tube est mélangé sur roue pendant 1h à 4°C, puis est centrifugé pendant 30 minutes à 14000rpm. Le surnageant contenant les protéines nucléaires est prélevé et dialysé toute la nuit à 4°C dans une cassette de dialyse d'une capacité de 10K (Thermo Scientific) en tampon BC100, tampon de forte stringence (20mM Tris pH7.3, 100mM KCl, 20% glycérol, 0.25mM EDTA, 0.125mM EGTA, 0.5mM PMSF, 1mM DTT, 0.1% NP-40). Le produit de dialyse est récupéré et centrifugé 30 minutes à 14000 rpm pour éliminer le reste des résidus. Le surnageant final est prélevé et aliquoté.

D5.3.1.3 DOSAGE DES PROTÉINES CYTOPLASMIQUES ET NUCLÉAIRES

Le dosage des protéines est réalisé par la méthode de Bradford. Pour cela, 2µL de chaque échantillon protéique est ajouté à 1mL de solution de Bradford (acide phosphorique 85%, bleu de Coomassie,

Ethanol ; Biorad). L'absorbance des échantillons est ensuite mesurée à 595nm et la concentration protéique est calculée. Les échantillons sont conservés à -80°C.

D5.3.3 CO-IMMUNOPRÉCIPITATION

Les coimmunoprécipitations sont faites à partir d'1mg (pour le test de mise au point et de confirmation de partenaires) ou 20 ou 30 mg (pour l'analyse en spectrométrie de masse) d'extraits protéiques cytoplasmiques. L'extrait protéique est repris dans du tampon BC-300 (20mM Tris pH7.3, 300mM KCl, 20% glycérol, 0.25mM EDTA, 0.125mM EGTA, 0.5mM PMSF, 1mM DTT, 0.1% NP-40) pour le ramener à une concentration de KCl plus stringente, à 300mM. La première étape imposée à l'extrait protéique est une étape de pré-lavage. Pour cela, 0.1µL de sérum normal de souris ou de lapin est ajouté à l'extrait, puis le tout est mélangé sur roue 50 minutes à 4°C. Cette étape de mélange est répétée après ajout de 25µL de billes de sépharose couplé à la protéine G, diluées au ½ dans 25µL de tampon BC-300. Les tubes sont ensuite centrifugés 3 minutes à 3000 rpm, puis le culot de billes est éliminé. Le surnageant est transvasé dans un nouveau microtube et l'anticorps immunoprécipitant est ajouté (20µL d'anticorps anti-Flag couplé à des billes d'agarose, Sigma ; 25 ou 50 µL (5 ou 10µg) d'anticorps anti-STK40, sc-368883, Santa Cruz ; 25 ou 50 µL (5 ou 10µg) d'anticorps anti-COP1, sc-, Santa Cruz). Les tubes sont à nouveau mélangés sur roue pendant 3 heures ou toute une nuit à 4°C. Les dernières étapes de récupération de la protéine cible et de ses interactants sont réalisées de 2 manières différentes suivant le type d'anticorps immunoprécipitant utilisé.

1) Pour l'anticorps anti-flag couplé aux billes d'agarose (Sigma) :

Lorsque l'échantillon final doit être analysé par spectrométrie de masse : après incubation avec l'anticorps, celui-ci est tout d'abord lavé 7x avec 1 mL de BC-300 et 1x avec 1mL de BC-100, chacun suivi par des centrifugations de 1 minute à 3000 rpm. Afin de détacher les protéines d'intérêt fixées par l'anticorps anti-Flag des billes d'agarose, l'ensemble est resuspendu dans 80 µL de peptide Flag (Sigma) à 0.2µg/mL, puis transféré sur une colonne (Thermo Scientific) fermée par un bouchon. Après agitation des colonnes pendant 30 minutes à 4°C, les protéines sont récupérées par centrifugation de la colonne. Cette étape d'éluion est répétée 3 fois. Les éluats protéiques sont enfin prêts à être analysés par spectrométrie de masse ou sont conservés à -80°C.

Lorsque l'échantillon final doit être analysé par Western-Blot (pour des confirmations de partenaires par exemple), l'éluion est peu recommandée car elle dilue l'échantillon. Dans ce cas, après incubation avec l'anticorps anti-Flag, l'ensemble billes/anticorps/protéines est directement repris dans du bleu de dépôt 2x (0.24M Tris-HCl pH6.8, 20% Glycérol v/v, 2% SDS v/v, 0.008% bleu de Bromophénol v/v) à raison de 2 fois le volume de billes (40µL de bleu 2X pour 20µL de billes/anticorps). L'échantillon est prêt à être analysé par Western-Blot.

2) Pour les anticorps non couplés à l'agarose (anti-STK40 et anti-COP1, Santa Cruz) :

Un volume de 20µL de billes de sépharose couplées à la protéine G, diluées au ½ dans du BC-100, sont ajoutés directement après incubation avec l'anticorps primaire. Après un mélange sur roue d'1h30 à 4°C, les tubes sont centrifugés et les billes sont lavées 7x avec 1mL de BC-200 (200mM KCl) et 1x avec 1 mL de BC-100. Dans ce cas-là, les protéines d'intérêt ne peuvent pas être séparées des billes de sépharose, puisque l'ajout d'un peptide « compétiteur » pour procéder à l'éluion n'est pas possible. Ainsi, l'ensemble billes/protéines est donc repris dans du bleu de dépôt à raison de 2 fois le volume de billes (20µL de bleu 2X pour 10µL de billes pures) et peut être analysé par Western-Blot ou conservé à -80°C.

D5.3.4 WESTERN-BLOT DE CONFIRMATION DE COIP

D5.3.4.1 APRÈS LA COIP ANTI-FLAG

Pour confirmer la coimmunoprécipitation, un volume de 2µL de chaque éluat de coIP ou d'extrait cytoplasmique total est mélangé à 3µL de bleu de dépôt 2x puis déposé sur un gel de polyacrylamide de gradient 4-12% (NuPage). Après une migration à 200V pendant 35 minutes, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF qui est ensuite saturée toute la nuit avec une solution de TBS-Tween 0.1%, 5% de lait. La membrane est ensuite révélée avec un anticorps anti-Flag-HRP (Sigma) dilué au 1/1000 de la même façon qu'expliqué **en partie D3.3.3.2**.

D5.3.4.2 APRÈS LA COIP ANTI-STK40

Un volume de 15µL de l'ensemble final billes/protéines mélangé à du bleu de dépôt 2x, ainsi que 3µL d'échantillon d'extrait cytoplasmique total sont déposés sur gel de polyacrylamide de gradient 4-15% (Biorad). Après une migration à 170V durant 1h, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF et l'immunomarquage est réalisé comme décrit **D3.3.3.2**. L'anticorps anti-STK40 est utilisé au 1/2000 pour l'immunomarquage, en couplage avec un anticorps secondaire de souris dirigé contre les chaînes légères des IgG de lapin (Abcam) utilisé au 1/40 000 (afin d'éviter la reconnaissance des chaînes lourdes de l'anticorps ayant servi à réaliser la coimmunoprécipitation dont la taille (55kDa) coïncide avec la taille de la protéine Stk40).

D5.3.5 MARQUAGE DES PROTÉINES AU NITRATE D'ARGENT

Le marquage des protéines au nitrate d'argent est effectué sur un gel de polyacrylamide. Le principe repose sur la capacité qu'ont les groupements thiols présents sur les acides aminés à réduire les ions Ag⁺ en Ag. La forme réduite de l'Ag est alors sensible à la lumière et permet la visualisation des protéines à l'œil nu sur le gel.

Pour ce faire, un volume de 20µL du premier éluat des coIP anti-flag et 2µL de ladder sont déposés sur un gel de polyacrylamide (4-15% Biorad ou 4-12% NuPage). Après séparation des protéines à 200V pendant 35min, le gel de polyacrylamide est récupéré pour être traité par un marquage au nitrate d'argent, réalisé grâce au kit ProteoSilver plus (Sigma). Ce kit consiste en une première étape de fixation des protéines sur le gel grâce à une incubation dans une solution composée de 50% d'éthanol et 10% d'acide acétique durant toute une nuit à température ambiante. Le gel est ensuite lavé pendant 10 minutes dans un bain de 100mL d'éthanol à 30%, puis dans un second de 200mL d'H₂O. Il subit ensuite une sensibilisation grâce à une incubation de 10 minutes dans 100mL de solution « sensitizer » (Sigma). Après une double étape de lavage avec 200mL d'H₂O, le gel est incubé 10 minutes dans 100mL de solution de coloration au nitrate d'argent (Sigma). Le gel est une dernière fois lavé pendant 10 minutes dans 200mL d'H₂O, puis révélé avec 100mL de la solution de développement. La réaction est arrêtée avec 5mL de la solution STOP (Sigma) après un temps variable de révélation, dépendant du signal attendu/voulu (généralement entre 3 et 7 minutes).

D5.3.6 ANALYSE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE

Les analyses d'échantillons par spectrométrie de masse ont été réalisées par le service de protéomique de l'IGBMC. Elles ont été réalisées sur éluat total récupéré après la coIP, ou à partir des bandes de gels découpées et préalablement marquées au nitrate d'argent. Les bandes de gel sont tout d'abord décolorées, puis de façon générale (pour échantillons liquides ou solides) les protéines sont précipitées, réduites, puis alkylées, afin d'éliminer les ponts disulfures. Les échantillons subissent ensuite une étape de digestion grâce à deux protéases : la trypsine et la Lysine-C, afin de couper les protéines en plusieurs peptides. Enfin, les échantillons sont analysés par un spectromètre de masse composé d'un Ultimate 3000 nano-RSLC (Thermo Scientific) et d'un Orbitrap ELITE (Thermo Scientific).

D5.3.7 STRATÉGIE D'ANALYSE DES RÉSULTATS OBTENUS PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE

Les protéines sont identifiées en comparant les masses expérimentales mesurées et les masses théoriques des peptides issus de la digestion *in silico* de la banque de données protéique Swissprot (réduite à l'espèce *Mus musculus*) dans laquelle : 1) la séquence de la protéine Trib1 endogène a été remplacée par la séquence recombinante Trib1-HA-Flag, et 2) la séquence de la protéine GFP-HA-Flag a été ajoutée.

Les protéines identifiées et les données expérimentales qui leur sont propres sont listées dans un tableur qui comprend plusieurs onglets :

- 1) L'onglet « **Accession** » correspond au numéro d'accèsion de la protéine X dans la base de donnée Swissprot.
- 2) L'onglet « **Description** » correspond au nom complet de la protéine X.
- 3) L'onglet « **Nombre de peptides** » correspond au nombre de peptides différents observés pour cette protéine.
- 4) L'onglet « **Nombre de PSM** » (Peptide Spectrum Matched) correspond au nombre total de peptides observés en tenant compte de leurs occurrences (un même peptide peut avoir été vu plusieurs fois).
- 5) L'onglet « **Recouvrement** » correspond au pourcentage de couverture de séquence de la protéine reconnue après addition de tous les peptides identifiés.
- 6) L'onglet « **Score** » correspond à la somme de tous les scores attribués pour chacun des PSM. Pour chaque PSM, un score est attribué en fonction de la qualité du spectre, du nombre de fragments ou encore des écarts de masse entre les masses théoriques et les masses mesurées (pour les ions parents et leurs fragments respectifs).

Les protéines ont ensuite été classées suivant leur score (du plus haut au plus faible). Ce score peut finalement être apparenté à une « confiance dans l'identification ». Plus une protéine présente un score élevé, plus on peut être sûr que c'est bien cette protéine qui est identifiée.

Accession	Description	Score	Recouvrement	Nombre de peptides	Nombre de PSM
-----------	-------------	-------	--------------	--------------------	---------------

Figure 54 : Description des données analysées pour chacune des protéines identifiées par spectrométrie de masse



RÉSULTATS



PARTIE E. ÉTUDE DES CONSÉQUENCES DE LA SUREXPRESSON DE *FKBP11* DANS LES LYMPHOCYTES B

(Article 1)

Overexpression of *Fkbp11*, a feature of lupus B cells, leads to B cell tolerance breakdown and initiates plasma cell differentiation.

Julie Ruer-Laventie, Léa Simoni, Jean-Nicolas Schickel, Anne Soley, Monique Duval, Anne-Marie Knapp, Luc Marcellin, Delphine Lamon, Anne-Sophie Korganow, Thierry Martin, Jean-Louis Pasquali and Pauline Soulas-Sprauel, *Immunity, Inflammation and Disease*, Volume 3, Issue 3, p. 265-279, 2015.

E.1 COMMENTAIRES

Le projet du laboratoire porte sur l'étude des **LB**, acteurs centraux de la pathogénèse lupique. Dans le but de rechercher **des anomalies B intrinsèques** associées au développement de la maladie, une étude transcriptomique a été réalisée sur les LB de 17 patients lupiques et 9 sujets sains. Parmi les gènes retrouvés dérégulés, ***FKBP11***, codant pour la protéine FKBP19, présente une surexpression de 4 à 9 fois dans les LB de patients lupiques comparé aux contrôles.

Afin d'évaluer le rôle de la surexpression de *Fkbp11* dans la fonction des LB et dans le développement d'une autoimmunité, un modèle murin transgénique reproduisant cette surexpression a été généré sur un fond B6 (appelé modèle *Fkb11*^{high}). Ces souris présentent une surexpression ubiquitaire du gène, avec une surexpression d'environ 12x dans les cellules B matures spléniques.

La surexpression de *Fkbp11* de façon ubiquitaire dans des souris de souche B6 mène à une **hyperplasie** des organes lymphoïdes primaires et secondaires à l'âge de 8 mois, à une augmentation de la production d'**IgG3** et d'**autoanticorps anti-ADNdb d'isotype IgG** ainsi que des **autoanticorps d'isotype IgM** ciblant différents autoantigènes (actine, thyroglobuline) pour certains animaux, à l'état basal. De plus, les animaux *Fkb11*^{high} présentent **une réponse humorale augmentée** après immunisation avec un antigène T-indépendant. Ce gène est aussi impliqué dans l'initiation de la **différenciation plasmocytaire (DP)**, puisqu'après stimulation *in vitro* de LB spléniques avec du LPS pendant 4 jours, la surexpression de *Fkbp11* induit une plus forte diminution de l'expression des gènes réprimant la différenciation plasmocytaire (*Pax5*, *Bach2*, *BCI-6*). La répression du gène précoce *Pax5* a été confirmée par **Western Blot**. Enfin, l'ajout de **siRNA dirigés contre *Fkbp11***, dans une culture de LB normaux, induit le phénotype inverse de celui observé lorsque *Fkbp11* est surexprimé,

sur l'expression des gènes inhibiteurs de la DP. *Fkbp11* semble donc avoir **une fonction dans la répression des gènes inhibiteurs de la DP, pouvant ainsi favoriser le processus de DP.**

D'autre part, le croisement du modèle transgénique *Fkbp11*^{high} avec le modèle de tolérance B anti-ADN 56R d'une part, et le modèle lupique B6^{lpr/lpr} d'autre part, a permis de montrer deux fonctions potentielles du gène lors de la pathogénèse lupique. Premièrement, le croisement avec les souris anti-ADN 56R met en évidence **une rupture de tolérance B** causée par la surexpression du gène, car les souris présentent des taux plus élevés d'autoanticorps que les souris contrôles anti-ADN 56R. Deuxièmement, le croisement avec des souris lupiques B6^{lpr/lpr} démontre que la surexpression de *Fkbp11* est capable **d'amplifier le caractère lymphoprolifératif ainsi que l'hypergammaglobulinémie** présents dans ces souris.

Enfin, **une corrélation** entre le **pourcentage de plasmablastes circulants et l'expression de FKBP11** a été démontrée chez des patients lupiques, suggérant que la surexpression du gène participe à la différenciation plasmablastique.

En conclusion, la surexpression de *Fkbp11* chez la souris, induit une rupture de tolérance, caractérisée par la production d'autoanticorps, le développement de traits autoimmuns ainsi qu'une initiation de la différenciation plasmocytaire. Chez l'Homme, la surexpression de FKBP11 est corrélée à l'augmentation du nombre de plasmablastes circulants. Cette dérégulation d'expression constitue une nouvelle anomalie B intrinsèque associée à la susceptibilité de développer une autoimmunité.

E.2 ARTICLE 1 : OVEREXPRESSION OF *FKBP11*, A FEATURE OF LUPUS B CELLS, LEADS TO B CELL TOLERANCE BREAKDOWN AND INITIATES PLASMA CELL DIFFERENTIATION.

PARTIE F. ÉTUDE DES CONSÉQUENCES DE LA SUREXPRESSION DE *TRIB1* DANS LES LYMPHOCYTES B

F1. ANALYSE DE L'EXPRESSION DE *TRIB1* DANS LES LB DE PATIENTS LUPIQUES ET DE DIFFÉRENTES LIGNÉES MURINES LUPIQUES OU SAUVAGES

F1.1 L'EXPRESSION DE *TRIB1* EST AUGMENTÉE DANS LES LB DE PATIENTS LUPIQUES QUIESCENTS

L'étude transcriptomique présentée en **partie B7.3.5.3** de l'introduction a été réalisée dans les LB CD19⁺ périphériques de patients lupiques en phase quiescente, et de contrôles appariés. Cette analyse a montré une surexpression de *TRIB1* dans les LB de patients, comparé aux contrôles (**Figure 55A**, montrant l'expression en valeurs brutes sur la puce). Comme le montre la **figure 55B**, *TRIB1* est retrouvé surexprimé environ 2 fois pour la totalité des patients et environ 6 fois dans un sous-groupe de 5 patients. Comme exposé dans la partie **B7.3.5.3**, ce sous-groupe de 5 patients présente une dérégulation commune de plusieurs centaines de gènes (*Garaud et al., 2011*).

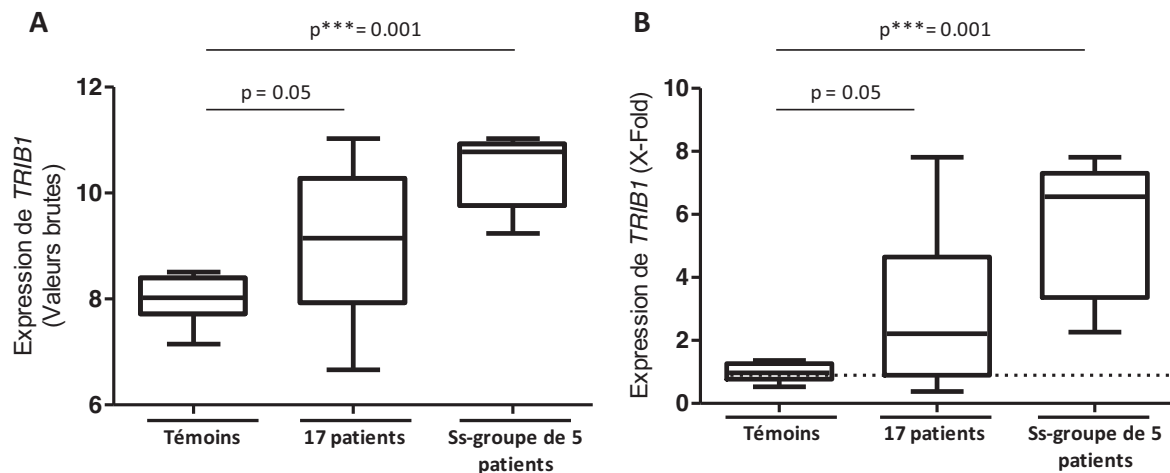


Figure 55 : Expression de *TRIB1* dans les LB de sujets sains, des 17 patients lupiques quiescents et du sous-groupe de 5 patients.

La totalité des patients lupiques quiescents (n=17) et le sous-groupe de 5 patients sont comparés aux témoins (n=9). Les valeurs brutes (Log2) de l'expression de *TRIB1* sont présentées en (A). Les valeurs $2^{\text{Valeur brute}}$ (X-Fold) sont présentées en (B) et sont normalisées par rapport à la moyenne des témoins, elle-même rapportée à 1. (*: *Test Mann&Whitney*).

Ainsi, la surexpression de *TRIB1* est retrouvée dans les LB de plusieurs patients lupiques en phase quiescente, et le rôle de la surexpression de cette protéine dans la maladie a constitué mon principal sujet de thèse.

F1.2 ÉTUDE DE LA SUREXPRESSON DE *TRIB1* DANS LES SOUS-POPULATIONS B MURINES

Le rôle de *Trib1* dans les LB est à ce jour inconnu. Ainsi, nous avons évalué l'expression de *Trib1* dans les populations lymphocytaires B de plusieurs lignées murines. Ceci a été réalisé dans deux contextes différents, premièrement au sein des sous-populations B de lignées murines sauvages (B6 et BALB/c), et deuxièmement, dans la lignée murine lupique (NZBxNZW)F1, afin d'évaluer si la surexpression de *Trib1* dans les LB au cours du lupus se reproduit également chez la souris, du moins dans ce modèle murin lupique spécifique.

F1.2.1 ÉTUDE DE LA SUREXPRESSON DE *TRIB1* DANS DES LB DE SOURIS SAUVAGES

Dans un premier temps, l'expression de *Trib1* étant inconnue dans les **LB normaux à l'état basal**, nous l'avons évaluée dans les sous-populations de MO et de rate de **souris B6 et BALB/c**, afin de connaître son évolution tout au long du développement B. Pour cela, les sous-populations de la MO (pro-pré-B, immatures et matures recirculantes) et de la rate (LB transitionnels T1 et T2, LB MZ et LB Fo) ont été triées par cytométrie en flux. L'expression de *Trib1* a ensuite été mesurée par qRT-PCR en temps réel pour l'ensemble de ces sous-populations. L'expression de *Trib1* pour chaque sous-population a été normalisée par rapport à celle des cellules pro-pré B, correspondant à la première sous-population B au cours du développement. Nous avons choisi de l'évaluer dans ces 2 lignées de souris sauvages car 1) la souris B6 est la souris habituellement utilisée dans nos études et correspond au fond génétique de nos souris transgéniques, 2) la souris BALB/c est traditionnellement utilisée dans la littérature comme contrôle de la souris (NZBxNZW)F1.

Nous observons une légère augmentation (de 2 à 3 fois environ) de l'expression basale de *Trib1* dans les cellules immatures de la MO par rapport aux LB pro-pré B, dans les deux lignées sauvages, ainsi que dans la population T1 des BALB/c. Ce résultat peut être important compte tenu du fait que c'est aux stades immatures et T1 que les mécanismes de tolérance B se mettent en place. Cependant, l'expression basale de *Trib1* semble très faible dans les populations matures spléniques et médullaires, comparé aux cellules immatures et T1. Il serait intéressant d'analyser l'expression de *Trib1* dans des plasmocytes triés de souris. Chez l'Homme, comme présenté en **figure 57**, la

littérature démontre que l'expression de *TRIB1* est retrouvée augmentée dans les cellules plasmablastiques et plasmocytaires, comparé aux LB matures naïfs .

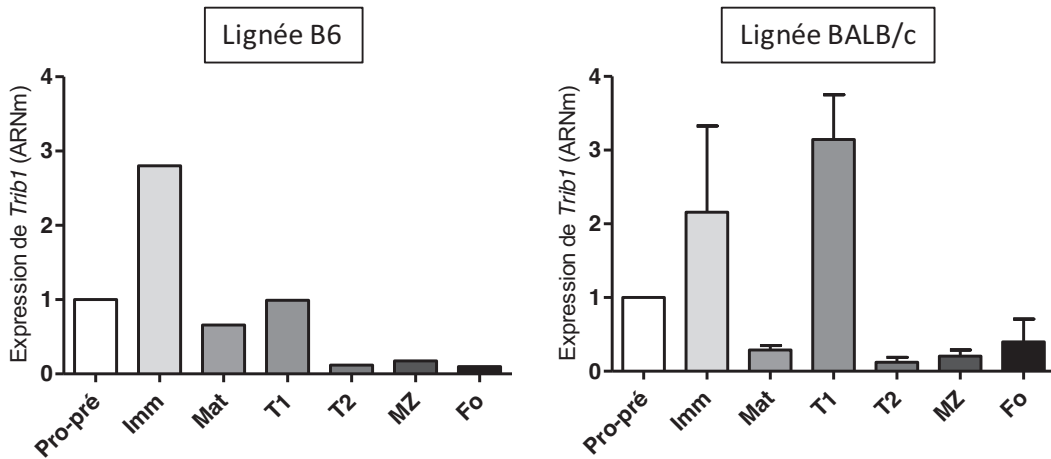


Figure 56 : Expression de *Trib1* dans les sous-populations B de la moelle osseuse et de la rate de souris B6 (n=1) et BALB/c (n=2) âgées de 4 mois.

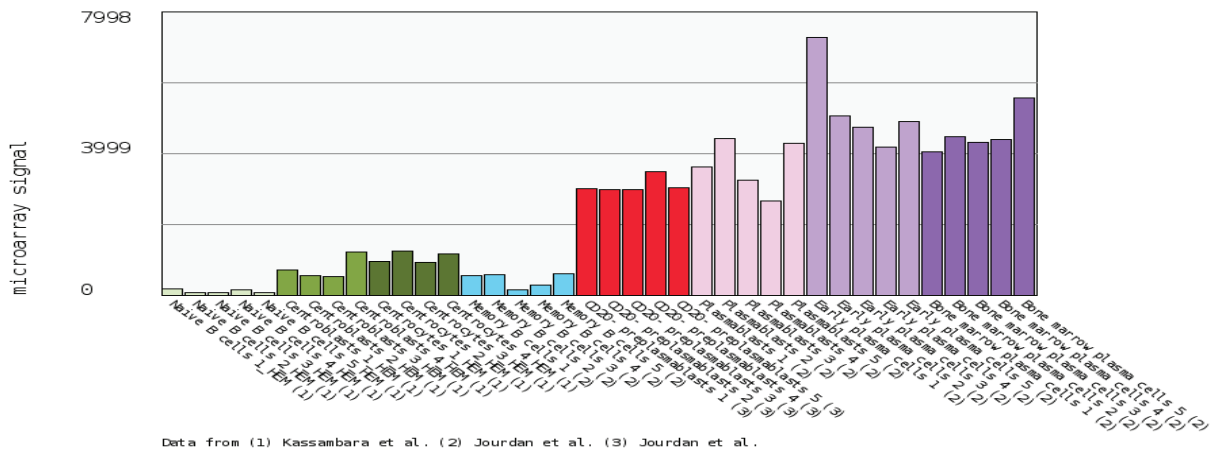


Figure 57 : Expression de *TRIB1* dans les sous-populations B matures chez l'Homme.

Amazonia.transcriptome.eu

Dans un second temps, nous avons évalué la variation d'expression de *Trib1* dans les LB de souris sauvage B6 suite à une activation des cellules. Pour cela, nous avons quantifié son transcrite par qRT-PCR en temps réel dans des LB spléniques matures de souris B6 stimulés avec un anticorps anti-IgM de souris, du LPS, ou une combinaison LPS&IL-4, à plusieurs temps de stimulation (1h, 2h, 5h, 24h et 48h). L'ensemble de ces stimuli permet d'activer les LB de manière dépendante du BCR (anticorps anti-IgM) ou indépendante du BCR (LPS, LPS&IL-4). L'expression de *Trib1* pour chaque temps de stimulation a été normalisée par rapport à la condition non-stimulée (NS).

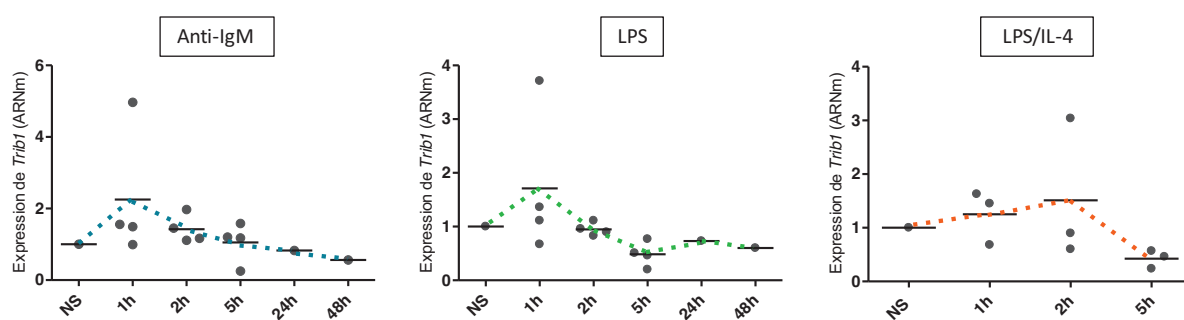


Figure 58 : Expression de *Trib1* après stimulation de LB spléniques de souris B6 triés, avec un anticorps anti-IgM, du LPS ou une combinaison de LPS et IL-4.

L'expression de *Trib1* a été analysée par qRT-PCR en temps réel et normalisée par rapport à la condition non-stimulée (NS). *Hprt1* a été utilisé comme gène de ménage dans cette analyse. NS = temps 0, non-stimulé.

L'expression de *Trib1* dans les LB spléniques de B6 n'est pas induite de manière notable après activation de la cellule dans les 3 conditions testées, comme présenté en **figure 58**. Une très légère augmentation est observable à 1h après stimulation par de l'anti-IgM ou du LPS. Le même type d'expérience a été réalisé sur des temps très courts (5, 10, 20 et 30 minutes, n=1) mais l'expression de *Trib1* reste stable, quel que soit le stimulus (résultats non montrés).

L'ensemble de ces résultats indique que l'expression de *Trib1* semble être plus importante dans les premiers stades de développement (pré-pro B, immatures) comparé aux stades matures naïfs. De plus, son expression ne semble pas être influencée par une activation des LB avec un anticorps anti-IgM, du LPS ou du LPS/IL-4.

F1.2.2 ÉTUDE DE LA SUREXPRESSION DE *TRIB1* CHEZ LA SOURIS LUPIQUE (NZBXNZW)F1

La surexpression de *TRIB1* a été retrouvée dans les LB de patients lupiques quiescents de notre analyse transcriptomique. Afin d'évaluer si cette surexpression est retrouvée dans un modèle murin lupique, les sous-populations B de la MO et de la rate de souris (NZBxNZW)F1 et de souris BALB/c (servant de lignée contrôle saine pour la lignée lupique (NZBxNZW)F1) ont été triées par cytométrie en flux de la même façon qu'en **E1.2.1**. L'expression de *Trib1* a été évaluée par qRT-PCR en temps réel pour chaque sous-population et a été rapportée à l'expression de la population propre B de la lignée BALB/c pour chacun des âges (**Figure 59**). Cette étude a été réalisée à l'âge de 4 mois, âge où les (NZBxNZW)F1 ne sont pas encore malades, pour potentiellement détecter une dérégulation d'expression intrinsèque, ainsi qu'à l'âge de 6 mois, après déclenchement de la maladie (protéinurie positive, notamment).

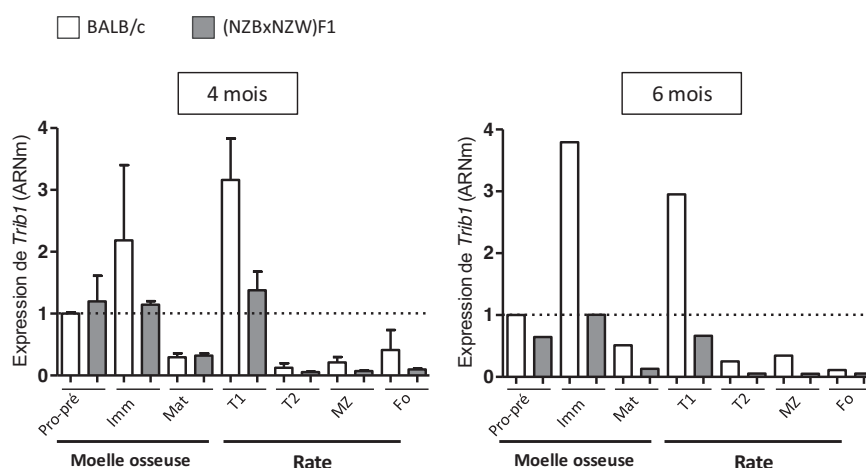


Figure 59 : *Trib1* n'est pas surexprimé dans les LB du modèle (NZBxNZW)F1.

Les sous-populations B de souris lupiques (NZBxNZW)F1 et BALB/c contrôles âgées de 4 mois (n=2 pour chaque groupe) ou 6 mois (n=1 pour chaque groupe) ont été triées par cytométrie en flux. (cf **Figure 56** pour les marqueurs). Puis l'expression de *Trib1* a été quantifiée par qRT-PCR en temps réel. Les valeurs ont été normalisées par rapport à l'expression endogène de *Trib1* des pro-pré B des souris BALB/c. *Hprt1* a été utilisé comme gène de ménage dans cette analyse.

A l'âge de 4 mois, excepté pour les populations pro-pré B et matures de la MO, l'expression de *Trib1* dans les sous-populations B des (NZBxNZW)F1 semble être inférieure à celle des BALB/c. A l'âge de 6 mois, l'expression de *Trib1* semble, de façon générale, plus basse dans toutes les sous-populations B de (NZBxNZW)F1 (**Figure 59**).

Ces résultats montrent que contrairement au sous-groupe de patients de l'analyse transcriptomique, *Trib1* n'est pas retrouvé surexprimé dans le modèle lupique (NZBxNZW)F1. Il serait intéressant d'évaluer son expression dans d'autres modèles murins lupiques, puisque le modèle (NZBxNZW)F1 présente une susceptibilité génétique à développer un lupus qui lui est unique. De façon surprenante, ces résultats semblent montrer que l'expression de *Trib1* dans les LB est plus importante chez la souris saine que chez la souris lupique étudiée.

F2. ÉTUDE DES EFFETS DE LA SUREXPRESSION DE *TRIB1* PAR LE PHÉNOTYPAGE DU MODÈLE *TRIB1*-KI-BIMM

Afin d'analyser les effets de la surexpression de *TRIB1* observée dans les LB de patients lupiques quiescents sur le phénotype des LB et sur le développement de la pathologie lupique, nous avons choisi de **développer une étude de génomique fonctionnelle chez la souris**.

F2.1 GÉNÉRATION DU MODÈLE TRIB1-KI-BIMM

Nous avons produit un modèle murin transgénique de type Knock-In (KI) conditionnel, permettant la surexpression de *Trib1* spécifiquement dans les LB.

Pour cela, la séquence murine de *Trib1* a été clonée dans le vecteur CTV (Klaus Rajewsky (Xiao *et al.*, 2007, Xiao *et al.*, 2008)), suivant les différentes étapes décrites en **D1. de la partie Matériel et méthodes**. La séquence de *Trib1* est placée en aval du promoteur CAG, responsable du contrôle de l'expression de *Trib1*, et en amont d'une cassette Néomycine-STOP (Néo-STOP) flanquée de sites LoxP. Cette cassette peut ainsi être éliminée suite à l'expression de la recombinaise Cre. Le vecteur CTV permet une insertion ciblée du transgène dans le locus ROSA26 (qui code pour un ARN non codant), utilisé de façon classique dans les modèles KI. Une cassette IRES-eGFP, placée en aval de la séquence de *Trib1* et en amont du signal de polyadénylation (pA), sert de système rapporteur (voir **figure 46**).

La souris obtenue après recombinaison homologue et insertion du transgène *Trib1* dans le locus ROSA se nomme **Trib1-KI**. Le croisement de cette souris *Trib1-KI*, qui ne surexprime pas *Trib1*, avec une souris transgénique exprimant la recombinaise Cre permet la délétion de la cassette Néo-STOP et ainsi l'expression du transgène *Trib1-IRES-eGFP*, permettant une **surexpression de *Trib1*** chez l'animal, et une expression de la GFP.

Dans le but d'induire la surexpression de *Trib1* dans toutes les sous-populations B, nous avons choisi de croiser la souris *Trib1-KI* avec la souris *Mb1Cre*, exprimant la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur du gène *Mb1*, codant pour l'Ig α du complexe du BCR. Le gène *Mb1* est exprimée très tôt dans le développement B (dès un stade très immature : le stade pro-B dans la MO) et jusqu'au stade mature. Le croisement de ces 2 souris génère des souris *Trib1-KI/Mb1Cre* qui surexpriment *Trib1* dans les LB dès un stade très immature et seront par conséquent nommées **Trib1-KI-Bimm**.

F2.2 CHOIX DE LA LIGNÉE MURINE CONTRÔLE

La lignée **Trib1-KI** qui porte le transgène *Trib1* dans le locus ROSA, mais ne surexprime pas *Trib1* car n'exprime pas la Cre, a servi de lignée contrôle tout au long des expériences. Les souris *Trib1-KI* contrôles utilisées lors des expériences proviennent de la même portée que leurs congénères *Trib1-KI/Cre*. Quand cela était possible, les contrôles étaient également choisis en fonction de leur sexe. De plus, des souris possédant uniquement le transgène de la recombinaise Cre (*Mb1 Cre*) ont également été analysées afin d'évaluer un quelconque effet délétère de l'expression de la Cre. Aucune différence n'a été notée entre les souris *Trib1-KI* et souris *Mb1Cre*.

F2.3 VALIDATION DU MODÈLE TRIB1-KI-BIMM

La première étape a consisté à **valider la surexpression de *Trib1*** dans les LB du modèle Trib1-KI-Bimm par différentes méthodes.

F2.3.1 MISE EN ÉVIDENCE DE LA DÉLÉTION DE LA CASSETTE STOP PAR PCR

Afin de confirmer l'efficacité de la délétion de la cassette STOP au niveau de l'ADN dans les LB des souris Trib1-KI-Bimm, nous avons développé une analyse par PCR. Pour cela des oligonucléotides ont été conçus pour s'hybrider à l'ADN en amont et en aval de la cassette STOP (**Figure60A**). Le fragment d'ADN comprenant encore la cassette STOP mesure environ 3000 pb, taille potentiellement trop élevée pour pouvoir être amplifiée correctement dans nos conditions expérimentales de PCR, ce qui explique qu'elle n'est pas toujours visible dans les résultats. Lorsqu'il y a délétion, le fragment de PCR mesure 522pb. Une bande à 522pb est donc attendue pour les cellules dans lesquelles l'excision par la Cre aura été effectuée.

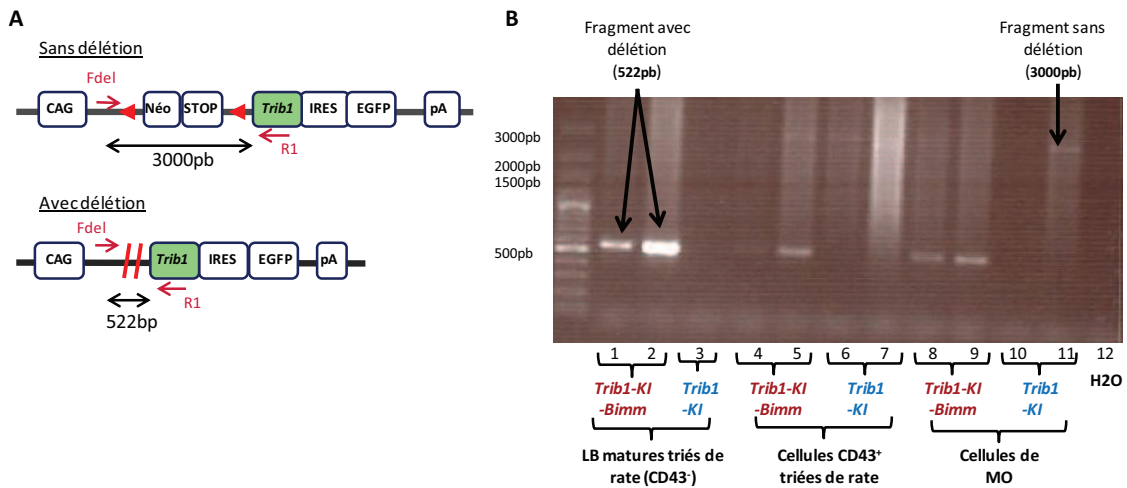


Figure 60 : Mise en évidence de la cassette STOP au niveau de l'ADN des LB Trib1-KI-Bimm.

La PCR a été réalisée à l'aide des oligonucléotides R1 et Fdel (s'hybrident sur le transgène comme présenté en **(A)**), sur de l'ADN extrait à partir de LB matures spléniques triées (CD43⁻), cellules CD43⁺ de la rate et de cellules médullaires (MO). L'H₂O correspond au témoin négatif de la PCR (**B**).

La PCR est réalisée sur de l'ADN extrait de cellules B matures (CD43⁻) et de cellules CD43⁺ (comprenant LB transitionnels, LT, monocytes et granulocytes) triées à partir de la rate, et de cellules de MO totale. La photographie du gel présentée **en figure 60B** révèle une bande à 522pb pour les LB matures (puits 1 et 2) et cellules de MO des souris Trib1-KI-Bimm (puits 8 et 9), et absente dans les échantillons des souris contrôles Trib1-KI (puits 3, 6, 7, 10 et 11). Une bande apparaît pour les cellules CD43⁺ des souris Trib1-KI-Bimm (puits n°4 et n°5). Ceci est probablement dû à la présence de LB transitionnels parmi la population CD43⁺. Les cellules transitionnelles sont effectivement concernées par l'excision de la cassette STOP puisqu'elles expriment l'Igα du complexe du BCR. De

plus, nous pouvons remarquer une bande à 3000pb dans certains puits, par exemple : au niveau des cellules de MO de souris Trib1-KI (puits n°11), ce qui confirme la non-délétion de la cassette STOP, ainsi qu'au niveau des cellules CD43⁺ de souris Trib1-KI-Bimm (puits n°5), qui indique qu'une proportion de ces cellules ne présente pas de délétion de la cassette STOP.

En conclusion, ces résultats confirment la délétion de la cassette STOP dans les LB d'un stade très immature à un stade mature des souris Trib1-KI-Bimm.

F2.3.2 QUANTIFICATION DE L'ARNM DE *TRIB1* PAR qRT-PCR EN TEMPS RÉEL

Nous avons évalué la surexpression de *Trib1* par qRT-PCR en temps réel dans les LB matures spléniques triés (CD43⁻) des souris Trib1-KI-Bimm comparé aux souris contrôles Trib1-KI, ainsi que dans les cellules CD43⁺ de la rate, les cellules médullaires et thymiques.

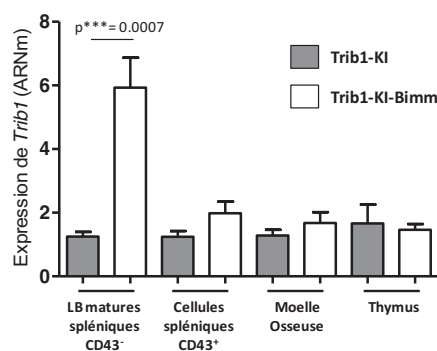


Figure 61 : Expression de *Trib1* dans plusieurs populations et organes lymphoïdes de souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm.

Analyse par qRT-PCR en temps réel de l'expression de l'ARNm de *Trib1* dans les cellules spléniques triées selon le marqueur CD43 (n=9), les cellules totales de la MO (n=3) et du thymus (n=3). Cette expression est normalisée par rapport à l'expression endogène de *Trib1* dans les souris contrôles Trib1-KI. *Hprt1* a été utilisé comme gène de ménage. (* : Test de Mann&Whitney).

La **figure 61** montre une surexpression de *Trib1* de 5.9x dans les LB matures spléniques de souris Trib1-KI-Bimm, comparé aux LB matures spléniques des souris contrôles. Une faible surexpression non significative est détectée dans les cellules CD43⁺ des souris KI conditionnelles par rapport aux souris contrôles (correspondant probablement aux cellules B transitionnelles, présentant une délétion de la cassette STOP, voir **F2.3.1**). De plus, nous n'observons pas d'augmentation significative de la surexpression de *Trib1* dans les cellules médullaires totales, probablement car la proportion de LB dans cette population est faible. Il faudrait donc procéder à un tri de ces cellules, par exemple par cytométrie en flux. Enfin, nous n'observons aucune surexpression de *Trib1* dans le thymus.

Ces résultats nous permettent de confirmer que la surexpression de l'ARNm de *Trib1* est bien spécifique des LB des souris *Trib1-KI-Bimm*. La visualisation de l'expression de la GFP (voir ci-après) nous a permis d'affiner ce résultat pour les différents organes et les différentes sous-populations B.

F2.3.3 VISUALISATION DE L'EXPRESSION DE LA GFP PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX

Dans le vecteur CTV, la séquence codante de *Trib1* est suivie d'une cassette IRES-eGFP servant de rapporteur. En effet, les cellules dans lesquelles l'excision de la cassette STOP aura été réalisée par la Cre, exprimeront simultanément les transcrits puis les protéines Trib1 et GFP. La fluorescence de la GFP est ici mesurée par cytométrie en flux dans les cellules B220⁺ de la MO marquées avec un anticorps anti-B220 (marqueur des LB) (**Figure 62A**) et dans les cellules B220⁺ IgM⁺ de la rate et des ganglions (GG) marquées par un anticorps anti-B220 et anti-IgM (**Figure 62B/C**). L'absence de fluorescence de la GFP dans le thymus est représentée sur la **figure 62C**.

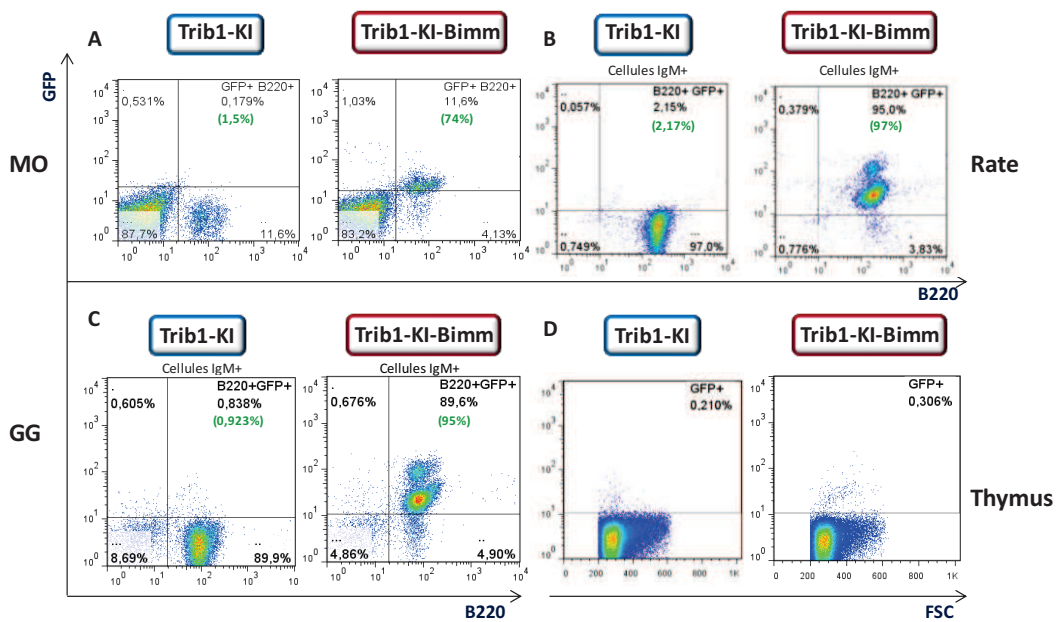


Figure 62 : Visualisation de l'expression de la GFP dans les différents organes lymphoïdes par cytométrie en flux.

Cellules B220⁺ de la MO (**A**), cellules B220⁺IgM⁺ de la rate (**B**), cellules B220⁺IgM⁺ des ganglions (GG) (**C**) et cellules totales thymiques (**D**). Ces résultats sont représentatifs de l'ensemble des souris analysées. (%) : % des cellules parmi la totalité des cellules ; (%) : % de cellules GFP⁺ parmi les cellules B220⁺.

	Trib1-KI (n=9)	Trib1-KI-Bimm (n=9)
MO : cellules B220⁺	2,5% ± 0,4%	70,0 % ± 5,5%***
Rate : cellules B220⁺IgM⁺	2,3% ± 1,4%	98,0% ± 1,0%***
GG : cellules B220⁺IgM⁺	1,35% ± 0,44%	95,0% ± 1,1%***
Thymus : sur toutes les cellules (n=3)	0,18% ± 0,01%	0,58% ± 0,58%

Tableau 12 : Tableau récapitulatif du pourcentage moyen de cellules exprimant la GFP dans les différents organes lymphoïdes des souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm à partir de l'analyse par cytométrie en flux.

(* : Test Mann&Whitney, *** : $p < 0.0001$).

Les résultats présentés dans le **tableau 12** montrent qu'en moyenne **70%** des cellules B220⁺ de la MO, **98%** des cellules B220⁺IgM⁺ de la rate et **95%** des cellules B220⁺IgM⁺ des GG des souris Trib1-KI-Bimm expriment la GFP. En revanche, un taux extrêmement faible de cellules thymiques des souris Trib1-KI-Bimm (<0.6%), et un taux faible de cellules des souris Trib1-KI, expriment la GFP (**Tableau 12**, colonne du milieu) (**Figure 62 A-D**).

Ces résultats sont le reflet d'une délétion presque totale de la cassette STOP, spécifique des LB à tous les stades de développement du modèle Trib1-KI-Bimm.

F2.3.4 EXPRESSION PROTÉIQUE DE TRIB1

L'expression protéique de Trib1 par Western-Blot n'a pas encore été réalisée étant donné la non-spécificité des nombreux anticorps commerciaux testés. Un anticorps polyclonal produit chez le lapin après injection de peptides spécifiques de Trib1 a été généré pour notre laboratoire à l'IGBMC. La mise au point des conditions expérimentales de Western Blot sur les échantillons de souris Trib1-KI-Bimm est actuellement en cours.

F2.4. ÉTUDE PHÉNOTYPIQUE DU MODÈLE TRIB1-KI-BIMM À L'ÉTAT BASAL

Afin d'évaluer les conséquences d'une surexpression de *Trib1* dans les LB des souris Trib1-KI-Bimm sur le développement des LB et le phénotype de ces cellules dans les organes lymphoïdes, nous avons procédé à **l'immunophénotypage des souris Trib1-KI-Bimm comparé aux souris contrôles Trib1-KI**, incluant la **répartition des sous-populations lymphocytaires** dans les organes lymphoïdes, **l'état d'activation des LB** et la **production d'immunoglobulines dans le sérum**. Ceci a été réalisé à l'âge de 3 mois (correspondant à l'âge « adulte » de la souris) et à un âge plus avancé (6 mois).

F2.4.1 IMMUNOPHÉNOTYPAGE DES ORGANES LYMPHOÏDES DU MODÈLE TRIB1-KI-BIMM

Les organes lymphoïdes primaires (MO et thymus) et secondaires (rate et GG) ont été prélevés et leurs cellules ont été comptées puis analysées par cytométrie en flux après marquage avec différentes combinaisons d'anticorps, afin de déterminer les proportions des sous-populations lymphocytaires B et T, d'une part, et d'évaluer le niveau d'activation de ces cellules, d'autre part.

F2.4.1.1 RÉPARTITION DES CELLULES LYMPHOCYTAIRES

Les tableaux et graphiques présentés en **figure 63** ne montrent pas de différence statistiquement significative entre les pourcentages de répartition des sous-populations lymphocytaires B et T (pour tous les organes) et le nombre absolu de cellules totales et des sous-populations (pour la rate, les GG et le thymus) entre les souris Trib1-KI-**Bimm** et les souris contrôles, à l'âge de 3 mois. Ce résultat est le même à l'âge de 6 mois (données non montrées).

Ainsi, la surexpression de *Trib1* dès un stade très immature dans les LB n'affecte pas le développement B ni la répartition des sous-populations lymphocytaires dans les organes lymphoïdes.

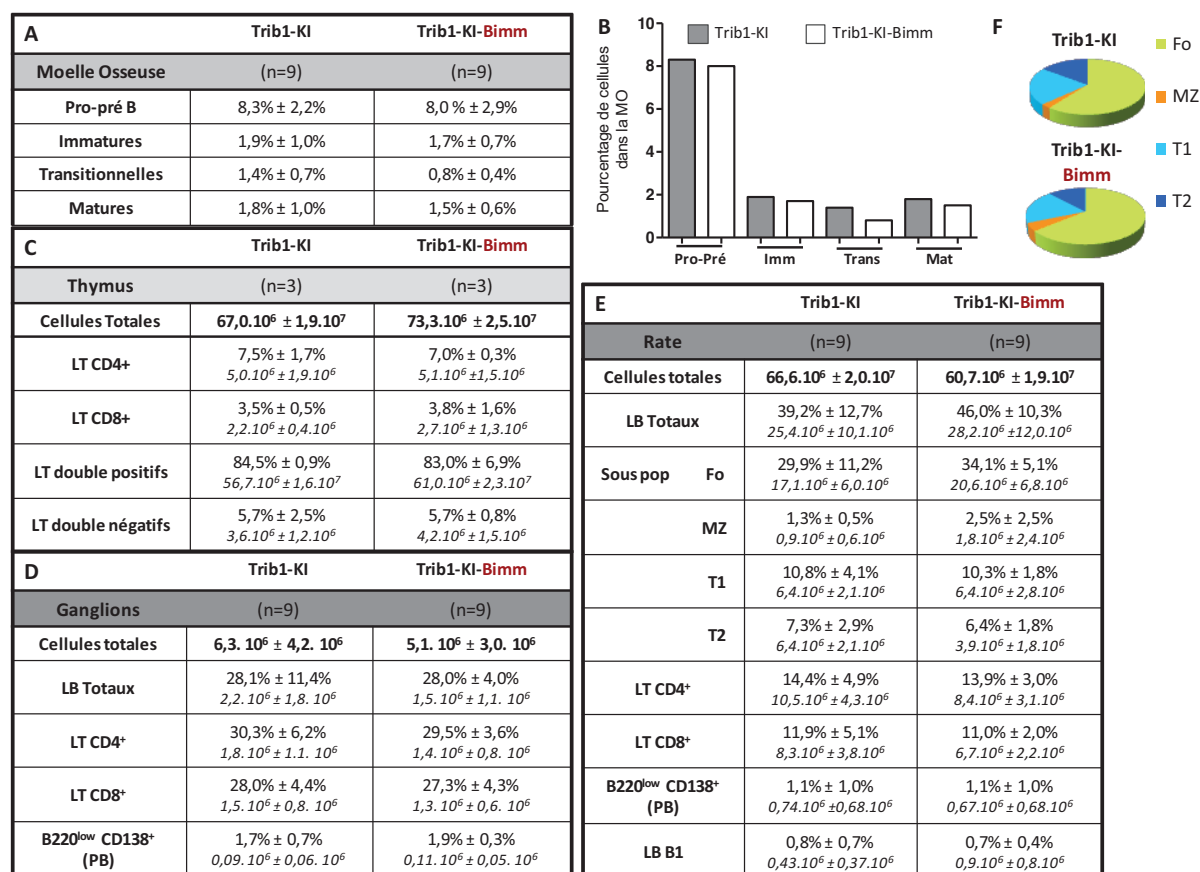


Figure 63 : Répartition des sous-populations lymphocytaires B et T dans les organes lymphoïdes primaires et secondaires des souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm.

Les cellules médullaires (A et B), thymiques (C), ganglionnaires (D) et spléniques (E et F) des souris Trib1-KI-Bimm ont été analysées par cytométrie en flux en comparaison à des souris Trib1-KI. Les nombres absolus ainsi que les pourcentages rapportés à la population cellulaire totale sont reportés. (Les nombres absolus des cellules médullaires ne sont pas reportés car la méthode de prélèvement des fémurs et de l'isolement des cellules ne permet pas un prélèvement parfaitement homogène entre les souris). Les sous-populations définies en cytométrie en flux par différents marqueurs de surface sont les suivantes : LB totaux (B220⁺IgM⁺), pro-pré B (B220⁺IgM⁺), immatures (B220^{int}IgM⁺), transitionnelles (B220^{int}IgM^{high}), matures recirculantes (B220^{high}IgM⁺), LT CD4⁺ (CD3⁺CD4⁺), LT CD8⁺ (CD3⁺CD8⁺), LT doubles positifs (CD3⁺CD4⁺CD8⁺), LT doubles négatifs (CD3⁺CD4⁻CD8⁻), T1 (Transitionnelles 1) (IgM⁺CD23⁻CD21⁻), T2 (Transitionnelles 2) (IgM⁺CD23⁺CD21^{high}), MZ (IgM⁺CD23⁻CD21^{high}) et Fo (IgM⁺CD23⁺CD21^{low}), plasmablastes (B220^{low}CD138⁺) et B1 (B220⁺CD5⁺).

F2.4.1.2 ÉTAT BASAL D'ACTIVATION DES LYMPHOCYTES B PÉRIPHÉRIQUES

Afin d'évaluer si la surexpression de *Trib1* modifie l'activation des LB à l'état basal, nous avons analysé par cytométrie en flux l'expression des marqueurs d'activation CD86, CMH de classe II (CMHII) et CD44 à la surface des cellules B de la rate et des GG *ex vivo*.

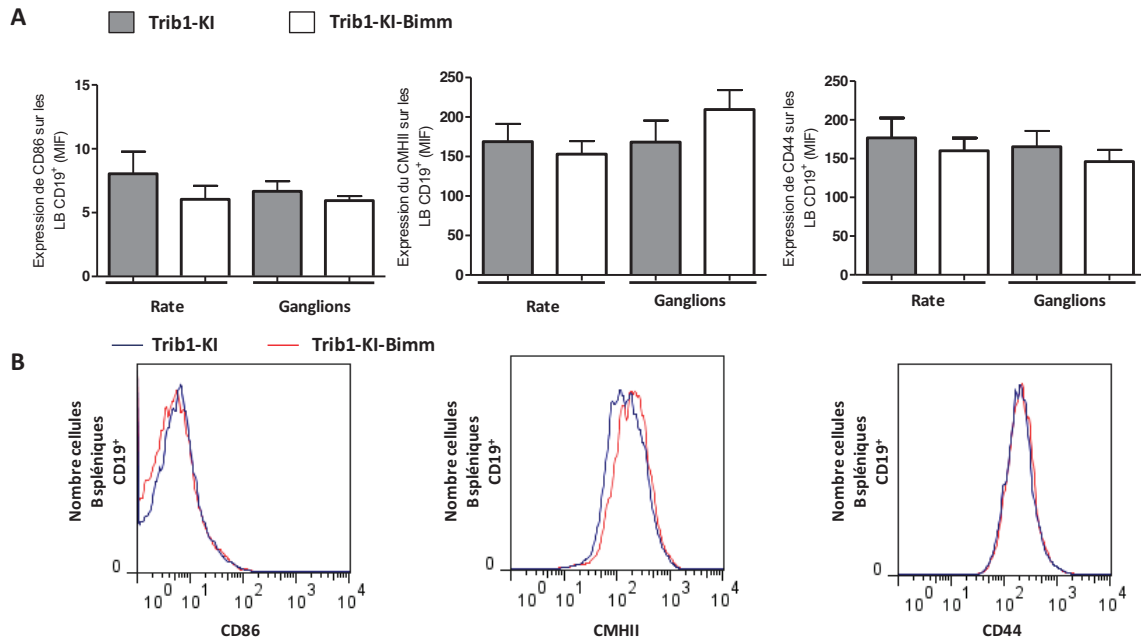


Figure 64 : La surexpression de *Trib1* n'induit pas de modification de l'activation basale des LB ganglionnaires et spléniques des souris Trib1-KI-Bimm et Trib1-KI âgées de 3 mois.

La moyenne de l'expression des marqueurs d'activation CD86, CMHII et CD44 à la surface des LB ganglionnaires et spléniques (CD19⁺) est exprimée par la MIF (Moyenne d'Intensité de Fluorescence) (n=9) (A). En (B) sont représentés des exemples de MIF des cellules B CD19⁺ spléniques provenant de souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm pour chacun des marqueurs.

L'expression des marqueurs est analysée par la moyenne d'intensité de fluorescence (MIF) du fluorochrome couplé à l'anticorps spécifique (ex : anticorps anti-CD86). Les résultats obtenus à l'âge de 3 mois et présentés en **figure 64** ne présentent pas de différence significative entre les MIF obtenues pour les souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm. De la même façon, aucune différence dans l'expression de ces marqueurs n'est observée à l'âge de 6 mois (résultats non montrés). **En conclusion, la surexpression de *Trib1* dans les LB n'a pas d'impact sur leur état d'activation basal.**

F2.4.2 DOSAGE DES IMMUNOGLOBULINES SÉRIQUES DU MODÈLE TRIB1-KI-BIMM

Dans le but d'évaluer si la surexpression de *Trib1* dans les LB induit une modification de la production des anticorps, nous avons dosé les immunoglobulines (IgM, IgG totales, IgG1, IgG2b et IgG3) dans le sérum des souris à l'âge de 3 mois et à l'âge de 6 mois par la technique ELISA.

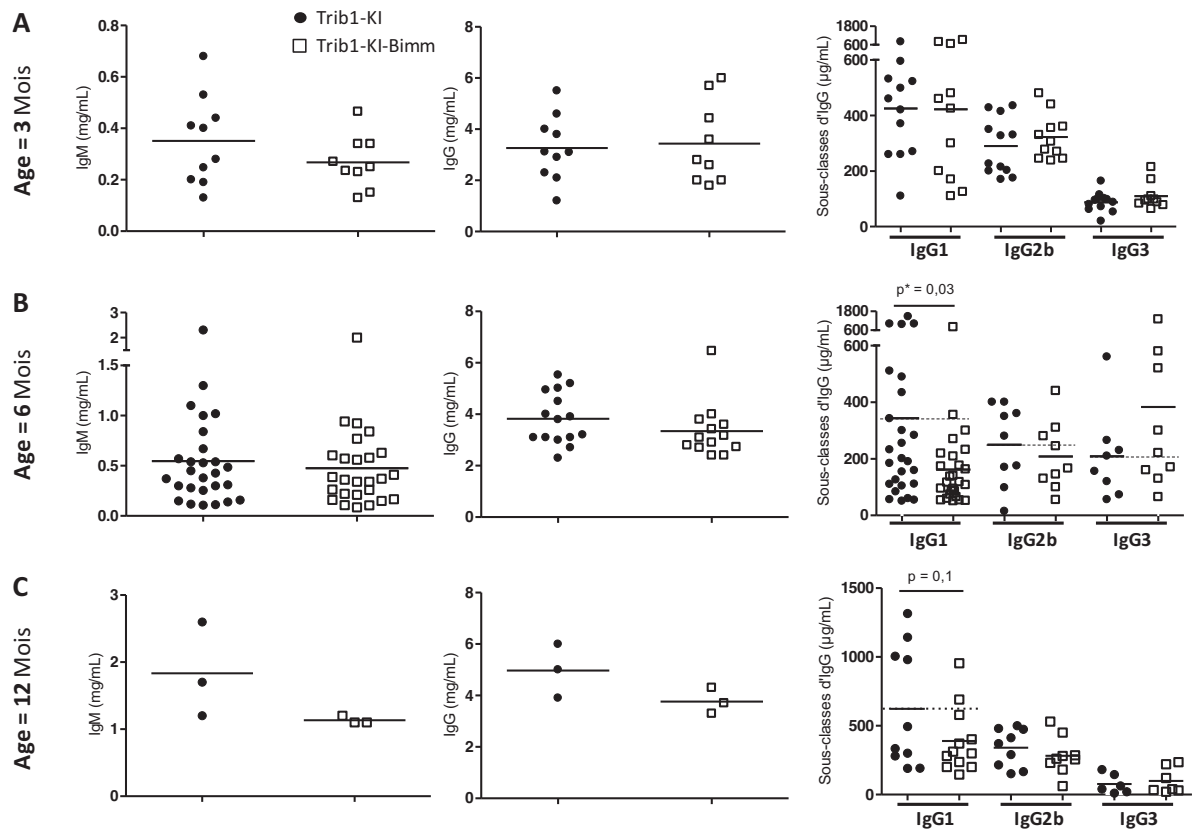


Figure 65 : Dosage des IgM, des IgG totales et des sous-classes IgG1, IgG2b et IgG3 par ELISA dans le sérum des souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm, âgées de 3 mois (A), 6 mois (B) et 12 mois (C).

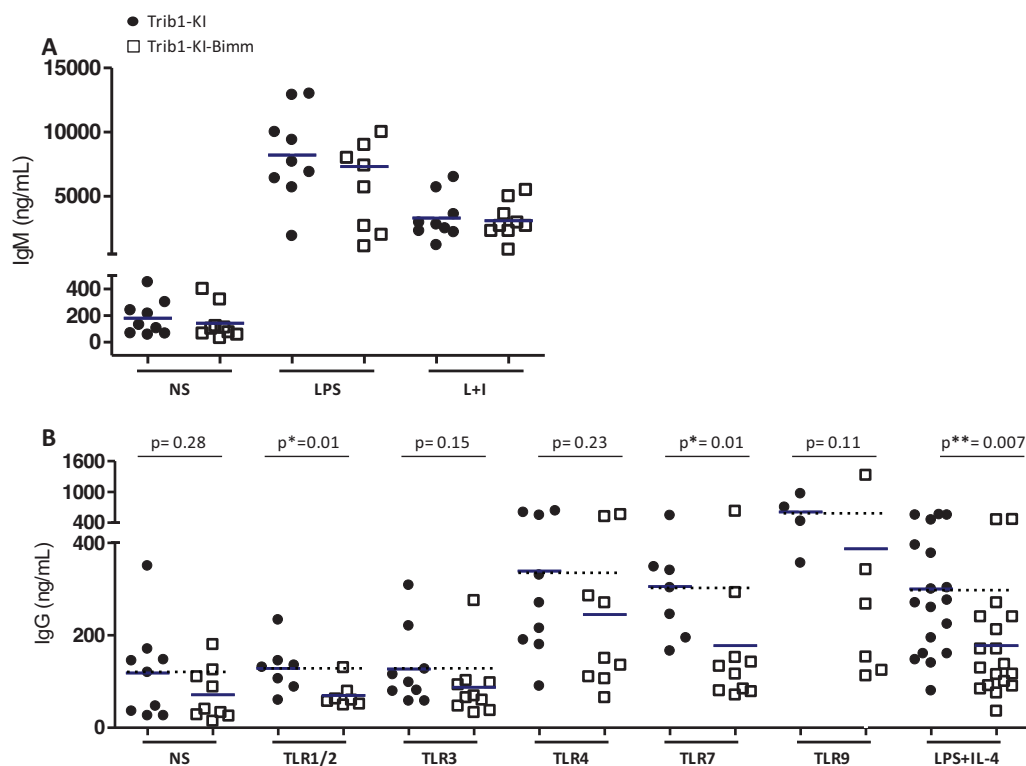
(*: Test de Mann&Whitney).

Alors qu'à l'âge de 3 mois, il n'y a pas de différence notable entre les deux types de souris pour toutes les classes d'Ig mesurée (**Figure 65A**), nous remarquons une diminution statistiquement significative des IgG1 dans le sérum des souris Trib1-KI-Bimm à 6 mois, comparé aux animaux contrôles (**Figure 65B**). Bien que les IgG1 représentent la sous-classe majoritaire parmi les sous-classes d'IgG, cette diminution ne se répercute pas de manière statistiquement significative sur les IgG totales. Cela peut s'expliquer par une faible augmentation non significative de la sous-classe IgG3. Ces résultats ont été complétés par l'analyse de souris âgées de 12 mois (**Figure 65C**), qui permet de confirmer une tendance à la diminution des IgG1 bien qu'elle ne soit pas significative. De plus, ces souris de 12 mois présentent également une légère tendance à la diminution des IgM et IgG totales.

En conclusion, la surexpression de *Trib1* dans les LB induit, à l'âge de 6 mois, une diminution de la sous-classe IgG1 dans le sérum des souris Trib1-KI-Bimm qui tend à persister à l'âge de 12 mois.

F2.5 ÉTUDE DE LA PRODUCTION D'ANTICORPS APRÈS STIMULATION *IN VITRO*

Parallèlement aux études phénotypiques à l'état basal, nous nous sommes intéressés à la capacité des LB surexprimant *Trib1* à produire des Ig après une stimulation *in vitro*. Pour cela, les cellules spléniques des souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm âgées de 3 mois ont été stimulées *in vitro* pendant 72h avec différents stimuli : 1) le LPS (ligand du TLR4), stimulus activant la commutation de classe vers IgG2b et IgG3 ; 2) une combinaison de LPS et d'IL-4, activant la commutation de classe vers IgG1 ; 3) différents agonistes des TLRs : Pam3CSK4 (agoniste du dimère TLR1/2), Poly(I:C) (agoniste du TLR3), Imiquimod (agoniste du TLR7), ADN à îlots CpG (agoniste du TLR9). Bien que certains stimuli favorisent la production de certaines sous-classes d'IgG spécifiques (ex : LPS/IL-4 → IgG1), chacune des 3 sous-classes IgG1, IgG2b et IgG3, ont été dosées par technique ELISA dans le surnageant de culture après chaque stimulation.



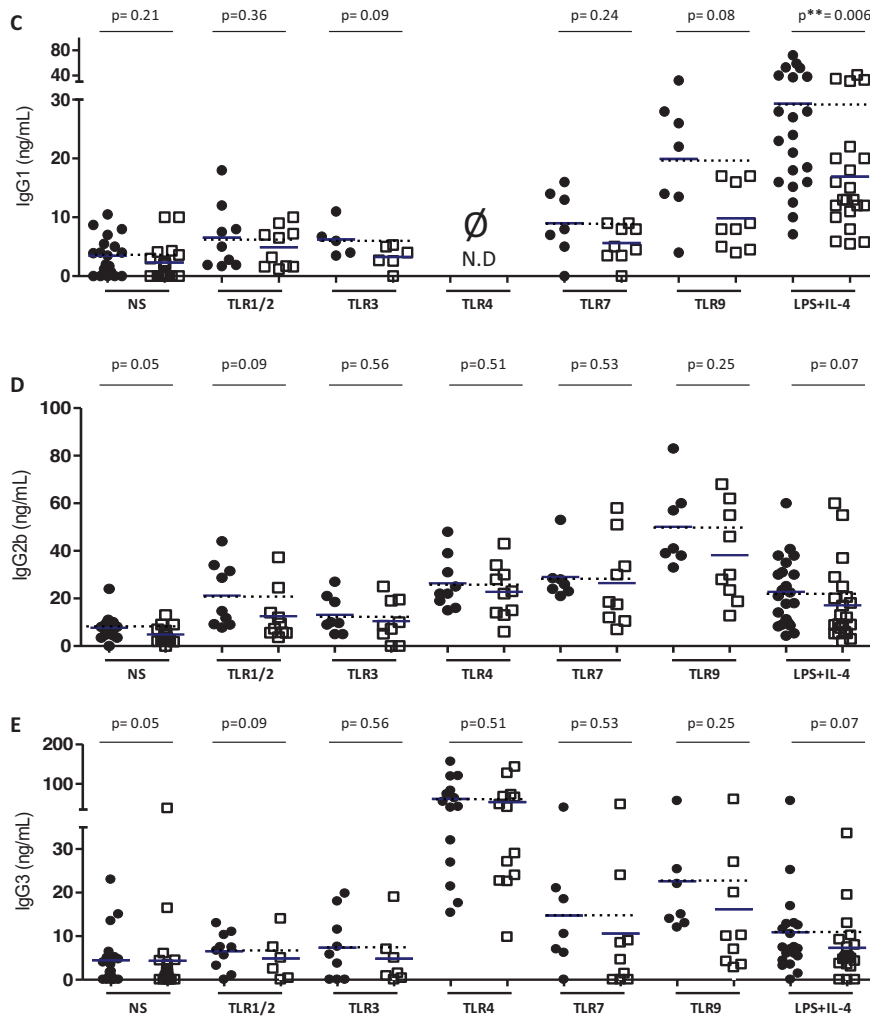


Figure 66 : Dosage des immunoglobulines par ELISA dans le surnageant de culture de cellules spléniques totales de souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm, incubées pendant 72h avec différents stimuli. Production d'IgM (A), d'IgG (B), d'IgG1 (C), d'IgG2b (D), d'IgG3 (E). NS : Non Stimulé ; N.D : Non Détectable. (* : Test de Mann&Whitney).

De manière générale, mises à part les IgM dosées après une stimulation avec du LPS et du LPS/IL-4, dont la quantité dans le surnageant de culture est équivalente entre les 2 lignées murines, la production des IgG (comprenant la totalité des sous-classes d'IgG : IgG1, 2b, 2c, 3) ainsi que des sous-classes IgG1, IgG2b et IgG3 dosées individuellement, a tendance à être réduite dans le surnageant de culture des souris Trib1-KI-Bimm comparé aux contrôles (**Figure 66**).

Plus précisément, la production des IgG est diminuée de manière statistiquement significative lorsque les cellules spléniques sont stimulées avec l'agoniste du dimère TLR1/2 (Pam3CSK4), du TLR7 (imiquimod) et la combinaison LPS/IL-4 (**Figure 66B**). Les diminutions observées après la stimulation avec de l'imiquimod et du Pam3CSK4 semblent être dues à l'addition d'une

faible réduction de plusieurs des sous-classes qui ne sont pas statistiquement significatives. Concernant la diminution des IgG après la stimulation LPS/IL-4, elle apparaît être majoritairement liée à une diminution des IgG1, additionnée d'une tendance à la diminution des IgG2b et IgG3 (**Figure 66C/D/E**).

Ainsi, ces résultats confirment un rôle de la surexpression de *Trib1* dans la diminution de la production d'anticorps, déjà observée à l'état basal dans le sérum des souris Trib1-KI-Bimm âgées de 6 mois pour la sous-classe IgG1. Cette sous-classe est à nouveau retrouvée diminuée de manière statistiquement significative après une stimulation LPS/IL-4 de splénocytes totaux provenant de souris Trib1-KI-Bimm comparé aux contrôles.

F2.6 CONCLUSION

Les souris Trib1-KI-Bimm présentent un développement lymphocytaire et une répartition des sous-populations lymphocytaires comparables à ceux des souris contrôles, à l'âge de 3 et 6 mois. La production d'Ig est également identique à l'état basal à l'âge de 3 mois. Cependant, une diminution de la sous-classe IgG1 est observée dans le sérum de souris Trib1-KI-Bimm âgées de 6 mois. Cette diminution concernant les IgG1 est retrouvée après activation des splénocytes totaux *in vitro* avec une combinaison LPS/IL-4, responsable de la commutation des LB vers IgG1. La diminution des IgG1, additionnée à une légère diminution non significative des sous-classes IgG2b et IgG3, est corrélée à une diminution statistiquement significative des IgG. D'autre part, une diminution statistiquement significative des IgG est également observée après la stimulation des splénocytes avec un agoniste du TLR7 et du dimère TLR1/2. Ces stimuli n'induisent néanmoins pas de diminution spécifique d'une sous-classe d'IgG particulière.

Ainsi, la surexpression de *Trib1* dans les LB semble induire un phénotype de type « immunosuppresseur » caractérisé par une diminution de la capacité des LB à produire des anticorps.

F3. ÉTUDE DE LA RÉPONSE ANTICORPS *IN VIVO* CHEZ LES SOURIS TRIB1-KI-BIMM

Etant donné que nous avons observé : 1) une diminution significative de la production des IgG1 dans le sérum des souris Trib1-KI-Bimm à l'âge de 6 mois ; 2) une diminution significative des IgG1 dans le surnageant de culture après une stimulation LPS/IL-4 ; 3) une tendance à la diminution non-significative des sous-classes d'IgG face à différents stimuli, nous avons choisi d'évaluer si la réponse anticorps dans un contexte d'activation du SI *in vivo* est aussi affectée par la surexpression

de *Trib1*. Nous avons alors procédé à différents types d'activation du SI : 1) par immunisation expérimentale classique des animaux dans le but d'induire une réponse anticorps élevée, 2) par infection par des agents pathogènes pour mimer une situation de production d'anticorps plus physiologique, 3) par injection de LPS afin d'étudier la production d'autoanticorps.

F3.1 ÉTUDE DE LA RÉPONSE ANTICORPS *IN VIVO* APRÈS IMMUNISATION DES SOURIS TRIB1-KI-BIMM AVEC UN ANTIGÈNE DE TYPE T-DÉPENDANT

Dans le but de reproduire, *in vivo*, la stimulation *in vitro* induite par la combinaison LPS/IL-4 (où l'IL-4 mime une aide des LT) qui provoque une diminution de la production d'IgG1, nous avons choisi d'immuniser nos souris avec deux immunogènes T-dépendants différents : l'ovalbumine (OVA) et le NP-KLH. Les animaux ont été immunisés à l'âge de 6 mois, âge auquel ils présentent une diminution des IgG1 dans le sérum à l'état basal.

F3.1.1 IMMUNISATION T-DÉPENDANTE AVEC DE L'OVALBUMINE

Nous avons immunisé des souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm âgées de 6 mois avec de l'OVA associée à deux types d'adjuvant : l'adjuvant de Freund, adjuvant classique lors des immunisations expérimentales qui induit une réponse anticorps très forte, et l'hydroxyde d'aluminium (alum), qui oriente une réponse de type IgG1 mais qui, de manière globale, induit une réponse moins forte qu'avec l'adjuvant de Freund. Les souris sont injectées à J0, J10 et J20 avec 100µg d'OVA.

F3.1.1.1 IMMUNISATION DES SOURIS AVEC L'OVA ET DE L'ADJUVANT DE FREUND

Le dosage des Ig anti-OVA a été réalisé sur le sérum des souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm immunisées à J0, J10 et J20 avec 100µg d'OVA couplés à de l'adjuvant de Freund complet (J0), incomplet (J10) et à du PBS à J20. Les résultats présentés en **figure 67** montrent que, en comparaison aux souris contrôles, les souris Trib1-KI-Bimm présentent des titres d'IgG et IgG1 anti-OVA semblables. Par contre, une diminution du titre des IgM anti-OVA est observée à J20 (**Figure 67C**).

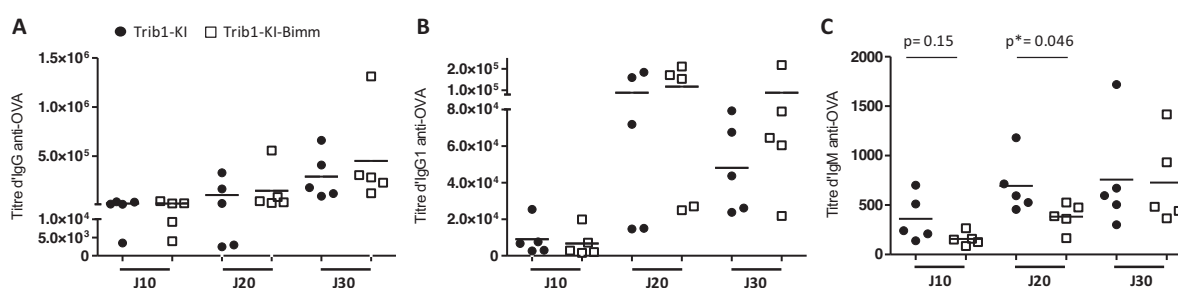


Figure 67 : Dosage des immunoglobulines par ELISA dans le sérum de souris Trib1-KI-Bimm et Trib1-KI immunisées avec de l'ovalbumine et de l'adjuvant de Freund.

Les souris ont été immunisées avec (100µg d'OVA à J0, J10 et J20 associée à de l'adjuvant de Freund complet à J0, incomplet à J10 et à du PBS à J20, puis les Ig anti-OVA (IgG (A), IgG1 (B) et IgM (C)) ont été dosées par ELISA. (* : Test de Mann&Whitney).

F3.1.1.2 IMMUNISATION DES SOURIS AVEC L'OVA ET DE L'HYDROXYDE D'ALUMINIUM

Le dosage des Ig anti-OVA a été réalisé sur le sérum des souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm immunisées à J0, J10 et J20 avec 100µg d'OVA associés cette fois à de l'alum (250µg) pour chaque injection. A J0 et J10, les titres d'anticorps IgG, IgG1 et IgM anti-OVA sont équivalents entre les souris Trib1-KI-Bimm et contrôles (données non montrées). Aux jours 20 et 30, nous observons cependant une diminution spécifique de la production d'IgM anti-OVA (Figure 68C) qui n'est pas retrouvée pour les IgG et IgG1 (Figure 68A/B).

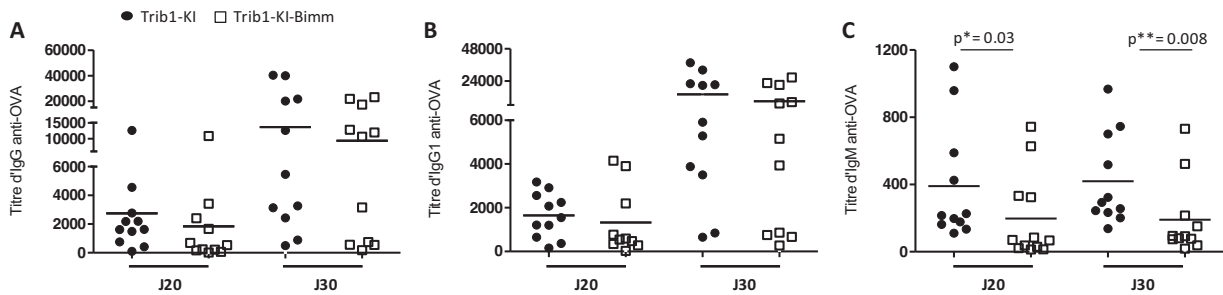


Figure 68 : Dosage des immunoglobulines par ELISA dans le sérum de souris Trib1-KI-Bimm et Trib1-KI immunisées avec de l'ovalbumine associée à de l'hydroxyde d'aluminium.

Les souris ont été immunisées avec (100µg d'OVA à J0, J10 et J20 associée à de l'alum pour chaque injection puis les Ig anti-OVA (IgG (A), IgG1 (B) et IgM (C)) ont été dosées par ELISA. (* : Test de Mann&Whitney).

F3.1.1.3 CONCLUSION

Ainsi, le phénotype de type immunosuppresseur due à la surexpression de *Trib1* est aussi retrouvé *in vivo*, mais cette fois-ci impacte la production d'IgM spécifique de l'antigène. En effet, l'immunisation des souris Trib1-KI-Bimm avec de l'OVA associée à deux adjuvants différents (adjuvant de Freund et alum) induit une diminution de la production d'IgM dirigées contre l'OVA à J20 et J20 et J30, respectivement.

F3.1.2 IMMUNISATION T-DÉPENDANTE AVEC DU NP-KLH

Des souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm âgées de 6 mois ont été immunisées avec du NP-KLH (où la protéine KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) joue le rôle de protéine porteuse et l'haptène NP (4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl) joue le rôle de l'antigène contre lequel seront dirigés les anticorps) à J0 (100µg) et J23 (10µg). Le titre des anticorps IgM et IgG anti-NP ont été quantifiés par ELISA à J6, J23 et J29.

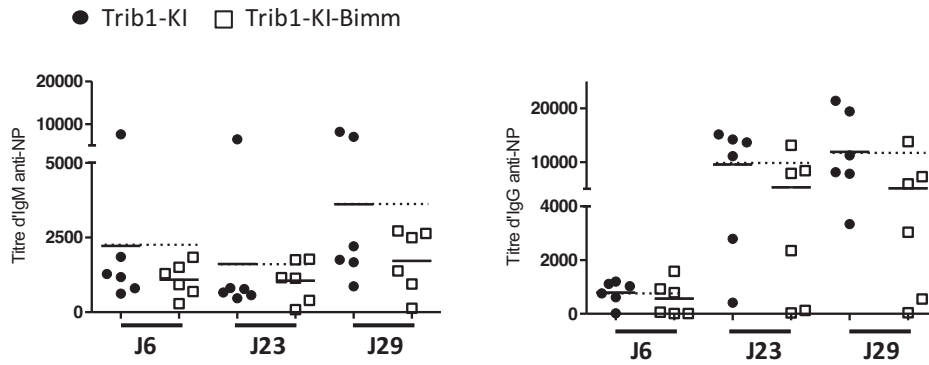


Figure 69 : Dosage des immunoglobulines par ELISA dans le sérum de souris Trib1-KI-Bimm et Trib1-KI immunisées avec du NP-KLH.

Des souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm âgées de 6 mois ont été immunisées avec du NP-KLH associé à de l'Alum aux J0 et J23. Les titres d'anticorps anti-NP de type IgM (Gauche) et IgG (Droite) ont été dosés par ELISA.

Les résultats montrent que la production d'IgM anti-NP (J6 et J29) et d'IgG anti-NP (J29) tend à diminuer, mais de manière non statistiquement significative (**Figure 69**).

Ces résultats montrent qu'une surexpression de *Trib1* a tendance à diminuer la réponse T-dépendante suite à une immunisation avec le NP-KLH. Cependant, aucun de ces résultats n'est significatif. Il faudra réitérer l'expérience afin de pouvoir conclure sur un plus grand nombre d'animaux.

F3.2 ÉTUDE DE LA RÉPONSE ANTICORPS *IN VIVO* APRÈS IMMUNISATION DES SOURIS TRIB1-KI-BIMM AVEC UN ANTIGÈNE DE TYPE T-INDÉPENDANT

Rappelons qu'une tendance à la diminution de la production de différentes sous-classes d'Ig a été observée *in vitro* avec différents stimuli incluant certains stimuli dits « T-indépendants » (ex : LPS) (**voir E2.5**). Nous avons alors décidé d'immuniser des souris contrôles et Trib1-KI-Bimm âgées de 6 mois avec du NP-LPS. Trois injections avec 100µg de NP-LPS ont été réalisées aux jours 0, 10 et 20. Le dosage des IgM et IgG totales ainsi que les IgM et IgG anti-NP a été fait par ELISA aux jours 10, 20 et 30.

Les résultats obtenus suite à ces dosages d'Ig montrent qu'il n'y a aucune différence significative entre les souris Trib1-KI-Bimm et contrôles concernant la production d'IgM et IgG anti-NP après immunisation (**Figure 70**), même si, à J20, le titre d'IgM anti-NP tend à diminuer dans les souris Trib1-KI-Bimm par rapport aux contrôles. Le dosage des sous-classes pourrait compléter ces résultats. Il pourrait être effectué à J10, jour où l'on observe une tendance à la diminution des IgG anti-NP.

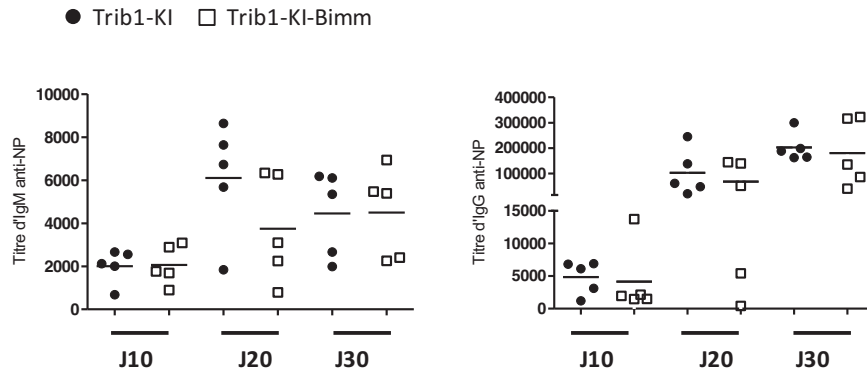


Figure 70 : Dosage des immunoglobulines par ELISA dans le sérum de souris Trib1-KI-Bimm et Trib1-KI immunisées avec du NP-LPS.

Des souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm âgées de 6 mois ont été immunisées avec du NP-LPS aux J0, J10 et J20. Les titres d'anticorps anti-NP de type IgM (Gauche) et IgG (Droite) ont été dosés dans le sérum des souris par ELISA.

Ainsi, l'immunisation des souris par le NP-LPS ne semble pas induire de modification majeure dans la production d'anticorps de type IgM et IgG spécifiques de l'haptène NP.

F3.3 ÉTUDE DE LA RÉPONSE ANTICORPS *IN VIVO* APRÈS INFECTION DES SOURIS TRIB1-KI-BIMM AVEC *BORRELIA BURGDORFERI*

La surexpression de *Trib1* a montré un phénotype de type immunosuppresseur qui se traduit par la diminution de la production d'Ig, notamment après la stimulation de splénocytes totaux de souris Trib1-KI-Bimm par un agoniste du dimère TLR1/2. Afin d'étudier la réponse anticorps des animaux en contexte plus physiologique, nous avons choisi de procéder à une infection expérimentale. Nous avons sélectionné le pathogène bactérien *Borrelia burgdorferi* (*Bb*). Ce spirochète est capable d'induire une infection chronique systémique dans la plupart des lignées murines, y compris la lignée B6, qui constitue le fond génétique de nos animaux transgéniques (Schoenfeld et al., 1992, Yang et al., 1992). Les lipoprotéines membranaires et la flagelline de *Bb* vont notamment activer les voies TLR via le récepteur TLR5 et l'hétérodimère TLR1/2 (Oosting et al., 2011), et induire une activation polyclonale des LB (avec adénopathies) associée à une hypergammaglobulinémie (particulièrement d'isotype IgG2b et IgG3). Les infections expérimentales ont été réalisées à l'Institut de Bactériologie de Strasbourg (Pr. Benoît Jaulhac, EA4438 « Physiopathologie et Médecine translationnelle », équipe « Borréliose de Lyme »).

Les animaux Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm ont été infectés à l'âge de 4 semaines avec 1.10^5 spirochètes, par injection intra-dermique au niveau de la base du dos. Des souris contrôles ont été injectées avec du milieu de culture stérile BSK-H. Le sang des souris a été prélevé à J0 puis chaque semaine après l'infection jusqu'au jour 28, jour du sacrifice des animaux. L'articulation de la patte

arrière gauche a été récupérée afin d'effectuer la quantification du gène *fla* (gène codant pour la flagelline), par qRT-PCR en temps réel pour valider l'infection expérimentale. Les ganglions inguinaux et axillaires ont été prélevés dans le but de comptabiliser les cellules lymphoïdes ainsi que d'analyser le pourcentage de cellules du CG. Le dosage des Ig spécifiques de *Bb* a été réalisé par technique ELISA.

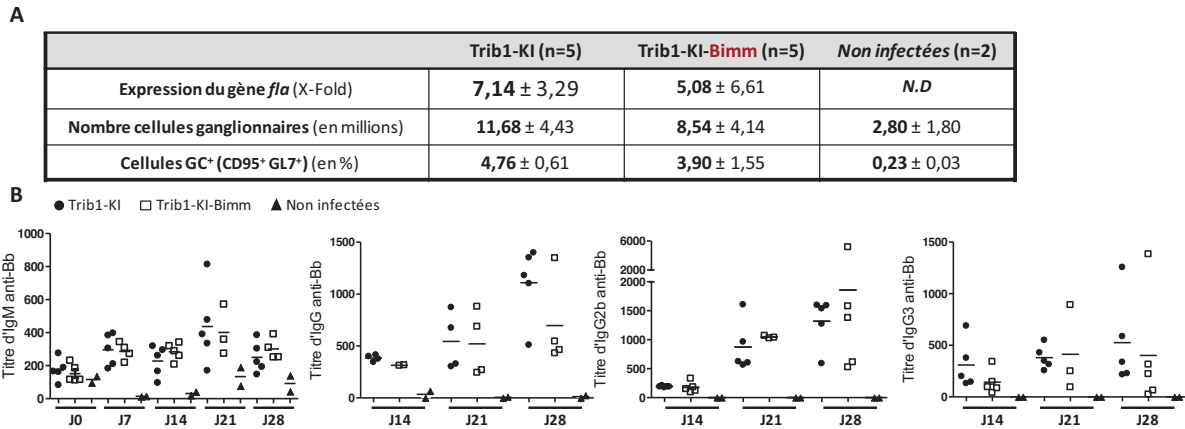


Figure 71 : Validation de l'infection des souris Trib1-KI-Bimm et Trib1-KI par *Borrelia burgdorferi* et dosage des immunoglobulines spécifiques.

Des souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm âgées de 4 semaines ont été infectées avec 1.10^5 spirochètes *Borrelia burgdorferi* (*Bb*). Deux souris contrôles ont été injectées avec le milieu de culture stérile de la bactérie (milieu BSK-H). L'infection des souris a été validée par la quantification du gène *fla* par qRT-PCR en temps réel (normalisation par rapport au gène de la *gapdh*), le comptage des cellules ganglionnaires (en millions) et le pourcentage de cellules du centre germinatif (GC) dans les ganglions (A). Les titres d'anticorps anti-Bb de type IgM, IgG, IgG2b et IgG3 ont été évalués par ELISA (B). N.D : Non détectable.

Dans un premier temps, nous pouvons constater que l'infection par *Bb* a été efficace pour toutes les souris infectées. En effet, la quantité de transcrits du gène *fla*, le nombre de cellules ganglionnaires totales à J28 ainsi que le pourcentage de cellules du GC sont augmentés dans les 2 groupes d'animaux infectés, par rapport aux animaux non infectés. D'autre part, nous ne notons pas de différence entre les souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm. (Figure 71A).

Le dosage des Ig spécifiques de *Bb* ne permet pas de mettre en évidence une modification de la réponse anticorps des animaux Trib1-KI-Bimm suite à l'infection bactérienne. En effet, la quantité d'IgM dirigées contre *Bb*, dosée à tous les temps post-injections (J7, J14, J21, J28) est équivalente entre les 2 lignées transgéniques. Les titres d'IgG, d'IgG2b et d'IgG3 dirigées contre *Bb*, dosées à J14, J21 et J28 (les IgG spécifiques de *Bb* n'étant quantifiables qu'à partir de J14) ne sont pas statistiquement différents entre les deux types de souris (Figure 71B). Néanmoins, nous remarquons une tendance à la diminution des IgG anti-Bb à J28 qui semble correspondre à une diminution

particulière de la sous-classe IgG3. Les IgG1 n'ont pas été dosées car l'infection n'oriente pas vers ce type de réponse.

En conclusion, la surexpression de *Trib1* dans les LB, n'induit pas de modification notable dans la production d'anticorps spécifiques, suite à une infection expérimentale des souris par *Bb*.

F3.4 ÉTUDE DE LA RÉPONSE AUTOIMMUNE DANS LE MODÈLE TRIB1-KI-BIMM

Le gène *TRIB1* a été retrouvé surexprimé dans les LB de patients lupiques en phase quiescente. Il était donc intéressant d'évaluer si dans notre modèle murin reproduisant cette altération d'expression, la production d'autoanticorps était augmentée à l'état basal, d'une part, et après induction par immunisation, d'autre part.

E3.4.1 DOSAGE DES AUTOANTICORPS ANTI-ADNDB À L'ÉTAT BASAL

Tout comme l'Homme, la souris produit des autoanticorps naturels à l'état basal dont la quantité dépend du fond génétique de l'animal. Nous avons voulu évaluer si la surexpression de *Trib1* avait un impact sur la production des autoanticorps anti-ADNdb naturels. Pour ce faire, le dosage des autoanticorps anti-ADNdb a été fait dans le sérum des souris Trib1-KI-Bimm et contrôles, aux âges de 3 mois et 6 mois.

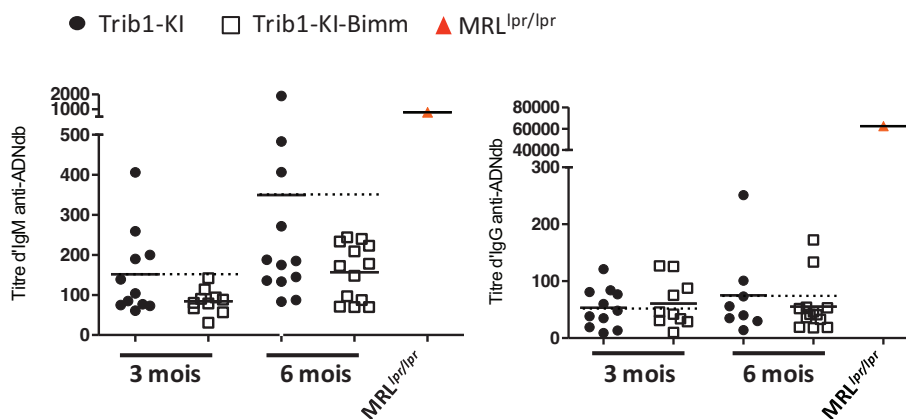


Figure 72 : Dosage des autoanticorps IgM et IgG anti-ADNdb dans le sérum des souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm à 3 et 6 mois.

Le dosage des autoanticorps anti-ADNdb d'isotype IgM (gauche) et IgG (droite) a été réalisé par ELISA dans le sérum de souris Trib1-KI-Bimm et Trib1-KI à l'âge de 3 et 6 mois. Le sérum d'une souris MRL^{lpr/lpr} malade (âge = 5 mois) a été utilisé comme contrôle positif.

Les titres d'autoanticorps anti-ADNdb d'isotype IgM (**Figure 72A**) et IgG (**Figure 72B**) ne sont pas augmentés dans les souris Trib1-KI-Bimm surexprimant *Trib1* dans les LB, en comparaison aux

animaux contrôles à 3 et 6 mois. Les titres concernant les IgM anti-ADNdb à 3 et 6 mois ont d'ailleurs plutôt tendance à diminuer dans les souris Trib1-KI-Bimm.

La surexpression de *Trib1* dans les LB ne conduit pas à une augmentation de la production d'autoanticorps anti-ADNdb à l'état basal.

F3.4.2 DOSAGE DES AUTOANTICORPS ANTI-ADNDB DANS UN MODÈLE D'INDUCTION DE LA PRODUCTION D'AUTOANTICORPS

La lignée murine B6 ne produit pas beaucoup d'autoanticorps à l'état basal. Ainsi nous avons décidé d'induire la production d'autoanticorps par nos animaux. Nous avons choisi le modèle d'immunisation par le LPS bactérien qui induit une activation polyclonale des LB (dont probablement les LB autoréactifs) et une augmentation des anticorps anti-ADNdb d'isotype IgM dans le sérum des animaux, mais sans induire de maladie lupique complète (*Fournie et al., 1974, Izui et al., 1977*). Les conditions expérimentales avaient été préalablement mises au point au laboratoire. De ce fait, des souris Trib1-KI-Bimm et Trib1-KI ont été injectées à l'âge de 3 mois avec 50µg de LPS provenant de *Salmonella typhimurium* à J0, puis 25µg à J7 et J14. Deux souris servant de contrôles ont été injectées avec du PBS.

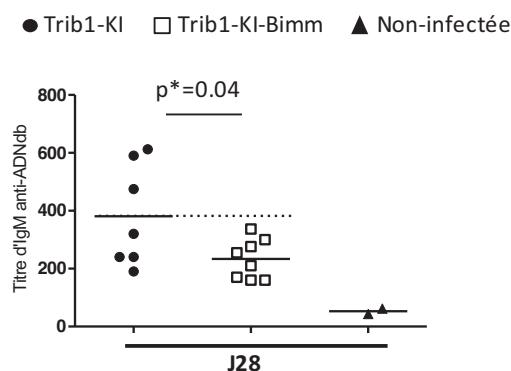


Figure 73 : La surexpression de *Trib1* induit une diminution de la production d'IgM anti-ADNdb à J28 après injection de LPS.

Après injection de LPS à J0 (50µg), J7 et J14 (25µg) de LPS à des souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm, les IgM anti-ADNdb ont été dosées dans le sérum des animaux par ELISA. Les résultats à J28 sont représentés dans cette figure. Le titre d'IgM anti-ADNdb des souris contrôles injectées au PBS est inférieur à 70. (* : Test de Mann&Whitney).

Nous remarquons, en **figure 73**, une diminution statistiquement significative de la production d'anticorps IgM anti-ADNdb au jour 28 après injection. **Ces résultats montrent que la surexpression de *Trib1* dans les LB est capable de réduire la quantité d'autoanticorps anti-ADNdb induits après injection de LPS.**

F3.5 CONCLUSION

Les résultats obtenus dans cette partie montrent que la surexpression spécifique de *Trib1* dans les LB est : 1) capable de diminuer la production d'IgM anti-OVA 20 à 30 jours après une immunisation expérimentale de type T-dépendante (OVA) ; 2) ne modifie pas la réponse anticorps suite à une immunisation avec un antigène T-indépendant (NP-LPS) ou après une infection de type chronique (*Bb*), 3) est capable de réduire les titres d'autoanticorps IgM anti-ADNdb dans le sérum des animaux 28 jours après une injection avec du LPS bactérien.

F4. LE PHÉNOTYPE DES SOURIS TRIB1-KI-BIMM DÉPEND-IL DU STADE DE DÉVELOPPEMENT À PARTIR DUQUEL *TRIB1* EST SUREXPRIMÉ ?

La surexpression de *Trib1* dans les LB à partir d'un stade très immature semble induire un phénotype de type immunosuppresseur. Nous avons souhaité savoir si le stade de développement des LB au cours duquel la surexpression de *Trib1* est induite, est important pour la mise en place de ce phénotype. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé des souris exprimant le transgène de la recombinaise Cre sous la dépendance du gène codant pour la protéine CD21. Cette protéine, aussi connue sous le nom de récepteur du complément 2 (CR2), est exprimée à la surface des LB lorsqu'ils se différencient du stade immature/transitionnel au stade mature (Fo/MZ). Les souris CD21Cre ont ainsi été croisées avec les souris Trib1-KI, puis nous avons étudié le phénotype des souris issues de ce croisement (nommées **Trib1-KI-Bmat**), qui surexpriment *Trib1* dans les LB seulement à partir du stade mature.

La lignée Trib1-KI est aussi considérée comme lignée contrôle pour le modèle Trib1-KI-Bmat.

F4.1 VALIDATION DU MODÈLE TRIB1-KI-BMAT

F4.1.1 MISE EN ÉVIDENCE DE LA DÉLÉTION DE LA CASSETTE STOP DANS LES LB MATURES

De la même façon qu'expliqué en **F2.3.1** pour le modèle Trib1-KI-Bimm, la délétion de la cassette STOP des LB Trib1-KI-Bmat a été mise en évidence par PCR.

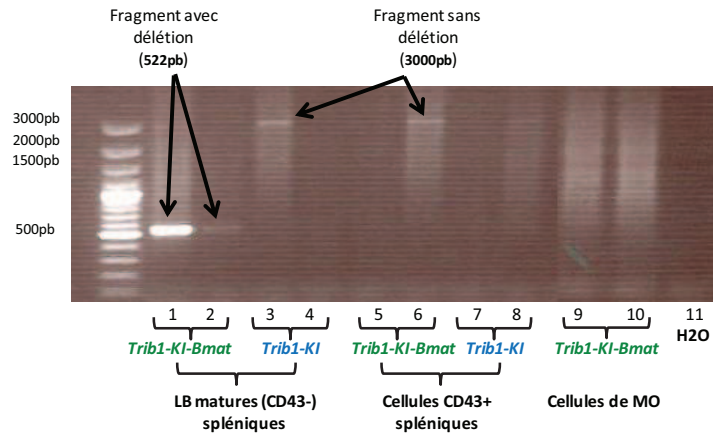


Figure 74 : Mise en évidence de la délétion de la cassette STOP au niveau de l'ADN des LB de souris Trib1-KI-Bmat.

La PCR a été réalisée à l'aide des oligonucléotides R1 et Fdel, sur de l'ADN extrait à partir de LB matures spléniques triés (CD43⁻), de cellules CD43⁺ de la rate et de cellules médullaires (MO). L'H₂O correspond au témoin négatif de la PCR.

Nous pouvons voir que dans le modèle Trib1-KI-Bmat, seuls les LB matures de la rate présentent une amplification du fragment de 522pb correspondant au fragment sans la cassette STOP (**Figure 74 puits n°1 et n°2**) puisque ce sont les seuls à exprimer CD21. Ce fragment de 522pb est absent dans tous les autres puits (qui correspondent à l'ADN des cellules spléniques CD43⁺ et des cellules médullaires des deux lignées transgéniques). Il est à noter que la protéine CD21 est aussi exprimée par les FDC, elles-mêmes CD43⁻. Ainsi, les bandes des deux premières colonnes (peu intense pour la 2ème, probablement dû à une faible concentration d'ADN) peuvent aussi représenter la délétion de la cassette STOP dans les FDC. Néanmoins, les FDC représentent une très faible proportion des cellules lymphoïdes, environ 0.2% des splénocytes (*Usui et al., 2012*).

F4.1.2 QUANTIFICATION DE L'ARNM DE *TRIB1* PAR QRT-PCR EN TEMPS RÉEL

Nous avons évalué par qRT-PCR en temps réel l'expression de *Trib1* dans différentes populations lymphoïdes provenant des souris Trib1-KI-Bmat et Trib1-KI.

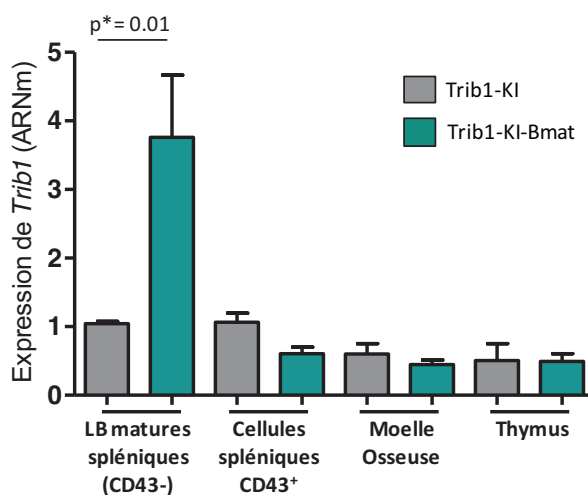


Figure 75 : Expression de *Trib1* dans plusieurs populations et organes lymphoïdes de souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bmat.

Analyse par qRT-PCR en temps réel de l'expression de l'ARNm de *Trib1* dans les cellules spléniques triées selon le marqueur CD43 (n=4), les cellules totales de la MO (n=4) et du thymus (n=3). Cette expression est normalisée par rapport à l'expression endogène de *Trib1* dans les souris contrôles Trib1-KI. *Hprt1 a été utilisé comme gène de ménage.* (* : Test de Mann&Whitney).

Les résultats présentés en **figure 75** montrent une surexpression de *Trib1* de plus de 4.5x dans les LB matures spléniques des souris Trib1-KI-Bmat, comparé aux animaux contrôles. Aucune surexpression du gène n'est retrouvée dans les cellules spléniques CD43⁺, les cellules médullaires ou thymiques. **La surexpression de *Trib1* dans le modèle Trib1-KI-Bmat est bien retrouvée dans les LB matures CD43⁻ de la rate.**

F4.1.3 VISUALISATION DE LA GFP PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX

L'expression de la GFP a été visualisée par cytométrie en flux dans les cellules B220⁺ de la MO, dans les cellules IgM⁺CD21⁺ de la rate et les cellules B220⁺IgM⁺ ganglionnaires (**Tableau 13 et Figure 76**).

	Trib1-KI (n=7)	Trib1-KI-Bmat (n=6)
MO : cellules B220 ⁺	2,7% ± 0,4%	17,0% ± 1,4%**
Rate : cellules B220 ⁺ IgM ⁺	3,1% ± 1,7%	78,6% ± 2,6%**
GG : cellules B220 ⁺ IgM ⁺	1,31% ± 0,53%	81,1% ± 2,57%**

Tableau 13 : Tableau récapitulatif le pourcentage moyen de cellules exprimant la GFP dans les différents organes lymphoïdes des souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bmat à partir de l'analyse par cytométrie en flux.

(* : Test Mann&Whitney, 0.0001 < p < 0.001).

Les valeurs du **tableau 13** montrent qu'en moyenne : **17%** des cellules B220⁺ de la MO, environ **79%** des cellules IgM⁺CD21⁺ de la rate, et **81%** des cellules B220⁺IgM⁺ ganglionnaires expriment la GFP dans les souris Trib1-KI-Bmat. Les cellules B220⁺GFP⁺ retrouvées au sein de la MO représentent les cellules matures recirculantes puisque 90% de celles-ci sont IgM^{high} (**Figure 76A**).

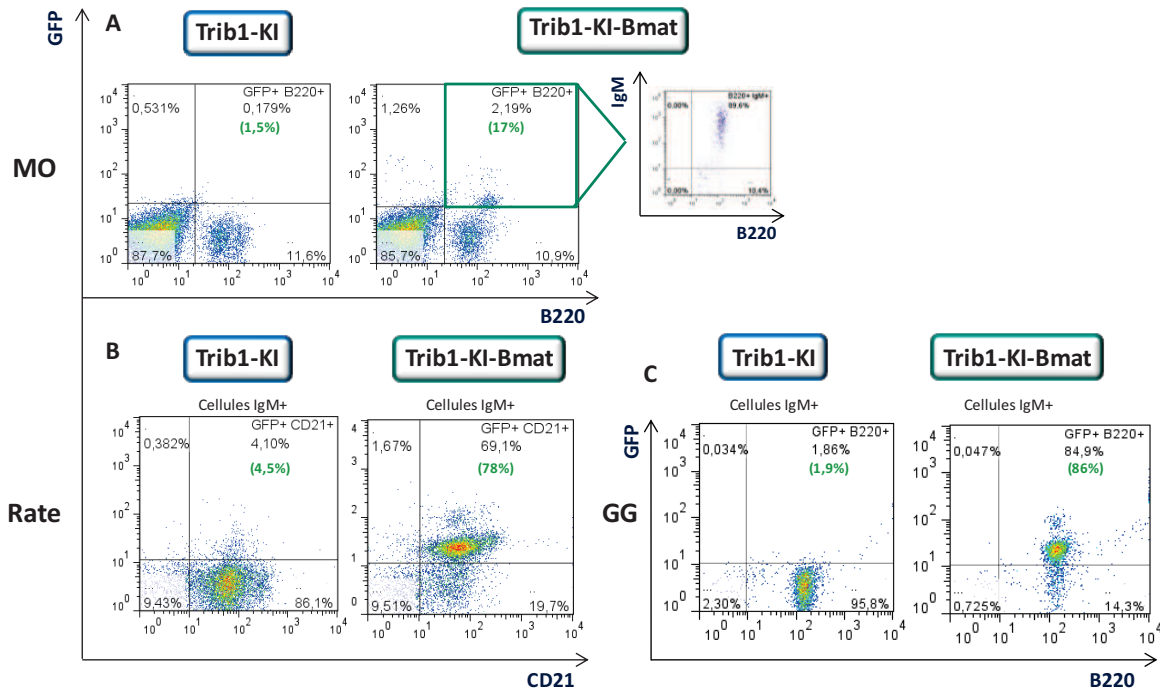


Figure 76 : Visualisation de l'expression de la GFP dans les différents organes lymphoïdes des souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bmat par cytométrie en flux.

Cellules B220⁺ de la MO (A), cellules IgM⁺CD21⁺ de la rate (B), cellules IgM⁺B220⁺ des ganglions (C). Ces résultats sont représentatifs de l'ensemble des souris analysées. (%) : % des cellules parmi la totalité des cellules (%) : % de cellules GFP⁺ parmi les cellules CD21⁺ (Rate) ou B220⁺ (MO et GG).

Bien que l'expression de la GFP soit observable pour une majorité des LB matures dans ce modèle, la délétion de la cassette STOP provoquée par la Cre dans le modèle CD21Cre semble moins efficace que celle induite par la Mb1Cre (ex pour les GG : la délétion de la cassette STOP par la Mb1Cre est efficace pour 95% des cellules B220⁺ contre 81% par la CD21Cre), ce qui correspond à ce qui est décrit dans la littérature .

F4.2 ÉTUDE PHÉNOTYPIQUE DU MODÈLE TRIB1-KI-BMAT

F4.2.1 IMMUNOPHÉNOTYPAGE DES ORGANES LYMPHOÏDES DU MODÈLE TRIB1-KI-BMAT

Dans le but d'étudier le développement ainsi que la répartition des sous-populations lymphocytaires, la MO, la rate et les GG de souris Trib1-KI-Bmat et contrôles âgées de 3 mois ont été prélevées puis les populations cellulaires ont été comptées et analysées par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés dans la **figure 77**. Aucun défaut majeur de développement ni d'anomalie de répartition des sous-populations lymphocytaires au sein des 3 organes lymphoïdes n'est notable chez les animaux Trib1-KI-Bmat comparé aux contrôles, si ce n'est une diminution du nombre et du pourcentage de cellules T2 dans la rate des souris Trib1-KI-Bmat. Cette diminution de la population T2 n'est cependant pas corrélée à un défaut de développement des LB vers les MZ ou les Fo.

A		Trib1-KI	Trib1-KI-Bmat
Moelle Osseuse		(n=8)	(n=10)
Pro-pré B		11,7% ± 2,3%	10,6% ± 2,9%
Immatures		3,4% ± 0,7%	3,3% ± 1,5%
Transitionnelles		1,8% ± 1,3%	1,8% ± 0,9%
Matures		2,0% ± 1,4%	2,2% ± 0,9%

B		Trib1-KI	Trib1-KI-Bmat
Rate		(n=10)	(n=10)
Cellules totales		71,1.10 ⁶ ± 2,0.10 ⁷	66,3.10 ⁶ ± 2,1.10 ⁷
LB Totaux		50,3% ± 4,8% 37,2.10 ⁶ ± 8,1.10 ⁶	47,6% ± 4,3% 29,7.10 ⁶ ± 5,8.10 ⁶
Sous pop	Fo	35,3% ± 4,4% 26,2.1.10 ⁶ ± 5,5.10 ⁶	32,9% ± 4,1% 21,7.10 ⁶ ± 7,4.10 ⁶
	MZ	2,3% ± 0,7% 1,7.10 ⁶ ± 0,8.10 ⁶	1,8% ± 0,6% 1,3.10 ⁶ ± 0,8.10 ⁶
	T1	12,2% ± 2,5% 8,8.10 ⁶ ± 1,9.10 ⁶	10,2% ± 2,7% 6,7.10 ⁶ ± 2,6.10 ⁶
	T2	9,0% ± 2,9% 6,9.10 ⁶ ± 2,6.10 ⁶	6,8% ± 1,8%* 4,7.10 ⁶ ± 3,0.10 ⁶ *
	LT CD4 ⁺	19,9% ± 2,6% 13,5.10 ⁶ ± 5,7.10 ⁶	18,9% ± 2,9% 12,6.10 ⁶ ± 4,8.10 ⁶
	LT CD8 ⁺	12,5% ± 2,5% 8,8.10 ⁶ ± 4,1.10 ⁶	13,0% ± 2,1% 8,6.10 ⁶ ± 3,5.10 ⁶
	B220 ^{low} CD138 ⁺ (PB)	1,4% ± 0,5% 1,15.10 ⁶ ± 0,52.10 ⁶	1,2% ± 0,4% 0,82.10 ⁶ ± 0,40.10 ⁶
	LB B1	1,3% ± 0,9% 0,99.10 ⁶ ± 0,60.10 ⁶	1,1% ± 0,6% 0,89.10 ⁶ ± 0,77.10 ⁶

C		Trib1-KI	Trib1-KI-Bmat
Ganglions		(n=10)	(n=10)
Cellules totales		6,6. 10 ⁶ ± 4,1. 10 ⁶	6,1. 10 ⁶ ± 2,3. 10 ⁶
LB Totaux		32,3,2% ± 4,1% 2,2. 10 ⁶ ± 1,7. 10 ⁶	27,2% ± 3,7% 1,57.10 ⁶ ± 0,7. 10 ⁶
LT CD4 ⁺		31,2% ± 4,5% 2,0. 10 ⁶ ± 1,1. 10 ⁶	33,4% ± 4,3% 2,0. 10 ⁶ ± 0,8. 10 ⁶
LT CD8 ⁺		25,7% ± 5,0% 1,6. 10 ⁶ ± 0,9. 10 ⁶	28,2% ± 2,8% 1,7. 10 ⁶ ± 0,6. 10 ⁶
B220 ^{low} CD138 ⁺		3,0% ± 1,5% 0,18. 10 ⁶ ± 0,09. 10 ⁶	2,7% ± 2,0% 0,17. 10 ⁶ ± 0,19. 10 ⁶

Figure 77 : Répartition des sous-populations lymphocytaires B et T dans les organes lymphoïdes primaires et secondaires des souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bmat à 3 mois.

Les cellules médullaires (A), spléniques (B) et ganglionnaires (C) des souris Trib1-KI-Bmat ont été analysées par cytométrie en flux en comparaison à des souris Trib1-KI. Les nombres absolus ainsi que les pourcentages rapportés à la population cellulaire totale sont reportés. (Les nombres absolus des cellules médullaires ne sont pas reportés car la méthode de prélèvement des fémurs et de l'isolement des cellules ne permet pas un prélèvement parfaitement homogène entre les souris). Les sous-populations sont définies en cytométrie en flux par différents marqueurs de surface de la même façon qu'en **Figure 63**.

L'activation à l'état basal des LB a été analysée par cytométrie en flux par mesure de la MIF de 3 marqueurs d'activation CD86, CD44 et CMHII. Les valeurs de MIF obtenues pour ces 3 marqueurs dans les LB surexprimant *Trib1* sont toutes 3 comparables à celle des LB contrôles (données non montrées).

En conclusion, la surexpression de *Trib1* dans les LB à partir d'un stade mature ne modifie ni le développement lymphocytaire, ni la répartition des sous-populations lymphocytaires, ni l'activation basale des LB.

F4.2.2 DOSAGE DES IMMUNOGLOBULINES SÉRIQUES

Dans le but de comparer la production d'Ig entre le modèle Trib1-KI-Bmat et les souris contrôles, la production des Ig (IgM, IgG, IgG1, IgG2b, IgG3) a été dosée par ELISA aux âges de 3 mois et 6 mois. Les concentrations d'Ig sériques des souris Trib1-KI-Bmat à l'âge de 3 mois sont équivalentes à celles des souris contrôles, comme ce qui a été observé pour le modèle Trib1-KI-Bimm (Figure 78). A l'âge de 6 mois, aucune différence n'est notable entre les deux lignées murines concernant les IgM et IgG totales, IgG2b et IgG3. Puis nous nous sommes particulièrement intéressés à la sous-classe IgG1, puisqu'elle est retrouvée réduite dans le modèle Trib1-KI-Bimm à cet âge. Cette diminution des IgG1 n'est pas retrouvée dans le sérum des animaux Trib1-KI-Bmat.

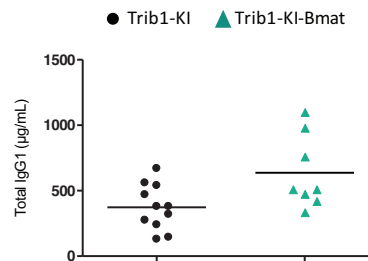


Figure 78 : Les animaux Trib1-KI-Bmat ne présentent pas de défaut de production d'IgG1 sériques à l'âge de 6 mois.

Ainsi, la surexpression de *Trib1* à partir d'un stade très immature est nécessaire à la mise en place du phénotype consistant en une diminution de production d'IgG1 à l'état basal à l'âge de 6 mois.

F4.2.3 ÉTUDE DE LA PRODUCTION D'ANTICORPS APRÈS STIMULATION *IN VITRO*

Les LB des souris Trib1-KI-Bimm présentent un défaut de la production des Ig après stimulation *in vitro*, et particulièrement des IgG1 après une stimulation par LPS et IL-4. Nous avons donc réitéré l'expérience avec les splénocytes totaux de souris Trib1-KI-Bmat en comparaison à des souris contrôles Trib1-KI.

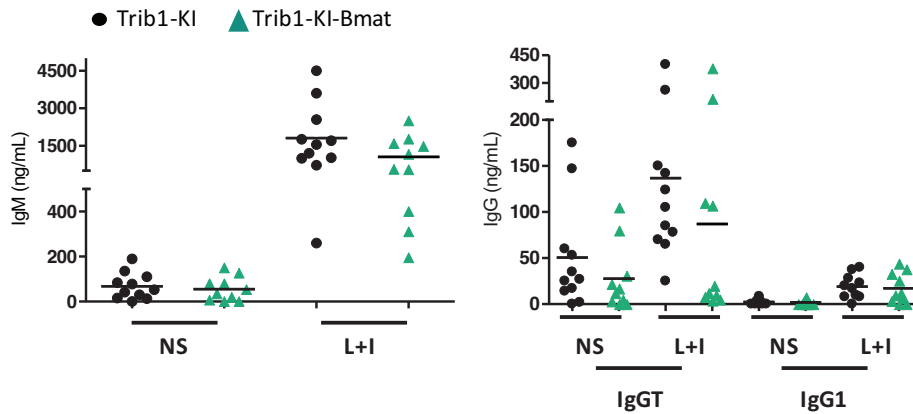


Figure 79 : Dosage des Ig dans le surnageant de culture de splénocytes de souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bmat, stimulés avec une combinaison de LPS et d'IL-4 pendant 72 heures.

Comme le montrent les résultats présentés en **figure 79**, nous ne constatons aucune différence entre les deux types de souris dans la production des IgM, IgG et IgG1 après stimulation avec le couple LPS/IL-4. Ainsi, la surexpression de *Trib1* induite à un stade mature du développement des LB ne permet pas d'induire une diminution de la production des IgG1 et IgG dans le surnageant de culture.

F4.2.4 ÉTUDE DE LA RÉPONSE ANTICORPS *IN VIVO* APRÈS IMMUNISATION DES SOURIS AVEC UN ANTIGÈNE T-DÉPENDANT

Ayant pour objectif de comparer les deux lignées transgéniques surexprimant *Trib1* dans les LB à différents stades de développement, nous avons reproduit l'expérience d'immunisation par l'OVA chez les souris Trib1-KI-Bmat. Pour cela, des souris Trib1-KI-Bmat et contrôles âgées de 6 mois ont été immunisées avec de l'OVA (100µg) à J0, J10 et J20 associée à l'adjuvant de Freund complet à J0, incomplet à J10 et à du PBS à J20. Le sérum a été récupéré avant chaque injection ainsi qu'à J30.

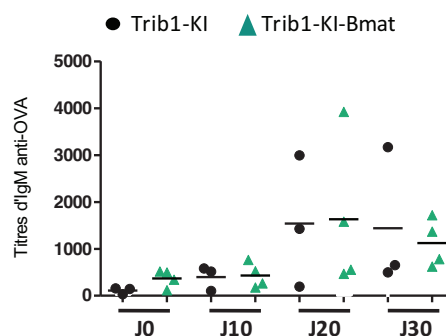


Figure 80 : Les animaux Trib1-KI-Bmat ne présentent pas de défaut d'IgM anti-OVA 20 jours après une immunisation à l'ovalbumine.

Contrairement au modèle Trib1-KI-**Bimm**, nous ne retrouvons pas la diminution des IgM anti-OVA à J20. D'autre part, les autres classes d'Ig (IgG anti-OVA et IgG1 anti-OVA) sont également produites à des quantités égales aux souris contrôles (**Figure 80**).

En conclusion, la surexpression de *Trib1* dans les LB à partir d'un stade mature ne suffit pas à induire le phénotype de type immunosuppresseur observé dans le modèle Trib1-KI-Bimm**.**

F4.3 CONCLUSIONS SUR LE MODELE TRIB1-KI-BMAT

Le modèle Trib1-KI-**Bmat** consistant en la surexpression de *Trib1* dans les LB à partir du stade mature **ne confirme pas le phénotype** observé pour le modèle Trib1-KI-**Bimm**. En effet, à l'état basal ou après stimulation *in vitro*, nous ne retrouvons pas la diminution d'IgG1 observée lorsque la surexpression de *Trib1* est induite dès un stade très immature. De plus, ce modèle ne présente pas de phénotype particulier.

F5. QUELLES SONT LES CONSÉQUENCES D'UNE SUREXPRESSIION DE *TRIB1* SPÉCIFIQUEMENT DANS LES LYMPHOCYTES T ?

Une étude de 2013 a montré que *Trib1* était fortement exprimé dans les LTregs murins (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) et humains (CD4⁺CD25⁺CD127⁻), et était capable d'interagir avec le facteur Foxp3, suggérant ainsi un rôle de *Trib1* dans la fonction des LTregs, sans l'avoir cependant démontré (*Dugast et al., 2013*). Par ailleurs, étant donné l'aide importante apportée par les LT CD4⁺ aux LB dans la production d'anticorps et le rôle des LTregs dans la tolérance lymphocytaire B, il apparaît intéressant de savoir si la surexpression de *Trib1* dans les LT matures, de manière globale, peut avoir un impact sur le phénotype des LB, de la même manière que lorsque *Trib1* est surexprimé dans les LB dans le modèle Trib1-KI-**Bimm**. Pour étudier cette surexpression spécifique dans les LT, nous avons croisé la souris Trib1-KI avec la souris dLckCre (n°3779), qui exprime la recombinaison Cre sous la dépendance du promoteur distal de la kinase Lck, à savoir dans les LT à partir d'un stade mature. Ces souris sont nommées **Trib1-KI-Tmat** et sont également comparées à la lignée contrôle Trib1-KI.

F5.1 VALIDATION DU MODÈLE TRIB1-KI-TMAT

Le modèle Trib1-KI-**Tmat** n'a été validé que par la visualisation de la GFP par cytométrie en flux qui ne doit concerner que les cellules T exprimant la kinase Lck sous le contrôle du promoteur distal, c'est-à-dire le compartiment T mature. La **figure 81** montre le pourcentage de cellules GFP⁺ parmi les compartiments CD3⁺ du thymus, CD3⁺CD4⁺ et CD3⁺CD8⁺ de la rate et des ganglions des souris Trib1-KI-**Tmat** et Trib1-KI. Les résultats pour le modèle Trib1-KI-**Tmat** sont les suivants : 1) un faible pourcentage de cellules CD3⁺ expriment la GFP (<8%) dans le thymus (dont 60% sont CD8⁺, 25% sont CD4⁺ et 15% sont double positifs, résultats non montrés sur la figure) ; 2) environ 50% des

cellules CD3⁺CD4⁺ expriment la GFP dans la rate et les GG ; 3) entre 82 et 85% des cellules CD3⁺CD8⁺ sont GFP⁺ dans la rate et les GG.

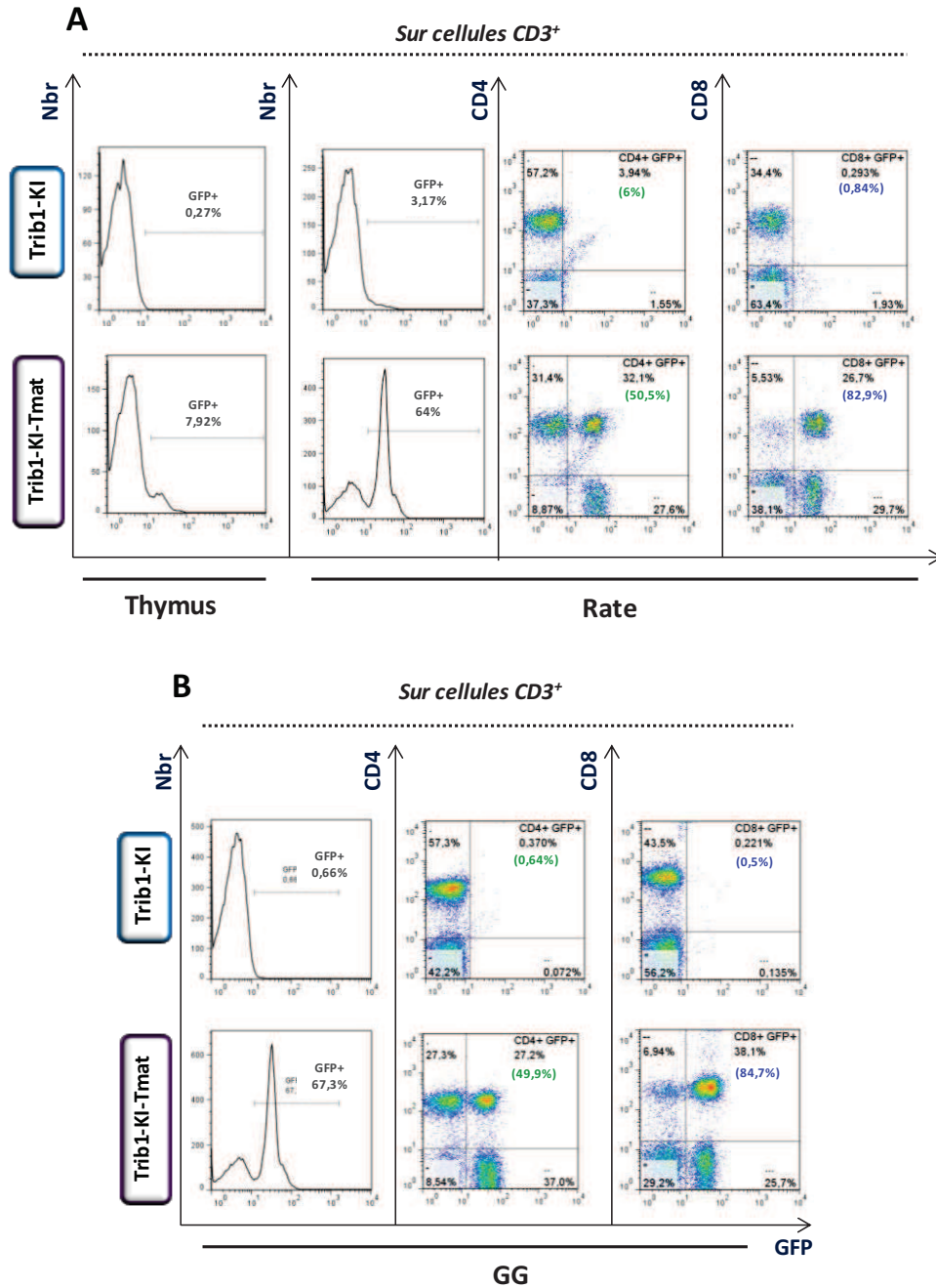


Figure 81 : Visualisation de l'expression de la GFP dans les différents organes lymphoïdes ((A) thymus et rate et (B) GG) des souris Trib1-KI et Trib1-KI-Tmat par cytométrie en flux.

(%) : % des cellules parmi les cellules CD3⁺, (%) : % de cellules GFP⁺ parmi les cellules CD4⁺, (%) : % de cellules GFP⁺ parmi les cellules CD8⁺.

En effet, nous remarquons une nette différence entre le pourcentage de cellules CD4⁺GFP⁺ et CD8⁺GFP⁺. Comme l'indiquait Zhang *et al.*, la Cre recombinase dLck (n°3779) est moins efficace dans les cellules CD4⁺ que dans les cellules CD8⁺ (Zhang *et al.*, 2005). Donc les pourcentages de cellules GFP⁺ obtenus pour le modèle Trib1-KI-Tmat confirment ceux obtenus par Zhang *et al.*

F5.2 ÉTUDE PHÉNOTYPIQUE DU MODÈLE TRIB1-KI-TMAT

F5.2.1 IMMUNOPHÉNOTYPAGE DES ORGANES LYMPHOÏDES DU MODÈLE TRIB1-KI-TMAT

L'étude du modèle Trib1-KI-Tmat surexprimant *Trib1* spécifiquement dans les LT matures a débuté par l'analyse du développement des LT et de la répartition des sous-populations au sein des organes lymphoïdes. Ainsi, le thymus, la rate et les GG des souris Trib1-KI et Trib1-KI-Tmat âgées de 3 mois ont été prélevés. Les cellules ont ensuite été comptées puis analysées par cytométrie en flux.

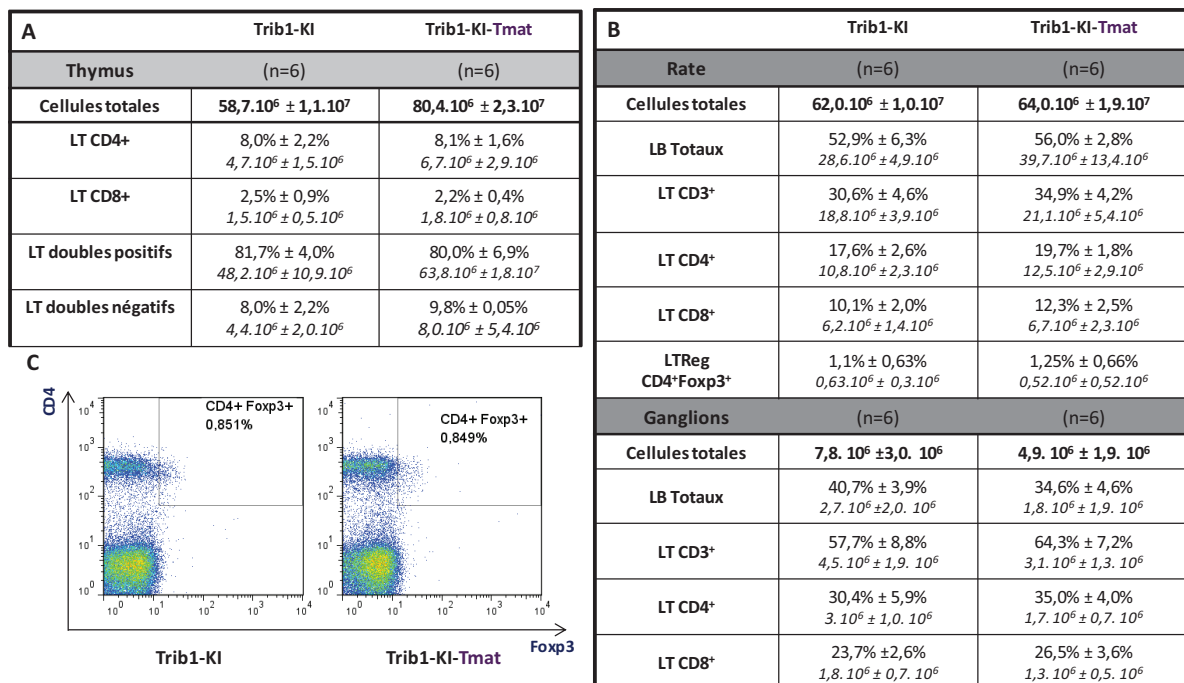


Figure 82 : Répartition des sous-populations lymphocytaires B et T dans les organes lymphoïdes primaires et secondaires des souris Trib1-KI et Trib1-KI-Tmat à 3 mois.

Les cellules thymiques (A), spléniques et ganglionnaires (B) des souris Trib1-KI-Tmat ont été analysées par cytométrie en flux en comparaison à des souris Trib1-KI. Les nombres absolus ainsi que les pourcentages rapportés à la population cellulaire totale sont reportés. Les sous-populations définies en cytométrie en flux par différents marqueurs de surface sont les suivantes : LB totaux (B220⁺ IgM⁺), LT doubles positifs (CD3⁺CD4⁺CD8⁺), LT double négatifs (CD3⁺CD4⁻CD8⁻), LTRegs (CD4⁺Foxp3⁺), LT CD4⁺ (CD3⁺CD4⁺), LT CD8⁺ (CD3⁺CD8⁺). Un exemple de marquage des LTRegs (CD4⁺Foxp3⁺) est représenté en (C).

Tout d'abord, la surexpression de *Trib1* n'altère pas le développement des LT au sein du thymus, puisque la répartition des sous-populations T (CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD8⁺, CD4⁻CD8⁻) est équivalente à la répartition observée chez les souris contrôle (Figure 82A). Au niveau des organes

lymphoïdes secondaires, le pourcentage, ainsi que le nombre absolu des populations provenant des souris *Trib1*-KI-*Tmat* ne sont pas statistiquement différents des valeurs obtenues pour les souris *Trib1*-KI (**Figure 82B**). Enfin, nous avons analysé les LTreg ($CD4^+Foxp3^+$) présents dans la rate des deux lignées puisque *Trib1* a été montré comme surexprimé dans cette population et comme capable d'interagir avec le facteur FoxP3 (*Dugast et al.*, 2013). Les cellules $CD4^+Foxp3^+$ surexprimant *Trib1* sont en nombre équivalent par rapport aux cellules contrôles (**Figure 82B/C**).

En conclusion, la surexpression de *Trib1* dans les LT matures ne semble pas avoir d'impact sur le développement, la proportion des sous-populations T dans les organes lymphoïdes étudiés incluant les LTregs. Néanmoins, plusieurs éléments doivent être pris en compte : 1) le manque du marqueur CD25 dans l'identification des LTregs, 2) l'efficacité moyenne de la dLck-Cre (n°3779) au niveau des cellules $CD4^+$, puisque cette population représente plus de la moitié des cellules $CD3^+$ de la rate par exemple, et comprend notamment la population de LTregs,

F5.2.2 DOSAGE DES IMMUNOGLOBULINES DANS LE SÉRUM

Nous avons évalué la production d'Ig dans le sérum des animaux *Trib1*-KI-*Tmat* à l'âge de 6 mois afin de savoir si une surexpression de *Trib1* pouvait potentiellement impacter sur la production basale d'Ig. La **figure 83** présente les quantités d'IgM, d'IgG totales et d'IgG1 dans le sérum des souris *Trib1*-KI et *Trib1*-KI-*Tmat*.

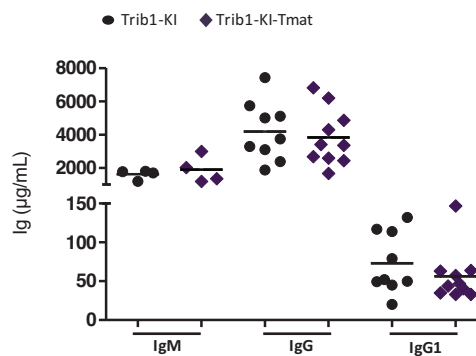


Figure 83 : Dosage des immunoglobulines (IgM, IgG, IgG1) par ELISA dans le sérum de souris *Trib1*-KI-*Tmat* et *Trib1*-KI âgées de 6 mois.

Nous remarquons que les taux d'Ig des 3 isotypes sont équivalents entre les deux modèles murins (**Figure 83**). **La surexpression de *Trib1* dans les LT matures, ne modifie pas la production d'Ig à l'état basal dans les souris *Trib1*-KI-*Tmat*.**

F5.2.3 ÉTUDE DE L'ACTIVATION *IN VITRO* DES LYMPHOCYTES T DU MODÈLE TRIB1-KI-TMAT

Dans le but d'évaluer la fonctionnalité des LT surexprimant *Trib1*, nous avons analysé leur capacité à pouvoir s'activer *in vitro* en présence d'un stimulus. Pour ce faire, les splénocytes totaux de souris Trib1-KI-Tmat et contrôles ont été mis en culture avec un anticorps **anti-CD3** (active la voie du TCR), une combinaison **anti-CD3 et anti-CD28** (active la voie du TCR et fourni un signal de co-activation) et le couple **PMA** (phorbol 12-myristate 13-acetate)/**Ionomyicine** (capable d'activer la voie calcique). Les cellules ont été récupérées 24 heures après la mise en stimulation, afin d'analyser l'expression du marqueur d'activation précoce CD69, ou 48 heures après, pour analyser l'expression du marqueur tardif CD44. Les populations CD4⁺ et CD8⁺ ont été analysées indépendamment l'une de l'autre.

Les résultats, non présentés ici, ne révèlent pas d'anomalie d'expression de ces deux marqueurs d'activation dans les LT surexprimant *Trib1* aux deux temps d'analyse. **En conclusion, une expression augmentée de *Trib1* dans les LT matures n'impacte pas sur la capacité des LT à s'activer *in vitro*.**

F5.3 CONCLUSION SUR LE MODÈLE TRIB1-KI-TMAT

Le modèle Trib1-KI-Tmat consistant en la surexpression de *Trib1* dans les LT matures ne présente pas de modification phénotypique des LT. Le nombre, la répartition des sous-populations ainsi que l'activation de ces cellules s'avère être comparable aux cellules contrôles. De plus nous n'avons constaté aucune anomalie au niveau de la production d'anticorps dans la lignée Trib1-KI-Tmat. Enfin, ce modèle reste critiquable puisque la délétion de la cassette STOP par la dLck Cre (n°3779) n'est pas optimale pour la sous-population CD4⁺.

F6. ÉTUDE DU MÉCANISME RESPONSABLE DE LA DIMINUTION DE PRODUCTION DES ANTICORPS EN CAS DE SUREXPRESSION DE *TRIB1* DANS LES LYMPHOCYTES B

La surexpression de *Trib1* dans les LB dès un stade immature induit une diminution statistiquement significative de la production d'Ig dans différentes conditions : une diminution des IgG1 à l'état basal dans le sérum de souris et après stimulation *in vitro* de splénocytes totaux avec une combinaison LPS/IL-4, une diminution des IgM anti-OVA après immunisation des souris avec de l'OVA et une diminution des IgM anti-ADNdb après immunisation des souris avec du LPS. Afin de rechercher le mécanisme par lequel la surexpression de ce gène peut induire un tel phénotype, nous avons réalisé plusieurs expériences.

F6.1 LA DIMINUTION DE PRODUCTION DES IG EST-ELLE INTRINSÈQUE AUX LYMPHOCYTES B ?

Pour répondre à cette première question, nous avons choisi d'étudier le comportement des LB isolés de la totalité des splénocytes provenant des souris Trib1-KI-Bimm. En se basant sur le modèle de stimulation *in vitro*, nous avons tout d'abord purifié les LB matures CD43⁺ à l'aide d'un tri négatif (reposant sur l'utilisation d'un anticorps anti-CD43) puis stimulé les cellules B triées avec la combinaison LPS/IL-4. Les Ig ont ensuite été dosées dans le surnageant de culture par ELISA. Nous avons choisi ce stimuli car : 1) il induit la production d'une quantité notable d'Ig ; 2) il correspond au stimulus induisant la plus forte diminution des Ig *in vitro* (IgG et IgG1) ; 3) il permet la commutation de classe vers IgG1, sous-classe retrouvée diminuée dans le sérum des souris âgées de 6 mois ; 4) il mime une aide des LT et se rapproche le plus de l'OVA, immunogène induisant une réponse T-dépendante et avec lequel nous avons également observé un phénotype dans le modèle Trib1-KI-Bimm *in vivo*.

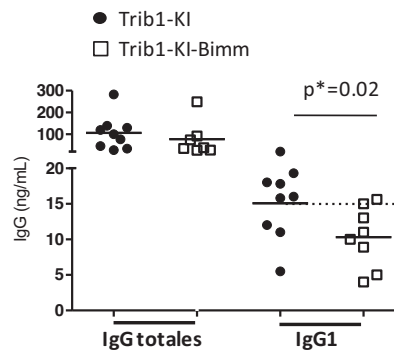


Figure 84 : La stimulation de LB triés (CD43⁺) par du LPS et de l'IL-4 induit une diminution de la production des IgG1 dans le surnageant de culture.

(*: Test Mann&Whitney).

Il apparaît que la stimulation de LB triés par du LPS et de l'IL-4 permet d'observer à nouveau cette diminution des IgG1 dans le surnageant de culture (**Figure 84**). Cependant, contrairement à la stimulation des splénocytes totaux, la production des IgG totales n'est pas significativement impactée.

Ainsi, le phénotype provoqué par la surexpression de *Trib1* semble bien intrinsèque aux LB bien qu'il semble être amplifié lorsque les LT sont présents dans la culture. Nous pouvons d'ailleurs noter que les quantités d'IgG1 et d'IgG totales produites après stimulation LPS/IL-4 sont augmentées en présence des LT, environ 2 fois pour les IgG1 (30ng/mL > 15 ng/mL) et 3 fois pour les IgG totales (300ng/mL > 100 ng/mL).

F6.2 LA DIMINUTION DE LA PRODUCTION D'IG EST-ELLE ASSOCIÉE À UNE MORTALITÉ AUGMENTÉE OU UNE PROLIFÉRATION DIMINUÉE DES LYMPHOCYTES B SUREXPRIMANT *TRIB1* ?

La diminution des Ig pourrait potentiellement être la conséquence d'une **mortalité plus accrue** des LB surexprimant *Trib1* ou une **prolifération moins importante**, en conditions de stimulation *in vitro*. Pour répondre à cette question, nous avons évalué par cytométrie en flux la mortalité des cellules après une stimulation des splénocytes totaux par LPS/IL-4 suivi d'un marquage à l'iodure de propidium d'une part, et la prolifération des LB après différentes stimulations par un marquage de l'antigène Ki67 (présent au niveau du noyau des cellules proliférantes), d'autre part.

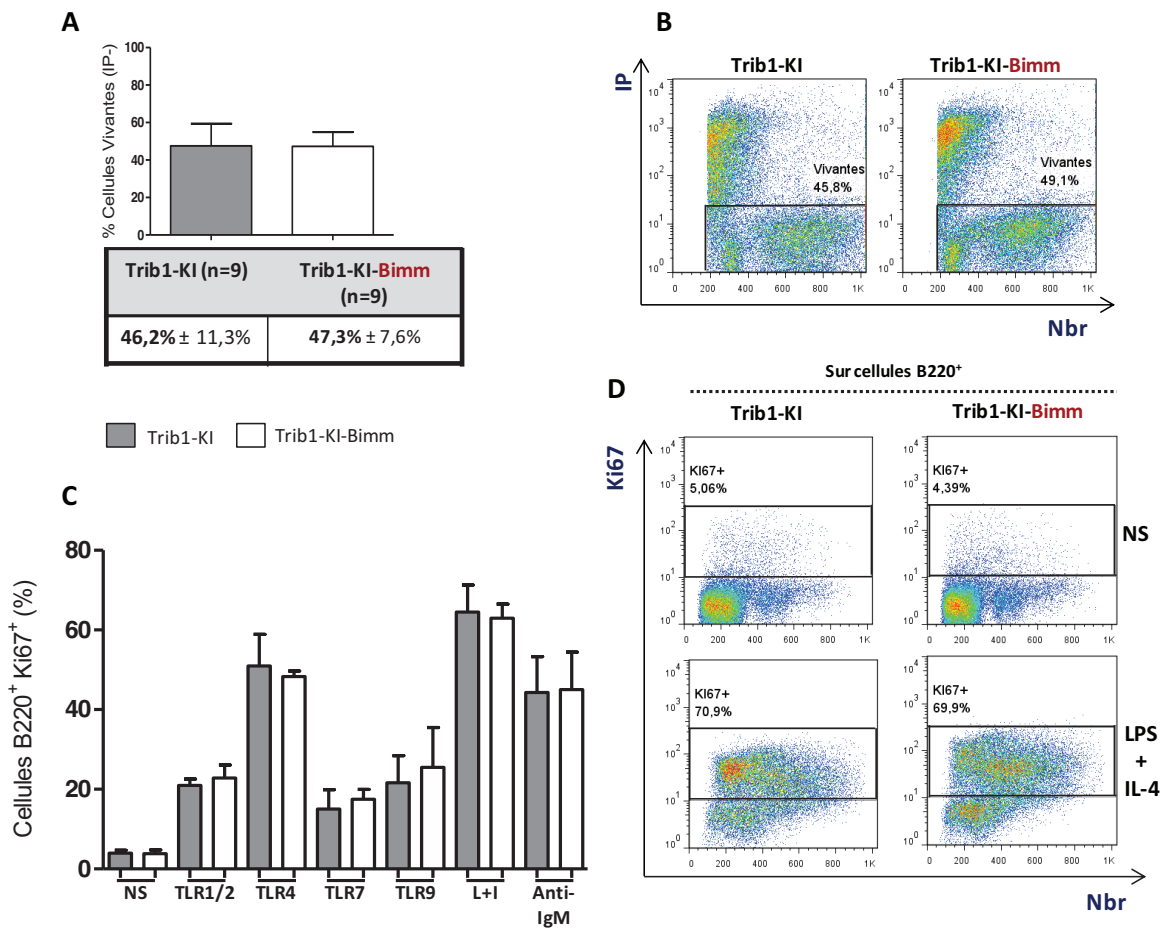


Figure 85 : Analyse de la mortalité des splénocytes et de la prolifération des LB Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm, après stimulation *in vitro*.

Après 72h de stimulation de splénocytes totaux provenant de souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm avec LPS/IL-4, la mortalité cellulaire a été évaluée par l'utilisation de l'iodure de propidium (IP) en cytométrie en flux (A) avec un exemple pour chaque type de souris (B). La prolifération des LB (B220⁺) après différentes stimulations a été mesurée par le marquage du Ki67 en cytométrie en flux (C). Un exemple pour chaque type de souris sans stimulation (NS) ou avec stimulation LPS/IL-4 est illustré (D). *Nbr* : Nombre ; NS n=3 ; TLR1/2 n=3 ; TLR4 n=3 ; TLR7 n=3 ; TLR9 n=3 , L+I n=6 ; Anti-IgM n=6 .

La **figure 85A**, montre qu'après 72 heures de stimulation avec la combinaison LPS/IL-4 le pourcentage de cellules vivantes s'élève à 46,2% pour les souris Trib1-KI et 47,3% pour les souris Trib1-KI-Bimm (un exemple pour chaque souris est montré en **figure 85B**). Cette analyse de la mortalité englobe tous les splénocytes. Nous pourrions compléter ces résultats avec un double marquage anti-CD19/annexine V afin d'évaluer l'apoptose. L'anticorps anti-CD19 nous permettrait de cibler spécifiquement les LB et le marquage à l'annexine V permet de marquer les phosphatidylsérines présentes à la surface des cellules mortes ou en train de mourir et permettrait de ce fait d'étudier les différentes phases du processus apoptotique (phase précoce/tardive).

La **figure 85C** présente le nombre de cellules B220⁺ Ki67⁺ après différentes stimulations *in vitro*, qui induisent par ailleurs une diminution (ou une tendance) de la production d'Ig (voir **Figure 66**). Nous avons choisi d'ajouter dans cette étude la stimulation de type BCR-dépendante, réalisée avec un anticorps anti-IgM, puisque la voie du BCR est primordiale à l'activation du LB. Ainsi, nous remarquons que les stimuli responsables de la plus forte prolifération sont : le LPS, la combinaison LPS/IL-4 et l'anticorps anti-IgM (un exemple pour chaque type de LB non stimulé ou stimulé avec LPS/IL-4 est illustré en **figure 85D**). Néanmoins, aucune différence dans les pourcentages de cellules proliférantes n'est notable entre les animaux contrôles et les animaux surexprimant *Trib1* dans les LB.

Ces résultats indiquent que la diminution de production des Ig, due à la surexpression de *Trib1*, n'est pas la conséquence d'une mortalité cellulaire augmentée, ni d'une diminution de la capacité des LB à proliférer.

F6.3 EST-CE QUE LES LYMPHOCYTES B SUREXPRIMENT *TRIB1* PRÉSENTENT UN DÉFAUT D'ACTIVATION ?

Afin d'évaluer l'état d'activation des LB après stimulation, différents stimuli (TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR9 et LPS/IL-4) ont été ajoutés à la culture de splénocytes de souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm pendant 72 heures. Les cellules ont ensuite été récoltées puis l'expression des marqueurs d'activation CD44, CD86 et CMHII a été analysée par cytométrie en flux sur les LB CD19⁺. Rappelons que l'activation des LB à l'état basal n'était pas modifiée dans le modèle Trib1-KI-Bimm (cf paragraphe **F2.4.1.2**).

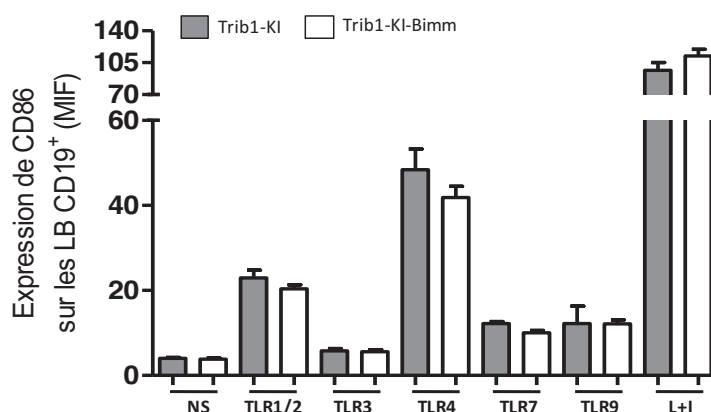


Figure 86 : L'activation des LB surexprimant *Trib1* n'est pas modifiée après stimulation *in vitro*.

Après 72h de stimulation de splénocytes totaux provenant de souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm, l'expression du marqueur d'activation CD86 (GeomMean) a été analysée par cytométrie en flux sur les LB CD19⁺. NS n=6 ; TLR1/2 n=6 ; TLR4 n=6 ; TLR7 n=4 ; TLR9 n=4 , L+I n=6.

La **figure 86** présente l'expression du marqueur CD86 en fonction du type de stimulation effectuée. Nous remarquons que par rapport à la condition non stimulée, l'expression de CD86 est différemment induite suivant les stimulations utilisées. Néanmoins, quel que soit le type de stimulation, l'expression de CD86 à la surface des LB est équivalente entre les souris Trib1-KI-Bimm et contrôles. L'expression des marqueurs d'activation CD44 et le CMHII a aussi été mesurée après les stimulations LPS et LPS/IL-4. De même, aucune différence n'est notable entre les deux lignées transgéniques (résultats non montrés).

Ainsi, la diminution de la production d'Ig dans le surnageant de culture n'est pas due à un défaut d'activation des LB surexprimant *Trib1*.

F6.4 LA SUREXPRESSION DE *TRIB1* ENTRAÎNE-T-ELLE DES MODIFICATIONS DANS LE PROGRAMME TRANSCRIPTIONNEL DE LA DIFFÉRENCIATION PLASMOCYTAIRE ?

Nous avons voulu évalué si la surexpression de *Trib1* pouvait avoir un éventuel impact sur le programme transcriptionnel qu'engagent les LB activés afin de devenir des cellules sécrétrices d'anticorps (voir partie A2.4.2). Une stimulation de 4 jours avec du LPS permet d'induire la différenciation d'environ 15% de LB matures en plasmablastes (PB) caractérisés par un profil B220^{low}CD138⁺. La combinaison LPS/IL-4, dans nos conditions expérimentales, permet la différenciation d'un pourcentage plus faible que le LPS (<8%). Les deux types de stimulation orientent la commutation de classe différemment (LPS → IgG2b et IgG3, LPS/IL-4 → IgG1). Nous avons donc testé les deux méthodes de différenciation plasmablastique.

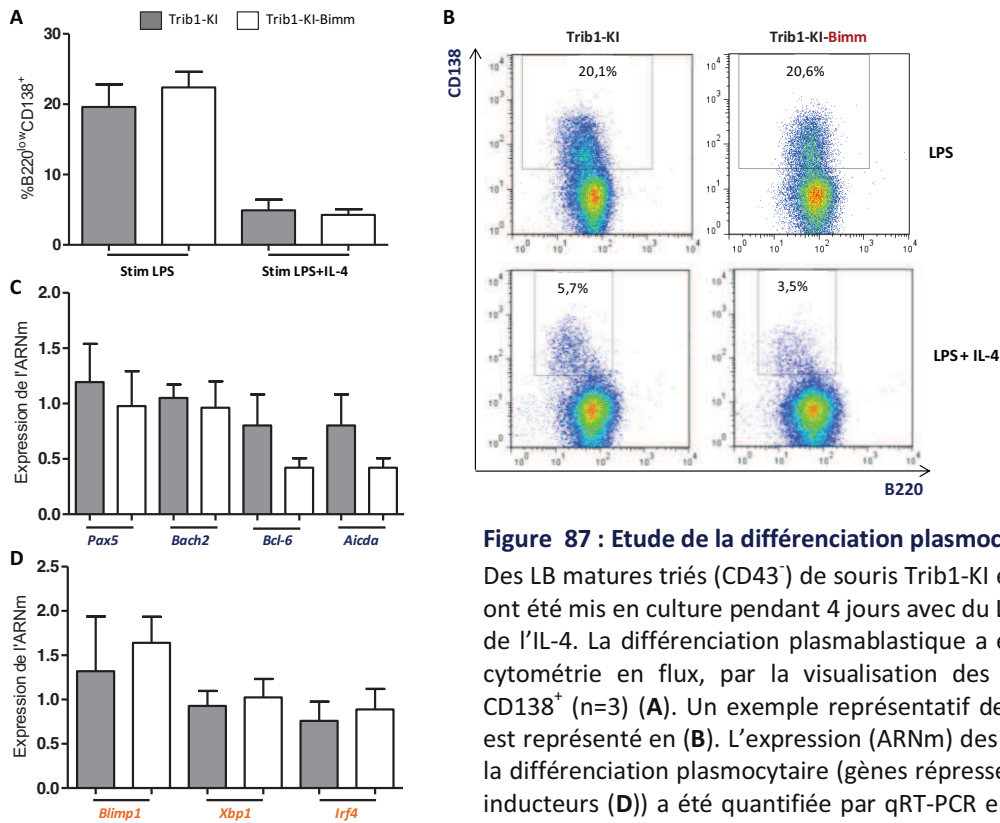


Figure 87 : Etude de la différenciation plasmocytaire.

Des LB matures triés (CD43⁻) de souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm ont été mis en culture pendant 4 jours avec du LPS, ou du LPS et de l'IL-4. La différenciation plasmablastique a été analysée par cytométrie en flux, par la visualisation des cellules B220^{low} CD138⁺ (n=3) (A). Un exemple représentatif de chaque groupe est représenté en (B). L'expression (ARNm) des gènes maîtres de la différenciation plasmocytaire (gènes répresseurs (C) et gènes inducteurs (D)) a été quantifiée par qRT-PCR en temps réel sur des LB stimulés pendant 4 jours au LPS (n=3). L'expression de chaque gène a été normalisée par rapport à son expression moyenne au sein des LB contrôles. *Hprt1* a été utilisé comme gène de ménage.

Le pourcentage de plasmablastes obtenus avec l'une ou l'autre stimulation est identique entre les souris Trib1-KI-Bimm et contrôles (environ 15% induits par le LPS et 4 à 5% par LPS/IL-4) (Figure 87A/B). Afin d'approfondir cette étude, nous avons évalué l'expression des transcrits des gènes maîtres de la différenciation plasmocytaire, à savoir les gènes: *Pax5*, *Bach2*, *Bcl-6* et *Aicda* qui doivent être réprimés et les gènes : *Blimp1*, *Xbp1* et *Irf4* qui doivent être induits (cf partie A2.4.2 de l'introduction). Cette analyse de qRT-PCR en temps réel a été réalisée sur l'ARN des LB totaux stimulés par le LPS pendant 4 jours. Le niveau d'expression de ces 7 gènes est équivalent entre les LB Trib1-KI-Bimm et les LB Trib1-KI (Figure 87C/D). Cependant, cette analyse correspond aux LB stimulés totaux alors que seulement 20% d'entre eux présentent le profil de plasmablastes. Ainsi, il serait intéressant de réaliser cette même étude en ayant procédé, avant l'extraction d'ARN, à un tri par cytométrie en flux des cellules B différenciées en plasmablastes. De plus, afin d'obtenir un pourcentage plus élevé de PB après stimulation LPS/IL-4, nous pourrions utiliser des concentrations plus importantes de ces deux stimuli qui, d'après les études de Heise et Park, induisent entre 10 et 15% de PB (Park et al., 2009, Heise et al., 2014).

En conclusion, nos résultats démontrent que la surexpression de *Trib1* dans les LB n'inhibe pas la différenciation plasmocytaire mais ne permet de conclure définitivement quant à des modifications potentielles dans le programme transcriptionnel de la différenciation PC.

F6.5 LA SUREXPRESSION DE *TRIB1* ENTRAINE-T-ELLE UN DÉFAUT DE COMMUTATION DE CLASSE ?

La commutation de classe est un processus au cours duquel le locus C μ (IgM) est remplacé par un autre locus permettant l'expression d'une Ig d'un autre isotype (IgG, IgE, IgA). Ce processus a lieu lors de l'activation du LB au sein des follicules et majoritairement dans les GC (voir **partie A2.3.2**). Comme énoncé précédemment, des conditions de stimulation *in vitro* particulières permettent d'orienter la commutation de classe vers l'une ou l'autre classe/sous-classe d'Ig. Un défaut de commutation de classe conduirait à une diminution de la production de ces sous-classes.

Nous avons donc évalué la fonctionnalité de la commutation de classe des LB par plusieurs méthodes. Tout d'abord, après 72h de stimulation de splénocytes provenant de souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm, avec du LPS ou une combinaison LPS/IL-4, nous avons évalué le pourcentage de cellules B exprimant l'Ig commutée à leur surface (IgG1 après LPS/IL-4, IgG3 après LPS ; IgG2b n'a pas été analysé). Les pourcentages de cellules IgG1⁺ et IgG3⁺ sont identiques entre les deux lignées murines transgéniques (**Figure 88A**). Puis nous avons analysé la MIF des marquages avec les anticorps anti-IgG1 et anti-IgG3. La MIF relevée pour chacun des anticorps utilisés est semblable entre les souris Trib1-KI-Bimm et contrôles (**Figure 88B**). Cette même expérience a été menée sur un temps d'incubation des cellules de 4 jours, qui mène à la commutation de classe d'un pourcentage plus important de cellules (environ 10% de cellules IgG1⁺ et 5% de cellules IgG3⁺). Nous n'observons pas de différences entre les deux types de souris à J4 (données non montrées).

En conclusion, la diminution des Ig retrouvée dans le surnageant de culture des cellules B surexprimant *Trib1* n'est pas due à un défaut de commutation de classe. Néanmoins, nous pourrions mettre au point des conditions de stimulation induisant une commutation de classe plus importante à J3.

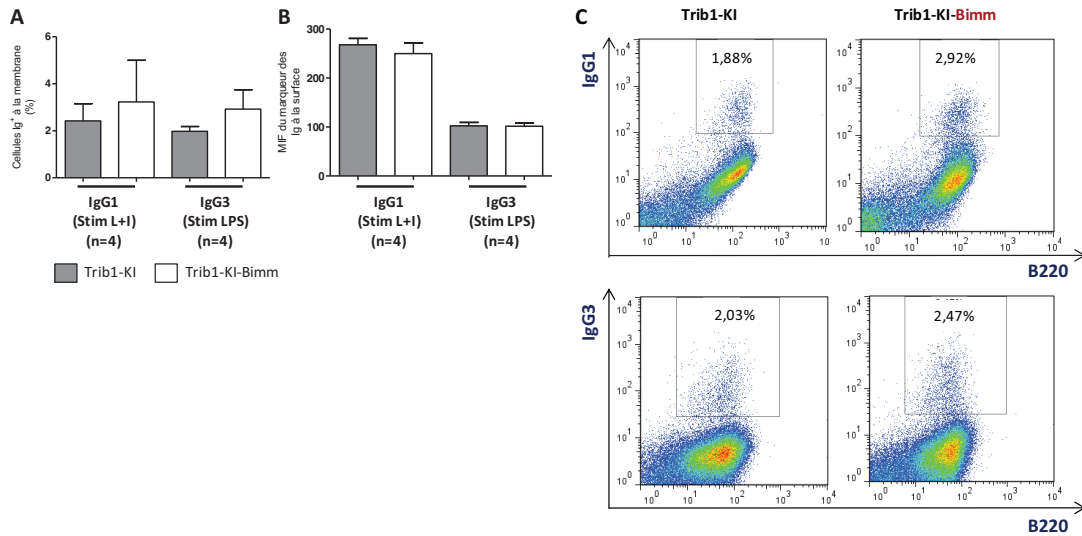


Figure 88 : Etude de la commutation de classe vers IgG1 et IgG3.

Après 72h de stimulation de splénocytes totaux provenant de souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm avec du LPS ou LPS/IL-4, la commutation de classe vers IgG1 et IgG3 a été évaluée par cytométrie en flux en visualisant les IgG1 et IgG3 à la membrane des cellules (A), la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) du marquage avec les anticorps anti-IgG1 et anti-IgG3 (B). Un exemple de marquage représentatif du groupe est illustré en (C).

F6.6 LA SUREXPRESSION DE *TRIB1* INDUIT-ELLE UN DÉFAUT DE SÉCRÉTION DES IMMUNOGLOBULINES ?

Un défaut dans le processus sécrétoire pourrait se traduire, entre autre, par une accumulation des Ig en intracytoplasmique. Afin d'étudier cette hypothèse, nous avons quantifié le nombre de cellules exprimant des IgG intracytoplasmiques par cytométrie en flux. Nous avons choisi d'utiliser la stimulation LPS/IL-4 et la visualisation des IgG1 intracytoplasmiques.

Après 72h de culture avec une stimulation LPS/IL-4, les LB sont récupérés puis analysés par un marquage anti-IgG1 en intracytoplasmique. Afin d'éviter le marquage des IgG1 situées à la membrane des cellules, une étape de saturation a été réalisée grâce à un anticorps de chèvre anti-IgG de souris, non couplé à un fluorochrome (Figure 89A).

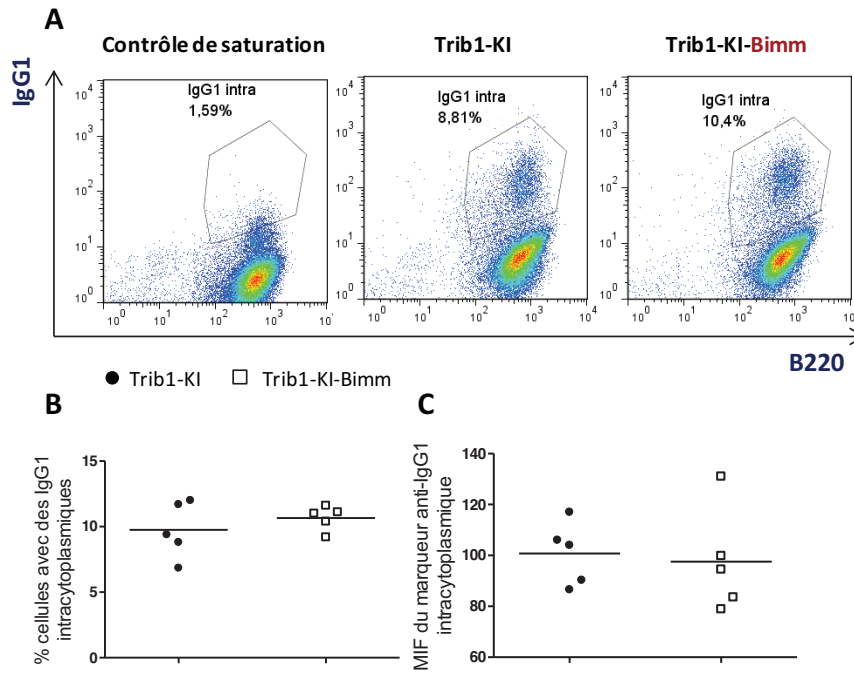


Figure 89 : Analyse des IgG1 intracytoplasmiques par cytométrie en flux.

Après 72h de stimulation de LB triés (CD43) provenant de souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm avec LPS/IL-4, le marquage des IgG1 intracytoplasmiques a été effectué par cytométrie en flux (A). Le pourcentage de cellules exprimant des IgG1 cytoplasmiques (B) et la MIF (GeomMean) de l'anticorps anti-IgG1 (C) ont été analysés. (Contrôle de saturation : marquage des IgG1 membranaires après saturation de la membrane avec un anticorps anti-IgG).

La **figure 89B** présente la moyenne du pourcentage de cellules positives pour le marquage IgG1 intracytoplasmique. Le pourcentage de cellules B exprimant des IgG1 dans leur cytoplasme n'est pas différent entre les deux lignées murines. La MIF du marquage avec l'anticorps anti-IgG1 est également équivalente entre les deux groupes de souris (**Figure 89C**).

Lors de la stimulation LPS/IL-4, la surexpression de *Trib1* n'entraîne d'accumulation des IgG1 dans le cytoplasme, dans les conditions expérimentales que nous avons testées.

F6.7. ÉTUDE DE L'ACTIVATION DES VOIES DE SIGNALISATION DES LYMPHOCYTES B

Parallèlement à l'étude des mécanismes relatifs à la production et la sécrétion des Ig, nous avons voulu évaluer si la surexpression de *Trib1* altérait les voies de signalisation importantes à l'activation de la cellule B, de manière plus globale. Pour ce faire, nous avons trié des LB matures (CD43) de souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm âgées de 3 mois, et les avons stimulé sur des temps très courts avec 2 stimuli différents. Nous avons sélectionné la stimulation par un anticorps anti-IgM, qui

permet l'activation de la voie du BCR, essentielle à l'activation du LB et responsable de l'activation de nombreuses voies de signalisation (par exemple : MAPK, PI3K, NF- κ B. voir **Figure 11 partie A, p.31**) et la stimulation **LPS/IL-4**, par laquelle nous observons une diminution de la production des IgG1. Suite à ces stimulations nous avons choisi d'évaluer la phosphorylation de certaines protéines effectrices terminales de ces voies : la kinase Erk (voie des MAPK), et la protéine I κ B (responsable du contrôle de l'expression du facteur NF- κ B). Il est à rappeler que la famille des Tribbles a été étroitement associée à la régulation de la voie des MAPK (*Kiss-Toth et al., 2004, Sung et al., 2007*) et que la protéine Trib1 semble être liée à l'activation de la sous-unité relA du facteur NF- κ B (*Ostertag et al., 2010*) (voir **partie C2.2.2.2**). Les temps optimaux de stimulation ont été mis au point au laboratoire en se basant sur une étude de *Zhu et al.* qui a consisté à tester différents stimuli et évaluer l'activation des voies des LB (*Zhu et al., 2004*).

Les résultats obtenus après stimulation avec l'anticorps anti-IgM montrent tout d'abord une légère diminution du ratio phospho-Erk/Erk total pour l'ensemble des temps de stimulation des LB Trib1-KI-Bimm (**Figure 90A**). Cette diminution est d'ailleurs statistiquement significative au temps 2 minutes. La **figure 90B** présente un ratio phospho-I κ B/I κ B total comparable entre les deux types de souris pour tous les temps de stimulation avec l'anticorps anti-IgM. En **figure 90C**, le ratio phospho-Erk/Erk total obtenu après une stimulation avec LPS/IL-4 est équivalent entre les deux lignées. Néanmoins, il tend à être diminué dans la lignée Trib1-KI-Bimm à 45 minutes de stimulation.

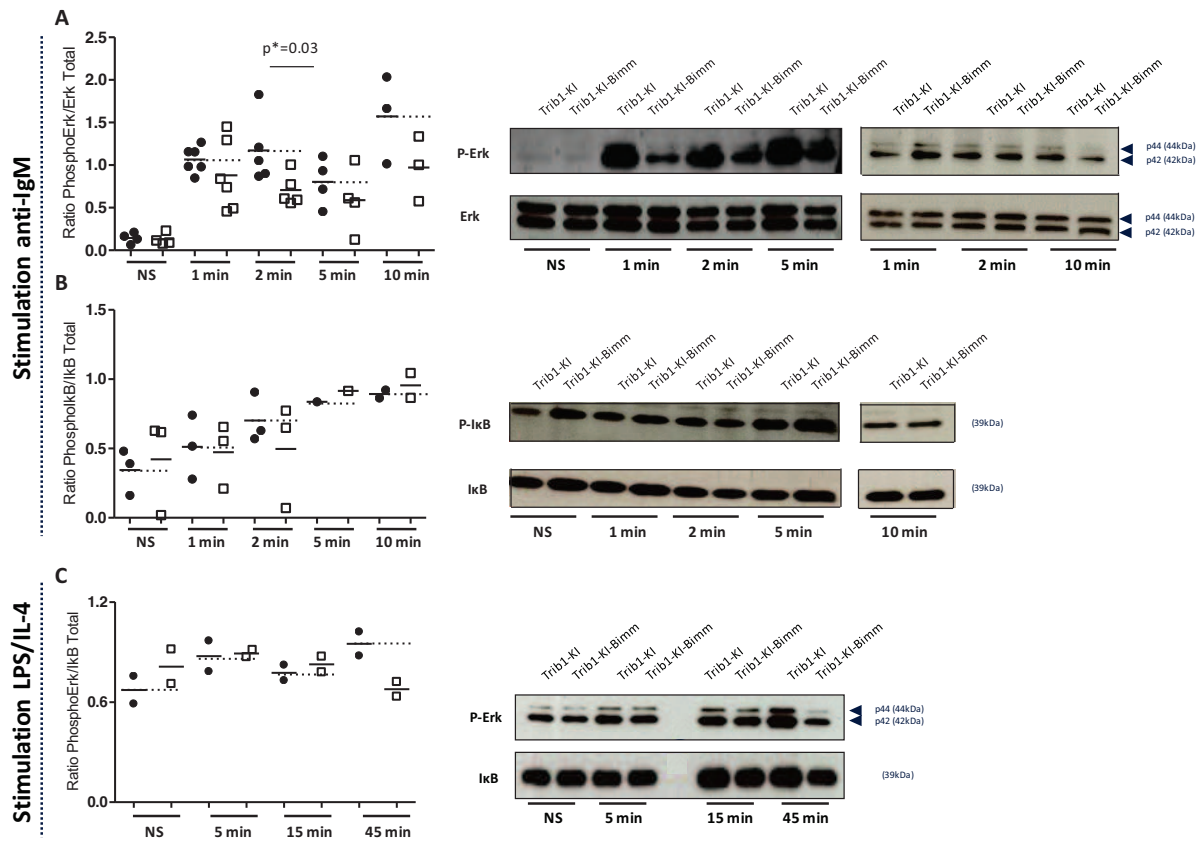


Figure 90 : Etude de l'activation des voies Erk et NF-κB après une stimulation avec un anticorps anti-IgM ou une combinaison LPS/IL-4.

Des LB matures triés (CD43⁺) de souris Trib1-KI et Trib1-KI-Bimm ont été stimulés avec un anticorps anti-IgM (A et B) ou du LPS/IL-4 (C) pendant les temps indiqués (min). Les lysats cellulaires ont été analysés par Western-Blot en utilisant des anticorps anti-Phospho-Erk (P-Erk), -phospho-IκB (P-IκB), -Erk total ou -IκB total, ces deux derniers servant de contrôle de charge. La quantification des résultats est présentée à gauche et des exemples de résultats obtenus sont présentés à droite. *Le ratio correspond au rapport de la valeur de densité de la bande de la protéine phosphorylée sur la valeur de densité de la bande de la protéine totale du même échantillon. Les densités sont mesurées par le logiciel ImageJ. (*: Test Mann&Whitney).*

La différence des temps, au cours desquels une diminution de la phosphorylation de Erk est observable, entre les deux types de stimuli (anti-IgM : 2 minutes, versus LPS/IL-4 : 45 minutes) peut s'expliquer par le fait que des voies différentes peuvent mener à la phosphorylation de Erk avec des cinétiques différentes. Toutefois, ces résultats restent préliminaires et doivent être confirmés par un plus grand nombre d'expériences. De plus, il est envisagé d'élargir les voies de signalisation et ainsi d'évaluer la phosphorylation d'autres protéines effectrices, comme par exemple JNK se trouvant en aval de MKK4, décrit dans la littérature comme un partenaire de Trib1.

Ainsi, ces résultats suggèrent un potentiel rôle de régulateur négatif de la voie Erk à la protéine Trib1, mais ces résultats doivent être approfondis et à confirmés.

F7. À LA RECHERCHE DES PARTENAIRES DE TRIB1 DANS LES LYMPHOCYTES B

Plusieurs fonctions de Trib1 ont été décrites dans différents types cellulaires (ex : hépatocytes, cellules musculaires lisses, fibroblastes,..) (cf **partie C2** concernant Trib1, **p135**). La plupart de ces études suggèrent d'ailleurs de façon commune que les fonctions de Trib1, et de la famille Tribbles en général, sont dépendantes du type cellulaire. Or, aucune étude n'a encore été publiée sur le rôle que Trib1 pouvait avoir dans l'activation, la fonction ou la différenciation des LB. La surexpression de cette protéine dans les LB de souris induit un phénotype de type immunosuppresseur traduit par la diminution de la production de certaines Ig. Nous avons donc souhaité identifier les partenaires de Trib1 au sein de ce type cellulaire particulier afin de comprendre le mécanisme responsable de ce phénotype. Ce travail a été effectué en collaboration avec l'équipe du Dr Bernardo Reina San Martin (IGBMC).

F7.1 PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Afin d'identifier les partenaires protéiques de Trib1, nous avons procédé à une analyse par spectrométrie de masse. Pour réaliser ces analyses, nous avons induit la surexpression de notre protéine, flanquée d'une étiquette HA-Flag, dans une lignée cellulaire immortalisée. Cette méthode permet de récupérer de grandes quantités de matériel protéique. Puis la protéine Trib1-HA-Flag, ainsi que ses interactants potentiels, sont isolés du reste des protéines par technique de coimmunoprécipitation (coIP). L'ensemble peut ensuite être analysé par spectrométrie de masse afin d'établir une liste de protéines partenaires potentielles.

F7.2 CHOIX DU MODÈLE

Dans le but de reproduire au mieux les conditions dans lesquelles la surexpression de *Trib1* induit une diminution de la production des Ig par les LB des souris Trib1-KI-**Bimm**, nous avons choisi une lignée cellulaire B murine immortalisée et capable de sécréter des Ig après activation *in vitro*. La **lignée CH12F3** est une lignée lymphocytaire B murine, capable de sécréter des IgA après une stimulation de 72 heures avec du TGF- β , un anticorps anti-CD40 murin et de l'IL-4 (*Nakamura et al.*, 1996). Nous avons donc choisi cette lignée cellulaire et avons généré deux lignées CH12F3 surexprimant *Trib1* par technique de transduction lentivirale.

En effet, afin de permettre les coIP, nous avons tout d'abord ajouté par PCR une étiquette HA-Flag à la protéine Trib1 soit en C-terminal, soit en N-terminal. Les deux constructions ont été réalisées dans l'éventualité où l'une des deux puisse couvrir un site d'interaction. Les séquences Trib1-HA-Flag (Cter) et Flag-HA-Trib1 (Nter) ont été clonées dans le vecteur pMX-Pie puis celui-ci a été transduit dans les CH12F3, générant ainsi les lignées appelées **Trib1-Cter** et **Trib1-Nter**. Une lignée cellulaire contrôle, nommée « **CH12F3-Vide** », a aussi été générée. Elle a été transduite avec le vecteur pMX-Pie vide. Ce vecteur contrôle présente l'avantage de contenir : 1) une séquence de

résistance à la puromycine, qui permet de sélectionner les cellules transduites en rajoutant cet antibiotique dans le milieu de culture, 2) la séquence de la GFP qui sert de rapporteur (Barreto *et al.*, 2003).

F7.3 VALIDATION DES MODÈLES CELLULAIRES

Dans un premier temps, la validation de la transduction des trois lignées cellulaires a été effectuée. Ainsi, l'expression de *Trib1* a été mesurée par qRT-PCR en temps réel et l'expression de la GFP, servant de rapporteur, a été évaluée par cytométrie en flux. Dans un deuxième temps, le phénotype des lignées transduites a été étudié afin de savoir si la surexpression de *Trib1* dans ce modèle cellulaire est aussi capable d'induire un phénotype de type immunosuppresseur sur la sécrétion d'anticorps.

F7.3.1 QUANTIFICATION DE L'ARNM DE *TRIB1* PAR QRT-PCR EN TEMPS RÉEL ET VISUALISATION DE LA GFP PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX

La quantification de l'ARNm de *Trib1* a été faite par qRT-PCR en temps réel sur les cellules **Trib1-Cter**, **Trib1-Nter**, **CH12F3-Vide** ainsi que sur des cellules **CH12F3 non transduites**. Nous remarquons que l'expression de *Trib1* est identique entre les cellules non transduites et les cellules CH12F3-Vide (**Figure 91A**). En revanche, une très nette surexpression de *Trib1* est quantifiée dans les lignées cellulaires Trib1-Cter (environ 120x) et -Nter (environ 90x).

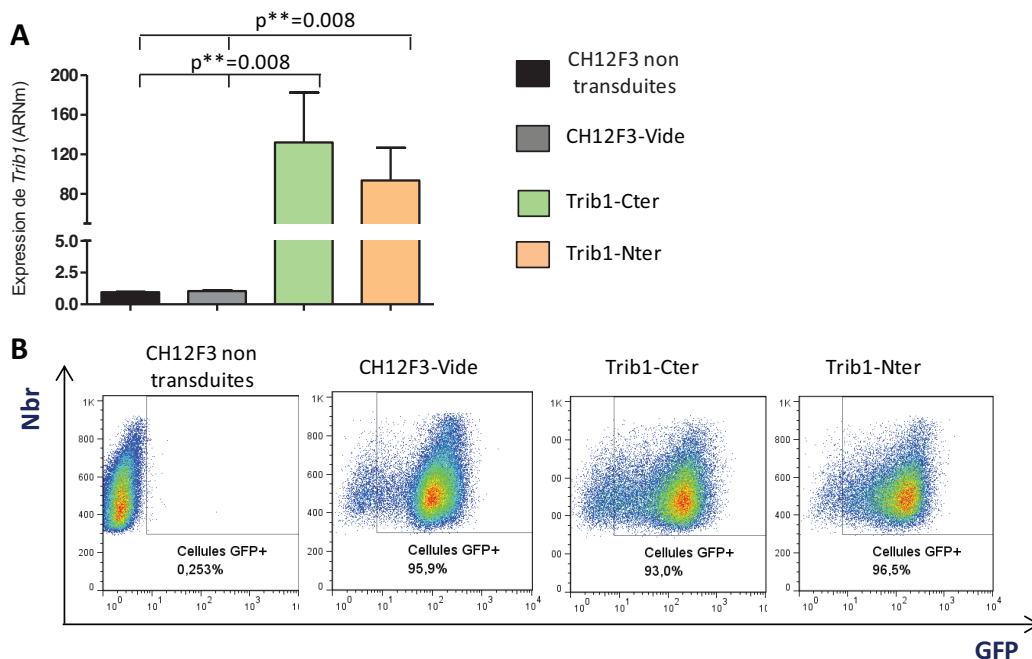


Figure 91 : Vérification de la transduction des lignées cellulaires CH12F3-Vide, CH12F3-Cter et CH12F3-Nter.

La quantification de l'ARNm de *Trib1* a été réalisée par qRT-PCR (**A**) (n=4). Les valeurs ont été normalisées par rapport à l'expression endogène de *Trib1* dans les CH12F3 non transduites. *Hprt1* a été utilisé comme gène de ménage. L'expression de la GFP est visualisée par cytométrie en flux (**B**). (*: Test Mann&Whitney).

Les 4 types cellulaires ont ensuite été analysés par cytométrie en flux afin d'évaluer le pourcentage de cellules transduites (pourcentage de cellules GFP⁺). Comparé aux cellules non-transduites, les 3 lignées transduites (-Vide, -Cter, -Nter) présentent plus de 93% de cellules GFP⁺ (Figure 91B).

En conclusion, les lignées CH12F3-Vide, Trib1-Cter et Trib1-Nter ont été transduites avec une bonne efficacité (>93% de cellules GFP⁺) et les deux lignées Trib1-Cter et Trib1-Nter surexpriment fortement *Trib1* comparé aux cellules CH12F3-Vide.

F7.3.2 ÉTUDE DU PHÉNOTYPE DES CELLULES TRIB1-CTER ET TRIB1-NTER

Nous avons étudié le phénotype des cellules Trib1-Cter et Trib1-Nter surexprimant *Trib1* après une stimulation de 72 heures combinant du TGF- β , un anticorps anti-CD40 et de l'IL-4. Ces cellules ont été comparées à la lignée CH12F3-Vide. Nous avons analysé : 1) la commutation de classe des cellules vers IgA par cytométrie en flux ; 2) la production d'IgA dans le surnageant de culture par ELISA.

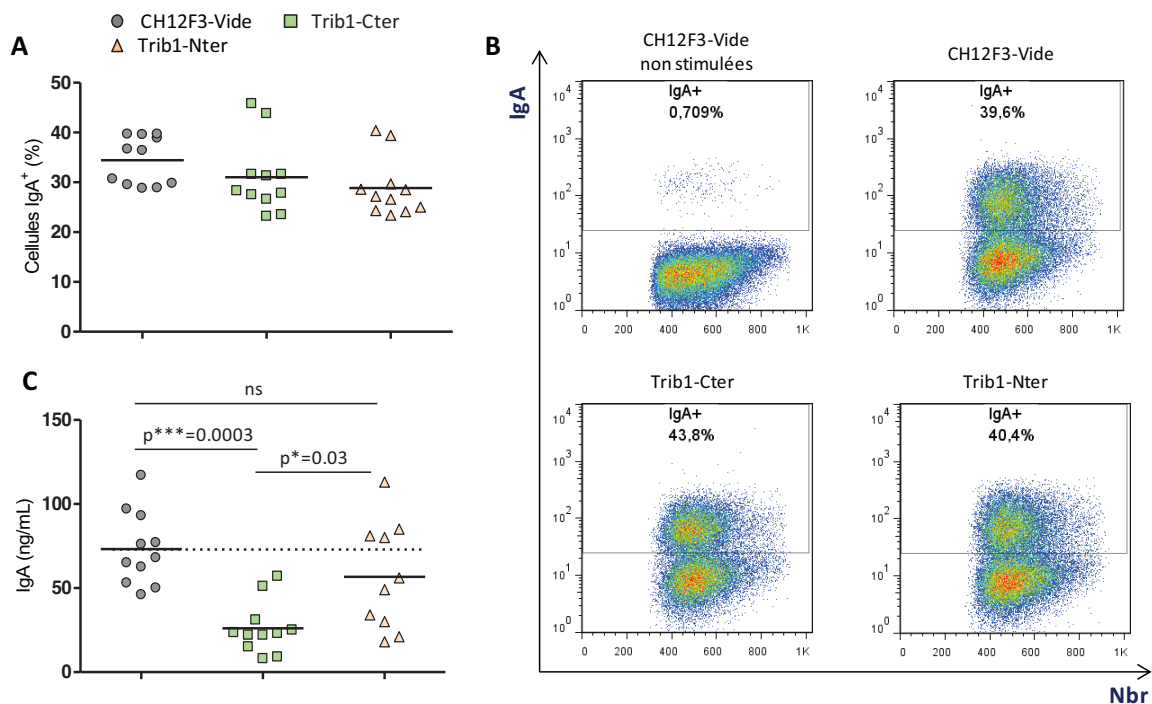


Figure 92 : Analyse de la commutation de classe et de la production d'IgA des CH12F3 après stimulation *in vitro*.

Les différentes lignées CH12F3 ont été stimulées pendant 72 heures avec du TGF- β , un anticorps anti-CD40 et de l'IL-4. La commutation de classe a été analysée par cytométrie en flux grâce à un anticorps anti-IgA. La moyenne des valeurs est présentée en (A) et un exemple pour chaque lignée est présenté en (B). Le dosage des IgA a été fait dans le surnageant de culture par ELISA (n=10, lors de 5 expériences indépendantes). Les conditions non stimulées présentent <1% de cellules IgA⁺ et une concentration <6ng/mL d'IgA dans le surnageant de culture (non présentées). (*: Test Mann&Whitney).

Le pourcentage de cellules ayant commuté de classe vers IgA s'élève entre 30 et 40%, et ce, pour les 3 lignées cellulaires CH12F3 transduites (**Figure 92A/B**). Par contre, le dosage des IgA dans le surnageant de culture révèle une nette diminution de la quantité d'IgA dans le surnageant de culture des cellules Trib1-Cter comparé aux cellules Trib1-Nter et CH12F3-Vide (**Figure 92C**).

Ces résultats montrent que la surexpression de *Trib1* dans la lignée CH12F3 n'altère pas le processus de commutation de classe d'une part, ce qui confirme les résultats obtenus dans le modèle murin *Trib1*-KI-Bimm, mais induit, dans la lignée Trib1-Cter spécifiquement, une diminution de la production des IgA après stimulation. Nous pouvons imaginer que l'étiquette en N-Terminal peut inhiber une interaction importante pour l'induction du phénotype. Cependant, pour s'affranchir du fait que la diminution des IgA observée pour le modèle Trib1-Cter n'est pas due à un mécanisme déclenché par la présence de l'étiquette en C-terminal, nous avons généré une nouvelle lignée CH12F3, qui surexprime *Trib1* mais sans ajout d'étiquettes. Cette lignée a été nommée « CH12F3-Trib1 »

F7.3.3 ÉTUDE DU PHÉNOTYPE DES CELLULES CH12F3-TRIB1

Tout d'abord, la surexpression de *Trib1* dans cette lignée a été analysée par qRT-PCR en temps réel. La figure présente une surexpression de *Trib1* d'environ 16x comparé à la lignée contrôle CH12F3-Vide (**Figure 93A**). Cette valeur valide la surexpression du gène bien qu'elle soit inférieure à celle retrouvée pour les lignées Trib1-Cter et Trib1-Nter (120x et 90x). De plus, environ 94% des cellules sont correctement transduites et expriment la GFP (**Figure 93B**).

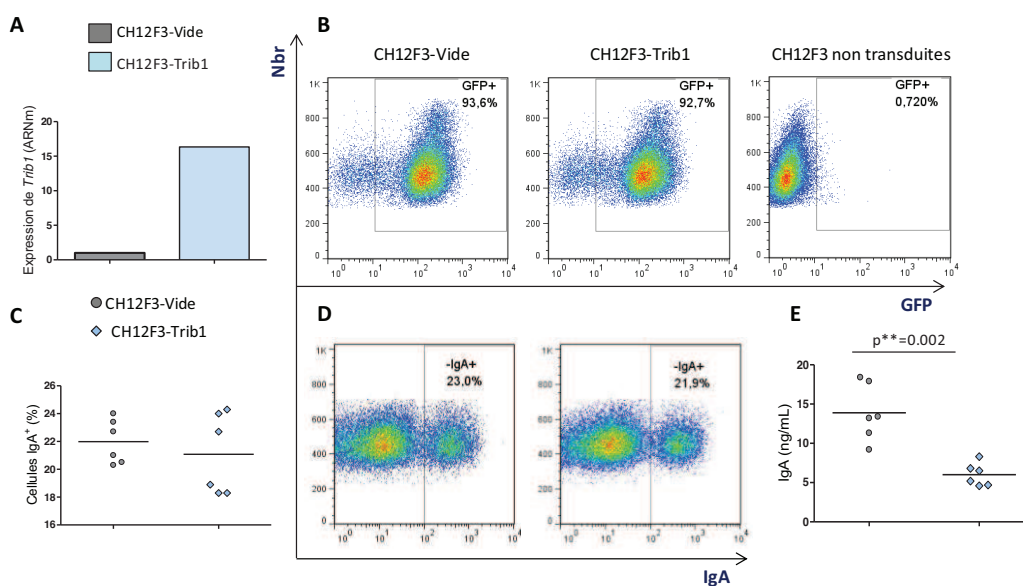


Figure 93 : Vérification de la transduction et phénotypage de la lignée CH12F3-Trib1.

La quantification de l'ARNm de *Trib1* a été réalisée par qRT-PCR en temps réel (**A**) (n=1). Les valeurs ont été normalisées par rapport à l'expression de *Trib1* dans la lignée CH12F3-Vide. *Hprt1* a été utilisé comme gène de

ménage. L'expression de la GFP est visualisée par cytométrie en flux (B). Après 72 heures de stimulation *in vitro*, les pourcentages de cellules IgA⁺ ont été analysés par cytométrie en flux dans les lignées CH12F3-Vide et CH12F3-Trib1 (C) (n=6, lors de 3 expériences indépendantes). Un exemple de marquage est présenté en (D) pour chacune des lignées. Le dosage des IgA dans le surnageant de culture a été effectué par ELISA (E). Les conditions non stimulées présentent un pourcentage de cellules IgA⁺ après stimulation <1% et une concentration <3ng/mL d'IgA dans le surnageant de culture (non montrées). (*: *Test Mann&Whitney*).

Nous avons ensuite étudié le phénotype des cellules CH12F3-Trib1 après activation. Le but était de s'assurer que la diminution des IgA retrouvée dans le surnageant de culture des cellules Trib1-Cter est uniquement due à la surexpression de *Trib1*, et non à la présence de l'étiquette HA-Flag.

Après 72 heures de stimulation avec la combinaison TGF-β, anticorps anti-CD40 et IL-4, le pourcentage de cellules CH12F3-Vide et CH12F3-Trib1 IgA⁺ ont été analysées par cytométrie en flux. Les pourcentages de cellules IgA⁺, présentés en **figure 93C et D**, sont équivalents entre les deux lignées (environ 20 à 25%). On peut cependant noter que ce pourcentage est inférieur aux 35% de cellules IgA⁺ retrouvées lors des expériences faites sur les lignées Trib1-Cter et Trib1-Nter. Ceci peut être dû à une dégradation partielle du TGF-β que nous avons utilisé, celui-ci étant très instable (même lorsqu'il est conservé à -80°C). Enfin, le dosage des IgA sécrétées dans le surnageant de culture, présenté en **figure 93E**, confirme la diminution de la production des IgA pour la lignée surexprimant *Trib1*.

En conclusion, la surexpression de *Trib1* sans étiquette, induite dans la lignée CH12F3-Trib1, est suffisante à induire une diminution de la production des IgA. Ainsi, ces résultats confirment que la surexpression de *Trib1* dans le modèle cellulaire CH12F3 est responsable d'une diminution de la production des IgA dans le surnageant de culture.

F7.3.4 CONCLUSION

L'induction de la surexpression de *Trib1* dans la lignée cellulaire CH12F3 a permis de confirmer, dans un nouveau modèle, le phénotype observé dans les LB murins. La surexpression de *Trib1* induit une diminution de la production des IgA sans altérer le processus de commutation de classe dans les lignées Trib1-Cter et CH12F3-Trib1. Ce modèle est donc optimal pour rechercher les partenaires de notre protéine d'intérêt. Ainsi, la lignée Trib1-Cter surexprimant la protéine Trib1-HA-Flag a été utilisée pour les expériences de colP et d'analyse par spectrométrie de masse.

F7.4 IDENTIFICATION DES PARTENAIRES DE TRIB1 DANS LA LIGNÉE TRIB1-CTER

F6.4.1 CHOIX DU MODÈLE CELLULAIRE CONTRÔLE

Les colP, réalisées dans le but de précipiter la protéine Trib1 et ses partenaires, sont réalisées grâce à des anticorps immunoprécipitants dirigés contre l'une et l'autre des étiquettes (anticorps

anti-Flag et anti-HA). Cette technique présente plusieurs intérêt : 1) la reconnaissance des étiquettes et non de la protéine par les anticorps permet de ne pas bloquer un site d'interaction potentiel ; 2) pour l'analyse par spectrométrie de masse, il est essentiel de pouvoir « décrocher » les anticorps ayant servi à la colP pour éviter leur détection, car ils pourraient « cacher » d'autres protéines et empêcher leur identification, et l'ajout de peptides Flag et HA permet, par compétition, de détacher les anticorps de la protéine-HA-Flag ; 3) cette double étiquette permet de réaliser 2 étapes successives de colP donc permet d'affiner la sélection.

Nous avons choisi comme contrôle pour ces expériences de colP, une lignée cellulaire exprimant une protéine étiquetée par HA-Flag mais supposée incapable d'interagir avec les protéines cellulaires. Pour répondre à ces critères, nous avons choisi la lignée cellulaire CH12F3 GFP-HA-Flag. Cette lignée a été transduite avec le vecteur pMX-Pie permettant l'expression de la séquence codante de la GFP fusionnée aux deux étiquettes HA et Flag.

F7.4.2 ÉTAPE DE COIMMUNOPRÉCIPITATION

Les colP sont réalisées à partir d'extrait protéique cytoplasmique des lignées cellulaires Trib1-Cter et GFP-HA-Flag. Deux extractions ont été réalisées. La première (extraction **1**) a été réalisée à partir d'une quantité de 1,5L de culture (ce qui équivaut à environ 1,5 milliards de cellules) de chacune des lignées et la seconde (extraction **2**) à partir 6L de culture (ce qui équivaut à environ 6 milliards de cellules) (**Figure 94**). La première colP, nommée **A**, a été réalisée à partir de 20mg de l'extraction protéique 1, et les colP **B** et **C** à partir de 30mg de l'extraction 2, grâce à l'anticorps immunoprécipitant anti-Flag. En effet, l'anticorps anti-HA n'a finalement pas été utilisé puisque le marquage anti-HA par Western-Blot ne permettait pas la détection de la protéine Trib1. Ceci a été conclu après une expérience de mise au point, effectuée sur 1mg d'extrait cytoplasmique. Plusieurs hypothèses peuvent être émises : soit la séquence HA a pu subir des modifications et n'est ainsi plus reconnue par l'anticorps, ce qui ne semble pas être le cas puisque le séquençage de la protéine Trib1-HA-Flag n'a montré aucune mutation au sein de cette séquence, soit la position de cette étiquette (entre la protéine d'intérêt et l'étiquette Flag) ne permet pas l'accès à l'anticorps. Des tests supplémentaires seraient nécessaires pour y répondre.

Les éluats liquides obtenus après colP (volume de 80µL) ont été traités de deux façons différentes (**Figure 94**). La première a consisté à directement analyser 40µL de l'éluat final par spectrométrie de masse. La deuxième a consisté à déposer 20µL de l'éluat liquide sur un gel de polyacrylamide dans le but de pouvoir sélectionner, après migration et après coloration des protéines au nitrate d'argent, les bandes à analyser (**Figure 95**). Un nombre total de 3 expériences

indépendantes de coIP ont été réalisées (expériences A, B et C). Les 3 expériences ont été analysées par spectrométrie de masse sur l'éluat total (nommées analyses n°1, 2 et 3), et 2 des expériences ont également été analysées après découpage des bandes du gel de polyacrylamide (nommées analyses n°4 et 5) (**Figure 94**).

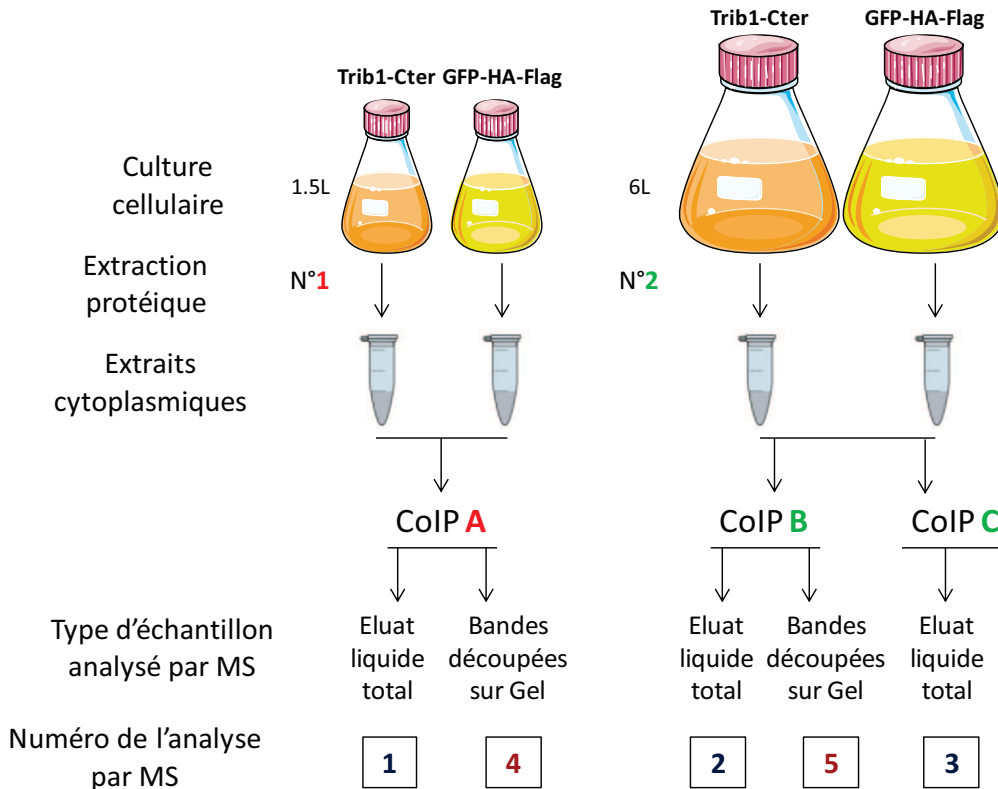


Figure 94 : Schéma récapitulatif des 3 expériences de coIP effectuées.

MS : Spectrométrie de Masse

F7.4.3 ÉTAPE DE SÉLECTION DES BANDES RÉVÉLÉES À LA COLORATION AU NITRATE D'ARGENT

Le marquage au nitrate d'argent permet une détection très sensible des protéines. Cette méthode par découpage permet notamment d'éviter la détection de protéines issues d'interactions non spécifiques, qui sont à priori présentes en trop faibles quantités dans l'éluat, donc non marquées par le nitrate d'argent, donc non prélevées pour l'analyse par spectrométrie de masse. Le schéma de découpage des 2 gels utilisés pour les analyses n°4 et 5 sont présentés en **figure 95**.

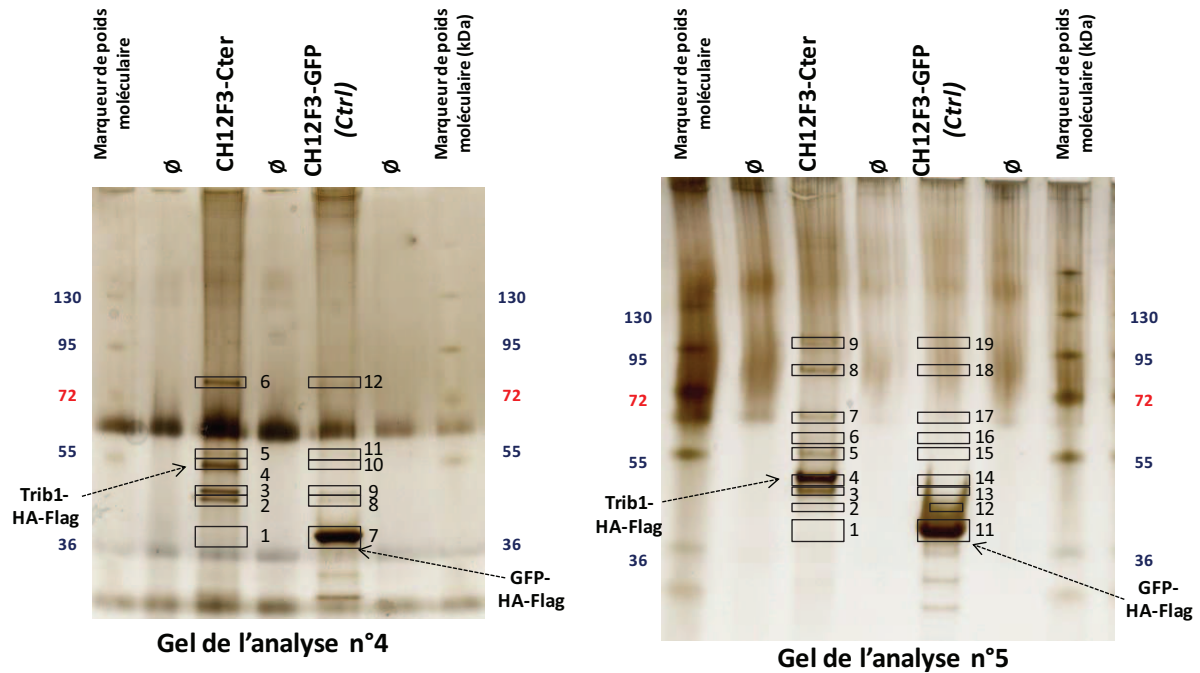


Figure 95 : Plan de découpage des gels utilisés pour les analyses n°4 et n°5.

Après coloration au nitrate d'argent, les bandes apparaissant sur les gels ont été découpées au scalpel suivant le schéma indiqué. La localisation des protéines Trib1-HA-Flag et GFP-HA-Flag est indiquée (d'après les résultats obtenus de l'analyse par MS).

Le gel de l'analyse n°4 (Figure 95, gauche) fait apparaître 5 bandes très nettes dans le puits Trib1-Cter (bandes n°2 à 6), qui n'apparaissent pas dans le puits contrôle GFP-HA-Flag. Nous avons donc procédé au découpage de ces 5 bandes avec un scalpel. Pour contrôle, nous avons également découpé un morceau de gel aux tailles correspondantes dans le puits GFP-HA-Flag (bandes n°8 à 12). Comme second contrôle, nous avons découpé la bande n°7 correspondant à la protéine GFP-HA-Flag dans le puits GFP-HA-Flag, ainsi que le morceau de gel à la taille correspondante dans le puits Trib1-Cter (bande n°1). Ce gel possède une bande aspécifique à environ 65kDa, présente dans tous les puits, incluant les puits vides. Cette bande peut être le reflet d'une contamination du bleu de dépôt par exemple. Cette bande ne sera pas découpée et donc pas analysée. Néanmoins, étant donné son intensité, il se peut qu'elle puisse masquer d'autres bandes situées à la même hauteur.

Le gel de l'analyse n°5 (Figure 95, droite) fait, quant à lui, apparaître un nombre de 8 bandes (bande n°2 à 9) dans le puits Trib1-Cter qui sont absentes dans le puits contrôle. Ces bandes ont ainsi été découpées ainsi que les morceaux de gel aux tailles correspondantes dans le puits GFP-HA-Flag (bandes n°12 à 19). De la même façon que pour le gel précédent, la bande de la GFP (n°11), ainsi que

le morceau de gel à la taille correspondante dans le puits Trib1-Cter (n°1), ont été ajoutées à l'analyse.

La disposition et le nombre de bandes apparaissant dans le puits Trib1-Cter sont différents pour les 2 gels. Plusieurs explications peuvent être énoncées : 1) la quantité d'extrait protéique cytoplasmique à partir de laquelle a été fait la colP est plus importante pour le deuxième gel que pour le premier (30mg>20mg), ce qui peut augmenter la qualité de la colP et ainsi le nombre de protéines récupérées ; 2) les programmes de migration des gels utilisés étaient différents, ce qui peut moduler la disposition des bandes. Néanmoins, l'analyse par spectrométrie de masse permettra de comparer les protéines retrouvées dans l'un et l'autre gel.

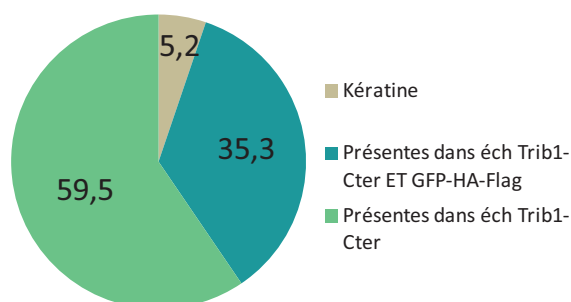
F7.4.4 RÉSULTATS DES ANALYSE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE

Les analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées par le service de protéomique à l'IGBMC avec un spectromètre de masse composé d'un Ultimate 3000 nano-RSLC et d'un Orbitrap ELITE. Les résultats de chaque analyse ont été compilés dans un tableur informatique (Excel) où les protéines identifiées ont été triées suivant leur score obtenu (du plus fort au plus faible) pour l'échantillon Trib1-Cter.

Afin de compiler les résultats des 5 analyses (n°1-3 : sur éluat liquide total ; n°4-5 : sur bandes de gel découpées), les 5 tableaux de résultats de chacune des analyses ont été rassemblés.

Le rassemblement de chacun des tableaux permet la comptabilisation de **368 protéines** différentes retrouvées au cours d'une ou plusieurs des 5 analyses effectuées sur les échantillons provenant des cellules Trib1-Cter. Parmi ces 368 protéines, **5,2%** (=19 protéines) correspondent à la famille de la kératine (**Figure 96**). La kératine est une protéine contaminante, souvent retrouvée dans les analyses de spectrométrie de masse, provenant de la peau ou des cheveux des manipulateurs. Puis **35,3%** de la totalité des protéines (=130 protéines) sont à la fois retrouvées dans les échantillons provenant des cellules Trib1-Cter **et** GFP-HA-Flag. Ces protéines, retrouvées dans l'échantillon contrôle, ne sont pas considérées comme spécifiques de la lignée Trib1-Cter et sont donc à éliminer lors de l'analyse. Enfin, **59,5%** des protéines (=219 protéines) sont exclusivement retrouvées dans les échantillons provenant de la lignée cellulaire surexprimant *Trib1*.

Figure 96 : Répartition (en %) des 368 protéines totales retrouvées au cours des 5 analyses par spectrométrie de masse.



Nous avons ainsi procédé à un classement des 219 protéines retrouvées pour la lignée Trib1-Cter, en fonction du nombre d'analyses où elles sont retrouvées puis en fonction du score de chacune. Nous avons considéré comme potentielles candidates, les protéines retrouvées dans au moins 3 des 5 analyses. Ces protéines, au nombre de 50 (correspondant à 13,6% des 368 protéines totales et 22,8% des 219 protéines spécifiques des cellules Trib1-Cter) sont classées dans le **tableau 14**.

Protéine	Dénomination complète de la protéine	Fonction	Nbr d'analyses sur éluats totaux dans lequel la protéine est présente (/3)	Nbr d'analyses sur bandes de gel dans lequel la protéine est présente (/3)	Nbr d'analyses totales dans lequel la protéine est présente	S
			3	2	5	
RN219	RING Finger protein 219	Protéine à doigts de zinc	3	2	5	122
COP1	E3 Ubiquitin-protein ligase COP1	Ubiquitine ligase	3	2	5	112
CAPZB	F-actin-capping protein subunit beta	Relatif à l'actine	3	2	5	49
Stk40	Serine/threonine-protein kinase 40	Kinase à sérine/thréonine, régulateur négatif de la voie NF-κB et de la transcription de gènes induits par p53	3	2	5	45
			3	1	4	
ADDG	Gamma-adducin	Relatif au cytosquelette d'actine	3	1	4	51
St38L	Serine/threonine-protein kinase 38-like	Kinase – impliquée dans la régulation de la transduction du signal	3	1	4	45
HS90B	Heat shock protein HSP 90-beta	Protéine chaperonne	3	1	4	37
CAZA1	F-actin-capping protein subunit alpha-1	Relatif à l'actine	3	1	4	37
HS90A	Heat shock protein HSP 90-alpha	Protéine chaperonne	3	1	4	29
Epb41	Isoform 2 of Protein 4.1	Associée à la stabilité du cytosquelette	3	1	4	21
MARCS	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	Substrat de la protéine kinase C	3	1	4	19
LMNA	Isoform C of Prelamin-A/C	Associée à la membrane nucléaire	2	2	4	19

Étude des conséquences de la surexpression de *Trib1* dans les LB

Protéine	Dénomination complète de la protéine	Fonction	Nbr d'analyses sur éluats totaux dans lequel la protéine est présente (/3)	Nbr d'analyses sur bandes de gel dans lequel la protéine est présente (/3)	Nbr d'analyses totales dans lequel la protéine est présente	S
			3	-	3	
LAP2	Isoform 2 of Protein LAP2	Adaptateur du récepteur HER2 – inhibe la signalisation de NF-κB dépendante de NOD2 et la sécrétion de cytokine pro-inflammatoire	3	-	3	71
MYO1E	Unconventional myosin-Ie	Relatif à la myosine	3	-	3	67
MYO5A	Unconventional myosin-Va	Relatif à la myosine	3	-	3	64
DHX57	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57	Catalyse l'ouverture de l'ARN	3	-	3	56
TFR1	Transferrin receptor protein 1	Associée au transport cellulaire du fer	3	-	3	46
Eif4b	Eukaryotic translation initiation factor 4B	Requis pour la liaison de l'ARNm au ribosome	3	-	3	39
CAZA2	F-actin-capping protein subunit alpha-2	Relatif à l'actine	3	-	3	35
SMD2	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	Composant du spliceosome	3	-	3	29
LRRF	Leucine-rich repeat flightless-interacting protein	Répresseur transcriptionnel	3	-	3	29
E41L2	Band 4.1-like protein	Relatif au cytosquelette (organisation, régulation)	3	-	3	28
ML12B	Myosin regulatory light chain 12B	Relatif à la myosine	3	-	3	27
PPM1B	Isoform Beta-2 of Protein phosphatase 1B	Associée à la déphosphorylation et l'inactivation de IKKB de la voie NF-κB	3	-	3	23
CALM	Calmoduline	Associée à la voie calcique	3	-	3	21
MYL6	Myosin light polypeptide 6	Relatif à la myosine	3	-	3	21
SKT	Sickle tail protein	Requis pour le développement des disques intervertébraux	3	-	3	20
FLII	Protein flightless-1 homolog	Impliquée dans la signalisation induite par les oestrogènes	3	-	3	18
AKAP8	A-kinase anchor protein 8	Médiation de la compartimentation cellulaire de la PKA de type II	3	-	3	17
DOCK2	Dedicator of cytokinesis protein 2	Impliquée dans le réarrangement du cytosquelette requis pour la migration des lymphocytes	3	-	3	16
MALT1	Isoform 2 of Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1	Activité ubiquitine-ligase – induit l'activation de la voie NF-κB induite par BCL-10	3	-	3	16
PP6R3	Isoform 2 of Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory subunit	Sous-unité régulatrice de la phosphatase 6 (peut avoir un rôle dans la tolérance immunitaire)	3	-	3	14
CDC37	Hsp90 co-chaperone Cdc37	Protéine chaperone	3	-	3	14
MYOC	Isoform 2 of Unconventional myosin-Ic	Relatif à la myosine	3	-	3	13
RS18	40S ribosomal protein S18	Protéine ribosomale	3	-	3	13
DNJB6	DnaJ homolog subfamily B member 6	Associé à l'organisation des filaments de kératine	3	-	3	13
MYCBP	C-Myc-binding protein	Contrôle l'activité transcriptionnelle de MYC	3	-	3	12
JAK3	Tyrosine-protein kinase JAK3	Kinase impliquée dans les voies des cytokines, la différenciation, le développement et la prolifération	3	-	3	10
ARPSL	<i>Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein</i>	Relatif à l'actine	3	-	3	9
RS19	<i>40S ribosomal protein S19</i>	Protéine ribosomale	3	-	3	7

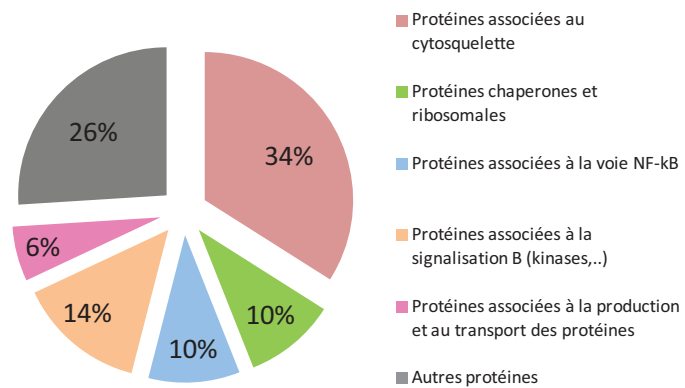
Protéine	Dénomination complète de la protéine	Fonction	Nbr d'analyses sur éluats totaux dans lequel la protéine est présente (/3)	Nbr d'analyses sur bandes de gel dans lequel la protéine est présente (/3)	Nbr d'analyses totales dans lequel la protéine est présente	S
			2	1	3	
ADDA	Isoform 2 of Alpha-adducin	Relatif au cytosquelette d'actine	2	1	3	48
TBA1C	Tubulin alpha-1C chain	Relatif à la tubuline	2	1	3	44
ADDA	Alpha-adducin	Relatif au cytosquelette d'actine	2	1	3	36
EPN4	Clathrin interactor 1	Associée au transport des vésicules à clathrines entre le trans-Golgi et les endosomes	2	1	3	30
CD72	B-cell differentiation antigen CD72	Protéine membranaire impliquée dans la régulation négative des lymphocytes B	2	1	3	16
RS6	40S ribosomal protein S6	Protéine ribosomale	2	1	3	15
SPRE1	Sprouty-related, EVH1 domain-containing protein 1	Régulateur de la voie des MAPK	2	1	3	15
STX7	Syntaxin-7	Impliquée dans le trafic des protéines entre les endosomes précoces et la membrane plasmique	2	1	3	13
BLMH	Bleomycin hydrolase	Cystéine peptidase	2	1	3	9
TR19L	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 19L	Induit l'activation de la voie NF-κB	2	1	3	8
			1	2	3	
ANXA1	Annexin A1	Annexine	1	2	3	11

Tableau 14 : Présentation des 50 protéines spécifiquement retrouvées dans les échantillons Trib1-Cter dans au moins 3 des 5 analyses effectuées par MS.

Les protéines ont été classées en fonction du nombre d'analyses dans lesquelles elles ont été retrouvées (le haut du tableau correspond aux protéines retrouvées dans chacune des 5 analyses) puis en fonction de leur score (S) exprimé dans la dernière colonne du tableau. La couleur de l'écriture de chacune des protéines correspond à la couleur de l'un des 6 groupes « fonctionnels » établis en Figure 96 (*Rouge : relatif au cytosquelette, Vert : Protéine chaperonne ou ribosomale, Orange : impliquée dans la transduction du signal, Bleu : associé à la voie NF-κB, Rose : relatif à la production et au transport des protéines, Noir : autres fonctions*).

La figure 97 présente 6 grands groupes, dans lesquels les 50 protéines (=100%) ont été classées. Le **groupe 1** (=34%) correspond à des protéines associées au cytosquelette cellulaire (ex : actine, myosine, tubuline,..), le **groupe 2** (=10%) inclut des protéines chaperonnes et ribosomales (HS90A/B, RS6,..), le **groupe 3** (=14%) des protéines impliquées dans la signalisation et la transduction du signal (ST38L, JAK3,..), le **groupe 4** (=10%) regroupe des protéines ayant un lien avec la voie NF-κB (Stk40, LAP2, TR19L,..) (ce groupe 4 a été séparé du groupe 3, compte-tenu du grand nombre de protéines reliées à la voie NF-κB), le **groupe 5** (=6%) est constitué de protéines associées à la production et le transport des protéines (EPN4, STX7,...) et enfin, le groupe 6 (=26%) est composé de toutes les autres protéines, n'entrant dans aucun des premiers groupes. Si on « élimine » les 17 protéines relatives au cytosquelette (bien souvent retrouvées dans les manipulations de colP, mais peu spécifiques de la protéine d'intérêt), il reste une liste de 33 protéines candidates (**Tableau 15**).

Figure 97 : Répartition (en %) des 50 protéines retrouvées dans au moins 3 des 5 analyses de spectrométrie de masse réalisées sur les échantillons Trib1-Cter, et non retrouvées dans les échantillons GFP-HA-Flag.



Ces 34 protéines candidates incluent notamment, en deuxième position, l'ubiquitine ligase **COP1** (Nbr total 5/5), partenaire de Trib1 déjà décrit dans la littérature notamment dans une lignée de cellules épithéliales et de cellules médullaires murines (*Yokoyama and Nakamura, 2011, Yoshida et al., 2013*). De plus, nous notons également des protéines pouvant avoir un rôle dans le phénotype de type immunosuppresseur que nous observons dans les LB surexprimant *Trib1*. En effet, nous pouvons noter la présence de protéines notamment décrites comme des régulateurs négatifs tels que la protéine **Stk40** (Nbr total 5/5), le répresseur transcriptionnel **LRRF** (Nbr total 3/5) ou encore les protéines **CD72** (Nbr total 3/5) (*Tsubata, 2012*) et **SPRED1** (Nbr total 3/5) (*Wakioka et al., 2001*) toutes deux connues pour intervenir dans les voies négatives de l'activation des LB. Enfin, la protéine **JAK3** (Nbr total 3/5), impliquée dans la voie des cytokines (et donc importante dans la voie de l'IL4, stimulus à l'origine, en combinaison avec le LPS, du phénotype de diminution de production d'IgG1 dans le modèle Trib1-KI-Bimm), a été retrouvée dans les 3 éluats totaux. Le haut poids moléculaire de cette protéine (120-130kDa) ne correspond à aucune des bandes découpées. Cela ne signifie donc pas qu'elle n'était pas présente sur le gel, mais probablement en trop faible quantité, ce qui n'a pas suffi à faire apparaître une bande visible après la coloration aux nitrates d'argent.

Afin de valider chacune de ces protéines candidates, des expériences de coIP inverses doivent être menées. Cela consiste tout d'abord à effectuer une coIP sur les mêmes extraits protéiques cytoplasmiques que pour la coIP anti-Flag, mais cette fois en utilisant un anticorps anti-protéine partenaire candidate, puis de mettre en évidence la présence de Trib1-HA-Flag dans l'éluat de la coIP par Western-Blot.

Protéine	Dénomination complète de la protéine	Fonction	Nbr total /5
RN219	RING Finger protein 219	Protéine à doigts de zinc	5
COP1	E3 Ubiquitin-protein ligase COP1	Ubiquitine ligase	5
STK40	Sérine/threonine-protein kinase 40	Kinase à sérine/thréonine, régulateur négatif de la voie NF-κB et de la transcription de gènes induits par p53	5
ST38L	Sérine/threonine-protein kinase 38-like	Kinase – impliquée dans la régulation de la transduction du signal	4
HS90B	Heat shock protein HSP 90-beta	Protéine chaperonne	4
HS90A	Heat shock protein HSP 90-alpha	Protéine chaperonne	4
MARCS	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	Substrat de la protéine kinase C	4
LAP2	Isoform 2 of Protein LAP2	Adapteur du récepteur HER2 – inhibe la signalisation de NF-κB dépendante de NOD2 et la sécrétion de cytokine pro-inflammatoire	3
DHX57	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57	Catalyse l'ouverture de l'ARN	3
TFR1	Transferrin receptor protein 1	Associée au transport cellulaire du fer	3
Eif4b	Eukaryotic translation initiation factor 4B	Requis pour la liaison de l'ARNm au ribosome	3
SMD2	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	Composant du spliceosome	3
LRRF	Leucine-rich repeat flightless-interacting protein	Répresseur transcriptionnel	3
PPM1B	Isoform Beta-2 of Protein phosphatase 1B	Associée à la déphosphorylation et l'inactivation de IKKB de la voie NF-κB	3
CALM	Calmoduline	Associée à la voie calcique	3
SKT	Sickle tail protein	Requis pour le développement des disques intervertébraux	3
FLII	Protein flightless-1 homolog	Impliquée dans la signalisation induite par les oestrogènes	3
AKAP8	A-kinase anchor protein 8	Médiation de la compartimentation cellulaire de la PKA de type II	3
MALT1	Isoform 2 of Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1	Activité ubiquitine-ligase – induit l'activation de la voie NF-κB induite par BCL-10	3
PP6R3	Isoform 2 of Sérine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory subunit	Sous-unité régulatrice de la phosphatase 6 (peut avoir un rôle dans la tolérance immunitaire)	3
CDC37	Hsp90 co-chaperone Cdc37	Protéine chaperone	3
RS18	40S ribosomal protein S18	Protéine ribosomale	3
DNJB6	DnaJ homolog subfamily B member 6	Associée à l'organisation des filaments de kératine	3
MYCBP	C-Myc-binding protein	Contrôle l'activité transcriptionnelle de MYC	3
JAK3	Tyrosine-protein kinase JAK3	Kinase impliquée dans les voies des cytokines, la différenciation, le développement et la prolifération	3
RS19	40S ribosomal protein S19	Protéine ribosomale	3
EPN4	Clathrin interactor 1	Associée au transport des vésicules à clathrines entre le trans-Golgi et les endosomes	3
CD72	B-cell differentiation antigen CD72	Protéine membranaire impliquée dans la régulation négative des lymphocytes B	3
RS6	40S ribosomal protein S6	Protéine ribosomale	3
SPRE1	Sprouty-related, EVH1 domain-containing protein 1	Régulateur de la voie des MAPK	3
STX7	Syntaxin-7	Impliquée dans le trafic des protéines entre les endosomes précoces et la membrane plasmique	3
BLMH	Bleomycin hydrolase	Cystéine peptidase	3
TR19L	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 19L	Induit l'activation de la voie NF-κB	3
ANXA1	Annexin A1	Annexine	3

Tableau 15 : Liste des 34 protéines candidates finales.

Ces protéines sont retrouvées dans au moins 3 des 5 analyses MS réalisées sur les échantillons Trib1-Cter. Elles sont classées en fonction du nombre d'analyses dans lesquelles elles ont été retrouvées (Nbr total /5). En gras figurent les 2 premières protéines candidates choisies pour les expériences de confirmation (colP inverse).

F7.4.5 VALIDATION DE PROTÉINES CANDIDATES

F7.4.5.1 CHOIX DES PROTÉINES CANDIDATES À CONFIRMER

Pour commencer la validation de partenaires potentiels de Trib1, nous avons choisi 2 protéines parmi les 33. La première est l'**ubiquitine ligase COP1**. Cette protéine est retrouvée dans chacune des 5 analyses et présente des scores très élevés. De plus, comme évoqué plus haut, COP1 a été décrit dans la littérature comme interagissant avec Trib1 (*Hegedus et al.*, 2007, *Yokoyama and Nakamura*, 2011, *Yoshida et al.*, 2013). Nous voulons donc confirmer cette interaction dans notre propre modèle.

Puis, également avec un nombre total de 5/5, apparaît la protéine **Stk40**. Cette sérine/thréonine kinase semble être un bon candidat puisque, tout comme Trib1, elle a été décrite comme ayant un rôle dans la régulation des voies NF- κ B (*Huang et al.*, 2003) et des MAPK (*Yu et al.*, 2013). En effet, *Huang et al.* montrent que la surexpression de *Stk40* inhiberait l'activation de NF- κ B suite à une stimulation avec du TNF (*Huang et al.*, 2003). Puis en 2013, *Yu et al.* présentent que la déficience de *Stk40* dans des souris atténue l'activation de la voie MAPK/Erk dans des cellules épithéliales pulmonaires (*Yu et al.*, 2013).

F7.4.5.2 CONFIRMATION DE L'INTERACTION TRIB1/COP1

Des essais de coIP inverse ont été réalisés avec un anticorps immunoprécipitant de lapin anti-COP1 de souris sur 1 mg d'extrait protéique cytoplasmique de cellules Trib1-Cter et GFP-HA-Flag. Néanmoins, les mises au point n'ont pas suffi à précipiter la protéine COP1 jusqu'à présent. Un nouvel anticorps immunoprécipitant anti-COP1 sera prochainement testé.

F7.4.5.3 CONFIRMATION DE L'INTERACTION TRIB1/STK40

Des premiers tests de coIP inverse ont été faits avec un anticorps immunoprécipitant de lapin anti-Stk40 de souris à partir d'1 mg d'extrait protéique cytoplasmique de cellules Trib1-Cter. Deux conditions d'immunoprécipitation ont été testées, l'une avec 5 μ g d'anticorps et l'autre avec 10 μ g. L'immunoprécipitation de Stk40 réalisée avec 10 μ g d'anticorps immunoprécipitant a été validée par Western-Blot (**Figure 98A, puits n°8**). Puis l'utilisation d'un anticorps anti-Flag a permis de mettre en évidence la présence de Trib1-HA-Flag dans le produit de coIP anti-Stk40 avec la condition 10 μ g (**Figure 98B, puits n°8**). Trib1-HA-Flag n'est pas retrouvé dans le puits correspondant à la coIP contrôle réalisée parallèlement avec du sérum de lapin (**Figure 98, puits n°2**).

Ainsi, ces premiers tests de coIP inverse confirment l'interaction Trib1/Stk40. Cependant, afin de complètement valider cette expérience, elle devra être réitérée et réalisée en parallèle sur les deux types cellulaires Trib1-Cter et GFP-HA-Flag.

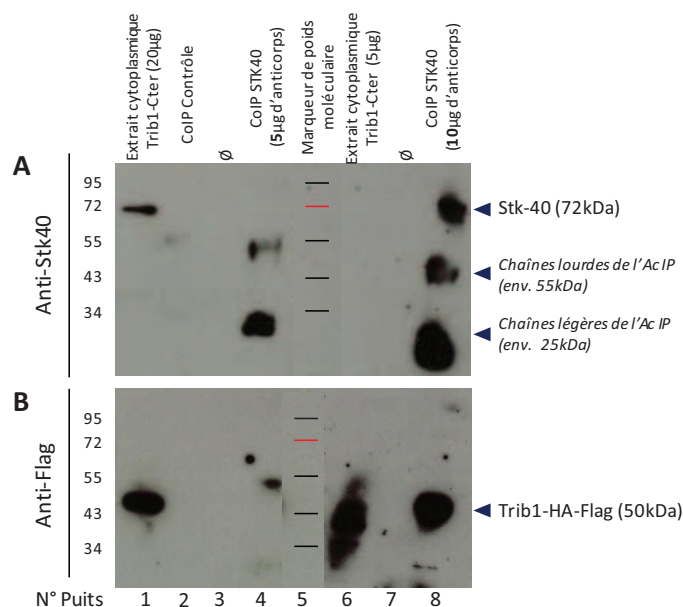


Figure 98 : Vérification par Western-Blot de la présence de Stk40 et Trib1-HA-Flag après coIP anti-STK40.

Deux conditions de coIP avec un anticorps de lapin anti-STK40 de souris (5µg (puits n°4) ou 10µg (puits n°8)) ont été réalisées sur 1mg d'extrait cytoplasmique de cellules Trib1-Cter. Le produit des coIP a été déposé sur gel de polyacrylamide puis marqué successivement avec un anticorps anti-STK40 (**A**) et un anticorps anti-Flag (**B**). Une coIP contrôle a été réalisée avec du sérum de lapin (puits n°2). \emptyset : puits vide. Pour une meilleure lisibilité de la figure, le puits du marqueur de poids moléculaire initialement dans le puits « 0 » de la partie B, a été ajouté au niveau du puits n°5, initialement vide.

F7.4.6 CONCLUSION

Les 3 expériences de coIP ont permis d'identifier une trentaine de partenaires candidats pour la protéine Trib1 murine. Certaines de ces protéines présentent des fonctions qui pourraient potentiellement être associées au phénotype de type immunosuppresseur observé dans les LB surexprimant *Trib1*. Néanmoins des expériences de confirmation de ces interactions doivent être effectuées. L'expérience de coIP inverse réalisée sur Stk40 semble être concluante quant à l'interaction Stk40/Trib1 mais nécessite des contrôles supplémentaires.

F7.5 ÉTUDES COMPLÉMENTAIRES RÉALISÉES À LA PLATEFORME DE PROTÉOMIQUE DE L'IBMC

Des expériences de coIP et de spectrométrie de masse ont également été réalisées par le service de protéomique de notre institut (IBMC) à partir d'extraits protéiques totaux de cellules Trib1-Cter et GFP-HA-Flag. Deux expériences de coIP ont été faites : la première avec un anticorps immunoprécipitant anti-HA, sur 3 échantillons Trib1-Cter et 3 échantillons GFP-HA-Flag et la seconde avec un anticorps anti-Flag, également sur 3 échantillons de chaque lignée. Ces expériences ont été totalement effectuées par le service de protéomique et les conditions d'extraction,

d'immunoprécipitation ainsi que les types d'anticorps utilisés, ne sont pas identiques à ce qui a été décrit précédemment. De plus, la vérification de la détection de la protéine Trib1-HA-Flag précédant les coIP, par l'utilisation d'anticorps anti-Flag et anti-HA en Western-Blot n'a pas été réalisée au cours de ces expériences.

Les résultats obtenus pour ces deux expériences ont été comparés aux résultats obtenus suite aux analyses faites au service de protéomique de l'IGBMC. Trois protéines ont été retrouvées dans les 5 analyses faites à l'IGBMC et dans les 2 faites à l'IBMC. Il s'agit des protéines **COP1**, **EPN4** et **AKAP8**. Trois autres protéines, retrouvées dans au moins 3 des analyses faites à l'IGBMC sont retrouvées dans au moins une des deux analyses faites à l'IBMC. Il s'agit de **ST38L**, **DHX57** et **LAP2** (Figure 99).

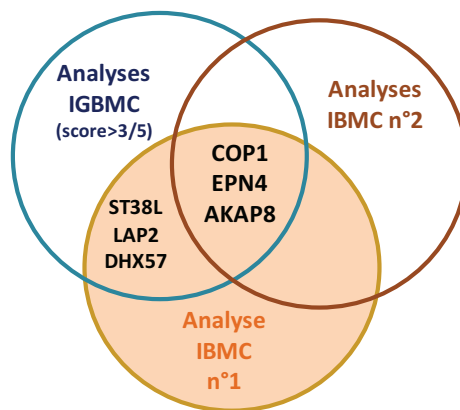


Figure 99 : 6 protéines sont retrouvées communes entre les analyses faites à l'IGBMC et à l'IBMC.

Parmi les protéines spécifiques de Trib1-Cter retrouvées dans au moins 3 des 5 analyses faites à l'IGBMC (>3/5), 3 protéines (COP1, EPN4, AKAP8) sont retrouvées dans les 2 analyses faites par l'IBMC et 3 autres (ST38L, LAP2 et DHX57) dans seulement une des deux.

Ces 6 protéines, dont COP1 déjà présenté précédemment, présentent chacune un type de fonction différent :

- **EPN4**, aussi appelé Clint1 (pour Clathrin interacting protein localized in the trans-Golgi region), jouerait un rôle dans le **transport**, notamment des enzymes lysosomales lors du processus d'endocytose via les vésicules à clathrines entre le trans-Golgi et les endosomes. Cette protéine participerait aussi à l'assemblage des vésicules à clathrines (Kalthoff et al., 2002).
- **AKAP8** (A-Kinase Anchor Protein 8) est principalement située dans la matrice nucléaire. Cette protéine interviendrait dans les **changements structuraux de la chromatine** et son

activation serait modulée via sa phosphorylation par les kinases à tyrosine telles que Src ou Fyn (Kubota *et al.*, 2015).

- **ST38L**, aussi connu sous le nom de NDR2, fait partie de la famille des **kinases NDR** (Nuclear Dbf2-related). Ces protéines ont été identifiées comme jouant notamment un rôle dans les phases précoces de l'organogénèse (Schmitz-Rohmer *et al.*, 2015) mais aussi dans la différenciation neuronale chez la souris (Rehberg *et al.*, 2014). Dans les neurones, ST38L participerait à la modulation de l'expression de l'intégrine $\beta 1$ à la surface cellulaire en modulant la phosphorylation de son domaine cytoplasmique.
- Très peu de données sont répertoriées pour la protéine **DHX57** qui a une fonction d'hélicase à ATP catalysant l'ouverture de l'ARN.
- Enfin, la protéine **LAP2**, aussi appelée Erbin (ErbB2-interacting protein) serait un **adaptateur du récepteur HER2**, et serait également capable d'interagir avec le senseur Nod2. La surexpression de LAP2 conduirait à une inhibition de l'activation de la voie NF- κ B associée à une diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (McDonald *et al.*, 2005).

Ainsi, ces 6 protéines, présentes dans les analyses effectuées de façon indépendantes au service de protéomique de l'IGBMC et de l'IBMC représentent des partenaires potentiels de Trib1 de forte confiance. Des recherches bibliographiques les concernant seront approfondies et les expériences de colP inverses seront entreprises pour celles présentant un intérêt fonctionnel important.



DISCUSSION ET PERSPECTIVES



CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

G.1 RETOUR SUR LE PROJET DE THÈSE

Les MAI représentent la 3^{ème} cause de morbidité dans les pays occidentaux. Le **lupus érythémateux disséminé** est l'une des MAI les plus sévères caractérisée par la production d'autoanticorps pathogéniques et une atteinte systémique. Les causes de la maladie englobent des facteurs à la fois **génétiques et environnementaux** mais qui ne sont, à ce jour, pas encore tous identifiés. Les analyses d'association génétique et de GWAS ont permis l'identification d'une **quarantaine de loci de susceptibilité** au développement de la maladie (*Relle et al., 2015*), ce qui est probablement très en dessous du nombre total de gènes potentiellement impliqués dans le lupus. Les analyses déjà entreprises sont basées, pour la plupart, sur la **recherche de polymorphismes d'ADN** associés au lupus, et mettent ainsi en évidence des modifications de séquences. Ces modifications de séquences peuvent être liées indirectement ou directement à des **modifications d'expression de gènes** particuliers au cours du lupus, et peuvent aussi être la conséquence de variations épigénétiques. Ces modifications d'expression de gènes sont importantes à étudier en complément des études GWAS pour pouvoir mieux comprendre la pathologie et l'étiologie génétique du lupus. Durant les dernières années, se sont notamment développées des **analyses transcriptomiques et épigénétiques sur cellules triées** (PBMC, LT CD4⁺,...). Cette technique présente l'avantage de pouvoir mettre en évidence le rôle et les anomalies de chaque acteur cellulaire dans la pathogénèse lupique. Les **LB jouent un rôle central** dans la maladie puisqu'ils sont notamment responsables de la production d'autoanticorps. Cependant, avant le développement de l'analyse transcriptomique préliminaire à mon travail de thèse, une seule étude visant à identifier des anomalies intrinsèques des LB au cours du lupus avait été effectuée (*Trevisan et al., 2006*). Cette étude de 2006, visant à détecter des anomalies d'expression de gènes dans les LB CD19⁺ de patients lupiques, a été réalisée sur un petit groupe de patients très hétérogène composé de 5 patients traités (dont 3 femmes et 2 hommes), 2 patients non traités (1 femme et 1 homme) et 6 sujets sains (3 femmes et 3 hommes). De plus, un nombre limité de séquences d'ADNc a été utilisé pour réaliser cette étude (n=960) et les auteurs se sont uniquement concentrés sur des gènes situés dans des loci chromosomiques déjà connus comme étant associés au LES ou à d'autres MAI. Cette étude présente donc un certain nombre de limites. **Ainsi, le laboratoire dans lequel j'ai effectué ma thèse, intéressé par le rôle de la population lymphocytaire B au cours du lupus, a choisi d'effectuer une analyse de**

type transcriptomique dans le but d'identifier des anomalies géniques intrinsèques présentes dans ces cellules chez les patients lupiques.

G.2 ÉTUDE TRANSCRIPTOMIQUE DE LB DE PATIENTS

Le laboratoire a entrepris une **étude transcriptomique** réalisée sur des **LB triés de patients lupiques en phase quiescente**, visant à identifier des anomalies d'expression dans les gènes des LB. Le choix de la phase quiescente était important car cette phase pourrait comporter des caractéristiques se rapprochant de celles de la période précédant la maladie : elle permet d'approcher les anomalies intrinsèques aux LB d'une part, et d'éviter la détection de dérégulations de l'expression de gènes dues à l'activité de la maladie, d'autre part. Cette étude a permis de mettre en lumière la **surexpression des gènes FKBP11 et TRIB1** qui présentent une surexpression de 4 à 9x et de 2 à 8x dans les LB de patients comparé aux LB de sujets sains, respectivement (Garaud et al., 2011).

G.3 ÉTUDE DES CONSÉQUENCES DE LA SUREXPRESSION DE FKBP11

Le projet portant sur l'étude des conséquences de la surexpression de Fkbp11, principalement mené par Julie Ruer-Laventie au cours de sa thèse, représente le deuxième projet sur lequel j'ai travaillé pendant ma thèse. J'ai participé à la réalisation du projet jusqu'à sa publication, en juin 2015 (Ruer-Laventie, 2015).

Le développement d'un modèle transgénique surexprimant *Fkbp11* (nommé *Fkbp11*^{high}) a permis de montrer que cette anomalie d'expression permet d'induire, chez la souris âgée de 8 mois, un phénotype incluant une **hyperplasie des organes lymphoïdes**, une **augmentation de la production basale d'IgG3** ainsi qu'une **réponse humorale amplifiée** face à un antigène de type T-dépendant, *in vivo*. Ce phénotype n'est néanmoins pas corrélé à un caractère hyperactivé des LB à l'état basal ou après stimulation *in vitro*. De plus, la surexpression de *Fkbp11* est capable d'induire chez les animaux une **rupture de tolérance** traduite par la production d'autoanticorps IgG dirigés contre l'ADNdb. Un sous-groupe d'animaux présente également des quantités élevées d'autoanticorps de type IgM incluant les FR ou encore des anticorps anti-actine. La surexpression de *Fkbp11* dans le modèle lupique B6^{lpr/lpr} est par ailleurs capable d'aggraver quelques traits de la pathologie autoimmune. De plus, afin d'étudier le mécanisme de rupture de tolérance en cas de surexpression de *Fkbp11*, le modèle anti-ADN 56R de fond B6 a été utilisé. Ce modèle exprime une chaîne lourde transgénique spécifique de l'ADNsb et db, et est hautement susceptible à une rupture de tolérance. Celle-ci est analysable par la détection des anticorps anti-ADNdb et sb dans le sérum

des animaux. Les souris 56R/*Fkbp11*^{high} présentent une quantité augmentée d'IgM anti-ADNsb (qui correspond à la proportion la plus importante des autoanticorps produits par le modèle 56R). Cependant, ce phénotype n'est pas expliqué par un défaut de tolérance centrale (délétion et édition du récepteur), ni par une anomalie du processus d'anergie. Bien que la surexpression de *Fkbp11* induise une rupture de tolérance B, phénomène important dans le développement du lupus, il est envisageable que la surexpression de *Fkbp11* dans d'autres types cellulaires puisse également avoir un rôle dans le phénotype observé, considérant la surexpression ubiquitaire du gène dans le modèle murin transgénique.

D'autre part, l'expression de **FKBP11 est retrouvée augmentée durant la DP** (Nakayama et al., 2006, Jourdan et al., 2009). Sachant que les PC sont retrouvés augmentés dans la circulation des patients lupiques, l'impact de la surexpression de *Fkbp11* sur la DP a été étudié dans le modèle murin *Fkbp11*^{high}. Les données montrent que la stimulation de LB matures purifiés avec du LPS pendant 4 jours induit une diminution de l'expression des gènes répresseurs de la DP, c'est-à-dire *Pax5*, *Bach2* et *Aicda* (les deux derniers étant eux-mêmes contrôlés par *Pax5*) dans les LB de souris *Fkbp11*^{high}, traduisant une initiation plus importante de la DP. Par contre, cet effet sur la DP reste partiel puisque la surexpression de *Fkbp11* seule ne permet pas une induction plus importante de l'expression des gènes inducteurs de la DP, tels que *Xbp1* et *Blimp1*. Ainsi, la surexpression de *Fkbp11* à un stade précédant le stade PC semble **induire l'initiation de la DP** mais n'est pas suffisante pour une différenciation complète. Chez les patients lupiques quiescents de l'analyse transcriptomique, l'expression de *FKBP11* a été retrouvée corrélée à la quantité de PB (CD19^{low}/CD138⁺CD38⁺) circulants. Ainsi, il est probable que des facteurs additionnels, absents dans notre modèle murin, mais présents chez le patient lupique, et pouvant être liés à d'autres défauts génétiques, soient nécessaires pour une différenciation complète.

De façon intéressante, ces résultats suggèrent que **la protéine FKBP19 agit en amont de PAX5**. L'étude de ses différentes fonctions de PPIase et de protéine chaperonne, fonctions indépendantes l'une de l'autre, pourrait mener à une meilleure compréhension du phénotype observé chez la souris lors de la surexpression de *Fkbp11*.

En conclusion, ces résultats apportent une nouvelle pièce au puzzle complexe que représente la pathologie lupique puisque la surexpression d'un unique gène, *Fkbp11*, dans les LB, est suffisante pour induire certains traits caractéristiques de la maladie lupique. Ainsi, la dissection des voies biologiques induites par la surexpression de la protéine FKBP19 ainsi qu'une analyse de l'expression de *FKBP11* dans une cohorte plus importante de patients lupiques, dans le but d'identifier une potentielle corrélation entre l'expression de *FKBP11* dans les LB et certains traits

cliniques, pourrait mener à l'identification de nouvelles cibles moléculaires, impliquées dans la pathologie lupique.

G.4 ÉTUDE DES CONSÉQUENCES DE LA SUREXPRESSON DE *TRIB1*

Dans le but d'évaluer les conséquences d'une surexpression de *Trib1* sur la fonction des LB et le développement d'une autoimmunité, nous avons produit un modèle murin transgénique conditionnel spécifique des LB, de type Knock-In, appelé Trib1-KI-Bimm.

G4.1 LE MODÈLE TRIB1-KI-BIMM

Le modèle Trib1-KI-Bimm, basé sur le système Cre/Lox, a permis d'induire une surexpression spécifique de *Trib1* dans un compartiment cellulaire spécifique et à partir d'un stade de développement choisi, à savoir **dans les LB à partir d'un stade très immature (stade pré-pro B)**. En effet, l'expression de la recombinaison Cre que nous avons utilisée, est placée sous le contrôle du promoteur du gène *Mb1*, codant pour l'Ig α du complexe du BCR. L'utilisation de la souris appelée Mb1Cre permet une délétion de la cassette STOP quasi-totale (environ 95%) dans la population d'intérêt (ici les LB), ce qui n'est pas forcément le cas de tous les modèles murins transgéniques exprimant la recombinaison Cre sous le contrôle de différents promoteurs (par exemple, la Cre « dLck » dans les LT CD4⁺, cf nos résultats). Ce modèle, basé sur le croisement avec le modèle Mb1Cre, est donc **un très bon modèle pour étudier une anomalie spécifique des LB**. De plus, la surexpression de *Trib1* induite dans les LB de la lignée Trib1-KI-Bimm par le transgène (6x) s'avoisine à la surexpression retrouvée chez les patients (2 à 8 x).

G4.2 LES SOURIS TRIB1-KI-BIMM PRÉSENTENT UN PHÉNOTYPE DE TYPE IMMUNOSUPPRESSEUR

A l'âge de 3 mois, les souris Trib1-KI-Bimm montrent un phénotype comparable à celui des souris contrôles Trib1-KI, en termes de développement lymphocytaire B, de répartition cellulaire ainsi que de cellularité totale dans les différents organes lymphoïdes primaires et secondaires, mais également en termes d'activation basale des LB et de production d'Ig sériques. Toutes ces analyses ont également été effectuées à un âge plus avancé, à 6 mois, et ont permis de **souligner une diminution de la quantité d'IgG1 dans le sérum des souris surexprimant *Trib1* dans les LB**.

Nous avons évalué la capacité des LB à produire des Ig de type IgG (1, 2b et 3), après stimulation *in vitro* de splénocytes totaux. La surexpression de *Trib1* engendre, de manière générale, **une diminution (ou tendance à la diminution) de la production des IgG** pour chacun des stimuli testés, à savoir, la combinaison LPS/IL-4, mimant une réponse T-dépendante, ainsi que le LPS (ligand

du TLR4) et des agonistes des récepteurs TLR1/2, -3, -7 et -9, mimant une réponse T-indépendante. Cette diminution de la quantité d'Ig dans le surnageant de culture est statistiquement significative pour les IgG totales, après stimulation avec la combinaison LPS/IL-4 et les agonistes des récepteurs TLR1/2 et TLR7. La stimulation par LPS/IL-4, combinaison orientant la commutation de classe vers la sous-classe IgG1, majoritairement induite lors d'une réponse T-dépendante, induit une diminution significative de cette sous-classe. Ces résultats renforcent le lien, déjà observé dans notre modèle murin *in vivo*, entre une surexpression de *Trib1* et la diminution spécifique de la sous-classe IgG1. Néanmoins, le lien entre la surexpression de *Trib1* et la diminution des IgG après activation du récepteur TLR1/2 (récepteur aux lipopeptides, localisé à la surface membranaire) et TLR7 (récepteur à l'ARNsb, situé dans les endosomes) n'est pas évident. Ceci ne semble pas dépendre de la voie empruntée en aval puisque bien que ces deux voies soient toutes deux dépendantes de MyD88 et que ce ne soit pas le cas de la voie TLR3, la voie MyD88 est également partagée par la voie du TLR9 et en partie par la voie du TLR4, qui, lorsqu'elles sont stimulées, n'induisent pas de diminution significative de la quantité d'Ig.

L'analyse de la production d'anticorps après immunisation des souris a permis de mettre en évidence **une défaillance dans la production des IgM spécifiques de l'antigène (IgM anti-OVA)** lors d'une immunisation de type T-dépendante (OVA) à un temps assez tardif (>J20) mais qui n'est pas retrouvée lors de l'immunisation T-dépendante avec NP-KLH, ni lors d'une immunisation T-indépendante avec du NP-LPS. L'infection de type chronique par *Bb*, connue pour activer les LB de manière polyclonale via les récepteurs TLR5 et TLR1/2, n'a pas permis de détecter une diminution de production des IgG dans le modèle *Trib1-KI-Bimm*, alors que nous l'avions observée *in vitro* par stimulation des splénocytes totaux avec un agoniste du dimère TLR1/2. La surexpression de *Trib1* dans les LB n'est donc **pas suffisante à inhiber la réponse anticorps face à une bactérie du type de *Bb***, en condition physiologique. Il est également possible que *Bb* induise la production d'anticorps par une activation synergique de plusieurs voies, dont certaines seraient peu dépendantes de la régulation par *Trib1*. En revanche, nous pourrions envisager de tester d'autres types d'infection, comme une infection aiguë (de type virale) ou une infection induisant plus fortement la production d'IgG1, qui correspond à la sous-classe la plus impactée *in vitro* et *in vivo* à l'état basal. Il est par exemple décrit que l'infection de souris par les parasites *Trypanosoma cruzi* (el Bouhdidi et al., 1994) ou *Leishmania major* (Sassi et al., 2015) induit une forte réponse de type IgG1. Enfin, la surexpression de *Trib1*, lors de **l'induction de certains symptômes de la maladie lupique par l'injection de LPS entraîne une diminution de la production d'anticorps IgM anti-ADNdb à J28.**

Ainsi, il semble qu'en contexte *in vitro* la surexpression de *Trib1* puisse induire un défaut de la production d'IgG par les LB spléniques dans certaines conditions de stimulation, alors qu'en

contexte *in vivo*, ce défaut concerne la production des IgM spécifiques. Il est néanmoins admis, que les diminutions d'IgG1 dans le surnageant de culture et d'IgM anti-OVA dans le sérum des souris, font toutes deux suite à une activation de type T-dépendante (ou mimant ce type d'activation). La différence des isotopes dont la concentration diminue dans les deux types d'expériences pourrait être expliquée par l'implication de sous-populations lymphocytaires B différentes. En effet, lors de l'immunisation par l'OVA, étant donné que la diminution des Ig concerne les IgM anti-OVA, nous pouvons suggérer un potentiel défaut des cellules B productrices d'IgM, comme par exemple les PB à courte durée de vie issus de la réponse extrafolliculaire, les LB MZ (sécrétant principalement des IgM et également capables de répondre à un antigène T-dépendant même si ce type de réponse est minoritaire) (Cerutti *et al.*, 2013) ou encore les LB B1, caractérisés par leur production naturelle d'IgM mais qui auraient également des fonctions de cellules présentatrices d'antigène, comme montré dans cette étude de 2012 qui présente la capacité des LB B1 à phagocyter l'OVA et à en présenter un épitope aux LTCD4⁺ (Parra *et al.*, 2012). Ces deux dernières populations cellulaires (LB MZ et B1) ne sont cependant pas impactées en nombre et en proportion par la surexpression de *Trib1*, dans la rate des souris à l'état basal. En revanche, il serait intéressant d'évaluer leur nombre au cours de l'expérience d'immunisation dans la rate, ainsi que dans le péritoine où sont majoritairement localisés les LB B1. Il est à préciser que les LB B1 sont d'ailleurs quasi absents (<2%) lors des expériences *in vitro*, réalisées sur la stimulation de splénocytes totaux. Par ailleurs, dans les expériences *in vitro*, étant donné que la production d'IgG1 est atteinte, on peut supposer que la sous-population B en cause dans la culture au départ soit les LB folliculaires. L'utilisation de marqueurs spécifiques des différentes sous-populations B spléniques nous permettrait définitivement de conclure. La stimulation de LB ganglionnaires, très majoritairement constitués de LB folliculaires, nous permettrait aussi d'apporter des informations supplémentaires.

En conclusion, il demeure difficile de comparer les expériences réalisées *in vitro* et *in vivo*, qui mettent en jeu des paramètres bien différents, comme par exemple le nombre et le type de cellules activées (absence des B1 du péritoine et déstructuration des cellules spléniques lors de l'activation *in vitro*), le type d'antigène (de la molécule synthétisée (ex : Pam3CSK4) aux complexes antigéniques complets (ex : bactéries, complexe haptène-protéine..)), l'association ou non d'un adjuvant (ex : alum), des environnements peu analogues (puits de culture cellulaire ou animal entier) ainsi que des durées d'activation différentes (3 jours versus 7 à 28 jours).

G4.3 COMPRÉHENSION DU PHÉNOTYPE DE TYPE IMMUNOSUPPRESSEUR

Le modèle Trib1-KI-Bmat, surexprimant *Trib1* dans les LB à partir d'un stade mature, a permis de mettre en évidence que la surexpression de *Trib1* est nécessaire dès un stade très immature pour induire le phénotype de type immunosuppresseur. En effet, ce modèle Trib1-KI-Bmat ne présente pas de phénotype particulier à l'état basal ou après activation (*in vitro*, ou après immunisation *in vivo*). Il semblerait que la surexpression de *Trib1* dans les LB au stade immature puisse conférer des propriétés particulières à la future cellule B mature, qui pourrait être, par exemple, la conséquence d'un programme transcriptionnel spécifique mis en place au stade immature et qui resterait « en mémoire » jusqu'au stade de cellule sécrétrice d'anticorps. Ce modèle de phénotype « pré-programmé » est d'ailleurs décrit chez l'Homme, concernant la durée de vie et la capacité sécrétoire des PC, qui dépendraient en partie de la force du signal au moment de l'activation antigénique au stade du LB mature, ainsi que de l'aide apportée par les LT au moment de l'activation B. Par exemple, un LB ayant reçu une aide T lors de son activation induirait un plus fort taux de sécrétion et une durée de vie prolongée une fois différencié en PC, comparé à un LB activé avec un antigène non-protéique et sans aide T. Ajouté à cela, il semblerait que les variations de la réponse anticorps chez l'Homme (durée et efficacité), suite à une infection ou une vaccination, seraient également dépendantes des facteurs génétiques de l'individu (Amanna and Slifka, 2010).

La surexpression de *Trib1* dans les LT matures n'induit pas de phénotype particulier, ni au niveau de la répartition des populations lymphocytaires T, ni au niveau de leur activation. L'étude de Dugast *et al.* (Dugast *et al.*, 2013), propose une éventuelle fonction de *Trib1* dans les LTregs, puisqu'ils retrouvent l'expression de *Trib1* augmentée dans les LTregs murins et humains et la protéine *Trib1* semble interagir avec FoxP3. Nous n'avons pas testé la fonctionnalité des LTregs dans notre modèle Trib1-KI-Tmat, mais leur nombre demeure inchangé. Nous pourrions éventuellement évaluer leur capacité à produire des cytokines anti-inflammatoires (ex : IL-10) après stimulation *in vitro* ou doser les autoanticorps à l'état basal ou après induction d'une autoimmunité dans le sérum des animaux Trib1-KI-Tmat en comparaison des contrôles. De plus, si l'on suit le raisonnement du modèle spécifique des LB, il pourrait être intéressant d'induire la surexpression de *Trib1* dans les LT à un stade immature, par exemple en utilisant la LckCre (Cre sous la dépendance du promoteur proximal de la LckCre) qui permet la délétion de la cassette STOP au stade thymocyte, ou la CD4Cre pour cibler la population CD4⁺ spécifiquement, et ceci dès un stade immature.

Afin de comprendre le phénotype immunosuppresseur que nous décrivons, et d'orienter nos axes de recherche, notre stratégie a tout d'abord consisté à évaluer si le phénotype observé *in vitro* était intrinsèque aux LB ou pouvait être la conséquence d'un effet indirect d'autres cellules que les LB dans le milieu de culture, elles-mêmes activées par les différents stimuli. L'incubation des LB

matures spléniques triés, avec la combinaison LPS/IL-4, a permis de montrer que le phénotype était bien la conséquence de la surexpression spécifique de *Trib1* dans les LB. De plus, ce phénotype n'est dû ni à une mortalité cellulaire accrue, ni à un défaut d'activation ou de prolifération des LB et les processus de commutation de classe et de différenciation plasmablastique sont normaux. Par contre, l'étude réalisée sur la différenciation des LB matures en PB pourrait être complétée par une induction plus complète de la DP, par exemple avec la combinaison IL-21/anti-CD40, qui permet au bout de 7 jours une différenciation plasmocytaire totale (présence de cellules PB (B220^{low}CD138⁺) et PC (B220⁻CD138⁺)). Ce type de culture permet de comparer les différents stades de différenciation (non différencié, PB et PC). De plus, nous avons analysé les gènes maîtres de la différenciation plasmocytaire dans les LB totaux après stimulation *in vitro*. Afin d'évaluer précisément le processus de différenciation, cette expérience d'analyse d'expression des gènes de la DP, devra être répétée après tri des PB différenciés par cytométrie en flux. **En conclusion, il semble que le phénotype observé dans les animaux Trib1-KI-Bimm soit le résultat d'un défaut de sécrétion des Ig par les LB surexprimant Trib1.**

Le processus de sécrétion des Ig étant très peu documenté, nous pourrions entreprendre l'étude d'une des phases précoces du mécanisme sécrétoire en analysant les **transcrits des formes membranaires et sécrétées des IgG1** lors d'une stimulation LPS/IL-4, par qRT-PCR en temps réel, d'une part. Ceci permettrait d'évaluer un éventuel défaut transcriptionnel de la forme sécrétée. D'autre part, la **réponse UPR** est induite dans les cellules sécrétrices telles que les plasmocytes afin de réguler le stress cellulaire entraîné par l'intense activité de production protéique. Un défaut de l'une des voies de l'UPR pourrait notamment conduire à un défaut de sécrétion d'Ig. Ainsi, par qRT-PCR en temps réel, nous aimerions évaluer l'expression des gènes codant pour des protéines clés des voies UPR tels que les gènes codant pour les senseurs ATF6 et IRE-1 α , ainsi qu'Xbp1(s) (forme épissée), essentiel à la fonction sécrétoire des PC. Cette analyse serait réalisée sur des PB triés par cytométrie en flux à partir de splénocytes totaux stimulés avec la combinaison LPS/IL-4. De plus, dans le but d'évaluer la réponse UPR en amont de ces voies, nous pourrions également mesurer l'expression du gène codant pour la protéine BiP, essentielle à la reconnaissance des protéines mal repliées dans le RE.

Pour étudier la sécrétion, nous avons également initié des expériences de microscopie électronique dans le but de visualiser les organelles impliquées dans la sécrétion des Ig (appareil de Golgi et réticulum endoplasmique) et d'évaluer si la surexpression de *Trib1* entraîne une modification de la taille de ces organelles. Cette étude de microscopie est difficile à mettre au point puisque la stimulation LPS/IL-4 permet la différenciation d'un pourcentage très faible de PB (environ 5%) alors que de grandes quantités de cellules d'intérêt (ici les PB) sont nécessaires pour la technique par

microscopie électronique. Parallèlement à cela, la visualisation des IgG1 intracytoplasmiques que nous avons réalisée par cytométrie en flux ne conduit pas à la conclusion d'une potentielle accumulation intracytoplasmique des Ig. Nous compléterons ces résultats par le même type d'expérience avec la différence que le transport des protéines aura été stoppé du RE vers l'appareil de Golgi, et du Cis-Golgi vers le Trans-Golgi, par l'ajout de Brefeldin A et de Monensin A, respectivement, ceci afin de forcer cette accumulation pour qu'une potentielle différence soit plus détectable par cytométrie en flux.

De plus, afin d'évaluer si ce défaut de sécrétion est spécifique des Ig ou commun à d'autres protéines, il serait intéressant de tester la capacité des LB à sécréter d'autres protéines, comme par exemple des cytokines, dans le surnageant de culture lors d'une stimulation *in vitro*.

Enfin, l'étude des voies d'activation Erk et NF- κ B après stimulation des LB sur des temps courts a permis d'identifier une diminution significative de la phosphorylation de Erk après 2 minutes de stimulation avec l'anti-IgM ainsi qu'une légère diminution après 45 minutes de stimulation avec LPS/IL-4. Il n'est pas surprenant de voir une variation dans l'activation de la voie Erk, puisque les protéines Tribbles ont été associées à la régulation des voies des MAPK. Il a été décrit dans la littérature que Trib1 serait capable d'induire la phosphorylation de Erk via son interaction avec MEK1 dans les cellules HeLa (*Kiss-Toth et al., 2004*) et dans les cellules myéloïdes (*Jin et al., 2007, Yokoyama et al., 2010*), mais pas dans les cellules musculaires (*Sung et al., 2006*).

Pour compléter ces résultats, il serait intéressant de valider cette diminution de la phosphorylation par cytométrie en flux ou encore d'évaluer l'expression de cibles de Erk, telles que *Egr1*, par qRT-PCR en temps réel. D'autre part, il serait intéressant d'évaluer d'autres voies d'activation importantes pour la signalisation B telles que les voies JNK ou Akt. Ces deux voies sont d'ailleurs décrites pour être inhibées par Trib1 (diminution de l'expression d'AP-1, situé en aval de JNK dans les cellules HeLa (*Kiss-Toth et al., 2004*) et musculaires (*Sung et al., 2006*)) et par Trib3 (diminution de la phosphorylation d'Akt dans les cellules musculaires squelettiques (*Liu et al., 2010*)), respectivement.

G4.4 À LA RECHERCHE DES PARTENAIRES DE TRIB1

Les protéines de la famille des Tribbles ont été décrites dans la littérature comme des protéines intervenant dans la régulation de la transduction du signal de manière dépendante du type cellulaire. En effet, les Tribbles peuvent aussi bien engendrer une régulation positive que négative suivant le type cellulaire et le contexte biologique, ainsi les partenaires de Trib1 pourraient être différents selon le type cellulaire. Plusieurs partenaires de Trib1 ont préalablement été identifiés : **COP1**, dans les lignées HEK293T et HeLa (cellules épithéliales), dans des macrophages murins, des

hépatocytes murins et des cellules myéloïdes et hématopoïétiques murines ; **MEK1** et **MKK4** dans les lignées HEK293T et HeLa (cellules épithéliales), la lignée NIH3T3 (fibroblastes), une lignée de cellules musculaires lisses et dans des cellules médullaires murines ; et encore **C/EBP β** dans la lignée épithéliale HEK293T. Ainsi, afin de pouvoir comprendre au mieux le phénotype que l'on observe dans les LB surexprimant *Trib1*, il nous a semblé indispensable d'entamer une recherche de partenaires protéiques de Trib1 spécifiquement dans les LB.

L'utilisation de la **lignée cellulaire CH12F3** nous a permis de valider le phénotype de type immunosuppresseur sur la sécrétion d'anticorps induit par la surexpression de *Trib1*, dans un nouveau modèle. Les expériences de colP et d'analyse par spectrométrie de masse réalisées sur ce modèle cellulaire nous ont permis l'identification de partenaires potentiels de Trib1. Nous avons retrouvé des candidats intéressants : 1) l'ubiquitine ligase **COP1** déjà décrite dans la littérature, 2) les protéines **Stk40**, **CD72** et **Spred1** impliquées dans la **régulation négative de voies cellulaires importantes** et notamment présentes dans les LB (voie des MAPK, voie NF- κ B), 3) la kinase **Jak3**, située dans les voies de signalisation induites par les cytokines, 4) des protéines dont la fonction est moins précise comme la protéine **RN219** qui apparaît en première position (présente le score le plus élevé). D'autre part, l'assemblage des résultats obtenus par la plateforme de l'IGBMC avec ceux de la plateforme de l'IBMC a permis de mettre en évidence 6 protéines communes : **COP1**, **EPN4**, **AKAP8**, **ST38L**, **DHX57** et **LAP2**.

Le fait de retrouver COP1 dans la liste des candidats pour chacune des analyses nous a permis de valider nos expériences puisque COP1 est le partenaire le plus décrit de Trib1. Néanmoins nous n'avons pas retrouvé les kinases MEK1 ou MKK4, ou encore la protéine C/EBP β , décrites dans la littérature comme partenaires de Trib1.

Ainsi, les perspectives pour cette partie du projet seront tout d'abord d'étudier très en détail dans la littérature le rôle potentiel de chaque candidat dans la mise en place du phénotype induit par la surexpression de *Trib1*. Ainsi, **COP1** pourrait, de par sa fonction d'ubiquitine ligase et sa liaison à Trib1, dégrader des protéines clés associées aux processus de production ou/et de sécrétion des Ig, via la voie du protéasome. Ce type de mécanisme est déjà décrit dans le cas de la leucémie myéloïde aiguë. En effet, le facteur C/EBP α (important pour la différenciation myéloïde) est dégradé par COP1 via Trib1 (*Yoshida et al.*, 2013). Si l'interaction de Trib1 avec **Stk40** se vérifiait et résultait en une inhibition de l'action de Stk40, ceci pourrait atténuer la voie Erk, comme décrit par Yu *et al.* (*Yu et al.*, 2013). Cette régulation pourrait corrélérer avec la diminution de la phosphorylation de Erk observée dans les LB surexprimant *Trib1*. Une induction des protéines **CD72** et **SPRED1**, décrites comme des protéines inhibitrices des voies d'activation des LB, par Trib1, pourrait conduire à une inhibition de

certaines fonctions du LB, y incluant certaines fonctions sécrétrices. Un défaut d'**EPN4, protéine impliquée dans la voie de transport des vésicules à clathrines**, induit par la surexpression de *Trib1*, pourrait altérer cette voie de transport et potentiellement perturber le trafic intracellulaire.

Les candidats les plus pertinents, prioritairement ceux cités ci-dessus, seront validés par des expériences de coIP inverses. Cette expérience a déjà été, en partie, réalisée pour Stk40.

Concernant les partenaires validés, nous souhaiterions évaluer leur expression dans les cellules surexprimant *Trib1* mais aussi étudier si leur absence est capable d'annuler le phénotype, voire de le reverser. Ceci serait réalisable en utilisant des inhibiteurs (s'il en existe dans le commerce) ou en produisant des modèles cellulaires de Knock-Down en transduisant les lignées cellulaires Trib1-Cter ou CH12F3-Trib1 (sans étiquette) avec un vecteur lentiviral contenant un shRNA (short hairpin RNA) dirigé contre la séquence du partenaire candidat de Trib1. Cependant, dans le cas où l'effet de la surexpression de *Trib1* est la conséquence d'une action synergique avec plusieurs partenaires, les modèles cellulaires de Knock-Down d'un seul partenaire ne permettront pas forcément de conclure. Par ailleurs, il serait intéressant de générer plusieurs mutants de la protéine Trib1 afin d'identifier plus particulièrement comment et via quels sites, Trib1 et la (les) protéine(s) candidate(s) interagissent ensemble, et d'évaluer quelle(s) interaction(s) permettent l'établissement du phénotype.

Enfin, étant donné que Trib1 est une protéine à la fois cytoplasmique et nucléaire, il serait intéressant d'effectuer des expériences de coIP sur les extraits nucléaires des cellules CH12F3-Cter et GFP-HA-Flag réalisés et conservés au laboratoire.

G4.5 CONCLUSION

Ainsi, *TRIB1* a été retrouvé surexprimé dans les LB de patients lupiques en phase quiescente. De façon inattendue, sa surexpression est liée à un phénotype immunosuppresseur associé à une diminution de la sécrétion des Ig. Nous pouvons imaginer que la surexpression de *TRIB1* soit finalement un mécanisme de régulation négative naturelle des LB qui puisse potentiellement jouer un rôle dans l'établissement et la maintenance des périodes de quiescence au cours du lupus. Très peu d'études ont été réalisées sur les phases de rémission de cette maladie et les mécanismes de régulation qui y sont associés. Ainsi, il serait intéressant de mesurer l'expression de *TRIB1* sur une cohorte plus importante de patients quiescents et d'étudier si le degré de surexpression de *TRIB1* dans les LB est corrélé à la durée des phases de quiescence. Par ailleurs, étudier les effets de la surexpression de *Trib1* dans un modèle de souris lupique aurait permis d'évaluer si la surexpression d'un unique gène dans une souris malade est capable de réduire ou de retarder les symptômes.

Cependant, les principaux modèles murins lupiques ((NZBxNZW)F1, MRL^{lpr/lpr}) possèdent des fonds génétiques complexes qui permettent difficilement le croisement avec nos souris transgéniques de fond B6. De plus, contrairement à l'Homme, la maladie lupique de ces modèles murins ne se manifeste pas par une succession de phases actives et de rémission.

A l'inverse, le phénotype immunosuppresseur observé par la surexpression de *Trib1* chez la souris et potentiellement associé aux phases de quiescence chez les patients lupiques, pourrait finalement avoir un **effet délétère dans le contexte de déficits immunitaires**. Le DICV (Déficit Immunitaire Commun Variable) est le déficit immunitaire primaire symptomatique le plus commun chez l'adulte (Xiao *et al.*, 2014). Il est caractérisé par des symptômes très divers et de degrés variables incluant une hypogammaglobulinémie sévère, des infections récurrentes, des signes d'autoimmunité, des tumeurs malignes lymphoïdes, des entéropathies ou encore une maladie granulomateuse. Cinq défauts génétiques conduisant au développement d'un DICV ont été décrits et concernent le récepteur TACI, le facteur BAFF, ICOS (Inducible Costimulator), la protéine CD19 et MSH5. Néanmoins, la cause moléculaire reste inconnue pour la majorité des patients. L'étude de l'expression de *TRIB1* dans les LB de patients souffrants de déficits immunitaires, et présentant des défauts de production d'IgG1 par exemple, pourrait constituer un axe de recherche intéressant et pourrait potentiellement confirmer l'association entre l'anomalie d'expression biologique de *TRIB1* et des traits cliniques d'immunodéficience.

Le travail sur Trib1 sera achevé par une étudiante en post-doctorat qui va intégrer le laboratoire en octobre 2015, puis un article sur tous les résultats concernant Trib1 sera préparé pour publication.

G.5 CONCLUSION GÉNÉRALE

En conclusion, on peut émettre l'hypothèse qu'au cours du lupus, la surexpression intrinsèque de *FKBP11* dans les LB, participe, conjointement à d'autres défauts génétiques, au développement de symptômes autoimmuns suite à un évènement déclencheur. Par ailleurs, la surexpression de *TRIB1*, également associée à d'autres facteurs régulateurs, pourrait intervenir dans l'établissement et la maintenance des phases de rémission de la maladie lupique (Figure 100). Ainsi, la compréhension de ces deux nouvelles voies biologiques pourrait conduire à une meilleure compréhension de la physiopathologie lupique et mener au développement de nouvelles thérapies.

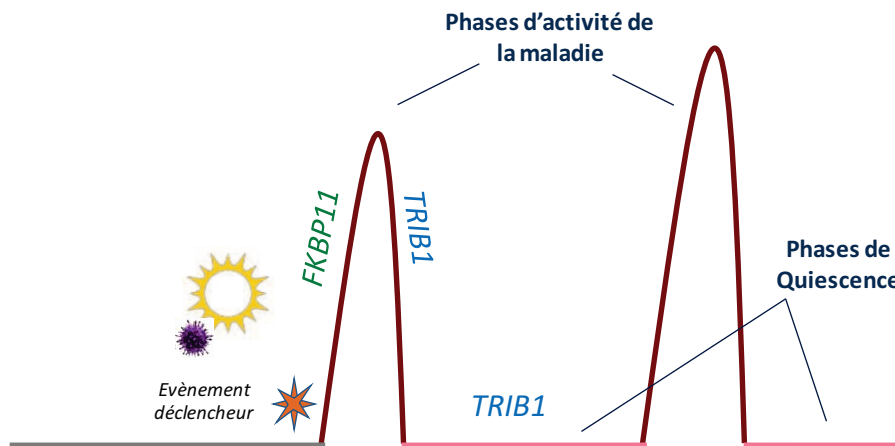


Figure 100 : Représentation schématique de la progression de la maladie lupique, partagée entre des phases d'activité et de quiescence.

Les gènes *FKBP11* et *TRIB1* sont placés sur le schéma en fonction du rôle qui leur est suggéré d'après les résultats de nos études de génomique fonctionnelle. Figure personnelle.



BIBLIOGRAPHIE



BIBLIOGRAPHIE

- . "<http://amazonia.transcriptome.eu/expression.php?genelD=Hs.444947>."
- . "http://www.nature.com/ni/journal/v8/n7/fig_tab/ni0707-665_T1.html."
- . "<https://www.addgene.org/15912/>."
- (2005). "A haplotype map of the human genome." *Nature*, **437**(7063): 1299-1320.
- (2011). "Large-scale gene-centric analysis identifies novel variants for coronary artery disease." *PLoS Genet*, **7**(9): e1002260.
- Abecasis, G. R., et al. (2010). "A map of human genome variation from population-scale sequencing." *Nature*, **467**(7319): 1061-1073.
- Ackermann, J. A., et al. (2011). "Grb2 regulates B-cell maturation, B-cell memory responses and inhibits B-cell Ca²⁺ signalling." *EMBO J*, **30**(8): 1621-1633.
- Addobbati, C., et al. (2013). "FYB gene polymorphisms are associated with susceptibility for systemic lupus erythematosus (SLE)." *Hum Immunol*, **74**(8): 1009-1014.
- Aguzzi, A., et al. (2014). "Follicular dendritic cells: origin, phenotype, and function in health and disease." *Trends Immunol*, **35**(3): 105-113.
- Amanna, I. J. and M. K. Slifka (2010). "Mechanisms that determine plasma cell lifespan and the duration of humoral immunity." *Immunol Rev*, **236**: 125-138.
- Amano, H., et al. (2003). "The Yaa mutation promoting murine lupus causes defective development of marginal zone B cells." *J Immunol*, **170**(5): 2293-2301.
- Aplin, B. D., et al. (2003). "Tolerance through indifference: autoreactive B cells to the nuclear antigen La show no evidence of tolerance in a transgenic model." *J Immunol*, **171**(11): 5890-5900.
- Aragon, I. V., et al. (2012). "The specialized unfolded protein response of B lymphocytes: ATF6 α -independent development of antibody-secreting B cells." *Mol Immunol*, **51**(3-4): 347-355.
- Arbuckle, M. R., et al. (2003). "Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus." *N Engl J Med*, **349**(16): 1526-1533.
- Arechiga, A. F., et al. (2009). "Cutting edge: the PTPN22 allelic variant associated with autoimmunity impairs B cell signaling." *J Immunol*, **182**(6): 3343-3347.
- Arnold, J. N., et al. (2007). "The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins." *Annu Rev Immunol*, **25**: 21-50.
- AS, J. d., et al. (2014). "Systemic Lupus Erythematosus: Old and New Susceptibility Genes versus Clinical Manifestations." *Curr Genomics*, **15**(1): 52-65.
- Baba, Y. and T. Kurosaki (2011). "Impact of Ca²⁺ signaling on B cell function." *Trends Immunol*, **32**(12): 589-594.
- Badr, G., et al. (2015). "Infection of Female BWF1 Lupus Mice with Malaria Parasite Attenuates B Cell Autoreactivity by Modulating the CXCL12/CXCR4 Axis and Its Downstream Signals PI3K/AKT, NF κ B and ERK." *PLoS One*, **10**(4): e0125340.

- Baechler, E. C., et al. (2003). "Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(5): 2610-2615.
- Balciunaite, G., et al. (2005). "A B220+ CD117+ CD19- hematopoietic progenitor with potent lymphoid and myeloid developmental potential." *Eur J Immunol*, **35**(7): 2019-2030.
- Barreto, V., et al. (2003). "C-terminal deletion of AID uncouples class switch recombination from somatic hypermutation and gene conversion." *Mol Cell*, **12**(2): 501-508.
- Basten, A. and P. A. Silveira (2010). "B-cell tolerance: mechanisms and implications." *Curr Opin Immunol*, **22**(5): 566-574.
- Beck, K., et al. (2009). "Distinct roles for E12 and E47 in B cell specification and the sequential rearrangement of immunoglobulin light chain loci." *J Exp Med*, **206**(10): 2271-2284.
- Belot, A. and R. Cimaz (2012). "Monogenic forms of systemic lupus erythematosus: new insights into SLE pathogenesis." *Pediatr Rheumatol Online J*, **10**(1): 21.
- Belot, A., et al. (2013). "Protein kinase cdelta deficiency causes mendelian systemic lupus erythematosus with B cell-defective apoptosis and hyperproliferation." *Arthritis Rheum*, **65**(8): 2161-2171.
- Bennett, L., et al. (2003). "Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood." *J Exp Med*, **197**(6): 711-723.
- Bensimon, C., et al. (1994). "Human lupus anti-DNA autoantibodies undergo essentially primary V kappa gene rearrangements." *EMBO J*, **13**(13): 2951-2962.
- Berkun, Y., et al. (2008). "Altered dendritic cells with tolerizing phenotype in patients with systemic lupus erythematosus." *Eur J Immunol*, **38**(10): 2896-2904.
- Bernal, C. B., et al. (2015). "Biologic therapies in systemic lupus erythematosus." *Int J Rheum Dis*, **18**(2): 146-153.
- Bernier, M. O., et al. (2009). "Combined oral contraceptive use and the risk of systemic lupus erythematosus." *Arthritis Rheum*, **61**(4): 476-481.
- Bertolotti, A., et al. (2000). "Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response." *Nat Cell Biol*, **2**(6): 326-332.
- Blackburn, E. A. and M. D. Walkinshaw (2011). "Targeting FKBP isoforms with small-molecule ligands." *Curr Opin Pharmacol*, **11**(4): 365-371.
- Blair, P. A., et al. (2010). "CD19(+)/CD24(hi)/CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients." *Immunity*, **32**(1): 129-140.
- Bodano, A., et al. (2004). "Novel DNASE I mutations related to systemic lupus erythematosus." *Arthritis Rheum*, **50**(12): 4070-4071.
- Bombardier, C., et al. (1992). "Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE." *Arthritis Rheum*, **35**(6): 630-640.
- Bosch, X. (2011). "Systemic lupus erythematosus and the neutrophil." *N Engl J Med*, **365**(8): 758-760.
- Bretscher, P. and M. Cohn (1970). "A theory of self-nonsel discrimination." *Science*, **169**(3950): 1042-1049.
- Brewer, J. W. and L. M. Hendershot (2005). "Building an antibody factory: a job for the unfolded protein response." *Nat Immunol*, **6**(1): 23-29.

- Brown, K. S., et al. (2004). "FcγRIIb-mediated negative regulation of BCR signalling is associated with the recruitment of the MAPkinase-phosphatase, Pac-1, and the 3'-inositol phosphatase, PTEN." *Cell Signal*, **16**(1): 71-80.
- Browne, C. D., et al. (2009). "Suppression of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate production is a key determinant of B cell anergy." *Immunity*, **31**(5): 749-760.
- Buchta, C. M. and G. A. Bishop (2014). "Toll-like receptors and B cells: functions and mechanisms." *Immunol Res*, **59**(1-3): 12-22.
- Burkhardt, R., et al. (2010). "Trib1 is a lipid- and myocardial infarction-associated gene that regulates hepatic lipogenesis and VLDL production in mice." *J Clin Invest*, **120**(12): 4410-4414.
- Butcher, G. A. (1991). "Does malaria select for predisposition to autoimmune disease?" *J R Soc Med*, **84**(8): 451-453.
- Bynote, K. K., et al. (2008). "Estrogen receptor-α deficiency attenuates autoimmune disease in (NZB x NZW)F1 mice." *Genes Immun*, **9**(2): 137-152.
- Cassese, G., et al. (2003). "Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals." *J Immunol*, **171**(4): 1684-1690.
- Castrejon, I., et al. (2014). "Indices to assess patients with systemic lupus erythematosus in clinical trials, long-term observational studies, and clinical care." *Clin Exp Rheumatol*, **32**(5 Suppl 85): S-85-95.
- Celhar, T., et al. (2012). "TLR7 and TLR9 in SLE: when sensing self goes wrong." *Immunol Res*, **53**(1-3): 58-77.
- Cerny, A., et al. (1989). "Anti-IgM treatment of C57BL/6-1pr/1pr mice: depletion of B cells reduces 1pr gene-induced lymphoproliferation and mononuclear cell vasculitis." *Clin Exp Immunol*, **77**(1): 124-129.
- Cerutti, A., et al. (2013). "Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes." *Nat Rev Immunol*, **13**(2): 118-132.
- Cervera, R., et al. (2002). "Lessons from the "Euro-Lupus Cohort"." *Ann Med Interne (Paris)*, **153**(8): 530-536.
- Chabbert-Buffet, N., et al. (2011). "Pregnane progestin contraception in systemic lupus erythematosus: a longitudinal study of 187 patients." *Contraception*, **83**(3): 229-237.
- Chan, O. and M. J. Shlomchik (1998). "A new role for B cells in systemic autoimmunity: B cells promote spontaneous T cell activation in MRL-lpr/lpr mice." *J Immunol*, **160**(1): 51-59.
- Chan, O. T., et al. (1999). "A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus." *J Exp Med*, **189**(10): 1639-1648.
- Chan, V. W., et al. (1997). "Characterization of the B lymphocyte populations in Lyn-deficient mice and the role of Lyn in signal initiation and down-regulation." *Immunity*, **7**(1): 69-81.
- Chen, M., et al. (2004). "Toxoplasma gondii infection inhibits the development of lupus-like syndrome in autoimmune (New Zealand Black x New Zealand White) F1 mice." *Int Immunol*, **16**(7): 937-946.
- Chen, Y. and F. Brandizzi (2013). "IRE1: ER stress sensor and cell fate executor." *Trends Cell Biol*, **23**(11): 547-555.
- Chen, Y., et al. (2009). "IgM antibodies to apoptosis-associated determinants recruit C1q and enhance dendritic cell phagocytosis of apoptotic cells." *J Immunol*, **182**(10): 6031-6043.

- Chen, Z. and J. H. Wang (2014). "Generation and repair of AID-initiated DNA lesions in B lymphocytes." *Front Med*, **8**(2): 201-216.
- Cheng, H. L., et al. (2009). "Integrity of the AID serine-38 phosphorylation site is critical for class switch recombination and somatic hypermutation in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**(8): 2717-2722.
- Chevrier, S., et al. (2014). "The BTB-ZF transcription factor Zbtb20 is driven by Irf4 to promote plasma cell differentiation and longevity." *J Exp Med*, **211**(5): 827-840.
- Chou, M. Y., et al. (2009). "Oxidation-specific epitopes are dominant targets of innate natural antibodies in mice and humans." *J Clin Invest*, **119**(5): 1335-1349.
- Chu, V. T., et al. (2011). "Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow." *Nat Immunol*, **12**(2): 151-159.
- Chung, S. A., et al. (2011). "Differential genetic associations for systemic lupus erythematosus based on anti-dsDNA autoantibody production." *PLoS Genet*, **7**(3): e1001323.
- Cinamon, G., et al. (2004). "Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone." *Nat Immunol*, **5**(7): 713-720.
- Cinamon, G., et al. (2008). "Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport." *Nat Immunol*, **9**(1): 54-62.
- Cochrane, S. W., et al. (2009). "Balance between Id and E proteins regulates myeloid-versus-lymphoid lineage decisions." *Blood*, **113**(5): 1016-1026.
- Cohen, P. L. and R. A. Eisenberg (1991). "Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease." *Annu Rev Immunol*, **9**: 243-269.
- Crampton, S. P., et al. (2014). "Linking susceptibility genes and pathogenesis mechanisms using mouse models of systemic lupus erythematosus." *Dis Model Mech*, **7**(9): 1033-1046.
- Crispin, J. C., et al. (2003). "Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus." *J Autoimmun*, **21**(3): 273-276.
- Crispin, J. C., et al. (2008). "Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys." *J Immunol*, **181**(12): 8761-8766.
- Crow, M. K. (2014). "Type I interferon in the pathogenesis of lupus." *J Immunol*, **192**(12): 5459-5468.
- Cui, Y., et al. (2013). "Genetic susceptibility to SLE: recent progress from GWAS." *J Autoimmun*, **41**: 25-33.
- Cunard, R. (2013). "Mammalian tribbles homologs at the crossroads of endoplasmic reticulum stress and Mammalian target of rapamycin pathways." *Scientifica (Cairo)*, **2013**: 750871.
- Cunningham-Graham, D. S., et al. (2008). "Polymorphism at the TNF superfamily gene TNFSF4 confers susceptibility to systemic lupus erythematosus." *Nat Genet*, **40**(1): 83-89.
- Cvetkovic-Lopes, V., et al. (2010). "Elevated Tribbles homolog 2-specific antibody levels in narcolepsy patients." *J Clin Invest*, **120**(3): 713-719.
- Cyster, J. G., et al. (1994). "Competition for follicular niches excludes self-reactive cells from the recirculating B-cell repertoire." *Nature*, **371**(6496): 389-395.
- Dai, C., et al. (2014). "Genetics of systemic lupus erythematosus: immune responses and end organ resistance to damage." *Curr Opin Immunol*, **31**: 87-96.
- Dai, X., et al. (2013). "A disease-associated PTPN22 variant promotes systemic autoimmunity in murine models." *J Clin Invest*, **123**(5): 2024-2036.

- Das, A. K., et al. (1998). "The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions." *EMBO J*, **17**(5): 1192-1199.
- De Silva, N. S. and U. Klein (2015). "Dynamics of B cells in germinal centres." *Nat Rev Immunol*, **15**(3): 137-148.
- Deng, C., et al. (2003). "Hydralazine may induce autoimmunity by inhibiting extracellular signal-regulated kinase pathway signaling." *Arthritis Rheum*, **48**(3): 746-756.
- Deng, G. M. and G. C. Tsokos (2008). "Cholera toxin B accelerates disease progression in lupus-prone mice by promoting lipid raft aggregation." *J Immunol*, **181**(6): 4019-4026.
- Deng, Y. and B. P. Tsao (2010). "Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era." *Nat Rev Rheumatol*, **6**(12): 683-692.
- Deng, Y. and B. P. Tsao (2014). "Advances in lupus genetics and epigenetics." *Curr Opin Rheumatol*, **26**(5): 482-492.
- Dib, C., et al. (1996). "A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites." *Nature*, **380**(6570): 152-154.
- Dobens, L. L., Jr. and S. Bouyain (2012). "Developmental roles of tribbles protein family members." *Dev Dyn*, **241**(8): 1239-1248.
- Dolence, J. J., et al. (2014). "Flt3 signaling regulates the proliferation, survival, and maintenance of multipotent hematopoietic progenitors that generate B cell precursors." *Exp Hematol*, **42**(5): 380-393 e383.
- Du, K., et al. (2003). "TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver." *Science*, **300**(5625): 1574-1577.
- Dudek, J., et al. (2015). "Protein transport into the human endoplasmic reticulum." *J Mol Biol*, **427**(6 Pt A): 1159-1175.
- Dugast, E., et al. (2013). "Identification of tribbles-1 as a novel binding partner of Foxp3 in regulatory T cells." *J Biol Chem*, **288**(14): 10051-10060.
- Duty, J. A., et al. (2009). "Functional energy in a subpopulation of naive B cells from healthy humans that express autoreactive immunoglobulin receptors." *J Exp Med*, **206**(1): 139-151.
- Early, P., et al. (1980). "Two mRNAs can be produced from a single immunoglobulin mu gene by alternative RNA processing pathways." *Cell*, **20**(2): 313-319.
- Egawa, T., et al. (2001). "The earliest stages of B cell development require a chemokine stromal cell-derived factor/pre-B cell growth-stimulating factor." *Immunity*, **15**(2): 323-334.
- Ehrenstein, M. R., et al. (2000). "Deficiency in serum immunoglobulin (Ig)M predisposes to development of IgG autoantibodies." *J Exp Med*, **191**(7): 1253-1258.
- Ekblom-Kullberg, S., et al. (2014). "Smoking, disease activity, permanent damage and dsDNA autoantibody production in patients with systemic lupus erythematosus." *Rheumatol Int*, **34**(3): 341-345.
- Ekland, E. H., et al. (2004). "Requirements for follicular exclusion and competitive elimination of autoantigen-binding B cells." *J Immunol*, **172**(8): 4700-4708.
- el Bouhdidi, A., et al. (1994). "Trypanosoma cruzi infection in mice induces a polyisotypic hypergammaglobulinaemia and parasite-specific response involving high IgG2a concentrations and highly avid IgG1 antibodies." *Parasite Immunol*, **16**(2): 69-76.

- Ellyard, J. I., et al. (2014). "Identification of a pathogenic variant in TREX1 in early-onset cerebral systemic lupus erythematosus by Whole-exome sequencing." *Arthritis Rheumatol*, **66**(12): 3382-3386.
- Esplin, B. L., et al. (2009). "A differentiation pathway for B1 cells in adult bone marrow." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**(14): 5773-5778.
- Ezra, N. and J. Jorizzo (2012). "Hydroxychloroquine and smoking in patients with cutaneous lupus erythematosus." *Clin Exp Dermatol*, **37**(4): 327-334.
- Fernando, M. M., et al. (2007). "Identification of two independent risk factors for lupus within the MHC in United Kingdom families." *PLoS Genet*, **3**(11): e192.
- Floto, R. A., et al. (2005). "Loss of function of a lupus-associated FcγRIIb polymorphism through exclusion from lipid rafts." *Nat Med*, **11**(10): 1056-1058.
- Fournie, G. J., et al. (1974). "Release of DNA in circulating blood and induction of anti-DNA antibodies after injection of bacterial lipopolysaccharides." *J Exp Med*, **140**(5): 1189-1206.
- Fox, H. S., et al. (1991). "Estrogen regulates the IFN-γ promoter." *J Immunol*, **146**(12): 4362-4367.
- Francis, L. and A. Perl (2010). "Infection in systemic lupus erythematosus: friend or foe?" *Int J Clin Rheumatol*, **5**(1): 59-74.
- Fransen, J. H., et al. (2009). "Mouse dendritic cells matured by ingestion of apoptotic blebs induce T cells to produce interleukin-17." *Arthritis Rheum*, **60**(8): 2304-2313.
- Froy, O. and Z. M. Stoeber (2009). "Defensins in systemic lupus erythematosus." *Ann N Y Acad Sci*, **1173**: 365-369.
- Fujinami, R. S., et al. (1983). "Molecular mimicry in virus infection: crossreaction of measles virus phosphoprotein or of herpes simplex virus protein with human intermediate filaments." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**(8): 2346-2350.
- Funauchi, M., et al. (1993). "Abnormal expression of intercellular adhesion molecule-1 on peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus." *J Clin Lab Immunol*, **40**(3): 115-124.
- Gaffney, P. M., et al. (1998). "A genome-wide search for susceptibility genes in human systemic lupus erythematosus sib-pair families." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(25): 14875-14879.
- Garaud, J. C., et al. (2011). "B cell signature during inactive systemic lupus is heterogeneous: toward a biological dissection of lupus." *PLoS One*, **6**(8): e23900.
- Gateva, V., et al. (2009). "A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus." *Nat Genet*, **41**(11): 1228-1233.
- Genot, E. and D. A. Cantrell (2000). "Ras regulation and function in lymphocytes." *Curr Opin Immunol*, **12**(3): 289-294.
- Ghaussy, N. O., et al. (2003). "Cigarette smoking and disease activity in systemic lupus erythematosus." *J Rheumatol*, **30**(6): 1215-1221.
- Ghosh, D., et al. (2012). "c-Jun and Ets2 proteins regulate expression of spleen tyrosine kinase in T cells." *J Biol Chem*, **287**(15): 11833-11841.
- Gilby, D. C., et al. (2010). "Tribbles-1 and -2 are tumour suppressors, down-regulated in human acute myeloid leukaemia." *Immunol Lett*, **130**(1-2): 115-124.
- Goodnow, C. C., et al. (1988). "Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice." *Nature*, **334**(6184): 676-682.

- Goodnow, C. C., et al. (2005). "Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity." *Nature*, **435**(7042): 590-597.
- Goto, T., et al. (1987). "Discovery of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*." *Transplant Proc*, **19**(5 Suppl 6): 4-8.
- Gotot, J., et al. (2012). "Regulatory T cells use programmed death 1 ligands to directly suppress autoreactive B cells in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**(26): 10468-10473.
- Green, N. M. and A. Marshak-Rothstein (2011). "Toll-like receptor driven B cell activation in the induction of systemic autoimmunity." *Semin Immunol*, **23**(2): 106-112.
- Griffin, D. O., et al. (2011). "Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70." *J Exp Med*, **208**(1): 67-80.
- Griffin, D. O. and T. L. Rothstein (2011). "A small CD11b(+) human B1 cell subpopulation stimulates T cells and is expanded in lupus." *J Exp Med*, **208**(13): 2591-2598.
- Grimaldi, C. M., et al. (2001). "Cutting edge: expansion and activation of a population of autoreactive marginal zone B cells in a model of estrogen-induced lupus." *J Immunol*, **167**(4): 1886-1890.
- Gronwall, C. and G. J. Silverman (2014). "Natural IgM: beneficial autoantibodies for the control of inflammatory and autoimmune disease." *J Clin Immunol*, **34** Suppl 1: S12-21.
- Grosshans, J. and E. Wieschaus (2000). "A genetic link between morphogenesis and cell division during formation of the ventral furrow in *Drosophila*." *Cell*, **101**(5): 523-531.
- Hakkim, A., et al. (2010). "Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**(21): 9813-9818.
- Halverson, R., et al. (2004). "Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens." *Nat Immunol*, **5**(6): 645-650.
- Han, J. W., et al. (2009). "Genome-wide association study in a Chinese Han population identifies nine new susceptibility loci for systemic lupus erythematosus." *Nat Genet*, **41**(11): 1234-1237.
- Han, L., et al. (2011). "Overlapping activation-induced cytidine deaminase hotspot motifs in Ig class-switch recombination." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**(28): 11584-11589.
- Hardy, R. R., et al. (1991). "Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow." *J Exp Med*, **173**(5): 1213-1225.
- Hardy, R. R. and K. Hayakawa (2001). "B cell development pathways." *Annu Rev Immunol*, **19**: 595-621.
- Harley, J. B., et al. (2008). "Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PXX, KIAA1542 and other loci." *Nat Genet*, **40**(2): 204-210.
- Haurly, M., et al. (1997). "The repertoire of serum IgM in normal mice is largely independent of external antigenic contact." *Eur J Immunol*, **27**(6): 1557-1563.
- Hayter, S. M. and M. C. Cook (2012). "Updated assessment of the prevalence, spectrum and case definition of autoimmune disease." *Autoimmun Rev*, **11**(10): 754-765.
- He, Y., et al. (2010). "Emerging roles for XBP1, a sUPER transcription factor." *Gene Expr*, **15**(1): 13-25.
- Hedrich, C. M., et al. (2012). "cAMP-responsive element modulator alpha (CREMalpha) suppresses IL-17F protein expression in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus (SLE)." *J Biol Chem*, **287**(7): 4715-4725.

- Hegedus, Z., et al. (2007). "Tribbles: a family of kinase-like proteins with potent signalling regulatory function." *Cell Signal*, **19**(2): 238-250.
- Heise, N., et al. (2014). "Germinal center B cell maintenance and differentiation are controlled by distinct NF-kappaB transcription factor subunits." *J Exp Med*, **211**(10): 2103-2118.
- Herve, M., et al. (2007). "CD40 ligand and MHC class II expression are essential for human peripheral B cell tolerance." *J Exp Med*, **204**(7): 1583-1593.
- Herzenberg, L. A. and A. B. Kantor (1993). "B-cell lineages exist in the mouse." *Immunol Today*, **14**(2): 79-83; discussion 88-90.
- Hewagama, A., et al. (2013). "Overexpression of X-linked genes in T cells from women with lupus." *J Autoimmun*, **41**: 60-71.
- Hibbs, M. L., et al. (1995). "Multiple defects in the immune system of Lyn-deficient mice, culminating in autoimmune disease." *Cell*, **83**(2): 301-311.
- Hobeika, E., et al. (2015). "Signaling mechanisms regulating B-lymphocyte activation and tolerance." *J Mol Med (Berl)*, **93**(2): 143-158.
- Hobeika, E., et al. (2006). "Testing gene function early in the B cell lineage in mb1-cre mice." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**(37): 13789-13794.
- Hochberg, M. C. (1997). "Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus." *Arthritis Rheum*, **40**(9): 1725.
- Hogben, D. N. and M. E. Devey (1986). "Studies on rheumatoid factor: I. The effect of rheumatoid factor on the clearance of preformed immune complexes in mice." *Clin Exp Immunol*, **66**(3): 648-653.
- Hollien, J., et al. (2009). "Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells." *J Cell Biol*, **186**(3): 323-331.
- Hondowicz, B. D., et al. (2008). "Autoantibody production in lpr/lpr gld/gld mice reflects accumulation of CD4+ effector cells that are resistant to regulatory T cell activity." *J Autoimmun*, **31**(2): 98-109.
- Horowitz, D. L. and R. Furie (2012). "Belimumab is approved by the FDA: what more do we need to know to optimize decision making?" *Curr Rheumatol Rep*, **14**(4): 318-323.
- Huang, D. F., et al. (1995). "Population and family studies of three disease-related polymorphic genes in systemic lupus erythematosus." *J Clin Invest*, **95**(4): 1766-1772.
- Huang, J., et al. (2003). "Identification of a novel serine/threonine kinase that inhibits TNF-induced NF-kappaB activation and p53-induced transcription." *Biochem Biophys Res Commun*, **309**(4): 774-778.
- Hudgins, C. C., et al. (1985). "Studies of consomic mice bearing the Y chromosome of the BXSB mouse." *J Immunol*, **134**(6): 3849-3854.
- Hughes, G. C., et al. (2009). "Decrease in glomerulonephritis and Th1-associated autoantibody production after progesterone treatment in NZB/NZW mice." *Arthritis Rheum*, **60**(6): 1775-1784.
- Humrich, J. Y., et al. (2010). "Homeostatic imbalance of regulatory and effector T cells due to IL-2 deprivation amplifies murine lupus." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**(1): 204-209.
- Huston, D. P. and A. D. Steinberg (1979). "Animal models of human systemic lupus erythematosus." *Yale J Biol Med*, **52**(3): 289-305.
- Imajo, M. and E. Nishida (2010). "Human Tribbles homolog 1 functions as a negative regulator of retinoic acid receptor." *Genes Cells*, **15**(10): 1089-1097.

- Ishizuka, Y., et al. (2014). "TRIB1 downregulates hepatic lipogenesis and glycogenesis via multiple molecular interactions." *J Mol Endocrinol*, **52**(2): 145-158.
- Iwakoshi, N. N., et al. (2003). "Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1." *Nat Immunol*, **4**(4): 321-329.
- Izui, S., et al. (1979). "IgM rheumatoid factors in mice injected with bacterial lipopolysaccharides." *J Immunol*, **122**(5): 2096-2102.
- Izui, S., et al. (1977). "Features of systemic lupus erythematosus in mice injected with bacterial lipopolysaccharides: identification of circulating DNA and renal localization of DNA-anti-DNA complexes." *J Exp Med*, **145**(5): 1115-1130.
- Jacob, C. O. and H. O. McDevitt (1988). "Tumour necrosis factor-alpha in murine autoimmune 'lupus' nephritis." *Nature*, **331**(6154): 356-358.
- Jacob, C. O., et al. (2003). "Pivotal role of Stat4 and Stat6 in the pathogenesis of the lupus-like disease in the New Zealand mixed 2328 mice." *J Immunol*, **171**(3): 1564-1571.
- Jacobi, A. M., et al. (2003). "Correlation between circulating CD27^{high} plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus." *Arthritis Rheum*, **48**(5): 1332-1342.
- Jacobi, A. M., et al. (2008). "Activated memory B cell subsets correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus: delineation by expression of CD27, IgD, and CD95." *Arthritis Rheum*, **58**(6): 1762-1773.
- Jacquemin, C., et al. (2015). "OX40 Ligand Contributes to Human Lupus Pathogenesis by Promoting T Follicular Helper Response." *Immunity*, **42**(6): 1159-1170.
- Janssens, S., et al. (2014). "Emerging functions of the unfolded protein response in immunity." *Nat Immunol*, **15**(10): 910-919.
- Jaromi, L., et al. (2011). "Triglyceride level-influencing functional variants of the ANGPTL3, CILP2, and TRIB1 loci in ischemic stroke." *Neuromolecular Med*, **13**(3): 179-186.
- Jeffries, M. A., et al. (2011). "Genome-wide DNA methylation patterns in CD4⁺ T cells from patients with systemic lupus erythematosus." *Epigenetics*, **6**(5): 593-601.
- Jeremiah, N., et al. (2014). "Inherited STING-activating mutation underlies a familial inflammatory syndrome with lupus-like manifestations." *J Clin Invest*, **124**(12): 5516-5520.
- Jin, G., et al. (2007). "Trib1 and Evi1 cooperate with Hoxa and Meis1 in myeloid leukemogenesis." *Blood*, **109**(9): 3998-4005.
- Johnson, A. E., et al. (1995). "The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England. Relationship to ethnicity and country of birth." *Arthritis Rheum*, **38**(4): 551-558.
- Jourdan, M., et al. (2009). "An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization." *Blood*, **114**(25): 5173-5181.
- Jousse, C., et al. (2007). "TRB3 inhibits the transcriptional activation of stress-regulated genes by a negative feedback on the ATF4 pathway." *J Biol Chem*, **282**(21): 15851-15861.
- Kabashima, K., et al. (2006). "Plasma cell S1P1 expression determines secondary lymphoid organ retention versus bone marrow tropism." *J Exp Med*, **203**(12): 2683-2690.
- Kallies, A., et al. (2004). "Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression." *J Exp Med*, **200**(8): 967-977.

- Kalthoff, C., et al. (2002). "Clint: a novel clathrin-binding ENTH-domain protein at the Golgi." *Mol Biol Cell*, **13**(11): 4060-4073.
- Kang, H. K., et al. (2007). "Low-dose peptide tolerance therapy of lupus generates plasmacytoid dendritic cells that cause expansion of autoantigen-specific regulatory T cells and contraction of inflammatory Th17 cells." *J Immunol*, **178**(12): 7849-7858.
- Kaplan, M. J. (2011). "Neutrophils in the pathogenesis and manifestations of SLE." *Nat Rev Rheumatol*, **7**(12): 691-699.
- Kaplan, M. J., et al. (2004). "Demethylation of promoter regulatory elements contributes to perforin overexpression in CD4+ lupus T cells." *J Immunol*, **172**(6): 3652-3661.
- Karassa, F. B., et al. (2003). "The Fc gamma RIIIA-F158 allele is a risk factor for the development of lupus nephritis: a meta-analysis." *Kidney Int*, **63**(4): 1475-1482.
- Kasitanon, N., et al. (2015). "The clinically quiescent phase in early-diagnosed SLE patients: inception cohort study." *Rheumatology (Oxford)*, **54**(5): 868-875.
- Katsiari, C. G., et al. (2002). "Aberrant expression of the costimulatory molecule CD40 ligand on monocytes from patients with systemic lupus erythematosus." *Clin Immunol*, **103**(1): 54-62.
- Katz, U. and G. Zandman-Goddard (2010). "Drug-induced lupus: an update." *Autoimmun Rev*, **10**(1): 46-50.
- Kaufman, K. M., et al. (2013). "Fine mapping of Xq28: both MECP2 and IRAK1 contribute to risk for systemic lupus erythematosus in multiple ancestral groups." *Ann Rheum Dis*, **72**(3): 437-444.
- Kehry, M., et al. (1980). "The immunoglobulin mu chains of membrane-bound and secreted IgM molecules differ in their C-terminal segments." *Cell*, **21**(2): 393-406.
- Kerr, W. G. (2011). "Inhibitor and activator: dual functions for SHIP in immunity and cancer." *Ann N Y Acad Sci*, **1217**: 1-17.
- Kil, L. P. and R. W. Hendriks (2013). "Aberrant B cell selection and activation in systemic lupus erythematosus." *Int Rev Immunol*, **32**(4): 445-470.
- Kim-Howard, X., et al. (2014). "Allelic heterogeneity in NCF2 associated with systemic lupus erythematosus (SLE) susceptibility across four ethnic populations." *Hum Mol Genet*, **23**(6): 1656-1668.
- Kim, A. and B. F. Chong (2013). "Photosensitivity in cutaneous lupus erythematosus." *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, **29**(1): 4-11.
- Kinnunen, T., et al. (2013). "Accumulation of peripheral autoreactive B cells in the absence of functional human regulatory T cells." *Blood*, **121**(9): 1595-1603.
- Kiss-Toth, E. (2011). "Tribbles: 'puzzling' regulators of cell signalling." *Biochem Soc Trans*, **39**(2): 684-687.
- Kiss-Toth, E., et al. (2004). "Human tribbles, a protein family controlling mitogen-activated protein kinase cascades." *J Biol Chem*, **279**(41): 42703-42708.
- Koene, H. R., et al. (1997). "Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype." *Blood*, **90**(3): 1109-1114.
- Komatsuda, A., et al. (2008). "Up-regulated expression of Toll-like receptors mRNAs in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus." *Clin Exp Immunol*, **152**(3): 482-487.

- Kometani, K. and T. Kurosaki (2015). "Differentiation and maintenance of long-lived plasma cells." *Curr Opin Immunol*, **33**: 64-69.
- Konya, C., et al. (2014). "The role of T cells in systemic lupus erythematosus: an update." *Curr Opin Rheumatol*, **26**(5): 493-501.
- Korganow, A. S., et al. (2010). "Peripheral B cell abnormalities in patients with systemic lupus erythematosus in quiescent phase: decreased memory B cells and membrane CD19 expression." *J Autoimmun*, **34**(4): 426-434.
- Kozyrev, S. V., et al. (2008). "Functional variants in the B-cell gene BANK1 are associated with systemic lupus erythematosus." *Nat Genet*, **40**(2): 211-216.
- Kraus, M., et al. (2004). "Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer." *Cell*, **117**(6): 787-800.
- Kubota, S., et al. (2015). "Role for Tyrosine Phosphorylation of A-kinase Anchoring Protein 8 (AKAP8) in Its Dissociation from Chromatin and the Nuclear Matrix." *J Biol Chem*, **290**(17): 10891-10904.
- Kumar, R., et al. (2014). "Biological function of activation-induced cytidine deaminase (AID)." *Biomed J*, **37**(5): 269-283.
- Kuo, C. H., et al. (2012). "The role of TRB3 in mast cells sensitized with monomeric IgE." *Exp Mol Pathol*, **93**(3): 408-415.
- Kurosaki, T., et al. (2015). "Memory B cells." *Nat Rev Immunol*, **15**(3): 149-159.
- Kyogoku, C., et al. (2004). "Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE." *Am J Hum Genet*, **75**(3): 504-507.
- Lalonde, E., et al. (2010). "Unexpected allelic heterogeneity and spectrum of mutations in Fowler syndrome revealed by next-generation exome sequencing." *Hum Mutat*, **31**(8): 918-923.
- Lang, T. J. (2004). "Estrogen as an immunomodulator." *Clin Immunol*, **113**(3): 224-230.
- Leadbetter, E. A., et al. (2002). "Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors." *Nature*, **416**(6881): 603-607.
- Lee-Kirsch, M. A., et al. (2007). "Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 are associated with systemic lupus erythematosus." *Nat Genet*, **39**(9): 1065-1067.
- Lee, K., et al. (2002). "IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response." *Genes Dev*, **16**(4): 452-466.
- Lee, Y. H. and S. C. Bae (2015). "Association between the functional ITGAM rs1143679 G/A polymorphism and systemic lupus erythematosus/lupus nephritis or rheumatoid arthritis: an update meta-analysis." *Rheumatol Int*, **35**(5): 815-823.
- Leffler, J., et al. (2014). "The complement system in systemic lupus erythematosus: an update." *Ann Rheum Dis*, **73**(9): 1601-1606.
- Lehmann, P. V., et al. (1992). "Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen." *Nature*, **358**(6382): 155-157.
- Lesley, R., et al. (2004). "Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF." *Immunity*, **20**(4): 441-453.
- Li, D. H., et al. (2008). "Modulation of peripheral B cell tolerance by CD72 in a murine model." *Arthritis Rheum*, **58**(10): 3192-3204.

- Li, Q. and I. M. Verma (2002). "NF-kappaB regulation in the immune system." *Nat Rev Immunol*, **2**(10): 725-734.
- Li, Y., et al. (2010). "Monocyte and macrophage abnormalities in systemic lupus erythematosus." *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, **58**(5): 355-364.
- Li, Y., et al. (2009). "Increased expression of FcgammaRI/CD64 on circulating monocytes parallels ongoing inflammation and nephritis in lupus." *Arthritis Res Ther*, **11**(1): R6.
- Liao, J., et al. (2015). "Cell-based therapies for systemic lupus erythematosus." *Autoimmun Rev*, **14**(1): 43-48.
- Lin, I. Y., et al. (2013). "Identification of FKBP11 as a biomarker for hepatocellular carcinoma." *Anticancer Res*, **33**(6): 2763-2769.
- Lin, K. I., et al. (2002). "Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells." *Mol Cell Biol*, **22**(13): 4771-4780.
- Linterman, M. A., et al. (2010). "IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses." *J Exp Med*, **207**(2): 353-363.
- Liou, S. N., et al. (1996). "B cells from patients with systemic lupus erythematosus display abnormal antigen receptor-mediated early signal transduction events." *J Clin Invest*, **98**(11): 2549-2557.
- Lipsker D., S. J. (2013). Lupus érythémateux.
- Liu, J., et al. (1991). "Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes." *Cell*, **66**(4): 807-815.
- Liu, J., et al. (2010). "Mammalian Tribbles homolog 3 impairs insulin action in skeletal muscle: role in glucose-induced insulin resistance." *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **298**(3): E565-576.
- Liu, Y., et al. (2014). "Activated STING in a vascular and pulmonary syndrome." *N Engl J Med*, **371**(6): 507-518.
- Llorente, L., et al. (1993). "Spontaneous production of interleukin-10 by B lymphocytes and monocytes in systemic lupus erythematosus." *Eur Cytokine Netw*, **4**(6): 421-427.
- Lu, H., et al. (2008). "The identification of potential factors associated with the development of type 2 diabetes: a quantitative proteomics approach." *Mol Cell Proteomics*, **7**(8): 1434-1451.
- Lu, Q., et al. (2007). "Demethylation of CD40LG on the inactive X in T cells from women with lupus." *J Immunol*, **179**(9): 6352-6358.
- Lu, T. T. and J. G. Cyster (2002). "Integrin-mediated long-term B cell retention in the splenic marginal zone." *Science*, **297**(5580): 409-412.
- Lu, X., et al. (2015). "Lupus Risk Variant Increases pSTAT1 Binding and Decreases ETS1 Expression." *Am J Hum Genet*, **96**(5): 731-739.
- Lugar, P. L., et al. (2012). "Molecular characterization of circulating plasma cells in patients with active systemic lupus erythematosus." *PLoS One*, **7**(9): e44362.
- Luning Prak, E. T., et al. (2011). "B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity." *Ann N Y Acad Sci*, **1217**: 96-121.
- Luo, J., et al. (2013). "Up-regulation of transcription factor Blimp1 in systemic lupus erythematosus." *Mol Immunol*, **56**(4): 574-582.
- Lyons, P. A., et al. (2010). "Novel expression signatures identified by transcriptional analysis of separated leucocyte subsets in systemic lupus erythematosus and vasculitis." *Ann Rheum Dis*, **69**(6): 1208-1213.

- Mackern-Oberti, J. P., et al. (2015). "Role of dendritic cells in the initiation, progress and modulation of systemic autoimmune diseases." *Autoimmun Rev*, **14**(2): 127-139.
- Mak, A. and S. H. Tay (2014). "Environmental factors, toxicants and systemic lupus erythematosus." *Int J Mol Sci*, **15**(9): 16043-16056.
- Makol, A., et al. (2011). "Prevalence of connective tissue disease in silicosis (1985-2006)-a report from the state of Michigan surveillance system for silicosis." *Am J Ind Med*, **54**(4): 255-262.
- Marie, C. S., et al. (2012). "Leptin protects host cells from *Entamoeba histolytica* cytotoxicity by a STAT3-dependent mechanism." *Infect Immun*, **80**(5): 1934-1943.
- Marshall-Clarke, S., et al. (2007). "Polyinosinic acid is a ligand for toll-like receptor 3." *J Biol Chem*, **282**(34): 24759-24766.
- Martin, A., et al. (2002). "Activation-induced cytidine deaminase turns on somatic hypermutation in hybridomas." *Nature*, **415**(6873): 802-806.
- Martincic, K., et al. (2009). "Transcription elongation factor ELL2 directs immunoglobulin secretion in plasma cells by stimulating altered RNA processing." *Nat Immunol*, **10**(10): 1102-1109.
- Martino, M. B., et al. (2013). "The ER stress transducer IRE1beta is required for airway epithelial mucin production." *Mucosal Immunol*, **6**(3): 639-654.
- Mashima, T., et al. (2014). "TRIB1 supports prostate tumorigenesis and tumor-propagating cell survival by regulation of endoplasmic reticulum chaperone expression." *Cancer Res*, **74**(17): 4888-4897.
- Mata, J., et al. (2000). "Tribbles coordinates mitosis and morphogenesis in *Drosophila* by regulating string/CDC25 proteolysis." *Cell*, **101**(5): 511-522.
- Mathis, D. and G. L. King (2002). "B-cell signaling: protein kinase Cdelta puts the brakes on." *Curr Biol*, **12**(16): R554-556.
- Matsushima, R., et al. (2006). "Effect of TRB3 on insulin and nutrient-stimulated hepatic p70 S6 kinase activity." *J Biol Chem*, **281**(40): 29719-29729.
- Mauri, C. and M. Menon (2015). "The expanding family of regulatory B cells." *Int Immunol*.
- Maus, M., et al. (2013). "B cell receptor-induced Ca²⁺ mobilization mediates F-actin rearrangements and is indispensable for adhesion and spreading of B lymphocytes." *J Leukoc Biol*, **93**(4): 537-547.
- McCarty, D. J., et al. (1995). "Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences." *Arthritis Rheum*, **38**(9): 1260-1270.
- McClain, M. T., et al. (2005). "Early events in lupus humoral autoimmunity suggest initiation through molecular mimicry." *Nat Med*, **11**(1): 85-89.
- McDonald, C., et al. (2005). "A role for Erbin in the regulation of Nod2-dependent NF-kappaB signaling." *J Biol Chem*, **280**(48): 40301-40309.
- McHeyzer-Williams, M., et al. (2012). "Molecular programming of B cell memory." *Nat Rev Immunol*, **12**(1): 24-34.
- McKinney, E. F., et al. (2010). "A CD8+ T cell transcription signature predicts prognosis in autoimmune disease." *Nat Med*, **16**(5): 586-591, 581p following 591.
- Medgyesi, D., et al. (2014). "The protein tyrosine phosphatase PTP1B is a negative regulator of CD40 and BAFF-R signaling and controls B cell autoimmunity." *J Exp Med*, **211**(3): 427-440.
- Meffre, E. and J. E. Salmon (2007). "Autoantibody selection and production in early human life." *J Clin Invest*, **117**(3): 598-601.

- Meffre, E. and H. Wardemann (2008). "B-cell tolerance checkpoints in health and autoimmunity." *Curr Opin Immunol*, **20**(6): 632-638.
- Merbl, Y., et al. (2007). "Newborn humans manifest autoantibodies to defined self molecules detected by antigen microarray informatics." *J Clin Invest*, **117**(3): 712-718.
- Miceli-Richard, C. (2015). "Epigenetics and lupus." *Joint Bone Spine*, **82**(2): 90-93.
- Mina-Osorio, P., et al. (2013). "Suppression of glomerulonephritis in lupus-prone NZB x NZW mice by RN486, a selective inhibitor of Bruton's tyrosine kinase." *Arthritis Rheum*, **65**(9): 2380-2391.
- Miyazaki, K., et al. (2014). "The establishment of B versus T cell identity." *Trends Immunol*, **35**(5): 205-210.
- Mohan, C., et al. (1998). "Accumulation of splenic B1a cells with potent antigen-presenting capability in NZM2410 lupus-prone mice." *Arthritis Rheum*, **41**(9): 1652-1662.
- Molad, Y., et al. (1994). "Intravascular neutrophil activation in systemic lupus erythematosus (SLE): dissociation between increased expression of CD11b/CD18 and diminished expression of L-selectin on neutrophils from patients with active SLE." *Clin Immunol Immunopathol*, **71**(3): 281-286.
- Montecino-Rodriguez, E. and K. Dorshkind (2011). "Formation of B-1 B cells from neonatal B-1 transitional cells exhibits NF-kappaB redundancy." *J Immunol*, **187**(11): 5712-5719.
- Montecino-Rodriguez, E. and K. Dorshkind (2012). "B-1 B cell development in the fetus and adult." *Immunity*, **36**(1): 13-21.
- Morris, D. L., et al. (2010). "Evidence for both copy number and allelic (NA1/NA2) risk at the FCGR3B locus in systemic lupus erythematosus." *Eur J Hum Genet*, **18**(9): 1027-1031.
- Morse, E., et al. (2010). "TRB3 is stimulated in diabetic kidneys, regulated by the ER stress marker CHOP, and is a suppressor of podocyte MCP-1." *Am J Physiol Renal Physiol*, **299**(5): F965-972.
- Moser, K. L., et al. (2009). "Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus." *Genes Immun*, **10**(5): 373-379.
- Moser, K. L., et al. (1998). "Genome scan of human systemic lupus erythematosus: evidence for linkage on chromosome 1q in African-American pedigrees." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(25): 14869-14874.
- Munz, C., et al. (2009). "Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity?" *Nat Rev Immunol*, **9**(4): 246-258.
- Murakami, M., et al. (1995). "Prevention of autoimmune symptoms in autoimmune-prone mice by elimination of B-1 cells." *Int Immunol*, **7**(5): 877-882.
- Muramatsu, M., et al. (1999). "Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells." *J Biol Chem*, **274**(26): 18470-18476.
- Murphy, E. D. and J. B. Roths (1979). "A Y chromosome associated factor in strain BXSB producing accelerated autoimmunity and lymphoproliferation." *Arthritis Rheum*, **22**(11): 1188-1194.
- Muto, A., et al. (2010). "Bach2 represses plasma cell gene regulatory network in B cells to promote antibody class switch." *EMBO J*, **29**(23): 4048-4061.
- Nagele, E. P., et al. (2013). "Natural IgG autoantibodies are abundant and ubiquitous in human sera, and their number is influenced by age, gender, and disease." *PLoS One*, **8**(4): e60726.
- Nakamura, M., et al. (1996). "High frequency class switching of an IgM+ B lymphoma clone CH12F3 to IgA+ cells." *Int Immunol*, **8**(2): 193-201.

- Nakayama, Y., et al. (2006). "A limited number of genes are involved in the differentiation of germinal center B cells." *J Cell Biochem*, **99**(5): 1308-1325.
- Nakou, M., et al. (2008). "Gene expression in systemic lupus erythematosus: bone marrow analysis differentiates active from inactive disease and reveals apoptosis and granulopoiesis signatures." *Arthritis Rheum*, **58**(11): 3541-3549.
- Namjou, B., et al. (2011). "Evaluation of the TREX1 gene in a large multi-ancestral lupus cohort." *Genes Immun*, **12**(4): 270-279.
- Napirei, M., et al. (2000). "Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice." *Nat Genet*, **25**(2): 177-181.
- Nath, P. R. and N. Isakov (2015). "Insights into peptidyl-prolyl cis-trans isomerase structure and function in immunocytes." *Immunol Lett*, **163**(1): 120-131.
- Nath, S. K., et al. (2008). "A nonsynonymous functional variant in integrin-alpha(M) (encoded by ITGAM) is associated with systemic lupus erythematosus." *Nat Genet*, **40**(2): 152-154.
- Ng, K. P., et al. (2006). "Association of antinucleosome antibodies with disease flare in serologically active clinically quiescent patients with systemic lupus erythematosus." *Arthritis Rheum*, **55**(6): 900-904.
- Ng, Y. S., et al. (2004). "Bruton's tyrosine kinase is essential for human B cell tolerance." *J Exp Med*, **200**(7): 927-934.
- Novoa, I., et al. (2003). "Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression." *EMBO J*, **22**(5): 1180-1187.
- Nowak, U. M. and M. M. Newkirk (2005). "Rheumatoid factors: good or bad for you?" *Int Arch Allergy Immunol*, **138**(2): 180-188.
- Nutt, S. L., et al. (2015). "The generation of antibody-secreting plasma cells." *Nat Rev Immunol*, **15**(3): 160-171.
- Nutt, S. L. and B. L. Kee (2007). "The transcriptional regulation of B cell lineage commitment." *Immunity*, **26**(6): 715-725.
- Nutt, S. L., et al. (2011). "The genetic network controlling plasma cell differentiation." *Semin Immunol*, **23**(5): 341-349.
- O'Garra, A., et al. (1992). "Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10." *Eur J Immunol*, **22**(3): 711-717.
- O'Neill, S. and R. Cervera (2010). "Systemic lupus erythematosus." *Best Pract Res Clin Rheumatol*, **24**(6): 841-855.
- Ochiai, K., et al. (2006). "Plasmacytic transcription factor Blimp-1 is repressed by Bach2 in B cells." *J Biol Chem*, **281**(50): 38226-38234.
- Ochiai, K., et al. (2013). "Transcriptional regulation of germinal center B and plasma cell fates by dynamical control of IRF4." *Immunity*, **38**(5): 918-929.
- Ochiai, K., et al. (2008). "Regulation of the plasma cell transcription factor Blimp-1 gene by Bach2 and Bcl6." *Int Immunol*, **20**(3): 453-460.
- Odendahl, M., et al. (2000). "Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus." *J Immunol*, **165**(10): 5970-5979.
- Ohnmacht, C., et al. (2009). "Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity." *J Exp Med*, **206**(3): 549-559.

- Ohoka, N., et al. (2005). "TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death." *EMBO J*, **24**(6): 1243-1255.
- Okada, T., et al. (2000). "BCAP: the tyrosine kinase substrate that connects B cell receptor to phosphoinositide 3-kinase activation." *Immunity*, **13**(6): 817-827.
- Okazaki, T., et al. (2001). "PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(24): 13866-13871.
- Oliver, P. M., et al. (2006). "Loss of the proapoptotic protein, Bim, breaks B cell anergy." *J Exp Med*, **203**(3): 731-741.
- Oosting, M., et al. (2011). "TLR1/TLR2 heterodimers play an important role in the recognition of *Borrelia spirochetes*." *PLoS One*, **6**(10): e25998.
- Ord, D. and T. Ord (2005). "Characterization of human NIPK (TRB3, SKIP3) gene activation in stressful conditions." *Biochem Biophys Res Commun*, **330**(1): 210-218.
- Ostertag, A., et al. (2010). "Control of adipose tissue inflammation through TRB1." *Diabetes*, **59**(8): 1991-2000.
- Pabst, O., et al. (2005). "Cutting edge: egress of newly generated plasma cells from peripheral lymph nodes depends on beta 2 integrin." *J Immunol*, **174**(12): 7492-7495.
- Palam, L. R., et al. (2011). "Phosphorylation of eIF2 facilitates ribosomal bypass of an inhibitory upstream ORF to enhance CHOP translation." *J Biol Chem*, **286**(13): 10939-10949.
- Pan, W., et al. (2010). "MicroRNA-21 and microRNA-148a contribute to DNA hypomethylation in lupus CD4+ T cells by directly and indirectly targeting DNA methyltransferase 1." *J Immunol*, **184**(12): 6773-6781.
- Panigrahi, A. K., et al. (2008). "RS rearrangement frequency as a marker of receptor editing in lupus and type 1 diabetes." *J Exp Med*, **205**(13): 2985-2994.
- Pao, L. I., et al. (2007). "Nonreceptor protein-tyrosine phosphatases in immune cell signaling." *Annu Rev Immunol*, **25**: 473-523.
- Park, S. R., et al. (2009). "HoxC4 binds to the promoter of the cytidine deaminase AID gene to induce AID expression, class-switch DNA recombination and somatic hypermutation." *Nat Immunol*, **10**(5): 540-550.
- Parra, D., et al. (2012). "Pivotal advance: peritoneal cavity B-1 B cells have phagocytic and microbicidal capacities and present phagocytosed antigen to CD4+ T cells." *J Leukoc Biol*, **91**(4): 525-536.
- Pauls, S. D., et al. (2012). "The phosphoinositide 3-kinase signaling pathway in normal and malignant B cells: activation mechanisms, regulation and impact on cellular functions." *Front Immunol*, **3**: 224.
- Pelayo, R., et al. (2005). "Derivation of 2 categories of plasmacytoid dendritic cells in murine bone marrow." *Blood*, **105**(11): 4407-4415.
- Peperzak, V., et al. (2013). "Mcl-1 is essential for the survival of plasma cells." *Nat Immunol*, **14**(3): 290-297.
- Perl, A. (2013). "Oxidative stress in the pathology and treatment of systemic lupus erythematosus." *Nat Rev Rheumatol*, **9**(11): 674-686.
- Perry, D., et al. (2011). "Murine models of systemic lupus erythematosus." *J Biomed Biotechnol*, **2011**: 271694.

- Petersen-Mahrt, S. K., et al. (2002). "AID mutates E. coli suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification." *Nature*, **418**(6893): 99-103.
- Peterson, M. L. and R. P. Perry (1989). "The regulated production of mu m and mu s mRNA is dependent on the relative efficiencies of mu s poly(A) site usage and the c mu 4-to-M1 splice." *Mol Cell Biol*, **9**(2): 726-738.
- Phan, R. T. and R. Dalla-Favera (2004). "The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells." *Nature*, **432**(7017): 635-639.
- Pieper, K., et al. (2013). "B-cell biology and development." *J Allergy Clin Immunol*, **131**(4): 959-971.
- Pillai, S. and A. Cariappa (2009). "The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision." *Nat Rev Immunol*, **9**(11): 767-777.
- Poeck, H., et al. (2004). "Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help." *Blood*, **103**(8): 3058-3064.
- Pone, E. J., et al. (2012). "BCR-signalling synergizes with TLR-signalling for induction of AID and immunoglobulin class-switching through the non-canonical NF-kappaB pathway." *Nat Commun*, **3**: 767.
- Praprotnik, S., et al. (2008). "The curiously suspicious: infectious disease may ameliorate an ongoing autoimmune destruction in systemic lupus erythematosus patients." *J Autoimmun*, **30**(1-2): 37-41.
- Pretel, M., et al. (2014). "Drug-induced lupus erythematosus." *Actas Dermosifiliogr*, **105**(1): 18-30.
- Pridans, C., et al. (2008). "Identification of Pax5 target genes in early B cell differentiation." *J Immunol*, **180**(3): 1719-1728.
- Puga, I., et al. (2012). "B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen." *Nat Immunol*, **13**(2): 170-180.
- Puiffe, M. L., et al. (2007). "Characterization of ovarian cancer ascites on cell invasion, proliferation, spheroid formation, and gene expression in an in vitro model of epithelial ovarian cancer." *Neoplasia*, **9**(10): 820-829.
- Puskas, L. G., et al. (2005). "Gene profiling identifies genes specific for well-differentiated epithelial thyroid tumors." *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **51**(2): 177-186.
- Qi, L., et al. (2006). "TRB3 links the E3 ubiquitin ligase COP1 to lipid metabolism." *Science*, **312**(5781): 1763-1766.
- Radic, M. Z., et al. (1993). "Residues that mediate DNA binding of autoimmune antibodies." *J Immunol*, **150**(11): 4966-4977.
- Rahman, A. and D. A. Isenberg (2008). "Systemic lupus erythematosus." *N Engl J Med*, **358**(9): 929-939.
- Ramiscal, R. R. and C. G. Vinuesa (2013). "T-cell subsets in the germinal center." *Immunol Rev*, **252**(1): 146-155.
- Rauen, T., et al. (2011). "cAMP-responsive element modulator (CREM)alpha protein induces interleukin 17A expression and mediates epigenetic alterations at the interleukin-17A gene locus in patients with systemic lupus erythematosus." *J Biol Chem*, **286**(50): 43437-43446.
- Ray, A., et al. (2015). "IL-10-independent regulatory B-cell subsets and mechanisms of action." *Int Immunol*.
- Reap, E. A., et al. (1995). "Apoptosis abnormalities of splenic lymphocytes in autoimmune lpr and gld mice." *J Immunol*, **154**(2): 936-943.

- Rehberg, K., et al. (2014). "The serine/threonine kinase Ndr2 controls integrin trafficking and integrin-dependent neurite growth." *J Neurosci*, **34**(15): 5342-5354.
- Reimold, A. M., et al. (2001). "Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1." *Nature*, **412**(6844): 300-307.
- Reininger, L., et al. (1992). "Development of autoimmune disease in SCID mice populated with long-term "in vitro" proliferating (NZB x NZW)F1 pre-B cells." *J Exp Med*, **176**(5): 1343-1353.
- Relle, M., et al. (2015). "Genetics and novel aspects of therapies in systemic lupus erythematosus." *Autoimmun Rev*.
- Ren, Y., et al. (2003). "Increased apoptotic neutrophils and macrophages and impaired macrophage phagocytic clearance of apoptotic neutrophils in systemic lupus erythematosus." *Arthritis Rheum*, **48**(10): 2888-2897.
- Revy, P., et al. (2000). "Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2)." *Cell*, **102**(5): 565-575.
- Rogosch, T., et al. (2012). "IgA response in preterm neonates shows little evidence of antigen-driven selection." *J Immunol*, **189**(11): 5449-5456.
- Ronco, P. and H. Debiec (2012). "Pathogenesis of membranous nephropathy: recent advances and future challenges." *Nat Rev Nephrol*, **8**(4): 203-213.
- Roosnek, E. and A. Lanzavecchia (1991). "Efficient and selective presentation of antigen-antibody complexes by rheumatoid factor B cells." *J Exp Med*, **173**(2): 487-489.
- Rothenberg, E. V. (2014). "Transcriptional control of early T and B cell developmental choices." *Annu Rev Immunol*, **32**: 283-321.
- Rothlisberger, B., et al. (2007). "TRIB1 overexpression in acute myeloid leukemia." *Cancer Genet Cytogenet*, **176**(1): 58-60.
- Roubinian, J. R., et al. (1978). "Effect of castration and sex hormone treatment on survival, anti-nucleic acid antibodies, and glomerulonephritis in NZB/NZW F1 mice." *J Exp Med*, **147**(6): 1568-1583.
- Roundy, K. M., et al. (2010). "The in vitro derivation of phenotypically mature and diverse B cells from immature spleen and bone marrow precursors." *Eur J Immunol*, **40**(4): 1139-1149.
- Rowley, B., et al. (2007). "Autoreactive B-1 B cells: constraints on natural autoantibody B cell antigen receptors." *J Autoimmun*, **29**(4): 236-245.
- Rubin, R. L. (2005). "Drug-induced lupus." *Toxicology*, **209**(2): 135-147.
- Rubtsov, A. V., et al. (2010). "Genetic and hormonal factors in female-biased autoimmunity." *Autoimmun Rev*, **9**(7): 494-498.
- Ruer-Laventie, J. S., L. Schickel, JN. Soley, A. Duval, M. Knapp, AM. Marcellin, L. Lamon, D. Korganow, AS. Martin, T. Pasquali, JL. Soulas-Sprauel, P. (2015). "Overexpression of *Fkbp11*, a feature of lupus B cells, leads to B cell tolerance breakdown and initiates plasma cell differentiation." *Immunity, Inflammation and Disease*.
- Rui, L., et al. (2006). "ERK signaling is a molecular switch integrating opposing inputs from B cell receptor and T cell cytokines to control TLR4-driven plasma cell differentiation." *J Immunol*, **177**(8): 5337-5346.
- Rulten, S. L., et al. (2006). "The human FK506-binding proteins: characterization of human FKBP19." *Mamm Genome*, **17**(4): 322-331.

- Rus, V., et al. (2004). "Gene expression profiling in peripheral blood mononuclear cells from lupus patients with active and inactive disease." *Clin Immunol*, **112**(3): 231-234.
- Saito, T., et al. (2003). "Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development." *Immunity*, **18**(5): 675-685.
- Salloum, R. and T. B. Niewold (2011). "Interferon regulatory factors in human lupus pathogenesis." *Transl Res*, **157**(6): 326-331.
- Santiago-Raber, M. L., et al. (2008). "Evidence for genes in addition to Tlr7 in the Yaa translocation linked with acceleration of systemic lupus erythematosus." *J Immunol*, **181**(2): 1556-1562.
- Sarkar, P., et al. (2011). "Structural basis for regulation of the Crk signaling protein by a proline switch." *Nat Chem Biol*, **7**(1): 51-57.
- Sassi, A., et al. (2015). "Identification of immunodominant Leishmania major antigenic markers of the early C57BL/6 and BALB/c mice infection stages." *Parasite Immunol*.
- Satoh, T., et al. (2013). "Critical role of Trib1 in differentiation of tissue-resident M2-like macrophages." *Nature*, **495**(7442): 524-528.
- Sawalha, A. H., et al. (2004). "Association between systemic lupus erythematosus and Helicobacter pylori seronegativity." *J Rheumatol*, **31**(8): 1546-1550.
- Schatz, D. G. and Y. Ji (2011). "Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination." *Nat Rev Immunol*, **11**(4): 251-263.
- Schebesta, A., et al. (2007). "Transcription factor Pax5 activates the chromatin of key genes involved in B cell signaling, adhesion, migration, and immune function." *Immunity*, **27**(1): 49-63.
- Schmitz-Rohmer, D., et al. (2015). "NDR Kinases Are Essential for Somitogenesis and Cardiac Looping during Mouse Embryonic Development." *PLoS One*, **10**(8): e0136566.
- Schoenfeld, R., et al. (1992). "Demonstration of a B-lymphocyte mitogen produced by the Lyme disease pathogen, Borrelia burgdorferi." *Infect Immun*, **60**(2): 455-464.
- Schuster, H., et al. (2002). "Expansion of marginal zone B cells is not sufficient for the development of renal disease in NZBxNZW F1 mice." *Lupus*, **11**(5): 277-286.
- Sciammas, R., et al. (2006). "Graded expression of interferon regulatory factor-4 coordinates isotype switching with plasma cell differentiation." *Immunity*, **25**(2): 225-236.
- Scofield, R. H., et al. (2008). "Klinefelter's syndrome (47,XXY) in male systemic lupus erythematosus patients: support for the notion of a gene-dose effect from the X chromosome." *Arthritis Rheum*, **58**(8): 2511-2517.
- Seher, T. C. and M. Leptin (2000). "Tribbles, a cell-cycle brake that coordinates proliferation and morphogenesis during Drosophila gastrulation." *Curr Biol*, **10**(11): 623-629.
- Shaffer, A. L., et al. (2002). "Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program." *Immunity*, **17**(1): 51-62.
- Shaffer, A. L., et al. (2004). "XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation." *Immunity*, **21**(1): 81-93.
- Shai, R., et al. (1999). "Genome-wide screen for systemic lupus erythematosus susceptibility genes in multiplex families." *Hum Mol Genet*, **8**(4): 639-644.
- Sharova, L. V., et al. (2009). "Database for mRNA half-life of 19 977 genes obtained by DNA microarray analysis of pluripotent and differentiating mouse embryonic stem cells." *DNA Res*, **16**(1): 45-58.

- Shlomchik, M. J. and M. P. Madaio (2003). "The role of antibodies and B cells in the pathogenesis of lupus nephritis." *Springer Semin Immunopathol*, **24**(4): 363-375.
- Siekierka, J. J., et al. (1989). "FK-506, a potent novel immunosuppressive agent, binds to a cytosolic protein which is distinct from the cyclosporin A-binding protein, cyclophilin." *J Immunol*, **143**(5): 1580-1583.
- Simpson, N., et al. (2010). "Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus." *Arthritis Rheum*, **62**(1): 234-244.
- Sisirak, V., et al. (2014). "Genetic evidence for the role of plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus." *J Exp Med*, **211**(10): 1969-1976.
- Sitnicka, E., et al. (2003). "Complementary signaling through flt3 and interleukin-7 receptor alpha is indispensable for fetal and adult B cell genesis." *J Exp Med*, **198**(10): 1495-1506.
- Smith, C. D. and M. Cyr (1988). "The history of lupus erythematosus. From Hippocrates to Osler." *Rheum Dis Clin North Am*, **14**(1): 1-14.
- Solomou, E. E., et al. (2001). "Molecular basis of deficient IL-2 production in T cells from patients with systemic lupus erythematosus." *J Immunol*, **166**(6): 4216-4222.
- Soubeyrand, S., et al. (2013). "ERK1/2 regulates hepatocyte Trib1 in response to mitochondrial dysfunction." *Biochim Biophys Acta*, **1833**(12): 3405-3414.
- Srinivasan, L., et al. (2009). "PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival." *Cell*, **139**(3): 573-586.
- Stadanlick, J. E., et al. (2008). "Tonic B cell antigen receptor signals supply an NF-kappaB substrate for prosurvival BlyS signaling." *Nat Immunol*, **9**(12): 1379-1387.
- Stagakis, E., et al. (2011). "Identification of novel microRNA signatures linked to human lupus disease activity and pathogenesis: miR-21 regulates aberrant T cell responses through regulation of PDCD4 expression." *Ann Rheum Dis*, **70**(8): 1496-1506.
- Stavnezer, J. and C. E. Schrader (2014). "IgH chain class switch recombination: mechanism and regulation." *J Immunol*, **193**(11): 5370-5378.
- Steinberg, B. J., et al. (1982). "Ability of the xid gene to prevent autoimmunity in (NZB X NZW)F1 mice during the course of their natural history, after polyclonal stimulation, or following immunization with DNA." *J Clin Invest*, **70**(3): 587-597.
- Steinberg, E. B., et al. (1983). "Studies of congenic MRL-lpr/lpr.xid mice." *J Immunol*, **131**(6): 2789-2795.
- Sterner, R. M., et al. (2014). "The Pathogenesis of Lupus Nephritis." *J Clin Cell Immunol*, **5**(2).
- Strasser, A. and P. Bouillet (2003). "The control of apoptosis in lymphocyte selection." *Immunol Rev*, **193**: 82-92.
- Su, Q., et al. (2008). "Modulation of the eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase PERK by tyrosine phosphorylation." *J Biol Chem*, **283**(1): 469-475.
- Subramanian, S., et al. (2006). "A Tlr7 translocation accelerates systemic autoimmunity in murine lupus." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**(26): 9970-9975.
- Sullivan, K. E., et al. (2007). "The TNFalpha locus is altered in monocytes from patients with systemic lupus erythematosus." *Clin Immunol*, **123**(1): 74-81.
- Sun, S. C. (2008). "Deubiquitylation and regulation of the immune response." *Nat Rev Immunol*, **8**(7): 501-511.

- Sung, H. Y., et al. (2006). "Regulation of expression and signalling modulator function of mammalian tribbles is cell-type specific." *Immunol Lett*, **104**(1-2): 171-177.
- Sung, H. Y., et al. (2007). "Human tribbles-1 controls proliferation and chemotaxis of smooth muscle cells via MAPK signaling pathways." *J Biol Chem*, **282**(25): 18379-18387.
- Suzuki, K., et al. (2010). "Roles of B-1 and B-2 cells in innate and acquired IgA-mediated immunity." *Immunol Rev*, **237**(1): 180-190.
- Suzuki, N., et al. (1996). "Characterization of a germline Vk gene encoding cationic anti-DNA antibody and role of receptor editing for development of the autoantibody in patients with systemic lupus erythematosus." *J Clin Invest*, **98**(8): 1843-1850.
- Taher, T. E., et al. (2010). "Protein phosphorylation and kinome profiling reveal altered regulation of multiple signaling pathways in B lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus." *Arthritis Rheum*, **62**(8): 2412-2423.
- Takahashi, Y., et al. (2008). "TRB3 suppresses adipocyte differentiation by negatively regulating PPARgamma transcriptional activity." *J Lipid Res*, **49**(4): 880-892.
- Takahashi, Y., et al. (2001). "Fas is required for clonal selection in germinal centers and the subsequent establishment of the memory B cell repertoire." *Immunity*, **14**(2): 181-192.
- Takemori, T., et al. (2014). "Generation of memory B cells inside and outside germinal centers." *Eur J Immunol*, **44**(5): 1258-1264.
- Taylor, K. E., et al. (2008). "Specificity of the STAT4 genetic association for severe disease manifestations of systemic lupus erythematosus." *PLoS Genet*, **4**(5): e1000084.
- Teague, B. N., et al. (2007). "Cutting edge: Transitional T3 B cells do not give rise to mature B cells, have undergone selection, and are reduced in murine lupus." *J Immunol*, **178**(12): 7511-7515.
- Teichmann, L. L., et al. (2010). "Dendritic cells in lupus are not required for activation of T and B cells but promote their expansion, resulting in tissue damage." *Immunity*, **33**(6): 967-978.
- Theofilopoulos, A. N. and F. J. Dixon (1985). "Murine models of systemic lupus erythematosus." *Adv Immunol*, **37**: 269-390.
- Tiller, T., et al. (2007). "Autoreactivity in human IgG+ memory B cells." *Immunity*, **26**(2): 205-213.
- Todd, D. J., et al. (2009). "XBP1 governs late events in plasma cell differentiation and is not required for antigen-specific memory B cell development." *J Exp Med*, **206**(10): 2151-2159.
- Tokoyoda, K., et al. (2004). "Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development." *Immunity*, **20**(6): 707-718.
- Trevisan, G. L., et al. (2006). "Using cDNA microarrays to identify human CD19(+) B cell gene products (ESTs) originated from systemic lupus erythematosus susceptibility loci." *Autoimmun Rev*, **5**(5): 319-323.
- Tsokos, G. C. (2011). "Systemic lupus erythematosus." *N Engl J Med*, **365**(22): 2110-2121.
- Tsokos, G. C., Lahita R., Jill B., Takao K. (2010). Systemic Lupus Erythematosus, 5th edition.
- Tsubata, T. (2012). "Role of inhibitory BCR co-receptors in immunity." *Infect Disord Drug Targets*, **12**(3): 181-190.
- Tsuru, A., et al. (2013). "Negative feedback by IRE1beta optimizes mucin production in goblet cells." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**(8): 2864-2869.
- Turner, S. D., et al. (2011). "Knowledge-driven multi-locus analysis reveals gene-gene interactions influencing HDL cholesterol level in two independent EMR-linked biobanks." *PLoS One*, **6**(5): e19586.

- Turunen, S. P., et al. (2012). "Recognition of *Porphyromonas gingivalis* gingipain epitopes by natural IgM binding to malondialdehyde modified low-density lipoprotein." *PLoS One*, **7**(4): e34910.
- Usui, K., et al. (2012). "Isolation and characterization of naive follicular dendritic cells." *Mol Immunol*, **50**(3): 172-176.
- Usui, T., et al. (1997). "Overexpression of B cell-specific activator protein (BSAP/Pax-5) in a late B cell is sufficient to suppress differentiation to an Ig high producer cell with plasma cell phenotype." *J Immunol*, **158**(7): 3197-3204.
- van Spriël, A. B., et al. (2012). "The tetraspanin CD37 orchestrates the alpha(4)beta(1) integrin-Akt signaling axis and supports long-lived plasma cell survival." *Sci Signal*, **5**(250): ra82.
- Varbo, A., et al. (2011). "TRIB1 and GCKR polymorphisms, lipid levels, and risk of ischemic heart disease in the general population." *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **31**(2): 451-457.
- Vettermann, C. and M. S. Schlissel (2010). "Allelic exclusion of immunoglobulin genes: models and mechanisms." *Immunol Rev*, **237**(1): 22-42.
- Victoria, G. D., et al. (2010). "Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter." *Cell*, **143**(4): 592-605.
- Vinuesa, C. G., et al. (2009). "Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease." *Nat Rev Immunol*, **9**(12): 845-857.
- von Freeden-Jeffry, U., et al. (1995). "Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine." *J Exp Med*, **181**(4): 1519-1526.
- Wakioka, T., et al. (2001). "Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling." *Nature*, **412**(6847): 647-651.
- Walter, P. and D. Ron (2011). "The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation." *Science*, **334**(6059): 1081-1086.
- Wang, S., et al. (2013). "An enhancer element harboring variants associated with systemic lupus erythematosus engages the TNFAIP3 promoter to influence A20 expression." *PLoS Genet*, **9**(9): e1003750.
- Wang, Y., et al. (2002). "The physiologic role of CD19 cytoplasmic tyrosines." *Immunity*, **17**(4): 501-514.
- Waters, H., et al. (1971). "The distribution of HL-A histocompatibility factors and genes in patients with systemic lupus erythematosus." *Tissue Antigens*, **1**(2): 68-73.
- Wellmann, U., et al. (2001). "An Ig mu-heavy chain transgene inhibits systemic lupus erythematosus immunopathology in autoimmune (NZB x NZW)F1 mice." *Int Immunol*, **13**(12): 1461-1469.
- Wilkin, F., et al. (1997). "Characterization of a phosphoprotein whose mRNA is regulated by the mitogenic pathways in dog thyroid cells." *Eur J Biochem*, **248**(3): 660-668.
- Wither, J. E., et al. (2005). "Colocalization of expansion of the splenic marginal zone population with abnormal B cell activation and autoantibody production in B6 mice with an introgressed New Zealand Black chromosome 13 interval." *J Immunol*, **175**(7): 4309-4319.
- Wu, M., et al. (2003). "SINK is a p65-interacting negative regulator of NF-kappaB-dependent transcription." *J Biol Chem*, **278**(29): 27072-27079.
- Xiao, C., et al. (2007). "MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb." *Cell*, **131**(1): 146-159.
- Xiao, C., et al. (2008). "Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes." *Nat Immunol*, **9**(4): 405-414.

- Xiao, S., et al. (2012). "Defect in regulatory B-cell function and development of systemic autoimmunity in T-cell Ig mucin 1 (Tim-1) mucin domain-mutant mice." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**(30): 12105-12110.
- Xiao, X., et al. (2014). "Common variable immunodeficiency and autoimmunity--an inconvenient truth." *Autoimmun Rev*, **13**(8): 858-864.
- Xu, L., et al. (2012). "CpG oligonucleotides induce the differentiation of CD4(+)Th17 cells by triggering plasmacytoid dendritic cells in adoptively cell transfer immunotherapy." *Immunol Lett*, **142**(1-2): 55-63.
- Yamanishi, S., et al. (2006). "Implications for induction of autoimmunity via activation of B-1 cells by *Helicobacter pylori* urease." *Infect Immun*, **74**(1): 248-256.
- Yang, J., et al. (2009). "Th17 and natural Treg cell population dynamics in systemic lupus erythematosus." *Arthritis Rheum*, **60**(5): 1472-1483.
- Yang, L., et al. (1992). "Evidence for B-lymphocyte mitogen activity in *Borrelia burgdorferi*-infected mice." *Infect Immun*, **60**(8): 3033-3041.
- Yang, X. W., et al. (2012). "Combination of anti-C1q and anti-dsDNA antibodies is associated with higher renal disease activity and predicts renal prognosis of patients with lupus nephritis." *Nephrol Dial Transplant*, **27**(9): 3552-3559.
- Yang, Y., et al. (2007). "Gene copy-number variation and associated polymorphisms of complement component C4 in human systemic lupus erythematosus (SLE): low copy number is a risk factor for and high copy number is a protective factor against SLE susceptibility in European Americans." *Am J Hum Genet*, **80**(6): 1037-1054.
- Yaniv, G., et al. (2015). "A volcanic explosion of autoantibodies in systemic lupus erythematosus: a diversity of 180 different antibodies found in SLE patients." *Autoimmun Rev*, **14**(1): 75-79.
- Yap, D. Y. and K. N. Lai (2015). "Pathogenesis of renal disease in systemic lupus erythematosus--the role of autoantibodies and lymphocytes subset abnormalities." *Int J Mol Sci*, **16**(4): 7917-7931.
- Yarkoni, Y., et al. (2010). "Molecular underpinning of B-cell anergy." *Immunol Rev*, **237**(1): 249-263.
- Yasutomo, K., et al. (2001). "Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus." *Nat Genet*, **28**(4): 313-314.
- Yokoyama, T., et al. (2010). "Trib1 links the MEK1/ERK pathway in myeloid leukemogenesis." *Blood*, **116**(15): 2768-2775.
- Yokoyama, T. and T. Nakamura (2011). "Tribbles in disease: Signaling pathways important for cellular function and neoplastic transformation." *Cancer Sci*, **102**(6): 1115-1122.
- Yokoyama, T., et al. (2012). "Identification of TRIB1 R107L gain-of-function mutation in human acute megakaryocytic leukemia." *Blood*, **119**(11): 2608-2611.
- Yoshida, A., et al. (2013). "COP1 targets C/EBPalpha for degradation and induces acute myeloid leukemia via Trib1." *Blood*, **122**(10): 1750-1760.
- Yoshida, H., et al. (2001). "XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor." *Cell*, **107**(7): 881-891.
- Yoshimoto, M., et al. (2011). "Embryonic day 9 yolk sac and intra-embryonic hemogenic endothelium independently generate a B-1 and marginal zone progenitor lacking B-2 potential." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**(4): 1468-1473.
- Yu, C. F., et al. (2010). "Human plasmacytoid dendritic cells support Th17 cell effector function in response to TLR7 ligation." *J Immunol*, **184**(3): 1159-1167.

- Yu, H., et al. (2013). "Deletion of STK40 protein in mice causes respiratory failure and death at birth." *J Biol Chem*, **288**(8): 5342-5352.
- Yu, K., et al. (2003). "R-loops at immunoglobulin class switch regions in the chromosomes of stimulated B cells." *Nat Immunol*, **4**(5): 442-451.
- Zhang, D. J., et al. (2005). "Selective expression of the Cre recombinase in late-stage thymocytes using the distal promoter of the Lck gene." *J Immunol*, **174**(11): 6725-6731.
- Zhang, J., et al. (2001). "Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus." *J Immunol*, **166**(1): 6-10.
- Zhang, Y., et al. (2005). "Identification of tribbles homolog 2 as an autoantigen in autoimmune uveitis by phage display." *Mol Immunol*, **42**(11): 1275-1281.
- Zhang, Z., et al. (2004). "The molecular basis and biological significance of VH replacement." *Immunol Rev*, **197**: 231-242.
- Zhang, Z., et al. (2010). "Global H4 acetylation analysis by ChIP-chip in systemic lupus erythematosus monocytes." *Genes Immun*, **11**(2): 124-133.
- Zhao, M., et al. (2010). "Hypomethylation of IL10 and IL13 promoters in CD4+ T cells of patients with systemic lupus erythematosus." *J Biomed Biotechnol*, **2010**: 931018.
- Zhou, X. J., et al. (2011). "Genetic association of PRDM1-ATG5 intergenic region and autophagy with systemic lupus erythematosus in a Chinese population." *Ann Rheum Dis*, **70**(7): 1330-1337.
- Zhu, X., et al. (2004). "Analysis of the major patterns of B cell gene expression changes in response to short-term stimulation with 33 single ligands." *J Immunol*, **173**(12): 7141-7149.
- Zuo, X. B., et al. (2014). "Variants in TNFSF4, TNFAIP3, TNIP1, BLK, SLC15A4 and UBE2L3 interact to confer risk of systemic lupus erythematosus in Chinese population." *Rheumatol Int*, **34**(4): 459-464.

ÉTUDE PAR GÉNOMIQUE FONCTIONNELLE DES CONSÉQUENCES DE LA SUREXPRESSION DE *TRIB1* ET *FKBP11* DANS LES LYMPHOCYTES B AU COURS DU LUPUS ÉRYTHÉMATEUX SYSTÉMIQUE

Le lupus érythémateux systémique est une maladie auto-immune systémique caractérisée par des lésions multiviscérales et la production d'autoanticorps (ex : anticorps anti-ADN double brin (db)) par les lymphocytes B (LB) qui jouent un rôle central dans la pathogénèse lupique. L'étiologie du lupus est à la fois environnementale et génétique. **Dans le but d'identifier des anomalies génétiques intrinsèques aux LB**, le laboratoire a réalisé une analyse transcriptomique sur les LB de patients lupiques en phase quiescente et a montré une surexpression des gènes *TRIB1* et *FKBP11* comparé aux sujets sains. Afin d'étudier les conséquences de la surexpression de ces gènes sur la fonction des LB et le développement d'une autoimmunité, nous avons généré une lignée murine conditionnelle spécifique, surexprimant *Trib1* dans les LB à partir du stade précoce pro-préB et une lignée murine transgénique surexprimant *Fkbp11* de façon ubiquitaire. **La surexpression de *Trib1*** ne modifie pas l'homéostasie lymphocytaire mais induit une diminution de **la production de certains Ig** : 1) les IgG1 dans le sérum à l'état basal et après une stimulation de LB *in vitro* ; 2) les IgM anti-OVA (Ovalbumine) après immunisation *in vivo* avec de l'OVA ; 3) les IgM anti-ADNdb dans le cas d'une immunisation par le LPS. Cette anomalie de la production des Ig semble provenir d'un **défaut de sécrétion**. De plus nous avons généré une lignée cellulaire B surexprimant *Trib1* qui nous a permis de confirmer le phénotype et d'identifier des partenaires potentiels de *Trib1* par technique de protéomique. **La surexpression du gène *Fkbp11***, est, quant à elle, suffisante à induire des signes de la maladie lupique chez la souris âgée de 8 mois, tels qu'une **rupture de tolérance** (caractérisée par la production d'autoanticorps) et une **initiation de la différenciation plasmocytaire**. **En conclusion, *Trib1* pourrait exercer un rôle d'immunosupresseur** et sa surexpression dans les LB lupiques pourrait constituer un nouveau mécanisme de régulation des LB pendant la phase de rémission du lupus, alors que *Fkbp11* semble **contribuer à la pathologie lupique**. La description de ces deux nouvelles voies biologiques pourrait mener à une meilleure compréhension de la maladie et conduire à de potentielles applications thérapeutiques.

MOTS-CLES : *Lupus Erythémateux Systémique, Lymphocyte B, Trib1, Fkbp11, modèles murins, génomique fonctionnelle*

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by an inflammation of various tissues and a high production of autoantibodies (autoAb) (for example: anti-double-stranded (ds)DNA) by B cells, central actors in the physiopathology of lupus. The etiology of SLE includes both genetics and environmental factors. **Looking for B cell genetic abnormalities during lupus**, our B cell microarray analysis in quiescent SLE patients pointed to the overexpression of *TRIB1* and *FKBP11* compared to B cells from healthy controls. In order to study the consequences of these expression deregulations on B cell function and autoimmunity development, we generated a B-cell specific *Trib1*-KI mouse line, overexpressing *Trib1* in B cells, starting from a very immature stage (pro-pre B) and a transgenic mouse overexpressing *Fkbp11* ubiquitously. ***Trib1* overexpression** induces a normal B cell homeostasis but a decrease in **the production of some immunoglobulins (Ig)**: 1) IgG1 subclass in the serum, at a basal level and after an *in vitro* stimulation of splenic B cells; 2) Anti-OVA (Ovalbumine) IgM after immunization *in vivo* with OVA; 3) Anti-dsDNA IgM after immunization with LPS. This abnormal production of Ig seems to be linked to a **defect in Ig secretion process**. In addition, we developed a murine B cell line overexpressing *Trib1* that let us to confirm the Ig production deficiency and to identify potential *Trib1*'s partners in B cells. In contrast, ***Fkbp11* overexpression**, leads to some features of lupus disease in 8-month-aged-mice, including a **tolerance breakdown** (characterized by autoantibody production) and **the initiation of plasma cell differentiation**. **In conclusion, *Trib1* could exert an immunosuppressive role** and its overexpression in SLE could constitute a new mechanism of B cell regulation during remission phases, whereas *Fkbp11* seems rather to **contribute to lupus physiopathology**. Thus, the description of these two biological pathways could bring new insights into the comprehension of lupus disease and could also potentially lead to the development of new therapeutic applications.

Key words: *Systemic Lupus Erythematosus, B cell, Trib1, Fkbp11, murine models, functional genomics*