



HAL
open science

Etude du mécanisme d'action chez l'homme d'un peptide immunomodulateur de la maladie lupique

Maud Wilhelm

► **To cite this version:**

Maud Wilhelm. Etude du mécanisme d'action chez l'homme d'un peptide immunomodulateur de la maladie lupique. Immunologie. Université de Strasbourg, 2016. Français. NNT : 2016STRAJ034 . tel-02003413

HAL Id: tel-02003413

<https://theses.hal.science/tel-02003413v1>

Submitted on 1 Feb 2019

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.

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

THÈSE

Présentée par **Maud WILHELM**

Soutenue publiquement le **5 septembre 2016**

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

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

Spécialité : **Immunologie**

Etude du mécanisme d'action chez l'homme d'un peptide immunomodulateur de la maladie lupique

THÈSE dirigée par :

Madame le Professeur Sylviane Muller

Institut de Biologie Cellulaire et Moléculaire (IBMC), Immunologie et Chimie Thérapeutique, CNRS UPR3572, Strasbourg, France

Directrice de thèse

Membres du JURY :

Monsieur le Professeur Mathias Faure

Université Lyon 1, INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS-Lyon, CIRI, Lyon, France

Rapporteur Externe

Monsieur le Professeur Guido Valesini

Department of Internal Medicine and Medical Discipline, Rheumatology unit, «Sapienza» University of Rome, Italy

Rapporteur Externe

Madame le Docteur Susan Chan

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), INSERM U964, CNRS UMR 7104, Université de Strasbourg, Illkirch, France

Rapporteur Interne

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les Professeurs Mathias Faure et Guido Valesini ainsi que le Docteur Susan Chan d'avoir accepté de lire et de juger ce travail de thèse.

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés dans l'unité de recherche « Immunologie et chimie thérapeutique » à Strasbourg sous la direction du Professeur Sylviane Muller. J'aimerais la remercier du fond du cœur de m'avoir accueillie au laboratoire et de m'avoir permis de réaliser mon stage de Master 2 ainsi que ma thèse dans son équipe. Sa confiance à mon égard et ses nombreux conseils m'ont permis d'évoluer aussi bien scientifiquement qu'humainement.

J'adresse mes remerciements à la région Grand Est ainsi qu'à ImmuPharma pour le soutien financier apporté à ce projet de thèse. Je remercie également tous les médecins des hôpitaux universitaires de Strasbourg qui ont participé à ces travaux en recrutant les patients.

Je tiens à remercier tout particulièrement le « seigneur de l'autophagie » Frédéric Gros, mon premier professeur d'immunologie, sans qui je ne serais pas là aujourd'hui. Ton appui durant ces 3 années de thèse ainsi que nos nombreuses discussions m'ont été d'une aide précieuse.

J'adresse une pensée à tous mes collègues/amis. Je vous suis entièrement reconnaissante de m'avoir fait passer 4 belles années à vos côtés. Je pense bien évidemment à l'équipe de choc (alias « les organisateurs de soirées ») : ma très chère Diane (merci à toi pour tous ces moments que nous avons passé toutes les deux dans le bocal), ma grande amie Cécile, mon collaborateur Matthieu et le meilleur des chimistes Adriano (alias C2L). Je n'oublis pas Benjamin (le blond) qui m'a remplacé au bureau (le chanceux), Delphine (qui fera prochainement partie des nôtres à l'IBMC), Farouk et Mélanie.

Je remercie également les autres membres du laboratoire (j'espère n'oublier personne) pour leur bonne humeur : Hayet (ma deuxième maman), Hélène, Fanny M., Astrid, Monique, Delphine, Jean-Daniel, Chris, Evelynne, Vincent, Olivier, Fanny B., les chimistes ainsi que les membres de l'IPCB.

Merci à Isabelle, qui a toujours su gérer (très diplomatiquement) tous les soucis du labo.

Une pensée pour mes anciens compagnons du 153 : Carole, Johan et Benjamin V. qui ont brillamment réussi leurs thèses grâce à (je pense) l'ambiance très studieuse qui régnait au bureau. J'espère que vous serez fiers de ce que je suis devenue : une grande fille !

Mais aussi une pensée pour mes premières voisines de bureau : Marion et Flo.

Enfin, j'aimerais exprimer toute ma gratitude à ma famille. Merci mamie de m'avoir préparé tous ces bons petits plats alsaciens depuis que je suis à Strasbourg. Mais surtout, je remercie mes parents qui me soutiennent depuis toujours, ainsi que ma sœur jumelle (thésarde à l'IBMC) et mon chéri pour m'avoir poussé à dépasser mes limites. Je vous remercie d'avoir essayé de comprendre mon travail, même si la tâche n'était pas gagnée ! Enfin je remercie tous ceux qui m'ont soutenu de près ou de loin. Je pense notamment à toutes mes copines du lycée et de la fac.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

LISTE DES PUBLICATIONS

INTRODUCTION 1

Partie 1 :

LE LUPUS, UNE MALADIE AUTO-IMMUNE POLYMORPHE AUX NOMBREUSES APPROCHES THERAPEUTIQUES

1. <u>Lupus érythémateux disséminé : Généralités</u>	<u>1</u>
1.1. Définition du lupus	1
1.1.1. Description du lupus et de l'immunité	1
1.1.2. Le diagnostic du LED	3
1.1.3. Pronostic de la maladie	4
1.2. Epidémiologie	5
1.3. Signes cliniques	5
1.3.1. Signes généraux	6
1.3.2. Signes dermatologiques	7
1.3.3. Signes rhumatologiques	8
1.3.4. Signes rénaux	8
1.3.5. Signes vasculaires	8
1.3.6. Signes pulmonaires et cardiaques	8
1.3.7. Signes neurologiques	9
1.3.8. Signes hématologiques	9
1.4. Physiopathologie	9

1.4.1.	Influence des facteurs génétiques	9
1.4.2.	Influence des facteurs environnementaux	13
1.4.3.	Influence des facteurs hormonaux	14
1.4.4.	Mécanismes immunologiques	14
1.4.4.1.	L'apoptose, source majeure d'autoantigènes	14
1.4.4.2.	Activation de l'immunité innée	18
1.4.4.3.	Activation de l'immunité adaptative	22
1.4.4.3.1.	<i>Le rôle des lymphocytes T dans le lupus</i>	22
1.4.4.3.2.	<i>Le rôle des lymphocytes B dans le lupus</i>	29
1.4.4.4.	Les autoanticorps, responsables de nombreuses atteintes	34
2.	Traitements actuels du lupus	36
2.1.	Les traitements non spécifiques	36
2.1.1.	Les traitements conventionnels	36
2.1.2.	Les immunosuppresseurs	37
2.2.	Les traitements spécifiques	38
2.2.1.	Les molécules commercialisées	38
2.2.2.	Les molécules en essais cliniques	40

Partie 2 :

<p align="center">UNE NOUVELLE STRATEGIE THERAPEUTIQUE : LE PEPTIDE P140, UN IMMUNOMODULATEUR DE LA MALADIE LUPIQUE</p>
--

1.	La découverte du peptide P140	45
2.	Plusieurs voies d'action du peptide P140	48
2.1.	Entrée du peptide dans les cellules immunitaires	48

2.2. Le peptide P140 et l'autophagie	50
2.2.1. Définition de l'autophagie	50
2.2.2. L'autophagie et son implication au cours de l'autoimmunité	62
2.2.3. Effet du peptide P140 sur l'autophagie	68
2.3. Le peptide P140 et la présentation antigénique par le CMH-II	69
2.3.1. La présentation antigénique	69
2.3.1.1. Structure du CMH-II	71
2.3.1.2. Sources d'antigènes pour la présentation par le CMH-II	72
2.3.1.3. Génération des peptides se liant aux molécules du CMH-II	72
2.3.1.4. Chargement des peptides sur les molécules du CMH-II	76
2.3.2. Rôle de la présentation antigénique au cours de l'autoimmunité	78
2.3.3. Effet du peptide P140 sur la présentation antigénique	80
3. Le peptide P140, en essai clinique	81
3.1. Résumé des résultats obtenus lors des phases IIa et IIb	81
CONTEXTE ET OBJECTIF DE L'ETUDE	83
RESULTATS	85
Chapitre 1 : Down-regulation of excessive chaperone-mediated autophagy by a small peptide normalizes the immune responses in lupus	85
1.1. Avant propos	85
1.2. Publication n°1	86
1.3. Commentaires relatifs à la publication	132
Chapitre 2 : Target autophagy as a novel therapeutic strategy in autoimmune diseases	135
1.1. Avant propos	135
1.2. Publication n°2	136

Chapitre 3 : Lupus regulator peptide P140 represses B-cell antigen presentation and differentiation	165
1.1. Avant propos	165
1.2. Publication n°3	166
1.3. Commentaires relatifs à la publication	198
1.3.1. Entrée du peptide P140 dans les cellules B humaines	198
1.3.2. Effet du peptide P140 sur l'expression des molécules du CMH-II	198
1.3.3. Effet du peptide P140 sur l'autophagie	199
1.3.4. Effet du peptide P140 sur la différenciation lymphocytaire B	200
<u>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</u>	203
1.1. Historique de ma thèse	203
1.2. Conclusion et discussion générale	207
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	209

LISTE DES ABREVIATIONS

A

ACR : « American College of Rheumatologie »
ADN : Acide désoxyribonucléique
AEP : « Asparaginyl endopeptidase »
A.I.N.S : Anti-inflammatoire non stéroïdien
ANA : « Antibodies anti-nuclear »
AP-1 : « Activator protein 1 »
APRIL : « A proliferation-inducing ligand »
ARN : Acide ribonucléique
Atg : « Autophagy-related gene »

B

BAFF : « B cell-activating factor »
BANK1 : « B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1 »
BAV : Bloc auriculo ventriculaire
Bcl-2 : « B cell lymphoma 2 »
BCMA : « B cell maturation antigen »
BCR : « B cell receptor »
BECN1 : « Beclin-1 gene »
BILAG : « British isles lupus activity group »
BLK : « B lymphocyte kinase »
BLYS : « B lymphocyte stimulator »
Breg : Lymphocyte B régulateur

C

CBA/J : Lignée murine
CD : « Cluster of differentiation »
CD : Maladie de Crohn
CG : Centre germinatif
CLIP : « Class II-associated invariant chain peptide »
CMA : Autophagie médiée par les chaperonnes
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA : Cellule présentatrice d'antigène
CQ : Chloroquine
CTLA4 : « Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 »
CTSB/D : Cathepsine B/D
CXCR : « C-X-C chemokine receptors »

D

DAMP : Danger associated molecular pattern
Db : Double brin
DC : Cellule dendritique
DRAM1 : « DNA damage-regulated autophagy modulator 1 »
DSG : 15-deoxyspergualine

E

EBNA-1 : « Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 »
EF1 α : « Elongation factor 1 α »
ELISA : « Enzyme-like immunosorbent assay »
EM : Microscopie électronique
ERK1/2 : « Extracellular signal-regulated kinase »
EST1 : « Ever shorter telomeres 1 »
EULAR : « European league against rheumatism »

F

Fc : Fragment constant
FDA : « Food and Drugs Administration »
FIP200 : « Focal adhesion protein family interacting protein of 200 kDa »
FM : Microscopie à fluorescence
FKBP12 : « FK506-binding protein of 12 kDa »
Foxp3 : « Forkhead box P3 »

G

GAD : « Glutamate decarboxylase »
GFAP : « Glial fibrillary acidic protein »
GILT : « Gamma interferon inducible lysosomal thiol reductase »
GTP : Guanosine triphosphate
G β L : « G protein β -subunit-like protein »
GWAS : « Genome wide association »

H

Hep2 : « Human epithelial type 2 »
HCQ : Hydroxychloroquine
Hip : « HSPA8 interacting protein »
HLA : « Human leukocyte antigen »
HMGB1 : « high mobility group protein »
Hop : « HSPA8/HSP90-organizing protein »
HPLC : Chromatographie liquide à haute performance
HSP : « Heat shock protein »

I

ICOS : « inducible T-cell costimulator-ligand »
IFIH1 : « Interferon-induced helicase 1 »
IFN-I : Interféron de type I

IFNAR : « Interferon α/β receptor »
Ig : Immunoglobuline
IKZF1 : « IKAROS family zinc finger 1 »
IL : Interleukine
IRF : « Interferon regulatory factor »
IRGM : « Immunity-related GTPase family M protein »
ITAM : « Immunoreceptor tyrosine-based activation motif »
Itch : « Itchy E3 ubiquitin protein ligase »

J

JAK : « Janus kinase »

L

LAI : « Lupus activity index »
LAMP : « Lysosome-associated membrane protein »
LAP : « LC3-associated phagocytosis »
LAT : « Linker of activated T cells »
LB : Lymphocyte B
LC3 : « Light chain 3 »
LED : Lupus érythémateux disséminé
LT : Lymphocyte T
LPS : Lipopolysaccharide
Lpr : Lymphoprolifération

M

MAPK : « Mitogen-activated protein kinase »
MIIC : « MHC class II compartment »
MRL : « Murphy roths large »
MS : « Multiple sclerosis »
mTOR : « Mammalian target of rapamycin »

N

NFAT : « Nuclear factor of activated T cells »
NCF2 : « Neutrophil cytosolic factor 2 »
NET : « Neutrophil extracellular trap »
NF- κ B : « Nuclear-kappa B »
NK : « Natural killer »
NLR : « NOD like receptors »
NZB : « New zealand black »
NZW : « New zealand white »

O

OMS : Organisation mondiale de la santé

P

PAMP : « Pathogen-associated molecular pattern »
PAS : Structure pré-autophagosomale
Pax2 : « Paired box gene 2 »
PBMC : Cellules mononucléées du sang périphérique
PCR : « Polymerase chain reaction »
PD-1 : « Programmed death-1 »
PD-L1 : « Programmed death ligand-1 »
pDC : Cellule dendritique plasmacytoïde
PGA : « Physician's global assesment »
PHLPP1 : « Pleckstrin homology leucine-rich repeat protein phosphatase 1 »
PI3K : « Phosphatidylinositol 3-kinase »
PIP3 : « Phosphatidylinositol-3-phosphate »
PM : « Polymyositis »
PRAS40 : « Proline-rich Akt substrate of 40 kDa »
PRDM1 : « PR domain 1 »
PROTOR : « protein observed with rictor »
PRR : « Pattern-recognition receptor »
PTPN22 : « protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 »
PXK : « PX domain containing kinase »

R

RA : Arthrite rhumatoïde
RAGE : « Receptor for advanced glycation end products »
Raptor : « Regulatory associated protein of mTOR »
RCAN1 : « Regulator of calcineurin 1 »
RE : Réticulum endoplasmique
Rictor : « rapamycin-sensitive companion of mTOR »
RLR : « Rig-like receptor »
RNM : Résonance magnétique nucléaire
RNP : « Ribonucleoprotein »

S

SCLA5 : « Solute-linked carrier family A1 member 5 »
SIN1 : « SAPK-interacting protein 1 »
SLAM : « Systemic lupus activity measure »
SLEDAI : « Systemic lupus erythematosus disease activity index »
SNP : « Single nucleotide polymorphism »

snRNP : « Spliceosomal nuclear ribonucleoprotein »
SQSTM1 : « Sequestosome-1 »
SR : « Serine/arginine-rich »
SRI : « SLE responder index »
STAT4 : « Signal transducer and activator factor »
SYK : « Spleen tyrosine kinase »

T

TACI : « Transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor »
TCR : Récepteur des cellules T
Tfh : « Follicular helper T cell »
TGF- β : « Tumor growth factor β »
Th : Lymphocyte T helper
TLR : « Toll-like receptor »
TNF- α : « Tumor necrosis factor α »
TNFSF4 : « Tumor necrosis factor superfamily member 4 »
TNIP1 : « TNFAIP3-interacting protein 1 »
Treg : Cellule T régulatrice
TYK2 : « Tyrosine kinase 2 »

U

U1snRNP : « U1 small nuclear ribonucleoprotein »
UBE : « Ubiquitin protein »
UKL1/2 : « UNC-51-like kinase 1/2 »
UV : Ultraviolets
UVRAG : « UV-radiation resistance-associated gene »

V

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
VSP15/34 : « Vacuolar protein sorting 15/34 »

W

WB : « Western blot »
WIPI-1 : « WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 1 »

Z

ZAP-70 : « Zeta-chain-associated protein kinase 70 »

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figures

Figure 1 : Pathogénèse du lupus	17
Figure 2 : L'implication de l'IFN- α au cours du lupus	21
Figure 3 : Comparaison de la voie de signalisation du TCR entre un individu sain et un patient atteint de LED	25
Figure 4 : Dérégulation de la balance entre les cellules Th17 et Tregs chez les patients lupiques	26
Figure 5 : Représentation schématique d'un centre germinatif: rôle des T _{fh} et de l'IL-21 au cours du LED	28
Figure 6 : Les différentes fonctions des LB	29
Figure 7 : Le développement des LB	30
Figure 8 : Les différents traitements proposés aux patients lupiques en fonction des atteintes et de la gravité de la maladie	40
Figure 9 : Les traitements potentiels du LED : leurs cibles et mécanismes d'action	42
Figure 10 : Structure et stabilité des peptides 131-151 et P140	48
Figure 11 : Les trois principales voies autophagiques : la macroautophagie, la CMA et la microautophagie	51
Figure 12 : Les différentes étapes de la macroautophagie	52
Figure 13 : Régulation de la macroautophagie par la voie mTOR	54
Figure 14 : Régulation dynamique de la macroautophagie grâce au complexe Beclin-1/VSP15/VSP34	55
Figure 15 : La CMA, un processus dynamique impliqué dans la dégradation de protéines cibles	58
Figure 16 : Régulation de l'activité de la CMA	60
Figure 17 : Augmentation du nombre d'autophagosomes dans les LT de patients lupiques	64
Figure 18 : Les régulateurs pharmacologiques de l'autophagie	67
Figure 19 : Structure des molécules du CMH-II	71
Figure 20 : La macroautophagie, l'une des sources majeures de peptides pour leur présentation par les molécules du CMH-II	75
Figure 21 : La présentation antigénique par les molécules du CMH-II	77
Figure 22 : Rôle de PD-1 dans les mécanismes de tolérance des cellules T	79
Figure 23 : Pourcentage de patients lupiques ayant répondu au traitement P140 selon le score du SLEDAI	82
Figure 24 : Modèle d'action proposé du peptide P140 chez l'homme	201

Tableaux

Tableau 1 : Critères de classification du LED proposés par l'ACR en 1982 et modifiés en 1997	4
Tableau 2 : Calcul du SLEDAI	7
Tableau 3 : Liste des principaux gènes de susceptibilité au LED	10
Tableau 4 : Diversité des autoanticorps retrouvés chez les patients atteints de LED	34
Tableau 5 : Liste des maladies autoimmunes où l'autophagie est dérégulée	65

LISTE DES PUBLICATIONS

- Schall, N., **Wilhelm, M.**, Dali, H., Jouvin-Marche, E., and Muller, S. Down-regulation of excessive chaperone-mediated autophagy by a small peptide normalizes the immune responses in lupus, article soumis

- **Wilhelm, M.** and Muller, S. (2016) Target autophagy as a novel therapeutic strategy in autoimmune disease. Chapter 13 In: Autophagy networks in inflammation. Springer International Publishing Switzerland, Maiuri, M.C and De Stefano, D. (Eds), ISBN 978-3-319-30077-1, pp 267-295.

- **Wilhelm, M.**, Wang, F., Schall, N., Kleinmann, J.F., Faludi, M., Dombi, E., Diot, A., Buron, N., Borgne-Sanchez, A., Nashi, E.P., Sibilias, J., Martin, T., Pasquali, J.P., Schaeffer, E., Poulton, J. and Muller, S. Lupus regulator peptide P140 represses B-cell antigen presentation and differentiation, article en préparation

Partie 1

LE LUPUS, UNE MALADIE AUTOIMMUNE POLYMORPHE AUX NOMBREUSES APPROCHES THERAPEUTIQUES

1. Lupus érythémateux disséminé : Généralités

1.1. Définition du lupus

1.1.1. Description du lupus et de l'immunité

Le système immunitaire est un système biologique complexe permettant de discriminer le soi du non-soi. Il est classiquement divisé en deux groupes : l'immunité innée et l'immunité adaptative. Une collaboration étroite de ces deux systèmes est nécessaire à la protection des organismes vertébrés contre de nombreux agents pathogènes. L'immunité innée intervient lors des premières étapes de la défense grâce à des récepteurs appelés « pattern recognition receptors » (PRR) qui reconnaissent des motifs moléculaires conservés associés aux pathogènes ou des molécules de stress. Les granulocytes (neutrophiles, basophiles, éosinophiles), les cellules NK (« natural killer »), les mastocytes et les phagocytes (monocytes, cellules dendritiques (DC), macrophages) sont les principaux acteurs de ce système. Leur activation favorise la destruction des pathogènes ainsi que la mise en place de la réponse immunitaire adaptative. Les lymphocytes B (LB) et lymphocytes T (LT) du système immunitaire adaptatif possèdent un récepteur variable à l'antigène. Ce dernier est directement reconnu par le BCR (« B cell receptor ») des LB. Les LT grâce à leur TCR (« T cell receptor ») reconnaissent un peptide antigénique présenté par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Contrairement à l'immunité innée qui se caractérise par la reconnaissance peu spécifique des molécules du non-soi, l'activation de la réponse immunitaire adaptative se fait plus tardivement et permet la mise en place d'une réponse mémoire spécifique à l'antigène. Ainsi, une seconde exposition à ce même pathogène conduira à une mise en place plus rapide de la défense immunitaire.

Les LB et LT, lors de leur maturation, subissent une sélection négative centrale au niveau des organes lymphoïdes primaires (thymus et moelle osseuse). Cette sélection, appelée tolérance centrale, permet l'élimination des cellules réagissant envers le soi. Lors de cette étape, certaines

cellules autoréactives ne sont pas éliminées. C'est au niveau des organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglions, par exemple) que les cellules autoréactives sont régulées grâce à des mécanismes de tolérance périphérique. Un dysfonctionnement quelconque de ces mécanismes peut engendrer une réponse autoimmune.

L'autoimmunité ne conduit pas systématiquement à une maladie autoimmune. La combinaison de plusieurs facteurs tels que des facteurs génétiques, environnementaux et hormonaux peut conduire, dans certains cas, à une rupture de tolérance. Les maladies autoimmunes sont très hétérogènes et peuvent être classées en deux groupes : spécifiques à un organe ou systémiques. Dans le premier cas, elles touchent un unique organe comme le pancréas pour le diabète de type I ou le cerveau pour la sclérose en plaques. Au contraire, lorsqu'elles touchent plusieurs organes ou tissus, elles sont regroupées sous le terme de « systémique ». L'exemple le plus représentatif de cette famille de maladies autoimmunes systémiques est le lupus érythémateux disséminé (LED). Très polymorphe, il se caractérise notamment par des atteintes cutanées typiques, des atteintes articulaires, pulmonaires et vasculaires, ou encore des phénomènes d'inflammation au niveau des reins dû au dépôt de complexes immuns. Dans les pays développés, les maladies autoimmunes touchent 5% de la population et dans 78% des cas, il s'agit de femmes. Ce dimorphisme sexuel est probablement lié à l'influence des hormones ainsi qu'à des gènes codés par le chromosome X. En général, l'apparition des maladies autoimmunes s'effectue chez des individus jeunes (entre 20 et 29 ans) (Hayter and Cook, 2012).

Les premiers récits faisant référence au lupus remontent à l'époque de la Grèce Antique. Hippocrate (460-375 avant JC) est généralement considéré comme le premier à avoir décrit des ulcères cutanés, nommés « herpes esthiomenos » (Smith and Cyr, 1988). Le terme lupus signifie « loup » en latin. Il apparaît dès le Moyen-âge pour désigner la forme en masque de loup des lésions ulcérales retrouvées sur visage des patients. Le terme érythémateux quant à lui vient du grec « erythema » et désigne les rougeurs. En 1845, Théodore Biett évoqua une dermatose de la face qu'il décrit comme étant un « érythème centrifuge ». C'est son étudiant, Pierre-Louis-Alphée Cazenave, qui le qualifia de « lupus érythémateux » en 1851. Au même moment, les médecins autrichiens Ferdinand Von Hebra et Moritz Kaposi montrèrent une propagation des atteintes au niveau de plusieurs organes. Ils divisèrent le lupus en deux groupes distincts en fonction des symptômes. Il est alors qualifié de discoïde lorsqu'il ne touche que la peau et de systémique lorsqu'il atteint d'autres organes. Par la suite, le médecin Sir William Osler confirma ces résultats en précisant que le lupus n'est pas une maladie cutanée mais bien une maladie systémique touchant l'ensemble du corps humain (Scofield and Oates, 2009). La découverte des

cellules LE (lupus érythémateux) par Malcom Hargraves en 1948 fut un tournant majeur pour la compréhension du lupus. L'hématologiste mis en évidence que lorsque du sérum de patient est mis en présence de moelle osseuse de sujets sains, un amas leucocytaire se forme autour du matériel nucléaire (Hargraves, 1969). Ces travaux ont conduit à la découverte des autoanticorps reconnaissant des éléments nucléaires dans les années 1950 (Friou et al., 1958). La présence de ces autoanticorps chez les patients a permis la mise au point de tests immunologiques pour le diagnostic du lupus. Ces tests sont encore utilisés de nos jours en routine et sont d'une aide précieuse pour le dépistage de la maladie.

1.1.2. Le diagnostic du LED

Le LED est une maladie autoimmune polymorphe. La diversité des signes cliniques rend souvent son diagnostic complexe. Une seule manifestation clinique ou biologique ne permet pas d'affirmer qu'il s'agit d'un lupus. En effet, c'est l'ensemble de plusieurs critères qui permet de classer une maladie en tant que LED. La société américaine de rhumatologie (ACR : « American College of Rheumatology ») a proposé une classification basée sur 11 symptômes cliniques afin de faciliter le diagnostic (Tableau 1). Ces 11 critères ont été définis à partir des 30 manifestations les plus fréquemment rencontrées. Lors des études cliniques, l'association d'au moins 4 de ces critères est nécessaire pour poser un diagnostic de LED.

Critères	Description
1. Rash malaire	Erythème malaire en ailes de papillon
2. Eruption de lupus discoïde	Erythème en placards avec des squames kératosiques adhérentes
3. Photosensibilité	Eruptions cutanées résultant d'une réaction inhabituelle au soleil
4. Ulcérations buccales ou nasopharyngées	Ulcères oraux ou nasopharyngés douloureux
5. Polyarthrite non érosive	Impliquant au moins deux articulations périphériques et caractérisée par des douleurs, une augmentation du volume ou un épanchement articulaire
6. Pleurésie ou péricardite	Epanchement pleurale Péricardite
7. Atteinte rénale	Protéinurie > 0,5g/jour Présence de cylindres dans les urines (globules rouges, hémoglobine, leucocytes, cellules tubulaires...)
8. Atteinte neurologique	Convulsions ou psychose
9. Atteinte hématologique	Anémie hémolytique avec hyperréticulocytose ou leucopénie < 4000/mm ³ , ou lymphopénie < 1500/mm ³ , ou thrombopénie < 100000/mm ³
10. Désordre immunologique	Présence d'anticorps anti-ADN natif, ou anti-Sm, ou anti-phospholipides
11. Anticorps antinucléaires	Taux anormal d'anticorps anti-nucléaires

Tableau 1 : Critères de classification du LED proposés par l'ACR en 1982 (Tan et al., 1982), modifiés en 1997 (Hochberg, 1997)

1.1.3. Pronostic de la maladie

Globalement le taux de survie des patients lupiques s'est considérablement amélioré ces dernières années. De 40% à 5 ans dans les années 1950, il est aujourd'hui d'environ 90% à 10 ans. Cette nette augmentation est probablement liée à un diagnostic plus précoce de la maladie ainsi qu'à une meilleure prise en charge des patients.

Les principales causes de décès du LED sont :

- des causes directement liées à la maladie : complications rénales (18% des causes de décès) ou complications cérébrales et cardiovasculaires (10%)
- des causes favorisées par les thérapies actuelles : infarctus, cancers et surtout les complications infectieuses (33% des causes de décès) dues aux thérapies immunosuppressives imposées.

L'atteinte rénale est une manifestation clinique courante (50% des cas) mais il s'agit également d'une des plus sévères puisqu'elle impacte de manière significative le pronostic vital des patients.

1.2. Epidémiologie

Le LED est considéré comme une des maladies autoimmunes les plus fréquentes en France après la polyarthrite rhumatoïde (PR) (Guillemin et al., 2005). On estime son incidence à environ 3 nouveaux cas pour 100 000 habitants par an et sa prévalence est de l'ordre de 40 cas pour 100 000 habitants (Arnaud et al., 2014). Le LED touche majoritairement les femmes (78% des cas) et se déclare en moyenne avant 30 ans. Il s'agit généralement de femmes dans l'âge de procréer puisque le lupus peut se manifester pour la première fois pendant ou après une grossesse (15% des cas). De plus, il existe une grande disparité en fonction de l'origine ethnique des patients. Les formes les plus graves sont en effet retrouvées au sein des populations afro-américaines et asiatiques (Petri, 2002). Paradoxalement, une étude plus récente a mis en évidence que le taux de mortalité parmi les populations asiatiques et hispaniques est plus faible par rapport aux populations africaines et afro-américaines (Gómez-Puerta et al., 2015). Ces inégalités en fonction du sexe, de l'âge et de l'origine ethnique reflètent la complexité et l'hétérogénéité de cette pathologie autoimmune.

1.3. Signes cliniques

Outre le LED, il existe également d'autres formes de lupus érythémateux : le lupus discoïde, le lupus iatrogène ou encore le lupus néonatal. Le lupus discoïde se caractérise par des atteintes exclusivement cutanées et localisées au niveau du visage. Le lupus iatrogène également appelé lupus induit, est lié à une prise prolongée de médicaments. Dans certaines études, cette forme représente 10% des patients lupiques. Une liste des médicaments à risque a récemment été établie (Vedove et al., 2009). Cliniquement, il s'agit d'un lupus cutané et/ou articulaire associé à des signes généraux. Enfin, le lupus néonatal est une maladie rare (1 cas sur 10 000 naissances) liée à la transmission d'autoanticorps par la mère. Ces autoanticorps de type anti-SSA ou anti-SSB sont capables de passer la barrière placentaire et peuvent interagir avec certains organes de fœtus. Ils peuvent alors provoquer un bloc auriculo ventriculaire (BAV) congénital, c'est à dire un trouble de la conduction électrique du cœur du fœtus, mais aussi une éruption cutanée chez le nouveau-né. Le lupus néonatal touche majoritairement des enfants dont la mère est atteinte par une maladie autoimmune de type LED ou un syndrome de Gougerot-Sjögren.

1.3.1. Signes généraux

Le LED n'évolue pas de manière constante au fil du temps. Il se manifeste par des phases de poussées alternées par des phases asymptomatiques (ou « rémissions »). Les phases de poussées peuvent être favorisées par une exposition aux rayons UV, une infection, des modifications hormonales liées à une grossesse (Yang et al., 2015) ou encore à une perturbation affective. En fonction de la sévérité de la maladie, les poussées lupiques sont définies comme étant légères à modérées ou sévères. En ce qui concerne les poussées légères à modérées, ces phases se manifestent principalement par des lésions cutanées ainsi que des arthrites non érosives. Les phases de poussées sévères se caractérisent quant à elles par des atteintes au niveau des organes impactant le pronostic vital des patients.

L'évaluation de la forme et de l'activité de la maladie est cruciale car elle constitue la base de la décision du traitement pour chaque patient. Plusieurs indices d'activités globales et spécifiques d'organes ont été validés et sont largement utilisés afin de déterminer la gravité de la maladie. Le plus couramment utilisé est le SLEDAI (« systemic lupus erythematosus activity index ») développé en 1992 (Bombardier et al., 1992). Il s'agit d'une mesure de l'activité globale où un coefficient est attribué à chaque symptôme (Tableau 2). Ce score peut varier entre 0 et 105 et, de ce fait, des seuils ont été proposés afin de définir le niveau d'activité ainsi qu'une amélioration et une poussée de la maladie. Ainsi, un patient avec un score du SLEDAI supérieur ou égal à 6 est considéré comme actif et inversement un patient avec un score du SLEDAI inférieur à 6 est décrit comme inactif. De plus, lorsqu'un patient présente une augmentation de son score d'au moins 3 points, ce dernier est en phase de poussée. Une diminution du score du SLEDAI de 4 points est définie comme une amélioration. Enfin, un score inférieur à 4 correspond à un patient en rémission.

Score	Manifestations	Score	Manifestations
8	Convulsions	2	Nouveau rash
8	Psychose	2	Alopécie
8	Atteintes cérébrales	2	Ulcères muqueux
8	Troubles visuels	2	Pleurésie
8	Nerfs crâniens	2	Péricardite
8	Céphalées	2	Baisse du complément
8	AVC	2	Elévation des anticorps anti-ADN
8	Vascularite	1	Fièvre
4	Arthrites	1	Thrombopénie
4	Myosite	1	Leucopénie
4	Cylindres urinaires		
4	Hématurie		
4	Protéinurie		
4	Pyurie		

Abréviations : AVC : accident cardiovasculaire

Tableau 2 : Calcul du SLEDAI adapté de (Bombardier et al., 1992)

Le BILAG (« British isles lupus activity group ») initialement développé en 1988, est généralement utilisé lors d'essais cliniques. Contrairement au SLEDAI, il permet l'établissement d'un score individuel pour chaque système organique. Il existe 9 systèmes pour le calcul du score du BILAG : signes généraux, muqueuses et peau, système nerveux central, muscles et squelette, système cardio-respiratoire, système gastro-intestinal, système rénal, système ophtalmologique et système hématologique. Le SRI (« SLE responder index ») est également utilisé lors d'essais cliniques. Enfin, il existe d'autres index d'activité moins courants : le LAI (« Lupus activity index ») et le SLAM (« Systemic lupus activity measure »). Les deux principaux index d'activité de la maladie lupique restent le SLEDAI et le BILAG.

1.3.2. Signes dermatologiques

Les lésions cutanées sont très évocatrices d'un lupus et sont retrouvées chez la majorité des patients (80 à 90% des cas). Il s'agit d'érythèmes de la face apparaissant sous la forme d'ailes de papillon. Ces atteintes sont caractérisées par une photosensibilité. A ces lésions dermatologiques s'associent, dans 50% des cas, des lésions secondaires telles que des vascularites et/ou des alopécies (fréquentes lors des phases de poussées).

1.3.3. Signes rhumatologiques

Les lésions articulaires surviennent chez 90% des patients atteints de LED. Il s'agit soit de simples arthralgies (inflammations) ou d'arthrites vraies. Les articulations les plus souvent touchées sont celles des mains, des poignets, des genoux et des chevilles.

1.3.4. Signes rénaux

L'atteinte rénale constitue aujourd'hui l'une des principales causes de décès chez les patients lupiques. Elle est fréquente et est retrouvée dans plus de 50% des cas. Elle est caractérisée par une inflammation des différentes structures du néphron dont le glomérule. L'organisation mondiale de la santé (O.M.S) a proposé une classification des différentes atteintes glomérulaires en fonction de leur gravité (Weening et al., 2004). Parmi les patients atteints de néphropathie lupique, 20 à 30% d'entre eux évoluent vers une insuffisance rénale.

1.3.5. Signes vasculaires

L'inflammation des petits vaisseaux sanguins (vascularite) est également une caractéristique du LED. Les manifestations vasculaires sont très diverses et apparaissent le plus fréquemment au niveau des doigts ainsi qu'au niveau des coudes. Ces lésions sont non spécifiques et se caractérisent par :

- des troubles de la circulation sanguine au niveau des extrémités (phénomène de Raynaud) touchant 15 à 20% des patients
- des thromboses artérielles et veineuses liées à la présence d'anticorps anti-phospholipides

1.3.6. Signes pulmonaires et cardiaques

Les manifestations pulmonaires et cardiaques sont retrouvées chez 25 à 50% des patients lupiques. Le LED peut toucher la plèvre et le péricarde. Généralement, il s'agit de pleurésies inflammatoires pouvant évoluer vers une fibrose pulmonaire. Enfin, l'atteinte cardiaque la plus fréquente est la péricardite.

1.3.7. Signes neurologiques

L'implication du système nerveux dans le développement et l'accélération de la pathologie lupique reste à ce jour peu connue. Les atteintes neurologiques sont très diverses et sont présentes chez environ 20 à 80% des patients à un moment donné de la maladie. Ces manifestations sont regroupées sous le terme de « neurolupus » (Joseph and Scolding, 2010). Les troubles anxieux, les troubles de l'humeur ainsi que les migraines sont fréquents. Plus rarement, des myélopathies et des méningites sont observées chez les patients lupiques (Jeltsch-David and Muller, 2014). Certains de ces symptômes peuvent être liés à un syndrome des anti-phospholipides (Rai and Swetha, 2015).

1.3.8. Signes hématologiques

Une anémie est retrouvée dans 25 à 80% des cas. Le plus souvent elle est provoquée par l'inflammation due au lupus à proprement parler. Cependant, il existe une forme plus sévère d'anémie qui est liée à la présence d'autoanticorps anti-globules rouges. Ces derniers conduisent à une hémolyse. On parle alors d'anémie hémolytique autoimmune. La leucopénie fait également partie des manifestations hématologiques. Elle touche 20 à 80% des patients et se traduit principalement par une lymphopénie et une neutropénie. Enfin, une thrombopénie est également observée chez 10 à 60% des patients et s'explique généralement par la présence d'autoanticorps dirigés contre les plaquettes.

1.4. Physiopathologie

1.4.1. Influence des facteurs génétiques

L'analyse des modèles murins spontanés du lupus montre une forte composante génétique et a permis de définir des loci de susceptibilité pour la maladie. Les principaux modèles murins du lupus sont les souris (NZB/W)F1 et MRL/*lpr* (Perry et al., 2011). Le modèle (NZB/W)F1 est le plus ancien modèle murin classiquement utilisé pour étudier le lupus. Il correspond à la première génération du croisement entre les souches NZB (« New Zealand Black ») et NZW (« New Zealand White »). Les souris NZB et NZW affichent une autoimmunité limitée contrairement aux souris (NZB/W)F1 qui développent une pathologie sévère semblable au LED humain. Le modèle MRL/*lpr* quant à lui possède un fond génétique favorisant le développement d'une autoimmunité. La mutation *lpr* au niveau du gène codant pour le récepteur de mort Fas

conduit à un défaut d'apoptose et à la persistance des LB et LT autoréactifs. Il est important de mentionner qu'aucun défaut d'expression du récepteur ou de son ligand Fas-L n'est retrouvé chez les patients lupiques.

L'implication des facteurs génétiques dans le développement du lupus est également suggérée grâce aux analyses d'association familiale. En effet, ces études ont montré que le taux de concordance du lupus est approximativement de 25 à 50% pour les jumeaux homozygotes et passe à 5% pour les jumeaux dizygotes ainsi que les frères et sœurs (Block et al., 1975; Deafen et al., 1992).

Il existe de nombreux gènes associés au LED (Tableau 3). Ce nombre a fortement augmenté ces dernières années grâce au développement de nouvelles stratégies de génotypage. Les études d'associations pangénomiques : GWAS (« Genome-wide association study») ont notamment permis de mettre en évidence les SNP (« single nucleotide polymorphism ») impliqués dans le développement du lupus (Guerra et al., 2012; Harley et al., 2009).

Gène	Position	Fonction	Gène	Position	Fonction
ITGAM	16p11.2	Phagocytose	PTPN22	1q13	Voie de signalisation BCR et TCR
FcyR	multiple	Phagocytose	TNFSF4	1q25	Régulation de la production IFN
PRDM1-ATG5	6q21-q22.1	Autophagie, différenciation (LB)	HLA-DRB1	6p21.3	Présentation peptidique par le CMH-II
TNFAIP3	6q23	Ubiquitination	SLC15A4	12q24.32	Transport de peptides
TNIP1	5q32-q33.1	Régulation de l'activation de NFkB	IRF5	7q32	Régulation de la production IFN
UBE2L3	22q11.2-q13.1	Ubiquitination	IRF7	11p15.5	Régulation de la production IFN
ETS1	11q23.3	Développement et activation des lymphocytes	IRF8	16q24.1	Régulation et production IFN
IKZF1	7p12	Développement lymphocytaire	IFIH1	2q24	Régulation de la production IFN
CD44	11p13	Interaction, adhésion et migration cellulaire	TYK2	19p13.2	Différenciation, prolifération cellulaire
BANK1	4q22-q24	Activation et signalisation (LB)	PXK	3p14.3	Régulation de la dégradation d'un facteur de croissance épidermique
BLK	8p23-p22	Signalisation du BCR et développement des LB	JAZF1	7p15	Métabolisme des lipides et homéostasie du glucose
LYN	8q13	Différenciation, prolifération et survie (LB)	DRAM1	12q23.2	Autophagie
RasGRP3	2p25.1-p24.1	Activation de la voie MAPKK	STAT4	2q32.2-q32.3	Développement et signalisation (LT)
NCF2	1q25	Apprêtement et présentation antigénique			

Tableau 3 : Liste des principaux gènes de susceptibilité au LED

La principale prédisposition génétique concerne les gènes HLA codant pour le CMH-II. Ce dernier joue un rôle essentiel dans la présentation de peptides antigéniques et l'activation des LT. Une mutation au niveau de ces gènes peut contribuer à une réponse immunitaire anormale. Chez les patients lupiques d'origine caucasienne, les mutations des gènes HLA-DRB1 et HLA-DR2 sont significativement associées au LED (Barcellos et al., 2009). La mutation du gène HLA-DRB1 a également été retrouvée chez les patients d'origine asiatique (Kim et al., 2009). Toutefois, ces résultats montrent que l'association génétique varie souvent en fonction des origines ethniques, ce qui nécessite une validation des mutations dans les différents groupes. Les mutations des gènes impliqués dans la cascade du complément sont plus rares mais prédisposent fortement au LED (Walport et al., 1998). En effet, le risque de développer un lupus est très élevé chez un patient ayant un déficit en C1q. Le fragment C1q joue un rôle important dans la clairance des corps apoptotiques en favorisant leur phagocytose par les macrophages. Le déficit en C1q conduit à une accumulation des corps apoptotiques et favorise la présentation d'autoantigènes, ce qui au final stimule la production d'autoanticorps. D'autres gènes impliqués au cours de la phagocytose possèdent un polymorphisme chez les patients atteints de LED. C'est le cas des gènes codant pour les récepteurs Fc γ . Ces récepteurs jouent un rôle important dans l'élimination des complexes immuns en reconnaissant la partie constante des anticorps. La mutation de plusieurs de ces gènes est susceptible d'induire une baisse de l'affinité du récepteur pour les IgG et ainsi conduire à une baisse de l'élimination des complexes immuns en favorisant leur dépôt au niveau d'organes cibles, en particulier le rein. Des SNP ont également été trouvés au niveau de gènes impliqués au cours du développement lymphocytaire B et T. Parmi ceux-ci, les gènes ETS1, IKZF1, BLK, STAT4 sont retrouvés associés au lupus. Leur mutation implique souvent une hyperactivation ainsi qu'une perte de tolérance des lymphocytes autoréactifs. Enfin, plusieurs études ont montré des polymorphismes au niveau des gènes impliqués dans l'autophagie. Ce processus cellulaire sera détaillé dans la deuxième partie de cette introduction. Un SNP localisé dans la région intergénique entre ATG5 et PRDM1 confère un risque de développer un lupus (Zhou et al., 2011). C'est aussi le cas du gène DRAM1 qui code pour un régulateur de l'autophagie (Yang et al., 2013).

Outre les gènes de susceptibilité, des modifications épigénétiques sont fortement associées au développement de maladie autoimmunes, dont le LED (Greer and McCombe, 2012). Ces modifications sont définies comme étant des événements qui affectent l'activité des gènes sans changements de leurs séquences nucléotidiques. La méthylation de l'ADN est un phénomène épigénétique impliqué dans la régulation de l'expression de gènes. Ce processus se caractérise par l'addition d'un groupement méthyl au niveau des îlots CpG en position 5' des gènes. Il s'agit

d'une régulation complexe où une faible méthylation favorise la transcription de gènes alors qu'au contraire une forte méthylation favorise son inhibition. De nombreuses études ont montré un lien entre la méthylation de l'ADN et l'autoimmunité. En effet, le traitement par un inhibiteur de la méthylation de l'ADN, le 5-azacytidine, est suffisant pour induire le développement d'une maladie autoimmune *in vitro* et *in vivo* (Zhou and Lu, 2008). Par ailleurs, plusieurs gènes dont CD70 (TNFSF7) (Liu et al., 2009) et CD11a (ITGAL) (Lu et al., 2002) ont été retrouvés hypométhylés au cours du LED favorisant ainsi leur surexpression par les LB et LT. Finalement, l'inactivation d'un des deux chromosomes X chez la femme repose également sur un phénomène de méthylation au niveau de certaines régions spécifiques. Une hypométhylation du chromosome X est retrouvée chez les femmes lupiques ce qui provoque une surexpression des gènes localisés sur celui-ci tels que CD40L (Lu et al., 2007). Ainsi, ce processus épigénétique pourrait expliquer pourquoi les femmes sont plus touchées par le LED que les hommes.

Les modifications post-traductionnelles des histones sont également associées au développement du lupus. Les histones sont des protéines riches en acides aminés basiques qui se lient à l'ADN et favorisent sa compaction pour former les nucléosomes. La particule cœur des nucléosomes est composée de deux copies des histones H2A, H2B, H3 et H4. L'histone H1, quant à elle, interagit avec l'ADN internucléosomal et permet de relier deux nucléosomes successifs. Les histones possèdent un domaine C-terminal qui est responsable de l'assemblage du nucléosome et un domaine N-terminal qui est la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles telles que des phosphorylations, acétylations et méthylations. L'ubiquitination des histones H2A et H2B porte sur des résidus de leur domaine C-terminal. Ces modifications régulent le degré de condensation de l'ADN autour des nucléosomes et influencent l'expression génique. Plusieurs études ont montré que les histones H2A, H2B, H4 sont acétylées (van Bavel et al., 2009) et les histones H3 méthylées (Bavel et al., 2011) durant l'apoptose. Ces modifications sont responsables de la formation de nouveaux épitopes qui vont être reconnus par les anticorps de souris et de patients au cours du lupus. Le lien entre les modifications post-traductionnelles des histones et le développement du LED est complexe. En effet, des études chez les patients lupiques ont rapporté une hyperacétylation des histones H4 qui pourrait être impliquée dans l'augmentation de l'expression de gènes régulant la production d'IFN de type I (Zhang et al., 2010). Des études contradictoires ont cependant montré que l'hypoacétylation des histones H3 et H4 chez les souris MRL/*lpr* favorise le développement d'un lupus (Mishra et al., 2003).

1.4.2. Influence des facteurs environnementaux

Malgré l'existence de nombreuses prédispositions génétiques favorisant l'apparition d'un lupus, celles-ci ne sont pas suffisantes pour expliquer l'étiologie de la maladie. Ainsi une combinaison de facteurs génétiques, environnementaux et hormonaux est à l'origine du syndrome lupique. Les facteurs environnementaux peuvent être regroupés sous différents types :

- physique : Rayons ultraviolets (UV-A, UV-B, UV-C)
- chimique : Prise de certains médicaments, exposition à la cigarettes et aux pesticides
- infectieux : Virus d'Epstein-Barr (EBV)

La photosensibilité un signe clinique très évocateur d'un LED. Elle se manifeste par des lésions cutanées principalement au niveau du visage. Un certain nombre d'études ont montré un lien entre l'exposition aux UV et les poussées lupiques (Kuhn and Beissert, 2005). L'exposition prolongée aux rayons UV pourrait altérer l'ADN et le rendre plus immunogène. Elle pourrait également induire l'apoptose des kératynocytes ce qui provoquerait la translocation des antigènes nucléaires au niveau de la membrane cellulaire (Caricchio et al., 2003). Bien que ces deux phénomènes semblent contribuer à la pathogénèse du lupus, le rôle des rayons UV dans le développement du lupus reste controversé. En effet, une étude réalisée en Chine a montré qu'en hiver, lorsque les rayons UV sont faibles, le pourcentage de patients actifs est plus élevé que durant l'été, lorsque les rayons UV sont intenses (Zhang et al., 2011). De plus, un sous-type de rayons ultraviolets, les UV-A1, sont utilisés lors de photothérapie pour traiter certaines formes de lupus (McGrath, 1994).

De nombreux agents chimiques sont connus pour augmenter le risque de développer un lupus. Comme décrit plus haut (Vedove et al., 2009), certains médicaments tels que la procaïnamide ou encore l'hydralazine qui est utilisée dans le traitement contre l'hypertension, sont susceptibles de déclencher un lupus chez un individu prédisposé. Il s'agit d'inhibiteurs de la méthylation de l'ADN des LT. Les cellules T CD4+ traitées avec ces molécules seraient capables d'être activées par les macrophages sans présentation de peptides antigéniques par le CMH-II (Cornacchia et al., 1988). La consommation de tabac est également un facteur de risque (Majka and Holers, 2006). Parmi de nombreuses hypothèses, la cigarette pourrait, entre autre, augmenter l'expression du gène Fas dans les LB et LT CD4+. La consommation de tabac serait donc responsable de l'augmentation de l'apoptose, causant ainsi une éventuelle rupture de tolérance et une production d'autoanticorps suite à l'exposition d'antigènes normalement intracellulaires (Bijl et al., 2001).

Finalement, l'infection par le virus d'Epstein-Barr chez des individus génétiquement prédisposés est un facteur déclenchant la maladie lupique (Draborg et al., 2012). Lors de la réplication du virus, des protéines telles que EBNA-1 (« Epstein-Barr nuclear antigen 1») vont être exprimées. Cette protéine contient une séquence peptidique qui est également présente dans la protéine sm-D contre laquelle les patients lupiques développent fréquemment des anticorps. Ainsi, les anticorps générés contre la protéine EBNA-1 suite à l'infection, vont également reconnaître la protéine sm-D. L'apparition des autoanticorps anti-sm-D pourrait donc être liée à un mécanisme de mimétisme moléculaire avec le peptide EBNA-1 du virus d'Epstein-Barr (Poole et al., 2006). D'autres agents pathogènes tels que le cytomégalovirus (CMV) et le parvovirus B19 sont également associés au développement du LED (Rigante and Esposito, 2015).

1.4.3. Influence des facteurs hormonaux

Plusieurs éléments mettent en évidence l'implication des facteurs hormonaux dans l'apparition du LED. Tout d'abord, le lupus touche majoritairement les femmes (9 cas sur 10) avec une augmentation de l'incidence après la puberté et une diminution après la ménopause. De plus, une grossesse et la prise de la pilule favorisent le déclenchement ou une recrudescence de la maladie. Cette influence hormonale est également observée chez les modèles murins lupiques tels que les souris MRL/lpr et (NZB/NZW)F1 chez lesquels les femelles développent des caractéristiques de la maladie (autoanticorps, glomérulonéphrites, arthrites,...) et meurent plus tôt que les mâles. Par ailleurs, l'administration d'œstrogènes aux mâles déclenche l'apparition de néphrites sévères accompagnées par des niveaux élevés d'autoanticorps anti-ADN ainsi qu'une augmentation de la mortalité (González, 2010). Les mécanismes reliant les hormones sexuelles à l'autoimmunité sont complexes. Une étude a montré que les œstrogènes et la prolactine peuvent favoriser la survie et l'activation des LB autoréactifs de forte affinité (Grimaldi, 2006). Les œstrogènes jouent également un rôle au niveau des LT en augmentant, par exemple, l'expression de CD40L (Rider et al., 2000).

1.4.4. Mécanismes immunologiques

1.4.4.1. L'apoptose, source majeur d'autoantigènes

La mort cellulaire est un processus qui se produit à la fois en condition physiologique et pathologique. Elle joue un rôle primordial lors des mécanismes de tolérance du système

immunitaire en permettant l'élimination des cellules régissant envers les composants du soi. Outre la nécrose et l'autophagie, l'apoptose est la principale voie de mort cellulaire. Elle correspond à une mort programmée impliquant l'activation de caspases. Elle s'effectue par une fragmentation de l'ADN et de la membrane de la cellule en petites structures appelées corps apoptotiques. En condition physiologique, ces corps apoptotiques sont rapidement éliminés par les cellules phagocytaires (macrophages et cellules dendritiques), ne déclenchant pas de réaction inflammatoire. Ce phénomène favorise au contraire une diminution de la production de la cytokine pro-inflammatoire TNF- β (« tumor necrosis factor β ») et une augmentation de la sécrétion de TGF- β (« tumor growth factor β »), une cytokine anti-inflammatoire. Le mécanisme de clairance des corps apoptotiques est régulé par de nombreux ligands et récepteurs situés à la surface des cellules phagocytaires et apoptotiques. La phosphatidylsérine exposée à la surface des cellules en apoptose est reconnue par plusieurs récepteurs des cellules phagocytaires : β 2-glycoprotein-1 receptor, CD36, CD68 et constitue l'un des principaux signaux « eat me ». De plus, les cellules en apoptose peuvent activer le système du complément. Les composants du complément C1q, C3 et C4 sont décrits comme étant impliqués dans le mécanisme de clairance des corps apoptotiques (Taylor et al., 2000). C1q se lie directement aux cellules mortes lors des dernières étapes de l'apoptose et ceci de manière dépendante des IgM (Ogden et al., 2005). La liaison de C1q induit l'activation de la voie classique du complément, comme le montre le dépôt des composants C3 et C4 à la surface des cellules apoptotiques.

Excès d'apoptose chez les patients lupiques

Il existe chez les patients atteints de LED une dérégulation de l'apoptose (Munoz et al., 2005). L'apparition des autoanticorps semble étroitement liée à ce phénomène. En effet, l'injection de corps apoptotiques isolés à des souris normales, conduit à la génération d'anticorps anti-nucléaires et anti-ADN (simple brin) ainsi qu'au dépôt d'anticorps au niveau des reins (Mevorach et al., 1998). Chez l'homme, la plupart des études montrent que les patients lupiques présentent un niveau élevé d'apoptose. Cet excès d'apoptose augmenterait la libération des corps apoptotiques.

L'apoptose représente l'une des principales sources d'autoantigènes. Un excès de cette voie pourrait être responsable du développement d'une autoimmunité. Plusieurs études ont mis en évidence que les antigènes majeurs contre lesquels les patients lupiques développent des autoanticorps (ADN, nucléosomes, protéines RNP, SS-A et SS-B) sont regroupés au sein des corps apoptotiques (Casciola-Rosen et al., 1994). La rupture de tolérance des antigènes du soi

est favorisée par de nombreuses modifications post-traductionnelles conduisant ainsi à la création de nouveaux épitopes non tolérogènes. C'est le cas des histones, et notamment des histones H2B et H3 qui subissent des méthylations et acétylations lors de l'apoptose (van Bavel et al., 2009, 2011). C'est également le cas des protéines du spliceosome où une grande majorité des composants de la particule U1 snRNP sont des cibles antigéniques au cours du lupus. Les protéines U1-70K (spécifique de la particule U1) et SmF (commune à toutes les particules snRNP) subissent des modifications lors de l'apoptose. Ces dernières sont alors reconnues par les autoanticorps de patients lupiques (Hof et al., 2005). Notre laboratoire a mis en évidence que lors de l'apoptose, le résidu sérine 140 de la protéine U1-70K est rapidement phosphorylé alors qu'au contraire les nombreux autres résidus sérine de la protéine sont déphosphorylés (Dieker et al., 2008). Suite à ces modifications post-traductionnelles, la protéine U1-70K est retrouvée dans les corps apoptotiques et est reconnue par les autoanticorps et les LT CD4+ de patients lupiques (Monneaux et al., 2001).

Défaut de clairance des corps apoptotiques chez les patients lupiques

Il est communément admis que le défaut de clairance des corps apoptotiques représente l'une des principales causes de développement et d'accélération du LED. L'élimination des corps apoptotiques semble étroitement liée aux prédispositions génétiques. Comme décrit plus haut, la cascade du complément joue un rôle important dans le mécanisme de clairance des débris apoptotiques. Or, des polymorphismes dans les gènes du complément sont associés au LED. C'est le déficit en C1q qui est le plus constamment associé au lupus. De plus, les souris déficientes en C3 et C4 ont tendance à développer une maladie autoimmune semblable au lupus avec une augmentation du taux d'autoanticorps ainsi que l'apparition de glomérulonéphrites (Botto et al., 1998). Des expériences réalisées *in vitro* montrent que les lymphocytes de patients lupiques présentent un niveau plus élevé d'apoptose par rapport à des individus sains ou des patients atteints d'autres maladies autoimmunes comme par exemple la PR (Emlen et al., 1994). De plus, les macrophages de patients lupiques possèdent des anomalies morphologiques accompagnées d'un défaut de phagocytose des cellules apoptotiques (Tas et al., 2006). Enfin, les sérums de ces patients ont une plus grande capacité à induire l'apoptose des lymphocytes et des monocytes (Bengtsson et al., 2004). L'ensemble de ces études suggère un lien étroit entre le défaut de clairance des corps apoptotiques et le LED. L'initiation du LED est d'origine multifactorielle, la présence excessive de débris apoptotiques est crucial dans la pathogénèse du lupus et corrèle avec l'activité de la maladie. Lorsque les corps apoptotiques ne sont pas rapidement dégradés par les macrophages et les cellules dendritiques, ils évoluent vers un stade d'apoptose tardif et

de necrose. Contrairement à l'apoptose il ne s'agit pas d'une mort cellulaire programmée. Elle est caractérisée par une perte de l'intégrité de la membrane plasmique des corps apoptotiques conduisant à la libération de nombreuses protéines endogènes. Les protéines endogènes sont reconnues comme des « signaux de dangers » par l'organisme ce qui provoque une réponse inflammatoire dans le tissu environnant (Figure 1).

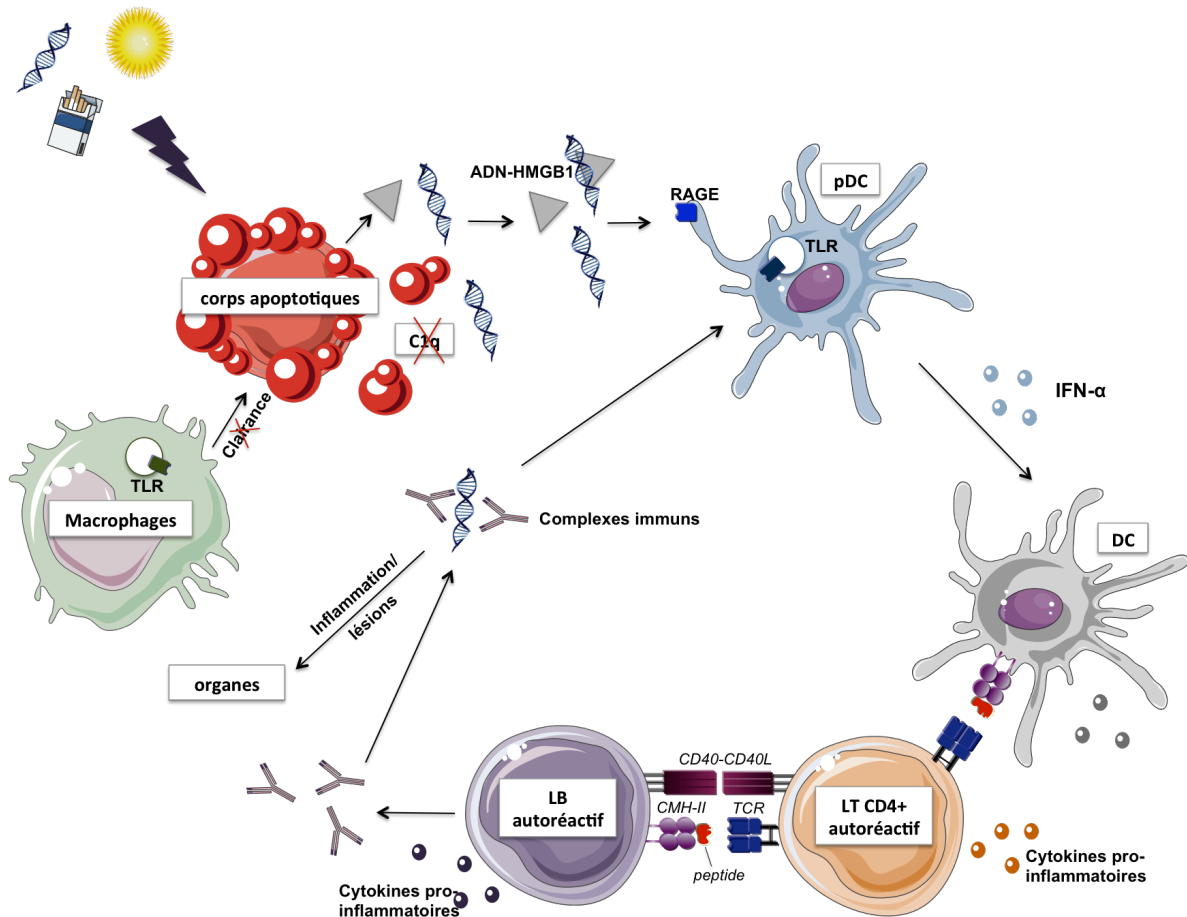


Figure 1 : Pathogénèse du lupus. Le LED est une maladie hétérogène d'origine autoimmune. Plusieurs facteurs environnementaux (UV, tabac) ou génétiques (déficit en C1q) contribuent à un excès d'apoptose et à un défaut de clairance des corps apoptotiques. Ces dérégulations conduisent à la libération d'antigènes nucléaires tels que l'ADN. Les molécules HMGB1 (« high mobility group box 1 protein ») se lient à l'ADN et le stabilise. Elles peuvent être activement sécrétées par les cellules vivantes ou passivement par les cellules en apoptose. Le complexe ADN-HMGB1 va être reconnu par les récepteurs RAGE (« receptor for advanced glycation endproducts ») exprimés à la surface des cellules de l'immunité innée en particulier les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). Cette interaction conduit à la translocation de l'ADN au niveau des endosomes où sont localisés les TLR9 (« Toll-like receptors 9 »). Les pDC vont alors stimuler la maturation des cellules dendritiques (DC) en sécrétant de l'IFN α . Le système immunitaire adaptatif quant à lui est activé grâce à la présentation d'autoantigènes aux LT CD4+ et par l'activation des LB autoréactifs. Ces derniers se différencient en plasmocytes sécrétant des autoanticorps. Les antigènes nucléaires qui sont libérés lors de l'apoptose sont alors reconnus par ces autoanticorps et forment des complexes immuns. Finalement ceux-ci se déposent au niveau des organes et créent des inflammations ainsi que des lésions tissulaires. Par ailleurs, les pDC peuvent être directement activés par les complexes immuns grâce à leurs récepteurs Fc.

1.4.4.2. Activation de l'immunité innée

L'immunité innée constitue le premier mécanisme de défense de l'organisme contre des agents pathogènes et infectieux. L'activation de ce système est très rapide, non spécifique et ne permet pas la mise en place d'une réponse mémoire face à l'antigène. Les principaux acteurs de l'immunité innée sont le complément et les cellules phagocytaires telles que les macrophages et les DC. Ces dernières sont activées grâce à la reconnaissance de motifs moléculaires conservés associés aux pathogènes (PAMP, « pathogen-associated molecular pattern ») ou des molécules endogènes délivrées par des cellules endommagées suite à un stress (DAMP, « danger associated molecular pattern »). Les molécules de danger sont reconnues par les PRR qui sont répartis en plusieurs familles. Les TLR sont les PRR les plus étudiés et sont considérés comme les premiers « senseurs ». Il s'agit de protéines transmembranaires exprimées à la membrane plasmique et/ou au niveau des endosomes. Ces récepteurs sont activés par différents types de PAMP, parmi lesquels des lipopeptides bactériens (BLP), des lipopolysaccharides (LPS), des acides nucléiques (ARN double brin ou motif CpG de l'ADN) et des protéines (flagelline). Les TLR activent les facteurs de transcription NF- κ B (« Nuclear-kappa B ») et AP-1 (« activator protein 1 »), qui régulent l'expression de cytokines inflammatoires comme le TNF α , l'IL-6 et des molécules de costimulation CD80 et CD86. Les NLR (« Nod-like receptors ») sont des récepteurs cytosoliques qui reconnaissent des composants bactériens anormalement présents dans le cytoplasme des cellules et notamment le peptidoglycane (PGN) des bactéries GRAM négatif ou encore la flagelline bactérienne. Suite à la reconnaissance des PAMPs, ces récepteurs activent la voie NF- κ B et MAP kinase mais également le complexe de l'inflammasome ce qui conduit à la sécrétion des cytokines inflammatoires IL-1 β et IL-18. Enfin, les RLR (« Rig-like réceptors ») reconnaissent l'ARN viral dans le cytoplasme de cellules infectées et induisent la sécrétion d'IFN de type I (Kumar et al., 2011).

Les TLR et leur implication dans la pathogénèse du lupus

Les TLR7 et 9 semblent jouer un rôle important dans le développement du lupus. En effet, ces récepteurs sont exprimés dans les endosomes des macrophages, des pDC et des LB et sont activés par l'ARNsb et l'ADNdb respectivement. Compte-tenu des dérégulations du mécanisme de l'apoptose au cours du lupus, les acides nucléiques libérés par les corps apoptotiques sont reconnus par ces récepteurs. Les TLR pourraient donc être impliqués dans la reconnaissance des antigènes nucléaires (ADN, ARN,...) et ainsi conduire à l'activation d'une réponse autoimmune et à la production d'autoanticorps. Par ailleurs, une augmentation de l'expression des ARN

messagers des TLR7 et 9 à été observée chez les patients lupiques (Komatsuda et al., 2008). L'expression de ces deux récepteurs corrèle avec le niveau d'ARNm de l'IFN- α , une cytokine impliquée dans la pathogénèse du LED et qui sera détaillée dans le paragraphe suivant. Une étude très récente a confirmée l'augmentation de l'expression du TLR7 et de l'IFN- α dans les LB et LT de patients. Cependant, aucune corrélation n'a été trouvée entre le niveau d'expression du TLR7 dans les LB et la sévérité de la maladie (SLEDAI) (Pacheco et al., 2016). Chez la souris lupique MRL/*lpr*, la délétion du TLR7 conduit à une diminution des taux sériques des autoanticorps anti-Sm et contribue à l'amélioration de la pathologie. En revanche, la délétion du TLR9 chez ces mêmes souris provoque une aggravation de la maladie malgré une diminution des autoanticorps anti-ADN sériques (Christensen et al., 2006). Outre les similarités entre les TLR7 et TLR9 en termes de séquence, spécificité, expression et voie de signalisation, ces deux récepteurs ont des effets opposés au cours de la maladie. Le TLR9 pourrait avoir un rôle inhibiteur sur le TLR7. Par conséquent, en absence du TLR9, le TLR7 pourrait être stimulé de manière plus importante. Cette hypothèse a été confirmée chez des souris MRL/*lpr* déficientes à la fois pour le TLR7 et TLR9 et qui présentent une amélioration de la pathologie par rapport à des souris déficientes pour le TLR9 uniquement (Nickerson et al., 2010). L'inhibition de la voie des TLR pourrait donc avoir un effet thérapeutique chez les patients atteints de LED. Les inhibiteurs ciblant à la fois le TLR7 et le TLR9 pourraient être les plus efficaces. En effet, des études réalisées chez les souris MRL/*lpr* (Pawar et al., 2007) et (NZB/W)F1 (Barrat et al., 2007) ont montré que l'utilisation de ce type d'inhibiteurs diminuait significativement les glomérulonéphrites et améliorait la survie des animaux traités.

D'autres TLR semblent impliqués au cours du lupus. Le rôle du TLR2 est envisagé puisque son expression est augmentée dans les LT, LB et monocytes de patients. La stimulation *in vitro* de ce TLR induit la sécrétion d'IL-17. En effet, l'activation du TLR2 conduit à une augmentation du niveau d'acétylation de l'histone H4 et à une diminution de la méthylation de l'histone H3 sur le résidu lysine 9 dans la région du promoteur de l'IL-17. Par ailleurs, l'utilisation d'un siRNA pour ce TLR abolit la sécrétion de l'IL-17. Ainsi, l'augmentation de l'expression du TLR2 chez les patients conduit à la sécrétion de l'IL-17 suite à des modifications post-traductionnelles des histones (Liu et al., 2015). Le TLR3 joue également un rôle au cours du LED. Le pourcentage de PBMC (« peripheral blood mononuclear cells ») exprimant le récepteur TLR3 à leur surface est plus élevé chez les patients lupiques que chez les sujets sains. Cependant, dans cette étude le pourcentage de cellules TLR3 positives ne corrèle pas avec l'activité de la maladie (Klonowska-Szymczyk et al., 2014). Enfin, l'expression du TLR4 corrèle positivement avec le SLEDAI des patients dans les LT CD4+ et LT CD8+ (Wong et al., 2010). Des études complémentaires seront

toutefois nécessaires pour montrer l'implication directe des TLR2, 3 et 4 dans la pathogénèse du lupus.

L'IFN- α , une cytokine majeure impliquée dans le LED

Les cytokines permettent la communication entre les différentes cellules du système immunitaire et sont, par conséquent, au centre de la pathogénèse du lupus. Parmi ces cytokines, l'IFN de type I (et notamment l'IFN- α) semble jouer un rôle majeur dans l'initiation et l'accélération de la maladie. L'étude du profil d'expression génique a mis en évidence une augmentation de l'expression de nombreux gènes induits par les IFN de type I, appelée « signature IFN » chez les patients lupiques (Baechler et al., 2003). L'IFN- α possède des propriétés antivirales en activant l'expression de gènes permettant de bloquer le cycle de réplication des virus. Cette cytokine est principalement produite par les pDC. De manière surprenante, le nombre de pDC est diminué dans le sang des patients lupiques. Toutefois, cette diminution serait due à une migration plus importante de ces cellules dans les organes cibles comme par exemple les reins (Kim et al., 2015). Au cours du lupus, l'ADN et l'ARN qui sont libérés par les corps apoptotiques en excès vont stimuler les pDC via les TLR7 et 9 et conduire à l'augmentation de la sécrétion d'IFN- α (Figure 1). Il a été reporté que lors de thérapies impliquant l'administration d'IFN- α , les patients souffrant d'hépatite C développent des symptômes sévères de type lupique (Ho et al., 2008). D'un point de vue fonctionnel, l'IFN- α peut promouvoir l'activité cytolytique des cellules NK et T cytotoxiques. Il peut également augmenter la production des protéines BlyS (« B lymphocyte stimulator ») et APRIL (« A proliferation-inducing ligand »), toutes les deux impliquées dans la survie des cellules B autoréactives. Ces protéines contribuent également à la différenciation des LB et à la commutation de classe des immunoglobulines (Ig). De plus, la maturation des DC qui est induite en réponse à l'IFN- α , permet l'activation des LT CD4+. En effet, l'administration d'IFN- α à des souris (NZB/W)F1 accélère la pathologie lupique de manière dépendante des LT (Liu et al., 2011). L'ensemble de ces données a permis d'expliquer le rôle de l'IFN- α dans l'initiation et le maintien du lupus (Figure 2).

L'implication des neutrophiles a également été mise en évidence dans l'activation des pDC via le TLR7 et 9 au cours du LED. Les neutrophiles sont des acteurs majeurs du système immunitaire inné et jouent un rôle essentiel dans la défense contre les pathogènes. Ils sont capables de répondre à une infection grâce notamment à la phagocytose et la dégranulation. Outre ces mécanismes, les neutrophiles subissent une forme distincte de mort cellulaire caractérisée par la

libération d'une grande quantité d'ADN nucléaire dans l'espace extracellulaire sous la forme de complexes appelés NETs (« neutrophil extracellular traps ») (Grayson and Kaplan, 2016). Chez les patients lupiques, le nombre de neutrophiles en mort cellulaire (NETose) est augmenté dans le sang et corrèle avec le développement des autoanticorps anti-ADN et l'activité de la maladie (McConnell et al., 2002). De plus, des défauts de clairance des NETs ont été décrits chez les patients lupiques. En effet, de rares mutations de la DNase 1, une endonucléase impliquée dans la dégradation de la chromatine dans les NETs, ont été associées au LED (Bodaño et al., 2006). L'augmentation du nombre de NETs ainsi que la libération de leur contenu dans le domaine extracellulaire vont conduire à la reconnaissance du matériel nucléaire par les TLR 7 et 9, l'activation des pDC et la sécrétion de l'IFN- α .

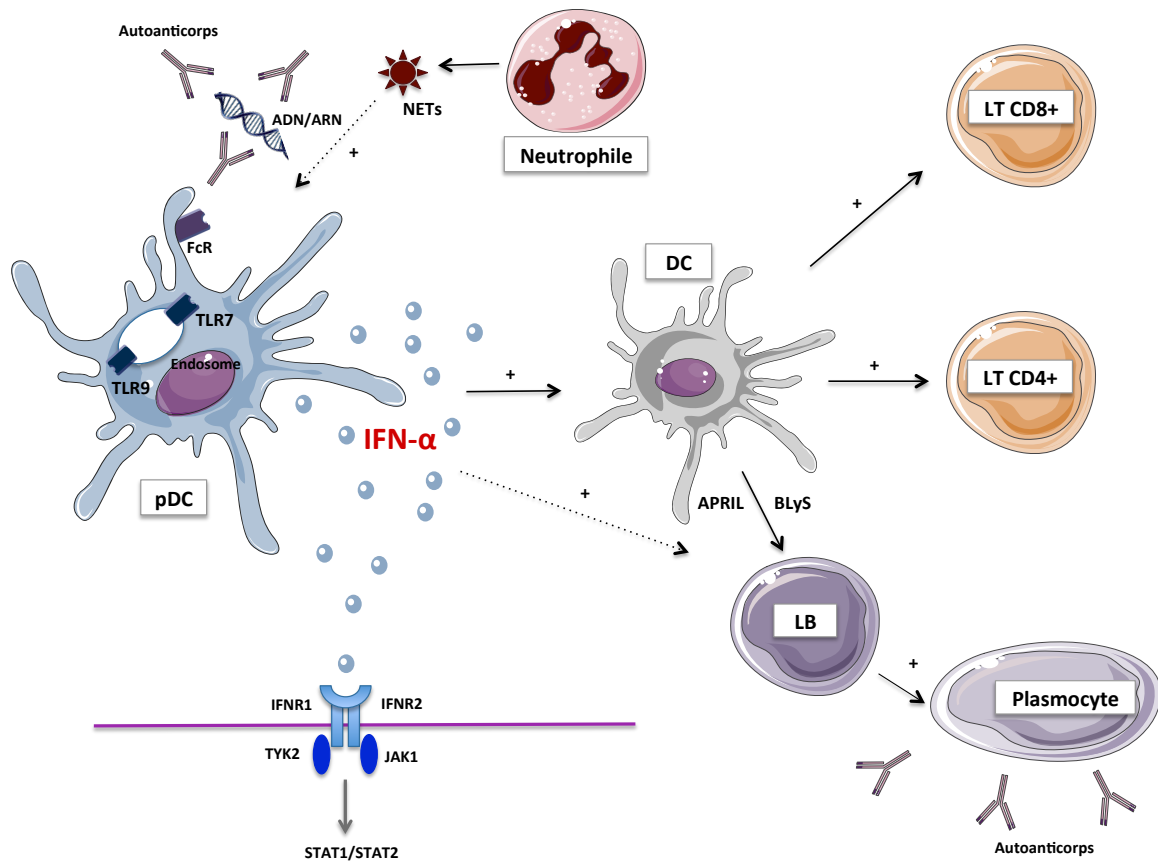


Figure 2 : L'implication de l'IFN- α au cours du lupus. Les acides nucléiques contenus dans les complexes immuns et libérés lors de l'apoptose sont reconnus par les TLR7 et TLR9 des pDC. L'activation de ces cellules conduit à la production d'IFN- α . Les neutrophiles de patients lupiques vont libérer des NETs pouvant potentiellement activer les pDC pour produire de l'IFN- α (Lande et al., 2011). L'IFN- α joue un rôle au cours de la différenciation des LB autoréactifs en plasmocytes. Elle favorise la production d'APRIL et BlyS qui sont nécessaires à la maturation des LB. D'autre part, la sécrétion d'IFN- α active les DC, les LT cytotoxiques ainsi que les LT CD4+. L'IFN- α en se liant à son récepteur IFNAR (« interféron α/β receptor ») conduit à l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT et à l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire (adapté de Kim et al., 2015).

1.4.4.3. Activation de l'immunité adaptative

Les deux acteurs majeurs de l'immunité adaptative sont les LT et les LB. Une coopération étroite de ces deux populations cellulaires permet la mise en place d'une réponse immunitaire spécifique et mémoire suite à la reconnaissance d'un antigène.

1.4.4.3.1 Le rôle des lymphocytes T dans le lupus

Ontogénie des LT en condition non pathologique

Le développement des LT a lieu dans le thymus à partir de précurseurs hématopoïétiques provenant de la moelle osseuse. Parmi les LT, on distingue deux sous-populations, les LT CD4+ et LT CD8+ qui diffèrent de par leur phénotype et leur fonction. L'activation des LT débute suite à la reconnaissance d'un antigène via leur TCR. Ce sont les molécules du CMH-I qui présentent les antigènes aux LT CD8+ et les molécules du CMH-II aux LT CD4+. La liaison entre les LT et les CPA va permettre la formation d'une synapse immunologique autour du point de contact. Les signaux de costimulation (B7/CD28, CD40/CD40L) sont également recrutés. Il est à noter que la présentation antigénique par les molécules du CMH, la participation de molécules de costimulation ainsi que la sécrétion de cytokines (IL-2) sont les 3 signaux nécessaires et indispensables à l'activation des cellules T. Suite à l'engagement du TCR, les corécepteurs CD4 et CD8 sont relocalisés vers le TCR pour stabiliser le complexe TCR/CMH. La tyrosine kinase qui est associée à ces corécepteurs entre en contact avec les molécules CD3, permettant ainsi la phosphorylation des résidus tyrosines des motifs ITAM (« immunoreceptor tyrosine-based activation motif »). Les ITAM servent de substrat pour les kinases de la famille Src (Lck et Fyn). La principale protéine recrutée sur les motifs ITAM lorsque ceux-ci sont phosphorylés est la tyrosine kinase ZAP-70 (« zeta-chain-associated protein kinase 70 »). Cette dernière est activée grâce à sa phosphorylation par Lck (Figure 3). Une des cibles importantes de ZAP-70 est la protéine adaptatrice LAT (« linker of activated T cells »). Elle est rapidement phosphorylée par ZAP-70 suite à l'engagement du TCR. Finalement, la phosphorylation de LAT conduit au recrutement de protéines de signalisation. Ces protéines forment un complexe autour de LAT et initient les cascades de signalisation aboutissant à l'activation des facteurs de transcription (NFAT « nuclear factor of activated T cells », AP-1 et NF- κ B). Après activation, les LT prolifèrent et se différencient soit en cellules effectrices pour les LT CD8+ cytotoxiques soit en cellules auxiliaires pour les LT CD4+. Parmi les LT auxiliaires, on distingue 4 sous-populations qui ont un profil cytokinique et des fonctions cellulaires différentes. Les cellules Th1 produisent principalement de l'IFN- γ et de l'IL-2 et favorisent l'immunité cellulaire. Les cellules Th2

sécrètent de l'IL-4, IL-5, IL-13 et IL-25 et contribuent à l'immunité humorale. Les cellules Th17 sécrètent principalement de l'IL-17 et favorisent l'inflammation. Enfin, les cellules T régulatrices (Tregs) produisent des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF- β et ont un rôle inhibiteur sur la fonction des autres cellules immunitaires. Il est à noter qu'il existe également des cellules T CD8+ régulatrices. Ces cellules expriment plus de facteurs d'activation (ICOS, Ki-67) que les autres cellules CD8+. De plus, *in vivo*, elles inhibent la prolifération des cellules T effectrices aussi bien voir mieux que les cellules T CD4+ regs (Churlaud et al., 2015).

La reconnaissance des antigènes par les LT est étroitement contrôlée par des mécanismes de tolérance centraux et périphériques. Cette tolérance conduit à l'élimination de cellules autoréactives. La première étape, dite de sélection positive, concerne les thymocytes double positifs CD4+CD8+ et se produit dans le thymus au sein de la zone du cortex. Les thymocytes dont le récepteur est capable d'interagir avec le CMH du soi survivent. En revanche, par un mécanisme appelé ignorance, les cellules ne reconnaissant pas le complexe CMH/peptide du soi meurent en l'absence de signaux de costimulation. Lorsque les cellules atteignent le stade simple positif, c'est à dire CD4+CD8- ou CD4-CD8+, elles subissent une sélection négative dans la zone médullaire. Cette sélection permet à toutes les cellules ayant une forte affinité pour un antigène du soi d'être éliminées ou de subir un processus de réarrangement de leur TCR (« receptor editing ») ou encore d'être inactivées par anergie. Seules les cellules ayant une faible affinité pour l'antigène vont survivre et migrer en périphérie. Des cellules dites autoréactives peuvent échapper au mécanisme de tolérance centrale. Ainsi, la tolérance périphérique entre en jeu et permet l'élimination de ces cellules grâce à des mécanismes d'anergie ou d'ignorance. Enfin, les Tregs contribuent fortement à la tolérance périphérique.

Un défaut de tolérance centrale et périphérique chez les patients lupiques pourrait donc être responsable de l'émergence de cellules T autoréactives. Aucune publication n'a mis en évidence un défaut des mécanismes de tolérance centrale. En revanche, plusieurs études ont montré des altérations des mécanismes de sélection périphérique liées notamment aux Tregs. Nous reviendrons plus en détail sur le rôle de ces cellules dans un prochain paragraphe.

Signalisation aberrante du TCR

De nombreuses altérations phénotypiques et fonctionnelles des LT sont retrouvées au cours du LED. L'ensemble de ces dérégulations conduit à l'exagération de l'activation du TCR en réponse à un stimulus et à l'augmentation du nombre de cellules T activées (Moulton and Tsokos, 2011, 2015). Des anomalies au niveau de la signalisation du TCR avec notamment une diminution de

l'expression de la chaîne ζ du TCR, une baisse de la phosphorylation du motif ITAM ainsi qu'un défaut d'expression du facteur de transcription NF- κ B pourraient être responsables de l'hyperréactivité de ces cellules. L'expression de la tyrosine kinase Syk est, au contraire, augmentée dans les LT de patients par rapport aux contrôles sains. De plus, l'inhibition de Syk qui induit une baisse de la phosphorylation de ses substrats, réduit les atteintes cutanées et rénales chez les souris lupiques (Deng et al., 2010). Les LT produisent également moins d'IL-2. Puisque cette cytokine peut contribuer au maintien de la tolérance des LT, un défaut de production d'IL-2 pourrait favoriser la rupture de tolérance des LT qui se traduit, entre autres, par une production d'autoanticorps dans le LED. Par ailleurs, la reconstitution de la chaîne ζ du TCR des LT de patients conduit à une restauration de la production d'IL-2 après stimulation du CD3/CD28 (Nambiar et al., 2003).

Dérégulation de la signalisation calcique

Suite à l'engagement du TCR, une augmentation du niveau de calcium intracellulaire et de l'expression du facteur de transcription NFAT est retrouvée dans les LT de patients lupiques. NFAT se lie au promoteur du CD40L et de l'IL-2 et induit leur transcription (Kyttaris et al., 2007). Bien qu'une expression accrue du CD40L est observée chez les patients lupiques, l'augmentation de l'expression de NFAT ne favorise pas la production d'IL-2. Cette différence s'explique du fait que l'activation du promoteur de l'IL-2 nécessite également la liaison des facteurs de transcription AP1 et NF- κ B. L'expression de ces deux facteurs est diminuée dans les LT de patients lupiques et contribue donc à la diminution de la production d'IL-2. D'autre part, la surexpression du CD40L par les LT, au contact des LB autoréactifs exprimant CD40, permettrait une meilleure costimulation de ces dernières et augmenterait leur réponse autoimmune. L'expression du CD40L est également augmentée dans les LT de souris MRL/*lpr*. Le traitement de ces souris avec du dipyridamole, une molécule qui cible la voie calcineurine-NFAT, réduit l'expression du CD40L au niveau des cellules T, diminue la production d'IgG dépendante des LT et améliore les atteintes rénales des souris (Kyttaris et al., 2011).

Autres molécules de signalisation des cellules T

La protéine adaptatrice LAT intervient également lors de l'activation des LT. L'expression de cette dernière est diminuée chez les patients lupiques. Par conséquent, l'activation de la voie MAPK (« mitogen-activated protein kinase ») est altérée et la phosphorylation de Erk1/2 (« extracellular signal-regulated kinase 1/2») est diminuée chez les patients lupiques par rapport aux sujets sains (Nursamaa Abdoel, 2012).

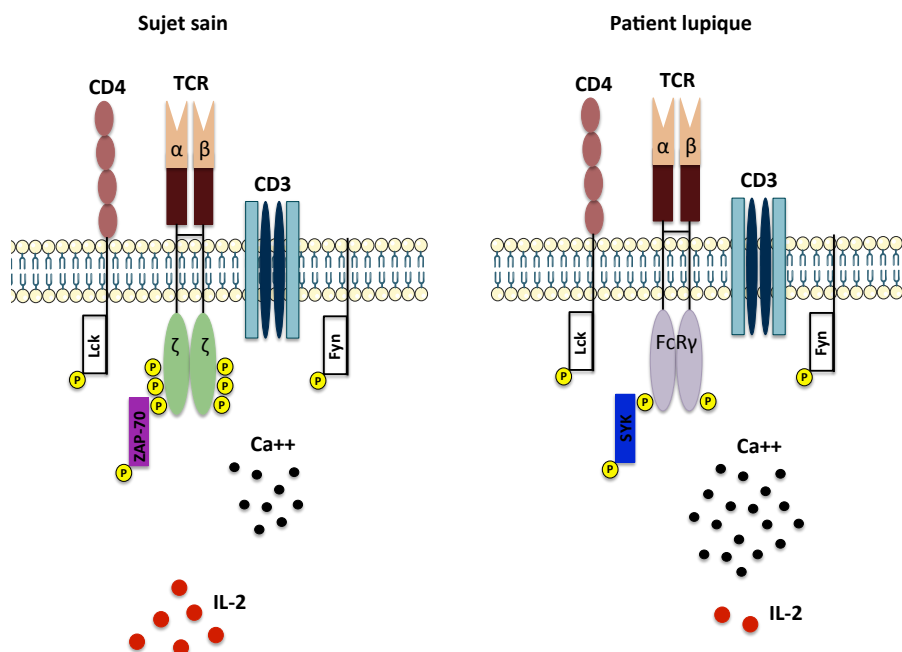


Figure 3 : Comparaison de la voie de signalisation du TCR entre un individu sain et un patient atteint de LED. L'engagement du TCR conduit à la phosphorylation de sa chaîne ζ. Par conséquent, la tyrosine kinase ZAP-70 est recrutée et phosphorylée par Lck, ce qui provoque en aval un flux de calcium cytoplasmique activant la cellule. Dans les LT de patients lupiques, la chaîne ζ est remplacée par la chaîne γ du récepteur Fc (FcRγ). Cette dernière est phosphorylée ce qui induit le recrutement de la kinase Syk qui à son tour est phosphorylée. En aval, le flux de calcium est plus élevé. De plus, le remplacement de la chaîne ζ du TCR par le FcRγ conduit à une baisse de la production d'IL-2 chez les patients lupiques (Moulton and Tsokos, 2011).

Les cellules Th17 et Treg dans la pathogénèse du LED

Une autre dérégulation majeure du lupus est la modification des proportions des sous-populations de LT, principalement des LT CD4+ auxiliaires. Les cellules Tregs interviennent lors des mécanismes de tolérance périphériques en inhibant les cellules autoréactives. Les cellules Tregs peuvent exercer des fonctions tolérogènes via un contact direct de cellule à cellule ou en sécrétant des facteurs immunosuppresseurs tels que le TGF-β ou l'IL-10. Une réduction du nombre des cellules Tregs et une altération de leur fonction ont été associées au lupus (Bonelli et al., 2008). Chez les souris lupiques MRL/lpr, le pourcentage de ces cellules est normal. En revanche, leur capacité d'inhiber la prolifération et la sécrétion d'IFN-γ par les LT CD4+ effecteurs est réduite (Parietti et al., 2008). Le rôle des cellules Tregs et leur implication au cours du lupus restent toutefois controversés. En effet, une étude a montré que la fréquence et l'activité inhibitrice des Tregs sont normales chez les patients souffrant de néphrite lupique (Yates et al., 2008). Les cellules Th17 jouent également un rôle important dans l'autoimmunité. Ces dernières sont les principales cellules sécrétrices d'IL-17, une cytokine pro-inflammatoire.

Un déséquilibre de la balance entre les cellules Th1 et Th17 est observé chez les patients lupiques (Shah et al., 2010). De plus, l'augmentation du nombre de cellules Th17 corrèle avec un taux plus élevé d'IL-17 dans le sérum des patients (Wong et al., 2000). Le facteur de transcription STAT3 est impliqué dans le développement des cellules Th17 ; son expression est augmentée dans les LT de patients (Harada et al., 2007) alors que sa diminution retarde l'apparition des atteintes rénales chez les souris MRL/*lpr* (Edwards et al., 2015). Outre les cellules Th17, les cellules T doubles négatives (B220+CD3+CD4-CD8-) peuvent également produire de l'IL-17. Ces cellules sont présentes en plus grand nombre chez les patients lupiques et elles infiltrerent les reins (Crispín et al., 2008).

L'augmentation du nombre de cellules Th17 et la diminution du nombre de cellules Tregs suggèrent un fort déséquilibre de la balance Th17 et Tregs au cours du LED (Figure 4). Le TGF- β joue un rôle important dans le développement des deux sous-populations de cellules T. Il favorise la différenciation des cellules T naïves en Tregs. De plus, le TGF- β induit l'expression de Foxp3 (Chen et al., 2003). Le TGF- β associé à l'IL-6 est nécessaire pour le développement des cellules Th17. Par ailleurs, l'IFN- α , qui est augmenté chez les patients lupiques, contribue également au développement des cellules Th17 (Ambrosi et al., 2012). Enfin, l'IL-2 est cruciale pour le développement des cellules Tregs (Bachmann and Oxenius, 2007). La baisse du taux d'IL-2 observée chez les patients lupiques pourrait donc expliquer la diminution du nombre de cellules Tregs ou leur dysfonctionnement.

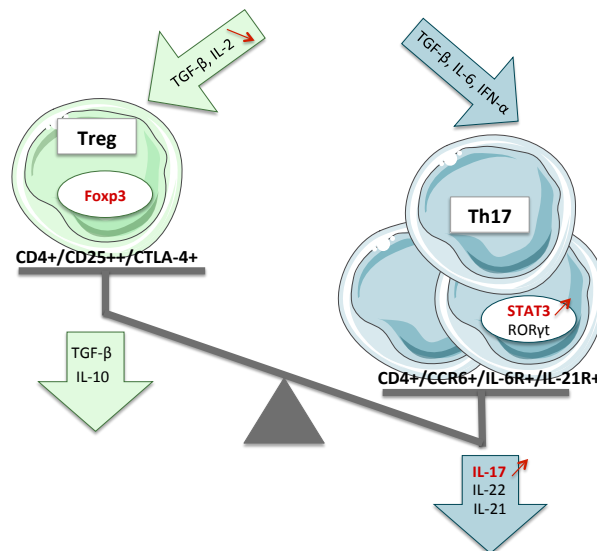


Figure 4 : Dérégulation de la balance entre les cellules Th17 et Tregs chez les patients lupiques. La proportion de cellules Th17 est augmentée ce qui, par conséquent, induit une sécrétion plus importante d'IL-17 chez les patients. Le nombre de cellules Tregs est, quant à lui, diminué chez les patients lupiques. Ces cellules sont impliquées lors des mécanismes de tolérance périphérique. Leur diminution pourrait ainsi contribuer à la rupture de tolérance.

Une autre sous-population de LT CD4⁺ est décrite comme ayant un rôle de cellule auxiliaire. Il s'agit des cellules T_{fh} (« follicular helper T cell ») qui expriment le récepteur des chémokines CXCR5 et qui sont localisées dans les centres germinatifs folliculaires. C'est au niveau de ces structures qu'elles soutiennent la différenciation et la maturation des LB en plasmocytes de longue durée de vie et/ou LB mémoires via la sécrétion d'IL-21. Les T_{fh} contribuent ainsi à la production d'anticorps de haute affinité (Vinuesa et al., 2016). Récemment, des sous-populations de cellules T_{fh} qui partagent des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles communes avec les cellules T_{fh} du centre germinatif ont été décrites dans le sang périphérique chez l'homme. Ces cellules circulantes sont décrites comme étant CXCR5^{high}ICOS^{high}PD-1^{high} et leur nombre est plus élevé chez les patients lupiques par rapport aux sujets sains. De plus, l'expression de PD-1 est significativement augmentée chez les patients et corrèle avec le SLEDAI, la fréquence de plasmablasts circulants ainsi que le taux d'anticorps anti-ADNdb (Choi et al., 2015). Une distribution anormale des sous-populations de cellules T_{fh} circulant a également été rapportée au cours du LED. Une augmentation de la fréquence des cellules T_{fh2} est retrouvée chez les patients actifs (SLEDAI > 8) tandis que la fréquence des cellules T_{fh1} est fortement diminuée (Le Coz et al., 2013). De plus, le déséquilibre entre le nombre de cellules T_{fh1} et T_{fh2} est associé à une augmentation du taux d'autoanticorps dans le sérum des patients. L'augmentation du nombre de cellules T_{fh2} corrèle avec une augmentation de la fréquence de cellules B mémoires doubles négatives (CD27-IgD-CD19⁺) qui expriment le récepteur de l'IL-21 à leur surface.

Enfin, le nombre de cellules T productrices d'IL-21 est augmenté chez les patients lupiques par rapport aux individus sains, toutefois sans corrélation avec le SLEDAI (Dolff et al., 2011). L'ensemble de ces résultats soutient l'hypothèse selon laquelle une expansion des cellules T_{fh} et une augmentation de la production d'IL-21 seraient deux éléments majeurs contribuant à la pathogénèse du lupus (Figure 5).

Le ciblage des cellules T_{fh} est considéré comme une nouvelle stratégie thérapeutique dans le LED. Des molécules inhibant la fonction de protéines impliquées dans la formation et/ou la fonction des cellules T_{fh} ont été testées dans des modèles murins lupiques. Parmi ces protéines ; ICOS (« inducible T-cell costimulator »), l'IL-6 ou encore l'IL-21 qui est la cytokine majoritairement produite par les cellules T_{fh} sont les cibles. Ainsi, une étude a montré que l'utilisation de la protéine de fusion IL-21.Fc chez les souris MRL/lpr conduit à un ralentissement de la progression de la maladie qui se traduit par une baisse de la production d'autoanticorps, une réduction des dépôts de complexes immuns dans les reins ainsi qu'une diminution des atteintes cutanées (Herber et al., 2007).

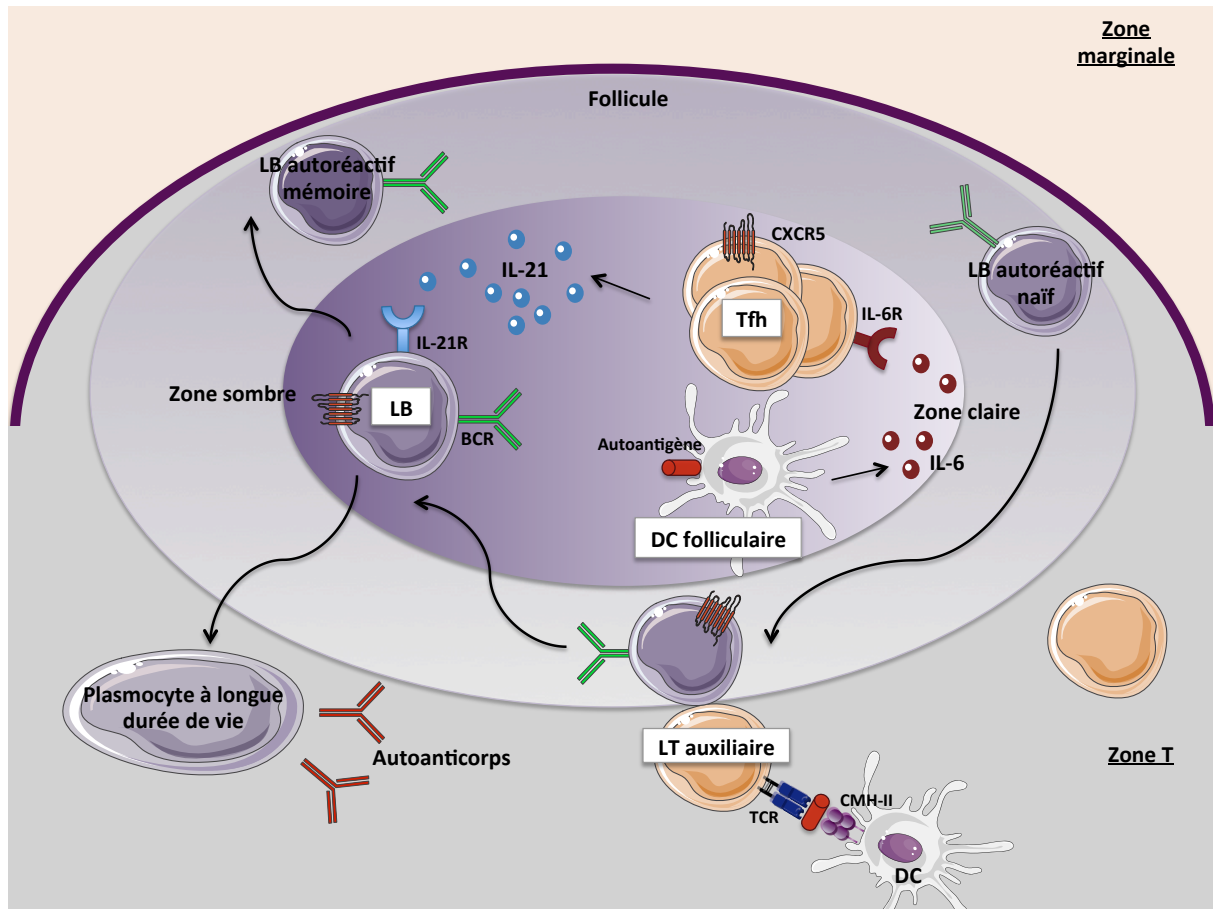


Figure 5 : Représentation schématique d'un centre germinatif : rôle des T_{fh} et de l'IL-21 au cours du LED. Le centre germinatif fait partie des organes lymphoïdes secondaires et se caractérise par de nombreuses zones. Chacune d'elle est composée de cellules immunitaires ayant un rôle distinct. Au sein de la zone claire se trouvent les DC folliculaires et les cellules T_{fh}. Les LB sont localisés au niveau de la zone sombre. C'est dans cette structure qu'ils subissent de nombreuses modifications lors de leur différenciation. Enfin, dans la zone T se trouvent les cellules T CD4+ auxiliaires et les DC qui participent toutes les deux à l'éducation des LB. Les DC de la zone T vont présenter un autoantigène aux LT auxiliaires. Cette interaction va permettre l'activation des LT et leur différenciation en T_{fh} au sein du follicule. D'autre part les LT auxiliaires participent à l'activation des LB autoréactifs naifs se trouvant à la frontière entre le follicule et la zone T. Une partie des LB va alors migrer dans le centre germinatif et subir une expansion clonale, une hypermutation somatique ainsi qu'une commutation de classe. La survie de ces cellules dépend de signaux apportés par les DC folliculaires et les T_{fh}. Ces dernières sont présentes en plus grand nombre chez les patients lupiques. Elles produisent de l'IL-21 en excès ce qui favorise la différenciation plasmocytaire des LB du centre germinatif. Les DC folliculaires quant à elles sécrètent de l'IL-6 favorisant la différenciation des T_{fh}. L'ensemble de ces mécanismes conduit à la différenciation des LB en cellules autoréactives mémoires et en plasmocytes à longue durée de vie qui produisent des autoanticorps (adapté de Nutt and Tarlinton, 2011).

1.4.4.3.2 Le rôle des lymphocytes B dans le lupus

Les cellules B jouent un rôle crucial dans le développement du lupus puisqu'elles sont responsables de la production des autoanticorps. Outre leur fonction liées à la sécrétion d'anticorps, plusieurs études controversées ont montré que les LB seraient les premières CPA impliquées au cours du LED. Les DC ne semblent pas jouer de rôle dans l'initiation de la réponse immunitaire adaptative puisque leur délétion chez les souris lupiques MRL/lpr n'induit pas d'augmentation du nombre de cellules T naïves (Teichmann et al., 2010). Les LB produisent également un grand nombre de cytokines pouvant agir sur d'autres cellules immunitaires. La sécrétion des cytokines par les cellules B est influencée par les signaux du BCR et du CD40. Ainsi, les LB activées par ces deux signaux sécrètent du TNF- α et de l'IL-6. En revanche, la stimulation du CD40 seul induit une sécrétion négligeable de cytokines pro-inflammatoires par les LB tandis qu'elle conduit à la sécrétion d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire (Duddy et al., 2004). Les cellules sécrétrices d'IL-10 sont appelées LB régulateurs (B_{reg}) (Figure 6).

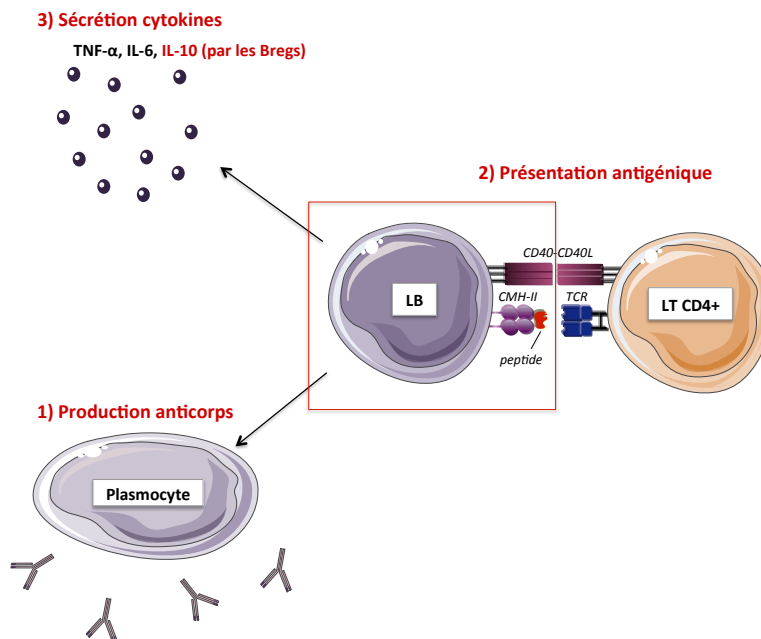


Figure 6 : Les différentes fonctions des LB. Les cellules B ont plusieurs rôles au cours de la réponse immunitaire. D'une part, elles peuvent se différencier en plasmocytes et produire des anticorps. D'autre part, elles sécrètent des cytokines pro et anti-inflammatoires et sont impliquées dans la présentation de peptides antigéniques par les molécules du CMH-II aux LT CD4+. Ces fonctions sont alors indépendantes des anticorps.

Ontogénie des LB en condition non pathologique

La reconnaissance d'un antigène est la première étape lors de l'activation du système immunitaire adaptatif. Les LB sont définis par la présence d'Ig de surface. Ces dernières,

produites par la cellule elle-même jouent le rôle de récepteur spécifique pour l'antigène (BCR). Les recombinaisons des segments codant pour les chaînes lourdes et légères des Ig traduisent la grande diversité du BCR. Ainsi, les cellules B, grâce à leur récepteur, vont être capables de reconnaître de nombreux antigènes. La première phase de différenciation des LB est indépendante des antigènes. Elle se déroule dans la moelle osseuse à partir des précurseurs hématopoïétiques. Lors de cette phase, la cellule B va passer par le stade pro-B, pré-B et enfin par un stade transitionnel. Elle subit des réarrangements des immunoglobulines aboutissant à la génération de LB immatures exprimant un BCR capable de reconnaître un antigène. Lors de la seconde phase, les cellules au stade transitionnel quittent la moelle osseuse et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires. Cette étape est dépendante des antigènes. Les LB vont alors passer au stade T1, puis T2 avant de devenir des LB matures exprimant à leur surface une IgM et une IgD. Lors d'une dernière étape, les cellules se différencient soit en LB folliculaires (FO) impliqués dans les réponses humorales dépendantes des LT, soit en LB de la zone marginale (MZ) qui sont impliqués dans les réponses humorales indépendantes des T (Figure 7).

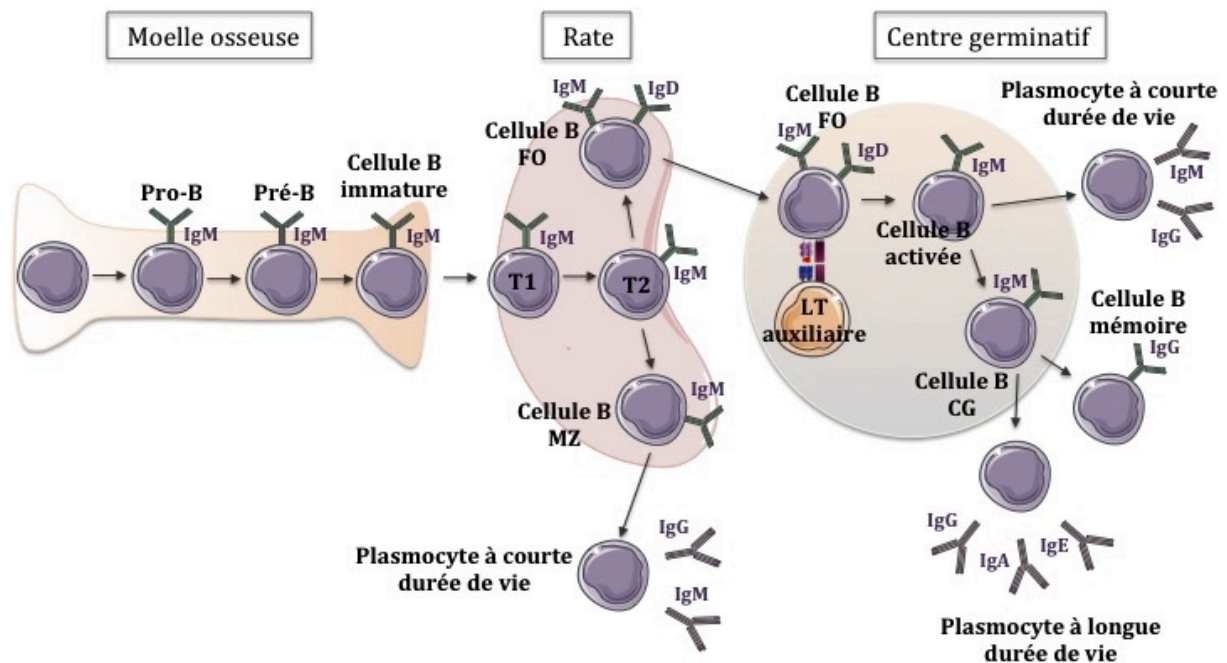


Figure 7 : Le développement des LB. La première étape de différenciation et de maturation des LB est indépendante de l'antigène. Elle se déroule dans la moelle osseuse et aboutit à la génération de LB immature exprimant une IgM capable de reconnaître un antigène. Cette reconnaissance se fait lors d'une seconde étape, au niveau des organes lymphoïdes secondaire (CG) et conduit à la formation de cellules B mémoires spécifiques pour un antigène ainsi qu'à des plasmocytes à courte et longue durée de vie.

Le pontage d'au moins deux BCR suite à la reconnaissance d'un antigène va permettre l'activation de la voie de signalisation du BCR. Les molécules CD79 qui sont associées au BCR sont rapidement activées grâce à la phosphorylation de leur motif ITAM par des kinases (Fyn, Lyn,..). La phosphorylation permet l'ancrage de protéines adaptatrices et favorise le recrutement de molécules de signalisation. Celles-ci vont activer les facteurs de transcription qui permettent l'expression de gènes tels que Bcl-2 et Ki67. Il existe deux types d'activation des cellules B matures en fonction de la participation ou non des cellules T. En effet, la présentation d'un antigène sans l'action d'un LT CD4+ conduit à l'activation des LB de la zone marginale. Ces derniers se différencient en plasmocytes de courte durée de vie produisant peu d'anticorps de classe IgM. Les LB folliculaires, quant à eux, sont principalement activés lorsque la reconnaissance de l'antigène implique l'intervention des LT auxiliaires. Ces derniers fournissent des signaux de costimulation tels que CD40L qui se lie au CD40 exprimé par les LB. Une fois activées, les cellules B FO peuvent se différencier en plasmocytes de courte durée de vie et produire des anticorps de classe IgM ou également participer à la formation d'un centre germinatif dans la zone folliculaire. C'est au sein de cette zone qu'ils vont subir une expansion clonale, une hypermutation somatique ainsi qu'une commutation de classe leur permettant ainsi de devenir des plasmocytes de longue durée de vie et produire des anticorps de classe IgG, IgA ou IgE ou encore de se différencier en LB mémoires (Figure 7).

La différenciation lymphocytaire B a pour but de générer des cellules possédant un récepteur membranaire capable de reconnaître un très grand nombre d'antigènes tout en contrôlant les cellules susceptibles de réagir envers le soi. Ainsi, avant leur migration en périphérie, les LB immatures subissent une sélection conduisant à l'élimination des cellules autoréactives. Cependant, malgré l'efficacité de cette sélection, un certain nombre de cellules autoréactives rejoignent la périphérie. Des mécanismes de tolérance périphérique sont alors mis en place.

Tout d'abord, au niveau central, dans la moelle osseuse, les cellules immatures subissent une sélection négative. Les cellules possédant un récepteur spécifique pour les antigènes du soi sont éliminées par délétion clonale, anergisées ou subissent un réarrangement de leur BCR. Une seconde sélection négative a lieu en périphérie, dans la rate, lorsque les cellules sont au stade transitionnel. Les LB possédant un récepteur de faible affinité pour le soi poursuivent leur développement et migrent dans le follicule. En revanche, les LB possédant un BCR de forte affinité pour le soi sont éliminées. Enfin, au sein du centre germinatif, intervient un troisième mécanisme de tolérance. Les LB, en plus de subir une hypermutation somatique et une commutation de classe, subissent une sélection positive. Les LB reconnaissant spécifiquement

l'antigène présenté par les DC folliculaires survivent. Les cellules dont le BCR ne reconnaît pas l'antigène reçoivent des signaux conduisant à leur mort par apoptose.

Ainsi, au cours du LED, des altérations des mécanismes de tolérance centrale et périphérique des LB peuvent contribuer à une augmentation du nombre de cellules autoréactives et à la production d'autoanticorps. Les travaux appuyant cette hypothèse restent cependant peu nombreux tout comme ceux décrivant les défauts de tolérance des LT. Une première étude a montré qu'au niveau de la moelle osseuse, les cellules B immatures de souris lupiques MRL/lpr ont une capacité réduite de réarrangement de leur récepteur, ce qui favoriserait l'émergence de cellules autoréactives (Lamoureux et al., 2007). Une seconde étude réalisée à partir de LB provenant de 3 patients lupiques a montré un défaut de tolérance périphérique. En effet, 25 à 50% des cellules B matures naïves produisent des autoanticorps avant même de participer à la réponse immunitaire (Yurasov et al., 2005). Enfin, un défaut de tolérance est suggéré au niveau des centres germinatifs. Des LB autoréactifs sont présents en grand nombre chez les patients lupiques alors qu'ils sont exclus dans les GC d'individus sains (Cappione et al., 2005).

Défaut de signalisation des LB chez les patients lupiques

Une signalisation aberrante du BCR joue certainement un rôle dans la rupture de tolérance des LB et par la suite dans la pathogénèse du LED. Le calcium est un important messenger intracellulaire impliqué dans la régulation de nombreux processus cellulaires. L'augmentation du flux calcique et de la phosphorylation de plusieurs protéines chez les patients lupiques indique une signalisation anormale du récepteur. Après stimulation des cellules B avec un ligand du BCR, la réponse calcique ainsi que la phosphorylation des résidus tyrosine est plus élevée chez les patients par rapport aux sujets sains (Lioussis et al., 1996). De plus, une diminution de l'expression de la protéine inhibitrice Lyn est retrouvée chez les patients (Huck et al., 2001). Les souris déficientes pour la protéine Lyn développent des symptômes lupiques tels que des atteintes rénales ou encore la production d'autoanticorps (Hibbs et al., 1995). Une des cibles de Lyn est le récepteur Fc γ RIIB. La mutation de ce dernier est associée au LED. Ainsi, la baisse d'expression du récepteur Fc γ RIIB empêche le recrutement de la protéine Lyn à proximité du récepteur suite à sa stimulation. L'ensemble de ces altérations contribue à l'augmentation de la réponse calcique des LB chez les patients et à l'amplification du signal induit par le BCR (Enyedy et al., 2001).

Le rôle de BAFF dans le défaut de tolérance des LB

L'émergence des LB autoréactifs au cours du lupus pourrait également être due à une augmentation de l'expression de la cytokine BAFF (« B-cell activating factor »). En effet, cette cytokine est impliquée dans la survie et la maturation des LB. De manière intéressante, son taux est augmenté dans le sérum des patients lupiques par rapport aux sujets sains et semble corrélérer avec la production d'anticorps anti-ADNdb (Petri et al., 2008). Ces résultats suggèrent donc que BAFF pourrait directement promouvoir la rupture de tolérance envers l'ADN natif en conduisant sélectivement à la production d'autoanticorps anti-ADNdb.

Altération de la répartition des différentes sous-populations

Certaines sous-populations de LB sont augmentées alors que d'autres sont diminuées au cours du LED. La représentation majeure de la rupture d'homéostasie des LB est l'expansion des plasmocytes qui corrèle avec l'activité de la maladie et le taux d'autoanticorps (Jacobi et al., 2003). De plus, le lupus est associé à une diminution du nombre de cellules B naïves (CD19+ CD27-) (Odendahl et al., 2000) et à une augmentation du nombre de cellules B transitionnelles (CD24^{high} CD38^{high}) (Sims et al., 2005). La fréquence de cellules B mémoires quant à elle ne semble pas affectée chez les patients actifs et non actifs, bien que leur nombre soit diminué chez les patients lupiques par rapport aux sujets sains.

Les fonctions indépendantes des anticorps

La présentation d'autoantigènes par les molécules du CMH-II aux LT CD4+ est indispensable pour l'activation d'une réponse autoimmune. Chez la souris lupique MRL/lpr, l'expression du CMH-II est augmentée à la surface des LB (Page et al., 2011). Par ailleurs, les souris lupiques déficientes pour le CMH-II dans les LB, présentent une augmentation du pourcentage de cellules T naïves et une diminution du pourcentage de cellules T activées (Giles et al., 2015). Les LB régulent également la progression de la pathologie grâce à la sécrétion de nombreuses cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, les LB de patients produisent des niveaux élevés d'IL-6 qui stimulent la différenciation plasmocytaire (Kitani et al., 1992). Finalement, la fonction des cellules B_{reg} est altérée chez les patients, ce qui conduit à une baisse de la production d'IL-10 suite à la stimulation du CD40 (Blair et al., 2010). Les cellules B_{reg} sont des cellules immunosuppressives qui interviennent lors de la tolérance. En produisant de l'IL-10, l'IL-35 et du TGF- β , elles sont capables de bloquer la prolifération des cellules T. Elles sont également importantes dans la

maintenance des fonctions des cellules Tregs. De manière indirecte, les cellules B_{reg} inhibent la différenciation des cellules Th1 et Th17 en agissant sur la production de cytokines pro-inflammatoires par les DC (Rosser and Mauri, 2015). Une récente étude a mis en évidence que le pourcentage de cellules B_{reg} est significativement diminué chez les patients lupiques, en particulier ceux avec des atteintes rénales, par rapport aux individus sains. Toutefois, cette diminution du nombre de cellules régulatrices ne corrèle pas avec l'activité de la maladie (Heinemann et al., 2016).

1.4.4.4. Les autoanticorps, responsables de nombreuses atteintes

Le LED est une maladie autoimmune qui est associée dans 95% des cas à une production d'autoanticorps. Ces derniers engendrent des inflammations et des dommages lorsqu'ils se déposent dans les tissus. Plusieurs études ont montré que les autoanticorps sont présents de nombreuses années avant le diagnostic de la maladie (Arbuckle et al., 2003). De plus, l'apparition de ces anticorps a tendance à suivre un parcours prévisible puisqu'ils s'accumulent progressivement tandis que les patients demeurent asymptomatiques. Il existe une grande variété d'autoanticorps au cours du LED (tableau 4).

Anticorps	Cible	Prévalence (%)	Utilité pour le diagnostic du lupus
anti-ADN*	ADN db	70-98	Spécifiques pour le LED, corrèlent avec l'activité de la maladie
anti-Sm*	Sm B/B', D1, E, F, G	20-40	Très spécifiques pour le LED
anti-histones	H1, H2A, H2B, H3, H4	70	Plus fréquents lors du lupus induit par les drogues
anti-nucléosome	nucléosome	60-85	Corrèlent avec l'activité de la maladie
anti-SSA/Ro	protéines Ro 60 et Ro 52	30	Prédisposent à un lupus cutané et au lupus néonatal
anti-SSB/La	protéine SSB/La	10	Diminution du risque de néphrite
anti-ribosome P	protéine ribosomes	20	Corrèlent avec la dépression et la psychose due à un neurolupus
anti-phospholipides	phospholipides	30-40	Corrèlent avec thromboses veineuses et artérielles
anti-C1q	C1q	17-46	Permet de mesurer l'évolution d'une néphrite lupique
anti-RNP	protéine de U1snRNP	30-40	
anti-érythrocytes	érythrocytes	60	
anti-plaquettes	plaquettes	30	Associés avec la thrombocytopénie
anti-ubiquitine	ubiquitine	80	
anti-HSP	HSPA8, HSP90	0-20	

* Anticorps marqueur du LED

Tableau 4 : Diversité des autoanticorps retrouvés chez les patients atteints de LED

Les autoanticorps sont générés par les plasmocytes issus de la différenciation de LB autoréactifs. Ils reconnaissent le plus souvent des protéines nucléaires telles que l'ADN et les histones mais ils peuvent également réagir avec des protéines cytoplasmiques ou directement avec des antigènes de la membrane cellulaire. Toutefois, seuls les anticorps anti-ADN natif et anti-Sm sont spécifiques du lupus. La détection des autoanticorps peut être très utile pour mieux définir le type de lupus. Par exemple, les anticorps anti-ADNdb sont plutôt associés à la néphrite lupique, les anticorps anti-Ro/SSA au lupus cutané et enfin les anticorps anti-ribosomes au neurolupus (Cozzani et al., 2014). Par ailleurs, la présence d'ANA (« anti-nuclear antibodies ») est nécessaire mais pas suffisante pour établir un diagnostic de LED. En effet, ces autoanticorps peuvent aussi être retrouvés dans d'autres maladies autoimmunes spécifiques ou non spécifiques d'organes ou encore dans certains cancers et infections (VIH ou tuberculose, par exemple). Un des principaux tests de détection des ANA est l'immunofluorescence sur cellules Hep2 dérivées d'une lignée tumorale de cellules épithéliales humaines. Ces cellules possèdent un gros noyau et un grand cytoplasme permettant une bonne visualisation des structures nucléaires reconnues par les anticorps de patients. L'aspect de la fluorescence est fortement évocateur pour certains anticorps, mais ne permet pas à lui seul de déterminer la spécificité des anticorps, qui devra être affinée grâce à d'autres méthodes utilisant des antigènes purifiés (ELISA). Une fluorescence homogène est typiquement associée à la présence d'anticorps anti-ADN natif alors qu'un aspect moucheté correspond à la présence d'anticorps anti-ENA (« extractable nuclear antigen »), anti-RNP, anti-SSA/Ro ou anti-SSB/La.

L'atteinte rénale est un symptôme majeur du LED et se caractérise par une inflammation pouvant toucher différentes structures du néphron (glomérule, tube interstitiel et tubules). Une succession de données suggère que les autoanticorps contribuent à ces lésions. Sources de nombreux débats et de décennies de recherches, plusieurs mécanismes sont toujours évoqués pour expliquer la pathogénèse rénale typique du LED générée par certains de ces autoanticorps. Le premier mécanisme repose sur une réactivité croisée des anticorps anti-ADNdb avec des antigènes glomérulaires. En effet, les anticorps anti-ADNdb de patients souffrant de néphrites lupiques sont capables de se lier à l'annexine-II et l' α -actinine exprimés par les cellules mésangiales (Susan Yung et al., 2015). Cette réaction croisée n'est pas retrouvée lorsque les anticorps anti-ADNdb proviennent de patients lupiques ne souffrant pas d'atteintes rénales (Mason et al., 2004). La seconde hypothèse repose sur la liaison électrostatique d'autoantigènes avec des protéines de la membrane basale du glomérule. Ces autoantigènes, pour la plupart des histones, sont ensuite reconnus par les autoanticorps de patients. Cette hypothèse est soutenue par la détection de complexes immuns contenant les histones H2B et H3 au niveau du glomérule

chez les patients lupiques (van Bruggen et al., 1997). Enfin, il a été proposé que des complexes immuns formés dans la circulation périphérique se lient aux différentes structures du rein et provoque une inflammation. En effet, ces complexes sont reconnus par les récepteurs Fcγ exprimés au niveau de la membrane du glomérule.

2. Traitements actuels du lupus

Le lupus est une maladie autoimmune systémique chronique d'origine multifactorielle. Il touche l'ensemble du corps humain avec une expression très variée des atteintes et des symptômes lupiques. De plus, de nombreuses cellules et voies immunologiques sont dérégulées. De ce fait, l'établissement d'une thérapie spécifique est très complexe. Les traitements actuellement proposés aux patients sont essentiellement palliatifs et non curatifs. Ils sont adaptés à la sévérité de la maladie ainsi qu'aux organes touchés. De manière générale, ils sont basés sur l'utilisation d'immunosuppresseurs, de glucocorticoïdes et d'anti-inflammatoires qui affectent l'ensemble du système immunitaire. Ces traitements sont non ciblés et engendrent de nombreux effets secondaires indésirables (infections, tumeurs, diabète,...). L'avancée des connaissances sur le lupus accélère la découverte de nouveaux traitements plus spécifiques ciblant certains processus biologiques impliqués dans le développement et la progression de la pathologie. Dans cette partie, nous aborderons les différentes thérapies proposées aux patients lupiques. Nous évoquerons également les molécules ciblées qui sont actuellement en essai clinique, parmi lesquelles le peptide P140 dont j'ai étudié le mécanisme d'action chez l'homme durant mes 3 années de thèse.

2.1. Les traitements non spécifiques

2.1.1. Les traitements conventionnels

Trois classes de médicaments sont indiqués dans le traitement du lupus : les anti-inflammatoires non stéroïdiens (A.I.N.S) et plus particulièrement l'aspirine, les anti-malariques et les glucocorticoïdes. Les A.I.N.S et l'aspirine sont proposés dans les formes relativement mineures en particulier lorsque les patients présentent des atteintes cutanées et articulaires. Cependant, l'inconvénient majeur des A.I.N.S est lié à son utilisation chronique qui entraîne l'apparition de troubles digestifs. Concernant les anti-malariques de synthèse, l'hydroxychloroquine (Plaquenil ®) et la chloroquine (Nivaquine ®) sont les plus couramment utilisés. Bien que leur mécanisme

d'action au cours du lupus reste inconnu, ces deux molécules lipophiles passent facilement à travers la membrane cellulaire lipidique et se concentrent préférentiellement dans les vésicules cytoplasmiques acides. En tant qu'agent lysomotrope, elles augmentent le pH intralysosomal, ce qui conduit à une baisse de la présentation antigénique par les molécules du CMH-II et à une diminution de la stimulation des TLR endosomaux. De plus, l'hydroxychloroquine agit sur la macroautophagie qui est un processus catabolique impliqué au cours de l'immunité innée et adaptative et qui est dérégulé dans plusieurs pathologies dont le lupus. Nous reviendrons sur le lien entre l'autophagie et l'autoimmunité dans un prochain paragraphe. Les anti-malariques sont plutôt bien tolérés et peuvent être administrés plusieurs mois avec très peu d'effets secondaires exceptés des rétinopathies (Ding et al., 2015). Enfin, les glucocorticoïdes sont des substances dérivées du cholestérol et sont prescrites pour leur activité anti-inflammatoire dans les formes aiguës de la maladie. Les plus couramment utilisés sont la prednisone (Cortancyl ®) et la méthylprednisolone (Médrol ®). Ces molécules se lient aux récepteurs des glucocorticoïdes, diminuent l'expression des gènes pro-inflammatoires dont le TNF- α et favorisent l'induction de cytokines anti-inflammatoires (IL-10). Il existe de nombreux effets secondaires (diabète, hypertension, atteintes oculaires) qui sont liés à leur forte posologie. Ces derniers sont normalement utilisés uniquement lors de thérapies courtes.

2.1.2. Les immunosuppresseurs

Les immunosuppresseurs sont largement employés au cours des formes sévères du LED et notamment lorsque les patients souffrent d'atteintes neurologiques et rénales. Ces traitements peuvent être associés à une corticothérapie à forte dose. Parmi les immunosuppresseurs les plus couramment utilisés, plusieurs sont des inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques. Ces molécules incluent le cyclophosphamide (Endoxan ®), l'azathioprine (Imurel ®) ainsi que le mycophénolate mofétil (Cellcept ®). Le cyclophosphamide fait partie de la classe des agents alkylants empêchant la réplication de l'ADN par formation de liaisons covalentes entre bases puriques et pyrimidiques. Il agit préférentiellement sur les cellules en prolifération (dont les LB) en induisant leur mort, c'est pourquoi il est utilisé dans le LED. Les effets secondaires des immunosuppresseurs restent une préoccupation majeure. Le cyclophosphamide peut provoquer des nausées, des vomissements et une diminution des globules blancs qui se traduit notamment par des infections urinaires. L'azathioprine est un inhibiteur de la synthèse des purines. Il est utilisé en prévention du rejet aigu lors de greffes d'organes et également dans les formes corticorésistantes des maladies autoimmunes (LED, PR,...). Les effets secondaires sont les mêmes qu'avec le cyclophosphamide, à savoir une chute du taux de globules blancs, des nausées et des

troubles digestifs. Enfin, le mycophénolate mofétil est également un anti-métabolite de la classe des inhibiteurs de la synthèse des purines. Il remplace progressivement l'azathioprine dans le traitement du rejet de greffe. Il inhibe de façon sélective la prolifération des lymphocytes. Les effets indésirables les plus souvent observés sont les troubles digestifs, une diminution de la résistance aux infections (due à une leucopénie) et un risque accru de tumeurs de type lymphomes.

En conclusion, les traitements actuellement proposés aux patients ont pour but de contrôler et réduire de manière globale la réponse immunitaire et l'inflammation. Ils permettent de diminuer les phases de poussées et les manifestations cliniques sans pour autant guérir la maladie. De plus, le LED requiert très souvent l'utilisation d'immunosuppresseurs et de glucocorticoïdes qui agissent de façon non spécifique sur le système immunitaire. L'utilisation de ces molécules conduit à l'apparition de nombreux effets secondaires dont les infections. Ainsi, le principal objectif de ces dernières années est de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques plus spécifiques, augmentant l'efficacité du traitement et diminuant les effets indésirables chez les patients.

2.2. Les traitements spécifiques

2.2.1. Les molécules commercialisées

Belimumab

Le Belimumab (Benlysta ®) est un anticorps monoclonal d'isotype IgG1 humanisé qui se lie à la protéine soluble BLYS/BAFF. Comme décrit plus haut, cette cytokine est augmentée dans le sérum des patients lupiques et joue un rôle central dans la survie des LB autoréactifs. Le Belimumab, en se liant à BAFF, empêche sa liaison aux récepteurs BAFF-R, BCMA et TACI et inhibe son activité (Petri et al., 2008). L'efficacité de cet anticorps dans le traitement du lupus a été étudiée lors de plusieurs essais cliniques (Furie et al., 2008; Wallace et al., 2009). Les essais de phases I et II ont permis de mettre en évidence que le Belimumab est biologiquement actif et bien toléré. Il induit une diminution de la fréquence des LB ainsi qu'une baisse du taux d'anticorps sériques anti-ADNdb chez les patients lupiques. Il est intéressant de mentionner que les patients actifs répondent mieux à leur traitement conventionnel lorsque celui-ci est combiné au Belimumab. Par la suite, le Belimumab a été évalué lors de deux essais cliniques de phase III : BLISS-52 (Navarra et al., 2011) et BLISS-76 (Furie et al., 2011). Les effets thérapeutiques ont été

mesurés par le taux de réponse des patients selon l'indice SRI qui comprend différents critères d'amélioration des symptômes cliniques. Le pourcentage de répondeurs à 52 semaines était de 51% pour les patients traités avec le Belimumab versus 39% pour les patients traités avec le placebo. Bien qu'un manque d'efficacité du Belimumab ait été retrouvé à 76 semaines lors de l'essai BLISS-76, aucun effet secondaire majeur dû au traitement n'a été observé chez les patients. Ces résultats ont conduit l'agence de santé américaine (FDA) à approuver le Belimumab pour le traitement du lupus en mars 2011. Il devient le premier médicament commercialisé pour le LED depuis 50 ans. Il convient de souligner qu'un certain nombre de patients ne répondent à ce traitement. En outre, le Belimumab est moins efficace chez les patients d'origine afro-américaine. Par ailleurs, son efficacité dans les formes sévères de la maladie reste indéterminée puisque les patients présentant des atteintes graves ont été exclus de l'étude (Hahn, 2013). C'est le cas des patients lupiques souffrant d'atteintes rénales ou neurologiques.

Rituximab

Le Rituximab (Rituxan ®) est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre la molécule CD20. Cet antigène est exprimé à la surface des cellules B matures mais n'est pas exprimé au niveau des plasmocytes. Suite à sa liaison, le Rituximab induit l'apoptose des cellules cibles. Il est utilisé dans le traitement des lymphomes B ainsi que dans la PR. Plusieurs études ouvertes ont également montré son efficacité chez les patients lupiques qui ne répondent pas aux traitements standards (Looney et al., 2004; Turner-Stokes et al., 2011). Cependant, deux grands essais cliniques, à savoir, LUNAR (incluant des patients atteints de néphrites lupiques) et EXPLORER (incluant des patients sans atteinte rénale) n'ont pas réussi à montrer un effet thérapeutique significatif du Rituximab (Merrill et al., 2010a; Rovin et al., 2012). Des facteurs tels que la conception de l'étude, le nombre d'individus ou encore les traitements de fond des patients pourraient expliquer ces résultats négatifs. Bien que le rôle du Rituximab dans le traitement du LED reste controversé, l'ACR et l'EULAR (European League against Rheumatism) recommandent ce médicament pour les patients lupiques réfractaires aux autres traitements. Les effets secondaires les plus importants du Rituximab sont les infections. Elles ont été reportées chez près de 10% des patients traités (Mok, 2015).

Ainsi, il existe plusieurs traitements pour le LED. La plupart sont non spécifiques et ont pour but de diminuer les symptômes lupiques lors des phases de poussées (Figure 8).

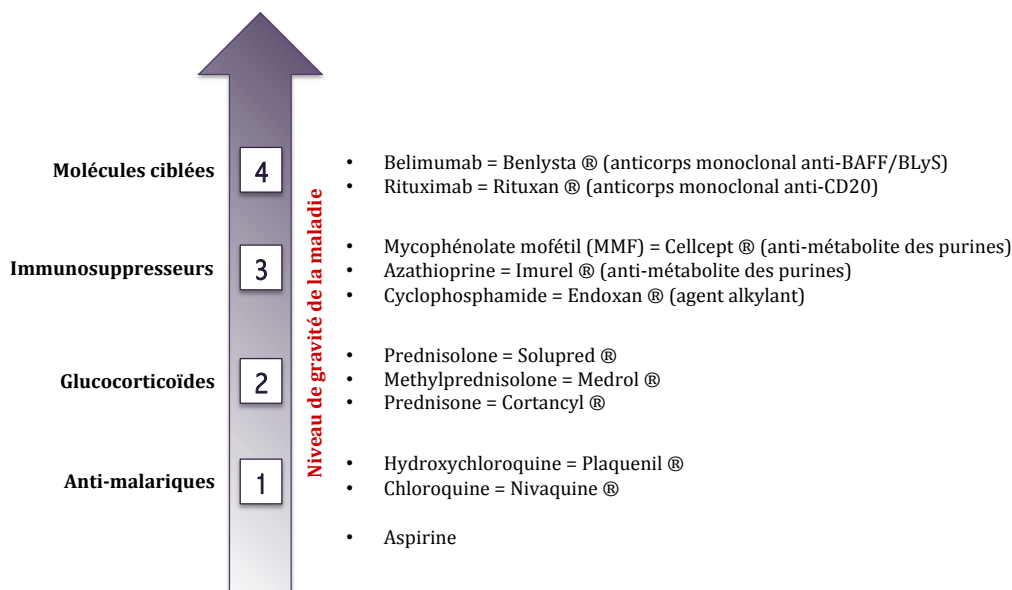


Figure 8 : Les différents traitements proposés aux patients lupiques en fonction des atteintes et de la gravité de la maladie.

2.2.2 Les molécules en essais cliniques

Plusieurs nouvelles molécules thérapeutiques sont actuellement en essais cliniques pour le traitement du LED. Ces dernières ciblent différents mécanismes et voies immunologiques impliqués dans la pathogénèse du LED (Figure 9).

L'hyperactivation des LB qui conduit à un excès de production d'autoanticorps est une dérégulation majeure du lupus. Ainsi, de nombreuses stratégies thérapeutiques reposent sur la déplétion de ces cellules grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Dans ce contexte, l'Epratuzumab ciblant la protéine de surface CD22 et l'Ocrelizumab ciblant la protéine CD20 ont tous les deux été testés lors d'essais cliniques. Bien que l'Epratuzumab ait montré des effets bénéfiques durant les phases I et II (Wallace et al., 2014), les premiers résultats de l'essai clinique de phase III ne semblent pas convaincants. En effet, la réponse au traitement des patients lupiques ayant reçu de l'Epratuzumab en plus du traitement standard ne semble pas statistiquement plus élevée que les patients ayant reçu le placebo et le traitement de fond. L'efficacité thérapeutique de l'Ocrelizumab a également été évaluée lors d'un essai clinique de phase III. Les effets secondaires liés au traitement ont conduit à l'arrêt prématuré de l'étude (Mysler et al., 2013). Comme décrit précédemment, le Belimumab, qui cible la protéine soluble BAFF, est la seule molécule approuvée pour le traitement du LED. Cependant, le Blisibimod, une protéine de fusion qui cible à la fois la forme soluble et membranaire de BAFF est actuellement en essai clinique de phase III. Les résultats de la phase II ont montré une réduction de la

protéinurie et des taux d'anticorps anti-ADNdb ainsi qu'une amélioration de l'activité de la maladie chez les patients traités (Furie et al., 2015).

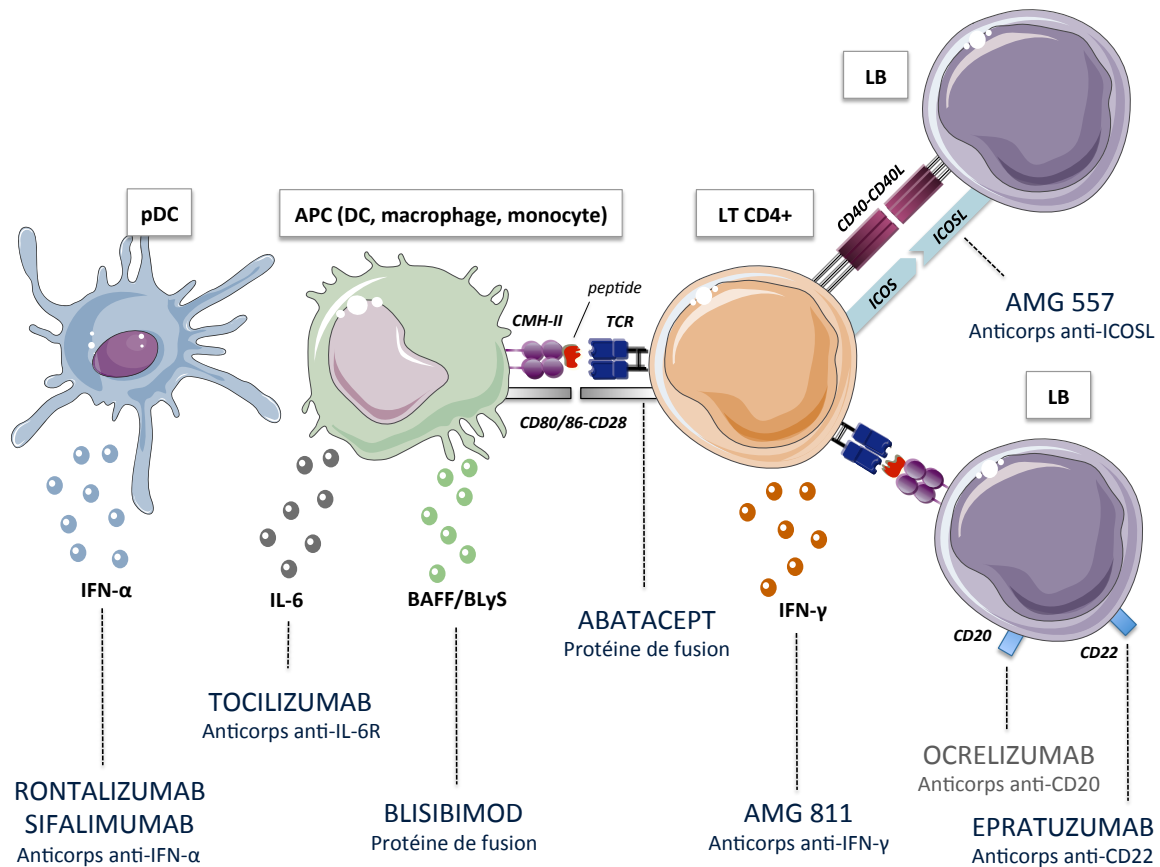


Figure 9 : Les traitements potentiels du LED : leurs cibles et mécanismes d'action. Les molécules actuellement à l'étude agissent sur plusieurs voies du système immunitaire. Le Rontalizumab, le Sifalimumab, le Tocilizumab, le Blisibimod et l'AMG 811 ciblent différentes cytokines impliquées dans la pathogénèse du LED. L'abatacept, quant à lui, inhibe les signaux de costimulation B7/CD28. C'est également le cas de l'AMG 557, un anticorps monoclonal, qui reconnaît ICOSL et bloque la voie de costimulation ICOS/ICOSL. Enfin, de nombreuses protéines transmembranaires des LB sont les cibles de ces nouvelles biothérapies. L'Ocrelizumab et l'Epratuzumab, deux anticorps monoclonaux, reconnaissent les molécules CD20 et CD22 respectivement (schéma adapté de Bakshi et al., 2015).

Une seconde stratégie thérapeutique consiste à bloquer les signaux de costimulation CD40/CD40L et B7/CD28. Ces signaux sont nécessaires à l'activation des cellules B et T et participent au développement du lupus. Parmi les molécules en essai clinique, l'Abatacept est une protéine de fusion humanisée contenant la partie Fc d'une IgG et le domaine extracellulaire de la molécule CTLA4. Cette dernière est un homologue du récepteur CD28 exprimé à la surface des LT activés. L'Abatacept est donc capable de bloquer l'interaction entre B7 et CD28 à la surface des cellules. Bien que son efficacité ait été prouvée dans des modèles murins et chez les patients atteints de PR (Kremer et al., 2008), l'Abatacept ne semble pas efficace chez les patients lupiques. Il pourrait toutefois présenter un potentiel thérapeutique dans un sous-groupe de

patients souffrant d'arthrites lupiques (Merrill et al., 2010b). Une autre voie de costimulation impliquant ICOS/ICOSL peut jouer un rôle dans la pathogénèse du LED. L'engagement de ICOS favorise l'orientation de la différenciation des cellules T CD4+ en Tfh et permet la maturation des LB. De plus, cette voie est particulièrement importante pour la sécrétion d'IL-10, sans pour autant influencer la prolifération des cellules Tregs. Chez les patients lupiques, l'expression de ICOS est augmentée sur les LT CD4+ et CD8+ (Yang et al., 2005). Ainsi, l'efficacité de l'AMG 557, un anticorps humanisé qui cible ICOSL, est actuellement en essai clinique de phase I chez des patients souffrant de LED (Zhang and Vignali, 2016).

Le blocage des cytokines, autre que BAFF, fait également l'objet de plusieurs essais cliniques. C'est le cas du Sifalimumab et du Rontalizumab qui sont deux anticorps monoclonaux humanisés d'isotype IgG1 actuellement en essais cliniques et qui ciblent l'IFN- α . Les résultats de l'essai clinique de phase II du Rontalizumab ont été publiés récemment (Kalunian et al., 2015). Ce traitement a été associé à une amélioration de l'activité de la maladie, à une réduction des poussées ainsi qu'à une diminution de l'utilisation des corticostéroïdes. Par ailleurs, un vaccin anti-IFN- α est également à l'étude dans le LED. Ici un Kinoid® (complexe formé entre la cytokine cible et une protéine immunogène, la *keyhole limpet hemocyanin (KLH)*), est administré aux patients qui répondent en produisant activement des anticorps neutralisant l'IFN- α . Lors des phases I/II d'essais cliniques, une réduction de la « signature IFN » fut observée chez les patients vaccinés, sans effets secondaires importants (Lauwerys et al., 2013). La poursuite des études chez l'homme est programmée. L'IFN- γ , une cytokine pro-inflammatoire majeure qui module la fonction de nombreuses populations cellulaires dont les LB, les LT et les macrophages, a également été étudiée lors de deux essais cliniques de phase I. Les résultats montrent que l'AMG 811, un anticorps monoclonal qui cible cette cytokine, est bien toléré et affecte l'expression de gènes associés à l'IFN chez les patients lupiques (Mathian et al., 2015). Enfin, le Tocilizumab est un anticorps monoclonal ciblant le récepteur de l'IL-6. Des taux élevés de cette cytokine sont retrouvés dans le sérum des patients actifs. Bien que les résultats de la phase I montrent que Tocilizumab est bien toléré, des études complémentaires sont nécessaires afin de confirmer son efficacité dans le traitement du lupus (Illei et al., 2010).

De nouvelles approches thérapeutiques sont mises en place afin de cibler spécifiquement les cellules autoréactives tout en laissant intact le reste des cellules du système immunitaire. En effet, les traitements conventionnels qui agissent sur l'ensemble des cellules du système immunitaire et les biothérapies qui appauvrissent une grande partie des populations de cellules cibles (ou diminuent leurs fonctions), entraînent de nombreux effets secondaires indésirables.

Ainsi, une solution thérapeutique plus spécifique consisterait à utiliser des peptides dérivés d'antigènes ou d'anticorps qui sont impliqués dans le LED. Au cours des dernières décennies, les peptides thérapeutiques ont bénéficié d'une intense recherche visant à améliorer sensiblement leur stabilité, leur biodisponibilité et leur efficacité. Par ailleurs, leur toxicité et leur immunogénicité sont généralement très faibles, ce qui réduit considérablement leurs effets secondaires. Leur coût de production est également plus abordable par rapport aux anticorps monoclonaux. A l'heure actuelle, environ 70 peptides thérapeutiques ont été approuvés par la FDA dans diverses indications thérapeutiques (Schall and Muller, 2015).

Peptides dérivés d'anticorps

Parmi les peptides dérivés d'autoanticorps, le pCons est une séquence de 15 acides aminés correspondant à la région VH d'un anticorps IgG anti-ADN. L'injection d'une forte dose de ce peptide à des souris lupiques (NZB/W)F1 prolonge leur survie, diminue la production d'anticorps anti-ADNdb et anti-nucléosome et réduit la sécrétion de cytokines inflammatoires telles que l'IFN- γ (Hahn et al., 2001; La Cava et al., 2004). Le mécanisme d'action du peptide pCons implique l'induction des cellules T CD4+ (CD4+CD25+Foxp3+) et T CD8+ (CD8+Foxp3+) régulatrices. Par ailleurs, les cellules CD8+ induites par pCons sont résistantes à l'apoptose et expriment des niveaux réduits de PD-1 (« programmed death-1 ») (Singh et al., 2008). L'efficacité du peptide pCons a également été testée *in vitro* sur des PBMC de patients lupiques. L'incubation des cellules de patients mais pas celles de sujets sains, en présence de pCons, conduit à une expansion des cellules Tregs (CD4+CD25+). L'expression de Foxp3 par les cellules Tregs est nécessaire pour induire une baisse de la prolifération et de la sécrétion d'IFN- γ par les cellules T CD4+CD25-. Les cellules Tregs de patients lupiques séropositifs expriment Foxp3, ce qui corrèle positivement avec le taux d'anticorps anti-ADNdb (Hahn et al., 2008). A l'heure actuelle, aucun essai clinique n'a été reporté pour le peptide pCons.

Un autre peptide appelé hCDR1 a également été synthétisé dans le but de rétablir la tolérance immunitaire qui est rompue au cours du LED. Ce peptide correspond à la séquence de la chaîne lourde CDR1 d'un anticorps anti-ADN monoclonal humain. L'administration de hCDR1 à faible dose une fois par semaine pendant 10 à 14 semaines réduit significativement la production d'autoanticorps ainsi que les atteintes rénales chez les souris lupiques (NZB/W)F1 (Luger et al., 2004). Le mécanisme de tolérance périphérique implique la suppression des réponses autoimmunes par les cellules T ayant une capacité immunoregulatrice. Ainsi, le traitement avec le peptide hCDR1 augmente le nombre de cellules CD4+ régulatrices de 30 à 40% (Sharabi et al.,

2006). Deux essais cliniques de phase I (Edratide) ont été réalisés et ont montré que le peptide est bien toléré. Un essai clinique de phase II (PRELUDE) a également été conduit afin de tester l'efficacité du peptide chez les patients lupiques. Bien que des effets bénéfiques significatifs aient été observés chez les patients actifs, une étude complémentaire à plus long terme ainsi qu'un nouvel indice de répondeurs doit encore être mis en place afin de valider l'efficacité du hCDR1 dans le lupus (Urowitz et al., 2015).

Peptides dérivés d'antigènes

Comme il a été présenté plus haut, les nucléosomes sont des éléments centraux dans la pathogénèse du lupus. L'équipe de Syamal Datta a identifié cinq peptides d'histones qui renferment des autoépitopes majeurs reconnus par les cellules B et T autoréactives. Ces peptides (H1₂₂₋₄₂, H2B₁₀₋₃₃, H3₈₅₋₁₀₂, H4₁₆₋₃₉ et H4₇₁₋₉₄) qui dérivent d'antigènes hautement conservés que sont les histones, peuvent être présentés par les molécules du CMH-II. L'induction de la tolérance à l'aide de hautes doses de ces peptides (300µg/souris) prolonge la survie des souris (SWRxNZB)F1 ayant ou non des atteintes rénales (Kaliyaperumal et al., 1999). De plus, l'injection à faible dose diminue le taux d'autoanticorps. De manière intéressante, le meilleur effet thérapeutique a été obtenu avec le peptide H4₇₁₋₉₄. Ce dernier supprime les réponses autoimmunes associées au lupus grâce à un mécanisme impliquant les DC et plus particulièrement les pDC. Ces dernières lors de leur interaction avec le peptide augmentent la sécrétion de TGF-β et diminuent la production d'IL-6. Le peptide induit également la génération de cellules CD4⁺CD25⁺ et CD8⁺ régulatrices qui sont impliquées dans le contrôle de l'autoimmunité (Kang et al., 2007). Les effets thérapeutiques potentiels de ces peptides ont été testés *in vitro* à partir de PBMC de patients. Lors de ces études, il a été démontré que les cellules Tregs sont induites lorsque les PBMC sont incubées en présence de faibles doses de peptides. Toutefois, l'induction des cellules Tregs est moins efficace lorsque les PBMC proviennent de patients actifs. Ces résultats suggèrent donc qu'un autre mécanisme que les Tregs entre en jeu dans la régulation des réponses autoimmunes lorsque de faibles doses de peptides sont utilisées chez les patients actifs (Zhang et al., 2013). Aucun essai clinique n'a été reporté à ce jour avec ces différents peptides d'histones.

Enfin, le peptide P140, découvert au sein de mon laboratoire, est un candidat-médicament prometteur. Il correspond à la séquence 131-151 de la protéine splicéosomale U1-70K et a été chimiquement phosphorylé sur le résidu sérine 140. Nous allons consacrer un second chapitre à sa découverte et son mécanisme d'action dans le LED.

Partie 2

UNE NOUVELLE STRATEGIE THERAPEUTIQUE : LE PEPTIDE P140, UN IMMUNOMODULATEUR DE LA MALADIE LUPIQUE

1. La découverte du peptide P140

Les protéines du spliceosome sont les cibles privilégiées des autoanticorps et des LT CD4+ au cours du lupus. En effet, les anticorps réagissant envers les protéines snRNP (« spliceosomal nuclear ribonucleoprotein particles ») sont présents chez 30 à 40% des patients lupiques. O'Brien a été le premier à montrer que les cellules T de patients atteints de maladies autoimmunes rhumatismales (dont le LED) réagissent avec les protéines de la particule U1snRNP (O'Brien et al., 1990). Cette dernière est composée de 7 protéines Sm majeures (SmB/B', D1, D2, E, F, G), dites « protéines de cœur » et de protéines dites « spécifiques » à la particule U1 (U1A, U1-70K et U1C). C'est dans ce contexte que mon laboratoire a voulu identifier les épitopes T associés au LED dans la protéine U1-70K qui compose le spliceosome. Suite au séquençage de la protéine, des peptides de différentes longueurs ont été synthétisés et testés afin de déterminer quel motif peptidique induit la prolifération des LT CD4+. Cette étude a permis de découvrir une séquence couvrant les résidus 131 à 151 (RIHMYVSKRSGKPRGYAFIEY) reconnue par les LT CD4+ de souris (Monneaux et al., 2000, 2001) et de patients lupiques (Monneaux et al., 2005). En effet, le peptide 131-151 est capable de stimuler *in vitro* la prolifération des LT CD4+ de souris MRL/*lpr* et (NZB/W)F1 en induisant la sécrétion d'IL-2 lorsque les souris sont à des stades précoces de la maladie. Les IgG de souris lupiques reconnaissent également cette séquence, qui est conservée entre la souris et l'homme. Elle est également capable de se lier à de nombreuses molécules du CMH-II chez la souris (I-A^k, I-E^k, I-A^d et I-E^d) et chez l'homme (HLA-DR1, HLA-DR4, HLA-DR7). Enfin, la séquence 131-151 englobe un motif conservé appelé RNP1 qui est également présent dans d'autres ribonucléoprotéines telles que U1-A et hnRNP-A2/B1. Partant du constat que les séquences contenant le motif RNP1 sont souvent les cibles des anticorps générés au cours du lupus, l'équipe a proposé que ce motif pourrait être responsable du processus de diversification des épitopes à d'autres séquences d'U1-70K (diversification intramoléculaire) (Monneaux et al., 2004) et à des séquences sur d'autres protéines du spliceosome (diversification intermoléculaire) (Monneaux et al., 2007).

La protéine U1-70K est hautement phosphorylée *in vivo* et son niveau de phosphorylation joue sur son rôle au cours de l'épissage. Les modifications post-traductionnelles de la protéine, qui se produisent lors de l'apoptose, peuvent être impliquées dans la génération de néo-antigènes responsables de la rupture de tolérance. Le peptide 131-151 contient deux résidus sérine aux positions 137 et 140. Afin d'étudier le rôle de la phosphorylation sur l'antigénicité du peptide et d'acquérir une meilleure compréhension de la façon dont ce peptide peut conduire à une réponse autoimmune, mon laboratoire a synthétisé 2 peptides phosphorylés sur la sérine 137 et 140 respectivement. De manière intéressante, il a montré que le peptide P140 est reconnu par les LT CD4+ des souris lupiques MRL/*lpr* et contrairement à l'hypothèse de départ présente un rôle protecteur dans le lupus. En effet, l'injection du peptide par voie intraveineuse à ces souris augmente significativement leur durée de vie, ce qui n'est pas le cas du peptide non phosphorylé 131-151. Il induit également une baisse de la production d'anticorps anti-ADNdb et réduit les atteintes cutanées et rénales. Il est important de mentionner que seule l'injection du peptide P140 en solution saline induit un effet thérapeutique chez les souris. Le peptide P140 injecté en présence d'adjuvant de Freund accélère le développement de glomérulonéphrites sévères (Monneaux et al., 2003; Page et al., 2011). De plus, les souris traitées sont capables de se défendre contre une infection virale. Le peptide P140 a donc un rôle protecteur dans le LED, sans effet immunosuppresseur (Monneaux et al., 2007). Les effets bénéfiques du peptide P140 obtenus chez la souris lupique ont conduit mon laboratoire à tester son efficacité chez l'homme lors d'essais cliniques. Ces études ont été réalisées par la société Immupharma sous le nom de Lupuzor™. Nous reviendrons sur les résultats des différentes phases de l'essai clinique dans un futur paragraphe (3.3.1).

Comme décrit plus haut, l'état de phosphorylation de la protéine U1-70K est crucial au cours de l'épissage. L'assemblage du spliceosome est initié par la reconnaissance d'un site 5' d'un pré-ARNm par la particule U1snRNP. Cette reconnaissance est assistée par des protéines SR (« serine/arginine-rich »). La phosphorylation et déphosphorylation affecte le recrutement des facteurs d'épissage, l'assemblage du spliceosome ainsi que le processus d'épissage. La protéine U1-70K qui fait partie du complexe U1snRNP est hautement phosphorylée et contient deux domaines SR. Par ailleurs, la thiophosphorylation de la protéine, rendant cette dernière résistante à la déphosphorylation par les phosphatases, conduit à un blocage complet de l'épissage sans pour autant inhiber la formation du spliceosome (Tazi et al., 1993). Lors de l'apoptose, la caspase-3 clive plusieurs protéines du spliceosome. C'est le cas de la protéine U1-70K. De plus, de nombreuses kinases et phosphatases sont également clivées, ce qui conduit à leur activation ou inactivation. C'est dans ce contexte que mon laboratoire s'est intéressé à

évaluer les changements d'état de phosphorylation de la protéine U1-70K durant l'apoptose. A des stades précoces de l'apoptose, la phosphorylation de la sérine 140 est augmentée (Dieker et al., 2008). Cette modification pourrait être associée à un changement d'activité de l'épissage de l'ARNm. Toutefois, le rôle exact de la phosphorylation de la sérine 140 ainsi que la kinase impliquée reste à ce jour non identifié. De plus, il existe plusieurs variants de la protéine U1-70K qui diffèrent de par leur niveau de phosphorylation. Lors de l'apoptose, un variant correspondant à la forme la moins phosphorylée de U1-70K a été mis en évidence. C'est la phosphatase PP1 qui est impliquée dans le processus de déphosphorylation (Dieker et al., 2008). Ainsi, les modifications de l'état de phosphorylation de la protéine U1-70K pourraient expliquer pourquoi la séquence 131-151 qui contient la sérine en position 140 est un autoantigène central au cours du lupus.

Puisque seul le peptide P140 ralentit le développement de la maladie chez les souris lupiques MRL/*lpr*, la structure et les propriétés physiques du peptide phosphorylé (P140) et non-phosphorylé (131-151) ont été étudiées et comparées (Page et al., 2009). Ainsi, la modélisation de la structure qui est basée sur les données obtenues par résonance magnétique nucléaire (RMN) a permis de mettre en évidence que la conformation des deux peptides est plutôt similaire (Figure 10). En effet, pour les deux analogues, la chaîne contenant le résidu sérine 140 (phosphorylé ou non) est dirigé vers le milieu extérieur et fait partie d'une boucle en épingle à cheveux. Cette conformation est probablement très importante pour la reconnaissance de la séquence. Ces dernières données montrent donc que le peptide phosphorylé sur le résidu sérine 140 garde toujours sa capacité de reconnaissance. La solubilité des deux peptides a également été déterminée à 20 et 30°C. Alors que le peptide 131-151 reste très soluble à une concentration de 200µM dans de l'eau, du PBS et du milieu de culture, le peptide P140 quant à lui s'agrège à une concentration égale ou supérieure à 50µM lorsqu'il est dans du PBS ou du milieu de culture. Dans l'eau, le peptide phosphorylé reste soluble. Enfin, la stabilité du peptide P140 a été mesurée en solution saline et en PBS par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). La structure du peptide reste intacte durant au moins 60 jours à 37°C. L'ensemble de ces résultats montrent donc que le peptide P140 utilisé à de faibles concentrations (<50µM) est très soluble et très peu dégradé au cours du temps.

dernières forment des agrégats qui peuvent endommager la cellule. Les protéines HSP sont alors surexprimées et assistent les protéines dénaturées afin qu'elle retrouvent leur conformation native (Stricher et al., 2013). Chez la souris lupique MRL/*lpr*, l'expression de HSPA8 est augmentée à la surface des LB, LT et macrophages (Page et al., 2011). Cette protéine chaperonne pourrait donc jouer le rôle de récepteur du peptide P140 et permettre son entrée dans les cellules dans un contexte lupique. Par ailleurs, l'injection intraveineuse du peptide à des souris lupiques provoque une baisse d'environ 30% de l'expression intracellulaire de HSPA8 au niveau des cellules B (Page et al., 2011). De la même manière, une baisse de l'hypercellularité périphérique qui est typique chez les souris lupiques est observée lorsque les souris sont injectées avec le peptide (Page et al., 2009; Schall et al., 2012).

La biodistribution du peptide P140 a également été étudiée par imagerie en temps réel (Page et al., 2011). Le peptide couplé à un fluorochrome s'accumule principalement dans les organes excréteurs (rate et poumons) suite à son injection par voie intraveineuse. Il est détecté dans la rate 10 à 15 min après l'injection. Les organes des souris lupiques ont été prélevés en fin d'expérience et les coupes montrent que le peptide co-localise principalement avec les CPA (LB et macrophages) au niveau de la rate. Le mode d'injection du peptide P140 est essentiel pour obtenir un effet thérapeutique chez la souris lupique. En effet, l'injection intranasale du peptide ne retarde pas le développement de la maladie et n'affecte pas la production d'autoanticorps anti-ADNdb (Monneaux et al., 2003). De plus, l'injection sous-cutanée du peptide en présence d'adjuvant de Freund à des souris pré-autoimmunes accélère le développement des atteintes rénales. Des études complémentaires sont actuellement réalisées dans mon équipe afin d'identifier les cellules ciblées par le peptide en fonction des différents modes d'administration.

Une récente étude a permis d'identifier plus précisément la voie d'entrée du peptide P140 dans les cellules B de souris lupiques (Macri et al., 2015). Le peptide est internalisé dans les LB par la voie d'endocytose qui est dépendante des clathrines. Des études complémentaires sont actuellement en cours pour déterminer si le peptide utilise la même voie d'entrée dans d'autres types cellulaires, qu'ils soient normaux ou autoimmuns. De plus, le récepteur ainsi que les molécules adaptatrices utilisées par le peptide afin d'être endocyté sont en cours d'identification dans l'équipe. Dans cette même étude, il a été montré que le peptide P140 est retrouvé dans les endosomes précoces des splénocytes de souris MRL/*lpr* 3h après injection par voie intraveineuse (Macri et al., 2015). Six heures après injection, le peptide est retrouvé dans les endosomes tardifs et co-localise avec la protéine LAMP-2A (« lysosome-associated membrane glycoprotein 2A»). Ces résultats indiquent que le peptide P140 entre dans les splénocytes par la

voie d'endocytose médiée par les clathrines et se retrouve finalement dans les lysosomes quelques heures après son injection à des souris MRL/lpr.

2.2. Le peptide P140 et l'autophagie

2.2.1. Définition de l'autophagie

La survie des cellules ainsi que leur bon fonctionnement dépend de la production énergétique. L'autophagie fait partie d'un des nombreux mécanismes cataboliques permettant la dégradation de constituants cytoplasmiques par le lysosome dans le but de générer de l'énergie. Ce processus cellulaire est très conservé chez les eucaryotes. En condition physiologique, l'autophagie permet aux cellules de dégrader des protéines à longue durée de vie, complétant ainsi l'action du protéasome qui cible les protéines à courte durée de vie. De plus, dans ces mêmes conditions, elle aide les cellules à se débarrasser des organites endommagés, tels que les mitochondries et les protéines agrégées qui sont toxiques. Lors d'un stress cellulaire (oxydation, hypoxie, privation de nutriment...), la stimulation de l'autophagie est importante afin de fournir l'énergie nécessaire pour la survie des cellules. Elle représente une voie majeure dans l'homéostasie cellulaire (Awan and Deng, 2014). Elle joue également un rôle essentiel au cours de la différenciation cellulaire de plusieurs lignées (adipocytes, érythrocytes et lymphocytes) et est impliquée dans l'immunité. La dérégulation de l'autophagie participe donc au développement de pathologies telles que le cancer, les troubles neurodégénératifs ainsi que les maladies infectieuses et autoimmunes (Mizushima et al., 2008). C'est pourquoi notre laboratoire s'intéresse tout particulièrement à l'autophagie au cours du LED. Enfin, dans certaines conditions, l'autophagie peut induire la mort cellulaire. L'apoptose et l'autophagie sont en effet étroitement liées grâce notamment à certaines protéines autophagiques (ATG « autophagy-related gene ») qui jouent un double rôle au cours de ces deux processus (Eisenberg-Lerner et al., 2009).

Il existe trois formes majeures d'autophagie qui diffèrent de par leurs fonctions physiologiques et leurs manières de délivrer des protéines agrégées, des organites endommagés ou encore des portions de cytosol aux lysosomes. Il s'agit de la macroautophagie, l'autophagie assistée par les chaperonnes (CMA « chaperone-mediated autophagy ») et la microautophagie (Figure 11). Toutefois, de nombreuses autres formes d'autophagie ont été décrites. On peut citer par exemple l'aggréphagie (pour les protéines agrégées), la mitophagie (pour les mitochondries), la ribophagie (pour les ribosomes) ou encore la xénophagie (pour les pathogènes). Ainsi,

l'autophagie qui était décrite au départ comme un système de dégradation cytoplasmique non spécifique, participe finalement à un processus très sélectif de livraison des différents substrats. Puisque plusieurs études, dont celles de mon équipe (Gros et al., 2012; Macri et al., 2015) pionnières dans ce domaine, ont montré que la macroautophagie et la CMA sont dérégulées au cours du lupus, nous nous intéresserons uniquement à ces deux voies autophagiques.

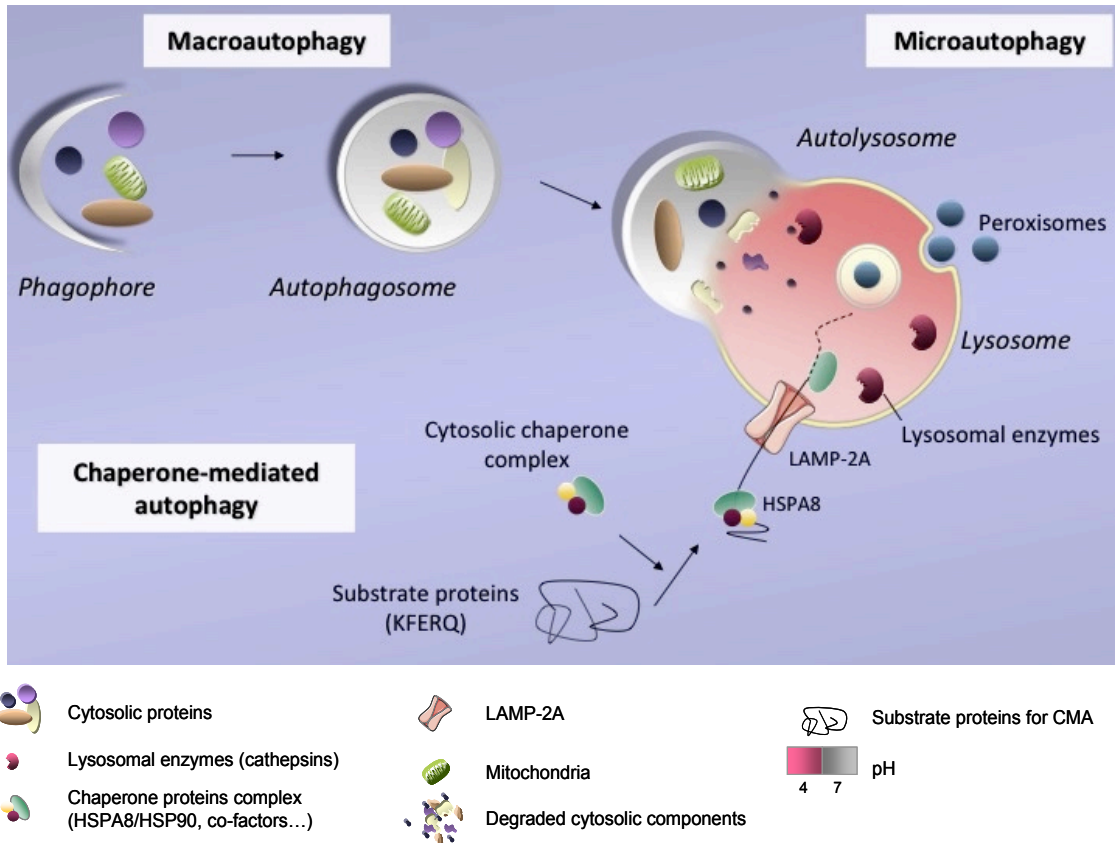


Figure 11 : Les trois principales voies autophagiques : la macroautophagie, la CMA et la microautophagie. Ces trois axes autophagiques partagent un élément central qui est le lysosome. C'est au sein de cet organite qu'a lieu la dégradation du matériel cytoplasmique grâce aux enzymes lysosomales. Au cours de la macroautophagie, les composants cytoplasmiques sont contenus dans des vésicules à double membrane (autophagosomes). Ces dernières fusionnent avec les lysosomes pour former les autolysosomes. Lors de la CMA, seules les protéines contenant le motif KFERQ sont reconnues par la protéine chaperonne HSPA8 et associées à la protéine LAMP-2A. Cette liaison permet la translocation des protéines cibles dans le lysosome. Enfin, la microautophagie implique la séquestration directe de composants cytoplasmiques par le lysosome grâce à l'invagination de sa membrane.

La macroautophagie

Plus communément appelée « autophagie » (ce qui prête souvent à confusion dans la littérature), elle reste la principale voie autophagique grâce à sa capacité de rapidement séquestrer des macromolécules et des organites entiers. La macroautophagie a été décrite pour

la première fois chez la levure *Saccharomyces cerevisia* et est régulée par de nombreuses protéines ATG. Chaque protéine a un rôle spécifique et la plupart d'entre elles sont conservées entre les espèces. La macroautophagie se déroule en trois étapes successives. Elle débute par la phase d'initiation au cours de laquelle les phagophores associés au complexe ATG5/ATG12 sont formés. Le dimère ATG5/ATG12 permet le recrutement de la protéine cytosolique MAP1LC3 (« microtubule-associated protein 1 light chain 3 ») plus communément appelée LC3-I. Cette dernière se lie alors à un résidu de phosphatidyléthanolamine pour former la protéine LC3-II incorporée aux phagophores et permettant l'élongation des membranes autophagiques. Lors d'une phase dite de « maturation », les autophagosomes séquestrent le contenu cytoplasmique dont des agrégats protéiques ou organelles endommagées. Finalement, les autophagosomes fusionnent avec les lysosomes pour former les autolysosomes. Le contenu cytoplasmique est alors dégradé par les protéases lysosomales et une partie des protéines LC3-II est recyclée en protéines LC3-I ou dégradée (Figure 12).

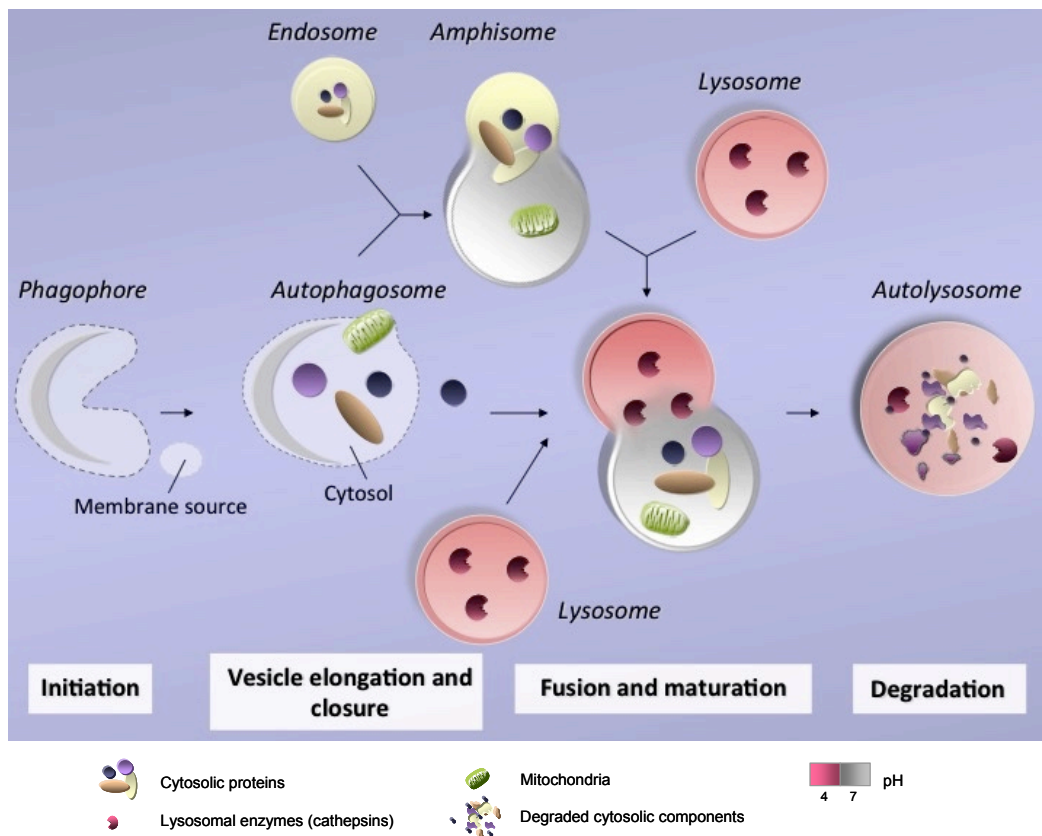


Figure 12: les différentes étapes de la macroautophagie. Le processus de la macroautophagie est initié par la formation d'un phagophore auquel s'associe le complexe ATG5/ATG12. Durant la phase suivante, l'élongation, les membranes autophagiques vont englober le matériel cytoplasmique et former une vésicule caractéristique à double membrane appelée autophagosome. Celle-ci va finalement fusionner avec le lysosome pour devenir un autolysosome et permettre la dégradation du matériel qui est contenu dans la vésicule autophagique.

La macroautophagie est étroitement régulée afin d'être rapidement activée ou inhibée en fonction du stress et des besoins énergétiques de la cellule. L'une des principales voies de régulation est la voie mTOR (« mammalian target of rapamycin »). Cette voie implique deux complexes : mTORC1 et mTORC2. Le complexe mTORC1 est composé de mTOR ainsi que de sa sous-unité catabolique, raptor (« regulatory associated protein of mTOR »), GβL (« G protein β-subunit-like protein ») et PRAS40 (« proline-rich Akt substrate of 40 kDa »). Lorsque mTORC1 est actif, il inhibe la formation des autophagosomes en s'associant au complexe ULK1/mAtg13/FIP200 en le phosphorylant (Figure 13). En revanche, dans des conditions de stress cellulaire ou en réponse à un traitement pharmacologique (tel que la rapamycine), mTORC1 se dissocie du complexe ULK1/mAtg13/FIP200 ce qui permet à la kinase UKL1 d'être activée et d'induire la formation des autophagosomes (Ravikumar et al., 2010). La rapamycine, connue pour activer la macroautophagie, agit en inhibant mTORC1. Cette inhibition dépend de la liaison de la rapamycine à la protéine FKBP12 (« FK506-binding protein of 12 kDa ») qui stabilise l'interaction entre raptor et mTOR (Oshiro et al., 2004). De plus, la présence d'acides aminés induit un signal qui active le complexe mTORC1. L'absorption de la L-glutamine est dépendante des transporteurs SCLA5 (« solute-linked carrier family A1 member 5 ») et SLC7A5/SLC3A2. Ainsi la perte de fonction de SCLA5 active la macroautophagie et inhibe la croissance cellulaire (Nicklin et al., 2009). Contrairement à mTORC1, le complexe mTORC2 est moins sensible à la rapamycine. Il est composé de mTOR, rictor (« rapamycin-insensitive companion of mTOR »), GβL, SIN1 (« SAPK-interacting protein 1 ») et PROTOR (« protein observed with rictor »).

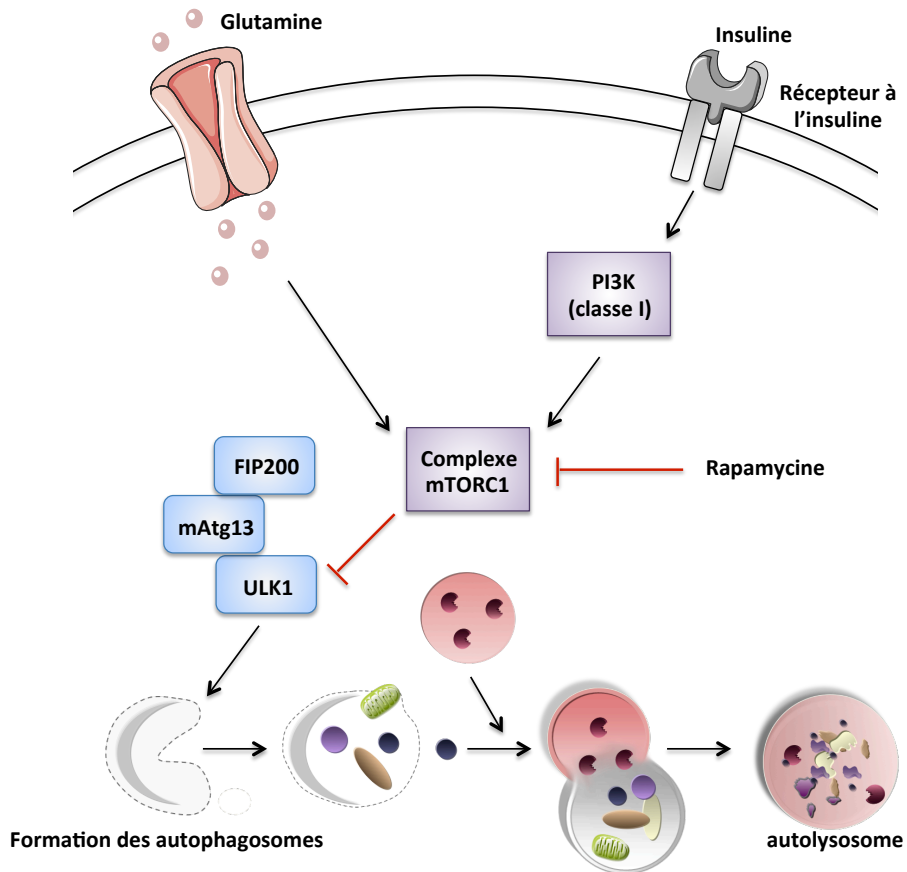


Figure 13 : Régulation de la macroautophagie par la voie mTOR. Le complexe mTORC1 inhibe la formation des autophagosomes en phosphorylant le complexe ULK1/mAtg13/FIP200. Le transport de la L-glutamine par les transporteurs SLC7A5/SLC3A2 stimule la voie de signalisation aboutissant à l'activation de mTORC1. La liaison de facteurs de croissance au récepteur de l'insuline est également une condition activatrice du complexe mTORC1. Cette régulation se fait à travers la voie de signalisation contenant des kinases PI3K de type I. Enfin, la rapamycine induit la macroautophagie en inhibant le complexe mTORC1.

Une seconde voie majeure de régulation de la macroautophagie fait intervenir le complexe contenant Beclin-1, VPS15 et VPS34 (« vacuolar protein sorting 15 and 34 »). Ce complexe peut interagir avec différents partenaires protéiques dans le but de contrôler la formation et la maturation des autophagosomes. VSP34 est une protéine kinase de la famille des PI3K de classe III. Cette dernière est la source majeure de PIP3 et permet le recrutement des protéines Atg au niveau du phagophore. En effet, la protéine WIPI-1 (« WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 1 ») est l'une des protéines principales qui reconnaît les molécules PIP3 ancrées au niveau de la membrane et qui participe à l'élongation du phagophore. Ainsi, la modification d'une des protéines partenaires associée au complexe Beclin-1/VPS15/VPS34 influence l'activité de VPS34 et par conséquent régule la macroautophagie. La protéine Atg14L qui se lie au complexe Beclin-1/VPS15/VPS34 stimule l'activité de VPS34 et induit la

macroautophagie (Itakura et al., 2008). C'est également le cas de la protéine UVRAG (« UV irradiation resistance-associated gene ») (Liang et al., 2008). Enfin, des protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (dont Bax et Bcl-XL) se lient à la Beclin-1 et inhibent la macroautophagie. Cette interaction bloque la formation des autophagosomes en réduisant la liaison de Beclin-1 à VPS34 (Patingre et al., 2005). De plus, les membres de la famille de Bcl-2 diminuent l'affinité de la protéine UVRAG pour Beclin-1 (Figure 14).

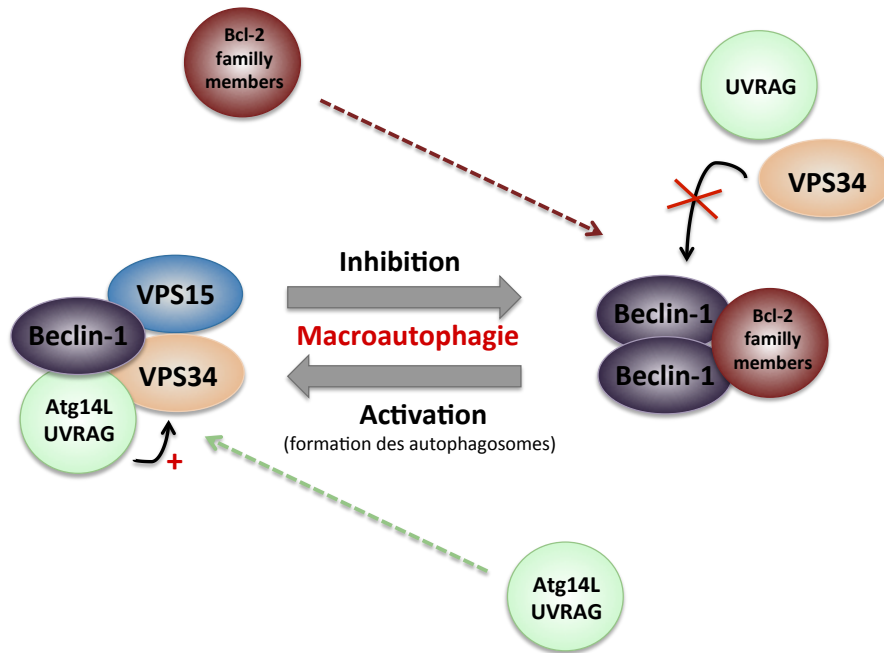


Figure 14 : Régulation dynamique de la macroautophagie grâce au complexe Beclin-1/VPS15/VPS34. Ces 3 protéines forment un complexe pro-autophagique avec leurs partenaires Atg14L et UVRAG. En revanche, lorsque les membres de la famille de Bcl-2 se lient à Beclin-1, la macroautophagie est inhibée suite à la perturbation de la liaison de la protéine kinase VPS34 avec le complexe. La liaison de Bcl-2 peut également bloquer l'interaction de Atg14L ou UVRAG, ce qui entraîne une inhibition de l'autophagie. De plus, la liaison de Bcl-2 favorise l'homodimérisation de Beclin-1, ce qui empêche la formation d'un hétérodimère avec Atg14L ou UVRAG (adapté de Funderburk et al., 2010).

La macroautophagie est impliquée dans de nombreux processus cellulaires. Tout d'abord, elle joue un rôle central dans le maintien de l'homéostasie puisqu'elle prend en charge les protéines mal structurées et les dirige vers les lysosomes. Elle est également importante lors du développement embryonnaire. L'activité autophagique est fortement augmentée à un stade précoce de l'embryogénèse. En effet, après fécondation les protéines maternelles stockées dans l'ovocyte sont dégradées et de nouvelles protéines codées par le génome zygotique sont

synthétisées. Bien que de nombreuses protéines soient dégradées par le protéasome, la macroautophagie pourrait participer à la dégradation des protéines maternelles et permettre ainsi le développement de l'oocyte (Wada et al., 2014). La macroautophagie intervient également dans la balance mort/survie. D'une part, elle est capable de favoriser la survie en dégradant des agrégats protéiques et des organelles endommagées cytotoxiques ainsi qu'en produisant de l'énergie. D'autre part, elle est capable de déclencher l'apoptose puisque certaines protéines Atg, comme Atg5 et Atg7, ont un rôle pro-apoptotique (Codogno and Meijer, 2006; Walls et al., 2010). Finalement, la macroautophagie intervient au cours de l'immunité et notamment dans la protection contre des agents pathogènes, dans le contrôle des réponses inflammatoires et autoimmunes ainsi que dans la tumorigenèse et le cancer (Deretic et al., 2013; Gros and Muller, 2014; Levine et al., 2011). Dans l'immunité innée, la macroautophagie fonctionne à différents niveaux et notamment contrôle la sécrétion de certaines cytokines. Elle active la sécrétion de TNF- α , d'IL-6 et d'IFN de type I alors qu'elle inhibe la production d'IL-1 α/β (elle régule l'activation de l'inflammasome en ciblant la pro-IL-1 β pour sa dégradation). Dans l'immunité adaptative, la macroautophagie intervient à différents niveaux et notamment joue un rôle primordial lors de la sélection des cellules T (affectant aussi leur homéostasie, leur différenciation et leur activation (Bronietzki et al., 2015)), dans la survie des cellules B (Pua and He, 2009) ainsi que dans la présentation antigénique (Crotzer and Blum, 2009). Nous reviendrons sur cette propriété dans une prochaine partie (paragraphe 2.3.3).

La CMA (« chaperone-mediated autophagy »)

La CMA est une forme sélective d'autophagie au cours de laquelle des protéines cytosoliques cibles sont dirigées vers le lysosome avant d'y être dégradées par des protéases lysosomales. Ainsi, elle permet la dégradation de protéines contenant un motif spécifique dans leur séquence. Tout comme la macroautophagie, elle peut être fortement activée lors d'un stress cellulaire (carence en acides aminées, oxydation,..). Par ailleurs, la CMA et la macroautophagie sont activées de manière séquentielle, ce qui suggère un lien entre ces deux voies autophagiques (Kaushik et al., 2008; Wu et al., 2015).

Les protéines contenant la séquence KFERQ sont reconnues par la protéine chaperonne HSPA8. Cette dernière forme un complexe avec d'autres protéines chaperonnes (dont HSP90) et va permettre la translocation des protéines cibles à travers le lysosome (Figure 15). Environ 30% des protéines cytosoliques renferment un motif KFERQ plus ou moins dégradé (Fred Dice, 1990). Toutefois, des modifications post-traductionnelles qui permettent de générer des motifs

supplémentaires augmentent encore le nombre de protéines cibles (Lv et al., 2011; Thompson et al., 2009). Ainsi, toutes les protéines internalisées contiennent dans leur séquence le pentapeptide qui est nécessaire et suffisant pour leur ciblage vers les lysosomes. La liaison de ce motif à des protéines qui ne sont généralement pas dégradées par la voie lysosomale est suffisante pour induire leur dégradation par la CMA (Koga et al., 2011). Outre sa fonction de reconnaissance des protéines cibles, la protéine HSPA8 est une chaperonne qui participe à de nombreuses autres fonctions cellulaires dont le dépliement des protéines ainsi que le désassemblage de complexes multiprotéiques. La protéine cible (contenant le motif KFERQ), la protéine HSPA8 ainsi que les autres protéines chaperonnes (HSP90, hip, hop, Bag1 et HSP40) forment un complexe qui interagit avec le récepteur LAMP-2A exprimé à la membrane du lysosome. L'internalisation du substrat protéique dans le lysosome dépend de la protéine transmembranaire LAMP-2A. Cette dernière correspond à l'une des trois isoformes codées par le gène *Lamp2* (LAMP-2A, LAMP-2B et LAMP-2C). Chaque isoforme possède une séquence en acides aminés différente au niveau du domaine cytoplasmique. Notons que seule la protéine LAMP-2A est spécifique à la CMA. Initialement le récepteur LAMP-2A est exprimé sous forme de monomères à la membrane des lysosomes. L'interaction de la protéine cible avec le récepteur LAMP-2A provoque sa multimérisation, ce qui permet la translocation de la protéine cible dans le lysosome. Par ailleurs, une forme lysosomale de la protéine chaperonne HSP90 assure la stabilité de LAMP-2A durant l'assemblage en multimères. Une fois le substrat protéique contenu dans le lysosome, le complexe LAMP-2A est dissocié grâce notamment à la protéine chaperonne HSPA8 lysosomale (Bandyopadhyay et al., 2008). Il existe en effet un variant de la protéine chaperonne HSPA8 localisé dans la lumière du lysosome (Agarraberes et al., 1997). Bien que son rôle ne soit pas encore clairement défini, la protéine HSPA8 intralysosomale pourrait s'associer au substrat et participer à son internalisation. Elle pourrait aussi agir passivement en bloquant le substrat au sein du lysosome et en évitant son externalisation (Figure 15).

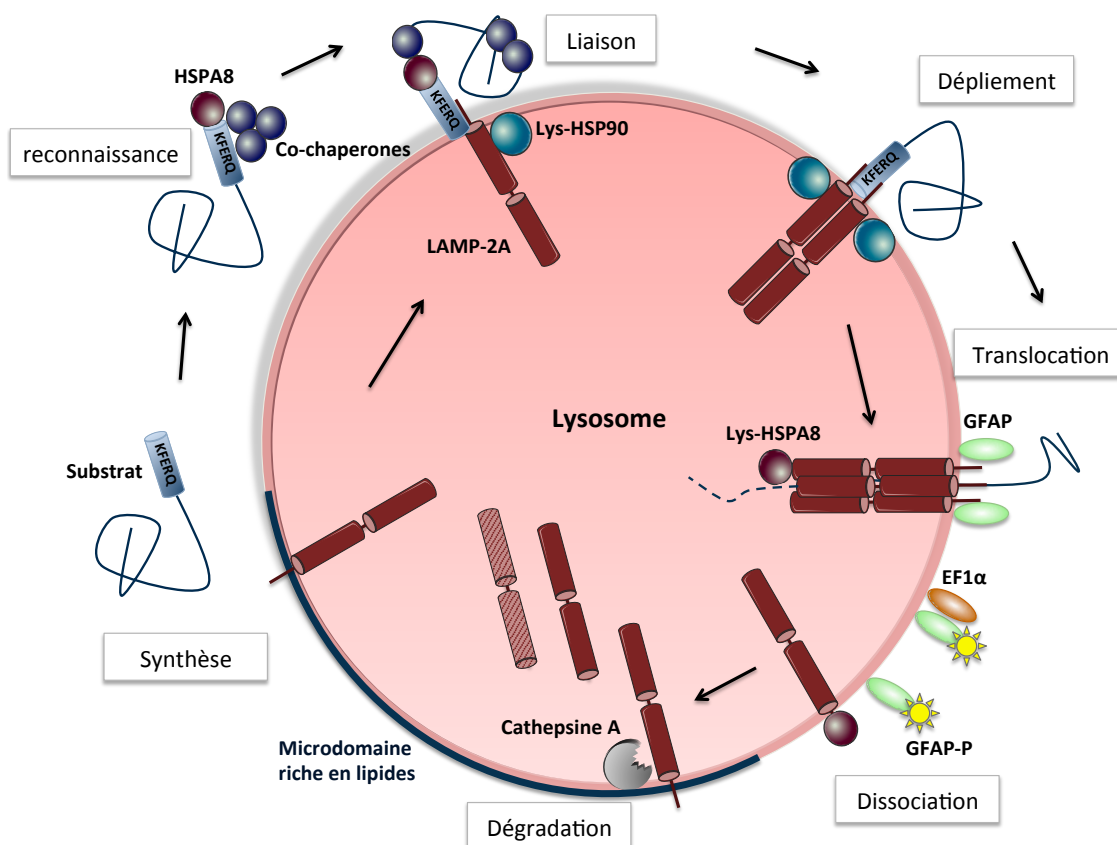


Figure 15 : La CMA, un processus dynamique impliqué dans la dégradation de protéines cibles. Les protéines contenant le pentapeptide KFERQ dans leur séquence sont reconnues par un complexe de chaperonnes incluant HSPA8. Le complexe s'associe ensuite au récepteur LAMP-2A exprimé à la membrane du lysosome, ce qui provoque la multimérisation de ce dernier. La protéine cible est alors transférée dans la lumière du lysosome grâce à la forme intralysosomale de HSPA8 et à la protéine HSP90 qui stabilise le récepteur LAMP-2A sous sa forme multimérique. Enfin, la protéine cible est dégradée par les enzymes lysosomales et le multimère de LAMP-2A est dissocié (adapté de Kaushik and Cuervo, 2012).

L'expression de la protéine LAMP-2A à la membrane du lysosome est le facteur limitant de la CMA. En effet, son niveau corrèle avec l'activité de la CMA (Cuervo and Dice, 1996). Ainsi, une modification d'expression de ce récepteur permet une activation ou une inhibition rapide de la CMA. Les niveaux de LAMP-2A sont principalement régulés par les variations de sa demi-vie et sa répartition entre la membrane et la matrice du lysosome. LAMP-2A est libérée de la membrane par l'action des protéases lysosomales et sa forme tronquée est rapidement dégradée dans la matrice lysosomale. La dégradation/libération de la protéine au niveau de la membrane du lysosome est inhibée en présence de substrats pour la CMA. L'import du substrat dans le lysosome entraîne également le transport de certaines protéines LAMP-2A de la membrane vers la matrice. Ces fractions de protéines peuvent par la suite être réintégrées dans la membrane du lysosome. Ainsi, la distribution de LAMP-2A entre la membrane et la matrice du lysosome est un processus dynamique qui contribue à la régulation des niveaux de LAMP-2A membranaire et par

conséquent régule l'activité de la CMA (Cuervo and Dice, 2000). En condition basale, une certaine quantité de protéines LAMP-2A se localise au niveau de la membrane du lysosome dans des microdomaines riches en cholestérol. Les protéines sont rapidement dégradées par la cathepsine A se trouvant dans la matrice du lysosome, ce qui empêche la multimérisation du récepteur et donc inhibe la CMA. En revanche, en présence de substrat pour la CMA ou lors d'un stress cellulaire activant cette voie autophagique, les protéines sont exclues des microdomaines et assemblées en multimères, ce qui permet l'import du substrat au sein du lysosome (Cuervo et al., 2003; Kaushik et al., 2006).

Outre la protéine HSP90 qui est localisée dans la matrice du lysosome, le récepteur LAMP-2A est stabilisé sous sa forme multimérique par plusieurs protéines cytosoliques dont GFAP («glial fibrillary acidic protein») et EF1 α («elongation factor 1 α »). GFAP est exprimée sous deux états au niveau de la membrane du lysosome. Lorsqu'elle est non-phosphorylée, elle s'associe au complexe multimérique de LAMP-2A et le stabilise. En revanche, lorsqu'elle est phosphorylée, GFAP a une faible affinité pour LAMP-2A et s'associe à la place avec EF1 α au niveau de la membrane du lysosome (Bandyopadhyay et al., 2010) (Figure 15). En présence de GTP, EF1 α est dissocié de GFAP phosphorylé. Ce dernier se dimérise ce qui conduit au désassemblage du récepteur LAMP-2A en monomère et à l'inhibition de la CMA. Ainsi, la concentration en GTP au niveau de la membrane du lysosome est un élément régulateur central du processus d'assemblage des récepteurs LAMP-2A et donc de l'activité de la CMA.

Une étude récente a permis de mettre en évidence que la voie de régulation de la CMA est composé de PHLPP1 («Pleckstrin homology leucine-rich repeat protein phosphatase 1»), mTORC2 et leur cible commune en aval Akt (Arias et al., 2015). Le complexe mTORC2 et Akt exercent un effet inhibiteur sur la CMA en agissant sur la phosphorylation de GFAP et en inhibant ainsi l'assemblage du complexe de translocation du substrat. Cet effet inhibiteur est neutralisé durant des conditions de stress par le recrutement de PHLPP1 au niveau de la membrane du lysosome. En effet, PHLPP1 active la CMA grâce à son effet inhibiteur sur Akt. Ainsi, cette voie de signalisation mTORC2/PHLPP1/Akt module l'activité basale de la CMA et son activation en réponse à un stress cellulaire (Figure 16).

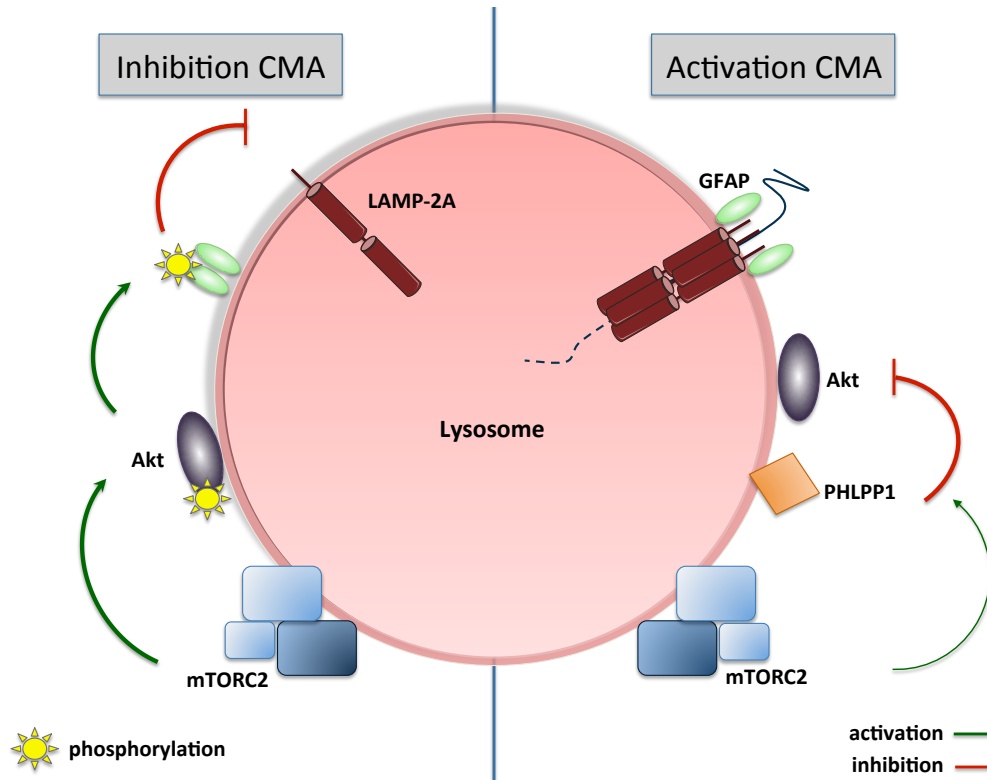


Figure 16 : Régulation de l'activité de la CMA. En condition basale, le complexe mTORC2 phosphoryle la kinase Akt localisée au niveau de la membrane du lysosome. Cette dernière active GFAP en la phosphorylant, ce qui provoque le désassemblage du récepteur LAMP-2A et l'inhibition de la CMA. Lors d'un stress oxydatif ou d'une privation de nutriment, PHLPP1 est recruté et inhibe l'activité de la kinase Akt. GFAP est alors exprimée sous sa forme non phosphorylée. Elle stabilise le complexe multimérique de LAMP-2A, ce qui conduit à la translocation du substrat et à l'activation de la CMA (adapté de Arias et al., 2015).

La macroautophagie et la CMA sont deux processus autophagiques qui jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la qualité cellulaire. Malgré leurs différences, la macroautophagie et la CMA sont étroitement liés. Elles sont faiblement activées en condition basale mais peuvent être rapidement stimulées en condition de stress. Ainsi, lors d'une privation de nutriment ou un stress oxydatif, celles-ci sont activées de manière séquentielle. La macroautophagie est stimulée durant les premières heures de carence, en fournissant la première vague d'acides aminés nécessaires pour la synthèse de protéines. Elle atteint un niveau maximum d'activité 4 à 6h après le début de la carence. En revanche, l'activité de la CMA augmente progressivement atteignant un plateau d'activité maximale environ 20h après le début de la carence. L'activation retardée de la CMA fournit une seconde vague d'acides aminés afin de maintenir la synthèse protéique à travers la dégradation sélective de protéines non essentielles (Wu et al., 2015). Ainsi, un changement d'activité d'une de ces deux voies autophagiques influence l'activité de la seconde. En effet, une étude a mis en évidence que les cellules déficientes pour la macroautophagie ont une activité de la CMA qui est augmentée (Kaushik et al., 2008). Lorsque la

CMA est inhibée, les cellules maintiennent un niveau normal de dégradation des protéines à longue durée de vie grâce à l'activation de la macroautophagie (Massey et al., 2006). Les mécanismes moléculaires mis en jeu et pouvant expliquer le lien entre ces deux voies reste à ce jour mal définis. Toutefois, il semblerait que la protéine chaperonne HSPA8 soit impliquée. Bien que la liaison du substrat au récepteur LAMP-2A soit le facteur limitant dans la voie de la CMA, la présence de la protéine HSPA8 lysosomale est absolument nécessaire pour le transfert du substrat dans le lysosome. HSPA8 est stable dans le lysosome à un pH compris entre 5,2 et 5,4. Or, lors de la macroautophagie, la fusion des autophagosomes avec les lysosomes conduirait à une augmentation transitoire du pH. Ainsi, la macroautophagie induirait indirectement la dégradation de la chaperonne HSPA8 lysosomale et réduirait par la même occasion l'activité de la CMA (Kaushik et al., 2008).

Les fonctions cellulaires de la CMA sont nombreuses et participent au maintien de l'homéostasie cellulaire. Entre autre, la CMA est impliquée dans la dégradation et le contrôle de la qualité des protéines. Grâce au lysosome, elle est capable de dégrader sélectivement des protéines endommagées ou altérées. En effet, lors d'un stress oxydatif, la CMA est augmentée pour permettre la dégradation des protéines oxydées. Il est intéressant de mentionner que l'activité de la CMA diminue avec l'âge, ce qui provoque une accumulation des protéines oxydées dans les tissus (Cuervo and Wong, 2014). Des modifications de l'activité de la CMA ne sont pas uniquement retrouvées au cours du vieillissement ; des altérations sont également observées en condition pathologique et notamment lors de maladies autoimmunes. Nous reviendrons sur ce point dans le paragraphe suivant (2.2.2). La CMA participe également à des fonctions spécialisées qui dépendent des substrats protéiques qui sont dégradés par cette voie. Plusieurs substrats de la CMA ont été bien caractérisés, ils correspondent à des facteurs de transcription ou des protéines régulant leur activité. Par exemple, durant une carence nutritionnelle, la CMA dégrade $I\kappa B\alpha$, un inhibiteur endogène du facteur de transcription NF- κ B. Ce dernier permet d'activer le programme de transcription requis pour l'adaptation des cellules lors d'une carence prolongée. L'oxydation de $I\kappa B\alpha$, dans ces conditions, est un élément déclencheur de sa dégradation par la CMA (Cuervo et al., 1998). Dans d'autres conditions, la CMA contrôle le changement d'expression de facteurs de transcription uniquement dans des tissus spécifiques. La diminution de l'activité de la CMA dans les cellules épithéliales rénales compromet la dégradation de Pax2 (« paired box gene 2 ») qui est nécessaire pour la prolifération et la différenciation cellulaire. Ainsi, l'accumulation de Pax2 entraîne une croissance anormale de ces cellules et une hypertrophie du rein (Franch et al., 2001). La CMA contribue également à la présentation antigénique par les molécules du CMH-II. Cette hypothèse est soutenue par le fait

que la modification d'expression des protéines LAMP-2A ou HSPA8 augmente ou réduit la présentation d'autoantigènes cytoplasmiques (Zhou et al., 2005). La diminution du niveau total de la protéine LAMP-2 réduit la présentation de l'antigène endogène GAD (« glutamate decarboxylase ») par HLA-DR4. Inversement, la surexpression de LAMP-2A conduit à une augmentation de la présentation de l'antigène endogène GAD mais pas des antigènes exogènes. Enfin, la CMA est impliquée dans le contrôle de l'activation des cellules T en dégradant spécifiquement des régulateurs négatifs de la voie de signalisation du TCR, Itch (« Itchy E3 ubiquitin protein ligase ») et RCAN1 (« regulator of calcineurin 1 ») (Valdor et al., 2014a).

2.2.2. L'autophagie et son implication au cours de l'autoimmunité

Comme décrit plus haut, l'autophagie joue un rôle primordial au cours de l'immunité innée et adaptative. L'altération de ce mécanisme pourrait être à l'origine d'une dérégulation du système immunitaire et contribuerait au développement de syndromes autoimmuns. L'autophagie (et plus précisément la macroautophagie) est régulée par de nombreuses protéines appartenant à la famille des gènes *Atg* qui sont bien caractérisés chez la levure et les mammifères (Klionsky and Emr, 2000; Mizushima et al., 2011; Ohsumi, 2014; Shibutani et al., 2015). Les protéines ATG sont très conservées au cours de l'évolution et chacune d'elles a une fonction spécifique au cours de l'autophagie. Plusieurs études ont montré qu'un certain nombre de gènes *Atg* sont associés à l'autoimmunité. En effet, des analyses génétiques ont rapporté que des polymorphismes dans ces gènes pourraient conférer une susceptibilité accrue à développer une maladie auto-immune. Ainsi, des études d'associations pangénomiques effectuées chez des patients atteints de LED ont permis d'identifier plusieurs SNPs (« single nucleotide polymorphisme ») localisés dans les gènes *Atg* et qui sont associés à l'apparition de la maladie (International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus Genetics (SLEGEN) et al., 2008; Orozco et al., 2011). Un SNP localisé dans la région intergénique entre *Atg5* et *Prdm1* corrèle avec une plus forte expression de l'ARNm du gène *Atg5* (Zhou et al., 2011). L'association génétique entre *Atg5* et la susceptibilité au LED a été confirmée dans des études individuelles mais n'est pas retrouvée dans toutes (Järvinen et al., 2012). Une méta-analyse réalisée en Asie a montré quant à elle une forte association entre un SNP localisé dans le gène *Dram1* et le LED (Yang et al., 2013). Ce gène code pour un activateur de la macroautophagie en réponse à un stress médié par p53 (un gène suppresseur de tumeur). Des polymorphismes génétiques ont également été trouvés dans d'autres maladies auto-immunes telles que la maladie de Crohn où un variant du gène *Atg16L1* (rs2241880) augmente le risque de développer cette maladie (Hampe et al., 2007). En revanche, aucune association n'est observée entre ce variant et la colite ulcéreuse, une autre maladie

autoinflammatoire intestinale (MICI) aussi connue sous le nom de rectocolite hémorragique. Les souris mutantes pour *Atg16L1* sont résistantes au développement d'une maladie intestinale induite par la bactérie *Citrobacter rodentium* (Marchiando et al., 2013). ATG16L1 joue un rôle central dans la formation des autophagosomes, faisant partie du complexe ATG5/ATG12 qui est nécessaire pour le recrutement de la protéine LC3-I au niveau des membranes autophagiques. Ainsi, la mutation du gène *Atg16L1* altère l'autophagie et augmente la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α et IL-1 β (Saitoh et al., 2008). En plus des SNPs et des gènes de susceptibilité, plusieurs études ont montrées que l'expression de certains gènes de l'autophagie est modifiée au cours de l'autoimmunité. Dans ce contexte, l'expression d'*ATG7* et *BECLIN-1* est augmentée dans les ostéoclastes de patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde. La cytokine pro-inflammatoire TNF- α est responsable de la variation d'expression du gène *Atg7*. Cette cytokine est critique dans la pathogénèse de la PR puisqu'elle régule l'inflammation synoviale (Tableau 5).

En ce qui concerne la CMA, aucune étude à ce jour n'a mis en évidence des polymorphismes génétiques au sein des gènes impliqués dans cette voie. Récemment, mon équipe a montré que l'expression de plusieurs protéines de la CMA (LAMP-2A et HSPA8) est augmentée dans les lymphocytes B de souris lupiques MRL/*lpr* (Macri et al., 2015; Page et al., 2011). Cette augmentation suggère que la CMA est dérégulée dans ces cellules au cours du lupus. Toutefois, les mécanismes impliqués dans les changements d'expression ne sont pas connus et sont différents en fonction des protéines. En effet, alors que l'augmentation de l'expression de HSPA8 corrèle avec une augmentation de son ARNm chez la souris MRL/*lpr*, aucune variation d'expression d'ARNm n'est observée pour LAMP-2A dans les LB (Macri et al., 2015; Page et al., 2011).

L'ensemble des analyses génétiques met en évidence le lien potentiel entre l'autophagie et l'autoimmunité. Toutefois, à l'heure actuelle les arguments expérimentaux montrant un rôle de l'autophagie dans l'initiation et la progression de l'autoimmunité sont encore rares. D'un point de vue moléculaire et cellulaire, l'étude de l'autophagie dans un contexte autoimmun est soutenue par des expériences réalisées à partir de souris possédant un fond génétique autoimmun et qui sont manipulées génétiquement afin de sur-exprimer ou sous-exprimer certains gènes de l'autophagie. Le peu d'information que nous possédons concernant le rôle de la CMA au cours de l'autoimmunité provient du fait que les modèles murins de délétion pour les marqueurs de la CMA ne sont pas tous viables. C'est le cas des souris déficientes pour la protéine HSPA8 (Valdor et al., 2014a). Par ailleurs, il n'existe aucun inhibiteur pharmacologique

spécifique pour la CMA. Mon laboratoire a pour la première fois montré que la macroautophagie est dérégulée dans les lymphocytes T de patients lupiques et de souris MRL/*lpr* et (NZB/W)F1 (Gros et al., 2012). Le nombre d'autophagosomes est plus élevé, ce qui se traduit par une augmentation de l'activité autophagique. Cette dérégulation est d'autant plus importante lorsque les cellules T sont stimulées par des activateurs chimiques de la voie de signalisation du TCR. Par ailleurs, l'augmentation du nombre de vacuoles autophagiques n'a pas été retrouvée dans d'autres pathologies inflammatoires non lupiques (Figure 17).

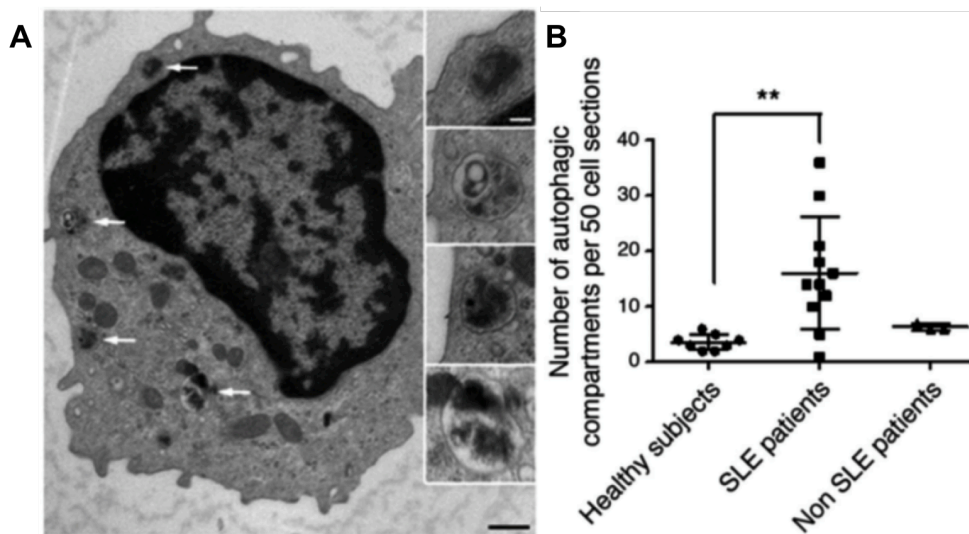


Figure 17 : Augmentation du nombre d'autophagosomes dans les LT de patients lupiques. A. Image en microscopie électronique à transmission d'un LT périphérique isolé à partir du sang d'un patient lupique. Les flèches blanches désignent les vacuoles autophagiques correspondant aux autophagosomes. Les structures sont agrandies à droite de l'image. B. Quantification du nombre d'autophagosomes dans les LT périphériques d'individus sains, de patients lupiques et de patients atteints d'un syndrome de Sjögren ou souffrant de vascularites. Abréviations : SLE, « systemic lupus erythematosus » (Gros et al., 2012).

La dérégulation de la macroautophagie au cours du LED a été confirmée par d'autres équipes. Alessandri et ses collègues ont montré dès 2012 une augmentation de l'expression de la protéine LC3-II dans les cellules T CD4+ naïves de patients lupiques (Alessandri et al., 2012). Ils ont émis une autre interprétation en suggérant que les LT de patients sont résistants à l'induction de la macroautophagie. Cependant, il est possible que l'activité de la macroautophagie dans ces cellules soit déjà à son maximum. Une étude plus récente a permis de renforcer et compléter les travaux décrits ci-dessus. Chez les souris (NZB/W)F1, la macroautophagie est augmentée dans les LB et plus particulièrement à des stades précoces du développement des cellules (Clarke et al., 2014). Chez les patients, l'activité autophagique est également augmentée dans les cellules B naïves. En plus des LB, la macroautophagie est dérégulée dans les LT de

patients. Dans les deux cas ces altérations corrélerent avec l'activité de la maladie. Seul un petit nombre d'études ont montré que la macroautophagie est dérégulée dans d'autres maladies autoimmunes. L'ensemble des travaux est résumé dans le tableau 5.

Autoimmune diseases	Associated genes	Cellular dysfonctions	References
CD (1)	ATG16L1		Hampe et al. 2007
	IRGM		Glas et al. 2013, Lu et al. 2013
SLE	ATG5		Harley et al. 2008, Zhou et al. 2011
	DRAM1		Yang et al. 2013
	PRDM1		Zhou et al. 2011
		MaA increased in T cells from MRL/lpr and NZB/W mice and SLE patients : autophagic vacuoles over-represented (EM) (2)	Gros et al. 2012
		MaA deregulated in naïve CD4+T cells from patients : autophagosome-associated marker MAP1LC3 increased (WB)	Alessandri et al. 2012
		MaA hyper-activated in B cells from NZB/W mice and naïve B cells of patients ; autophagosomes number increased (FACS, FM)	Clarke et al. 2014
		MaA activated in macrophages from lupus-prone mice and patients : ATG5, ATG12 and BECN1 expression increased HSPA8 increased in spleen of MRL/lpr mice (FACS, mRNA quantification)	Li et al. 2014 Page et al. 2011
	CMA hyper-activated in B cells of MRL/lpr mice : LAMP-1/2A, CTSD expression increased (WB)	Macri et al. 2015	
RA	ATG5		Orozco et al. 2011
	ATG7		Lin et al. 2013
	BECN1		Lin et al. 2013
		MaA activated in osteoclasts from patients : BECN1 and ATG7 expression increased (WB)	Lin et al. 2013
	Autophagic process increased in synovial fibroblast : p62 and MAP1LC3 expression increased (WB, FM)	Kato et al. 2014	
PM		MaA activated in muscle fiber : MAP1LC3, CTSD and CTSB expression increased (WB)	Nogalska et al. 2010
MS	ATG5		Alirezaei et al. 2009
		MaA deregulated in T cells : ATG5 expression increased (WB, PCR)	Alirezaei et al. 2009
Type 1 diabetes		MaA diminished in diabetic mouse heart : MAP1LC3 and ATG5/12 expression reduced (WB, FM)	Xu et al. 2013, Yamahara et al. 2013

(1) Abbreviations : ATG, autophagy related-gene; BECN1, beclin-1; CD, Crohn's disease; CMA, chaperone-mediated autophagy; CTSB, cathepsins B; CTSD, cathepsins D; DRAM1, damage-regulated autophagy modulator; EM, electron microscopy; FM, fluorescence microscopy; HSPA8, heat shock protein 8; IRGM, Immunity-related GTPase family M protein; LAMP-1/2, lysosomal-associated membrane protein 1/2; MaA, macroautophagy, MAP1LC3, microtubule-associated protein light chain 3; MS, multiple sclerosis; PCR, polymerase chain reaction; PM, polymyositis; PRDM1, positive regulatory domain I-binding factor 1; RA, rheumatoid arthritis; SLE, systemic lupus erythematosus; WB, Western blot. (2) The method used is given in parentheses.

Tableau 5 : Liste des maladies autoimmunes où l'autophagie est dérégulée (issu de Wilhelm and Muller, 2016).

Puisque l'autophagie contribue à la survie des cellules, ces résultats suggèrent qu'une augmentation de son activité au cours du LED pourrait promouvoir la survie des cellules autoréactives. Ces cellules sont normalement éliminées en condition non pathologique. Nous avons vu qu'un excès d'apoptose associé à un défaut de clairance des débris apoptotiques est un élément central dans la pathogénèse du lupus. Outre son implication dans la survie cellulaire, l'autophagie peut également promouvoir la mort des cellules. La dérégulation de l'autophagie pourrait donc être responsable de l'excès d'apoptose qui favorise la progression de la pathologie. Par ailleurs, la macroautophagie peut favoriser la production de certaines cytokines (TNF- α , IL-6 et IFN- γ) et inhiber la sécrétion d'autres (IL-1 α et β). Nous avons évoqué précédemment que les complexes immuns libérés lors de l'apoptose sont reconnus par les TLR7 et 9 des pDC. Dans ce cas, l'autophagie permet la capture des molécules d'ARN simple brin viraux dans le cytosol et leur transfert dans les endosomes à la suite d'une fusion autophagosomes-endosome. Ce mécanisme aboutit à la stimulation des TLR-7 et à la production d'IFN- α par les pDC (Lee et al., 2007). Une seconde étude a suggéré l'implication d'une forme non conventionnelle de macroautophagie, la LAP (« LC3-associated protein ») dans la production d'IFN de type I par les pDC. Suite à la phagocytose de complexes immuns couplés à l'ADN, les TLR-9 sont recrutés au niveau de ces phagosomes. La liaison des protéines LC3 à la membrane des phagosomes va favoriser la progression des vésicules vers des compartiments tardifs acides dans lesquels les TLR-9 vont être stimulés par l'ADN. L'activation des pDC conduit à la production d'IFN- α (Henault et al., 2012).

Pour finir, des molécules thérapeutiques utilisées dans le traitement de plusieurs maladies autoimmunes, dont le LED, ciblent l'autophagie (Baek et al., 2012; Fleming et al., 2011; Wang and Muller, 2015) (Figure 18).

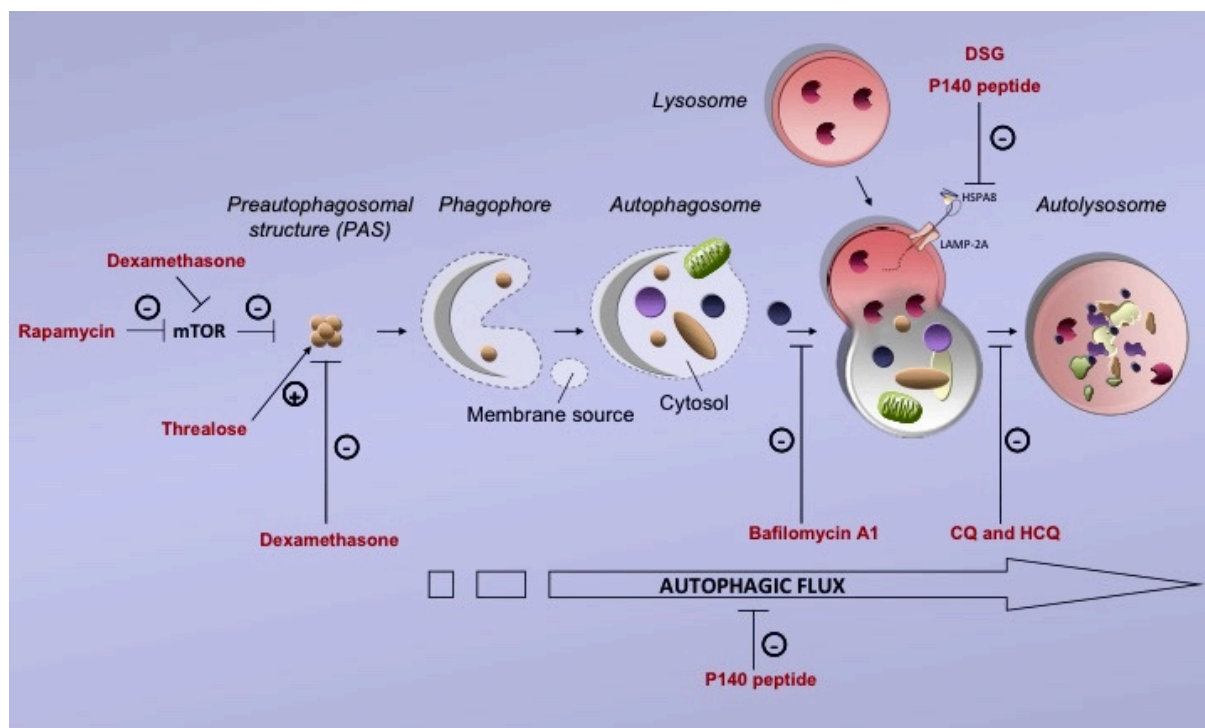


Figure 18 : Les régulateurs pharmacologiques de l'autophagie. La rapamycine et la dexaméthasone inhibent l'activité kinase de mTOR et contribuent ainsi à l'induction de la macroautophagie. De plus, la dexaméthasone influence la formation des structures pré-autophagosomales. Par une voie indépendante de mTOR, le trehalose active la macroautophagie. La Bafilomycine A1 prévient la maturation des vacuoles autophagiques en bloquant la fusion des autophagosomes avec les lysosomes. Le peptide P140 et la 15-deoxyspergualine (DSG) semblent affecter la biologie du lysosome en agissant sur le pH et l'expression de HSPA8. Par ailleurs, le peptide P140 induit une diminution du flux autophagique. Lors d'une dernière étape, la CQ et l'HCQ inhibent la dégradation des protéines en réduisant l'activité des enzymes lysosomales (schéma issu de Wilhelm and Muller, 2016).

C'est le cas de la chloroquine (CQ) et l'hydroxychloroquine (HCQ) qui sont couramment utilisés chez les patients lupiques. Ces deux molécules lipophiles passent facilement à travers la membrane cellulaire lipidique et se concentrent préférentiellement dans les vésicules cytoplasmiques acides. En tant qu'agent lysomotrope, elles augmentent le pH intralysosomal, ce qui conduit à une baisse de la dégradation des protéines par l'autophagie. Les enzymes lysosomales (cathepsines et autres protéases) responsables de cette dégradation sont sensibles au pH et sont actives lorsque celui-ci est acide. Ainsi, l'HCQ est un puissant inhibiteur de l'autophagie. Il affecte l'acidification lysosomale et inhibe la dégradation des protéines endogènes, ce qui entraîne une augmentation du nombre de compartiments autophagiques.

La rapamycine fait également partie de ces « nouvelles » molécules thérapeutiques. Elle possède des propriétés immunosuppressives en inhibant l'activité kinase du complexe mTORC1, ce qui induit la macroautophagie (mTORC2 est résistant à la rapamycine). Pour rappel, le complexe

mTORC1 est nécessaire pour la formation des autophagosomes. Des études réalisées chez la souris lupique (NZB/W)F1 montrent que l'administration de la rapamycine réduit considérablement la protéinurie, améliore les fonctions rénales, diminue le taux d'autoanticorps anti-ADNdb et diminue la splénomégalie (Lui et al., 2008; Stylianou et al., 2011). Toutefois, si nous prenons en compte le rôle exercé par la rapamycine sur le flux autophagique et considérons que le niveau basal de la macroautophagie est augmenté dans différents types cellulaires chez les souris et les patients lupiques, l'administration de la rapamycine ne devrait pas avoir d'effet bénéfique dans le LED. Au contraire, son administration devrait même aggraver la maladie. Ces résultats mettent donc en évidence que la macroautophagie n'est pas la principale cible de la rapamycine. De plus, des études ont montré que la macroautophagie est activée à travers un mécanisme indépendant de mTOR dans les cellules T (Hubbard et al., 2010). Un essai clinique de phase II est actuellement en cours sous le nom de Rapamune afin d'évaluer son efficacité thérapeutique chez les patients lupiques. Les résultats de cette étude seront prochainement publiés (NCT 00779194).

La dexaméthasone est une molécule immunosuppressive qui est également utilisée dans le traitement de différentes maladies inflammatoires et autoimmunes (LED, RA,...) ainsi que dans certains types de cancer. Son mécanisme d'action est complexe et reste controversé. La dexaméthasone induit notamment l'expression du gène codant pour la protéine Dig2/RTP801/REDD1 (Molitoris et al., 2011). Cette protéine est un régulateur négatif de la voie de signalisation de mTOR. Ainsi, l'élévation de l'expression de Dig2/RTP801/REDD1 par la dexaméthasone contribue à l'induction de la macroautophagie. De plus, la dexaméthasone augmente l'expression de plusieurs gènes impliqués au cours de l'autophagie dont *ATG5*, *MAP1LC3*, *BECLIN1* et *SQSTM1* (Troncoso et al., 2014).

Enfin, le peptide P140 dont j'ai étudié le mécanisme d'action chez l'homme au cours de ma thèse et qui est actuellement en essai clinique de phase III, affecte la macroautophagie et la CMA chez les souris lupiques MRL/*lpr*. L'ensemble des molécules ciblant la voie autophagique est résumé dans la figure 18.

2.2.3. Effet du peptide P140 sur l'autophagie

Mon équipe a précédemment montré que la macroautophagie est dérégulée dans les LT de patients lupiques ainsi que chez les souris MRL/*lpr* et (NZB/W)F1 (Gros et al., 2012). Ces analyses ont été renforcées par une seconde étude réalisée indépendamment montrant que la

macroautophagie est également augmentée dans les LB (Clarke et al., 2014). De manière intéressante, suite à l'administration du peptide P140, une accumulation des marqueurs autophagiques (p62 et LC3-II) est observée dans les LB de souris MRL/*lpr* traduisant un blocage du flux autophagique dans ces cellules (Page et al., 2011). Des analyses complémentaires devront toutefois être réalisées afin de vérifier que le peptide P140 agit directement sur la macroautophagie.

Plus récemment, mon équipe a mis en évidence dans deux tests indépendants réalisés *in vitro* que le peptide P140 cible directement une autre forme d'autophagie, la CMA. En effet, le peptide inhibe la CMA en interagissant avec la protéine HSPA8 (Page et al., 2009) et en altérant la composition du complexe que forme cette protéine avec d'autres protéines chaperonnes (Macri et al., 2015). L'expression de HSPA8 et LAMP-2A est augmentée dans les cellules B de souris MRL/*lpr*. L'injection intraveineuse du peptide P140 chez ces souris permet une diminution de l'expression des deux marqueurs. De plus, le P140 utilise la voie d'endocytose dépendante des clathrines pour entrer dans les LB des souris lupiques. Il s'accumule directement dans la matrice des lysosomes où il peut entraver les fonctions de la protéine lysosomale HSPA8 et également déstabiliser LAMP-2A en agissant directement sur la protéine chaperonne HSP90. Pour rappel, cette dernière joue un rôle primordial dans la stabilisation du récepteur de la CMA sous sa forme multimérique (Figure 15). Les effets du peptide P140 sur les différentes voies autophagiques, qu'ils soient directs ou indirects, peuvent interférer avec le processus de chargement et de présentation d'(auto)antigènes endogènes par les molécules du CMH-II. En effet, plusieurs études ont mis en évidence que l'autophagie est l'une des majeures sources de peptides pour leur présentation par le CMH-II aux lymphocytes T CD4+. Nous reviendrons plus en détails sur ce point dans le paragraphe 2.3.3. Ainsi, le peptide P140 induit une baisse de l'hyperactivité de la CMA (et de la macroautophagie) dans les LB, ce qui pourrait contribuer à une baisse globale de la présentation de peptides antigéniques du soi par le CMH-II et *in fine* diminuer l'activation des cellules T autoréactives chez les souris lupiques MRL/*lpr*.

2.3. Le peptide P140 et la présentation antigénique par le CMH-II

2.3.1. La présentation antigénique

La présentation antigénique est une étape clé dans la transmission d'informations entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Elle est également impliquée dans l'activation des LT suite à la reconnaissance via leur TCR de produits issus d'une protéolyse partielle intracellulaire.

Classiquement, les cellules T CD8⁺ reconnaissent les peptides dérivés de protéines endogènes en association avec les molécules du CMH-I, tandis que les cellules T CD4⁺ reconnaissent des peptides dérivés de protéines exogènes liés aux molécules du CMH-II. Les molécules du CMH-I sont retrouvées de façon quasi ubiquitaire à la surface des cellules nucléées. En revanche, l'expression des molécules du CMH-II est restreinte aux cellules présentatrices d'antigènes (CPA) dites « professionnelles ». Elles comprennent les macrophages, les lymphocytes B et les DC. Ces dernières ont longtemps été considérées comme les principales CPA puisqu'en plus d'avoir la capacité d'apprêter et présenter des antigènes, les DC expriment des PRR qui régulent l'activation du système immunitaire en réponse à des pathogènes. Sous leur forme mature, les DC peuvent exprimer à la fois des molécules du CMH-I et II et ainsi activer soit les cellules T auxiliaires, soit les cellules T cytotoxiques. Finalement, les DC expriment de nombreuses molécules de costimulation, telles que CD80 et CD86, qui sont également nécessaires pour une activation optimale des cellules T. Toutefois, il semblerait qu'au cours du LED ce ne soit pas les DC mais les lymphocytes B qui soient les principales CPA. En effet, les DC ne jouent pas de rôle dans l'initiation la réponse immunitaire adaptative puisque leur délétion chez les souris lupiques MRL/*lpr* n'induit pas une augmentation du nombre de cellules T naïves (Teichmann et al., 2010). Il est à noter qu'une récente étude a montré que l'univers bien établi des CPA « professionnelles » est plus complexe qu'il n'y paraît. Les auteurs ont proposé qu'en plus des CPA conventionnelles, les cellules hématopoïétiques expriment également des molécules du CMH-II à leur surface et sont capables de présenter des antigènes aux cellules T CD4⁺. C'est le cas des mastocytes, basophiles, éosinophiles et neutrophiles (Kambayashi and Laufer, 2014). De plus, l'expression du CMH-II peut être induite par l'INF- γ à la surface des cellules non présentatrices d'antigènes, incluant les cellules stromales mésenchymateuses (Romieu-Mourez et al., 2007).

Dans cette partie nous nous focaliserons sur la présentation de peptides antigéniques par les molécules du CMH-II. Nous nous intéressons particulièrement à cette voie de présentation antigénique puisque nous avons pu voir lors de nos précédentes études que l'expression du CMH-II est dérégulée à la surface des cellules B de souris lupiques MRL/*lpr* (Page et al., 2011). D'autre part, des analyses génétiques ont permis de mettre en évidence que parmi les gènes de susceptibilité au lupus, certains codent pour le CMH-II. Ainsi, les mutations des gènes HLA-DRB1 et HLA-DR2 sont significativement associées au LED et sont retrouvées chez les patients d'origine caucasienne (Barcellos et al., 2009). La mutation du gène HLA-DRB1 a également été retrouvé chez les patients lupiques d'origine asiatique (Kim et al., 2009).

2.3.1.1. Structure du CMH-II

Le CMH-II humain est un ensemble de gènes codant pour les molécules HLA (« Human leukocyte antigen »). Ces gènes sont localisés dans différentes régions (loci) sur le chromosome 6. Il existe 5 loci codant pour le CMH-II : HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, DLA-DM et HLA-DO. Parmi ceux-ci, les régions contenant les gènes codant pour HLA-DR, DP et DQ sont les plus polymorphes. Par ailleurs, du fait que plusieurs gènes codent pour les molécules du CMH-II, un large spectre de peptides peuvent être liés à ces molécules et présentés aux cellules T CD4+. Le CMH-II est exprimé à la surface des CPA sous la forme d'un hétérodimère composé d'une chaîne α et β . Ces dernières s'assemblent pour former une structure caractéristique (Figure 19) :

- une région (très polymorphe) de liaison peptidique constituée des domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ et qui forme une cavité où l'antigène se loge
- une région « immunoglobuline like » formée par les domaines $\alpha 2$ et $\beta 2$ et où se lie la molécule CD4
- une région transmembranaire contenant des acides aminés hydrophobes permettant à la molécule du CMH-II d'être ancrée à la membrane cellulaire
- une région cytoplasmique contenant des sites de phosphorylation et de liaison à des éléments du cytosquelette

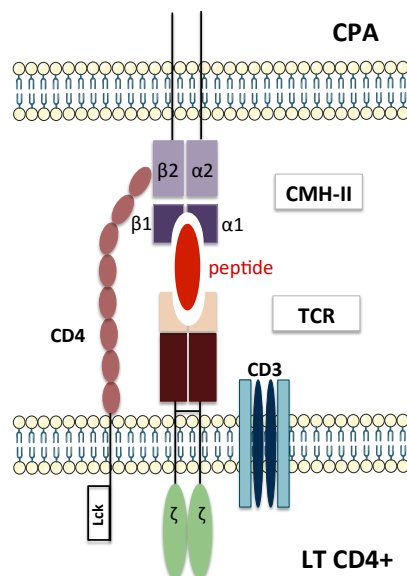


Figure 19 : Structure des molécules du CMH-II. Le CMH-II est composé d'une chaîne α et d'une chaîne β toutes les deux organisées en deux domaines. Les différentes chaînes sont associées entre elles de manière non covalente. Les cellules T CD4+ reconnaissent les peptides antigéniques présentés par le complexe du CMH-II. L'étroite collaboration entre les CPA et les LT est nécessaire pour l'activation du système immunitaire adaptatif.

2.3.1.2. Sources d'antigènes pour la présentation par le CMH-II

Classiquement, le CMH-I présente des peptides qui ont été générés dans le cytosol à partir de plusieurs sources intracellulaires telles que des protéines du soi d'origine cytosolique ou nucléaire, des protéines provenant de pathogènes intracellulaires ou encore des antigènes tumoraux endogènes (Crotzer and Blum, 2010). Il est à noter que l'ubiquitinylation est souvent la cible de ces antigènes pour leur dégradation par le protéasome. Par opposition, les peptides présentés par le CMH-II proviennent classiquement de protéines exogènes internalisées par les CPA. Ainsi, les molécules du CMH-I et II sont spécialisées dans la présentation de peptides provenant de différentes origines. Grâce à cette « répartition du travail », les cellules T CD8+ cytotoxiques et les cellules T CD4+ auxiliaires surveillent respectivement les niches intracellulaires et extracellulaires et permettent de maintenir la tolérance périphérique. Ce schéma a cependant évolué ces dernières années. Le séquençage des peptides élués à partir des molécules du CMH-II a en effet révélé que 20 à 30% des ligands du CMH-II proviennent de protéines intracellulaires cytosoliques et nucléaires (Roche and Furuta, 2015). Ces peptides peuvent être générés soit après clivage par le protéasome, soit par l'intermédiaire de l'autophagie. Une étude a mis en évidence que l'induction de l'autophagie par privation de nutriments augmente considérablement le nombre de peptides antigéniques cytosoliques présentés par les molécules du CMH-II (Dengjel et al., 2005). Nous reviendrons plus en détails sur le rôle de l'autophagie dans la génération de peptides antigéniques endogènes dans le prochain paragraphe.

2.3.1.3. Génération des peptides se liant aux molécules du CMH-II

Comme suggéré précédemment, les antigènes d'origine extracellulaire sont en général présentés aux cellules T CD4+ par l'intermédiaire du CMH-II. L'internalisation de ces protéines dans les CPA se fait par endocytose, pinocytose ou phagocytose. Durant l'endocytose, des complexes récepteurs de surface cellulaire-ligands, des protéines membranaires ou encore des macromolécules solubles sont internalisées. La capture des antigènes particuliers ainsi que des agents pathogènes est assurée par la phagocytose. Finalement, le processus non-sélectif de pinocytose permet l'internalisation d'une grande quantité de matériel extracellulaire, incluant des protéines, des bactéries et des virus à travers des invaginations de la membrane plasmique. Ces trois voies de transport sont présentes dans les DC, les macrophages et les LB, bien qu'il existe des variations de leur efficacité et de leur régulation au sein de chaque population cellulaire (Blum et al., 2013).

Endocytose et présentation antigénique

La présentation antigénique implique le trafic d'antigènes des endosomes précoces vers les endosomes tardifs. La dénaturation et la protéolyse des antigènes dans ces vésicules est influencée par le pH qui régule l'activité des protéases résidentes ainsi que d'autres enzymes telles que GILT (« gamma interferon inducible lysosomal thiol reductase »). Cette dernière est capable de réduire les ponts disulfure présents dans la plupart des protéines. Elle est présente de façon constitutive dans les CPA et peut être induite par l'IFN- γ dans d'autres cellules. De nombreuses études ont été réalisées dans le but d'identifier les protéases spécifiquement impliquées dans la présentation antigénique par le CMH-II. Parmi celles-ci, les cathepsines (S, L, F) ainsi que l'AEP (« asparaginyl endopeptidase ») sont responsables du clivage de la chaîne invariante Li. Celle-ci joue un rôle clé dans l'apprêtement des antigènes. Nous reviendrons plus en détails sur sa fonction dans le prochain paragraphe. Les protéases sont synthétisées au niveau du RE et transportées à travers l'appareil de golgi où elles sont modifiées par l'ajout d'un mannose-6-phosphate. Ce motif va faciliter leur transport dans les lysosomes et leur activation à pH acide. Outre leur action sur la chaîne invariante Li, l'activité protéolytique de ces enzymes permet également la production de ligands pour les molécules du CMH-II. Le blocage des fonctions du lysosome et l'affaiblissement de l'activité des protéases (suite à l'augmentation du pH), diminuent la présentation antigénique. En effet, les souris déficientes pour le mannose-6-phosphate, présentent une perte significative de l'activité des cathepsines (B et L) dans les LB, ce qui conduit à un dysfonctionnement des lysosomes et à une accumulation du matériel de stockage dans ces compartiments. Par conséquent, un défaut d'apprêtement et de présentation antigénique et finalement des anomalies de maturation des LB et de production d'anticorps sont observés chez ces souris (Otomo et al., 2015). Dans la plupart des cas, le processus d'endocytose des antigènes extracellulaires est non spécifique, tout comme le site de clivage qui est principalement déterminé par son accessibilité au site actif de la protéase. Cependant, des études ont également mis en évidence que la présentation de certains peptides antigéniques requiert un type particulier de protéases lysosomales. C'est le cas de l'AEP qui joue un rôle essentiel dans la présentation de peptides provenant de la toxine du tetanos chez l'homme (Watts et al., 2005).

Phagocytose, pinocytose et présentation antigénique

Les antigènes extracellulaires peuvent également être internalisés par phagocytose. Plusieurs études ont montré que les antigènes phagocytés et par la suite dénaturés forment un complexe

CMH-II-peptide au sein des phagosomes (Muraille et al., 2010). De plus, la phagocytose pourrait être responsable d'un mécanisme de « cross-présentation » qui conduit à la translocation d'antigènes extracellulaires dans le cytoplasme pour leur apprêtement et finalement leur présentation par les molécules du CMH-I aux cellules T CD8+ cytotoxiques. Comme évoqué précédemment, l'internalisation de l'antigène dans les phagosomes peut être facilitée par l'activation des TLR. Dans certaines conditions, lors de la phagocytose par les DC, la protéine autophagique LC3 est recrutée au niveau des phagosomes. Ce phénomène de LAP permet d'une part, de favoriser la dégradation de l'antigène et d'autre part, contribue au chargement de l'antigène sur les molécules du CMH-II (Sanjuan et al., 2007).

En ce qui concerne la pinocytose, très peu d'études ont pu être réalisées en raison du manque d'inhibiteurs spécifiques pour cette voie. Toutefois, certaines études suggèrent un rôle de la pinocytose dans la présentation par le CMH-II d'un autoantigène, le collagène de type II (von Delwig et al., 2006).

L'autophagie, une source importante de peptides antigéniques

Les protéines endogènes d'origine cytosolique ou nucléaire peuvent également être présentées via les molécules du CMH-II. Cette présentation est grandement facilitée par le mécanisme de l'autophagie (Figure 20).

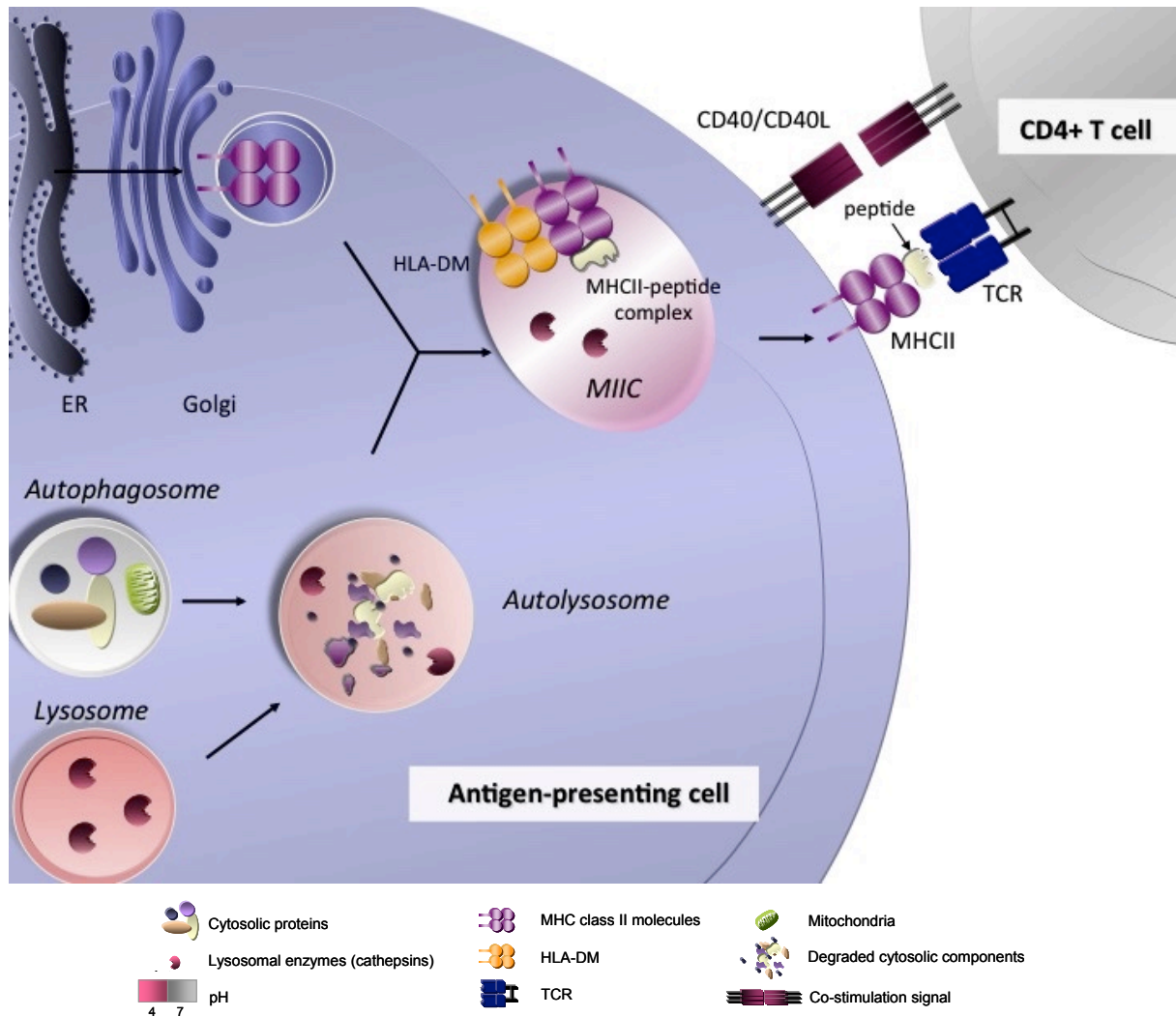


Figure 20 : La macroautophagie, l'une des sources majeures de peptides pour leur présentation par les molécules du CMH-II. La machinerie autophagique favorise la dégradation d'antigènes cytoplasmiques et permet leur acheminement vers des vésicules riches en molécules du CMH-II (compartiments MIIC) où ils seront apprêtés et présentés aux cellules T CD4+.

Une étude réalisée par l'équipe de Christian Münz a pour la première fois mis en évidence que la présentation d'antigènes endogènes, tels que la protéine virale EBNA-1, est dépendante de la voie autophagique. Lors de l'inhibition de l'acidification des lysosomes, EBNA-1, un antigène majeur retrouvé suite à l'infection par le virus d'Epstein-Barr, s'accumule dans des vésicules et co-localise partiellement avec la protéine LAMP-1. Des analyses complémentaires ont permis de mettre en évidence qu'en présence de chloroquine, cette protéine virale est retrouvée dans les autophagosomes. De plus, l'inhibition de la macroautophagie par la 3-MA diminue la reconnaissance des clones T CD4+ pour l'antigène EBNA-1 qui est présenté par les LB infectés. Ainsi, la macroautophagie contribue à la présentation d'antigènes endogènes via les molécules du CMH-II (Paludan et al., 2005). Comme décrit plus haut, la macroautophagie induite lors d'une

carence en acides aminés modifie la qualité des peptides chargés par les molécules du CMH-II et augmente la proportion d'antigènes intracellulaires présentés (Dengjel et al., 2005). L'activation de cette même voie autophagique dans les macrophages et les DC est également responsable de la présentation d'antigènes mycobactériens via les molécules du CMH-II à la suite d'une infection par le BCG (« Bacille Calmette Guerin ») (Jagannath et al., 2009).

Une seconde forme d'autophagie favorise la présentation d'antigènes cytoplasmiques par les molécules du CMH-II aux cellules T CD4+. Lors de la CMA, les protéines HSPA8 et LAMP-2A sont impliquées dans la présentation de l'antigène GAD (« glutamic acid decarboxylase »). La diminution de l'expression de LAMP-2A dans les cellules B, réduit la présentation de cet antigène par le CMH-II tandis que l'augmentation de l'expression de LAMP-2A conduit à une présentation accrue de GAD (Zhou et al., 2005).

2.3.1.4. Chargement des peptides sur les molécules du CMH-II

Les molécules du CMH-II sont des glycoprotéines. Comme toute protéine appartenant à cette famille, l'assemblage des chaînes α et β du CMH-II se fait dans le réticulum endoplasmique (RE) à l'aide de la chaîne invariante Li (ou CD74). Des souris déficientes pour la chaîne invariante Li présente un transport aberrant des molécules du CMH-II qui se traduit par une baisse d'expression des complexes de classe II. De plus, les quelques molécules du CMH-II exprimées à la surface des cellules ne disposent pas d'une conformation typique indiquant qu'elles sont fortement liées à un peptide antigénique. Par conséquent, les cellules déficientes pour la chaîne invariante Li présentent très peu d'antigènes puisqu'en l'absence de celle-ci, les molécules du CMH-II ne sont pas stables (Viville et al., 1993).

L'association efficace de la chaîne invariante Li avec les dimères α et β du CMH-II permet l'export de ces molécules du RE vers des compartiments endosomaux tardifs, les MIIC (« MHC class II compartment »). Toutefois, plusieurs études montrent que les vésicules contenant le CMH-II transitent d'abord de la voie trans-golgi vers la membrane plasmique puis le complexe Li/molécule du CMH-II est endocyté par la voie des clathrines (McCormick et al., 2005). En effet, la chaîne invariante Li possède un motif dileucine qui est reconnu par des protéines adaptatrices AP-1 (localisée dans le réseau trans-golgi) et AP-2 (localisée au niveau de la membrane plasmique). Suite à l'endocytose, le complexe transite vers les endosomes précoces puis tardifs (MIIC).

Afin de pouvoir lier et présenter un antigène, les molécules du CMH-II doivent se dissocier de la chaîne invariante Li. Cet événement a lieu dans les MIIC. Ces compartiments sont caractérisés par un environnement acide permettant l'activation des protéases ainsi que par la présence de molécules accessoires HLA-DM et HLA-DO. Ainsi, la protéine Li est dégradée par protéolyse dans ces compartiments en un petit fragment qui reste associé au niveau de la poche peptidique du CMH-II et qui est nommé CLIP (« Class II-associated *invariant chain* peptide »). Ce fragment empêche la liaison de peptide au CMH-II et doit être libéré préalablement avant l'association avec l'antigène. La dégradation de CLIP se fait grâce à la protéine HLA-DM. Quant à la protéine HLA-DO, cette dernière sert de co-chaperonne pour HLA-DM en formant un complexe. Les études sur la fonction de HLA-DO sont contradictoires mais suggèrent que la protéine supprime l'activité de HLA-DM dans les endosomes précoces (où le pH est supérieur à 5.5), alors qu'elle permettrait un chargement efficace des peptides dans les endosomes tardifs et les lysosomes (où le pH est inférieur à 5) (Blum et al., 2013). Lorsque le fragment CLIP est éliminé, les molécules du CMH-II peuvent se lier à l'antigène à présenter, quitter les MIIC et migrer vers la membrane plasmique par exocytose afin de permettre une reconnaissance éventuelle par les LT CD4+ (Figure 21).

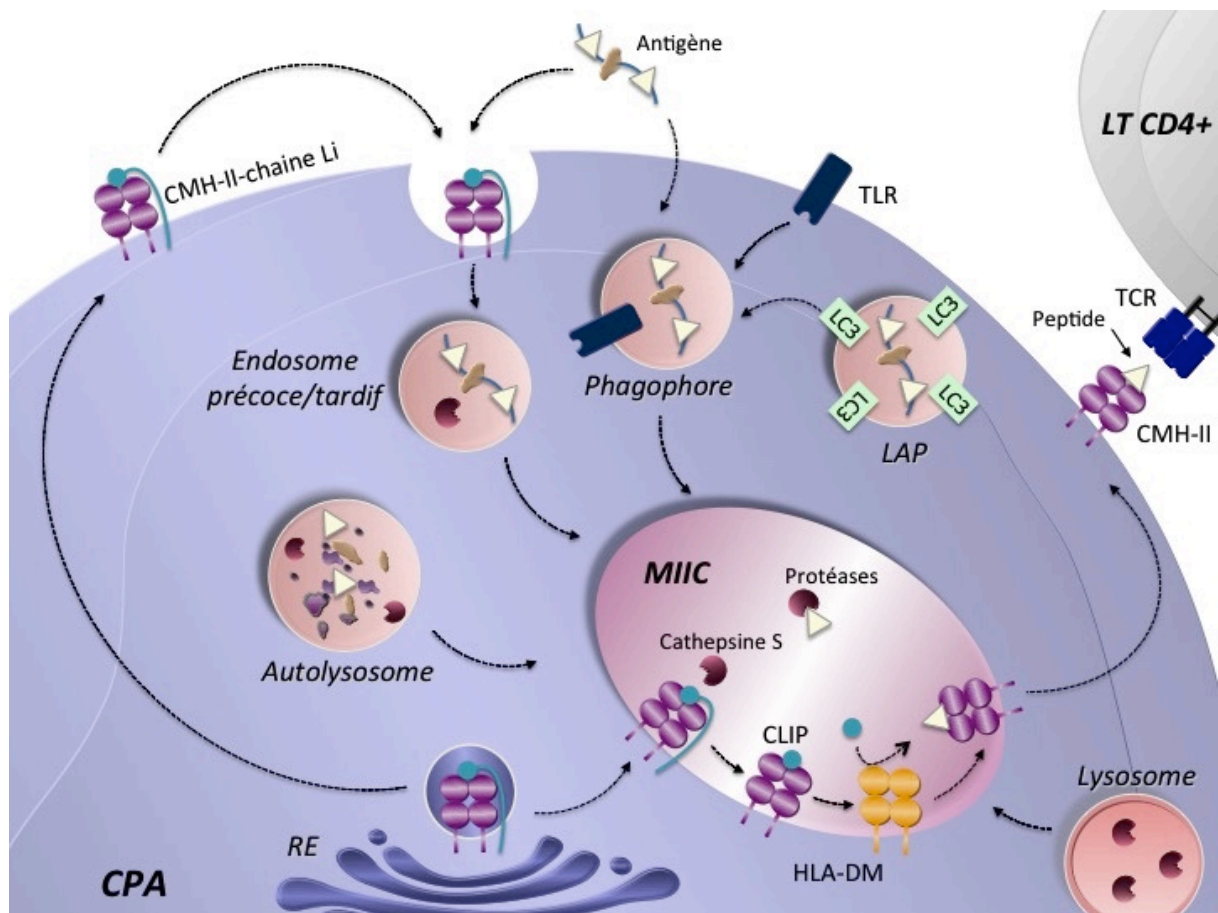


Figure 21 : La présentation antigénique par les molécules du CMH-II. L'apprêtement et la présentation de l'antigène implique le transport de celui-ci à travers la voie endosomale où il est dégradé. L'antigène peut également être internalisé par phagocytose et se retrouver dans les phagosomes. L'utilisation de cette voie peut être facilitée par l'activation des TLR. Le recrutement des protéines LC3 au niveau des phagophores induit la dégradation de l'antigène, c'est le phénomène de LAP. Enfin, l'autophagie contribue également à la synthèse de peptides antigéniques pour leur présentation par le CMH-II. C'est au sein du compartiment MIIC que se fait l'apprêtement de l'antigène. Les molécules du CMH-II qui sont synthétisées au niveau du RE forment un complexe avec la chaîne invariante Li. Ce complexe est transporté du golgi vers les MIIC, soit directement, soit via la membrane plasmique. La chaîne invariante Li est dégradée dans les MIIC par la cathepsine S. Le fragment CLIP reste au niveau de la poche peptidique des molécules du CMH-II et son échange avec le peptide antigénique se fait à l'aide de la molécule HLA-DM. Finalement, les molécules du CMH-II sont transportées vers la membrane plasmique pour y présenter les peptides antigéniques aux LT CD4+.

2.3.2. Rôle de la présentation antigénique au cours de l'autoimmunité

Comme décrit plus haut, les mécanismes de tolérance sont multiples et assurent la prévention des réactions autoimmunes. Ces mécanismes nécessitent en grande partie la présentation d'autoantigènes par les CPA professionnelles. Parmi celles-ci, les DC sont les principales CPA (Hopp et al., 2014). En effet, plusieurs études ont mises en évidence que les DC sont nécessaires pour le maintien de la tolérance. Appuyant cette idée, la délétion transitoire des DC conduit à une perte des LTregs (Darrasse-Jèze et al., 2009). De plus, les cellules Tregs restantes présentent une diminution de l'expression de Foxp3. La diminution du nombre des cellules Tregs (qui est dépendante de la perte des DC) conduit à une augmentation du nombre de cellules T produisant des cytokines inflammatoires telles que l'IFN- γ et l'IL-17. A l'inverse, une augmentation du nombre de DC entraîne une augmentation de la division et l'accumulation des cellules Treg grâce à un mécanisme qui requiert le CMH-II. De plus, l'augmentation du nombre de Tregs (qui est dépendante de l'expansion des DC) est suffisante pour prévenir l'apparition de maladies autoimmunes telles que le diabète de type I.

Ainsi, les CPA jouent un rôle crucial lors de l'établissement et le maintien de la tolérance immunitaire. Le dysfonctionnement de ces cellules pourrait être responsable de la rupture de tolérance et conduire au développement d'une autoimmunité. Dans ce contexte, une étude a montré que l'expression de la molécule inhibitrice PD-L1 (« programmed death ligand-1 ») est diminuée à la surface des CPA et notamment des DC chez les patients lupiques (Mozaffarian et al., 2008). L'activation efficace d'une cellule T naïve nécessite deux signaux délivrés par les CPA. Le premier implique la reconnaissance de l'antigène grâce à l'interaction entre le complexe

peptide-CMH-II et le TCR. Le second signal est indépendant de l'antigène et dépend des molécules de costimulation exprimées à la surface des CPA et qui se lient à leurs récepteurs sur les LT. La voie de costimulation constituée par le récepteur PD-1 et ses ligands PD-L1 et PD-L2 délivre des signaux inhibiteurs qui régulent l'équilibre entre l'activation des LT et la tolérance. Plus précisément PD-1 et ses ligands agissent sur les cellules T effectrices potentiellement autoréactives non seulement en inhibant leur activation et leur fonction, mais également en favorisant le développement et des LTreg (Francisco et al., 2010) (Figure 22). Ainsi, la diminution de l'expression de la molécule PD-L1 à la surface des DC de patients lupiques pourrait être responsable en partie de la rupture de tolérance. En effet, bien que les DC ne surexpriment pas PD-L1 chez les patients actifs, ces cellules gardent la capacité d'exprimer d'autres marqueurs dont CD80/CD86 à leur surface. Les cellules T reconnaissant des antigènes du soi et n'ayant pas reçu de signaux inhibiteurs seraient donc anormalement activées. Outre l'action activatrice sur les cellules T effectrices, la diminution d'expression de PD-L1 conduit à un développement anormal des cellules Treg. Des études concomitantes ont montré que le nombre de ces cellules est réduit chez les patients lupiques (Bonelli et al., 2008). Toutefois, il reste à déterminer si PD-L1 joue un rôle quelconque sur les anomalies de développement et de fonction des Treg.

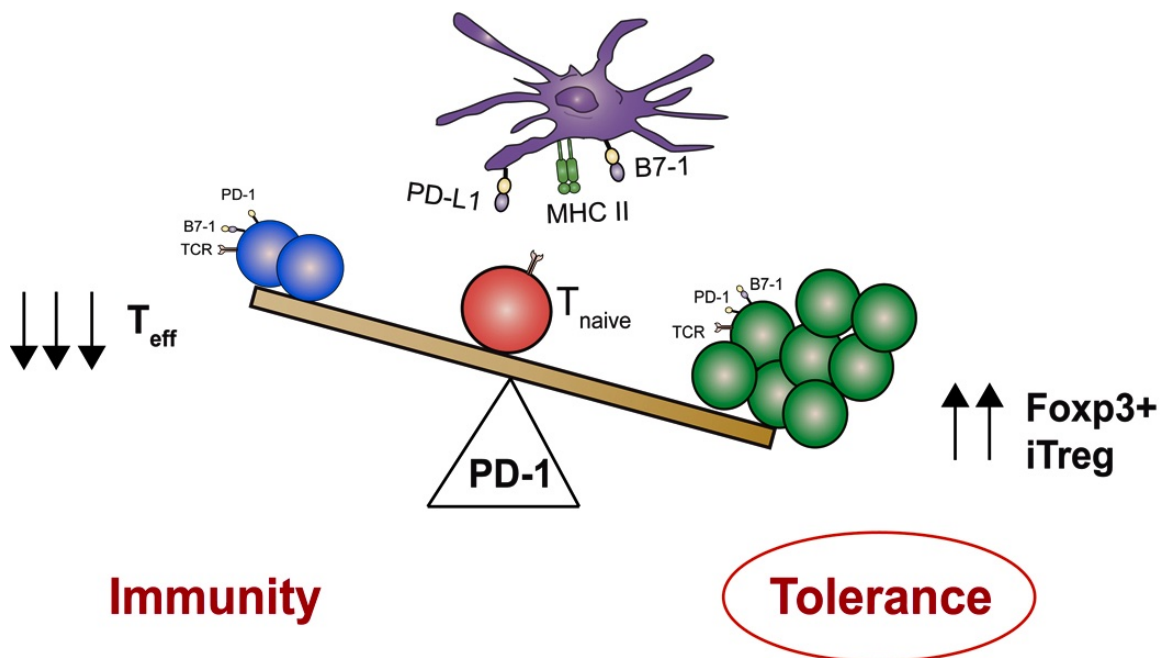


Figure 22 : Rôle de PD-1 dans les mécanismes de tolérance des cellules T. Suite à la stimulation du TCR, PD-L1 exprimé à la surface des CPA se lie à son récepteur PD-1. Cette liaison conduit d'une part, à diminuer la réponse des cellules T effectrices et d'autre part, à stimuler le développement des cellules Treg ce qui par conséquent fait basculer la balance vers la tolérance immunologique (schéma issu de Francisco et al., 2010).

Mon équipe a montré que l'expression des molécules du CMH-II est augmentée à la surface des LB chez les souris lupiques MRL/*lpr* (Page et al., 2011). Cette dérégulation pourrait être responsable de l'augmentation de la présentation des autoantigènes chez ces souris et conduirait à l'activation des LT CD4+ autoréactifs. Nous avons vu précédemment que plusieurs études controversées ont montré que les LB sont les premières CPA impliquées au cours du LED (Teichmann et al., 2010). De plus, une récente publication a mis en évidence que la délétion du CMH-II dans les LB chez les souris lupiques MRL/*lpr* conduit à une diminution du pourcentage de cellules T (CD4+ et CD8+) activées (Giles et al., 2015). Ces souris présentent également une baisse significative du nombre de plasmablasts et de cellules sécrétrices d'IgG. L'ensemble de ces modifications conduit à l'amélioration des symptômes lupiques chez les souris MRL/*lpr*.

2.3.3. Effet du peptide P140 sur la présentation antigénique

Comme décrit précédemment, l'expression des molécules du CMH-II est anormalement augmentée à la surface des LB chez les souris lupiques MRL/*lpr* (Page et al., 2011). Plus précisément, les souris lupiques âgées de 12 semaines présentent une augmentation significative de l'expression du CMH-II par rapport à des souris contrôles CBA/J. En revanche, avant l'apparition des premiers symptômes cliniques, lorsque les souris lupiques sont âgées de 6 semaines, aucune différence n'est observée entre les deux groupes de souris. Par la suite, mon équipe a voulu déterminer si le peptide P140 modifie l'expression des molécules du CMH-II. De manière intéressante, lors d'une thérapie courte, à savoir lorsqu'une seule injection du peptide est effectuée dans le péritoine des souris lupiques, l'expression du CMH-II est significativement diminuée à la surface des LB et se rapproche du seuil observé chez les souris contrôles. L'autophagie qui est impliquée dans la génération de peptides antigéniques pourrait également influencer leur présentation par les molécules du CMH-II. Par conséquent, la dérégulation à la fois de la machinerie autophagique et de l'expression du CMH-II dans les LB des souris MRL/*lpr* pourrait être responsable de l'activation anormale des cellules T CD4+ autoréactives au cours du lupus. Ainsi, le peptide P140 qui régule l'activité de la macroautophagie et de la CMA dans les LB pourrait directement ou indirectement diminuer l'expression des molécules du CMH-II et au final diminuer l'activation des lymphocytes T CD4+. Une étude antérieure avait en effet mis en évidence que le peptide P140 induit une baisse de la réactivité des LT autoréactifs chez les souris MRL/*lpr* (Monneaux et al., 2007). Il est important de mentionner ici que le lien direct entre tous ces effets du peptide n'a pas encore été totalement confirmé.

3. Le peptide P140, en essai clinique

Les résultats encourageants obtenus chez la souris MRL/*lpr* ont poussé mon équipe à étudier son efficacité chez l'homme lors d'essais cliniques. Ces études ont été réalisées par la société Immupharma sous le nom de Lupuzor ou IPP-201101. Les résultats de la phase I ont montré l'absence de toxicité chez les sujets sains. Par conséquent, l'essai clinique a été poursuivi chez les patients lupiques lors de plusieurs essais cliniques de phase IIa et IIb.

3.1. Résumé des résultats obtenus lors des phases IIa et IIb

Afin d'évaluer les risques, la tolérance et l'efficacité du peptide P140 chez les patients lupiques, un essai clinique de phase IIa (phase ouverte) a été conduit dans deux centres en Bulgarie. Pour cela, 20 patients (18 femmes et 2 hommes) ayant une activité modérée de la maladie et étant sous faible dose d'immunosuppresseurs et de glucocorticoïdes ont été sélectionnés. Les patients en phase de poussée (score du SLEDAI supérieur à 15), les patients souffrant de graves atteintes du système nerveux central, du cœur ou encore des reins, ainsi que les patients atteints de graves cytopénies, ont été exclus de cette étude.

Un effet bénéfique du traitement a été observé chez les patients ayant reçu trois injections sous-cutanées de 200µg de peptide en présence de mannitol et à deux semaines d'intervalle. Une diminution du taux d'anticorps anti-ADNdb ainsi qu'une amélioration du score du SLEDAI a été constatée chez ces individus. Une légère baisse du taux d'anticorps anti-chromatine a également été observée. En revanche, le taux d'anticorps ANA, anti-Ro, anti-Sm et anti-U1RNP est resté constant chez les patients traités. De plus, le peptide P140 n'a pas induit d'effet protecteur lorsque celui-ci était injecté à une concentration de 1000 µg chez un second groupe de 10 patients. Ces résultats suggèrent donc que la concentration la plus faible (200µg) est celle qui est la plus efficace (Muller et al., 2008).

L'efficacité thérapeutique du peptide a, par la suite, été évaluée lors d'un essai clinique de phase IIb (Zimmer et al., 2012). Lors de cette étude, 149 patients ont été recrutés dans des centres en Argentine, Espagne, Roumanie et Bulgarie. Seuls les patients avec un SLEDAI supérieur ou égal à 6 et possédant des anticorps anti-ADNdb ont été sélectionnés. Parmi ces patients, 49 ont reçu 200µg de peptide en injection sous-cutanée toutes les 4 semaines pendant 12 semaines (groupe 1), 51 patients ont reçu la même concentration de peptide toutes les 2 semaines (groupe 2) et enfin 49 patients ont reçu un placebo (groupe 3). Afin de mesurer l'efficacité du peptide P140, le

taux de répondeurs a été mesuré selon l'indice SRI (« SLE Responder Index »). Les patients présentant une baisse du score d'activité de la maladie (SLEDAI) d'au moins 4 points et pas d'augmentation du score du PGA (« physician's global assessment ») et du BILAG ont été considérés comme « répondeurs » au traitement. A l'issue de cet essai, le taux de répondeurs, 12 semaines après l'arrêt des injections du peptide P140, était de 67,6% pour le groupe 1, 51,3% dans le groupe 2 et 41,5% dans le groupe 3. Après 24 semaines, une amélioration des symptômes cliniques a été observée chez 84,2% pour le groupe 1, 66,7% pour le groupe 2 et 45,8% pour le groupe 3 (Figure 23).

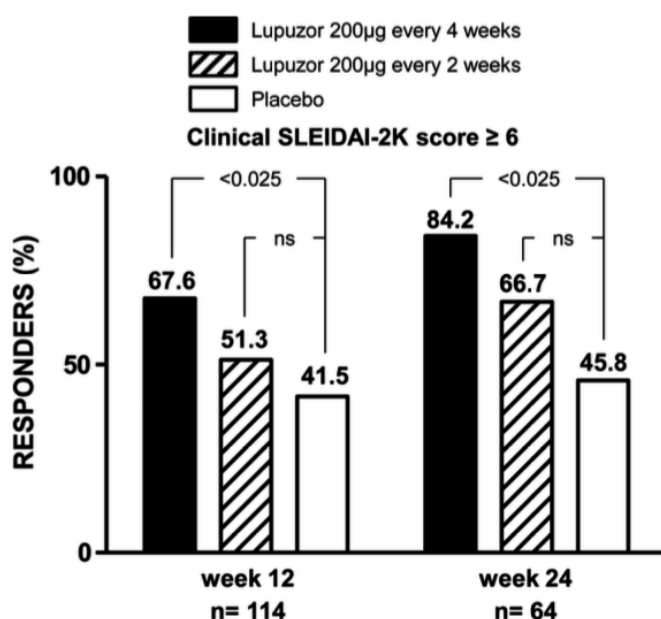


Figure 23 : Pourcentage de patients lupiques ayant répondu au traitement P140 selon le score du SLEDAI. Le peptide P140 (200µg) ou le placebo ont été injectés toutes les 2 semaines ou 4 semaines pendant 12 semaines. Suite à cette période, les patients n'ont plus reçu le peptide mais ont continué à recevoir leur traitement de fond. Après 12 semaines, le pourcentage de répondeurs au traitement Lupuzor a été calculé en fonction du score d'activité de la maladie (SLEDAI).

L'ensemble de ces résultats confirme ceux obtenus lors des précédentes phases de l'essai clinique, à savoir qu'un effet bénéfique du peptide P140 est observé chez les patients atteints de LED. De plus, l'administration de faibles doses de peptide à l'intervalle le plus élevé semble être la combinaison la plus efficace. Récemment, l'agence de santé américaine a donné son accord pour la conduite d'une phase III. Des centaines de patients ont été sélectionnés dans des centres en Amérique du Nord et en Europe de l'Ouest. Début 2016, les premiers patients ont été injectés et les résultats de cet essai seront connus durant 2017.

CONTEXTE ET OBJECTIF DE L'ETUDE

Durant mon doctorat, je me suis intéressée aux propriétés thérapeutiques du peptide P140 dans le traitement du LED. Comme je l'ai décrit plus haut, le LED est une maladie auto-immune qui se caractérise par des symptômes cliniques et biologiques variés. La plupart des traitements proposés aux patients sont palliatifs et ne permettent pas une rémission complète de la maladie. De manière générale, ils sont basés sur l'utilisation d'immunosuppresseurs et d'anti-inflammatoires qui affectent l'ensemble du système immunitaire. Bien qu'efficaces, ils engendrent de nombreux effets secondaires indésirables. Dans ce contexte, des traitements plus spécifiques voient actuellement le jour afin de cibler les différents mécanismes biologiques dérégulés au cours du lupus. Parmi ces nouvelles thérapies, certaines consistent à utiliser des peptides dérivés de protéines qui sont reconnues par les anticorps de patients. Le peptide P140, découvert au sein du laboratoire est un candidat-médicament prometteur. Il correspond à la séquence 131-151 de la ribonucléoprotéine U1-70K et comporte une phosphorylation sur le résidu serine 140. La protéine U1-70K est une cible privilégiée des autoanticorps dans le lupus et c'est pourquoi mon laboratoire s'est très tôt intéressé à elle. Le mode d'action du peptide, que j'ai détaillé dans l'introduction, commence à être bien connu dans la souris MRL/*lpr*. Un premier objectif de ma thèse a consisté à compléter et consolider les résultats obtenus chez ce modèle murin. Ainsi, nous avons cherché à étudier l'effet du peptide en aval des mécanismes précédemment décrit. Une activation anormale des récepteurs des LB et LT pourrait être responsable d'une réponse auto-immune délétère. Tout d'abord, nous avons comparé les réarrangements entre les différents gènes codant pour les segments V et J de la chaîne β du TCR et de la chaîne lourde des Ig pour le BCR chez des souris MRL/*lpr* et des souris contrôles CBA/J. Ces réarrangements contribuent en partie à la variabilité de ces récepteurs qui sont donc capables de reconnaître un plus grand nombre ou différents panels d'antigènes du soi et du non soi. Nous avons également évalué la prolifération et l'activation des LB et LT ainsi que la capacité des LB à se différencier en plasmocytes en présence du peptide P140. Enfin, nous avons mesuré la sécrétion de cytokines suite à l'administration intraveineuse du peptide aux souris. Les résultats de cette étude sont présentés dans le chapitre 1.

Les maladies auto-immunes sont fréquentes (prévalence 5-10%) et font partie des premières causes de mortalité dans les pays développés après les cancers et les maladies cardiovasculaires. Elles sont la conséquence d'un dérèglement du système immunitaire se traduisant par la rupture de la tolérance au soi. Le représentant le plus emblématique des formes systémiques de ces maladies auto-immunes est le LED. Les causes de cette pathologie restent encore mal connues ;

cependant comme c'est le cas pour de nombreuses maladies autoimmunes, des gènes de susceptibilité sont associés au développement du lupus. C'est le cas de plusieurs gènes impliqués dans le processus de l'autophagie. Comme je l'ai évoqué précédemment, il existe des liens étroits entre l'autophagie et l'immunité. L'altération de la machinerie autophagique pourrait donc affecter divers aspects des réponses immunitaires et conduire au développement de syndromes autoimmuns. Mon équipe a pour la première fois mis en évidence que l'autophagie est dérégulée dans les LT de souris MRL/lpr et de patients atteints de LED. Un article publié par un autre laboratoire a quant à lui décrit une dérégulation de l'autophagie dans les LB de modèles murins et de patients lupiques. Ces anomalies ont également été retrouvées dans d'autres pathologies telles que la PR et la maladie de Crohn. Par conséquent, la modulation de l'autophagie pourrait être une stratégie thérapeutique de choix dans le traitement de diverses maladies autoimmunes et inflammatoires. Par ailleurs, certaines molécules qui sont utilisées depuis plusieurs années dans le traitement du lupus, par exemple, ont récemment été rapportées comme agissant directement ou indirectement sur différentes formes d'autophagie. L'implication de l'autophagie dans le développement de maladies autoimmunes ainsi que les caractéristiques et les effets biologiques des différentes thérapies ciblant ce mécanisme sont abordés dans la revue présentée dans le chapitre 2.

Les résultats obtenus chez la souris MRL/lpr nous ont permis d'émettre l'hypothèse que le peptide P140 affecterait la présentation d'antigènes endogènes par les molécules du CMH-II en inhibant différentes voies autophagiques interdépendantes et en bloquant le clivage de ces antigènes au sein du lysosome. Ainsi, j'ai consacré la plus grande partie de ma thèse à étudier le mécanisme d'action du peptide P140 chez l'homme. Cette question est centrale puisque le peptide est actuellement en essai clinique de phase III (programme Lupuzor™). Dans ce contexte, nous avons tout d'abord cherché à étudier le mode d'entrée du peptide P140 dans les LB et son trafic intracellulaire. De plus, nous avons évalué l'effet du peptide sur l'autophagie ainsi que sur l'expression des molécules du CMH-II chez les individus sains et les patients atteints de LED. Lors des essais cliniques de phases IIa et IIb, le taux d'anticorps anti-ADNdb fut significativement diminué chez les patients lupiques traités avec le peptide. Dans un second temps, nous avons voulu déterminer si le peptide P140 induit une altération de la différenciation des LB en plasmocytes chez l'homme. Les résultats de ces travaux sont présentés dans le chapitre 3.

Chapitre 1

Down-regulation of excessive chaperone-mediated autophagy by a small peptide normalizes the immune responses in lupus

Schall, N., **Wilhelm, M.**, Dali, H., Jouvin-Marche, E., and Muller, S.

1.1. Avant propos

Les causes associées au développement du LED restent à ce jour mal connues. Cependant, de nombreuses études épidémiologiques et biologiques ont montré que le lupus, comme d'autres pathologies autoimmunes, est une maladie multifactorielle dont l'initiation et le maintien dépendent de plusieurs facteurs. Les LB et les LT sont impliqués dans de nombreuses dérégulations immunitaires typiques du LED. Ainsi, des défauts de leur signalisation et des modifications de leur profil cytokinique peuvent contribuer à la physiopathologie du lupus.

Plusieurs stratégies thérapeutiques ont été mises en place afin de moduler les réponses autoimmunes délétères au cours du LED. Quelques-uns des agents immunorégulateurs sont actuellement inclus dans des essais cliniques de phases avancées et parmi eux, le peptide P140. Le mode d'action du peptide a été récemment élucidé chez la souris lupique MRL/*lpr*. Suite à l'injection intraveineuse du peptide, le flux autophagique et l'activité de la CMA, deux processus autophagiques dérégulés dans le lupus, sont diminués dans les LB. Le peptide P140 diminue également l'expression de la protéine HSPA8, une protéine chaperonne impliquée dans de la CMA. Ces derniers résultats soutiennent l'idée que la CMA est une cible privilégiée du peptide P140. Ainsi, en inhibant directement ou indirectement deux voies autophagiques, le peptide P140 pourrait considérablement interférer avec le processus de présentation antigénique par les molécules du CMH-II puisque celui-ci est en partie dépendant de la dégradation des antigènes par l'autophagie. Une diminution à la fois de l'expression des molécules du CMH-II et de la réactivité des LT ont effectivement été observées chez les souris traitées avec le peptide P140. Suite à ces résultats, nous avons voulu approfondir notre étude du mécanisme d'action du peptide P140 en disséquant ses effets plus en aval de ceux précédemment décrits et survenant chez la souris lupique MRL/*lpr* lors d'un traitement *in vivo*. Durant ma thèse, j'ai pu participer à ces travaux qui font l'objet d'une première publication.

1.2. Publication n°1

Down-regulation of excessive chaperone-mediated autophagy by a small peptide normalizes the immune responses in lupus

Nicolas Schall¹, Maud Wilhelm¹, Hayet Dali¹, Evelyne Jouvin-Marche² and Sylviane Muller^{1,3}

¹CNRS, Immunopathologie et chimie thérapeutique/Laboratory of excellence Medalis, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, France; ²Centre de recherche Inserm U1209/CNRS UMR 5309/Université Grenoble Alpes, Immunologie analytique des pathologies chroniques, La Tronche, France; ³University of Strasbourg Institute for Advanced Study, Strasbourg, France

Short title : Peptide-based therapy targeting CMA in lupus

Abstract

P140/LupuzorTM is a synthetic peptide, which is currently evaluated in a phase-III clinical trial for Lupus in the US and Europe. Efficacy and no adverse safety signals were found in earlier phase IIb studies. Regarding its mode of action, P140 binds HSPA8/HSC70 chaperone protein and reduces autophagic flux in B lymphocytes of peptide-treated MRL/lpr lupus-prone mice. In vitro, it interferes with chaperone-mediated autophagy (CMA) presumably leading to lowering overexpression of MHCII molecules and affecting the peptide presentation to autoreactive T cells demonstrated earlier in vivo. Here, therefore, we examined these downstream aftermaths and show that upon P140 administration into MRL/lpr mice, a number of abnormalities affecting the pool of T and B cells no longer occur in treated lupus mice. It concerns TCR and BCR molecular rearrangements, the level of T and B cell activation, proliferation and trafficking of T and B cells, the ability of B cells to differentiate into plasma cells and the serum level of secreted cytokines. Taken together, our data unexpectedly support the view that in fact, P140 acts in depleting autoreactive T and B cells, explaining why post- P140 treatment, cell markers and functions appear close to normal, notably allowing treated MRL/lpr mice to mount an efficient immune response to foreign antigens. They highlight the mechanisms by which P140 probably works in Lupuzor-treated patients. This very novel therapeutic strategy might be also applied to many other chronic inflammatory diseases where basal CMA is abnormally increased and needs to be reduced.

Introduction

To benefit from active agents of immunotherapy able to immunomodulate the autoimmune response is of paramount importance in permitting efficient and safe strategies to be adequately applied, notably in patients with chronic autoimmune syndromes. A few of such immunomodulators are currently included in advanced clinical trials, and among them, there is the P140 peptide, which behaves as a potent regulator of the autoimmune response. P140 is a chemically-phosphorylated 21-mer linear peptide derived from the spliceosomal U1-70K protein. In a multicenter, randomized, placebo-controlled phase IIb clinical trial including patients with systemic lupus erythematosus (SLE), P140/Lupuzor™ had no adverse safety signals and met its primary efficacy end points^{1,2}. These results confirmed earlier data generated in the MRL/lpr lupus-prone mouse model in which preclinical studies were performed³⁻⁵.

SLE is a complex autoimmune disorder predominantly affecting young female population. It is characterized by unpredictable exacerbation and remission phases, hypocomplementemia and autoantibodies directed mostly against nuclear antigens^{6,7}. Chronic inflammation occurring in SLE can virtually affect any organs making this syndrome highly polymorphic and sometimes difficult to diagnose⁸⁻¹⁰. Successful genome wide association studies have shown that common gene polymorphisms and rare genetic variants can both contribute to SLE susceptibility¹¹⁻¹⁸. A polygenic predisposition, sex hormones, and environmental triggers likely result in the disordered immune response that typifies the disease. Both T and B cells are involved in the multiple, generally interconnected immunoregulatory abnormalities, which characterize lupus^{6,19-21}. Defects in their signaling and an abnormal skewing of the cytokine production might contribute to the pathophysiology. The disturbed T cell biology in lupus²² is central as, notably, activated T helper cells signal B cells leading for their differentiation, proliferation and maturation²¹.

Abnormalities in the autophagy pathway have been identified both in T and B cells from lupus patients²³⁻²⁶. In lupus T cells, and in naïve CD4+T cells in particular, autophagic vacuoles are more abundant and autophagosome-associated MAP1LC3-II/LC3-II isoform is over-expressed, indicating that macroautophagy is hyperactivated^{23,24}. Autophagy appears particularly activated in naïve B cell subsets, and when autophagy inhibitors were used, plasmablast (PB) differentiation and survival hardly occurred²⁵. Based on our previous data in lupus mice, our assumption is that P140 especially targets the autophagy pathway.

After treatment of MRL/lpr mice with P140, autophagy markers p62/SQSTM1 and MAP1LC3 accumulate in B cells, consistent with a down-regulation of autophagic flux²⁷; expression of HSPA8/HSC70 to which P140 readily interacts²⁸ and the limiting lysosome-associated membrane protein type 2A (LAMP-2A) component of the chaperone-mediated autophagy (CMA) pathway, which are both over-expressed in MRL/lpr B cells, is down-regulated^{27,29}. These features strongly support the notion that CMA represents a privileged target for P140. The latter uses the clathrin-dependent endo-lysosomal pathway to enter into MRL/lpr B lymphocytes and accumulates in the lysosomal lumen²⁹. Our hypothesis is that in

the lysosomal lumen, P140 binds to lysosomal HSPA8, directly hampers its chaperoning functions by altering the composition of HSPA8 heterocomplexes and/or also destabilizing LAMP-2A, as a result of its effect on HSP90AA1/HSP90. This dual effect of P140 shown in vitro is supposed to dramatically interfere with the endogenous autoantigen processing and loading to major histocompatibility complex class II (MHCII) molecules³⁰⁻³⁵, thereby contributing to a much weaker priming of autoreactive CD4+T cells. These two events, namely a lower expression of otherwise naturally-increased MHCII molecules levels occurring in MRL/lpr B cells and a much weaker reactivity of MRL/lpr T cells towards peptides encompassing T-cell epitopes were effectively observed in P140-treated MRL/lpr mice^{4,27}.

To dissect the downstream effects of P140 occurring in MRL/lpr mice during in vivo treatment, here, in comparison to MHC-matched CBA/J healthy mice, we examined cellular and molecular key elements of the autoimmune response. Our focus was on the TCR and BCR repertoires both in splenocytes and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of MRL/lpr mice, the trafficking properties of T and B cells, the ability of B cells to mature and plasma cells (PC) to secrete immunoglobulins (Ig), the capacity of immune cells to secrete soluble cytokines and of the immune system to mount a response to an exogenous antigen. Collectively, our findings led us to discover that by targeting CMA and lowering endogenous antigen-presentation by B-cell APCs, P140 contributes to a weakening of harmful lymphocyte compartments, limiting functional activity of potentially autoreactive CD4+T cells and autoreactive B cell expansion and differentiation.

Materials and Methods

Details for materials and methods are available in the supplemental Material section.

Mice and treatments

Female CBA/J and MRL/lpr mice were purchased from Harlan-France or Charles River-France. In most of experiments, MRL/lpr mice received a single intravenous (i.v.) administration of P140 in saline or saline alone as control. To test the immune response to a foreign immunogen, MRL/lpr mice received P140 four times in saline and then ovalbumin (OVA) in Freund's adjuvant. For continuous labeling experiments with bromodeoxyuridine (BrdU) in vivo, mice received an intraperitoneal injection of BrdU and then BrdU in drinking water. They received a single i.v. dose of P140 five days after they received intraperitoneal injection of BrdU.

Combinatorial diversity analysis of mouse TRB and IGH

The mouse (m) TRB VJ and Ig heavy (H) chain VJ (IGH VJ) genes are designed here according to the international ImMunoGeneTics database (<http://www.imgt.org>). Samples were analyzed with ImmunTraCkeR® kits, using the ImmunID IFS platform (ImmunID)^{36,37}.

BrdU intracellular cell staining

Intracellular cell staining was performed using the allophycocyanin-labeled BrdU flow kit.

Peripheral hypercellularity measurements

The method used was as described previously^{5,38}.

Quantification of serum cytokines

Serum cytokine levels were measured using BD cytometric beads array mouse Th1, TH2, Th17 kit.

PC differentiation and quantification of IgM-secreting cells by ELISPOT assay

Splenic B cells were isolated from MRL/lpr mice by negative selection and then let to differentiate in the presence of anti-CD40 antibody, IL-21 and increasing concentrations of P140. Antibodies secretion was measured by ELISPOT as previously described³⁹. The results were expressed as the number of Ig-secreting cells/10⁶ total cells.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Wilcoxon Rank Sum tests (comparison of TCR/BCR diversity between two groups), nonparametric Mann-Whitney test, and paired or unpaired t-tests when sample distribution followed a Gaussian distribution. P value <0.05 were considered statistically significant.

Results

Comparison of TCR and BCR V-J rearrangements in CBA/J and MRL/lpr mice

Although a number of studies have analyzed the TCR V α β chain repertoire of pathogenic T helper clones or T cell lines generated from lupus mice⁴⁰⁻⁴², a few studies only have examined the TCR V α β usage of T cells of different organs from lupus mouse models⁴³⁻⁴⁵. Likewise, the BCR repertoire was seldom examined in lupus mice apart from manipulated autoreactive BCR transgenic mice⁴⁶⁻⁴⁹. A single study directly explored spontaneous PCs from lupus-prone MRL/lpr and MRL/++ mice for VH gene family expression by using the technique of in situ hybridization at the single cell level⁵⁰. The results showed that compared to animals with mild disease, VH gene family expression was more restricted in sick mice, notably with regard to VH J558 usage. Before investigating the effect of P140, our first aim was therefore to assess the extent of TCR and BCR repertoire impairment in MRL/lpr mice in comparison to CBA/J mice, which share the same MHC and mTRB chain haplotypes⁵¹.

A detailed analysis of mTRB and mIGH diversity and combinatorial repertoire composition was performed from spleen and PBMC samples of CBA/J and MRL/lpr mice. We used a general immune companion diagnostic assay to monitor T and B cell responses and evaluate the immune statute in the different strains of mice³⁶. The results were compared for each group of mice and for each repertoire. A total of 43 spleen and 44 PBMC samples were analyzed for mTRB repertoire; 43 spleen and 39 PBMC samples were analyzed for mIGH repertoire (Supplemental Table 1). When CBA/J and MRL/lpr mice samples were compared, no statistically significant difference was observed in terms of mTRB and mIGH combinatorial diversity (Figure 1; supplemental Figure 1, A-B).

For exploring both repertoires more deeply, analyses of VJ rearrangements were made based on the frequency of detection of each of the 209 mTRB and 92 mIGH theoretical rearrangements per group of mice (Supplemental Figure 2, A-D). The frequency of detection was estimated through the number of times a given Vi-Jj rearrangement was detected and the number of samples in the concerned group.

The analysis done on the entire mTRB VJ repertoire revealed that 5 mTRB VJ rearrangements in spleen were significantly represented in CBA/J mice when compared to MRL/lpr mice (Supplemental Figure 3A). mTRB VJ rearrangements (21 in spleen; 9 in PBMCs) were significantly more frequent in MRL/lpr mice compared to CBA/J mice (Supplemental Figure 3A; Supplemental Table 3). V26-J2.3 and V26-J2.5 rearrangements appearing significantly more frequently in MRL/lpr mice, and in both the spleen and PBMCs, might represent a privileged combinatorial VJ repertoire signature of this mouse strain. Thus, between CBA/J and MRL/lpr mice no statistically significant difference exists both in the spleen and PBMC fraction in terms of mTRB combinatorial diversity but some specific mTRB VJ rearrangements are statistically more frequently represented in MRL/lpr mice and could be designed as a signature.

A similar analysis done on the entire mIGH VJ repertoire revealed that besides common rearrangements, mIGH VJ rearrangements (6 in spleen; 8 in PBMCs) were significantly more frequent in CBA/J mice compared to MRL/lpr mice. None were found significantly more represented in MRL/lpr (Supplemental Figure 3; Supplemental Table 3). Thus, no mIGH VJ repertoire signature could be highlighted in the MRL/lpr model with regard to CBA/J mice.

Effect of P140 on the frequency of TCR and BCR VJ rearrangements in MRL/lpr mice

The next step was to examine the possible influence of P140 on these rearrangements. Spleen and PBMC samples (Supplemental Table 1) collected 5 days post-administration of P140 were analyzed for mTRB and mIGH VJ repertoires. When untreated and P140-treated MRL/lpr mice were compared, no difference was observed in splenocytes and PBMCs in terms of mTRB VJ combinatorial diversity (Figure 1, A-B; Supplemental Figure 1, C-F).

The analysis done on the entire mTRB VJ repertoire (Supplemental Figure 2) revealed that compared to untreated MRL/lpr mice, one mTRB VJ rearrangement in spleen (none in PBMCs) was significantly more frequent in P140-treated mice (Supplemental Figure 4A; Supplemental Table 4). However, mTRB VJ rearrangements (7 in spleen, 8 in PBMCs) were found more frequently in untreated MRL/lpr mice compared to P140-treated mice. From those mTRB VJ rearrangements, V29-J2.1 and V3-J2.3, which were found both in splenocytes and PBMCs from untreated mice, could represent a signature that is absent in P140-treated mice. Regarding the fate of the mTRB VJ rearrangements distinguishing MRL/lpr spleen from CBA/J mice, some (V3-J2.3, V26-J2.4, V29-J2.1) also present a significant difference of frequency between treated and untreated MRL/lpr mice, meaning that they are apparently affected by the treatment. The analysis done with PBMC samples led to the same conclusions, which concern mTRB VJ rearrangements V29-J2.5 and V29-J1.5. These findings collectively suggest that pre- and post-P140 treatment, the distribution of frequencies of some mTRB VJ rearrangements is changed. To reinforce this assumption, the repertoire composition of the treated MRL/lpr mice was compared to the CBA/J control one.

The repertoire comparison showed that mTRB VJ rearrangements (15 in spleen but none in PBMCs) were significantly more represented in CBA/J while 7 in spleen and 13 in PBMCs could be considered as specifically related to the treated MRL/lpr repertoire (Supplemental Figure 5A; Supplemental Table 5). In the list of mTRB VJ rearrangements, which might putatively sign MRL/lpr features (Supplemental Figure 3A), V26-J2.5, V17-J2.2 and V17-J2.3 rearrangements were found highly represented both in the spleen and PBMCs of P140-treated MRL/lpr mice compared to CBA/J mice. However, no significant difference of frequency for these rearrangements was found between P140-treated and untreated MRL/lpr mice (Supplemental Figure 4A), indicating that P140 may have no influence on these rearrangements. However, regarding the other identified rearrangements (V3-J2.3, V26-J2.4, and V29-J2.1 in spleen and V29-J2.5 and V29-J1.5 in PBMCs), frequencies dropped in P140-treated mice to values close to the ones found in the CBA/J mice (no significant difference of

frequency could be highlighted for these rearrangements between the two groups; Supplemental Figure 5A). Taken together, these results indicate that treating MRL/lpr mice with P140 impacts the distribution of the frequency of rare, MRL/lpr-related mTRB VJ rearrangements, which reach levels that are similar to those found in healthy CBA/J mice.

The comparison of mIGH VJ repertoires of MRL/lpr mice treated or not with P140 (Supplemental Figure 2, C-D) revealed that more frequent differences occur in PBMCs than in spleens, where 22 rearrangements were found significantly more often in P140-treated than in untreated MRL/lpr mice (Supplemental Figure 4B; Supplemental Table 4). Thus, as found in the case of mTRB VJ rearrangements, the distribution of the frequency of mIGH VJ rearrangements also seems to be affected by P140 treatment.

As above in the case of mTRB VJ repertoire, we compared the mIGH VJ repertoire between CBA/J and P140-treated MRL/lpr mice (see details in Supplemental Figure 5B; Supplemental Table 5). Since in our hands no mIGH VJ repertoire signature could be visualized in MRL/lpr B cells, it was not possible to investigate a potential effect of peptide on this specific repertoire.

Effects of P140 on in vivo proliferative activities of MRL/lpr immune cells

Our results show that P140 significantly influences the distribution of the frequency of rare mTRB VJ rearrangements specifically found in MRL/lpr mice. To characterize the functional status of MRL/lpr T cell compartment and determine whether P140 treatment can modulate it, we performed in vivo labeling experiments in control CBA/J mice that received NaCl only, MRL/lpr mice that also received NaCl only, and MRL/lpr mice that received P140 in saline (Figure 2). Mice of the three groups received BrdU permanently in drinking water from day 0, and P140 in a single injection at day 5. At day 10, flow cytometry analysis of cell subtypes collected in the spleen and peripheral blood showed that in the spleen, when the three groups of mice were compared, although there was fewer T cells, there was no change in the number of dividing T cells (BrdU^{high}) (Figure 2A). As expected the number of cycling cells was elevated in the double negative (DN) CD3⁺CD4⁻CD8⁻B220⁺ MRL/lpr T cell subset with regard to normal mice but these numbers were not different in treated and non-treated animals (Figure 2B). In the PBMC fraction, the total number of non-dividing (long-lived) T cells was not different in the three groups (Figure 2F). In contrast, the number of BrdU-labeled T cells, which was raised in MRL/lpr mice as compared to normal mice, was significantly reduced upon P140 treatment (Figure 2F). This dramatic effect was not observed when the DN T cells were regarded (Figure 2G). These data indicate that upon P140 treatment no change could be observed in the status of total MRL/lpr T cells into secondary lymphoid tissue (spleen) while fewer dividing T cells reach the peripheral blood compartment.

In contrast to the above observation, BrdU pulse chase experiments showed that the number of dividing and non-dividing MRL/lpr B cells was decreased upon P140 treatment both in the

spleen and PBMC fraction (Figure 2, C and H). Regarding the PB and PC subsets, no quantitative change could be noted in the spleen and at the periphery (Figure 2, D-E, I-J). Fewer dividing PBs and PCs were counted in the spleen. Although these changes were statistically significant, they should be approached with cautious since the number of those cells was very small. Together, these analyses indicate that following a single i.v. administration of P140, the proliferative status of total MRL/lpr T cells evaluated 5 days later is not changed in the spleen while it is globally reduced in the peripheral blood. In parallel, the number of B cells that have the capacity to repeatedly divide is reduced both in the spleen and peripheral blood compartments. These depleting properties of P140 were not observed on MRL/lpr PB and PC subsets.

Repopulation of circulating immune cells following P140 treatment

We previously showed that i.v. P140 administration into MRL/lpr mice causes egress of several immune cell subtypes from the peripheral blood^{5,27,28}. We therefore investigated further this egress and the reconstitution of the peripheral immune cell pool in relation with their proliferative status. The effect was peptide-dose dependent until a threshold dose of 100µg P140/mouse/injection, which led to a peripheral cell balance similar to the one measured in healthy mice (Figure 3A; repetitively found in individual MRL/lpr mice evaluated in separate experiments). Increasing P140 dose did not affect this balance further. Using this optimal dose, we counted the number of immune cells post-P140 treatment and confirmed that at day 3, there was a dramatic drop of T cells, B cells, monocytes and granulocytes (Figure 3, B-H). At day 5 (when we also measured the number of dividing and non-dividing cells; Figure 2), the number of T cells, DN T cells, monocytes and granulocytes still remained at their basal level. In contrast, the total B cell compartment, although still compressed, was recovering from depletion (Figure 3D). In general, at day 10, cell counts in the peripheral blood of peptide-treated MRL/lpr mice reached the level untreated mice display (T cells, DN T cells, B cells and PCs). Monocyte and granulocyte compartments, however, recovered much more slowly (>10 days).

These studies suggest i. that cell populations that replenish the peripheral blood of MRL/lpr mice after a single injection of P140 are not predominantly constituted by rapidly dividing (BrdU+) cells; ii that after one peptide shot only, the reconstitution time that follows the rapid cell decay phase (<3 days) and is required to completely repopulate peripheral blood cells, is variable and can be rather long (>10 days); iii that PCs repopulate the peripheral blood in ~10 days, a delay that could be highly beneficial from a pathophysiological point of view.

P140 therapy induces changes in the patterns and levels of circulating cytokines

Next we addressed the important question of whether upon P140 treatment, MRL/lpr T cells remaining in the peripheral blood behave differently at a functional level. We compared the

profile of cytokines secreted in the serum of P140-treated or untreated MRL/lpr mice. We showed previously²⁸ that upon P140 treatment a number of genes coding for cytokines were significantly up-regulated or down-regulated in non-activated lymph node CD4⁺ T cells collected 6 and 24h post-treatment. Here, seven cytokines were measured simultaneously by flow cytometry in the serum of mice. Type-I IFN levels were not tested since in contrast to other mouse models of lupus, MRL/lpr mice do not show evidence of type-I IFN signature⁵². The level of four cytokines, namely IFN- γ , IL-6, IL-4 and IL-10, showed no or marginal variation over the time of experiment and in treated vs. untreated mice at any time (Figure 4, B-C, F-G). Although IL-2 and TNF- α levels were not statistically different between both groups, their occurrence of detection was clearly delayed in the serum of treated mice (Figure 4, A, D, H). Most strikingly, a sharp drop of IL-17a levels was found from day 7 in the serum of treated mice (Figure 4, E, H). These data collectively indicate that rapidly after treatment, the profile of certain serum cytokines is affected.

P140 alters the capacity of MRL/lpr B cell to differentiate in vitro into Ig-secreting PCs

To further decipher the downstream aftermath of P140, next we looked at whether it could interfere with the capacity of MRL/lpr B cells to differentiate into CD138/Syndecan-1⁺ PBs and PCs. We addressed this question in vitro using purified B cells from 12-week-old MRL/lpr mice, which were let to differentiate for 5 days in the presence of anti-CD40 antibody and IL-21^{53,54}. The number of CD19-CD138⁺ PCs was too low in the cultures to support any reliable conclusion (Figure 5, A-B). However, we observed that the percentage of CD19⁺CD138⁺ PBs diminished in a P140 concentration-dependent manner (Figure 5, C-D). ScP140 had no measurable effect. These results corroborate our previous flow cytometry results²⁸ showing the effect of P140 on CD138⁺B220⁻ PCs, measured 20h after MRL/lpr PBMCs treatment.

Since the size of CD19⁺CD138⁺ PBs compartment was significantly reduced in the presence of P140, we assessed its effect on IgM/IgG production and the number of antibody-secreting cells (ASCs; Figure 5E). ASCs represent the main effector B cells that expand in acute SLE⁵⁵ and recent findings demonstrated a general role of autophagy in the late stages of B cell activation and subsequent PC differentiation^{56,57}. ELISPOT results indicate that in a P140 concentration-dependent manner the frequency of IgM-secreting cells was significantly diminished in the culture (Figure 5E). ScP140 had no measurable effect. In this experimental in vitro setting, naïve B cells were not able to efficiently class-switch and we could not identify specific IgM-secreting ASCs to calf dsDNA, chromatin or histones.

P140-treated MRL/lpr mice respond normally to an exogenous immunogen

To consolidate this mechanism still further, we immunized untreated and P140-treated mice

with soluble OVA used here as a model immunogen, and evaluated the antibody response by ELISA (Figure 6A). A strong anti-OVA IgG antibody response was measured in all mice of each study group. Compared to healthy mice, the mean anti-OVA titers were particularly elevated in MRL/lpr mice after the second administration of immunogen, and then tend to decrease (Figure 6B). This hyper-responsiveness was not seen in MRL/lpr that received P140 prior immunization. The data shown here corroborate previous observations indicating that P140 treatment did not affect the capacity of MRL/lpr mice challenged with an infectious dose of influenza virus given intranasally, to mount specific T- and B-cell responses against viral antigens and to recover from infection⁴. Together, these past and present data convincingly argue that remaining immune cell subsets remain fully effective and that P140 does not behave as an immunosuppressant.

Discussion

The present study sought to dissect the molecular basis of the remarkable therapeutic effect of peptide P140 given for SLE indication^{1,2,58}. Our recent investigations²⁹ led us to precisely characterize the upstream mechanism of action of P140 when the latter enters cells and homes into lysosomes of MRL/lpr mice, where it may compromise CMA that is abnormally upregulated in MRL/lpr mice²⁹. Having in mind the results supporting a role of HSPA8 and LAMP-2A expression and CMA in MHCII presentation of antigens³¹⁻³⁴, we postulated that the downstream P140 effect would be a slowing down and/or a qualitative change of cellular autoantigen processing and peptide loading to MHCII molecules leading to the destabilization and weak expression of the latter (as was demonstrated earlier²⁷). As a consequence, the whole sequence of immune cell activation signaling would be affected, beginning with a weak or no priming of autoreactive CD4+T (helper) cells (as was demonstrated earlier⁴). This process has advantageous downstream outcome in the case of the lupus disease since if autoreactive CD4+T cells are no longer activated, they cannot in turn signal and activate autoreactive B lymphocytes, which as a matter of consequences limits or extinguish their proliferation and differentiation, leading to a significant reduction of autoantibodies to native DNA and an amelioration of the disease clinical signs (as was demonstrated earlier both in mice and patients with lupus^{3,58}). Experimental findings described here support our general hypothesis and provide new ways of regulation, which might also be profitable to modulate the course of the disease in other inflammatory conditions in which the endo-lysosomal and CMA pathways are excessive and therefore where antigen presentation is affected.

The results presented in the present study are consistent with the overall model we proposed²⁹. However, they further highlight an underlying mechanism that was not fully anticipated. We demonstrate here that post-P140 treatment, mice retain the overall TRB combinatorial diversity but no longer express MRL/lpr-specific TRB rearrangements and display patterns of TRB rearrangements, which are similar to those identified in non-autoimmune MHC-matched mice. Since in addition, our previous results demonstrated that reactivity of T cells from P140-treated mice is much weaker with peptides encompassing autoepitopes while reacting normally with foreign peptides (ref. 4; reinforced here using OVA), we propose that due to a failure of endogenous antigen presentation consecutive to the upstream effect of P140 on CMA, peptide P140 acts by depleting autoreactive T cells clones that are no longer activated by MHC-peptide presented by APCs. This depletion leads to normalize immune responses, notably restoring an overall T cell repertoire that is close to the normal one, in otherwise autoimmune animals.

In this scheme of action the place of CMA represents a central node. This pathway is abnormally activated in lupus, and by counterbalancing the process and regulating lysosome alterations²⁹, P140 contributes to restoring normal conditions of antigen processing and presentation, hence abolishing activation of the autoreactive T and B cells. The results showing the time required to reconstitute the peripheral blood compartment after a single administration of P140, for example, also support these conclusions.

Importantly, our results indicate that by “normalizing” the signaling cascade of immune cells in MRL/lpr mice, P140 reduces the expansion of autoreactive pool of ASC population with a potential drop of harmful antibody production. In in vitro conditions starting from MRL/lpr B cells, P140 reduced the pool of CD19+CD138+PBs generated in the presence of anti-CD40 and IL-21, and diminished the frequency of IgM-secreting cells.

The pattern of soluble cytokines circulating in the serum of P140-treated mice vs. non-treated ones was evaluated as reflecting the functional capacities of immune cells in primary and secondary immune compartments to be modified upon P140 administration. The most impressive was the drop of serum IL-17a level, a cytokine involved in the pathogenesis of SLE. The level of soluble IL-17a, which may be produced by IL-17-secreting CD4+ and CD8+T cells, DN T cells, NK cells and gd T cells, was particularly high in the MRL/lpr serum. It is not known yet if the number of a particular IL-17-producing cell subset is lowered upon P140 administration.

In summary, our studies highlights an immunological explanation for the clinical benefit of P140/Lupuzor in MRL/lpr mice and potentially also in patients with lupus. By targeting the overall population of autoreactive T cells and hampering amplification of the downstream autoimmune B cell response, without affecting cell compartments reacting with non-self-antigens, P140 contributes to efficiently remove autoimmune cells from the immune system, and restore the “normal” functioning of immune system. It is worth noting that the present data were obtained in a mouse model that is particularly severe in comparison with the pathophysiological features met in human SLE and that most data were generated after one single P140 injection only. These results are therefore the more deserving of our attention. They strongly support a functional mechanism in which P140 does not directly correct or modulate the many T and B cell abnormalities that are complex and interconnected in lupus disease but where it rather contributes to switch-off and clear-out autoimmune T and B cells²⁸. This mechanism explains why upon P140 treatment, cell markers and functions appear close to normal in MRL/lpr mice and likely in lupus patients.

Acknowledgements

The authors thank Christian Bloy for helpful suggestions on the design of this study; Orchidée Filipe-Santos, Anaïs Courtier, Jean-Daniel Fauny and Nicolas Page for critical reading of the article; Christophe Macri for technical help in the early steps of this study; Carole Le Coz and Hélène Dumortier for technical advice on PC differentiation and ACs quantification; Monique Duval and Delphine Lamon for excellent mouse care; and the imaging facility (Plateforme Inter-Unités de Microscopie et d'Imagerie Cellulaire Strasbourg-Esplanade). This research was funded by CNRS, Région Alsace, the Laboratory of Excellence Medalis (ANR-10-LABX-0034) and the EquipEx program I2MC (ANR-11-EQPX-022), Initiative of Excellence (IdEx), Strasbourg University, and ImmuPharma France.

Competing Interest Statement

MW was supported in part by an ImmuPharma-France doctoral fellowship. NS is employed by ImmuPharma. SM is consultant of ImmuPharma. The other authors have declared that no conflict of interest exists.

Contribution

NS, MW and HD performed the experiments, analyzed the data and wrote parts of the manuscript. EJM analyzed the data related to TCR and BCR rearrangements in full details. SM contributed the study design and wrote the manuscript.

Correspondence

Sylviane Muller, CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, UPR3572, 15 rue René Descartes, 67000 Strasbourg, France. Tel +33 640 40 87 25; e-mail: S.Muller@ibmc-cnrs.unistra.fr

References

1. Zimmer R, Scherbarth HR, Rillo OL, Gomez-Reino J, Muller S. Lupuzor/P140 peptide in patients with systemic lupus erythematosus: a randomised, double-blind, placebo- controlled phase IIb clinical trial. *Ann Rheum Dis*. 2013;72:1830-1835.
2. Muller S, Wallace D. The importance of implementing proper selection of excipients in lupus clinical trials. *Lupus*. 2014;23:609-614.
3. Monneaux F, Lozano JM, Patarroyo ME, Briand JP, Muller S. T cell recognition and therapeutic effects of a phosphorylated synthetic peptide of the 70K snRNP protein administered in MRL/lpr lupus mice. *Eur J Immunol*. 2003;33:287-296.
4. Monneaux F, Parietti V, Briand JP, Muller S. Importance of spliceosomal RNP1 motif for intermolecular T-B cell spreading and tolerance restoration in lupus. *Arthritis Res Ther*. 2007;9:R111.
5. Schall N, Page N, Macri M, Chaloin O, Briand JP, Muller S. Peptide-based approaches to treat lupus and other autoimmune diseases. *J Autoimmunity*. 2012;39:143-153.
6. Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*. 2011;365:2110-2121.
7. Lisnevskaja L, Murphy G, Isenberg D. Systemic lupus erythematosus. *Lancet*. 2014;384:1878-1888.
8. Li QZ, Xie C, Wu T, Mackay M, Aranow C, Putterman C, Mohan C. Identification of autoantibody clusters that best predict lupus disease activity using glomerular proteome arrays. *J Clin Invest*. 2005;115:3428-3439.
9. Lorenz G, Desai J, Anders HJ. Lupus nephritis: update on mechanisms of systemic autoimmunity and kidney immunopathology. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2014;23:211-217.
10. Jeltsch-David H, Muller S. Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus: pathogenesis and biomarkers. *Nat Rev Neurol*. 2014;10:579-596.
11. Harley JB et al. Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PTK, KIAA1542 and other loci. *Nat Genet*. 2008;40:204-210.
12. Kozyrev SV et al. Functional variants in the b-cell gene bank1 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*. 2008;40:211-216.
13. Chung SA et al. Differential genetic associations for systemic lupus erythematosus based on anti-dsDNA autoantibody production. *PLoS Genet*. 2011;7:e1001323.
14. Taylor KE et al. Risk alleles for systemic lupus erythematosus in a large case-control collection and associations with clinical subphenotypes. *PLoS Genet*. 2011;7:e1001311.

15. Järvinen TM, Hellquist A, Zucchelli M, Koskenmies S, Panelius J, Hasan T, Julkunen H, D'Amato M, Kere J. Replication of GWAS-identified systemic lupus erythematosus susceptibility genes affirms B-cell receptor pathway signalling and strengthens the role of IRF5 in disease susceptibility in a Northern European population. *Rheumatology*. 2012;51:87-92.
16. Guerra SG, Vyse TJ, Cunninghame Graham DS. The genetics of lupus: a functional perspective. *Arthritis Res Ther*. 2012;14:211.
17. Yang W et al. Meta-analysis followed by replication identifies loci in or near CDKN1B, TET3, CD80, DRAM1, and ARID5B as associated with systemic lupus erythematosus in Asians. *Am J Human Genet*. 2013;92:41-51.
18. Conolly JJ, Hakonarson H. Role of cytokines in systemic lupus erythematosus: recent progress from GWAS and sequencing. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:798924.
19. Perl A, Fernandez DR, Telarico T, Doherty E, Francis L, Phillips PE. T-cell and B-cell signaling biomarkers and treatment targets in lupus. *Curr Opin Rheumatol*. 2009;21:454- 464.
20. Gatto M, Zen M, Ghirardello A, Bettio S, Bassi N, Iaccarino L, Punzi L, Doria A. Emerging and critical issues in the pathogenesis of lupus. *Autoimmun Rev*. 2013;12:523- 536.
21. Mak A, Kow NY. The pathology of T cells in systemic lupus erythematosus. *J Immunol Res*. 2014;2014:419029.
22. Moulton VR, Tsokos, GC. Abnormalities of T cell signaling in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2011;13:207.
23. Gros F, Arnold J, Page N, Décossas M, Korganow AS, Martin T, Muller S. Macroautophagy is deregulated in murine and human lupus T lymphocytes. *Autophagy*. 2012; 8:1113-1123.
24. Alessandri C et al. T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus are resistant to induction of autophagy. *FASEB J*. 2012;26:4722-4732.
25. Clarke AJ, Ellinghaus U, Cortini A, Stranks A, Simon AK, Botto M, Vyse TJ. Autophagy is activated in systemic lupus erythematosus and required for plasmablast development. *Ann Rheum Dis*. 2015;74:912-920.
26. Caza T, Oaks Z, Perl A. Interplay of infections, autoimmunity, and immunosuppression in systemic lupus erythematosus. *Int Rev Immunol*. 2014;33:330-363.
27. Page N, Gros F, Schall N, Décossas M, Bagnard D, Briand JP, Muller S. HSC70 blockade by the therapeutic peptide P140 affects autophagic processes and endogenous MHCII presentation in murine lupus. *Ann Rheum Dis*. 2011;70:837-843.
28. Page N, Schall N, Strub JM, Quinternet M, Chaloin O, Décossas M, Cung MT, Van

- Dorsselaer A, Briand JP, Muller S. The spliceosomal phosphopeptide P140 controls the lupus disease by interacting with the HSC70 protein and via a mechanism mediated by $\gamma\delta$ T cells. *PLoS ONE*. 2009;4:e5273.
29. Macri C, Wang F, Tasset I, Schall N, Page N, Briand JP, Cuervo AM, Muller S. Modulation of deregulated chaperone-mediated autophagy by a phosphopeptide. *Autophagy*. 2015;11:472-486.
30. Zhou D et al. Lamp-2a facilitates MHC class II presentation of cytoplasmic antigens. *Immunity*. 2005;22:571-581.
31. Schmid D, Pypaert M, Münz C. Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity*. 2007;26:79-92.
32. Crotzer VL, Blum JS. Autophagy and its role in MHC-mediated antigen presentation. *J Immunol*. 2009;182:3335-3341.
33. Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P. Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:443-473.
34. Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:722-737.
35. Shibusaki ST, Saitoh T, Nowag H, Münz C, Yoshimori T. Autophagy and autophagy-related proteins in the immune system. *Nat Immunol*. 2015;16:1014-1024.
36. Pasqual N, Gallagher M, Aude-Garcia C, Loiodice M, Thuderoz F, Demongeot J, Ceredig R, Marche PN, Jouvin-Marche E. Quantitative and qualitative changes in V-J alpha rearrangements during mouse thymocytes differentiation: implication for a limited T cell receptor alpha chain repertoire. *J Exp Med*. 2002;196:1163-1173.
37. Pham HP, Manuel M, Petit N, Klatzmann D, Cohen-Kaminsky S, Six A, Marodon G. Half of the T-cell repertoire combinatorial diversity is genetically determined in humans and humanized mice. *Eur J Immunol*. 2012;42:760-770.
38. Briand JP, Schall N and Muller S. Generation of self-peptides to treat systemic lupus erythematosus. *Methods Mol Biol*. 2014;1134:173-192.
39. Lacotte S, Dumortier H, Décossas M, Briand JP, Muller S. Identification of new pathogenic players in lupus: autoantibody-secreting cells are present in nephritic kidneys of NZB/W mice. *J Immunol* 2010; 184:3937-3945.
40. Mao C, Osman GE, Adams S, Datta SK. T cell receptor alpha-chain repertoire of pathogenic autoantibody-inducing T cells in lupus mice. *J Immunol*. 1994;152:1462-1470.
41. Shi Y, Kaliyaperumal A, Lu L, Southwood S, Sette A, Michaels MA, Datta SK. Promiscuous presentation and recognition of nucleosomal autoepitopes in lupus: role of

- autoimmune T cell receptor alpha chain. *J Exp Med.* 1998;187:367-378.
42. Han SH, Li B, Chen YT, Gao XM. Isolation and functional analysis of autoreactive T cells from BXSB mice with murine lupus. *J Autoimmun.* 2002;19:45-54.
43. Skarstein K, Holmdahl R, Johannessen AC, Jonsson R. Oligoclonality of T cells in salivary glands of autoimmune MRL/lpr mice. *Immunology.* 1994;81:497-501.
44. Suttmuller M, Baelde HJ, Ouellette S, De Heer E, Bruijn JA. T-cell receptor V beta gene expression in experimental lupus nephritis. *Immunology.* 1998;95:18-25.
45. Zhou G, Fujio K, Sadakata A, Okamoto A, Yu R, Yamamoto K. Identification of systemically expanded activated T cell clones in MRL/lpr and NZB/W F1 lupus model mice. *Clin Exp Immunol.* 2004;136:448-455.
46. Lamoureux JL, Watson LC, Cherrier M, Skog P, Nemazee D, Feeney AJ. Reduced receptor editing in lupus-prone MRL/lpr mice. *J Exp Med.* 2007;204:2853-2864.
47. Shlomchik MJ. Sites and stages of autoreactive B cell activation and regulation. *Immunity.* 2008;28:18-28.
48. Makdasi E, Fischel R, Kat I, Eilat D. Autoreactive anti-DNA transgenic B cells in lupus-prone New Zealand black/New Zealand white mice show near perfect L chain allelic exclusion. *J Immunol.* 2009;182:6143-6148.
49. Zhou Z, Niu H, Zheng YY, Morel L. Autoreactive marginal zone B cells enter the follicles and interact with CD4+ T cells in lupus-prone mice. *BMC Immunol.* 2001;12:7.
50. Komisar JL, Leung KY, Crawley RR, Talal N, Teale JM. Ig VH gene family repertoire of plasma cells derived from lupus-prone MRL/lpr and MRL/++ mice. *J Immunol.* 1989;143:340-347.
51. Baum TP, Pasqual N, Thuderoz F, Hierle V, Chaume D, Lefranc MP, Jouvin-Marche E, Marche PN, Demongeot J. IMGT/GeneInfo: enhancing V(D)J recombination database accessibility. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:D51-54.
52. Zhuang H, Szeto C, Han S, Yang L, Reeves WH. Animal models of interferon signature positive lupus. *Front Immunol.* 2015;6:291.
53. Bryant VL, Ma CS, Avery DT, Li Y, Good KL, Corcoran LM, de Waal Malefyt R, Tangye SG. Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5+ T follicular helper cells. *J Immunol.* 2007;179:8180-8190.
54. Kuchen S, Robbins R, Sims GP, Sheng C, Phillips TM, Lipsky PE, Ettinger R. Essential role of IL-21 in B cell activation, expansion, and plasma cell generation during CD4+ T cell-B cell collaboration. *J Immunol.* 2007;179:5886-5896.

55. Odendahl M, Jacobi A, Hansen A, Feist E, Hiepe F, Burmester GR, Lipsky PE, Radbruch A, Dörner T. Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2000;165:5970-5979.
56. Pengo N et al. Plasma cells require autophagy for sustainable immunoglobulin production. *Nat Immunol.* 2013;14:298-305.
57. Conway KL, Kuballa P, Khor B, Zhang M, Shi HN, Virgin HW, Xavier RJ. ATG5 regulates plasma cell differentiation. *Autophagy.* 2013;9:528-537.
58. Muller S, Monneaux F, Schall N, Rashkov RK, Oparanov BA, Wiesel P, Geiger JM and Zimmer R. Spliceosomal peptide P140 for immunotherapy of systemic lupus erythematosus. Results of an early phase II clinical trial. *Arthritis Rheum.* 2008;58:3873- 3883.

Legend of Figures

Fig. 1 Dot, box plot and 3-D graph representations of combinatorial *mTRB* and *mIGH* diversity distribution in spleen and PBMC samples from CBA/J and MRL/lpr mice. The four representative images illustrate 3-D graph of the TRB and IGH immune repertoires generated by Constel ID® software (ImmunID). Each peak represents the rearrangement of a VH (or VB) gene family relative to the rearrangement of JH (or JB) genes. Relative intensity of these rearrangements is represented on the z-axis. Such a graph has been generated for each dot in A-D. Combinatorial diversity (%) median into box plots are represented by the central line. N = number of samples examined. Comparison of diversity by Wilcoxon Rank Sum tests between two groups is indicated. * $p < 0.05$.

Fig. 2 Long-term *in vivo* BrdU incorporation in various immune cell subsets of CBA/J and MRL/lpr mice that received or not P140 peptide. Age-matched mice received each a first intraperitoneal injection of BrdU (1 mg/ 20 g body weight). BrdU was then administrated in drinking water for 10 days (0.8 mg/ mL). 10-11 week-old female MRL/lpr mice treated with P140 peptide were given a single i.v. dose of peptide five days after they received intraperitoneal injection of BrdU. Cells were collected from the spleen and peripheral blood (PBMC fraction), stained by incubating them with fluorescently-tagged antibodies to appropriate surface markers, fixed stained with anti-BrdU antibodies, and analyzed by flow cytometry. Histograms represent the mean \pm SD of BrdU+ (cycling) or – (non-cycling) cells derived from 5 mice per group. Statistical significance was assessed using the Mann Whitney test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns, non-significant.

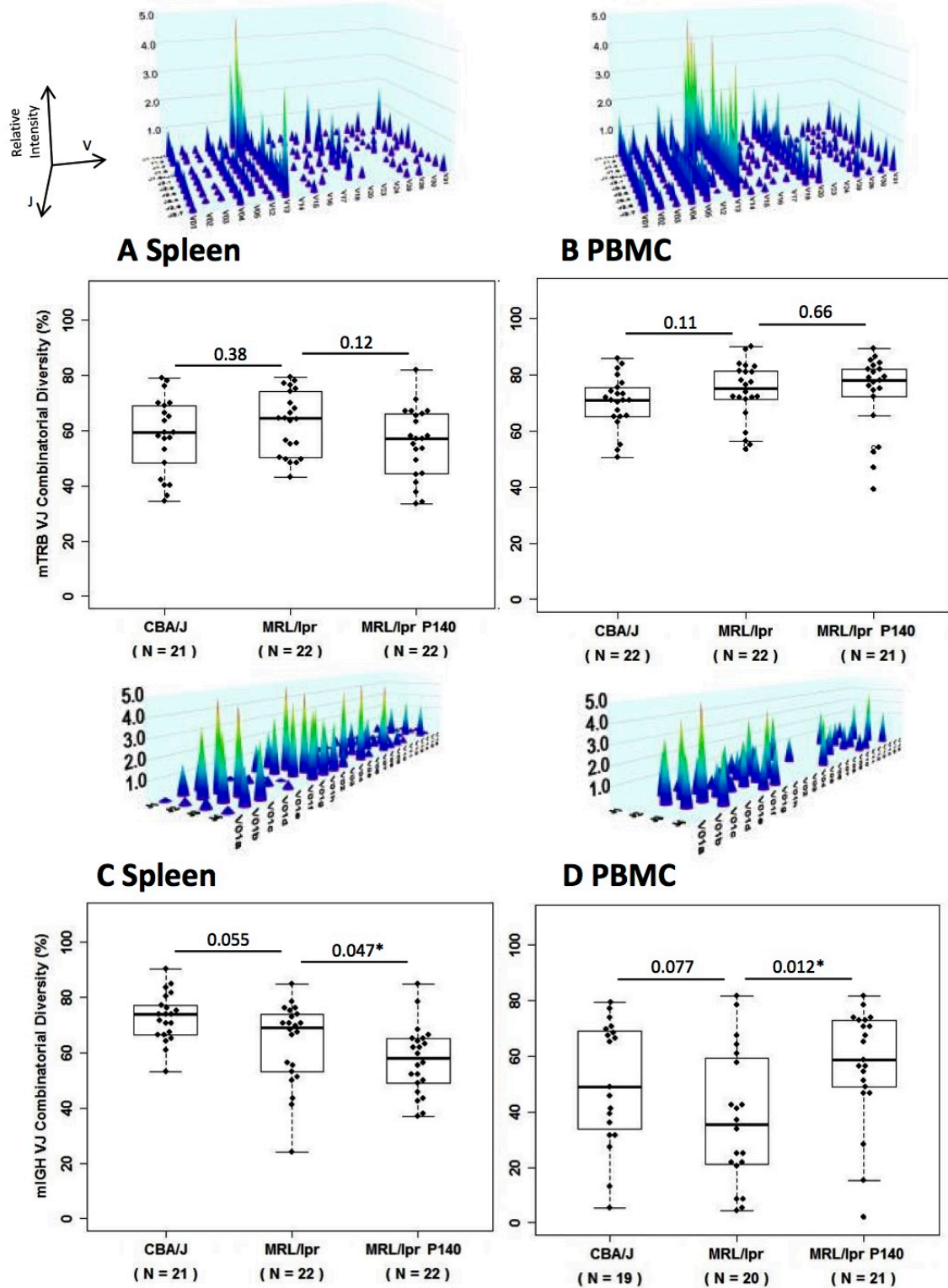
Fig. 3 Reconstitution post-P140 treatment of the peripheral immune cell pool of normal and MRL/lpr lupus mice. 11-13 week-old female CBA/J (panel A) or MRL/lpr mice (panels A-H) received a single i.v. administration of either peptide P140 in saline (increasing doses in panel A; fixed dose of 100 μ g peptide/mouse in panels B-H) or saline only (concentration 0 in panel A). The number of leukocytes/mL was evaluated by counting cells five days later (panel A) or at days 0, 3, 5, 7 and 10 post-P140 treatment by flow cytometry after labelling cells with appropriate fluorophores (panels B-H). Each symbol represents one individual mouse (n = 10-48 MRL/lpr mice and 5-14 CBA/J in panel A; n = 10 in panels B-H). The results mixed from two independent experiments are presented. The horizontal bars represent the respective average cell count values. Statistical significance was assessed using unpaired t-test.

Fig. 4 P140 alters the serum cytokine profile. (A-G) Two groups of MRL/lpr mice were injected i.v. with either 100 μ g/100 μ L of P140 (n=16) or NaCl only (n=20) at days 0 and 10. Sera were collected at days -2, 3, 7 and 13 and tested individually for their content in IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17a, INF- γ and TNF- α . Due to substantial inter-mouse variability, cytokine secretion was measured in individual MRL/lpr mice and normalized, and the results were expressed in terms of cytokine levels relative changes (\pm SEM) in each mouse, overtime, in comparison to day 2. (H) For comparing the data obtained in each group at days 3, 7 and 13 relative to day-2, a paired t test was used; to compare the two groups at each time point, a unpaired t test was applied.

Fig. 5 *P140 peptide alters the ability of MRL/lpr B cells to differentiate.* B cells collected from 12-13 week-old female MRL/lpr mice were let to differentiate in vitro in the presence of anti-CD40 antibodies and IL-21 and in the presence (with) or absence (w/o) of P140 peptide added at a 10, 20 and 30- μ M concentration. The scrambled peptide ScP140 was used as control. Differentiation was assessed 5 days later by flow cytometry by evaluating CD19 and CD138 expression. We verified that apoptosis did not occur until at least 6 days after adding P140 or ScP140 in the cultures. (A, B) A dot-plot of each condition is shown (representative of 7 independent experiments). The percentages of B cells expressing or not CD19 and CD138 are gathered in the graph. (C, D) The mean percentages of CD19+D138+ PBs \pm SD in panel C (n = 7) and reduction percentages illustrated in the case of 7 individual mice (panel D) are shown as a function of P140 concentration. Statistical significance was assessed using unpaired t-test (E) The frequency of IgM-secreting cells was measured by ELISPOT. The results are expressed as the number of IgM-secreting cells/ 1×10^6 total cells. A photograph of one culture well is shown for each condition (representative of 5 independent experiments corresponding to 5 individual mice). Statistical significance was assessed using Mann-Whitney test.

Fig. 6 *P140 does not affect the ability of treated mice to mount an efficient response elicited by a foreign model immunogen.* (A) Protocol of injections and bleedings used in this experiment. (B-D) The sera collected from CBA/J, untreated and P140-treated MRL/lpr mice that received ovalbumin (OVA) as model foreign immunogen were tested by ELISA for their capacity to produce anti-OVA IgG antibodies. The trend shown here was confirmed in two independent experiments that altogether involved a total of 15 mice/study group (one of two independent experiments is shown). The titers were defined as the reciprocal of the dilution giving an absorbance value of 0.5. The average titer and the number of responder animal (titer > 250) are indicated at the top of each histogram. Statistical significance was assessed using Mann-Whitney test.

Figure 1



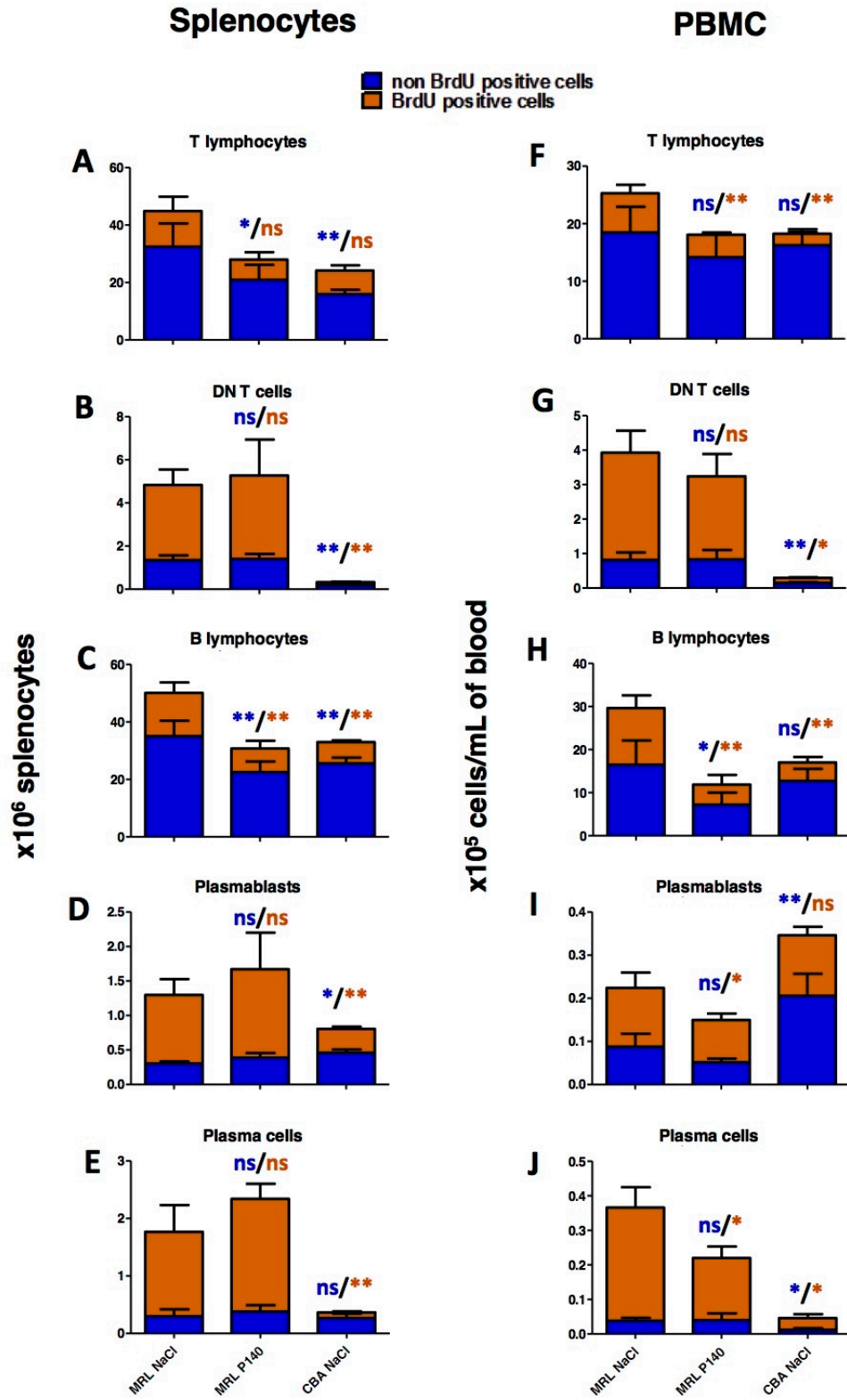


Figure 2

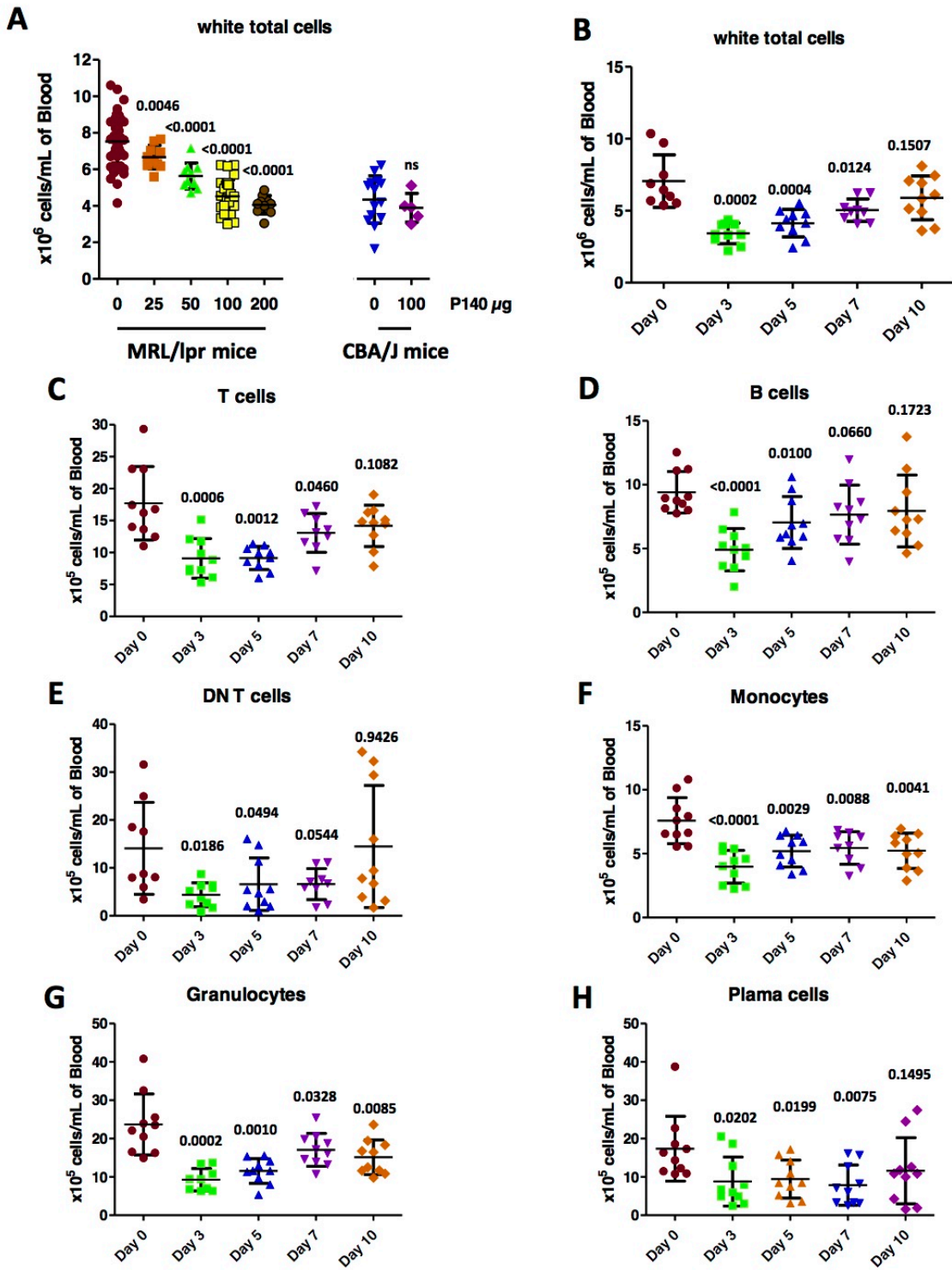


Figure 3

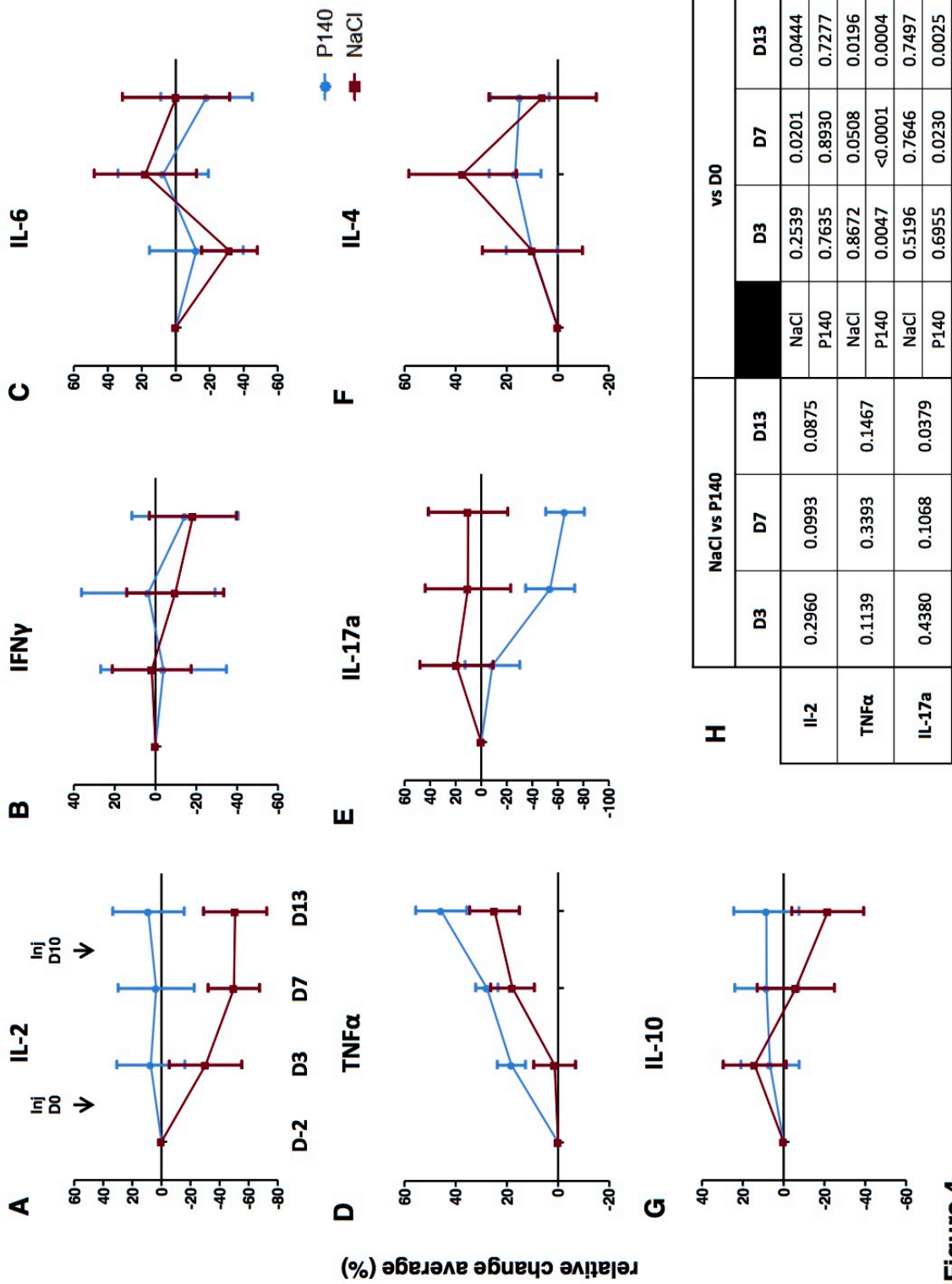


Figure 4

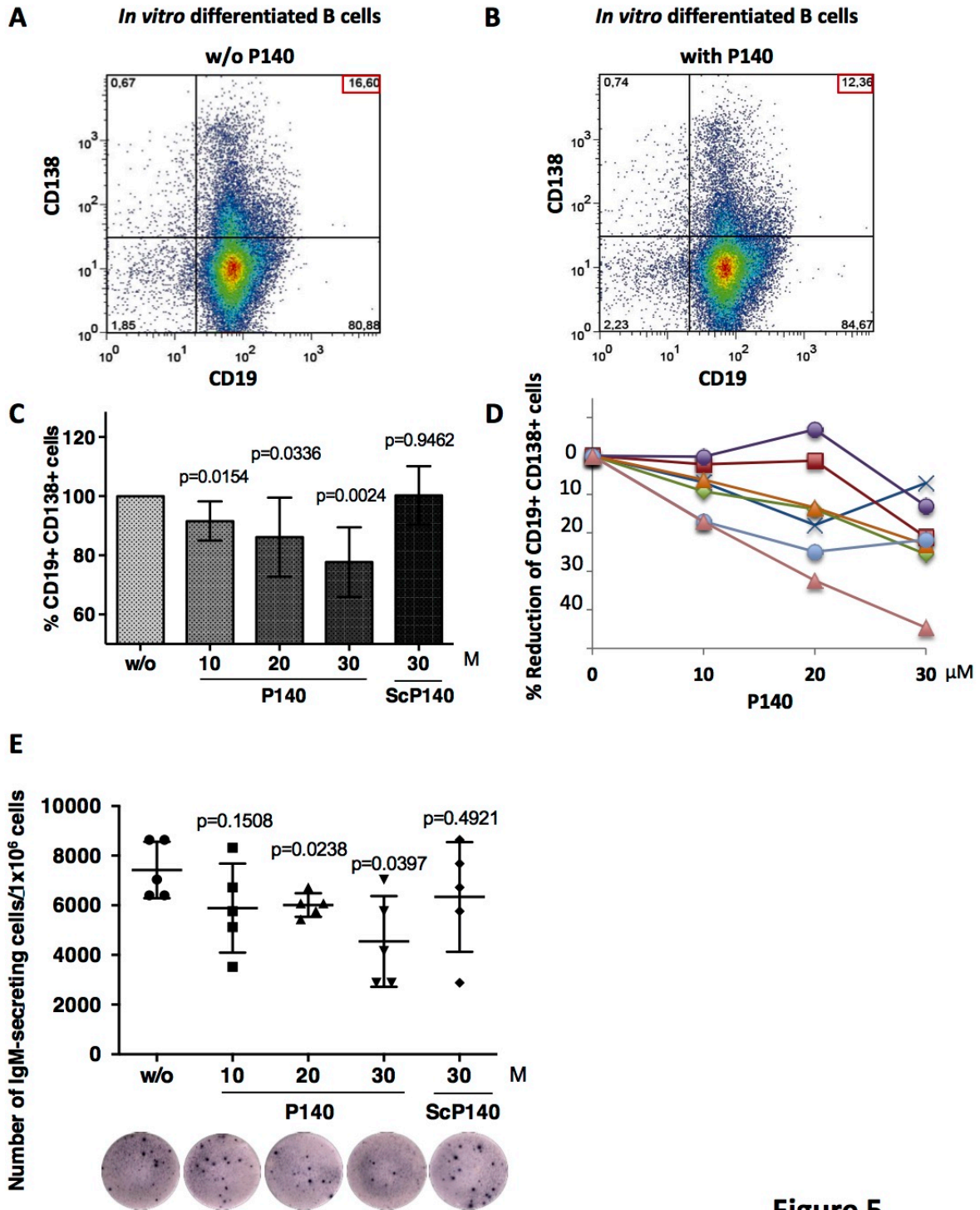


Figure 5

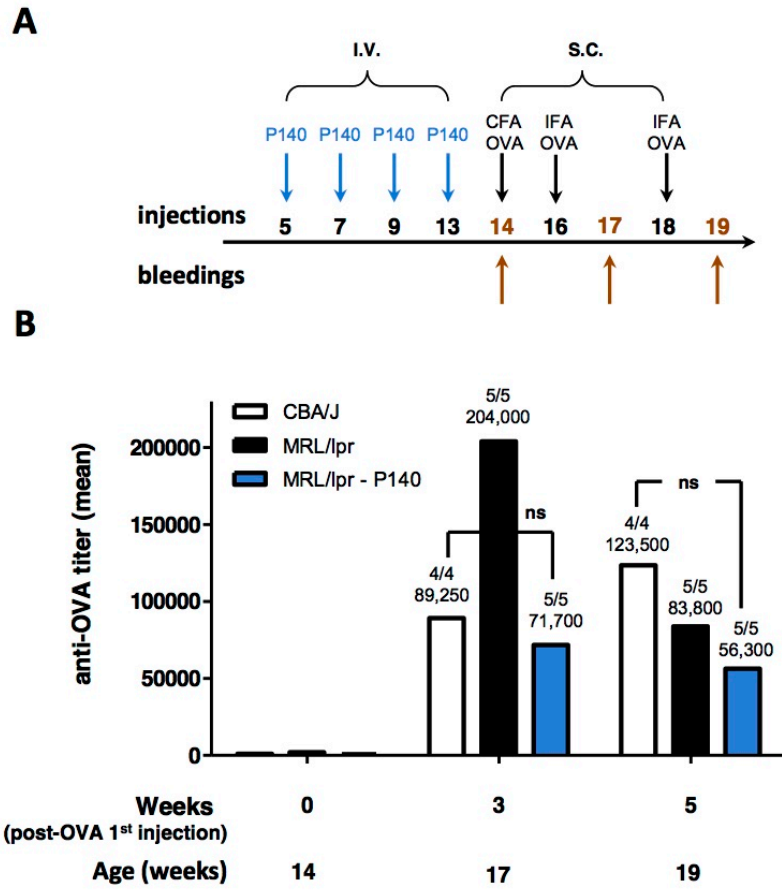


Figure 6

Figure S1

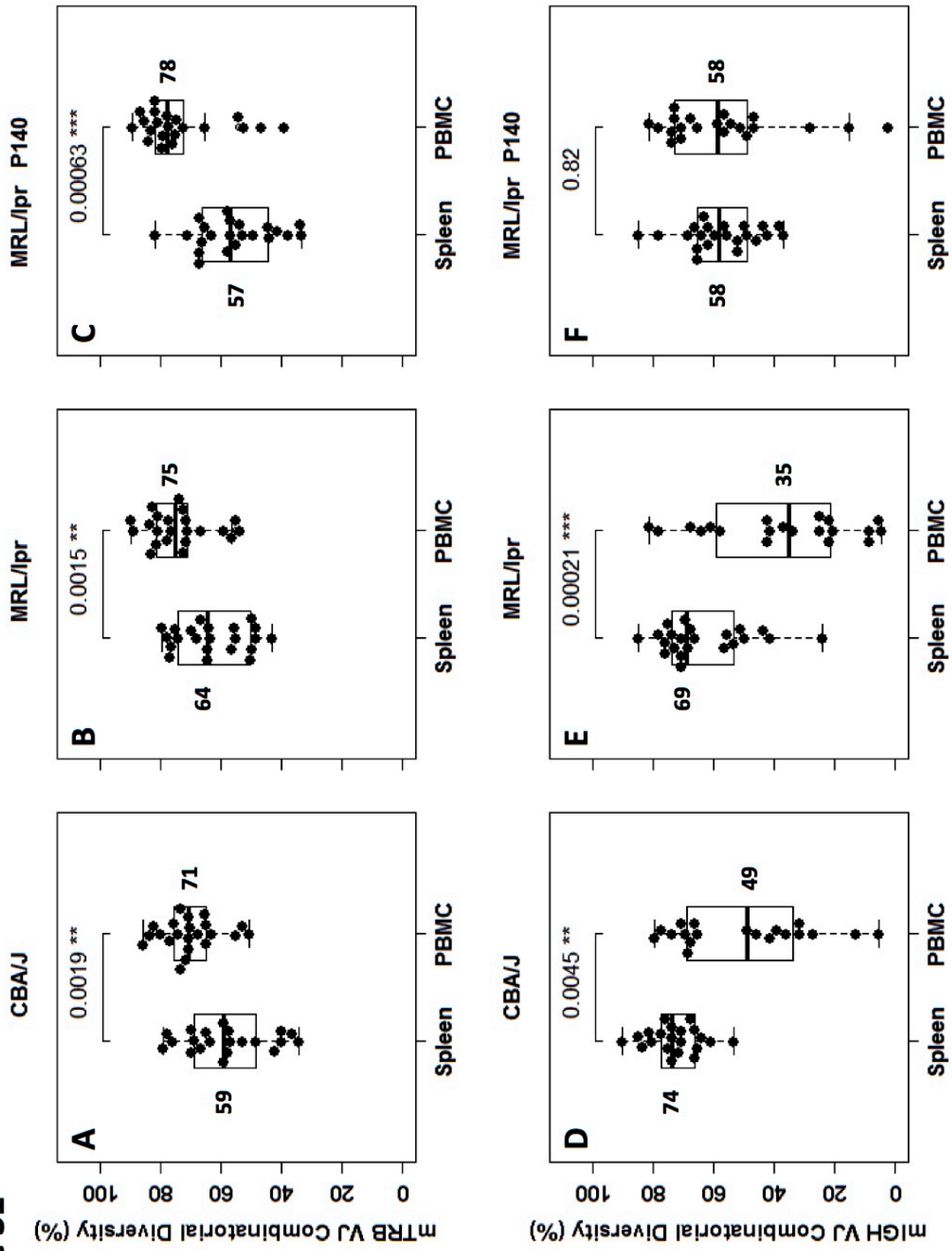


Figure S1 Dot plot representation of *mTRB VJ* (A-C) and *mIgH VJ* (D-F) combinatorial diversity distribution in spleen and PBMC samples, for each group of mice. Horizontal lines represent median of diversity with corresponding values. Statistical significance was assessed using the Wilcoxon signed-rank test. P values are indicated.

The median *mTRB* diversity in spleen samples was 59% (range 34.5-78.9) and 64% (range 43.1-79.4) in CBA/J and MRL/lpr mice, respectively ($p=0.380$; Wilcoxon rank-sum test), and 71% (range 50.7-85.7) and 75% (range 53.6-90.0) in CBA/J and MRL/lpr mice, respectively ($p=0.110$; Wilcoxon rank-sum test) in PBMC samples. The median *mIGH* diversity in the spleen was 74% (range 53.3- 90.2) and 69% (range 23.9-84.8) in CBA/J and MRL/lpr mice, respectively ($p=0.055$; Wilcoxon rank-sum test), and 49% (range 5.4- 79.4) and 35% (range 4.4-81.5), respectively ($p=0.0766$; Wilcoxon rank-sum test) in PBMCs. It is worth noting that as expected due to the content of T and B cells in each compartment, the T cell population was significantly more diversified in the peripheral blood than in the spleen ($p=0.0019$ and 0.0015 , respectively in CBA/J and MRL/lpr mice; Wilcoxon signed-rank test; Fig. S1, A and B) while, conversely, the B cell population was significantly more diversified in the spleen compared to the peripheral blood ($p=0.0045$ and 0.00021 , respectively; Wilcoxon signed-rank test; Fig. S1, D and E). Since these observations were made both in CBA/J and MRL/lpr mice, the differences were considered as independent from lupus disease and/or genetic background.

As above, it was observed that the T cell population in P140-treated mice was more diversified in the peripheral blood than in the spleen ($p= 0.00063$; Wilcoxon signed-rank test; Fig. S1,C). Remarkably, *mIGH VJ* combinatorial diversity was statistically different in untreated and P140-treated MRL/lpr mice ($p=0.047$ and 0.012 in the spleen and PBMCs, respectively; Wilcoxon rank-sum test; Fig. 1, C and D). The median *mIGH* diversity in the spleen from treated mice was 58% (range 36.96-84.78) versus 69% (range 23.91-84.78) in MRL/lpr mice. In PBMCs, it was 58% (range 2.17-81.52) in treated mice versus 35% (range 4.35-81.52) in untreated mice. The B-cell population was equally diversified in the spleen and the peripheral blood (Fig. S1,F).

Figure S2

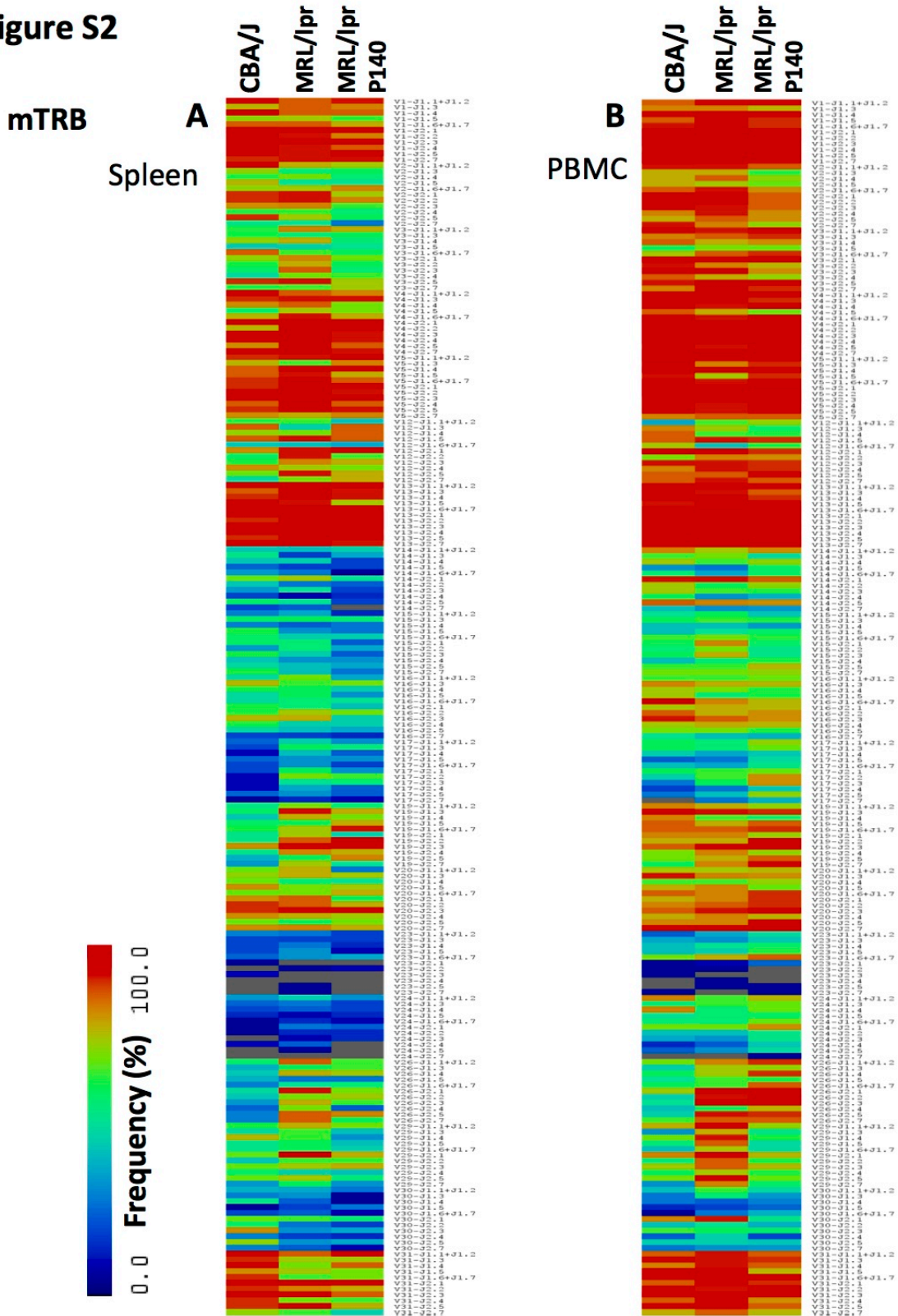


Figure S2

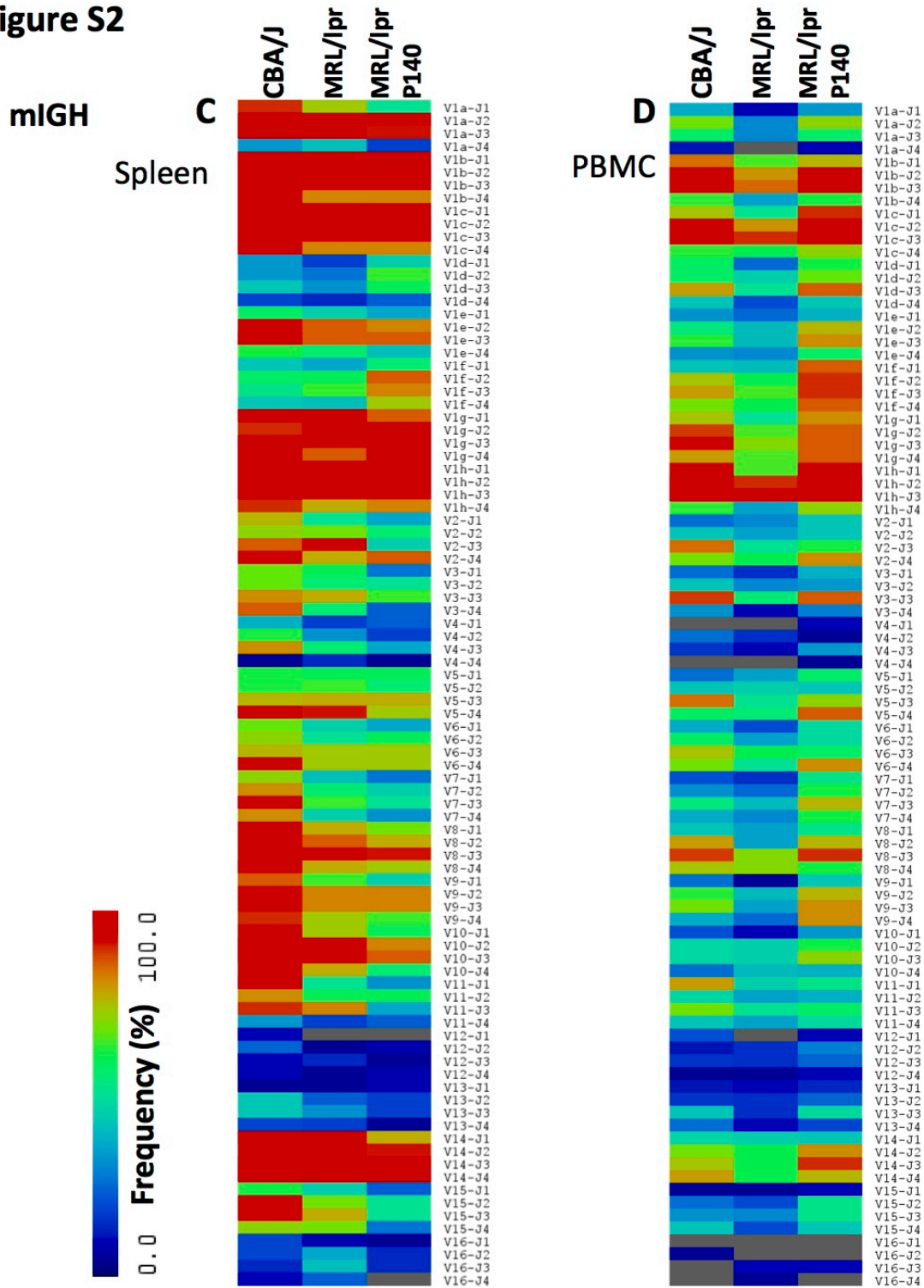


Figure S2 Overview of the frequency pattern for the 209 mTRB (A, B) and 92 mIGH (C, D) VJ theoretical rearrangements observed in spleen (A, C) and PBMC (B, D) samples from the indicated groups of mice. Colour code goes from dark blue to red, corresponding to the lowest and highest frequencies (in %); in grey the frequency is null.

Figure S3

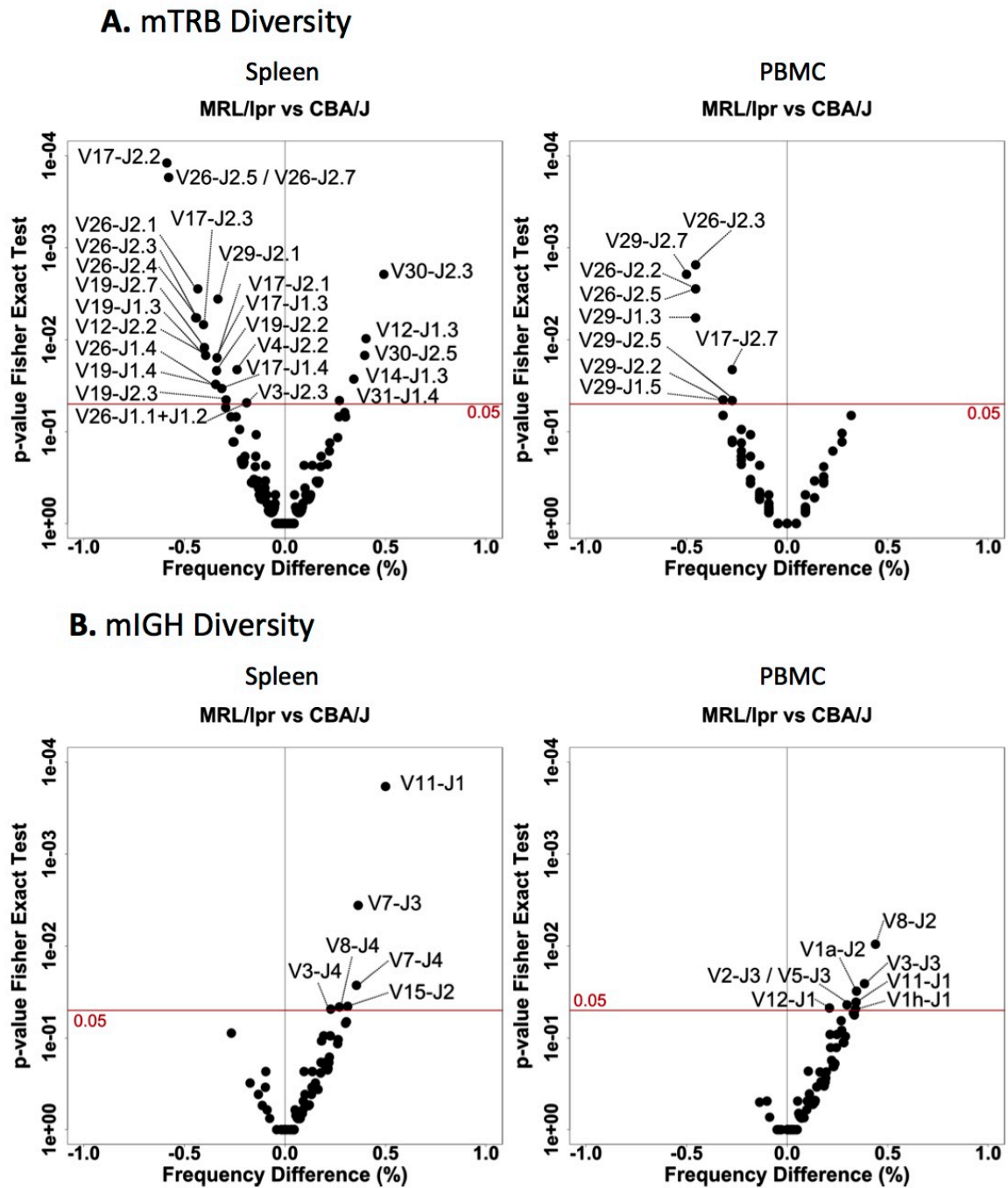


Figure S3 Distribution of the significantly detected mTRB VJ (A) and mIGH (B) rearrangements in CBA/J and MRL/lpr mice. The analysis was made from spleen and PBMC samples. Statistically significant differences of rearrangements frequencies between the two groups of mice are shown. P values <0.05 (dots above the line) were considered significant by Fisher's exact test.

Figure S4

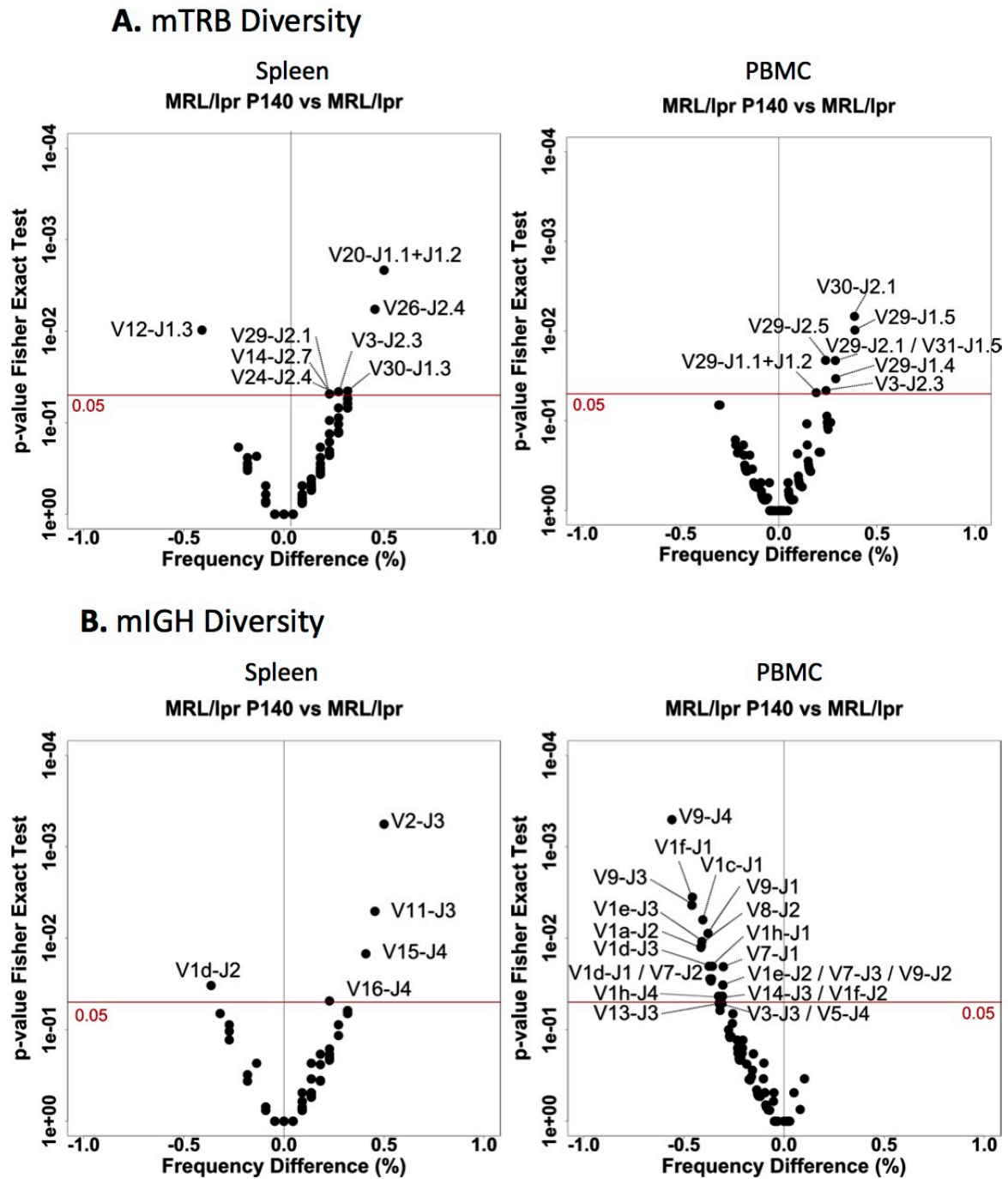


Figure S4 Distribution of the significantly detected mTRB VJ (A) and mIGH (B) rearrangements in MRL/lpr and P140 treated-MRL/lpr mice. See the legend of Figure S3 for details.

Figure S5

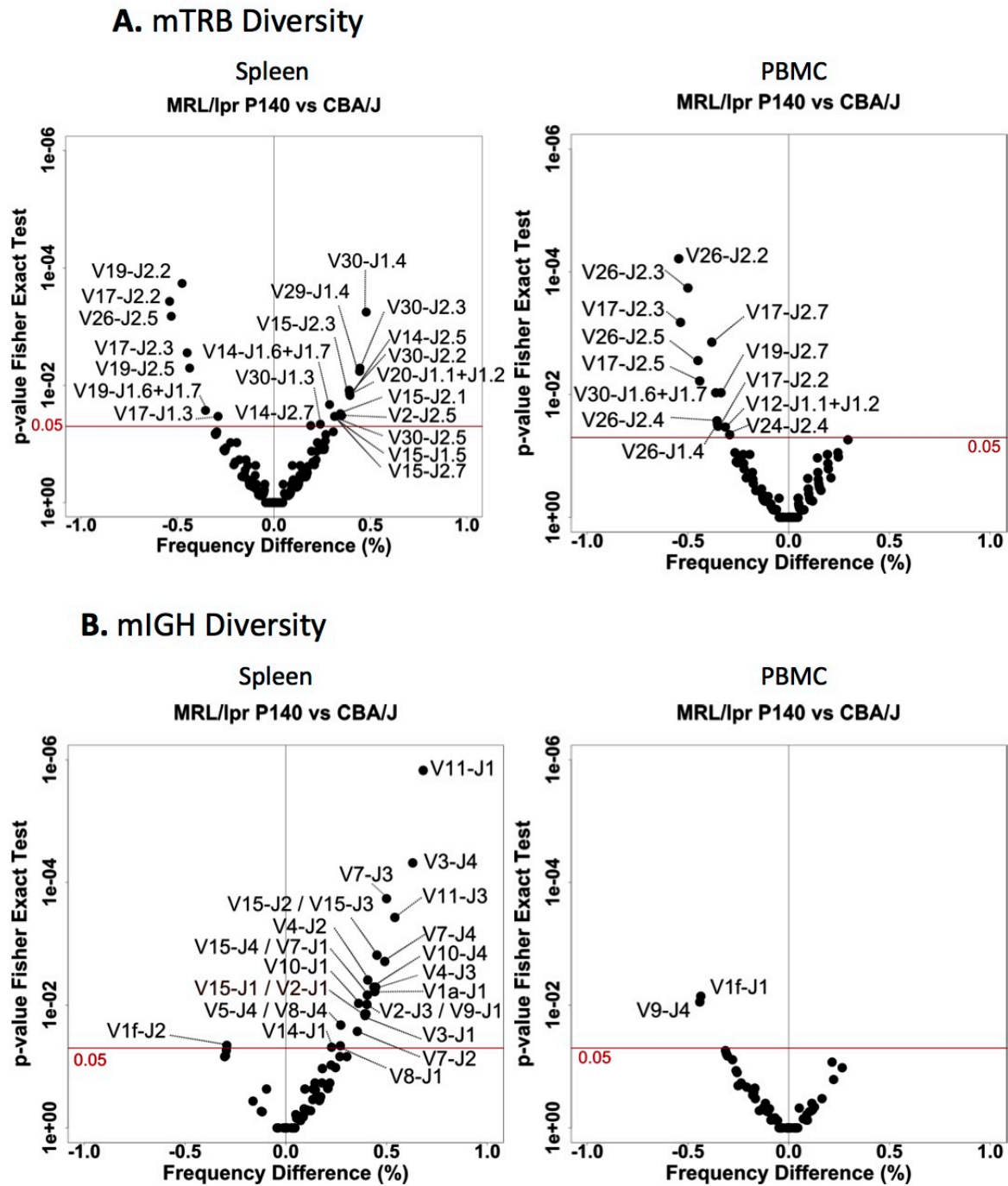


Figure S5 Distribution of the significantly detected mTRB VJ (A) and mIGH (B) rearrangements in CBA/J and P140-treated MRL/lpr mice. See the legend of Figure S3 for details.

Panel B

Here are compared the mIGH VJ repertoire between CBA/J and P140-treated MRL/lpr mice (see also the Supplemental Table 5). All 6 IGH VJ rearrangements (V11-J1, V7-J3, V7-J4, V8-J4, V3-J4 and V15-J2) visualized in CBA/J splenocytes when compared to untreated MRL/lpr mice (see Supplemental Figure 3B) are still significantly more represented in CBA/J compared to P140-treated MRL/lpr mice, indicating that those rearrangements are related to CBA/J background. Since in our hands no mIGH VJ repertoire signature could be visualized, neither in splenic nor in peripheral blood MRL/lpr B cells (see Supplemental Figure 3), it was obviously not possible to investigate a potential effect of peptide on this specific repertoire.

mTRB repertoire

Mice	Treatment		Spleen samples	PBMC samples
	NaCl	P140		
CBA/J	X		21	22
MRL/lpr	X		22	22
MRL/lpr	X	X	22	21
Total:			65	65

mIGH repertoire

Mice	Treatment		Spleen samples	PBMC samples
	NaCl	P140		
CBA/J	X		21	19
MRL/lpr	X		22	20
MRL/lpr	X	X	22	21
Total:			65	60

Supplemental Table 1: Description of the composition of each group of mice, their respective treatment and number of analyzed samples.

Abbreviations: CBA/J, C.C.x Bagg, strain A/Jackson; lpr, lymphoproliferation; mIGH, murine Ig heavy-chain; MRL, Murphy Roths large; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; mTRB, murine T cell receptor β -chain.

Groups	mTRB VJ rearrangements significantly detected (theoretical = 209)				mIGH V rearrangements significantly detected (theoretical = 92)			
	Spleen		PBMC		Spleen		PBMC	
	N	n	N	n	N	n	N	n
CBA/J NaCl	21	75	22	112	21	55	19	20
MRL/lpr NaCl	22	82	22	127	22	40	20	6
MRL/lpr NaCl + P140	22	70	21	119	22	34	21	33

Supplemental Table 2: Number (N) of significantly detected mTRB and mIGH VJ rearrangements for each tested group found over the theoretical rearrangements.

For each tested group of mice the number of samples (n) is indicated.

Abbreviations: CBA/J, C.C.x Bagg, strain A/Jackson; lpr, lymphoproliferation; mIGH, murine Ig heavy-chain; MRL, Murphy Roths large; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; mTRB, murine T cell receptor β -chain; V, variable.

Supplemental Table 3

A. mTRB Diversity

mTRB VJ rearrangement/Spleen	Frequency Detection in the group			Fisher Exact Test p-value
	CBA/J (N=21)	MRL/lpr (N=22)	Frequency Difference	
V30-J2.3	81%	32%	49%	0,0019
V12-J1.3	86%	45%	40%	0,0097
V30-J2.5	71%	32%	40%	0,0148
V14-J1.3	52%	18%	34%	0,0268
V31-J1.4	95%	68%	27%	0,0459
V19-J2.3	81%	100%	-19%	0,0485
V4-J2.2	76%	100%	-24%	0,0211
V26-J1.1+J1.2	57%	86%	-29%	0,0452
V3-J2.3	57%	86%	-29%	0,0452
V17-J1.4	10%	41%	-31%	0,0339
V29-J2.1	67%	100%	-33%	0,0036
V12-J2.2	57%	91%	-34%	0,0157
V19-J1.3	57%	91%	-34%	0,0157
V19-J2.2	52%	86%	-34%	0,0217
V19-J1.4	43%	77%	-34%	0,0305
V26-J1.4	43%	77%	-34%	0,0305
V19-J2.7	33%	73%	-39%	0,0148
V17-J1.3	19%	59%	-40%	0,0122
V17-J2.1	19%	59%	-40%	0,0122
V17-J2.3	10%	50%	-40%	0,0068
V26-J2.1	48%	91%	-43%	0,0028
V26-J2.3	33%	77%	-44%	0,0058
V26-J2.4	24%	68%	-44%	0,0058
V26-J2.5	29%	86%	-58%	2,00E-04
V26-J2.7	29%	86%	-58%	2,00E-04
V17-J2.2	10%	68%	-59%	1,00E-04

mTRB VJ rearrangement/PBMC	Frequency Detection in the group			Fisher Exact Test p-value
	CBA/J (N=22)	MRL/lpr (N=22)	Frequency Difference	
V17-J2.7	0%	27%	-27%	0,021
V29-J2.5	68%	96%	-27%	0,046
V29-J1.5	55%	86%	-32%	0,045
V29-J2.2	55%	86%	-32%	0,045
V26-J2.3	50%	96%	-45%	0,002
V26-J2.2	45%	91%	-45%	0,003
V26-J2.5	45%	91%	-45%	0,003
V29-J1.3	32%	77%	-45%	0,006
V29-J2.7	32%	82%	-50%	0,002

B. mIGH Diversity

Frequency Detection in the group				
mIGH VJ rearrangement/Spleen	CBA/J (N=21)	MRL/lpr (N=22)	Frequency Difference	Fisher Exact Test p-value
V11-J1	100%	50%	50%	2,00E-04
V7-J3	100%	64%	36%	0,0036
V7-J4	81%	45%	36%	0,0268
V3-J4	86%	55%	31%	0,0452
V15-J2	95%	68%	27%	0,0459
V8-J4	100%	77%	23%	0,0485

Frequency Detection in the group				
mIGH VJ rearrangement/PBMC	CBA/J (N=19)	MRL/lpr (N=20)	Frequency Difference	Fisher Exact Test p-value
V8-J2	79%	35%	44%	0,0095
V1a-J2	68%	30%	38%	0,0256
V3-J3	89%	55%	34%	0,031
V2-J3	84%	50%	34%	0,0407
V5-J3	84%	50%	34%	0,0407
V11-J1	79%	45%	34%	0,0484
V1h-J1	95%	65%	30%	0,0436
V12-J1	21%	0%	21%	0,0471

Supplemental Table 4

A. mTRB Diversity

mTRB VJ rearrangement/spleen	Frequency Detection in the group			Fisher Exact Test
	MRL/lpr (N=22)	MRL/lpr P140 (N=22)	Frequency Difference	p-value
V20-J1.1+J1.2	77%	27%	50%	0,0022
V26-J2.4	68%	23%	45%	0,0058
V3-J2.3	86%	55%	32%	0,0452
V30-J1.3	32%	5%	27%	0,0459
V29-J2.1	100%	77%	23%	0,0485
V14-J2.7	23%	0%	23%	0,0485
V24-J2.4	23%	0%	23%	0,0485
V12-J1.3	45%	86%	-41%	0,0097

mTRB VJ rearrangement/PBMC	Frequency Detection in the group			Fisher Exact Test
	MRL/lpr (N=22)	MRL/lpr P140 (N=21)	Frequency Difference	p-value
V29-J1.5	86%	48%	39%	0,01
V30-J2.1	91%	52%	39%	0,007
V29-J1.4	91%	62%	29%	0,034
V29-J2.5	96%	67%	29%	0,021
V29-J1.1+J1.2	96%	71%	24%	0,046
V29-J2.1	100%	76%	24%	0,021
V31-J1.5	100%	76%	24%	0,021
V3-J2.3	100%	81%	19%	0,048

B. mIGH Diversity

Frequency Detection in the group				
mIGH VJ rearrangement/Spleen	MRL/lpr (N=22)	MRL/lpr P140 (N=22)	Frequency Difference	Fisher Exact Test p-value
V2-J3	95%	45%	50%	6,00E-04
V11-J3	82%	36%	45%	0,0051
V15-J4	68%	27%	41%	0,0148
V16-J4	23%	0%	23%	0,0485
V1d-J2	27%	64%	-36%	0,0329

Frequency Detection in the group				
mIGH VJ rearrangement/PBMC	MRL/lpr (N=20)	MRL/lpr P140 (N=21)	Frequency Difference	Fisher Exact Test p-value
V1h-J1	65%	95%	-30%	0,0205
V14-J3	60%	90%	-30%	0,0325
V1f-J2	60%	90%	-30%	0,0325
V3-J3	55%	86%	-31%	0,0431
V5-J4	55%	86%	-31%	0,0431
V13-J3	15%	48%	-33%	0,0431
V1d-J3	50%	86%	-36%	0,0203
V1e-J2	40%	76%	-36%	0,0278
V7-J3	40%	76%	-36%	0,0278
V9-J2	40%	76%	-36%	0,0278
V1h-J4	35%	71%	-36%	0,0294
V1d-J1	25%	62%	-37%	0,0278
V7-J2	25%	62%	-37%	0,0278
V7-J1	15%	52%	-37%	0,0203
V9-J1	5%	43%	-38%	0,0089
V1c-J1	50%	90%	-40%	0,0063
V1e-J3	40%	81%	-41%	0,0109
V8-J2	35%	76%	-41%	0,0122
V1a-J2	30%	71%	-41%	0,0126
V1f-J1	40%	86%	-46%	0,0036
V9-J3	35%	81%	-46%	0,0044
V9-J4	25%	81%	-56%	5,00E-04

Supplemental Table 5

A. mTRB Diversity

Frequency Detection in the group				
mTRB VJ rearrangement/Spleen	CBA/J (N=21)	MRL/lpr P140 (N=22)	Frequency Difference	Fisher Exact Test p-value
V30-J1.4	52%	5%	48%	6,00E-04
V30-J2.3	81%	36%	45%	0,0051
V29-J1.4	76%	32%	44%	0,0058
V20-J1.1+J1.2	67%	27%	39%	0,0148
V15-J2.3	62%	23%	39%	0,0139
V14-J2.5	57%	18%	39%	0,0122
V30-J2.2	57%	18%	39%	0,0122
V30-J2.5	71%	36%	35%	0,0329
V15-J1.5	62%	27%	35%	0,0329
V15-J2.7	62%	27%	35%	0,0329
V15-J2.1	57%	23%	34%	0,0305
V2-J2.5	90%	59%	31%	0,0339
V14-J1.6+J1.7	33%	5%	29%	0,0212
V30-J1.3	29%	5%	24%	0,0459
V14-J2.7	19%	0%	19%	0,0485
V19-J1.6+J1.7	62%	91%	-29%	0,0339
V17-J1.3	19%	55%	-36%	0,0268
V19-J2.5	38%	82%	-44%	0,0051
V17-J2.3	10%	55%	-45%	0,0028
V19-J2.2	52%	100%	-48%	2,00E-04
V26-J2.5	29%	82%	-53%	7,00E-04
V17-J2.2	10%	64%	-54%	4,00E-04

Frequency Detection in the group				
mTRB VJ rearrangement/PBMC	CBA/J (N=22)	MRL/lpr P140 (N=21)	Frequency Difference	Fisher Exact Test p-value
V24-J2.4	14%	43%	-29%	0,045
V26-J1.4	59%	91%	-31%	0,034
V30-J1.6+J1.7	5%	38%	-34%	0,009
V12-J1.1+J1.2	36%	71%	-35%	0,033
V26-J2.4	41%	76%	-35%	0,031
V17-J2.2	46%	81%	-36%	0,027
V19-J2.7	59%	95%	-36%	0,009
V17-J2.7	0%	38%	-38%	0,001
V17-J2.5	27%	71%	-44%	0,006
V26-J2.5	46%	91%	-45%	0,003
V26-J2.3	50%	100%	-50%	0,000
V17-J2.3	27%	81%	-54%	0,001
V26-J2.2	46%	100%	-55%	0,000

B. mIGH Diversity

Frequency Detection in the group				
mIGH VJ rearrangement/Spleen	CBA/J (N=21)	MRL/lpr P140 (N=22)	Frequency Difference	Fisher Exact Test p-value
V11-J1	100%	32%	68%	0,0000
V3-J4	86%	23%	63%	0,0000
V11-J3	90%	36%	54%	4,00E-04
V7-J3	100%	50%	50%	2,00E-04
V7-J4	81%	32%	49%	0,0019
V15-J2	95%	50%	45%	0,0015
V15-J3	95%	50%	45%	0,0015
V4-J3	81%	36%	45%	0,0051
V15-J4	71%	27%	44%	0,006
V7-J1	71%	27%	44%	0,006
V4-J2	62%	18%	44%	0,0051
V10-J4	95%	55%	41%	0,0039
V1a-J1	90%	50%	40%	0,0068
V2-J3	86%	45%	40%	0,0097
V9-J1	86%	45%	40%	0,0097
V2-J1	76%	36%	40%	0,0139
V3-J1	67%	27%	39%	0,0148
V15-J1	62%	23%	39%	0,0139
V10-J1	95%	59%	36%	0,0093
V7-J2	81%	45%	36%	0,0268
V8-J4	100%	73%	27%	0,0211
V5-J4	100%	73%	27%	0,0211
V8-J1	95%	68%	27%	0,0459
V14-J1	100%	77%	23%	0,0485
V1f-J2	57%	86%	-29%	0,0452

Frequency Detection in the group				
mIGH VJ rearrangement/PBMC	CBA/J (N=19)	MRL/lpr P140 (N=21)	Frequency Difference	Fisher Exact Test p-value
V1f-J1	42%	86%	-44%	0,0072
V9-J4	37%	81%	-44%	0,0089

Supplemental Material

Chaperone-mediated autophagy down-regulation normalizes the immune responses in lupus

Nicolas Schall¹, Maud Wilhelm¹, Hayet Dali¹, Evelyne Jouvin-Marche² and Sylviane Muller^{1,3}

¹CNRS, Immunopathologie et chimie thérapeutique/Laboratory of excellence Medalis, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, France; ²Centre de recherche Inserm U1209/CNRS UMR 5309/Université Grenoble Alpes, Immunologie analytique des pathologies chroniques, La Tronche, France; ³University of Strasbourg Institute for Advanced Study, Strasbourg, France

Materials and Methods

Mice and treatments

Female CBA/J and MRL/lpr mice were purchased from Harlan-France or Charles River-France. In most of experiments including those conducted to explore TCR and BCR V-J rearrangements, 11-13 week-old female MRL/lpr mice received a single i.v. administration of P140 peptide in saline or saline alone as control. MHC-matched CBA/J mice were used as healthy control. For testing the effect of P140 on the ability of MRL/lpr mice to mount an immune response to a foreign immunogen, 14 week-old female CBA/J and MRL/lpr mice received P140 at weeks 5, 7, 9, and 13 (100 µg in 100 µL saline per mouse) by the intravenous (i.v.) route, and then ovalbumin (OVA; Sigma-Aldrich, ref. A5503) at weeks 14, 16 and 18 (100 µg in 100 µL saline, emulsified in complete Freund's adjuvant (CFA) for the first injection and in incomplete FA for the subsequent ones) by the sub-cutaneous (s.c.) route. They were bled at weeks 14 (control), 17 and 19. Proteinuria and dermatitis were recorded, and antibody levels were tested by ELISA. For continuous labeling experiments with bromodeoxyuridine (BrdU) in vivo, mice received first an intraperitoneal injection of BrdU (1 mg /20 g body weight; Sigma-Aldrich, ref. B5002) and then BrdU in drinking water for 10 days (0.8 mg/mL). They received a single i.v. dose of P140 five days after they received intraperitoneal injection of BrdU. Cell subsets were analyzed by flow cytometry. All experimental protocols were carried out with the approval of the local Institutional Animal Care and Use Committee (CREMEAS).

Combinatorial diversity analysis of mouse TRB and IGH

Throughout this study, the mouse (m) TRB VJ and Ig heavy (H) chain VJ (IGH VJ) genes are designed according to the international ImMunoGeneTics database (<http://www.imgt.org>). Samples were analyzed with ImmunTraCkeR® kits, using the ImmunID IFS platform

(ImmunID). Detailed protocols and expression of results have been published previously^{1,2}. Briefly, three days after peptide (100 µg per mouse) or placebo treatment, genomic DNA was extracted from CBA/J and MRL/lpr PBMCs or spleen cells. For each sample, multi-N-plex PCR was performed using an up-stream primer specific of all functional members of a given T cell receptor b (TRB)V family and a downstream primer specific of a given TRBJ segment. An independent multi-N-plex PCR was also applied for T cell receptor b (IGH)V and IGHJ amplification. These assays allow for the simultaneous detection of several V–J rearrangements in the same reaction. Using this technique, it is possible to detect 209 different murine (m) TRBV–TRBJ and 92 mIGHV-IGHJ rearrangements. All V–J1, J2, and Jn PCR products were separated according to their size. PCR products were separated on a 0.8%-agarose gel, directly stained with SYBR Green I, and quantified using a charge-coupled device camera equipped with a BIO-1D quantification software (Vilbert Lourmart). Constel ID® software (ImmunID) was used for further analytical studies including the generation of three-dimensional repertoire illustration. Results are expressed as percentages of detected rearrangements among the total 209 mTRB and 92 mIGH possible combinatorial rearrangements. Of note, due to high number of sub-members in the V1 family, the latter one has been splitted into 8 tubes (V1a to V1h). IGH V1a comprises sub-members: V1-11, 12, 15, 67; IGH V1b: V1-49, 63; IGH V1c: V1-17-1, 18, 26, 34, 22, 62-2, 71, 76; IGH V1d: V1-14, 47, 80; IGH V1e: V1-5, 7, 4; IGH V1f: V1-20, 31, 37, 39, 42, 43, 66, 75, 77, 84, 78; IGH V1g: V1-9, 19, 36, 62-1, 58; IGH V1h: V1-50, 52, 53, 54, 55, 56, 59, 61, 62-3, 64, 69, 72, 74, 81, 82, 85. For the others IGH Vn families, they comprise all corresponding members.

Antibodies

The following antibodies were used, all from BD PharMingen: for the BrdU experiments, fluorescein isothiocyanate (FITC) CD3 monoclonal antibody (mAb) clone 145-2C11, peridinin chlorophyll (PerCP)-Cy5.5 labeled B220 mAb clone RA3-6B2, phycoerythrin (PE) labeled CD138 mAb clone 281.2; for defining the cell subtypes that repopulate the peripheral blood, PerCP-Cy5.5 labeled CD3 mAb clone 145-2C11, allophycocyanin-labeled B220 mAb clone RA3-6B2, FITC labeled Ly6G-labeled mAb clone 1A8, PE-labeled Gr1 mAb clone RB6-8C5, allophycocyanin-labeled CD138 mAb clone 281.2, PerCP-Cy5.5-labeled CD19 mAb clone 1D3; for the B cell studies, FITC-labeled CD19 mAb clone 1D3 and allophycocyanin-labeled CD138 mAb clone 282-2. Stained cells were washed and analyzed on a FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience) and FlowJo software (TreeStar).

BrdU intracellular cell staining

Intracellular cell staining was performed using the allophycocyanin-labeled BrdU flow kit (BD, ref 552598). Briefly, 0.5×10^6 cells per condition were stained with surface markers, washed and permeabilized using cytofix/cytoperm solution and cytoperm permeabilisation buffer plus. Cells were washed and incubated with DNase (30 µg per 10^6 cells). In a last condition, cells were stained with anti-BrdU-allophycocyanin-labeled antibody, 20 min at room temperature, washed and acquired on a FACSCalibur cytometer.

Peripheral hypercellularity measurements

The method used was as described previously^{3,4}. The number of leukocytes/mL in the peripheral blood was evaluated by counting cells five days after a single injection of P140 peptide (100 µg/mouse) into MRL/lpr or CBA/J mice. White total cells and cell subsets were analysed by flow cytometry.

Quantification of serum cytokines

To measure IL-2, IL-4, IL-6, TNF α , IFN γ , IL-17a and IL-10 serum levels, we used the so called BD cytometric beads array mouse Th1, TH2, Th17 kit (BD, ref. 560485) according to the manufacturer protocol. Briefly, 25µL of MRL/lpr sera were diluted 1:1 with assay diluent, incubated with 50µL of capture beads and 50µL of Mouse Th1/Th2/Th17 PE detection reagent. Assay tubes were incubated for 2 h at room temperature and protected from light. After one wash with 1 mL of wash buffer, beads pellets were resuspended with 300µL of wash buffer and acquired on a FACSCalibur cytometer. A standard curve established with known concentrations of each cytokine was used for quantification.

PC differentiation and quantification of IgM-secreting cells by ELISpot assay

Splenic B cells were isolated from MRL/lpr mice by negative selection (Pan B cell isolation kit mouse; Miltenyi Biotec, ref. 130-104-443). Biotinylated anti-CD138 antibodies (1 µg/mL; clone 281-2, BD Pharmingen) were added to deprive preexisting plasma cells. MRL/lpr B cells (97-99 % purity, as estimated by flow cytometry) were then let to differentiate for 5 days in the presence of anti-CD40 antibody (0.5µg/mL; BD Pharmingen, ref. 4045566), IL-21 (10ng/mL; R&D, ref. 594-ML-010) and increasing concentrations of P140. Antibodies secretion was measured by ELISpot as previously described with minor modifications⁵. Briefly, 96-well multiscreen plates (Millipore) were coated 1h at 37°C with anti-mouse IgM or IgG (1µg/mL; Jackson ImmunoResearch) in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4. After washings with PBS, membranes were saturated for 1h with RPMI 1640 medium supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum, 0.05mM β -mercaptoethanol, 10µg/mL gentamycin and 10 mM HEPES. Serial dilutions of differentiated B cell suspensions were incubated for 18-24h at 37°C. The last steps were as described⁵ using anti-mouse IgM (μ chain-specific) biotin-labeled Ig or anti-mouse IgG (Fc γ -specific) biotin-labeled Ig (both 1:20,000 in PBS-T; Jackson ImmunoResearch) that were added for 12h at 4°C, followed by alkaline phosphatase-labeled extravidin (Sigma-Aldrich) for 1h at 37°C and 5-bromo-4-chloro-indolyl phosphate and nitro-blue tetrazolium chloride substrate (Sigma-Aldrich). The reaction was stopped with water when spots were clearly visible. Spots were counted with a Bioreader® 4000 (BioSysGmbH). The results were expressed as the number of IgM or IgG-secreting cells/10⁶ total cells using the following formula: (number of spots/well – background measured in control wells incubated with PBS or BSA) x dilution factor of the cell suspension.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Wilcoxon Rank Sum tests (comparison of diversity between two groups), nonparametric Mann-Whitney test, paired or unpaired t-tests when sample distribution followed a Gaussian distribution. P value <0.05 were considered statistically significant.

References

1. Pasqual N, Gallagher M, Aude-Garcia C, Loiodice M, Thuderoz F, Demongeot J, Ceredig R, Marche PN, Jouvin-Marche E. Quantitative and qualitative changes in V-J alpha rearrangements during mouse thymocytes differentiation: implication for a limited T cell receptor alpha chain repertoire. *J Exp Med*. 2002;196:1163-1173
2. Pham HP, Manuel M, Petit N, Klatzmann D, Cohen-Kaminsky S, Six A, Marodon G. Half of the T-cell repertoire combinatorial diversity is genetically determined in humans and humanized mice. *Eur J Immunol*. 2012;42:760-770.
3. Schall N, Page N, Macri M, Chaloin O, Briand JP, Muller S. Peptide-based approaches to treat lupus and other autoimmune diseases. *J Autoimmunity*. 2012;39:143-153
4. Briand JP, Schall N and Muller S. Generation of self-peptides to treat systemic lupus erythematosus. *Methods Mol Biol*. 2014;1134:173-192.
5. Lacotte S, Dumortier H, Décossas M, Briand JP, Muller S. Identification of new pathogenic players in lupus: autoantibody-secreting cells are present in nephritic kidneys of NZB/W mice. *J Immunol*. 2010;184:3937-3945.

1.3. Commentaires relatifs à la publication

Afin d'étudier plus en détail les effets du peptide P140 survenant chez la souris MRL/*lpr* lors d'un traitement *in vivo*, nous avons analysé les principaux éléments moléculaires et cellulaires de la réponse autoimmune. Dans ce contexte, nous avons comparé la diversité du répertoire des récepteurs des LB et des LT entre les souris saines CBA/J et les souris lupiques MRL/*lpr*. Nous avons également mesuré l'impact de l'administration du peptide P140 aux souris lupiques sur ce répertoire. Ces analyses ont été réalisées à la fois sur les cellules issues de la rate et du sang périphérique provenant des différents groupes de souris. Nous nous sommes ensuite intéressés à la différenciation des LB en plasmocytes sécrétant des Ig. Finalement, nous nous sommes focalisés sur la faculté des cellules immunitaires à sécréter des cytokines ainsi que sur la capacité du système immunitaire à monter une réponse suite à l'exposition à un antigène exogène.

L'analyse comparative des BCR et TCR entre les souris CBA/J et les souris MRL/*lpr* ne révèle pas de différence dans la diversité globale des répertoires de ces récepteurs. En revanche, une analyse plus approfondie de la fréquence de chaque réarrangements V-J à permis de mettre en évidence que dans les LT certains réarrangements des récepteurs sont significativement plus fréquents chez les souris lupiques par rapport aux souris contrôles. Ces réarrangements pourraient traduire une signature du lupus en lien avec le caractère autoréactif des LT apparaissant au cours de la pathologie. A l'instar des LT, ces résultats n'ont pas été retrouvés dans les LB lorsque nous avons cherché à étudier les réarrangements V-J de la chaîne lourde des immunoglobulines chez la souris MRL/*lpr*. Suite à l'administration par voie intraveineuse du peptide P140 chez les souris lupiques, la diversité globale du répertoire des récepteurs des LT n'est pas modifiée en comparaison avec les souris non traitées. Cependant, certains réarrangements qui étaient sur-représentés chez les souris MRL/*lpr* par rapport aux souris CBA/J voient leur fréquence diminuer après l'administration du peptide. Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment, à savoir que le peptide P140 n'est pas un immunosuppresseur puisque la diversité globale du répertoire des LT n'est pas affectée. Par conséquent, à travers son action sur la fréquence de certains réarrangements V-J spécifiquement retrouvés en condition lupique, le peptide P140 est capable de diminuer la reconnaissance d'antigènes du soi et du non-soi par les TCR et potentiellement inhiber l'activation des LT autoréactifs.

Par la suite, nous avons étudié la prolifération des LB et LT suite à l'administration du peptide P140 aux souris lupiques MRL/*lpr*. Nous avons montré que le nombre de cellules T qui

prolifèrent ne varie pas dans la rate, alors qu'il est globalement réduit dans le sang périphérique après traitement. Contrairement aux LT, le nombre de LB capables de proliférer est diminué à la fois dans la rate et en périphérie chez les souris MRL/*lpr* traitées avec le peptide P140. De plus, lorsque nous analysons plus en détail les différentes sous-populations de cellules B nous constatons que le peptide P140 réduit significativement le nombre de plasmablastes et de plasmocytes en prolifération dans le sang périphérique chez les souris MRL/*lpr*.

Ces résultats nous ont poussés à étudier la différenciation des LB. J'ai principalement participé aux travaux de ce papier en différenciant, *in vitro*, des LB de souris MRL/*lpr* en présence ou en absence du peptide P140. J'ai montré que le peptide P140 réduit significativement le pourcentage de plasmablastes, qui correspond au stade précédant le stade des plasmocytes. En revanche, le peptide ne semble pas impacter le pourcentage de plasmocytes bien que leur nombre soit très faible dans nos conditions expérimentales. Lors de cette même étude, j'ai montré que *ex vivo*, le peptide P140 réduit le nombre de cellules sécrétrices d'IgM mais pas d'IgG. L'ensemble de ces travaux est résumé dans la figure 5 du papier.

La sécrétion de cytokines par les cellules immunitaires est essentielle pour la mise en place de la réponse auto-immune. Une étude antérieure réalisée au laboratoire avait mis en évidence que lorsque des cellules de patients lupiques étaient incubées *in vitro* avec le peptide P140, ce dernier induisait la sécrétion d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire (Monneaux et al., 2005). Dans ce contexte, nous avons abordé la question centrale de savoir si le peptide P140 modifie la production de plusieurs cytokines pro- et anti-inflammatoires chez les souris MRL/*lpr*. Ainsi, nous avons pu constater que rapidement après le traitement des souris avec le peptide, le profil de certaines cytokines, présentes dans le sérum, était affecté. C'est le cas de l'IL-17 dont sa concentration est diminuée après l'administration du peptide.

Pour finir, nous avons cherché à consolider les résultats précédemment publiés par notre équipe à savoir que les souris traitées avec le peptide P140 sont toujours capables de répondre normalement à un immunogène exogène. En effet, nous avons mis en évidence que les souris injectées avec le peptide puis infectées avec le virus influenza produisent la même quantité d'anticorps anti-virus que les souris lupiques injectées avec du PBS uniquement (Monneaux et al., 2007). Ici, nous avons montré que suite à l'immunisation avec de l'ovalbumine, les souris traitées avec le peptide P140 ont la faculté de monter une réponse immunitaire spécifique à l'ovalbumine. Ces derniers résultats confirment une fois de plus que le peptide P140 est bien un immunomodulateur de la maladie lupique et non pas un immunosuppresseur.

Chapitre 2

Target autophagy as a novel therapeutic strategy in autoimmune diseases.

Maud Wilhelm and Sylviane Muller

Chapter 13 In: Autophagy networks in inflammation. Springer International Publishing Switzerland, Maiuri, M.C and De Stefano, D. (Eds), ISBN 978-3-319-30077-1, pp 267-295

1.1. Avant propos

Dans cet article de revue, publié récemment, nous avons résumé l'implication de l'autophagie (principalement de la macroautophagie) dans le développement de maladies autoimmunes. L'autophagie qui est un processus physiologique qui joue un rôle crucial pour la survie cellulaire, l'homéostasie ou encore le développement et la différenciation des cellules du système immunitaire. Outre ces nombreuses fonctions, l'autophagie contrôle l'immunité et l'inflammation de manière décisive. Par conséquent, l'altération du mécanisme de l'autophagie peut potentiellement conduire à une autoimmunité. Ici, nous avons exposé les différentes preuves mettant en évidence le lien entre la dérégulation de l'autophagie et le LED, par exemple. Nous nous sommes également intéressés aux nouvelles stratégies thérapeutiques ayant pour cible certaines protéines clés ou certaines voies de signalisation nécessaires au processus autophagique. Les éléments de cette revue ont largement été repris dans l'introduction de mon mémoire de thèse.

1.2. Publication n°2

Target Autophagy as a Novel Therapeutic Strategy in Autoimmune Diseases

Maud Wilhelm and Sylviane Muller

Abstract Autophagy is a normal physiological process that plays a pivotal role for cell survival, differentiation, development, and homeostasis. Selective or not, canonical or non-canonical, autophagy processes are considerably more complex than originally thought. Depending on favourable or unfavourable cell environment conditions, the autophagy machinery will promote both cell survival and cell death, thus maintaining a decisive balance between manufacture of cellular components and breakdown of damaged or superfluous organelles and other cellular constituents, for example. Autophagy displays complex, still-debated, interwoven links with several other degradative pathways, such as apoptosis and proteasome-mediated systems. Among its many cellular regulatory functions that have been experimentally proven or that are anticipated, autophagy decisively controls immunity and inflammation, and any impaired autophagy signaling can potentially lead to autoimmune-related diseases. Here we review recent progresses that have been made in deciphering existing links between autophagy and autoimmunity. We further discuss how targeting certain hot spots of autophagy processes with appropriate tools might influence the course of autoimmune diseases by controlling both innate and adaptive immune responses, which are improperly oriented in these settings.

M. Wilhelm

CNRS, Immunopathology and Therapeutic Chemistry/Laboratory of Excellence MEDALIS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, University of Strasbourg, Strasbourg, France
e-mail: M.Wilhelm@ibmc-cnrs.unistra.fr

S. Muller (✉)

CNRS, Immunopathology and Therapeutic Chemistry/Laboratory of Excellence MEDALIS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, University of Strasbourg, Strasbourg, France

UPR3572 CNRS, Immunopathologie et Chimie Thérapeutique, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 15 rue René Descartes, Strasbourg 67000, France
e-mail: S.Muller@ibmc-cnrs.unistra.fr

© Springer International Publishing Switzerland 2016
M.C. Maiuri, D. De Stefano (eds.), *Autophagy Networks in Inflammation*,
Progress in Inflammation Research, DOI 10.1007/978-3-319-30079-5_13

267

Abbreviations

3-MA	3-methyladenine
AEP	Asparagine endopeptidase
APC	Antigen-presenting cell
ATG	Autophagy-related protein
BECLIN1/beclin-1	BCL-2 interacting myosin/moesin-like coiled-coil protein 1
CD	Crohn's disease
CLIP	Class-II associated invariant chain peptide
CMA	Chaperone-mediated autophagy
CQ/HCQ	Chloroquine/hydroxychloroquine
DC	Dendritic cell
DN	Double negative
DRAM1	DNA damage-regulated autophagy modulator1
ds	Double-stranded
DSG	Deoxyspergualin
HSP	Heat shock protein
HSPA8/HSC70	Heat shock cognate protein of 70 KDa
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRGM	Immunity-related GTPase M
ITP	Immune thrombocytopenia
KO	Knockout
LAMP-2A	Lysosome-associated membrane protein-2A
LNC	Lymph node cells
LPS	Lipopolysaccharide
MAP1LC3/LC3	Microtubule-associated protein light chain 3
MHC I/II	Major histocompatibility complex class I or MHC class II
MIIIC	Major histocompatibility complex class II compartment
MOA	Mode of action
MRL	Murphy Roths large
MS	Multiple sclerosis
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NZB/W	(NZBxNZW) F1
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
PC	Plasma cell
RA	Rheumatoid arthritis
ROS	Reactive oxygen species
SLE	Systemic lupus erythematosus
SQSTM1/p62	Sequestosome 1
TCR	T cell receptor
Th1/Th2	T helper type 1 and type 2
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
UPS	Ubiquitin-proteasome system.

1 Introduction

Autoimmune diseases are not considered as orphan diseases. In general they are even not regarded as rare since as a whole they affect millions people worldwide. As a result of genetic influence, which is mostly polygenic, or environmental and metabolic factors, there is some disequilibrium regarding their incidence or severity in some parts of the world or in a particular group of people. It remains that in the collective perception, they are viewed as a common group of diseases. It is true that it has been estimated that autoimmune diseases are among the top ten leading causes of death among women in all age groups up to 65 years. In fact, under the term autoimmune diseases, there are more than eighty illnesses caused by autoimmunity. Some of them are rare, either as an entity (e.g. Crohn's disease/CD; primary biliary cirrhosis, myasthenia gravis, immune thrombocytopenic purpura) or by the form they display in affected patients (neuropsychiatric systemic lupus erythematosus, ocular myasthenia gravis, psoriatic arthritis). Also some individuals may have more than one autoimmune disorder at the same time, which complicates the task of follow-up and treatment, and makes each case unique. There is no known prevention for most autoimmune disorders, and in general there is no specific treatment. Despite the complexity and uniqueness of cellular and molecular pathways that are altered in different autoimmune conditions, investigating these mechanisms is very rewarding for scientists. Such studies can effectively reveal new elements and interacting partners of the immune system as well as unexpected abnormalities linked to autoimmune features. These findings can then inspire researchers to design novel strategies of possible intervention developed to mislead and correct the defective immune system.

2 Autoimmune Diseases

Autoimmunity does not systematically leads to autoimmune diseases. In autoimmunity, the patient's immune system is activated against the body's own components and only in certain conditions involving genetic, environmental, and hormonal elements, will the individual develop illness, which is often chronic, debilitating, and life-threatening. A large number of autoimmune diseases are recognized. They are said "organ-specific" when they are restricted to certain organs such as thyroid (e.g. Graves' disease, autoimmune thyroiditis, Hashimoto's disease), pancreas (e.g. type 1 diabetes in which insulin-producing beta cells are destroyed) and muscles (myasthenia gravis) or involve a particular tissue in different places (e.g. Goodpasture's disease, which affects the basement membrane in the lung and kidney). In contrast, they are classified as "systemic" when they implicate a variety of organs and tissues in the whole body. The most emblematic representative of the large family of systemic autoimmune diseases is systemic lupus erythematosus (SLE) in which heart, joints, skin, lungs, blood vessels, liver, kidneys, and nervous system can be affected. In fact, between these two commonly described families,

there is no sharp delineation. Thus scleroderma, also known as systemic sclerosis, which is a chronic systemic autoimmune disease characterized by hardening of the skin, also affects blood vessels, muscles, and internal organs in severe forms. A continuing debate and a matter of controversy remain about when a disease should be considered autoimmune. Within the usually reported list of somewhat 80 autoimmune diseases that are currently described [36], very few in fact do respond to the strict Witebsky's postulates formulated in 1957 and modified 35 years later [126]. The passive transfer of T lymphocytes, which should lead to disease development in the recipient, is generally hardly observed.

According to the American Autoimmune Related Diseases Association, autoimmune diseases affect up to 50 million Americans. The overall cumulative prevalence of all autoimmune diseases is around 5%, with about 3% for males and 7% for females [36]. There is a sexual dimorphism among autoimmune diseases with a well-established disequilibrium toward the female population. This female bias occurs in 59% of autoimmune diseases, probably in relation with hormonal influence and X-chromosome encoded genes. In general the onset for autoimmune diseases occurs in young people (20–29 year age-group).

Deciphering the molecular and cellular mechanisms leading to immune tolerance breaking and evolution toward autoimmune disease remains a vast area of investigations in the scientific and clinical community. Nowadays, no universal signature could be identified, and clues are largely lacking regarding the reasons of their tropism as well as on the elements triggering their initiation and maintenance. Relatively few is also known regarding the events governing the successive periods of flares and remission occurring in certain autoimmune diseases such as SLE. The multifactorial and polymorphic nature of most autoimmune diseases dramatically complicates their diagnosis and the treatment that can be applied to mitigate the symptoms. Except in very rare cases, the treatments are largely palliative and do not target the cause of illness. Although immense progresses have been made over the last decades leading to patients' survival rates that have considerably augmented, innovative therapeutic solutions are still awaiting that would combine efficacy, selectivity -and thus less secondary effects- and reliability. Without adapted treatment, the quality-of-life can be relatively poor in autoimmune patients and decreases as the disease evolves (fatigue, pain, fever associated to specific symptoms). Unfortunately, the medications required to minimize symptoms and slow-down inflammatory syndrome (i.e. corticosteroids, immunosuppressive drugs and tumor necrosis factor (TNF)- α blockers used for long-term periods) induce an alteration of the whole immune system leading to intestinal bleeding, kidney failure, increased blood pressure, insomnia, depression, psychosis, osteoporosis, muscle loss, and diabetes, not to mention overwhelming repetitive infection episodes and cancer development. In certain autoimmune diseases such as those affecting the central nervous system, or in anti-phospholipid syndrome that can be associated to SLE, the therapeutic solutions are limited, not specific, and unfortunately sometimes inefficient [9, 35, 40, 44]. Intense research is currently ongoing to develop novel immunomodulatory strategies based on molecular targets that are engaged in deregulated autoimmune processes and can be specifically re-orientated. In this context,

a better knowledge of cellular and molecular mechanisms that underline autoimmune responses and most particularly the homeostasis and regulation of autoimmune cells is central. Although the picture is immensely complex, studying the autophagic process, which is involved in the establishment and maintenance of immune tolerance and the proper effectiveness of the immune system, has particular importance in autoimmunity and might reveal decisive hot spots for therapeutic intervention.

3 Autophagy and Its Implication in Autoimmune Diseases

Autophagy is a lysosome-based physiological process, which in basal conditions occurs at low levels to continuously degrade unwanted cytoplasmic constituents and generate substrates for energy production. During oxidative stress, hypoxia or nutritional starvation, its level raises to allow cell survival. Autophagy represents therefore a major hub involved in cellular homeostasis [4, 37, 89, 111, 124]. It also plays a pivotal role in differentiation of many lineages, including adipocytes, erythrocytes and lymphocytes, and tissue remodelling [10, 62, 90, 91, 106, 117]. Under specific environmental conditions, however, autophagy can also mediate cell death and it is mechanistically important to distinguish autophagic cell death, which refers to cell death “by” autophagy from cell death “with” autophagy [58, 83, 128, 134]. Thus, recent studies suggest that autophagy and apoptosis processes are closely nested and share cross-talk between signal transduction elements. It has been shown in particular that certain autophagy-related (ATG) proteins play dual roles in autophagy and apoptosis regulation. This is the case of ATG5 and its binding partner ATG12, BCL-2 interacting myosin/moesin-like coiled-coil protein 1 (BECLIN1/beclin-1), the mammalian ortholog of yeast *Atg6*/vacuolar protein sorting (Vps)-30 that acts during the formation of autophagosomes by interacting with the class III PI3K pathway, and microtubule-associated-protein light chain 3 (MAP1LC3/LC3) a mammalian ortholog of yeast *Atg8*, for example [48, 56, 71, 84]. Other forms of cell death are also interconnected with autophagy, such as necrosis, necroptosis (regulated Fas-dependent, caspase-independent non-apoptotic cell death), and pyroptosis (caspase-1-dependent cell death) [128].

Three main types of autophagy have been identified and can be distinguished by both their physiological functions and the mechanisms they use to deliver cytoplasmic cargo to lysosomes (Fig. 1a). They are macroautophagy, microautophagy and chaperone-mediated autophagy or CMA [17, 27, 50, 111]. In fact, many more forms of autophagy have been described. Mention can be made, for example, of aggrephagy (for aggregated proteins), mitophagy (for mitochondria), ribophagy (for ribosomes), pexophagy (for peroxisomes), reticulophagy (for the endoplasmic reticulum, ER), and xenophagy (for pathogens). Thus, we now realize that while originally viewed as a nonselective (random) cytoplasmic degradation system, autophagy actually participates in a highly selective and tightly regulated process of substrate delivery.

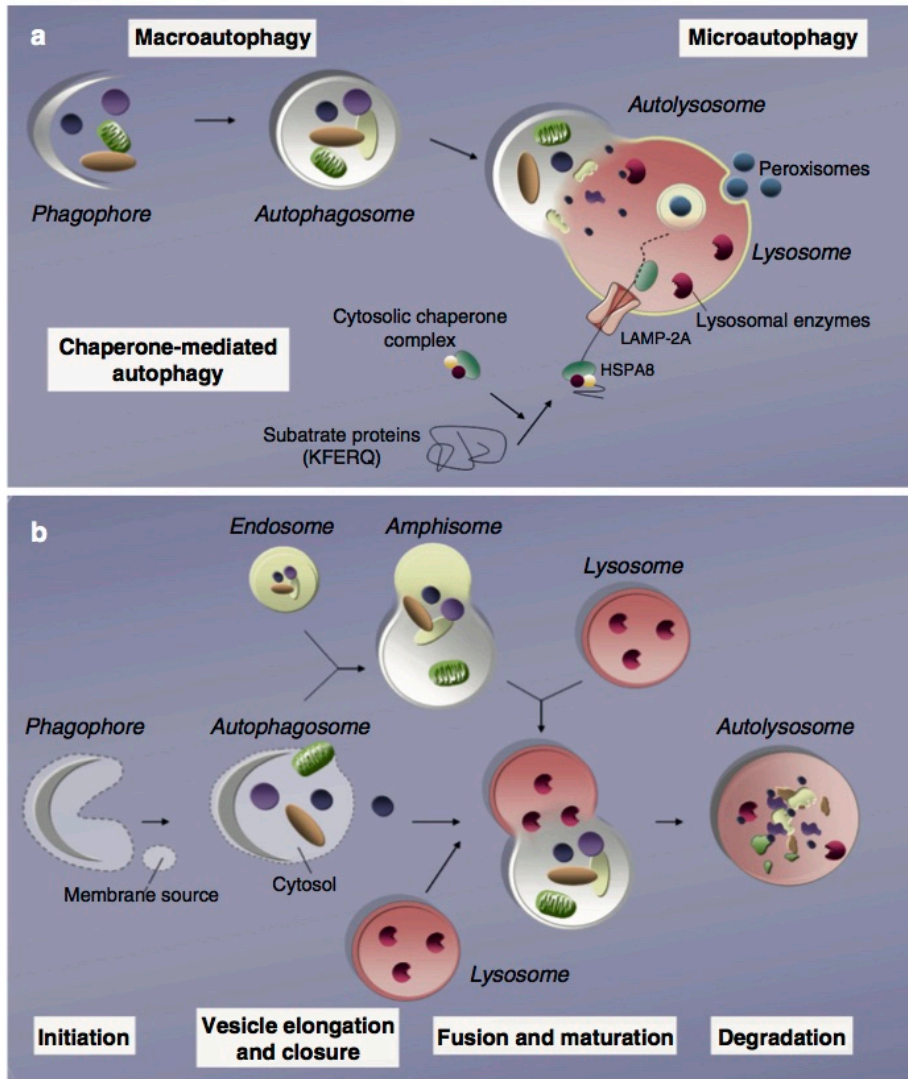


Fig. 1 Schematic depiction of autophagic pathways. (a) The three main autophagy axes, macroautophagy, microautophagy and CMA. The process of macroautophagy is initiated with the formation of the so-called isolation membrane. This structure is elongated to engulf cytosolic materials, forming a characteristic double-membrane structure termed autophagosome. The latter next fuses with a lysosome to become an autolysosome, after which the engulfed material is degraded. The molecular pathways regulating autophagy are highly conserved from yeast to higher eukaryotic cells. In CMA, proteins carrying the pentapeptide KFERQ-like signal sequence are recognized by the HSPA8 chaperone, which then associates to LAMP-2A, triggering its oligomerization. This event permits to the targeted protein to be translocated into the lysosome lumen through a process that requires HSPA8. Microautophagy involves the direct sequestration of cellular components by the lysosome through invagination of the lysosomal membranes; (b) Main steps of the macroautophagic process

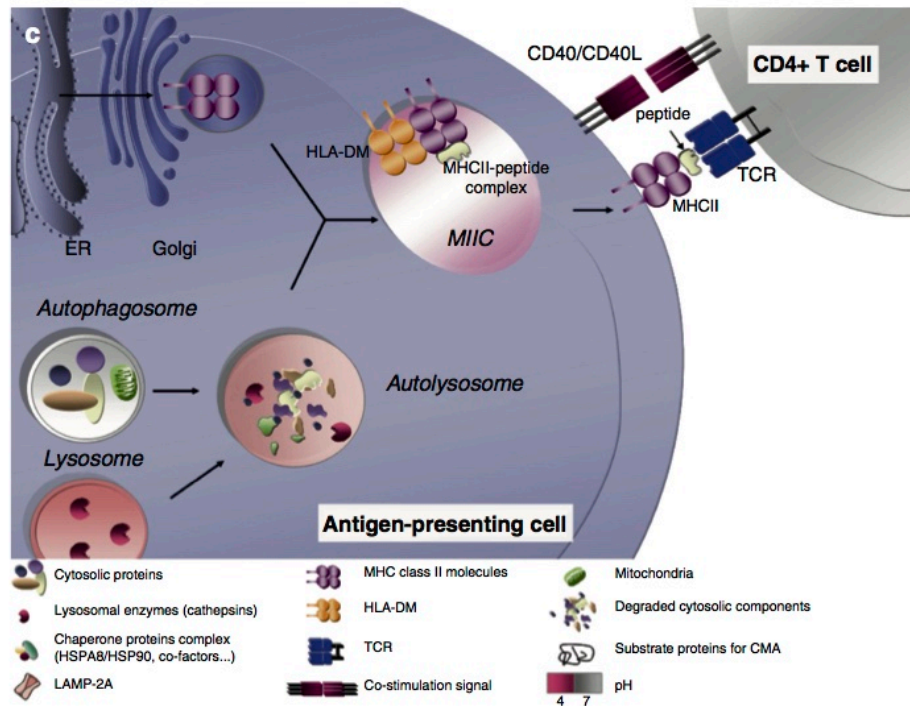


Fig. 1 (continued) (c) Autophagy as the major sources of peptides for presentation by MHCII molecules to T cells. *Abbreviations:* CMA chaperone-mediated autophagy, ER endoplasmic reticulum, HLA human leukocytes antigen, HSPA8/HSC70 heat shock cognate protein of 70 KDa, LAMP-2A lysosome-associated membrane protein-2A, MIIC major histocompatibility complex class II compartment, MHCII major histocompatibility complex class II, TCR T cell receptor

Macroautophagy (commonly referred as “autophagy”, which can in some cases create confusion in the literature) remains the major autophagic process through its ability to massively entrap macromolecules and entire organelles. The latter are captured into double-membrane autophagosomes where they are degraded. It therefore represents an alternative mechanism of proteasomal degradation, which rather treats short-lived intracellular proteins, although a cross-talk that is being increasingly understood, has been described to occur between the ubiquitin-proteasome system (UPS) and macroautophagy [19, 52, 57, 69, 124]. The fusion of autophagosomes with lysosomes leads to the formation of autolysosomes in which engulfed cellular constituents -including lipid droplets and protein aggregates- are degraded by lysosomal glycosidases, proteases, lipases and sulfatases (Fig. 1b). Concerning the CMA process, proteins containing a specific peptide motif biochemically related to KFERQ are recognized by the HSPA8/HSC70 chaperone protein prior being internalized and degraded in lysosomes (Fig. 1a). By contrast, in microautophagy, cytosolic components are directly taken up by invaginations of the lysosomal membrane (Fig. 1a).

Autophagic pathways are genetically regulated by proteins belonging to the ATG gene family and are well characterized in yeast and mammals [14, 55, 61, 94, 110, 135]. ATG proteins are evolutionary conserved and each of them has a specific function during autophagy. It is mainly through the discovery that certain ATG

genes could be associated to autoimmune syndromes that further studies have been generated to understand the links existing between autophagy and autoimmunity. Genetic analyses effectively reported that some polymorphisms in *ATG* genes might confer susceptibility to different autoimmune disorders. Thus genome-wide association studies (GWAS) performed in SLE patients identified several single nucleotide polymorphisms (SNPs) located on *ATG* genes, which have been associated with the disease occurrence [41, 113]. One SNP located in the intergenic region between *ATG5* and *PRDM1* was found to correlate with a greater expression of *ATG5* mRNA [159]. The genetic association between *ATG5* and susceptibility to SLE has been confirmed in individual studies, but not found in others [43]. Interestingly, a recent meta-analysis in Asians showed strong association of SNPs on *DRAM1* with SLE susceptibility [156]. This gene encodes an activator of macroautophagy in response to p53-mediated stress signals. In patients with CD, a GWA study identified rs2241880, mapping to the *ATG16L1* locus, as a susceptibility variant [34]. A statistically significant interaction with respect to CD risk between rs2241880 and the established *CARD15/NOD2* (nucleotide-binding oligomerization domain containing 2) susceptibility variants was shown. Interestingly there was no association between rs2241880 and ulcerative colitis, another closely related inflammatory bowel disease. Recent data showed that *Atg16L1* mutant mice are resistant to intestinal disease induced by the model bacterial pathogen *Citrobacter rodentium* [82]. The hyperimmune phenotype and protective effects developed in these mice were lost in *Atg16L1/Nod2* double-mutant mice, indicating that the susceptibility from *Nod2*-deficiency is dominant over the benefit of *Atg16L1* deficiency. *ATG16L1* is central in the autophagosome formation, being part of the *ATG12-ATG5* complex, which is required for the recruitment of *MAP1LC3* [94]. Removal of *ATG16L1* abrogates the ability of cells to form autophagosomes [130]. More recently it was described that the variant protein that contains a Thr → Ala substitution at position 300 is highly sensitive to cleavage by caspase 3, which is activated during cell stress [105]. Destruction of *ATG16L1*^{T300A} impaired autophagy and increased release of pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β . Several SNPs have been described in association with CD, notably in the so called immunity-related GTPase family M (*IRGM*) gene [30, 77]. The results indicated that autophagy gene-*IRGM* polymorphisms confer susceptibility to CD but not ulcerative colitis, especially in Europeans. *IRGM* is a member of the interferon-inducible GTPase family conferring autophagic defence against intracellular pathogens like *M. Tuberculosis*. *IRGM* controls the latter by enhancing mycobacterial phagosome maturation [137].

Altogether these data argue for a strong impact of autophagy elements in several aspects of immunity, including protection to infectious agents and control of inflammatory and autoimmune responses, as well as in tumorigenesis and cancer. Paradoxically, it is only recently that experimental studies based on cellular and molecular investigation shed some light on the involvement of autophagy in immunity. A number of comprehensive review articles have been recently published on this topic with a particular emphasis on the role of autophagy in infection and inflammation [10, 22, 23, 32, 66, 112, 123, 124]. The present review mainly focuses on autophagy in autoimmunity, in relation with possible manipulation of immune

system by small molecules and peptides in order to divert deleterious immune responses and at least partly restore impaired tolerance to self.

Innate immune responses importantly influence the adaptive immunity in the induction and regulation of autoimmune diseases. In innate immunity, autophagy works at different levels, notably by controlling activation and release of certain cytokines and chemokines [22, 23, 32, 47, 129]. Autophagy would activate the secretion of TNF α , interleukin (IL)-6, IL-8 and type I interferon (IFN) while it controls the production of IL-1 α and β (the latter by regulating inflammasome activation and by targeting pro-IL-1 β for degradation), IL-18 and type I IFN. In turn, some secreted cytokines influence autophagy. Thus, T helper type 1 (Th1) and pro-inflammatory cytokines such as IFN- γ (via IRGM), TNF α , IL-1 α and β , IL-23, reactive oxygen species (ROS) and engagement of some TLRs (mechanisms that are still poorly understood) induce autophagy. TWEAK (the TNF-like weak inducer of apoptosis, in C2C12 myotubes), IL-2 in CD4⁺ T cells, IL-6 in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and TGF- β in hepatocarcinoma cell lines also promote autophagy. Conversely, Th2 and regulatory cytokines such as IL-4, IL-13 and IL-10, via an effect on STAT-3 or -6 pathways and the serine/threonine-protein kinase (AKT) pathway were found to activate mammalian target of rapamycin (mTOR), which inhibits the serine/threonine protein kinase ULK1 and therefore autophagosome formation [33, 47]. Via its effect on cytokine secretion, particularly in antigen-presenting cells (APCs), autophagy represents a pivotal regulator of immune responses [10, 23, 32, 66, 106, 124, 129].

Although not yet recognized to such a level of crucial importance in current text books, autophagy in fact exerts profound effects on different aspects of adaptive immunity. It is a major player in thymic selection of T cells, affecting also T cell homeostasis, repertoire and polarization, survival of B cells, immune tolerance, and antigen presentation.

The discovery that autophagy is a key regulatory element for delivering self-antigens to major histocompatibility complex II (MHCII) molecules has been a critical turning point [21, 116, 158]. At the time of this finding, it was established classically that MHCI molecules presented peptides from intracellular source proteins to T cells while MHCII molecules presented antigenic peptides from exogenous and membrane proteins. The overall picture of T cell activation by MHCII peptide was thus considerably reconsidered and new nexus between immune response and cellular stress, cell metabolism, cell nutrient and cell environment were suggested and analysed further. Incidentally, it is interesting to note that following experiments in which potent macroautophagy inhibitors acting on PI 3-kinase activity, i.e. wortmannin, LY294002 and 3-methyladenine (3-MA) were incubated with macrophage cell line BMC-2 transfected with E α 52-68-eGFP (a peptide fragment issued from transmembrane protein I-E α) and shown to have no effect, it was concluded that macroautophagy was not a mechanism for cytoplasmic expressed proteins to gain access to the luminal peptide binding site of MHCII molecules [20]. At that time conflicting data were published, which could result from the inherent properties of the antigen that was studied, its half-life and intracellular (vesicular or not) trafficking, and the type of APCs [24, 64, 116]. More recent data have shown that in APCs that are less proteo-

lytically active than other cells such as macrophages, cleavage by lysosomal cysteine proteases – generally known as cathepsins – of particles and proteins that finally reach autolysosomes give rise to protein fragments, which will constitute the major source of peptides for MHCII molecules (Fig. 1c). Lysosomes and autolysosomes have a pH of 4–4.5, which is optimum for cathepsins. Thus, and of importance in the context of autoimmunity, MHCII molecules can bind peptides generated from endogenous antigens that are generated by lysosomal proteolysis. Such endogenous antigens can be from membranous, cytoplasmic (including vesicle components) or nuclear origin and can have trafficked into the endo-lysosomal network via several forms of autophagy for subsequent processing and presentation by MHCII molecules to promote CD4⁺ T cells priming [7, 104]. Interestingly, in their pioneer work, Stevanovic, Rammensee and coll. already demonstrated that the induction of autophagy by starvation altered the balance of active proteases in lysosomes [21], which as a matter of consequence, can change the quality of peptides that are loaded onto MHCII molecules. Over the last decade, the role and regulation of specific proteases on the liberation and processing of self-antigens has been studied extensively [148, 150] and it was shown in particular that a distinct set of cathepsins is at work in different APCs, e.g. dendritic cells (DCs) and B cells [8, 81]. There are also multiple mechanisms (including gene up-regulation or down-regulation governed by the environment), that are involved for controlling proteases activity, even in individual endosomes, and strongly affect antigen presentation [21, 148]. Endo-lysosomal proteases are thus key players to generate antigens that *in fine* will be presented to T cells. Via a stepwise process involving asparagine endopeptidase (AEP) also known as legumain, cystatin C, specific cathepsins and other still unspecified proteases, endo-lysosomal proteases act for processing the invariant (Ii) chain linked to MHCII molecule into class-II associated invariant chain peptide (CLIP), thus generating peptide-receptive MHCII molecules in which the CLIP peptide is exchanged for a high affinity peptide by the enzyme HLA-DM (Fig. 1c) prior its transport to the cell surface of APCs for display to CD4⁺ T cells [107]. Endo-lysosomal proteases, including AEP, also act to generate epitopes that will be presented by functional MHCII molecules [15, 86, 148]. In the many examples of antigens that have been examined so far, stability was found to be a determining factor that influences antigen presentation. Furthermore because the cleavage via cathepsins can liberate epitopes but also destroy some others, cathepsins regulation is even more strategic for defining the final panel of antigenic peptides that are delivered.

Finally, another important role of endo-lysosomal proteases in antigen-presentation lies to their influence on TLR-receptor signaling. Initially claimed while observing the effect of chloroquine (CQ) on TLR9 signaling [38, 85], it has been demonstrated later that endo-lysosomal proteases also activate endosomal TLRs 3, 7, and 8 [80] and that the mode of action was not the one proposed in the first studies. In fact, whether for TLR9 or for endosomal TLRs, endo-lysosomal proteases would act by converting the receptor from a non-signaling full-length form to a shorter form deleted from an N-terminal region [26, 118]. Although the precise mechanisms that are behind this effect -notably considering the specific proteases that are involved- are still a continuing matter of debates, it remains that such an effect can be strategic

as TLR-signaling is central for DC maturation that dictates protease activity and consequently influences the quality of peptides that are presented onto MHCII molecules. These data highlight the importance of TLRs in autophagy processes in conjunction with both innate (see above; [153]) and adaptive immunity.

The importance of autophagy in immunity also came from experiments performed with mice or cells that have been manipulated to under-express *Atg* genes. Using this strategy, associated to our growing knowledge of genes that appear defective in some individuals, it has been possible to better approach the potential role of some ATG proteins and establish some links with human diseases [12, 45, 79]. Thus, using mice with a B-cell-specific deletion of *Atg5*, a gene implicated in the elongation of autophagosome membrane, it has been shown that in autophagy-deficient B-cell progenitors the transition from the pro-B to the pre-B cell stage in the bone marrow was defective [87]. Studies of mice in which *Atg5* was conditionally deleted in B lymphocytes revealed further that this gene is essential for plasma cells (PC) homeostasis [16]. Class-switch did occur in these mice but antibody responses were strongly decreased after specific immunisation, parasitic infection and mucosal inflammation. These data and others [119] highlight the importance of ATG5 not only in early B cell development but also in late B cell activation and PC differentiation. Conditional deletion of essential autophagy genes *Atg5* [139], *Atg7* [46, 122], *Atg3* [46] also showed that macroautophagy is critical to the survival of peripheral T cells. Some *Atg* genes are important in infection setting. Thus, using mouse embryonic fibroblasts (MEFs) lacking human *ATG16L1* or murine *Atg7*, *Atg9a*, or *Atg14* [109] showed the importance of ATG16L1, ATG7 and ATG16L1, but not of ATG9A and ATG14, in the IFN- γ -induced recruitment of the immunity-related GTPases to the intracellular pathogen *T. gondii*. A number of examples in different forms of autophagy processes, including macroautophagy, CMA, and mitophagy have been described in which autophagy genes have been deleted or over-expressed, in some cases in specific tissues. Examples are *Pink1/parkin* knockout (KO) mice, the *Atg16L1* mutant and *Atg16L1/Nod2* double-mutant mice described above, *Sqstm1/p62/A170* (encoding SQSTM1 multifunctional protein, also known as signaling adaptor/scaffold protein) mutant mice, conditional deletion models invalidating *Beclin-1* or *Vps34*, to quote just a few. Some mutations affecting binding partners of key elements of autophagy pathways were also introduced. Thus, deletion of the gene encoding lysosome-associated membrane protein-2 (LAMP-2A) in T cells was shown recently to cause deficient in vivo responses to immunization or infection with *L. monocytogenes* [147]. In these mice, CMA in T cells was found to be altered with age. It should be mentioned here that mice invalidated for HSPA8 are not viable, as are *Beclin-1* KO mice that die in utero or *Atg5* KO mice that die within 24 h after birth due at least in part to deficient amino acid production.

At this stage of our thoughts, it seems important to insist on the fact that if investigations with such mutated mice provide decisive information, it remains that in general much more additional observations are needed to establish direct links between autophagy and certain pathologies, since mutations and polymorphisms of the *ATG* (or *Atg* in mice) genes can have many indirect effects as described above. Consistent with these considerations, important caveats have also been warranted

Table 1 List of autoimmune diseases with autophagy failures

Autoimmune diseases	Associated genes	Cellular dysfonctions	References
CD	ATG16L1		[34]
	IRGM		[30, 77]
SLE	ATG5		[41, 159]
	DRAM1		[156]
	PRDM1		[159]
		MaA increased in T cells from MRL/lpr and NZB/W mice and from patients: autophagic vacuoles over-represented (WB, EM) ^a	[31]
		MaA deregulated in naïve CD4 ⁺ T cells from patients : autophagosome-associated marker MAP1LC3 increased (WB)	[1]
		MaA hyper-activated in B cells from NZB/W mice and naïve B cells of patients; autophagosomes number increased (FACS, FM)	[13]
		MaA activated in macrophages from lupus-prone mice and patients : ATG5, ATG12 and BECN1 expression increased	[67]
RA		Increased HSPA8 expression in B and T cells of MRL/lpr mice (WB, FACS, PCR)	[114]
		Increased LAMP-2A and CTSD expression in B cells of MRL/lpr mice; lysosomes are defective in MRL/lpr mice (WB, FACS, Q-PCR, in vitro assay for CMA)	[78]
	ATG5		[113]
	ATG7		[70]
	BECN1		[70]
		MaA activated in osteoclasts from patients : BECN1 and ATG7 expression increased (WB)	[70]
PM		Autophagic process increased in synovial fibroblast : p62 and MAP1LC3 expression increased (WB, FM)	[49]
		MaA activated in muscle fiber : MAP1LC3, CTSD and CTSB expression increased (WB)	[108]
MS	ATG5		[2]
		MaA deregulated in T cells : ATG5 expression increased (WB, PCR)	[2]
Type 1 diabetes		MaA diminished in diabetic mouse heart : MAP1LC3 and ATG5/12 expression reduced (WB, FM)	[151, 154]

Abbreviations : ATG autophagy related-gene, BECN1 beclin-1, CD Crohn's disease CMA chaperone-mediated autophagy, CTSB cathepsins B, CTSD cathepsins D, DRAM1 damage-regulated autophagy modulator, EM electron microscopy, FM fluorescence microscopy, HSPA8 heat shock protein A8, IRGM Immunity-related GTPase family M protein, LAMP-2A lysosomal-associated membrane protein 2A, MaA macroautophagy, MAP1LC3 microtubule-associated protein light chain 3, MS multiple sclerosis, PCR polymerase chain reaction, PM polymyositis, PRDM1 positive regulatory domain I-binding factor 1, RA rheumatoid arthritis, SLE systemic lupus erythematosus, WB Western blot ^aThe method used to evaluate these changes is given in parentheses

regarding the interpretation of data that can be generated using RNA interference-based KO of *Atg* mRNAs in mammalian cell lines [138].

The close relationships between autophagy and immunity reported above easily explain that any deregulation of autophagy machinery can affect various aspects of immune responses and lead to autoimmunity development [32, 72, 121]. Enhanced autophagy, allowing survival of self-reactive lymphocytes, can promote autoimmunity. Moreover, autophagy, which produces autoantigens through intracellular protein digestion can participate in the initiation or maintenance of autoimmunity. In addition to SNPs and susceptibility genes, a number of studies have highlighted that expression of some genes related to autophagic process is modified during autoimmunity. In rheumatoid arthritis (RA), it has been shown that both *ATG7* and *BECLIN-1* gene expression is increased in osteoclasts from patients [70]. *Atg7* expression was found to be increased by pro-inflammatory cytokine TNF- α , a critical element for the pathogenesis through the regulation of synovial inflammation. Other studies have also demonstrated that in autoimmune demyelination syndrome and in multiple sclerosis (MS), *ATG5* gene expression is also significantly elevated compared to healthy controls [2].

Based on genetic evidences, potential links between autophagy and autoimmunity have been suggested for a decade. In general, however, experimental arguments at the cellular and molecular level showing a role of autophagy in the initiation and/or progression of autoimmune diseases are still scarce (Table 1). In SLE patients and two genetically unrelated mouse models of lupus, namely *MRL/lpr* and (NZB \times NZW)F1 (NZB/W) mice, we showed in a seminal report that autophagy is deregulated in T lymphocytes [31]. Autophagic vacuoles were found to be over-represented in T cells indicating that autophagy is hyperactivated. This deregulation was even more obvious when T cells were stimulated by chemical activators of T cell receptor (TCR)-related signalling pathways. The elevated autophagic compartment was not found in all T cells but was restricted to a subset of them. As autophagy is known to be involved in cell survival, these results suggest that autophagy could promote the survival of auto-reactive T cells during the disease. A few months after our results came out, independent studies were published describing some deregulated autophagy features in lupus T and B cells. Alessandri et al. [1] showed an increase of the autophagosome-associated MAP1LC3-II isoform in T cells, which mainly occurred in naïve CD4 T cells isolated from SLE patients. These results, which confirm our own data, suggest that there is an intrinsic deregulation of autophagic activity in SLE T cells. The authors proposed another interpretation in concluding that SLE T cells are resistant to macroautophagy induction and could thus become more prone to apoptosis. They came to this conclusion by re-stimulating T cells with rapamycin or with autologous (pro-autophagic) serum. It is possible, however, that SLE T cells are already at the maximum level of autophagosome loading and that re-exposure to their own serum had no further effect on autophagic activity. In any case, these data confirm the pro-autophagic role of SLE serum on normal T cells. Pierdominici and her colleagues also observed that the increase of autophagy was correlated with disease activity scores, important information that could be exploited in future therapeutic strategies [1, 120, 121].

More recent studies have reinforced and extended the pioneered works described above. Thus, for the first time, Clarke et al. [13] showed in NZB/W mice that

macroautophagy activation also occurs in B cells, and more particularly in early developmental and transitional stages of B cell development (before disease onset). In patients with lupus, autophagy was also activated compared to healthy individuals, and again this activation occurred mainly in naïve B cells. When autophagy inhibitors such as 3-MA, bafilomycin A1 or CQ were used, plasmablast differentiation and survival hardly occurred. These findings must be related to the overproduction of autoantibodies in the serum of lupus prone mice and patients with lupus. In their study, the authors confirmed that in addition to B cells, autophagy was increased in T cells from lupus patients, and that in both cases, this activation could be correlated to disease activity. Li et al. [67] also described convincing results demonstrating that compared to controls, autophagy was significantly activated in the macrophages collected from an induced mouse model of lupus (BALB/c mice that develop a lupus-like disease after administration in Freund's adjuvant of homologous activated lymphocyte-derived DNA) and in the PBMCs of patients with lupus. Adoptive transfer of *Beclin-1* KO macrophages significantly ameliorates the clinical conditions of recipient mice (decrease of proteinuria levels, reduction of typical renal complex deposition, amelioration of glomerulonephritis) as well as the biological features (decrease of serum anti-dsDNA antibody levels and circulating pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α , as measured by ELISA).

A few studies have highlighted the role of autophagy in other autoimmune diseases, notably in human RA [49, 70, 151] and in experimental autoimmune encephalomyelitis, a model of MS [6]. Autophagy appears to be activated in osteoclasts from patients with RA and regulates osteoclasts differentiation [70]. This increased autophagic process, also found in RA synovial fibroblast compared to osteoarthritis synovial fibroblast by Kato et al. [49] correlates with a reduced apoptosis level in RA synovial tissues [152]. It was concluded from these observations that the activation of autophagy induced by overproduced TNF- α leads to the reduction of apoptosis in joints and more importantly causes the survival of synovial fibroblasts, which are responsible for the pathology. This again highlights the dual effect of autophagy, which is cytoprotective when it eliminates misfolded or too abundant cellular components, but in excess, can become deleterious and generate negative effects.

4 Targeting Autophagy for Intervention in Autoimmune Diseases

A number of recent findings underlined the pivotal role of macroautophagy in the control of muscle mass, and misregulation of autophagy has been described in myopathies and muscular dystrophies [131]. Information in relation to possible autophagy process dysfunction is scarce, however, regarding patients with fibromyalgia, for example, or with polymyositis [73, 143], a rare disease with an autoimmune component which is characterized by inflammation and degeneration of the muscles. On the other hand, autophagy defects have been observed (or suspected) in

several autoimmune settings, including CD, SLE, possibly RA and MS (Table 1), as well as in inflammatory syndromes, notably in pulmonary diseases [88]. It is strongly anticipated that in all these situations, modulation of autophagy, in order to re-establish a proper flux regulation in particular, might rescue alterations and improve the clinical status of treated patients.

As underlined recently [32], some molecules used for years to treat inflammatory and autoimmune diseases have been found much later to target one or another type of autophagy processes. Nowadays, in fact, there are very few specific compounds targeting precise steps of autophagy pathways, and even a single pathway in particular [3], and quite surprisingly, the targets of some autophagy regulators that are widely prescribed to patients are not really known. This is the case, in particular, of CQ and hydroxychloroquine (HCQ) or of dexamethasone, which mode of action (MOA) is still being debated (see below).

A number of comprehensive review articles have recently exhaustively covered various aspects, structural and functional, of families of compounds, activators and inhibitors, which have been generated to modulate autophagy directly or indirectly [5, 11, 29, 32, 45, 125, 127, 148, 149]. Evaluated in rigorously calibrated assays performed both *in vitro* and *in vivo* [53, 93], some of these small molecules might prove to be relevant to modulate autoimmune diseases in appropriate settings. In the examples shown in the next section we will limit ourselves to a few pharmacological regulators of autophagy with established or promising clinical efficacy in autoimmune diseases.

Before providing a short description of these selected pharmacological autophagy modulators, several conceptual and practical comments should be made. Firstly, this field of possible intervention is new (or newly rediscovered) and autophagy processes, which are complex and somehow confusing, are not well perceived by decision makers of technology companies and Big Pharmas, of course even less by the general public and informed users. Communication including education towards professionals and patients is certainly much easier when, for example, one describes the activity of a therapeutic antibody specific for a soluble molecule or a surface receptor that is raised in inflammatory and autoimmune conditions. Important efforts of clarification and simplification have thus to be made as it was the cases some decades ago for apoptosis.

Secondly, it is well appreciated for a long time in the field that pharmacological small molecules rarely exert their action on only one single target. This is the case of HCQ and dexamethasone, for example, and many others (see below). These multi-target effects can explain their strong efficacy, but they also complicate the description of the said-molecule and of its safety file.

Thirdly, it is often argued that small molecules (<900–1000 daltons) and short peptides (<20–40 amino acid residues) will be eliminated rapidly from the body and therefore will have a too short period of possible action. This statement regarding pharmacokinetics and pharmacodynamics of molecules may be correct but if it is the case, there are numerous carrier systems or novel devices that increase molecule bioavailability and trafficking leading to improving their efficacy. It should be noted here that conversely, their low molecular mass can be an advantage when the desired

objective is to develop a strategy supposed to target the central nervous system, for example [44].

Fourthly, and most importantly, solubility of small molecules and peptides remains a limiting factor, as it is also the case of antibodies and fusion proteins that are designed and produced for therapeutic purposes. This aspect has to be taken into consideration at the very early stage of molecule selection as in general, it cannot be solved easily in the downstream steps of development.

On the other hand, pharmacological small molecules and peptides display a number of advantageous properties that makes them excellent therapeutics, notably for autoimmune diseases. In addition to their synthesis and production that can be highly optimized, and in some cases remarkably simple in comparison to some biologics, and automatable, small molecules and peptides selected as active components of pharmaceutical compositions are characterized by their stability and robustness, easy handling, the relatively low doses that have to be administered to patients and their cost, which remains reasonable with regard to most biologics. Small molecules and short peptides are not immunogenic per se, another considerable advantage for treating patients with chronic autoimmune diseases [132].

Finally, it must be stressed that, as it is the case for all new therapies that emerge, standardized and universalized animal models of the related human disease have to be developed -if they do not already exist-, a consensus position regarding the most promising modality to be tested has to be established, and formation of a cooperative international network of committed clinical investigators has to be gathered to evaluate these new therapies in a pre-designed rigorous fashion.

5 Existing Pharmacological Regulators of Autophagy

Herein, we briefly describe the characteristics of some chemical molecules that are established pharmacological regulators of autophagy (Fig. 2) and are given to patients with autoimmune diseases. Further details on these and other compounds can be found in recent reviews and articles [5, 11, 29, 32, 125, 127, 140, 146].

CQ and HCQ These two small molecules are lipophilic weak bases that easily pass through the lipid cell membrane and preferentially concentrate in acidic cytoplasmic vesicles. As lysosomotropic agent, they raise intralysosomal pH, leading to defective autophagic protein degradation. CQ/HCQ may also affect peptide degradation within lysosomes due to the pH effect on lysosomal cathepsins and therefore the entire process of antigen presentation by MHC molecules in the MHC compartment leading to activation of autoreactive T cells. HCQ is used for years in the treatment of inflammatory autoimmune diseases, SLE, RA and Sjögren's syndrome. CQ has been shown to reduce the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for MS, and the mechanism of action that was previously known to involve in part regulatory T cells has been recently established in much more details [144]. CQ and HCQ also operate by interacting directly with TLR ligands [59]. Other characteristics of CQ and derivatives, such as radiosensitising and chemosensitising

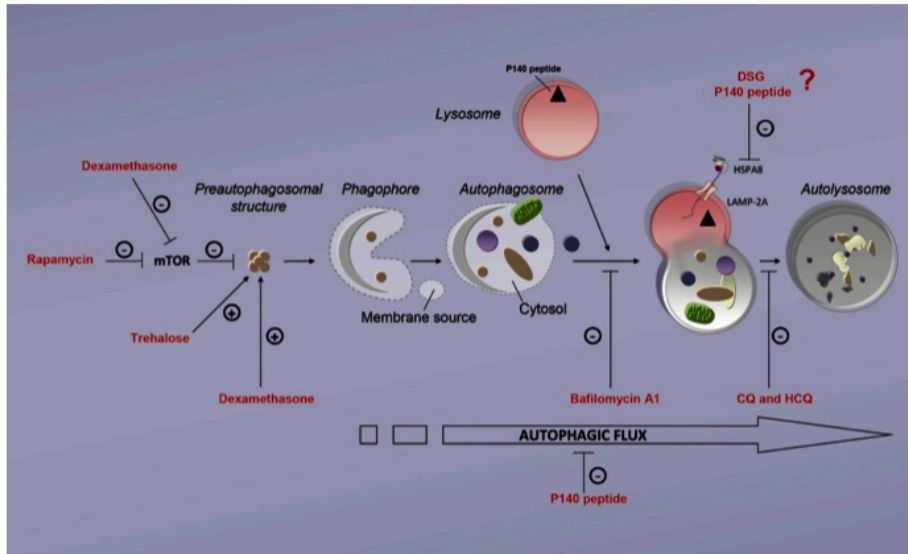


Fig. 2 Pharmacological regulators of autophagy. A diagram illustrating possible sites of intervention of pharmacological autophagy regulators. From the left to the right: rapamycin and dexamethasone inhibit the kinase activity of mTOR, leading to the upregulation of macroautophagy. Dexamethasone is also known as acting on pre-autophagosomal structure. Trehalose, the target of which still remains debated, is an activator of autophagy through an mTOR-independent pathway. Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes. It acts by inhibiting vacuolar H⁺ ATPase. P140 peptide (▲), the uptake into B lymphocytes by clathrin-mediated endocytosis and homing into lysosomes has been demonstrated after administration to mice, and DSG, both interact with HSPA8 in vitro and alter intralysosomal pH. P140 provokes the accumulation of autophagy markers p62/sequestosome 1 and MAP1LC3-II in MRL/lpr B cells, consistent with a down-regulation of autophagic flux. This peptide affects both CMA and macroautophagy. CQ and HCQ are lysosomotropic agents that prevent endosomal acidification. They accumulate inside endosomes and lysosomes, leading to inhibition of lysosomal enzymes, which requires an acidic pH, defective fusion of endosomes and lysosomes and maturation of autolysosomes. *Abbreviations:* CMA chaperone-mediated autophagy, CQ chloroquine, DSG 15-deoxyspergualin, HCQ hydroxychloroquine, HSPA8 heat shock protein 8, LAMP-2A lysosome-associated membrane protein-2A, MAP1LC3 microtubule-associated protein light chain 3, mTOR mammalian target of rapamycin

properties also receive attention in anti-cancer indications [45]. It should be reminded, however, that CQ/HCQ toxicity, in particular in the eye (cornea and macula) and in the occurrence of cardiomyopathies [142], remains a major break. Observed ocular toxicity is related to the total cumulative dose rather than the daily dose; therefore it becomes a serious potential problem in the cases of long-term use. A number of HCQ analogs and mimics have been tentatively designed that keep the molecule activity without secondary effects. Ongoing research should provide such safe molecules in the future.

Bafilomycin A This compound isolated from *Streptomyces* sp. is a member of the plecomacrolide sub-class of macrolide antibiotics. Early studies showed that at a

100 nM-concentration and short incubation time (1 h), in a rat hepatoma H-4-II-E cell line, it specifically acts by inhibiting the vacuolar H⁺ ATPase (V-ATPase) that is essential for acidifying lumen lysosomes and blocks the fusion of autophagosomes with lysosomes [155]. Used at the same or higher concentration and other settings, in the same cell line or other types of cell lines, effects targeted other key steps of the autophagy axes have been observed as summarized and analyzed by Klionsky et al. [54]. This in-depth analysis of published data led these authors to propose that at early time-points, bafilomycin could mainly interfere with the autophagic flux by slowing the degradation of MAP1LC3-II within existing autolysosomes, while at later time-points, its effect on acidification of lysosomes and possibly also of endosomes and amphisomes could impair the fusion of autophagosomes with both late endosomes and lysosomes as shown [42]. Altogether this sequence of events highlights again the fact that the pleiotropic effects of certain molecules, as a function of concentration, treatment time, or environment, have to be taken into account when mechanistic studies are performed, notably with the objective to elaborate therapeutic strategies.

P140 peptide/Lupuzor This 21-mer linear peptide encompassing the sequence 131–151 of the spliceosomal U1-70 K protein and containing a phosphoserine residue at position 140, was found to be safe and significantly ameliorated lupus patients' clinical status when administrated subcutaneously in the presence of mannitol as excipient [102, 103, 160]. All appropriate preclinical studies were done in the widely used MRL/lpr model, a mouse that develops a strong and rapid lupus disease. The capacity of P140 to ameliorate biological and clinical parameters in these mice, and to enhance their survival, was demonstrated in a robust manner [99, 133]. After P140 treatment, an accumulation of autophagy markers SQSTM1 and MAP1LC3 was observed in MRL/lpr B cells, consistent with a down-regulation of autophagic flux [114]. CMA was also recently found to be a target of P140 and it was demonstrated that P140 peptide inhibitory effect on CMA is likely tied to its ability to interact with HSPA8 [115] and to alter the composition of HSPA8 hetero-complexes [78]. Expression of both HSPA8 and the limiting CMA component LAMP-2A, which is increased in MRL/lpr B cells, is down-regulated after treating mice with P140 peptide. It was shown further that P140, but not the non-phosphorylated peptide that is not protective against disease development in mice [99], uses the clathrin-dependent endo-lysosomal pathway to enter into MRL/lpr B lymphocytes and accumulates in the lysosomal lumen where it may directly hamper lysosomal HSPA8 chaperoning functions, and also destabilize LAMP-2A in lysosomes as a result of its effect on HSP90. This dual effect may interfere with the endogenous (auto)antigen processing and loading to MHCII molecules and as a consequence, lead to the lower activation of autoreactive T cells that was previously shown experimentally [100, 101].

Interestingly, earlier work also indicated that *ex vivo*, P140 does not induce proliferation of human peripheral T cells (in contrast to the non-phosphorylated form that does) but generates secretion of high levels of regulatory cytokine IL-10 in cell

cultures [98]. This observation and others generated in our own studies might indicate that beside its effect on autophagy processes, P140 might also act as a so-called 'peptide altered ligand' of the TCR. Our first studies showed that the nominal peptide 131–151 contains an epitope that is effectively recognized by CD4⁺ T cells from MRL/lpr and NZBxW mice [96, 97]. The phosphate moiety introduced at position 140 in the P140 peptide might have no effect on MHC presentation (as experimentally demonstrated) but induce qualitatively different activation of T cells with changes in cytokine production and T cell responsiveness [98, 99]. Altogether, these considerations point out again the multi-target functions of efficient immunomodulator molecules. Thus, in the case of P140 peptide, both specific CD4⁺ T cell clones recognizing the sequence 131–151 of U1-70 K protein and T cell clones with a broader specificity for various self-components generated in autolysosomes and lysosomes and loaded onto MHC class II molecules in the MIIC compartment (Fig. 1c), could be simultaneously involved in the mechanism of peptide action.

15-Deoxyspergualin (DSG) This compound (1-amino-19-guanidino-11-hydroxy-4, 9, 12-triazanona-decane-10, 1–3-dione) is a synthetic analogue of spergualin, a natural product of the bacterium *Bacillus laterosporus*. A long list of more stable analogs have been designed, synthesized and evaluated over years. 15-DSG is a potent immunosuppressant, which showed immunosuppressive activity both in vitro and in vivo, affecting B lymphocytes, T lymphocytes and macrophage/monocyte functions. It was shown to bind to the EEVD domain of HSPA8, a site that is apparently different from the one(s) recognized by P140 peptide [140], with an affinity of approximately 4 μM, and increase its ATPase activity of 20–40%. It also binds to HSP90. 15-DSG blocks the NF-κB pathway and antigen presentation, causing alteration in the activation of immune cells, notably monocytes, DCs and T cells. It also inhibits AKT activation and phosphatidylcholine synthesis [51]. DSG was also shown to suppress the progression of polyclonal B cell activation and lupus nephropathy in lupus-prone MRL/lpr mice. In patients, in a first short clinical trial, two of three patients treated with DSG showed infectious episodes and the trial was interrupted [74]. Later, another phase-I/II study including a total of 21 patients was engaged [75]. After the first DSG injection, one patient was excluded from the study due to renal failure. Five patients dropped out due to adverse events or serious adverse events including fever, leukopenia, oral candidiasis, herpes zoster or pneumonia. Eleven of 20 patients achieved partial (4) or complete responses (7), 8 were judged as treatment failures and 1 patient was not assessable. In the 12 patients who completed all nine cycles, proteinuria was statistically decreased and the Selen-SLEDAI SLE responder score was decreased from 17.6 to 11.7. These data led the authors to conclude that although the number of patients still remained small, the improvement of their clinical status, particularly their proteinuria, was encouraging, supporting further investigations with large cohorts. At this stage, however, and although some promising data were also obtained in patients with anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies-associated vasculitis and cancer conditions, careful studies designed to better characterize toxicity and side-effects generated by DSG will be determining [63].

Dexamethasone This potent immunosuppressive drug is widely used to treat many different inflammatory and autoimmune conditions such as inflammatory bowel diseases (ulcerative colitis and CD), RA, SLE, chronic skin conditions (e.g. dermatitis *herpetiformis*, pemphigus, severe psoriasis and seborrheic dermatitis). It is also given in severe allergic conditions and certain types of cancer. Its MOA is multiple, complex and still a matter of some controversies. It was found in particular that dexamethasone induces the expression of a gene encoding the stress response protein Dig2/RTP801/REDD1 [95], and the elevation of Dig2/RTP801/REDD1, a negative regulator of mTOR signaling pathway, contributes to the induction of macroautophagy. It should be mentioned herein that depending on the dose and the type of cells, the effect of dexamethasone on Dig2/RTP801/REDD1 is not equivalent (less dependence at high dexamethasone dose, for example). Other dexamethasone effects were described. Thus, dexamethasone was shown to increase expression of several autophagy genes, including *ATG5*, *MAP1LC3*, *BECLIN1* and *SQSTM1*, and to trigger 5' AMP-activated protein kinase-dependent mitochondrial fragmentation associated with increased levels of dynamin-1-like protein, a GTPase that regulates mitochondrial fission [145]. Thus, certain steps of the mitophagy axis would be targeted by dexamethasone as well. The anti-inflammatory actions of dexamethasone are also thought to involve phospholipase A₂ inhibitory proteins, lipocortins, which control the biosynthesis of potent mediators of inflammation such as prostaglandins and leukotrienes.

Rapamycine/sirolimus This macrolide antibiotic is a safe and well-tolerated drug clinically used for rejection prophylaxis in renal transplantation. It is also used as immunosuppressant and anti-fungal agent. It forms a complex with the immunophilin FKBP-12 and inhibits the kinase activity of mTOR complex 1 (mTORC1), leading thus to autophagy induction (mTORC2 is largely resistant to rapamycin). It regulates mitochondria transmembrane potential and calcium influx. Its potent effect on the development of nephritis in NZB/W mice was shown [76]. Twelve-week-old female NZB/W mice were treated by oral gavage for 20 weeks with rapamycin (3 mg/kg body weight). Rapamycin treatment markedly reduced proteinuria, improved renal function, decreased serum anti-dsDNA antibody levels and diminished splenomegaly. Rapamycin-treated mice had near normal renal histology, with marked reduction in glomerular immune deposition and the infiltration by T cells, B cells and macrophages. These data were reinforced by recent mechanistic findings published independently [141]. In humans, rapamycin treatment showed some benefit in the treatment of nine SLE patients with refractory disease [28]. In a recent prospective open-label study based on 59 patients and 54 matched healthy subjects (for a total of 274 visits), rapamycin was shown to mainly block IL-4 production and necrosis of double negative (DN) T cells in patients with SLE. In addition, rapamycin was found to enhance FoxP3 expression in CD25⁺/CD4⁺ T cells and expand CD25⁺CD19⁺ B cells, suggesting that mTOR activation can trigger IL-4 production and necrosis of DN T cells in active SLE [60]. Further investigation in large cohorts of patients with lupus and also in patients with other immune-mediated disorders, including type 1 diabetes and RA are awaited for consolidating these data. If we only take into account

the role exerted by rapamycin on the autophagy flux (Fig. 2), and considering that basal autophagy seems to be activated in different subsets of lymphocytes in murine and human lupus (Table 1), rapamycin administration should not be beneficial in lupus. It might even make the illness more severe. This leads us to conclude that rapamycin probably modulates another pathway and not autophagy as main target.

Recently a randomized trial was conducted to investigate the efficacy and safety of rapamycin treatment in adults with chronic immune thrombocytopenia (ITP), an acquired autoimmune disease characterized by an autoantibody-mediated destruction and impaired platelet production [68]. Two groups of 40 patients were examined, the control one that received cyclosporine A plus prednisone and the experimental one that received rapamycin plus prednisone. The overall response was similar in both groups. However, sustained response was more pronounced in the experimental group than in the control group. Both groups showed similar incidence of adverse events (7% vs. 11%). The experimental group experienced a significant rise in CD4⁺CD25⁺CD127^{low} regulatory T cells level, and there was a strong correlation between the levels of regulatory T cells and TGF-β after the treatment. From these data it was concluded that rapamycin plus low dose prednisone could provide a new promising option for therapy of ITP.

6 Future Prospects and Concluding Remarks

The list of components described briefly above is far to be exhaustive. Excellent recent review articles gave much more structural and functional details on many other molecules (small molecules and peptides), some of them that are already administrated as therapeutics and some others that are under evaluation in autoimmune patients or included in preclinical studies in pertinent animal models [25, 39, 136]. The information we summarized herein underlines that most, if not all of the molecules, exhibit complex pleiotropic properties, and can notably influence different autophagy pathways (e.g. mTOR-dependent and -independent) as well as other quality-control mechanisms affecting the cell live/death balance. Several widely used molecules can exert dual (sometimes opposite) effects on upstream and downstream molecular events of the autophagy axes. It should be kept in mind also that the large majority of these molecules have been initially evaluated in cell culture conditions (some are issued from cellular screens) and it has been seen that their MOA largely depends on the selected cell type (immortalized cell lines, primary cells; cancer cells or non-cancer cells), concentration, and time of exposure. As underlined recently [32], these considerations are fundamental to analyze the conclusions that can be raised with most caution.

Nowadays, a number of pharmaceuticals approved in the European Union and USA, and in regular clinical use for alternative indications, inhibit autophagy and may therefore be novel treatments for autoimmune diseases. Chemical drugs acting on autophagy and/or other pivotal cellular pathways are also often evaluated in

association to reinforce their efficacy while lowering dosage to minimize deleterious side effects. Based on our increasing understanding of the physiological autophagy mechanisms and of their dysfunctions in pathological settings [18, 65, 92, 120, 147, 157], we dare believe that molecules that very specifically target key elements of the autophagy process will emerge and, with a minimum of side effects, will efficiently modulate debilitating autoimmune diseases that today affect more than 3 % of the general population worldwide.

Acknowledgments The authors would like to thank Jean-Paul Briand, Frédéric Gros and Jean-Louis Pasquali for useful discussion and a critical reading of the manuscript. Research in the SM's laboratory is financially supported by the French Centre National de la Recherche Scientifique and the Laboratory of Excellence Medalis (ANR-10-LABX-0034), Initiative of Excellence (IdEx), Strasbourg University. MW was supported by a Region Alsace and ImmuPharma-France doctoral fellowship

Conflicts of Interests SM is a consultant of ImmuPharma. MW declares no conflicts of interests

References

1. Alessandri C, Barbati C, Vacirca D et al (2012) T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus are resistant to induction of autophagy. *FASEB J* 26:4722–4732. doi:10.1096/fj.12-206060
2. Alirezaei M, Fox HS, Flynn CT et al (2009) Elevated ATG5 expression in autoimmune demyelination and multiple sclerosis. *Autophagy* 5:152–158. doi:10.4161/auto.5.2.7348
3. Anguiano J, Garner TP, Mahalingam M et al (2013) Chemical modulation of chaperone-mediated autophagy by retinoic acid derivatives. *Nat Chem Biol* 9:374–382. doi:10.1038/nchembio.1230
4. Awan MUF, Deng Y (2014) Role of autophagy and its significance in cellular homeostasis. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:5319–5328. doi:10.1007/s00253-014-5721-8
5. Baek K-H, Park J, Shin I (2012) Autophagy-regulating small molecules and their therapeutic applications. *Chem Soc Rev* 41:3245–3263. doi:10.1039/c2cs15328a
6. Bhattacharya A, Parillon X, Zeng S et al (2014) Deficiency of autophagy in dendritic cells protects against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Biol Chem* 289:26525–26532. doi:10.1074/jbc.M114.575860
7. Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P (2013) Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol* 31:443–473. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095910
8. Burster T, Beck A, Tolosa E et al (2004) Cathepsin G, and not the asparagine-specific endoprotease, controls the processing of myelin basic protein in lysosomes from human B lymphocytes. *J Immunol* 172:5495–5503. doi:10.4049/jimmunol.172.9.5495
9. Carrithers MD (2014) Update on disease-modifying treatments for multiple sclerosis. *Clin Ther*. doi:10.1016/j.clinthera.2014.08.006
10. Cenci S (2014) Autophagy, a new determinant of plasma cell differentiation and antibody responses. *Mol Immunol* 62:289–295. doi:10.1016/j.molimm.2014.02.008
11. Cheong H, Lu C, Lindsten T, Thompson CB (2012) Therapeutic targets in cancer cell metabolism and autophagy. *Nat Biotechnol* 30:671–678. doi:10.1038/nbt.2285
12. Choi AMK, Ryter SW, Levine B (2013) Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med* 368:1845–1846. doi:10.1056/NEJMc1303158

13. Clarke AJ, Ellinghaus U, Cortini A et al (2014) Autophagy is activated in systemic lupus erythematosus and required for plasmablast development. *Ann Rheum Dis*. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204343
14. Codogno P, Mehrpour M, Proikas-Cezanne T (2012) Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:7–12. doi:10.1038/nrm3249
15. Colbert JD, Matthews SP, Miller G, Watts C (2009) Diverse regulatory roles for lysosomal proteases in the immune response. *Eur J Immunol* 39:2955–2965. doi:10.1002/eji.200939650
16. Conway KL, Kuballa P, Khor B et al (2013) ATG5 regulates plasma cell differentiation. *Autophagy* 9:528–537. doi:10.4161/auto.23484
17. Cuervo AM (2004) Autophagy: many paths to the same end. *Mol Cell Biochem* 263:55–72. doi:10.1023/B:MCBI.0000041848.57020.57
18. Cuervo AM, Macian F (2014) Autophagy and the immune function in aging. *Curr Opin Immunol* 29:97–104. doi:10.1016/j.coi.2014.05.006
19. Cuervo AM, Wong E (2014) Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res* 24:92–104. doi:10.1038/cr.2013.153
20. Dani A, Chaudhry A, Mukherjee P et al (2004) The pathway for MHCII-mediated presentation of endogenous proteins involves peptide transport to the endo-lysosomal compartment. *J Cell Sci* 117:4219–4230. doi:10.1242/jcs.01288
21. Dengjel J, Schoor O, Fischer R et al (2005) Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:7922–7927. doi:10.1073/pnas.0501190102
22. Deretic V (2012) Autophagy: an emerging immunological paradigm. *J Immunol* 189:15–20. doi:10.4049/jimmunol.1102108
23. Deretic V, Saitoh T, Akira S (2013) Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 13:722–737. doi:10.1038/nri3532
24. Dörfel D, Appel S, Grünebach F et al (2005) Processing and presentation of HLA class I and II epitopes by dendritic cells after transfection with in vitro-transcribed MUC1 RNA. *Blood* 105:3199–3205. doi:10.1182/blood-2004-09-3556
25. Dowdle WE, Nyfeler B, Nagel J et al (2014) Selective VPS34 inhibitor blocks autophagy and uncovers a role for NCOA4 in ferritin degradation and iron homeostasis in vivo. *Nat Cell Biol* 16:1069–1079. doi:10.1038/ncb3053
26. Ewald SE, Lee BL, Lau L et al (2008) The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature* 456:658–662. doi:10.1038/nature07405
27. Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ (2014) The machinery of macroautophagy. *Cell Res* 24:24–41. doi:10.1038/cr.2013.168
28. Fernandez D, Bonilla E, Mirza N et al (2006) Rapamycin reduces disease activity and normalizes T cell activation-induced calcium fluxing in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 54:2983–2988. doi:10.1002/art.22085
29. Fleming A, Noda T, Yoshimori T, Rubinsztein DC (2011) Chemical modulators of autophagy as biological probes and potential therapeutics. *Nat Chem Biol* 7:9–17. doi:10.1038/nchembio.500
30. Glas J, Seiderer J, Bues S et al (2013) IRGM variants and susceptibility to inflammatory bowel disease in the German population. *PLoS One* 8:e54338. doi:10.1371/journal.pone.0054338
31. Gros F, Arnold J, Page N et al (2012) Macroautophagy is deregulated in murine and human lupus T lymphocytes. *Autophagy* 8:1113–1123. doi:10.4161/auto.20275
32. Gros F, Muller S (2014) Pharmacological regulators of autophagy and their link with modulators of lupus disease. *Br J Pharmacol* 171:4337–4359. doi:10.1111/bph.12792
33. Gutierrez MG, Master SS, Singh SB et al (2004) Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell* 119:753–766. doi:10.1016/j.cell.2004.11.038

34. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P et al (2007) A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* 39:207–211. doi:10.1038/ng1954
35. Hanly JG (2014) Diagnosis and management of neuropsychiatric SLE. *Nat Rev Rheumatol* 10:338–347. doi:10.1038/nrrheum.2014.15
36. Hayter SM, Cook MC (2012) Updated assessment of the prevalence, spectrum and case definition of autoimmune disease. *Autoimmun Rev* 11:754–765. doi:10.1016/j.autrev.2012.02.001
37. He C, Klionsky DJ (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 43:67–93. doi:10.1146/annurev-genet-102808-114910
38. Hong Z, Jiang Z, Liangxi W et al (2004) Chloroquine protects mice from challenge with CpG ODN and LPS by decreasing proinflammatory cytokine release. *Int Immunopharmacol* 4:223–234. doi:10.1016/j.intimp.2003.12.006
39. Huss M, Wieczorek H (2009) Inhibitors of V-ATPases: old and new players. *J Exp Biol* 212:341–346. doi:10.1242/jeb.024067
40. Inglese M, Petracca M (2014) Therapeutic strategies in multiple sclerosis: a focus on neuroprotection and repair and relevance to schizophrenia. *Schizophr Res*. doi:10.1016/j.schres.2014.04.040
41. International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus Genetics (SLEGEM, Harley JB, Alarcón-Riquelme ME et al (2008) Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PXX1, KIAA1542 and other loci. *Nat Genet* 40:204–210. doi:10.1038/ng.81
42. Jahreis L, Menzies FM, Rubinsztein DC (2008) The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic Cph Den* 9:574–587. doi:10.1111/j.1600-0854.2008.00701.x
43. Järvinen TM, Hellquist A, Zucchelli M et al (2012) Replication of GWAS-identified systemic lupus erythematosus susceptibility genes affirms B-cell receptor pathway signalling and strengthens the role of IRF5 in disease susceptibility in a Northern European population. *Rheumatol Oxf Engl* 51:87–92. doi:10.1093/rheumatology/ker263
44. Jeltsch-David H, Muller S (2014) Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus: pathogenesis and biomarkers. *Nat Rev Neurol* 10:579–596. doi:10.1038/nrneurol.2014.148
45. Jiang P, Mizushima N (2014) Autophagy and human diseases. *Cell Res* 24:69–79. doi:10.1038/cr.2013.161
46. Jia W, He Y-W (2011) Temporal regulation of intracellular organelle homeostasis in T lymphocytes by autophagy. *J Immunol* 186:5313–5322. doi:10.4049/jimmunol.1002404
47. Jones SA, Mills KHG, Harris J (2013) Autophagy and inflammatory diseases. *Immunol Cell Biol* 91:250–258. doi:10.1038/icb.2012.82
48. Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D (2011) The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ* 18:571–580. doi:10.1038/cdd.2010.191
49. Kato M, Ospelt C, Gay RE et al (2014) Dual role of autophagy in stress-induced cell death in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheumatol* 66:40–48. doi:10.1002/art.38190
50. Kaushik S, Cuervo AM (2012) Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol* 22:407–417. doi:10.1016/j.tcb.2012.05.006
51. Kawada M, Masuda T, Ishizuka M, Takeuchi T (2002) 15-Deoxyspergualin inhibits Akt kinase activation and phosphatidylcholine synthesis. *J Biol Chem* 277:27765–27771. doi:10.1074/jbc.M200318200
52. Kirkin V, McEwan DG, Novak I, Dikic I (2009) A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol Cell* 34:259–269. doi:10.1016/j.molcel.2009.04.026
53. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H et al (2012) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8:445–544. doi:10.4161/auto.19496
54. Klionsky DJ, Elazar Z, Seglen PO, Rubinsztein DC (2008) Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes? *Autophagy* 4:849–850. doi:10.4161/auto.6845
55. Klionsky DJ, Emr SD (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290:1717–1721. doi:10.1126/science.290.5497.1717

56. Konishi A, Arakawa S, Yue Z, Shimizu S (2012) Involvement of Beclin 1 in engulfment of apoptotic cells. *J Biol Chem* 287:13919–13929. doi:10.1074/jbc.M112.348375
57. Korolchuk VI, Menzies FM, Rubinsztein DC (2010) Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. *FEBS Lett* 584:1393–1398. doi:10.1016/j.febslet.2009.12.047
58. Kroemer G, Levine B (2008) Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:1004–1010. doi:10.1038/nrm2529
59. Kuznik A, Bencina M, Svajger U et al (2011) Mechanism of endosomal TLR inhibition by antimalarial drugs and imidazoquinolines. *J Immunol* 186:4794–4804. doi:10.4049/jimmunol.1000702
60. Lai Z-W, Borsuk R, Shadakshari A et al (2013) Mechanistic target of rapamycin activation triggers IL-4 production and necrotic death of double-negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 191:2236–2246. doi:10.4049/jimmunol.1301005
61. Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA (2013) The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14:759–774. doi:10.1038/nrm3696
62. Lee E, Koo Y, Ng A et al (2014) Autophagy is essential for cardiac morphogenesis during vertebrate development. *Autophagy* 10:572–587. doi:10.4161/auto.27649
63. Lee YH, Lee HS, Choi SJ et al (2011) Efficacy and safety of tacrolimus therapy for lupus nephritis: a systematic review of clinical trials. *Lupus* 20:636–640. doi:10.1177/0961203310389486
64. Leung CS, Haigh TA, Mackay LK et al (2010) Nuclear location of an endogenously expressed antigen, EBNA1, restricts access to macroautophagy and the range of CD4 epitope display. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:2165–2170. doi:10.1073/pnas.0909448107
65. Levine B, Kroemer G (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132:27–42. doi:10.1016/j.cell.2007.12.018
66. Levine B, Mizushima N, Virgin HW (2011) Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 469:323–335. doi:10.1038/nature09782
67. Li B, Yue Y, Dong C et al (2014) Blockade of macrophage autophagy ameliorates activated lymphocyte-derived DNA induced murine lupus possibly via inhibition of proinflammatory cytokine production. *Clin Exp Rheumatol* 32:705–714
68. Li J, Wang Z, Dai L et al (2013) Effects of rapamycin combined with low dose prednisone in patients with chronic immune thrombocytopenia. *Clin Dev Immunol* 2013:548085. doi:10.1155/2013/548085
69. Lilienbaum A (2013) Relationship between the proteasomal system and autophagy. *Int J Biochem Mol Biol* 4:1–26
70. Lin N-Y, Beyer C, Giessl A et al (2013) Autophagy regulates TNF α -mediated joint destruction in experimental arthritis. *Ann Rheum Dis* 72:761–768. doi:10.1136/annrheumdis-2012-201671
71. Li W, Zou W, Yang Y et al (2012) Autophagy genes function sequentially to promote apoptotic cell corpse degradation in the engulfing cell. *J Cell Biol* 197:27–35. doi:10.1083/jcb.201111053
72. Lleo A, Invernizzi P, Selmi C et al (2007) Autophagy: highlighting a novel player in the autoimmunity scenario. *J Autoimmun* 29:61–68. doi:10.1016/j.jaut.2007.06.003
73. Lloyd TE (2010) Novel therapeutic approaches for inclusion body myositis. *Curr Opin Rheumatol* 22:658–664. doi:10.1097/BOR.0b013e32833f0f4a
74. Lorenz H-M, Grunke M, Wendler J et al (2005) Safety of 15-deoxyspergualin in the treatment of glomerulonephritis associated with active systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 64:1517–1519. doi:10.1136/ard.2005.035329
75. Lorenz H-M, Schmitt WH, Tesar V et al (2011) Treatment of active lupus nephritis with the novel immunosuppressant 15-deoxyspergualin: an open-label dose escalation study. *Arthritis Res Ther* 13:R36. doi:10.1186/ar3268
76. Lui SL, Yung S, Tsang R et al (2008) Rapamycin prevents the development of nephritis in lupus-prone NZB/W F1 mice. *Lupus* 17:305–313. doi:10.1177/0961203307088289

77. Lu XC, Tao Y, Wu C et al (2013) Association between variants of the autophagy related gene – IRGM and susceptibility to Crohn’s disease and ulcerative colitis: a meta-analysis. *PLoS One* 8:e80602. doi:10.1371/journal.pone.0080602
78. Macri C, Wang F, Tasset I et al (2015) Modulation of deregulated chaperone-mediated autophagy by a phosphopeptide. *Autophagy* 11:472–486. <http://dx.doi.org/10.1080/15548627.2015.1017179>
79. Majai G, Kiss E, Tarr T et al (2014) Decreased apopto-phagocytic gene expression in the macrophages of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 23:133–145. doi:10.1177/0961203313511557
80. Manoury B (2013) Proteases: essential actors in processing antigens and intracellular toll-like receptors. *Front Immunol*. doi:10.3389/fimmu.2013.00299
81. Manoury B, Mazzeo D, Fugger L et al (2002) Destructive processing by asparagine endopeptidase limits presentation of a dominant T cell epitope in MBP. *Nat Immunol* 3:169–174. doi:10.1038/ni754
82. Marchiando AM, Ramanan D, Ding Y et al (2013) A deficiency in the autophagy gene Atg16L1 enhances resistance to enteric bacterial infection. *Cell Host Microbe*. doi:10.1016/j.chom.2013.07.013
83. Marino G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, Kroemer G (2014) Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:81–94. doi:10.1038/nrm3735
84. Marquez RT, Xu L (2012) Bcl-2:Beclin 1 complex: multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch. *Am J Cancer Res* 2:214–221
85. Matsumoto F, Saitoh S-I, Fukui R et al (2008) Cathepsins are required for Toll-like receptor 9 responses. *Biochem Biophys Res Commun* 367:693–699. doi:10.1016/j.bbrc.2007.12.130
86. Matthews SP, Werber I, Deussing J et al (2010) Distinct protease requirements for antigen presentation in vitro and in vivo. *J Immunol* 184:2423–2431. doi:10.4049/jimmunol.0901486
87. Miller BC, Zhao Z, Stephenson LM et al (2008) The autophagy gene ATG5 plays an essential role in B lymphocyte development. *Autophagy* 4:309–314
88. Mizumura K, Cloonan SM, Haspel JA, Choi AMK (2012) The emerging importance of autophagy in pulmonary diseases. *Chest* 142:1289–1299. doi:10.1378/chest.12-0809
89. Mizushima N (2007) Autophagy: process and function. *Genes Dev* 21:2861–2873. doi:10.1101/gad.1599207
90. Mizushima N, Komatsu M (2011) Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147:728–741. doi:10.1016/j.cell.2011.10.026
91. Mizushima N, Levine B (2010) Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol* 12:823–830. doi:10.1038/ncb0910-823
92. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451:1069–1075. doi:10.1038/nature06639
93. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B (2010) Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 140:313–326. doi:10.1016/j.cell.2010.01.028
94. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y (2011) The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27:107–132. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154005
95. Molitoris JK, McColl KS, Swerdlow S et al (2011) Glucocorticoid elevation of dexamethasone-induced gene 2 (Dig2/RTP801/REDD1) protein mediates autophagy in lymphocytes. *J Biol Chem* 286:30181–30189. doi:10.1074/jbc.M111.245423
96. Monneaux F, Briand JP, Muller S (2000) B and T cell immune response to small nuclear ribonucleoprotein particles in lupus mice: autoreactive CD4(+) T cells recognize a T cell epitope located within the RNP80 motif of the 70 K protein. *Eur J Immunol* 30:2191–2200. doi:10.1002/1521-4141(2000)30:8<2191::AID-IMMU2191>3.0.CO;2-R
97. Monneaux F, Dumortier H, Steiner G et al (2001) Murine models of systemic lupus erythematosus: B and T cell responses to spliceosomal ribonucleoproteins in MRL/Fas(lpr) and (NZB x NZW)F(1) lupus mice. *Int Immunol* 13:1155–1163. doi:10.1093/intimm/13.9.1155
98. Monneaux F, Hoebeke J, Sordet C et al (2005) Selective modulation of CD4+ T cells from lupus patients by a promiscuous, protective peptide analog. *J Immunol* 175:5839–5847. doi:10.4049/jimmunol.175.9.5839

99. Monneaux F, Lozano JM, Patarroyo ME et al (2003) T cell recognition and therapeutic effect of a phosphorylated synthetic peptide of the 70 K snRNP protein administered in MRL/lpr mice. *Eur J Immunol* 33:287–296. doi:10.1002/immu.200310002
100. Monneaux F, Parietti V, Briand J-P, Muller S (2004) Intramolecular T cell spreading in unprimed MRL/lpr mice: importance of the U1-70 k protein sequence 131–151. *Arthritis Rheum* 50:3232–3238. doi:10.1002/art.20510
101. Monneaux F, Parietti V, Briand J-P, Muller S (2007) Importance of spliceosomal RNP1 motif for intermolecular T-B cell spreading and tolerance restoration in lupus. *Arthritis Res Ther* 9:R111. doi:10.1186/ar2317
102. Muller S, Monneaux F, Schall N et al (2008) Spliceosomal peptide P140 for immunotherapy of systemic lupus erythematosus: results of an early phase II clinical trial. *Arthritis Rheum* 58:3873–3883. doi:10.1002/art.24027
103. Muller S, Wallace D (2014) The importance of implementing proper selection of excipients in lupus clinical trials. *Lupus*. doi:10.1177/0961203314525249
104. Münz C (2012) Antigen processing for MHC class II presentation via autophagy. *Front Antigen Present Cell Biol* 3:9. doi:10.3389/fimmu.2012.00009
105. Murthy A, Li Y, Peng I et al (2014) A Crohn's disease variant in Atg16l1 enhances its degradation by caspase 3. *Nature* 506:456–462. doi:10.1038/nature13044
106. Nedjic J, Aichinger M, Emmerich J et al (2008) Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature* 455:396–400. doi:10.1038/nature07208
107. Neeffjes J, Jongsma MLM, Paul P, Bakke O (2011) Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 11:823–836. doi:10.1038/nri3084
108. Nogalska A, D'Agostino C, Terracciano C et al (2010) Impaired autophagy in sporadic inclusion-body myositis and in endoplasmic reticulum stress-provoked cultured human muscle fibers. *Am J Pathol* 177:1377–1387. doi:10.2353/ajpath.2010.100050
109. Ohshima J, Lee Y, Sasai M et al (2014) Role of mouse and human autophagy proteins in IFN- γ -induced cell-autonomous responses against *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 192:3328–3335. doi:10.4049/jimmunol.1302822
110. Ohsumi Y (2014) Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res* 24:9–23. doi:10.1038/cr.2013.169
111. Okamoto K (2014) Organellophagy: eliminating cellular building blocks via selective autophagy. *J Cell Biol* 205:435–445. doi:10.1083/jcb.201402054
112. Oliva L, Cenci S (2014) Autophagy in plasma cell pathophysiology. *Front Immunol* 5:103. doi:10.3389/fimmu.2014.00103
113. Orozco G, Eyre S, Hinks A et al (2011) Study of the common genetic background for rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 70:463–468. doi:10.1136/ard.2010.137174
114. Page N, Gros F, Schall N et al (2011) HSC70 blockade by the therapeutic peptide P140 affects autophagic processes and endogenous MHCII presentation in murine lupus. *Ann Rheum Dis* 70:837–843. doi:10.1136/ard.2010.139832
115. Page N, Schall N, Strub J-M et al (2009) The spliceosomal phosphopeptide P140 controls the lupus disease by interacting with the HSC70 protein and via a mechanism mediated by $\gamma\delta$ T cells. *PLoS One* 4:e5273. doi:10.1371/journal.pone.0005273
116. Paludan C, Schmid D, Landthaler M et al (2005) Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science* 307:593–596. doi:10.1126/science.1104904
117. Pampliega O, Orhon I, Patel B et al (2013) Functional interaction between autophagy and ciliogenesis. *Nature* 502:194–200. doi:10.1038/nature12639
118. Park B, Brinkmann MM, Spooner E et al (2008) Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nat Immunol* 9:1407–1414. doi:10.1038/ni.1669
119. Pengo N, Scolari M, Oliva L et al (2013) Plasma cells require autophagy for sustainable immunoglobulin production. *Nat Immunol* 14:298–305. doi:10.1038/ni.2524

120. Pierdominici M, Barbati C, Vomero M et al (2014) Autophagy as a pathogenic mechanism and drug target in lymphoproliferative disorders. *FASEB J* 28:524–535. doi:10.1096/fj.13-235655
121. Pierdominici M, Vomero M, Barbati C et al (2012) Role of autophagy in immunity and autoimmunity, with a special focus on systemic lupus erythematosus. *FASEB J* 26:1400–1412. doi:10.1096/fj.11-194175
122. Pua HH, Guo J, Komatsu M, He Y-W (2009) Autophagy is essential for mitochondrial clearance in mature T lymphocytes. *J Immunol* 182:4046–4055. doi:10.4049/jimmunol.0801143
123. Puleston DJ, Simon AK (2014) Autophagy in the immune system. *Immunology* 141:1–8. doi:10.1111/imm.12165
124. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE et al (2010) Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 90:1383–1435. doi:10.1152/physrev.00030.2009
125. Renna M, Jimenez-Sanchez M, Sarkar S, Rubinsztein DC (2010) Chemical inducers of autophagy that enhance the clearance of mutant proteins in neurodegenerative diseases. *J Biol Chem* 285:11061–11067. doi:10.1074/jbc.R109.072181
126. Rose NR, Bona C (1993) Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today* 14:426–430. doi:10.1016/0167-5699(93)90244-F
127. Rubinsztein DC, Codogno P, Levine B (2012) Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nat Rev Drug Discov* 11:709–730. doi:10.1038/nrd3802
128. Ryter SW, Mizumura K, Choi AMK (2014) The impact of autophagy on cell death modalities. *Int J Cell Biol* 2014:502676. doi:10.1155/2014/502676
129. Saitoh T, Akira S (2010) Regulation of innate immune responses by autophagy-related proteins. *J Cell Biol* 189:925–935. doi:10.1083/jcb.201002021
130. Saitoh T, Fujita N, Jang MH et al (2008) Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production. *Nature* 456:264–268. doi:10.1038/nature07383
131. Sandri M, Coletto L, Grumati P, Bonaldo P (2013) Misregulation of autophagy and protein degradation systems in myopathies and muscular dystrophies. *J Cell Sci* 126:5325–5333. doi:10.1242/jcs.114041
132. Schall N, Muller S (2015) Resetting the autoreactive immune system with a therapeutic peptide in lupus. *Lupus* 24:412–418. doi: 10.1177/0961203314556138
133. Schall N, Page N, Macri C et al (2012) Peptide-based approaches to treat lupus and other autoimmune diseases. *J Autoimmun* 39:143–153. doi:10.1016/j.jaut.2012.05.016
134. Shen S, Kepp O, Kroemer G (2012) The end of autophagic cell death? *Autophagy* 8:1–3. doi:10.4161/auto.8.1.16618
135. Shibutani ST, Yoshimori T (2014) A current perspective of autophagosome biogenesis. *Cell Res* 24:58–68. doi:10.1038/cr.2013.159
136. Shoji-Kawata S, Sumpter R, Leveno M et al (2013) Identification of a candidate therapeutic autophagy-inducing peptide. *Nature* 494:201–206. doi:10.1038/nature11866
137. Singh SB, Davis AS, Taylor GA, Deretic V (2006) Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* 313:1438–1441. doi:10.1126/science.1129577
138. Staskiewicz L, Thorburn J, Morgan MJ, Thorburn A (2013) Inhibiting autophagy by shRNA knockdown: cautions and recommendations. *Autophagy* 9:1449–1450. doi:10.4161/auto.24895
139. Stephenson LM, Miller BC, Ng A et al (2009) Identification of Atg5-dependent transcriptional changes and increases in mitochondrial mass in Atg5-deficient T lymphocytes. *Autophagy* 5:625–635. doi:10.4161/auto.5.5.8133
140. Stricher F, Macri C, Ruff M, Muller S (2013) HSPA8/HSC70 chaperone protein: structure, function, and chemical targeting. *Autophagy* 9:1937–1954. doi:10.4161/auto.26448
141. Stylianou K, Petrakis I, Mavroedi V et al (2011) The PI3K/Akt/mTOR pathway is activated in murine lupus nephritis and downregulated by rapamycin. *Nephrol Dial Transplant* 26:498–508. doi:10.1093/ndt/gfq496
142. Sumpter MD, Tatro LS, Stoecker WV, Rader RK (2012) Evidence for risk of cardiomyopathy with hydroxychloroquine. *Lupus* 21:1594–1596. doi:10.1177/0961203312462757
143. Temiz P, Wehl CC, Pestronk A (2009) Inflammatory myopathies with mitochondrial pathology and protein aggregates. *J Neurol Sci* 278:25–29. doi:10.1016/j.jns.2008.11.010

144. Thomé R, Issayama LK, DiGangi R et al (2014) Dendritic cells treated with chloroquine modulate experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Cell Biol* 92:124–132. doi:10.1038/icb.2013.73
145. Troncoso R, Paredes F, Parra V et al (2014) Dexamethasone-induced autophagy mediates muscle atrophy through mitochondrial clearance. *Cell Cycle* 13:2281–2295. doi:10.4161/cc.29272
146. Tsvetkov AS, Miller J, Arrasate M et al (2010) A small-molecule scaffold induces autophagy in primary neurons and protects against toxicity in a Huntington disease model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:16982–16987. doi:10.1073/pnas.1004498107
147. Valdor R, Mocholi E, Botbol Y et al (2014) Chaperone-mediated autophagy regulates T cell responses through targeted degradation of negative regulators of T cell activation. *Nat Immunol* 15:1046–1054. doi:10.1038/ni.3003
148. Van Kasteren SI, Overkleeft HS (2014) Endo-lysosomal proteases in antigen presentation. *Curr Opin Chem Biol* 23C:8–15. doi:10.1016/j.cbpa.2014.08.011
149. Vidal RL, Matus S, Bargsted L, Hetz C (2014) Targeting autophagy in neurodegenerative diseases. *Trends Pharmacol Sci*. doi:10.1016/j.tips.2014.09.002
150. Villadangos JA, Bryant RA, Deussing J et al (1999) Proteases involved in MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev* 172:109–120. doi:10.1111/j.1600-065X.1999.tb01360.x
151. Xu K, Xu P, Yao J-F et al (2013) Reduced apoptosis correlates with enhanced autophagy in synovial tissues of rheumatoid arthritis. *Inflamm Res* 62:229–237. doi:10.1007/s00011-012-0572-1
152. Xu X, Kobayashi S, Chen K et al (2013) Diminished autophagy limits cardiac injury in mouse models of type 1 diabetes. *J Biol Chem* 288:18077–18092. doi:10.1074/jbc.M113.474650
153. Xu Y, Jagannath C, Liu X-D et al (2007) Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity* 27:135–144. doi:10.1016/j.immuni.2007.05.022
154. Yamahara K, Yasuda M, Kume S et al (2013) The role of autophagy in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Diabetes Res* 2013:193757. doi:10.1155/2013/193757
155. Yamamoto A, Tagawa Y, Yoshimori T et al (1998) Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct Funct* 23:33–42
156. Yang W, Tang H, Zhang Y et al (2013) Meta-analysis followed by replication identifies loci in or near CDKN1B, TET3, CD80, DRAM1, and ARID5B as associated with systemic lupus erythematosus in Asians. *Am J Hum Genet* 92:41–51. doi:10.1016/j.ajhg.2012.11.018
157. Yang Z, Klionsky DJ (2010) Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol* 12:814–822. doi:10.1038/ncb0910-814
158. Zhou D, Li P, Lin Y et al (2005) Lamp-2a facilitates MHC class II presentation of cytoplasmic antigens. *Immunity* 22:571–581. doi:10.1016/j.immuni.2005.03.009
159. Zhou X, Lu X, Lv J et al (2011) Genetic association of PRDM1-ATG5 intergenic region and autophagy with systemic lupus erythematosus in a Chinese population. *Ann Rheum Dis* 70:1330–1337. doi:10.1136/ard.2010.140111
160. Zimmer R, Scherbarth HR, Rillo OL et al (2013) Lupuzor/P140 peptide in patients with systemic lupus erythematosus: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb clinical trial. *Ann Rheum Dis*. doi:10.1136/annrheumdis-2012-202460

Chapitre 3

Lupus regulator peptide P140 represses B-cell antigen presentation and differentiation

Wilhelm, M., Wang, F., Schall, N., Kleinmann, J.F., Faludi, M., Dombi, E., Diot, A., Buron, N., Borgne-Sanchez, A., Nashi, E.P., Sibia, J., Martin, T., Pasquali, J.P., Schaeffer, E., Poulton, J. and Muller, S.

1.1. Avant propos

Le deuxième objectif de ma thèse, dont j'ai consacré la plus grande partie de mon temps, a consisté à étudier le mécanisme d'action du peptide P140 chez l'homme. Ces travaux sont primordiaux puisque le peptide est actuellement évalué en essai clinique de phase III en Amérique du Nord et en Europe de l'Ouest. Les résultats seront connus au cours de l'année 2017. Si l'essai clinique s'avère concluant, le peptide P140 pourrait alors être mis rapidement sur le marché pour le traitement du LED. Les travaux réalisés chez le modèle murin MRL/*lpr* nous ont permis d'émettre plusieurs hypothèses quant au mécanisme d'action du peptide chez l'homme. Toutefois, comme je l'ai évoqué précédemment, les souris lupiques présentent un syndrome lymphoprolifératif dû à la mutation *lpr* dans le gène Fas qui n'est pas retrouvée chez les patients lupiques qui sont plutôt lymphopéniques. Par conséquent, bien que le mode d'action du peptide P140 ait été élucidé chez la souris, sa validation chez les patients lupiques était requise. Aucune étude antérieure réalisée au laboratoire n'avait mis en évidence le mode d'action du peptide chez l'homme lorsque nous avons débuté ces travaux. Ainsi, les résultats que j'ai obtenus lors de ces 3 années de recherches sont les premiers dans ce contexte et font l'objet d'un article qui est en préparation et qui sera prochainement soumis pour publication.

Pour cette étude j'ai bénéficié de prélèvements de patients atteints de LED et également de patients atteints de sclérodermie grâce à une collaboration étroite de plusieurs médecins des hôpitaux de Strasbourg. J'ai également obtenu des prélèvements d'individus sains provenant de l'établissement Français du sang à Strasbourg.

1.2. Publication n°3

In preparation

Lupus regulator peptide P140 represses B-cell antigen presentation and differentiation

Maud Wilhelm¹, Fengjuan Wang¹, Nicolas Schall¹, Jean-François Kleinmann^{2,3,4}, Michael Faludi⁵, Eszter Dombi⁶, Alan Diot⁶, Nelly Buron⁷, Annie Borgne-Sanchez⁷, Emil Pablo Nashi⁵, Jean Sibilia^{2,3,4}, Thierry Martin^{1,3,4,8}, Jean-Louis Pasquali^{1,3,4,8}, Evelyne Schaeffer¹, Joanna Poulton⁶ and Sylviane Muller^{1,9*}

¹CNRS UPR3572, Immunopathologie et chimie thérapeutique/Laboratory of excellence Medalis, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, France; ²INSERM UMRS1109, Département de rhumatologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Université de Strasbourg, Strasbourg, France; ³UFR Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France; ⁴Centre de Référence National des Maladies Rares Auto-Immunes, Centre Hospitalier Universitaire de Strasbourg, France; ⁵McGill University Health Center Research Institute, Montreal, Canada; ⁶Nuffield Department of Obstetrics and Gynaecology, Women's Centre, Oxford, UK; ⁷Mitologics SAS, Paris, France; ⁸Department of Clinical Immunology, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France; ⁹University of Strasbourg Institute for Advanced Study, Strasbourg, France.

*Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, UPR3572 CNRS, 15 rue René Descartes, 67000 Strasbourg, France. Tel +33 640 40 87 25; S.Muller@ibmc-cnrs.unistra.fr

Key Points

- The therapeutic P140 peptide down-regulates HLA-II overexpression on treated lupus B cells
- P140 prevents autoreactive B-cell-T-cell cooperation and would act as a negative regulator of autoreactive B cells differentiation.

Introduction

Nowadays, pharmacologic treatments of chronic inflammatory diseases and more specifically of autoimmune diseases are largely palliative. Most of them result in non-specific immunosuppression, which can be associated with disruption of innate and induced immunity and significant adverse effects. Among the novel therapeutic strategies that are under development, tools that target specific molecular pathways and cells and modulate the immune system (rather than globally reduce its hyper-activation) to restore normal tolerance mechanisms, are central. Within this class of potent drugs, the phosphopeptide P140 is very promising for treating patients with systemic lupus erythematosus (SLE), a chronic autoimmune disease in which patients can have dangerous reductions in the number of red and white blood cells and platelets, contributing to symptoms of fatigue and serious infections. Some patients can also experience excessive blood clots in the legs, lungs and brain, often associated to anti-phospholipid antibodies. In a multicenter, randomized, placebo-controlled clinical phase IIb study for lupus, P140/Lupuzor™ was found to be safe and met its primary efficacy end points¹, confirming thus the validity of pre-clinical data generated in lupus-prone mice.^{2,3} Lupuzor is currently evaluated in a phase III trial both in the US (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02504645) and in Europe.

Following extensive studies in lupus-prone MRL/lpr mice, we recently discovered that P140 targets autophagy, a finely orchestrated catabolic process involved in the regulation of inflammation and in the biology of immune cells.⁴ P140 acts directly on a particular form of autophagy called chaperone-mediated autophagy (CMA)⁵, which appears to be hyperactivated in MRL/lpr B cells.⁶ Shortly after its intravenous administration into MRL/lpr mice, the P140 peptide is endocytosed in MRL/lpr B cells *via* a clathrin-dependent pathway (CME) and accumulates into lysosomes of these cells acting as antigen-presenting cells (APCs). Supported by both *in vitro* and *in vivo* studies⁷⁻⁹, our current mechanistic view is that once internalized into the B cells lysosomes, which were unexpectedly found to exhibit some intrinsic defects and notably a significantly higher luminal pH in average⁶, P140 compromises CMA, at least in part, by disruption of the lysosomal HSPA8 heterocomplexes containing HSP90AA1. As a result, cellular autoantigen loading to major histocompatibility complex class II (MHCII) molecules in the MIIC compartments of antigen-presenting B cells is probably altered, leading to a weaker priming of autoreactive T cells¹⁰ and a lower signal for help of autoreactive B cells. These downstream events contribute to the decrease of B cell proliferation and differentiation into deleterious autoantibody-secreting plasma cells (ASPCs)⁹ resulting in a remarkable delay of mortality in P140-treated MRL/lpr mice compared to naïve MRL/lpr mice that received saline only^{2,3}.

Here, for the first time, the mechanism of action of P140 was studied in detail in human, using peripheral blood cells (PBMCs) from healthy donors (HD) and patients with SLE, and in some cases, when large numbers of B cells were required, using the Raji human B cell line. PBMCs from patients with systemic sclerosis (SSc), an other autoimmune disease, were included in some experiments. In this study, we demonstrate that P140 down-regulates

human leukocyte antigen (HLA)-II overexpression on lupus B cells and hampers B cells differentiation into ASCs. This mechanism potentially switches off the downstream events leading to pathogenic autoantibodies secretion, thus explaining the highly promising results obtained in P140/Lupuzor™ -based clinical trials.

Materials and Methods

Patients

Patients with SLE and SSc were recruited from the Strasbourg University Hospitals after informed consent was obtained. The characteristics of patients with SLE are listed in Table 1.

Peptides

The P140 (RIHMOVYSKRpSGKPRGYAFIEY), the P140 desTyr151 (RIHMOVYSKRpSGKPRGYAFIE) and ScP140 (YVSRYFGpSAIRHEPKMKIYRG) phosphopeptides as well as the non-phosphorylated nominal peptide 131-151 (RIHMOVYSKRSGKPRGYAFIEY) were synthesized using classical N-[9-fluorenyl]methoxycarbonyl solid-phase chemistry and purified by reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC). Their homogeneity was checked by analytical HPLC, and identity assessed by liquid chromatography-mass spectrometry on a Finnigan LCQ Advantage Max system (Thermo Fischer Scientific). For labeling purposes, peptides were also synthesized with a cysteine residue added at their N terminus. Alexa fluor (AF)488 Cys-P140, Cys-ScP140 and Cys-131-151 peptides were prepared by reacting equimolar amounts of the maleimide derivatives (Thermo Fischer Scientific) and peptides in dimethylformamide. The conjugates were purified by HPLC and lyophilized in the dark.

Antibodies

Antibodies used for flow cytometry were as follows: for studying B and T cells, CD19-PerCP-Cy5.5 (BD, 561295), CD19-APC (BD, 555415), CD4-FITC (BD, 555346), CD4-APC (BD, 555349), CD8-PE (BD, 555367), HLA-DRDPDQ-FITC (BD, 555558), CD86-PE (BD, 555658), CD38-PE-Cy7 (BD, 560677), CD27-APC (BD, 558664), SQSTM1-Alexa647 (MBL, M162-A64), LAMP2A (Abcam, 18528), anti-rabbit Ig-FITC (BD, 554020), HSPA8-PE (Enzo, ADI-SPA-815PE-E); for analyzing dendritic cells (DCs), HLA-DR-FITC (Tü39), DC-SIGN/CD209-PerCP-Cy5.5 (DCN46), CD1a-APC (HI149), CD86-APC (FUN-1) from BD Bioscience, and CD14-PE (MEM-15, ImmunoTools); for studying apoptosis, annexin V-APC (BD, 550475) and propidium iodide (PI; Sigma-Aldrich, P4170). Antibodies used for western blotting experiments were: LC3 (MBL, M1153) and β -actin (Santa Cruz, sc-47778).

Isolation and culture of primary cells

Human PBMCs were isolated on a Ficoll density gradient, and B and T cells were then sorted by a negative selection using specific kits (Miltenyi Biotec). DCs were differentiated from monocytes by 5 days of culture with GM-CSF (50 ng/mL; Schering-Plough) and IL-4 (10

ng/mL; ImmunoTools). About 1×10^6 human DCs were obtained after differentiation of 3×10^6 monocytes. Proper differentiation was characterized by low CD14 and high CD1a and DC-SIGN expression levels. For cell activation, DCs (10^5 cells) in complete medium (200 mL) were plated in a 96-well plate. They were left untreated or treated with P140, the mannoside glycolipid conjugate 2U¹⁰ at the indicated final concentrations, the toll-like receptor (TLR)4 ligand Ultrapure *E.coli* K12 lipopolysaccharide (1 mg/mL) or their combination. After 24 h, cell supernatants were collected and stored at -20°C . Cells were labelled with anti-HLA-DR, DP,DQ-FITC and anti-CD1a-APC, and analysed by flow cytometry. Levels of TNF- α released in the media were measured by ELISA with the corresponding BD OptEIA Set (BD-Pharmingen).

Cell culture of Raji cells

Raji B cells (purchased from ATCC) were cultured in RPMI medium (Gibco) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), HEPES and gentamycin. The medium was changed every 2 to 3 days and cells were split when reaching $2-3 \times 10^6$ viable cells/mL. The experiments were done using a cell density of 1×10^6 Raji B cells/mL.

Flow cytometry analysis of endocytosis pathways

Raji cells or B cells from HDs (buffy coat) were pre-treated with 20 $\mu\text{g/mL}$ Chlorpromazine hydrochloride (CPZ, Sigma-Aldrich), 20 μM Pitstop 2 (Abcam) or 5 mM methyl-beta-cyclodextrin (M β CD, Sigma-Aldrich) for 30 min, followed by exposure to 10 μM AF488-labeled peptide. The experiments were carried out in 2% (v/v) FBS in phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4 and the respective inhibitors were present throughout the experiments. Cells were washed 3 times in PBS after treatment followed by fixation in PBS containing 4% (v/v) paraformaldehyde for 20 min at room temperature. The cellular fluorescence was assessed with a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences). The mean fluorescence intensity was normalized by that of untreated control cells to calculate the percentage of uptake. The toxicity of inhibitors was examined with 2 $\mu\text{g/mL}$ propidium iodide (Sigma-Aldrich). The efficiency and specificity of the inhibitors were assessed with positive controls, namely AF488-human transferrin (Thermo Fisher Scientific), which enters specifically through CME and Bodipy® FL C5-Lactosylceramide complexed to bovine serum albumin (BSA; Thermo Fisher Scientific), which uses caveolin-mediated endocytosis. The choice of respective inhibitor concentrations was dictated by criteria of low toxicity and high inhibition efficiency for the positive controls.

Fluorescence imaging of peptides accumulating into lysosomes

Raji B cells or B cells purified from the buffy coat of healthy donors were exposed to 10 μM AF488-labeled peptides for 2 h in 2% (v/v) FBS in PBS, followed by lysosomal staining with 100 nM LysoTracker Red for 20 min at 37°C . The cells were washed three times in PBS and allowed to attach on Lab-Tek™ chambered coverglass (Thermo Scientific) coated with poly-L-lysine (Sigma-Aldrich), and immediately imaged using a spinning-disc confocal microscope consisting of a CSU confocal spinning disk unit (Yokogawa), an EMCCD Evolve camera (Roper Scientific), mounted on an Axio Observer Z1 microscope (Zeiss). 488 and 561

nm lasers, band pass 500-550 and band pass 598-660 emission filters were used to image the labeled peptides and LysoTracker Red, respectively.

Evaluation of human leukocyte antigen (HLA) expression

Expression of HLA molecules was evaluated 24h post-incubation with peptides, by flow cytometry using an anti-HLA DR/DP/DQ antibody.

Measurement of apoptosis by flow cytometry

Expression of Annexin V and PI was measured by flow cytometry 24h post-incubation with peptides.

Plasma cells differentiation and measurement of secreted Ig levels

Purified B cells from healthy donors were stimulated for 6 days with human IL-21 and antibodies to CD40 and IgM in the presence or not of P140 and ScP140 peptides. Expression of CD19, CD86, CD38 and CD27 was then measured by flow cytometry. Culture supernatant IgM and IgG levels were measured by ELISA.

Evaluation of macroautophagy and CMA levels by western blotting and flow cytometry

MAP1LC3-I to MAP1LC3-II conversion was measured by western blot in T cells stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 50ng/mL, Sigma-Aldrich) and ionomycin (1µg/mL, Sigma-Aldrich). The assays were performed in the presence or not of protease inhibitors pepstatin A and E64D (5µg/mL) to evaluate the autophagic flux. Cell surface expression of HSPA8 and intracellular expression of sequestosome 1 (*SQSTM1/p62*) and lysosome-associated membrane protein 2A (LAMP-2A) was evaluated by flow cytometry in PBMCs from healthy individuals and lupus patients.

Toll-like receptor ligand screening

The screening assay (InvivoGen) was based on recombinant human embryonic kidney (HEK)-293 cells stably expressing functional human TLRs 2, 3, 4, 5, 7, 8 and 9 and a NF-κB-inducible reporter gene as a read-out. Cells incubated with TLR-specific ligands were used as a positive control.

Statistical analysis

Statistical tests were performed using GraphPad Prism version 5.0. Statistical significance was assessed using the Student's t-test. *P* values less than 0.05 were considered significant.

Results

The 21-mer P140 peptide corresponds to the sequence 131-151 of the spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein U1-70K. It contains a phosphoserine residue at position 140, which was added chemically during its synthesis while we undertook our first investigations on its potent protective properties in lupus mice.² It subsequently emerged that this punctual modification corresponded to a natural apoptosis-specific post-translational modification of the protein.¹² P140 alone (in saline or in mannitol) does not generate any antibody response in human and mice.¹³ Its stability (and that of the phosphoryl moiety) has been analyzed at different temperatures and pH in various salt conditions and controlled media.^{6,7} The structure of both phosphorylated and non-phosphorylated sequences in aqueous solution has been determined by ¹H-NMR spectrometry and molecular dynamics calculation.⁷ P140, the sequence of which is remarkably conserved over evolution, is a ligand of HSPA8; it interacts with the N-terminal nucleotide binding domain of the protein.⁶ The first aspect we explored in human setting was to determine if, as in the MRL/lpr lupus-prone context, P140 recognizes HSPA8 and HLA-II molecules at the surface of human B cells and uses CME to enter those cells.

P140 enters human B cells by a clathrin coat-dependent endocytosis process

Using several cell entry inhibitors, which inhibit CME or caveolae-dependent endocytosis and entry marker proteins, we demonstrated that AF488-labeled P140 (but not the AF488-labeled unphosphorylated peptide 131-151 or a truncated AF488-labeled analog of peptide P140) readily enters human Raji B cells by CME (Figure 1, A-C; supplemental Figure 1) and homes to lysosomes (Figure 1D). Similar results were obtained using B cells from healthy donors (supplemental Figure 2). Collectively, our findings reveal the pathway used by the P140 peptide in human cells and show the paramount importance of the phosphorylated moiety in this process.

P140 peptide decreases the levels of overexpressed HLA-II molecules

MHCII molecules are overexpressed in MRL/lpr spleen B cells and we demonstrated earlier⁸ that following daily intraperitoneal injections of P140 into 12-week-old mice this overexpression was significantly diminished. Flow cytometry experiments confirmed that compared to HD B cells, there was a significant increase of HLA-DR/DP/DQ molecules on SLE B cells ($p=0.0056$) but not on SSc B cells (Figure 2A). In a dose-dependent manner, P140, but not the ScP140 control peptide, significantly decreased this overexpression of HLA-II molecules on total CD19⁺ B cells ($p=0.0004$ in the presence of 30 μ M P140; Figure 2B), whether or not they were activated (-9.07% SD 6.07 and -11.13% SD 10.23; Figure 2, C and D). This effect, however, had no influence on the absolute or relative (%) number of activated B cells in the total B cell population (not shown). It was not linked to a possible apoptotic effect of P140 that could have affected B cells (supplemental Figure 3). Of note, this effect of P140 on HLA-DR/DP/DQ expression was found to be remarkably related to the

SLEDAI score of lupus patients (Figure 2E). Higher the SLEDAI score of lupus patients was, stronger was the P140 effect at decreasing expression of DR/DP/DQ on the cell surface of CD19⁺ B cells.

It is also important to point out that *ex vivo*, both in SLE patients and HD, P140 decreases the expression of HLA-II molecules on non-activated B cells (Figures 2C et 3A), while it is not the case in non-activated DCs from HDs (-3.0% SD 17%; Figure 3B). The effect of P140 on DCs, which was not significant, was highly dependent on the blood donor, with responders and non-responders. Indeed, a strong reduction of HLA-II expression is observed in DCs to 4 of 10 HDs.

Effect of P140 on macroautophagy in human setting

Our early pioneering work showed that macroautophagy, the best characterized type of autophagy, is abnormally enhanced in T lymphocytes from lupus mice and patients.¹⁴ These results were confirmed by others^{15,16} and were completed recently in B cells from (NZBxNZW)F1 mice and lupus patients.¹⁷ Macroautophagy was claimed to be required for plasmablast differentiation^{18,19} and survival of memory B cells^{20,21}, indicating a central role of this process in humoral autoimmunity in mice and patients with lupus. Our own studies demonstrated further that CMA is also activated in MRL/lpr B cells and that this feature was associated to alteration of lysosomes, the number and size of which as well as their average pH was increased.⁶ In MRL/lpr mice that received P140 peptide intravenously, most of these alterations were no longer observed. To check whether this scenario could also occur in human setting, a set of experiments were undertaken *ex vivo* with PBMCs from lupus patients.

To determine whether P140 peptide directly or indirectly affects macroautophagy in T and B cells, first we measured the conversion of MAP1LC3-I into the hydrophobic, mostly membrane-associated form MAP1LC3-II. The latter is enriched in the autophagic vacuole fraction but is rapidly degraded by lysosomal proteases when the autophagic flux is intense, hence the presence or not of protease inhibitors in the assays.²² In PMA/iono-stimulated T cell cultures, western blotting showed that MAP1LC3-I to MAP1LC3-II conversion occurred equally well following normal and lupus cell incubation with P140 or ScP140 control peptide (supplemental Figure 4, A-D). This test could not be used for testing patient's B cells due to the insufficient number of B cells in the PBMC fraction. Instead, the expression of SQSTM1, another good marker used to study autophagic activity was studied in B cells. SQSTM1 accumulates when autophagy is impaired and its level is decreased when autophagy is activated.²² Once again, to measure autophagic flux, proteases inhibitors were used to block lysosomal degradation of SQSTM1. Flow cytometry experiments showed that accumulation of SQSTM1 was not different in B and CD4⁺ T cells from healthy and diseased donors (Figure 4, A and B). In good agreement with earlier microscopy data¹⁴, a significant SQSTM1 accumulation was observed here in CD8⁺ T cells, indicating higher autophagic flux, which was however not affected by P140 (Figure 4C).

Effect of P140 on CMA in human setting

The effect of P140 on CMA-associated markers was studied in B and T cells from HD and patients with SLE. Our previous results showed that in the MRL/lpr spleen and lymph nodes the surface and intracellular expression of HSPA8 was increased in different immune cell subsets.⁸ qRT-PCR experiments demonstrated that HSPA8 overexpression measured in the spleen of MRL/lpr mice was correlated with an increased mRNA expression, a phenomenon that was not seen when lymph nodes and thymus materials were studied. In MRL/lpr mice that received P140 intravenously, HSPA8 expression in splenic B cells was decreased by one-third while in parallel expression of inducible HSP70 protein was not affected.⁸ In striking contrast, in human, we found no statistically significant difference of HSPA8 surface expression when B cells or CD4⁺ and CD8⁺ T cells collected from the PBMC fraction of HD, SLE or SSc patients were considered (supplemental Figure 5).

Expression of LAMP-2A, the specific marker for CMA and lysosomes, was also evaluated, and again, flow cytometry experiments showed that LAMP-2A expression was not changed in B cells and CD4⁺ or CD8⁺ T cells from four healthy and two diseased donors, whether cells were or not stimulated by CD3/CD28 antibodies (Figure 5, A-C). No effect of P140 could be noted. These preliminary results were obtained with a limited number of patients. Additional experiments are needed to determine whether there is a deregulation of CMA in SLE patients and to conclude on the possible effect of P140 peptide.

P140 is not an agonist of TLRs

Functional interactions have been described between autophagy and pattern recognition receptors, such as TLRs, NOD-like receptors and RIG-I-like receptors.²³⁻²⁶ Depending on cell environment (e.g. cytokines/chemokines) or on the cell subtype, these interactions with innate immunity receptors can functionally exert activation or down-regulation of the autophagic machinery. Thus, induction of autophagy by signaling through TLRs 2, 3, 4, 5 and 7 have been described.^{27,28} Knowing the key role played in lupus by some TLRs, such as TLR4, TLR7 and TLR9²⁶⁻²⁸, and the relationships that have been recently established between TLRs, autophagy and lupus²⁹, we next asked whether P140 could interact with specific TLRs, particularly with endosomal TLRs 3, 7, 8 and 9. This possibility was tested in using a screening assay based on recombinant HEK-293 cell lines expressing functional human TLRs and an NFκB inducible reporter gene. P140 peptide was unable to activate any of cell lines expressing human TLRs (supplemental Figure 6), leading to the conclusion that in the *in vitro* conditions used, P140 is not a TLR agonist.

To further consolidate these data, we studied the possible effect of P140 on pro-inflammatory cytokine TNF-α produced by DCs collected from HDs. The anti-inflammatory mannoside glycolipid conjugate 2U was used as internal control.¹⁰ The results show that, in contrast to the anti-inflammatory mannoside glycolipid conjugate, P140 does not inhibit LPS-induced production of TNF-α (Supplemental Figure 7), further supporting the view that P140 has no effect on TLR4 signalling.

P140 prevents B cell maturation and differentiation and decreases IgG secretion

We have shown recently⁹ that P140 alters the capacity of MRL/lpr B cell to differentiate *in vitro* into Ig-secreting plasmablasts. To check whether this property of P140 peptide stands out in the case of human B cells, purified B cells from five healthy donors were let to differentiate *in vitro* with anti-CD40 antibodies, anti-IgM antibodies and IL-21³⁰ in the presence or absence of P140 peptide or ScP140 used as control. Differentiation was assessed six days later by flow cytometry by measuring CD19, CD27 and CD38 expression (Figure 6A). In a dose-dependent manner, P140, but not ScP140, decreased the percentage of CD19⁺CD27^{high}CD38^{high} plasmablasts (Figure 6B). This finding was not linked to apoptosis of B cells, which could have happen in 6-days cultures of B cells (not shown). Of note, the activation status of this activated B cells population, as measured by CD86 marker expression, remained unchanged (Figure 6C and D). However, the IgG levels secreted by differentiated B cells in the supernatant of 8-days cultures containing P140 (but not ScP140) was significantly decreased (Figure 6E).

It was unfortunate that this set of experiments could not be performed using B cells from patients with SLE due to the low number of B cells that can be sorted out from the PBMC fraction. More work has therefore to be done to further characterize the effect of P140 on lupus ASPCs.

Discussion

In the current study, which is the first one describing the effect of the therapeutic peptide P140/Lupuzor™ in human cells, we demonstrate that P140 is highly efficient at modulating APC functions of B cells. *Ex vivo*, it reduces the presentation of HLA-II molecules that are overexpressed on B cells from lupus (but not SSc) patients. This P140-dependent decrease of HLA-II overexpression was directly related to the activity of the lupus disease as evaluated by the SLEDAI score. A similar effect was also visualized *ex vivo* on HD B cells but not on non-activated DCs collected from healthy volunteers.

In this study we show that as in MRL/lpr mice, P140 enters in human B cells by a clathrin coat-dependent endocytosis process and homes in lysosomes. Since we were not able, in human SLE B cells, to demonstrate any alteration in macroautophagy or CMA processes in using classical markers of these pathways, we could not raise any mechanistic conclusion regarding the possible effect of P140 on lysosome functioning in human. However, using a combination of factors (anti-CD40 and anti-IgM antibodies in the presence of IL-21) to mimic T cell-driven B cell activation, expansion and differentiation of normal B cells, we demonstrated that P140 down-regulated maturation and differentiation of B cells into plasmablasts and decreased IgG secretion by ASCs. Of important note, cells remaining after P140 treatment were fully active. Nowadays, similar experiments with lupus B cells could not be engaged due to the low number of these cells in the peripheral blood of patients. If some blood samples could become available, it would be interesting in this context to examine the capacity of P140 to interfere with activation, expansion and differentiation of lupus B cells, with a particular emphasis on certain B cell subsets that are abnormally represented in patients with SLE, such as IgD⁻CD27⁺ post-switched memory B cells³¹ and another class of memory B cells that are IgD⁻CD27⁻.³² The elevated frequency of the latter in the peripheral blood of patients with SLE has been reported to correlate with disease activity, especially with renal disease, and the occurrence of autoantibodies such as anti-native DNA, anti-Smith/ribonucleoprotein antibodies.^{32,33}

Only few cellular studies have been performed on autophagy alteration in lymphocytes from lupus patients. They are nonetheless converging towards the conclusion that macroautophagy is altered in T and B cells.^{14,15,17,21} In the present study, we found no defect altering macroautophagy in following MAPLC3-I/II conversion (in western blotting) and SQSTM1 (by flow cytometry) in these cell subtypes. The only significant difference was found in CD8⁺T cells where the autophagic flux was increased in SLE patients compared to HD. This increase of autophagic activity was not rescued after P140 *ex vivo* treatment. Future experiments with additional blood samples will tell us if these discrepancies with the existing literature reveal individual patients-related variations (due to their treatment or the stage, acute or quiescent, of the disease) or to a mechanistic feature, for example with regard to cell subsets (including effector, memory, regulatory T and B cells), their level of activation (or anergy³⁴) and stress, or their eventual lysosomal defects. To our knowledges, CMA that was shown to be enhanced in lupus mice⁶, was not examined in lupus patients. In the present

studies, no change could be highlighted by following LAMP2A CMA marker expression by flow cytometry. At this stage, the lack of large numbers of patient's cells limit certain investigations and consequently an important question remains regarding the fine mechanism through which HLA-II molecules are destabilized and repress antigen presentation to T cells. Future experiments will precisely point this yet unsolved aspects, particularly when samples from lupus patients included in the ongoing phase-III, placebo control, multicenter clinical trial will be available (before and after treatment) for our authorized ancillary study.

Overall, our findings provide evidence that P140 peptide downregulates B cell maturation and differentiation owing to T cell activation defect. This lack of T cell activation after P140 treatment likely occurs due to a destabilization or a defect of presentation of HLA-II molecules in B cell APCs, a feature that seems specific to B cells but not to other professional APCs like DCs.

References

1. Zimmer R, Scherbarth HR, Rillo OL, Gomez-Reino J, Muller S. (2013) Lupuzor/P140 peptide in patients with systemic lupus erythematosus: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb clinical trial. *Ann Rheum Dis* 72:1830-1835.
2. Monneaux F, Lozano JM, Patarroyo ME, Briand JP, Muller S. (2003) T cell recognition and therapeutic effects of a phosphorylated synthetic peptide of the 70K snRNP protein administered in MRL/lpr lupus mice. *Eur J Immunol* 33:287-296.
3. Schall N, Page N, Macri M, Chaloin O, Briand JP, Muller S. (2012) Peptide-based approaches to treat lupus and other autoimmune diseases. *J Autoimmunity* 39:143-153.
4. Shibutani ST, Saitoh T, Nowag H, Münz C, Yoshimori T. (2015) Autophagy and autophagy-related proteins in the immune system. *Nat Immunol.* 16:1014-1024.
5. Kaushik S, Cuervo AM. (2012) Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol.*22:407-417.
6. Macri C, Wang F, Tasset I, Schall N, Page N, Briand JP, Cuervo AM, Muller S. (2015) Modulation of deregulated chaperone-mediated autophagy by a phosphopeptide. *Autophagy*11:472-486.
7. Page N, Schall N, Strub JM, Quinternet M, Chaloin O, Décossas M, Cung MT, Van Dorsselaer A, Briand JP, Muller S. 2009. The spliceosomal phosphopeptide P140 controls the lupus disease by interacting with the HSC70 protein and *via* a mechanism mediated by gd T cells. *PLoS ONE* 4: e5273.
8. Page N, Gros F, Schall N, Décossas M, Bagnard D, Briand JP, Muller S. (2011) HSC70 blockade by the therapeutic peptide P140 affects autophagic processes and endogenous MHCII presentation in murine lupus. *Ann Rheum Dis* 70:837-843.
9. Schall N, Wilhelm M, Dali H, Jouvin-Marche E, Muller S. Down-regulation of excessive chaperone-mediated autophagy by a small peptide normalizes the immune responses in lupus (submitted)
10. Flacher V, Neuberger P, Point F, Daubeuf F, Muller Q, Sigwalt D, Fauny JD, Remy JS, Frossard N, Wagner A, Mueller CG, Schaeffer E. 2015. Mannoside glycolipid conjugates display anti-inflammatory activity by inhibition of Toll-like receptor-4 mediated cell activation. *ACS Chem Biol* 10:2697-2705.
11. Monneaux F, Parietti V, Briand JP, Muller S. (2007). Importance of spliceosomal RNP1 motif for intermolecular T-B cell spreading and tolerance restoration in lupus. *Arthritis Res Ther* 9:R111.
12. Dieker J, Cisterna B, Monneaux F, Décossas M, van der Vlag J, Biggiogera M, Muller S. (2008) Apoptosis changes the phosphorylation status and subcellular localization of the spliceosomal autoantigen U1-70K. *Cell Death Diff.* 15:793-804.
13. Schall, N., Muller, S. (2015) Resetting the autoreactive immune system with a therapeutic peptide in lupus. *Lupus* 24:412-418.
14. Gros F, Arnold J, Page N, Décossas M, Korganow AS, Martin T, Muller S (2012) Macroautophagy is deregulated in murine and human lupus T lymphocytes. *Autophagy* 8:1113-1123.
15. Alessandri C, Barbati C, Vacirca D, Piscopo P, Confaloni A, Sanchez M, Maselli A, Colasanti T, Conti F, Truglia S, Perl A, Valesini G, Malorni W, Ortona E, Pierdominici M. (2012) T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus are resistant to induction of autophagy. *FASEB J.* 26:4722-4732.

16. Pan Q, Gao C, Chen Y, Feng Y, Liu WJ, Liu HF. 2015 Update on the role of autophagy in systemic lupus erythematosus: A novel therapeutic target. *Biomed Pharmacother.* 71:190-193
17. Clarke AJ, Ellinghaus U, Cortini A, Stranks A, Simon AK, Botto M, Vyse TJ. 2015 Autophagy is activated in systemic lupus erythematosus and required for plasmablast development. *Ann Rheum Dis.* 74:912-920.
18. Pengo N, Scolari M, Oliva L, Milan E, Mainoldi F, Raimondi A, Fagioli C, Merlini A, Mariani E, Pasqualetto E, Orfanelli U, Ponzoni M, Sitia R, Casola S, Cenci S. (2013) Plasma cells require autophagy for sustainable immunoglobulin production. *Nat Immunol* 14:298-305.
19. Conway KL, Kuballa P, Khor B, Zhang M, Shi HN, Virgin HW, Xavier RJ (2013) ATG5 regulates plasma cell differentiation. *Autophagy* 9:528-537.
20. Chen M, Kodali S, Jang A, Kuai L, Wang J. 2015 Requirement for autophagy in the long-term persistence but not initial formation of memory B cells. *J Immunol* 194:2607-2615
21. Arnold J, Murera D, Arbogast F, Fauny, JD, Muller S, Gros F (2016) Autophagy is dispensable for B cell development but essential for humoral autoimmune responses. *Cell Death Diff.* 23:853-864.
22. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, Adachi H, Adams CM, Adams PD, Adeli K, et al. (2016) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*, 12:1-222.
23. Deretic V. 2012. Autophagy as an innate immunity paradigm: expanding the scope and repertoire of pattern recognition receptors. *Curr Opin Immunol.* 24:21-31.
24. Xu Y, Jagannath C, Liu XD, Sharafkhaneh A, Kolodziejaska KE, Eissa NT. 2007. Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity* 27:135-44.
25. Delgado MA, Elmaoued RA, Davis AS, Kyei G, Deretic V. 2008. Toll-like receptors control autophagy. *EMBO J.* 27:1110-21.
26. Liu B, Yang Y, Dai J, Medzhitov R, Freudenberg MA, Zhang PL, Li Z. 2006. TLR4 up-regulation at protein or gene level is pathogenic for lupus-like autoimmune disease. *J Immunology* 177:6880-6888.
27. Marshak-Rothstein A. 2006. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol.* 6:823-835
28. Lartigue A, Colliou N, Calbo S, François A, Jacquot S, Arnoult C, Tron F, Gilbert D, Musette P. 2009 Critical role of TLR2 and TLR4 in autoantibody production and glomerulonephritis in lpr mutation-induced mouse lupus. *J Immunology* 183:6207-6216.
29. Weindel CG, Richey LJ, Bolland S, Mehta AJ, Kearney JF, Huber BT. 2015. B cell autophagy mediates TLR7-dependent autoimmunity and inflammation. *Autophagy* 11:1010-1024.
30. Kuchen S, Robbins R, Sims GP, Sheng C, Phillips TM, Lipsky PE, Ettinger R. 2007. Essential role of IL-21 in B cell activation, expansion, and plasma cell generation during CD4+ T cell-B cell collaboration. *J Immunol.* 179:5886-5896.
31. Odendahl M, Jacobi A, Hansen A, Feist E, Hiepe F, Burmester GR, Lipsky PE, Radbruch A, Dörner T. 2000. Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 165:5970-5979.
32. Jacobi AM, Odendahl M, Reiter K, Bruns A, Burmester GR, Radbruch A, Valet G, Lipsky PE, Dörner T. 2003. Correlation between circulating CD27^{high} plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 48:1332-1342.

33. Wei C, Anolik J, Cappione A, Zheng B, Pugh-Bernard A, Brooks J, Lee EH, Milner EC, Sanz I. 2007. A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 178:6624-6633.
34. Tretter T, Venigalla RK, Eckstein V, Saffrich R, Sertel S, Ho AD, Lorenz HM. 2008. Induction of CD4+ T-cell anergy and apoptosis by activated human B cells. *Blood.* 112:4555-4564.

Legends to Figures

Figure 1. P140 enters Raji human B cells via a clathrin-mediated endo-lysosomal pathway. (A-C) Quantification of cellular uptake of AF488-labeled peptides P140 (A), 131-151 (B) and P140desTyr151 (C) by flow cytometry in Raji cells with or without the pre-treatment of various endocytosis inhibitors, namely chlorpromazine (CPZ) or Pitstop 2 for clathrin-mediated endocytosis and methyl- β -cyclodextrin (M β CD) for caveolin-mediated endocytosis. The mean fluorescence intensity was normalized to that of untreated control cells (Ctrl) to calculate the percentage of uptake (uptake %), and the values are given as means \pm SD of triplicates from three independent experiments. The statistics were carried out with Student's *t*-test. (D) Raji cells were exposed to 10 μ M AF488-labeled peptides P140, 131-151 or ScP140 for 2h, followed by lysosomal staining with LysoTracker Red. Cells were washed and immediately imaged with a spinning disk microscope. Representative images of 2-3 independent experiments are shown.

Figure 2. HLA-II expression in B cells of patients with SLE and effect of the P140 peptide. (A) Comparison of HLA-II expression in total B cells from healthy donors (n=10), SLE patients (n=13) and SSc patients (n=8). (B-D) Expression of HLA-DR/DP/DQ was measured by flow cytometry in total B cells (CD19⁺ cells; B), non-activated B cells (CD19⁺ CD86⁻ cells; C) and activated B cells (CD19⁺ CD86⁺ cells; D). HLA-DR/DP/DQ expression in cells treated with increasing concentrations of either P140 or scP140 was normalized to that of untreated cells. At 30 μ M P140, the relative decrease of HLA-II expression was -9.07% (SD 6.07) and -11.13% (SD 10.23) on non-activated (C) and activated (D) B cells, respectively. (E) Correlation between the decreased HLA-DR/DP/DQ expression (in %) and the SLEDAI score of patients (effect measured at 30 μ M P140). Patients with a negative score were excluded from this analysis. *P* values are indicated (unpaired *t* test).

Figure 3. HLA-II expression in B cells and DCs of healthy donors and effect of the P140 peptide. (A,B) Expression of HLA-DR/DP/DQ measured by flow cytometry in non-activated CD19⁺ CD86⁻ B cells (A; n=6 HDs tested in independent experiments) or DCs (B; n=10 HDs tested in independent experiments). HLA-II expression in cells treated with increasing concentrations of either P140 or scP140 was normalized to that of untreated cells. *P* values are indicated (unpaired *t* test).

Figure 4. Expression of SQSTM1/p62 in B and T cells from HDs and patients with SLE. Autophagic activity was measured by flow cytometry using intracellular staining of SQSTM1/p62 in purified PBMC of SLE patients and HDs. To demonstrate accumulation of autophagic substrate SQSTM1, PBMC were incubated in complete RPMI containing 10 μ g/mL E64D and pepstatin A. Inhibitors were added 4h before the end of the cultures. Autophagic flux was compared between HDs and SLE patients and the effect of P140 was measured in B cells (A), CD4⁺ T cells (B) and CD8⁺ T cells (C). *P* values are indicated (Mann-Whitney *t* test).

Figure 5. Expression of LAMP-2A in B and T cells from HDs and patients with SLE. LAMP-2A expression, as measured by intracellular flow cytometry in purified PBMC of SLE patients (n=2) and HDs (n=4) was compared and the effect of P140 was measured in B cells (A), CD4⁺ T cells (B) and CD8⁺ T cells (C), which were activated or not *in vitro* by anti-CD3/anti-CD28 antibodies.

Figure 6. P140 peptide decreases the ability of human B cells to differentiate. Purified B cells from five HDs were let to differentiate *in vitro* in the presence of anti-CD40/anti-IgM antibodies and IL-21 and with or without (w/o) increasing concentrations of P140 peptide. ScP140 was used as a control. Differentiation was assessed six days later by flow cytometry by evaluating CD19, CD27 and CD38 marker expression. We verified that apoptosis did not occur until at least 6 days after adding P140 or ScP140 in the cultures. *P* values are indicated (Mann-Whitney t test). (A) dot-plot of each condition (representative of 5 independent experiments). (B) Reduction percentages of plasmablasts as a function of P140 concentration. (C) Activation status of B cells evaluated by measuring CD86 expression at the beginning and the end of the culture. (D) Effect of the P140 on CD86 expression after 6 days of stimulation. (E) The percentage of inhibition of IgG secretion is shown as a function of P140 concentration. The secretion of IgG was measured by ELISA after 8 days of culture.

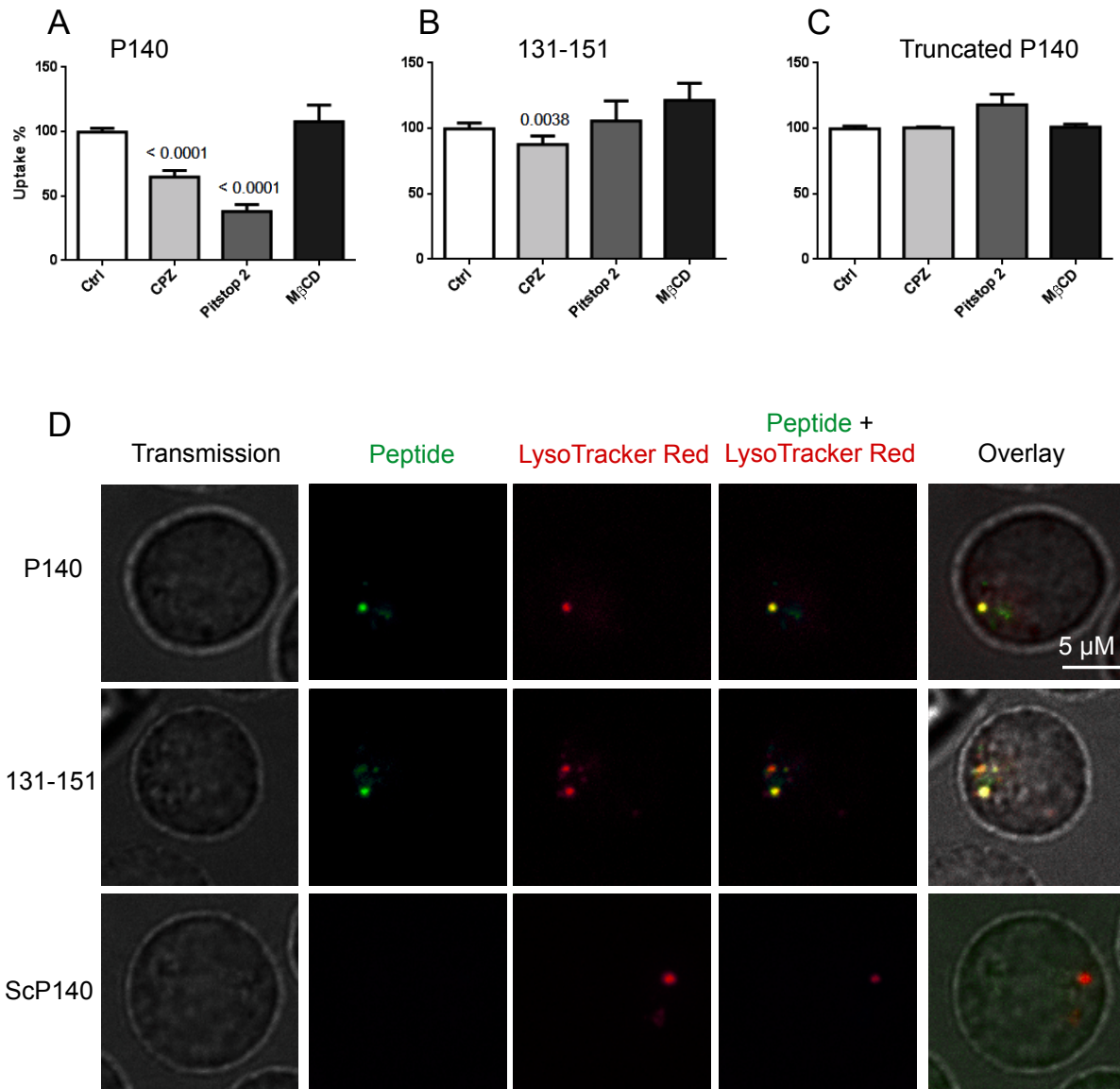


Figure 1

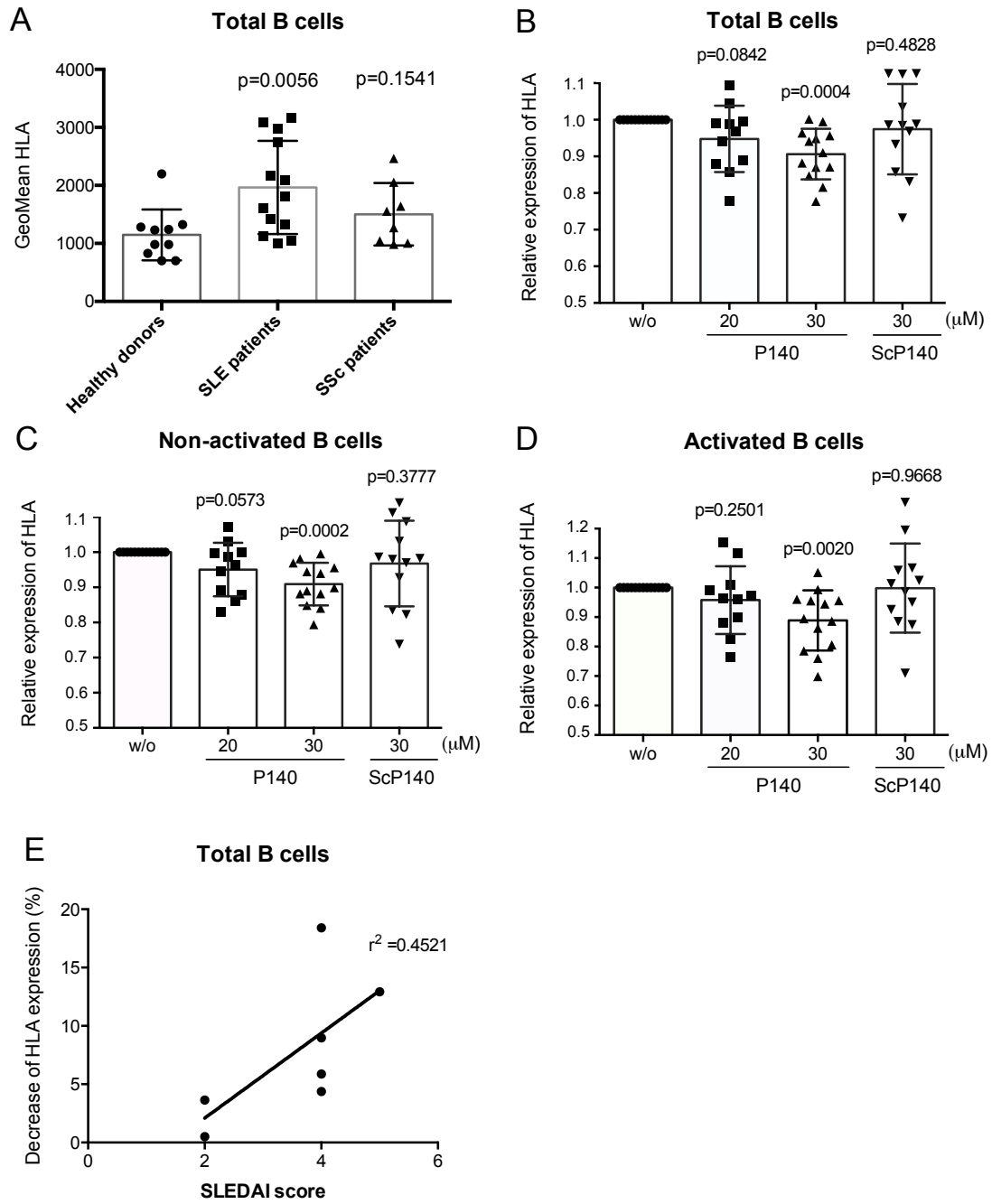


Figure 2

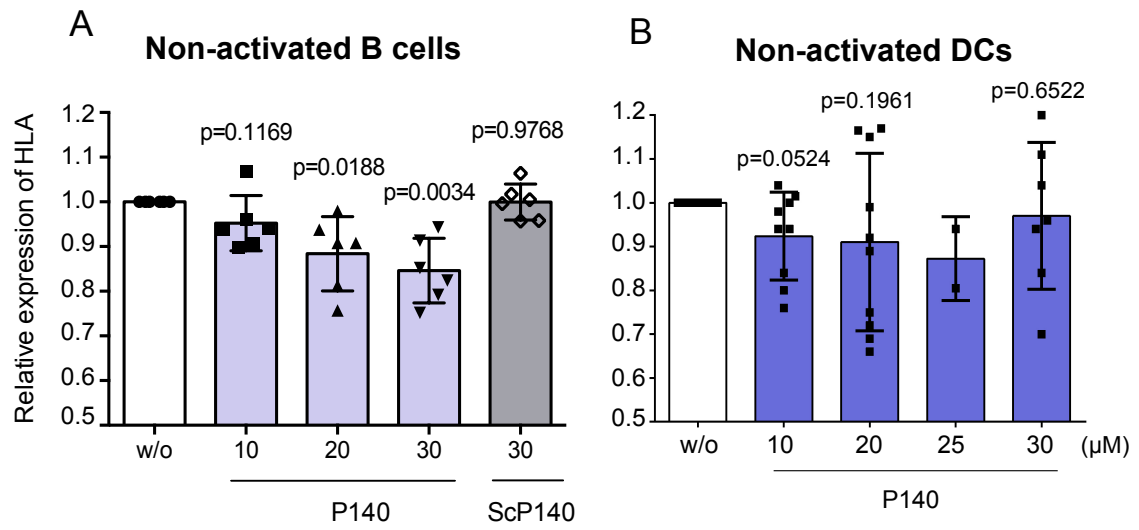


Figure 3

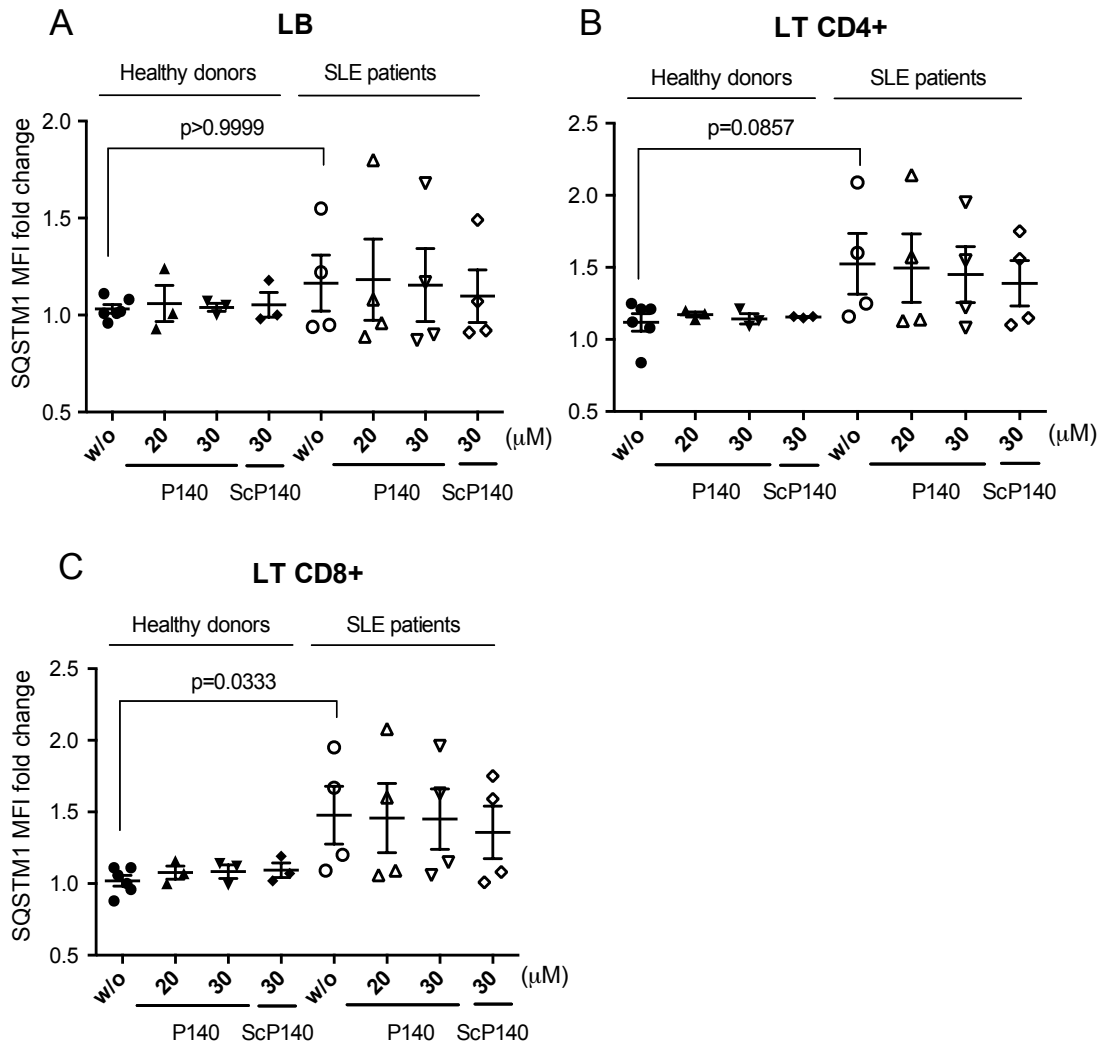


Figure 4

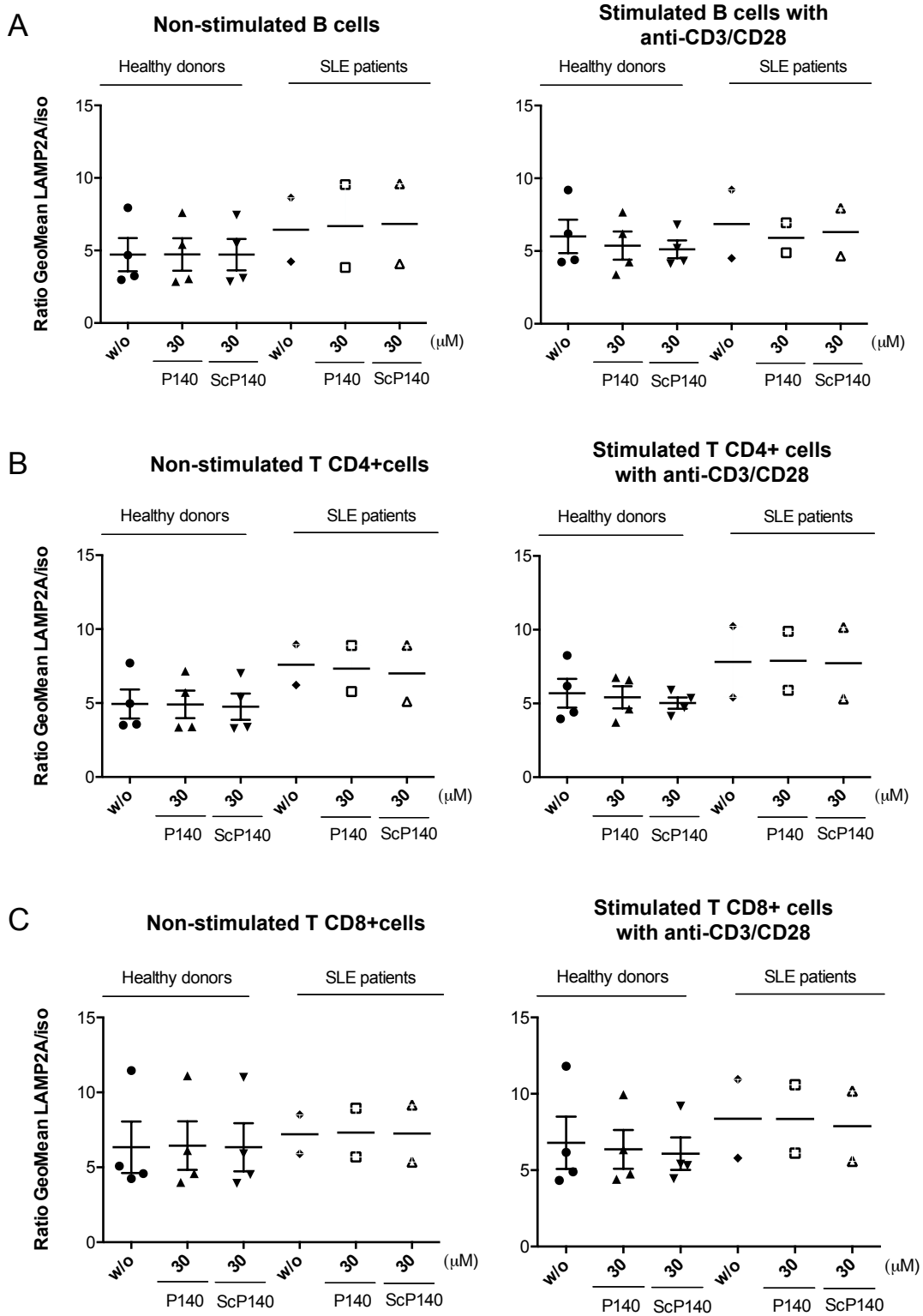


Figure 5 (In preparation)

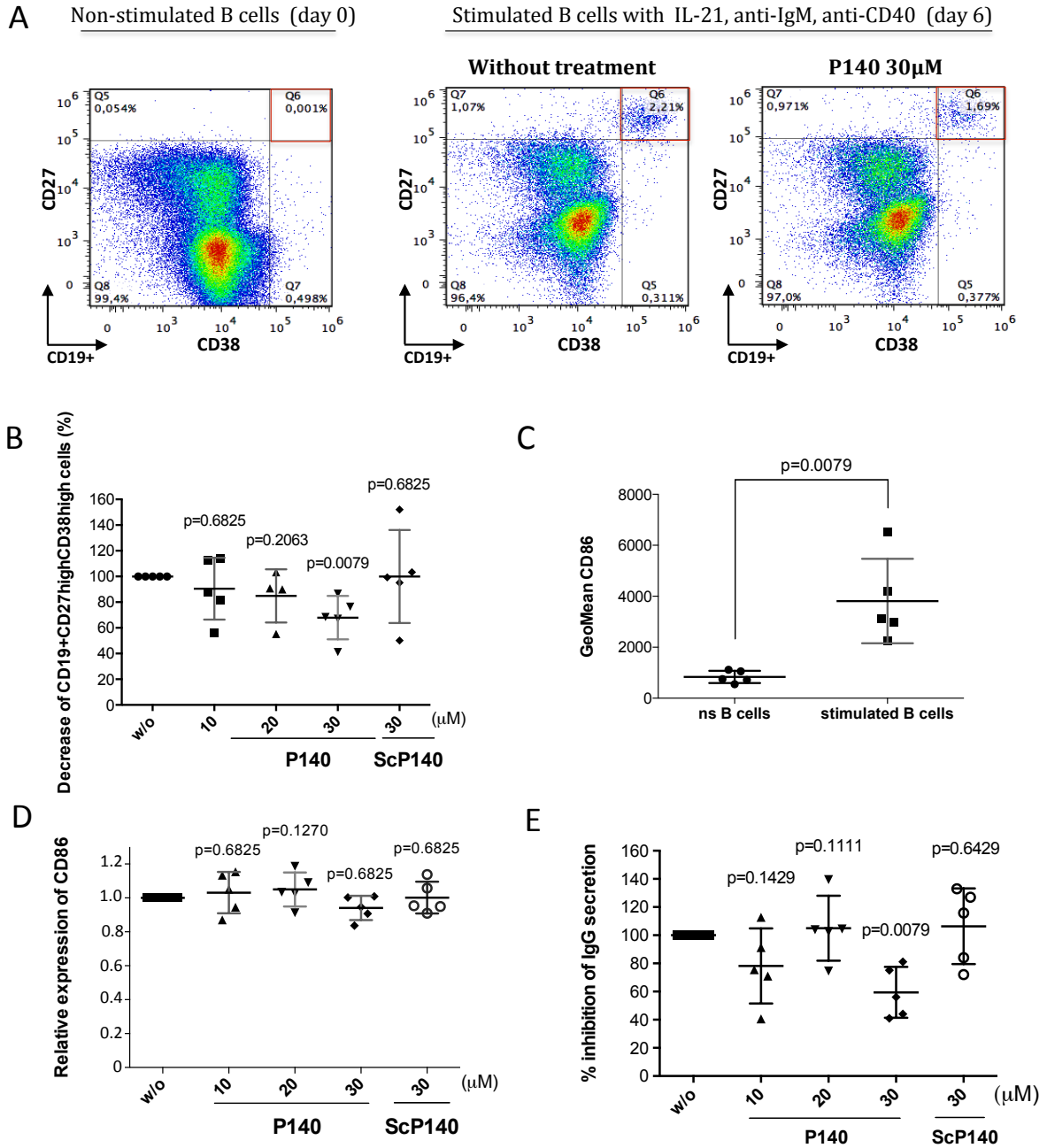


Figure 6

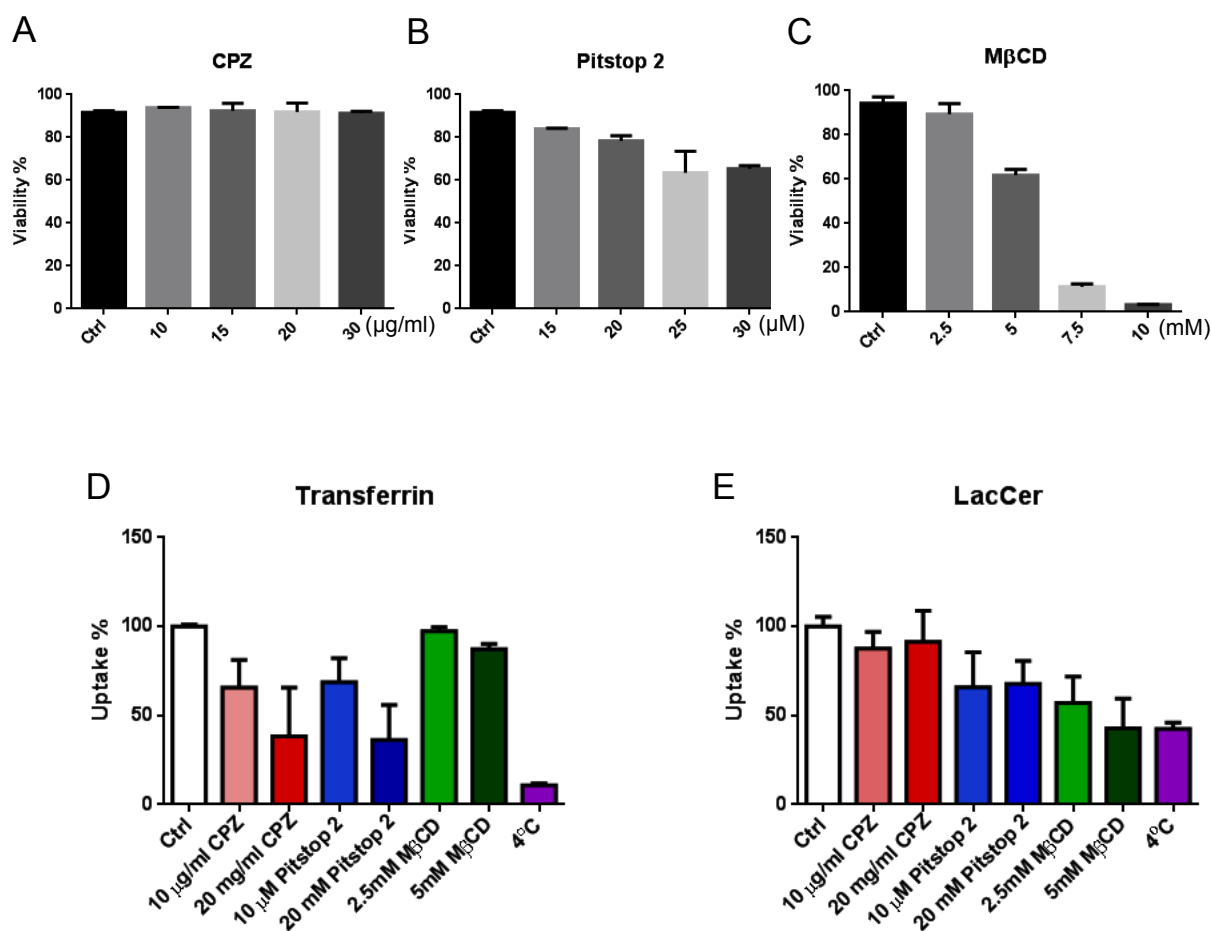
Table I. Characteristics of patients with systemic lupus erythematosus¹

Patient/sex/ age/race	Disease duration (years)	SLEDAI ^a	ANA (IIF) ^b	ENA (Ouchterlony)	Anti- dsDNA ^c	Organ involvement	Therapy
LHO/F/26/C		4	+	+	+	Skin, kidney, joints, APLS, lymphopenia	HCQ, CS, MMF, FL
MER/F/69/C		0	+	+	+	Skin, joints, heart, kidney, anemia, photosensitivity	MMF, CS, EN, FR
BEN/F/34/M		4	-	-	+	Skin, joints, kidney, CNS, neutropenia, anemia, lymphopenia alopecia	CS, AZA
MUN/F/49/C		5	+	+	+	Skin, neutropenia, lymphopenia	HCQ, SFM, KRG
WIN/F/44/C		4	-	-	-	Skin, joints, mouth, thrombosis	HCQ, MTX, CS
KHU/F/37/A		2	+	+	+	Joints, rash, kidney, photosensitivity	MMF, CS
GAT/M/63/C	>14	0	+	+	-	APLS, pulmonary embolism, kidney	CS, AZA, HCQ, FL, IRB, FR, BIS, PRA, TAM, LPZ, CLC, SLF
BON/F/43/C	20	0	+	-	+	HTA, polyarthralgia	CQ, CS, ETA, VAL, RS
COR/F/51/C	12	6	+	+	-	APLS, Gougerot, lupus nephritis stage V	CS, HCQ, FL, LAB, OMZ, FR, PC
LAM/F/49/C	25	4	+	+	-	Rheumatoid arthritis, Gougerot, Raynaud, pericarditis, polyneuropathy, lung	HCQ, CS, MTX, FA, PC, CLC, ESZ, AML, TRP
MAS/F/49/C	16	0	+	+		Lupus glomerulonephritis class V, skin	HCQ, CS, LVS
BAU/F/34/C	14	0			-	Articular, haematological, erythroblastopenia	HCQ, CA

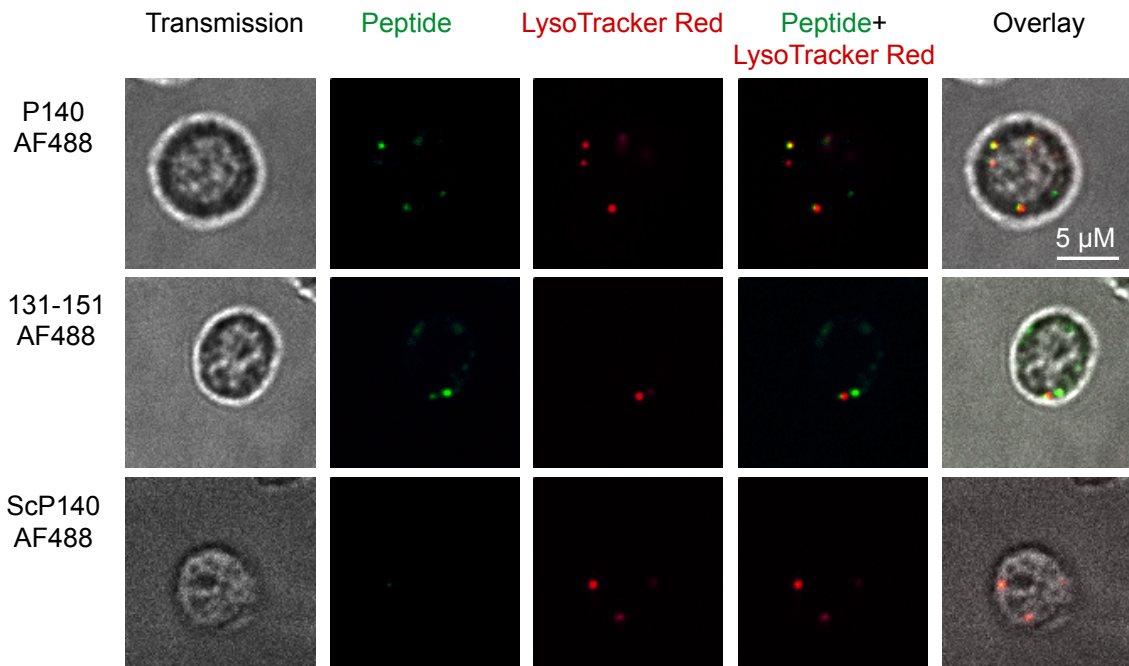
- Résultats : chapitre 3 -

DEN/F/65/C	24	4	+	-	-	Charcot-Marie-Tooth, Gougerot, skin, polyarthralgia, epilepsy, COPD, hyperthyroidism, polyarticular chondrocalcinosis, bilateral knee osteoarthritis, osteoporosis, anemia, eczema	MTX, HCQ
GRE/F/40/C	26	14	+		+	Pleurisy, pericarditis, psychiatric	CQ, CS, PC, CC, RS, PRX
BAZ/F/47/C		8			+	Articular, decrease of C4	CS
LAG/M/52	14	2	+	+	+	Cutaneous articular	MTX,HCQ
RAM/F/23		21			+	Fever, kidney, decrease of C3 and C4, lymphopenia, anemia, proteinuria, hematuria, leukocyturia	CS
ABD/F/39							
PER/F/70							

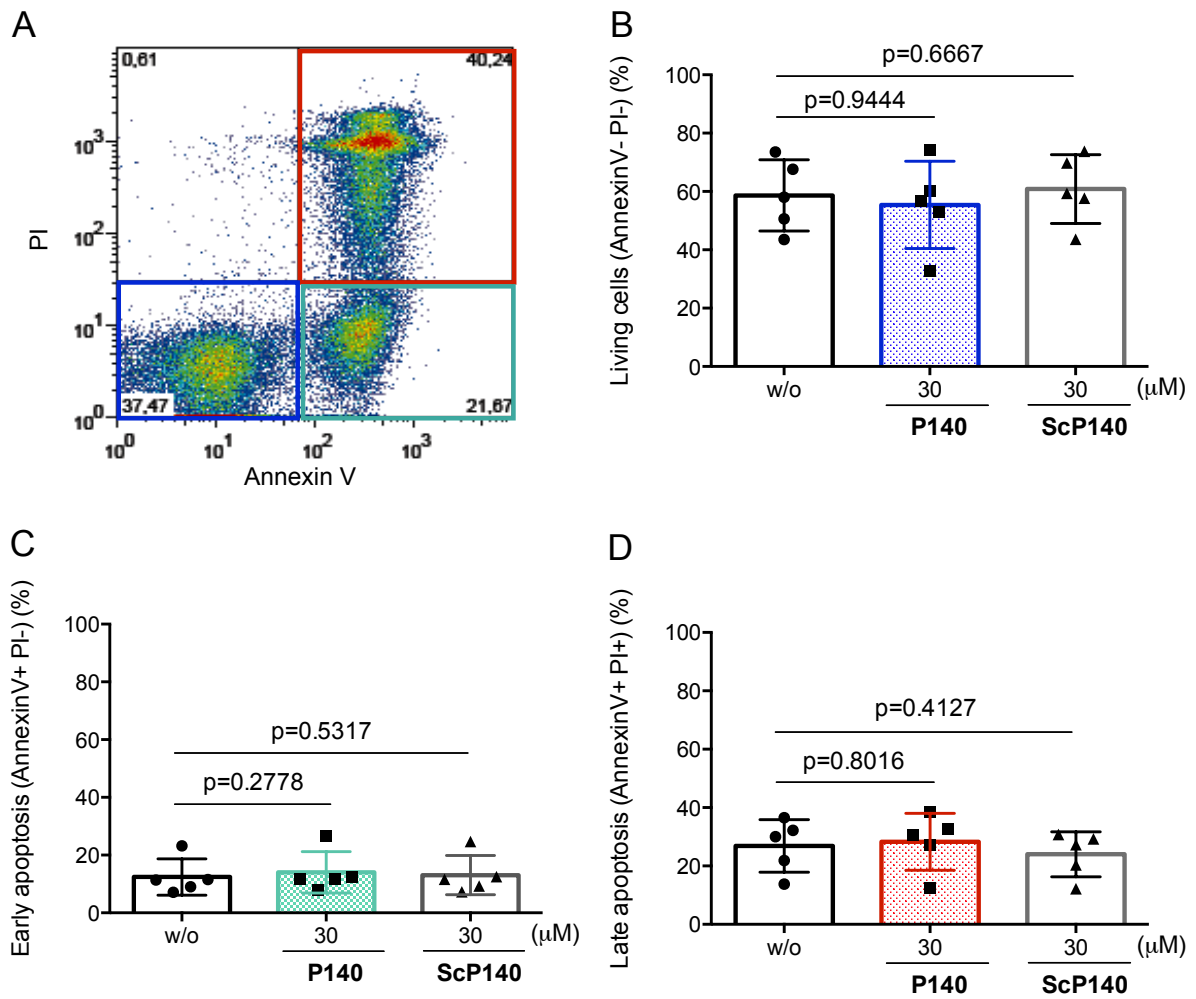
Abbreviations used: C, Caucasian; M, Maghrebien; A, Asian; SLEDAI, Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; ANA, antinuclear antibodies; CNS, central nervous system, APLS, anti-phospholipid syndrome; MTX, methotrexate; CS, corticosteroids; HCQ, hydroxychloroquine; CQ, Chloroquine; MMF, mycophenolate mofetil; FL, fluindione; EN, enalapril; FR, furosemide, AZA, azathioprine; SFM, sulfamethoxazole; KRG, kardegic; IRB, Irbesartan; BIS, Bisoprolol; PRA, Pravastatine; TAM, Tamsulosine; LPZ, Lansoprazole; CLC, Cholecalciferol; ETA, Etanercept; VAL, Valsartan; RS, Risedronate sodique, LAB, Labetalol; OMZ, Omeprazole; PC, Potassium chloride; FA, Folique acid; ESZ, Esomeprazole; AML, Amlodipine; TRP, Teriparatide; LVS, Levothyroxine sodique; CA, Cyproterone acetate; CC, Calcium carbonate; RS, Risperidone; PRX, Paroxetine



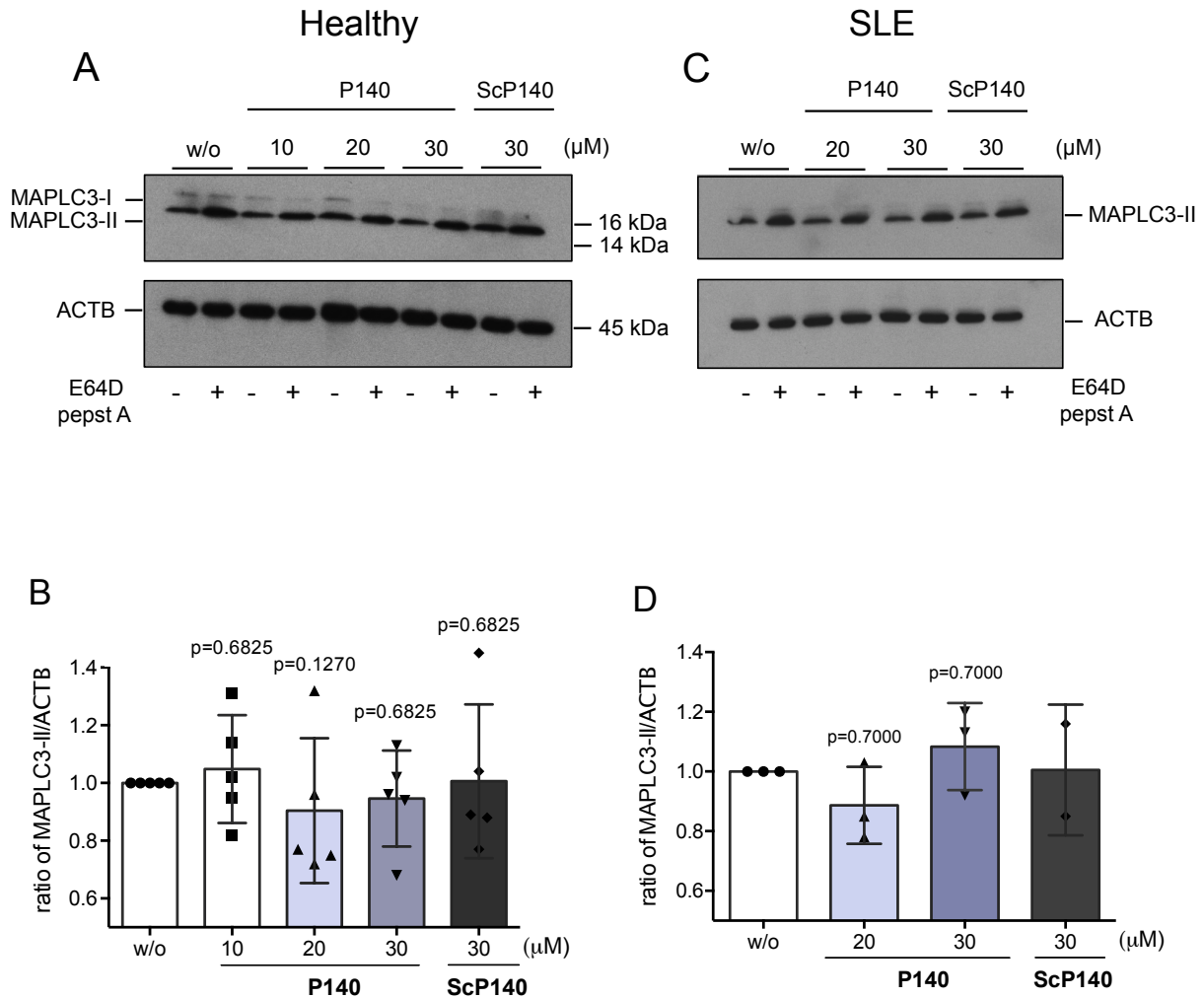
Supplemental Figure 1: Toxicity and inhibition efficiency of endocytosis inhibitors. (A-C) The toxicity of CPZ (A), Pitstop 2 (B) and MβCD (C) was tested 1h post-incubation at the indicated concentrations in Raji cells. The number of viable cells was expressed as the percentage of cells that were negative to propidium iodide (PI) in the total cell population. The inhibition efficiency and specificity of endocytosis inhibitors were tested at indicated concentrations. (D-E) Raji cells were pre-treated with the inhibitors for 30 min, followed by exposure to human transferrin AF488 conjugate (D) or BODIPY® FL C5-Lactosylceramide complexed to BSA (LacCer, E) for a further 30 min. The inhibitors were present through out the experiments. The 4°C condition (treated in the same conditions) was used as a positive control since endocytosis pathways are mostly shut down at this temperature. In this case, cells were left at 4°C for 30 min, followed by exposure to transferrin or LacCer for a further 30 min at 4°C. The cellular fluorescence was monitored by flow cytometry, and the mean fluorescence intensity was normalized to that of untreated control cells (Ctrl) to calculate the percentage of uptake (uptake %). Error bars are standard deviations (SD) from three replicates.



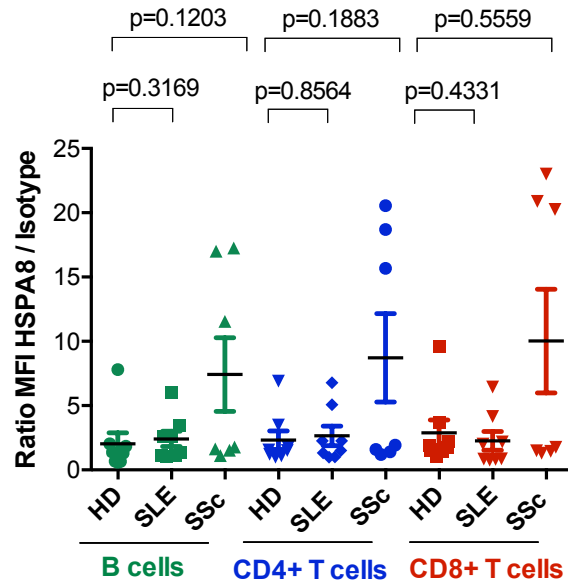
Supplemental Figure 2: Lysosomal accumulation of P140 and its analogues in human B cells. B cells isolated from buffy coat of healthy donors were exposed to 10 μ M AF488-labeled peptides P140, 131-151 or ScP140 for 2 h, followed by lysosomal staining with LysoTracker Red for 20 min at 37 °C. Cells were washed and immediately imaged with a spinning disk microscope. Representative images from two independent experiments are shown.



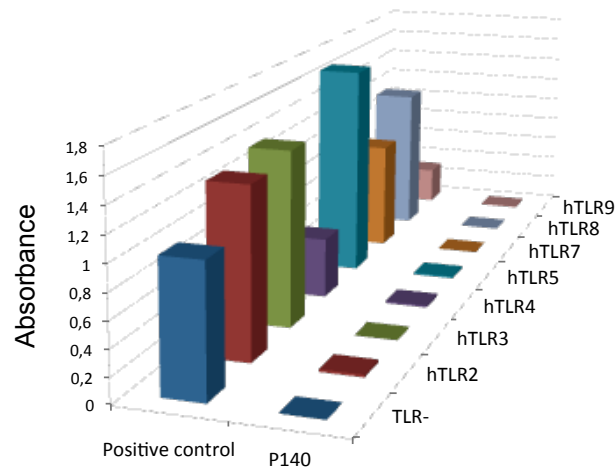
Supplemental Figure 3 : Effect of P140 on apoptosis of B cells from SLE patients. Expression of Annexin V and PI was measured by flow cytometry in total CD19+ B cells 24h post-incubation with P140 or with ScP140 used as control. Experiments were carried out with the cells from five SLE patients. p -values (Mann-Whitney score) are indicated (comparaison with the conditions without peptide). **(A)** Flow cytometry dot plot of Annexin V and PI expression in B cells from one representative SLE patient. **(B)** Percentage of living cells; **(C)** percentage of early apoptosis; **(D)** percentage of late apoptosis.



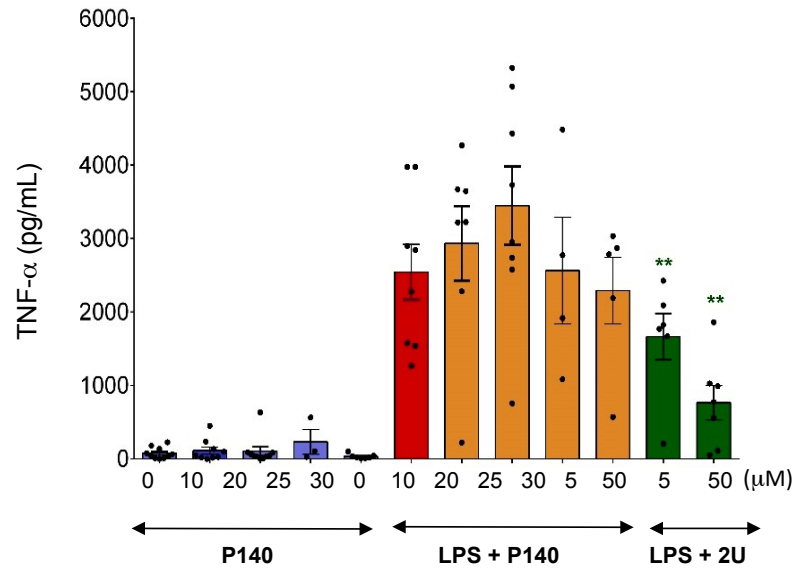
Supplemental Figure 4 : Effect of P140 on macroautophagy occurring in T cells. Detection of MAP1LC3-I and II proteins by western blotting in T cells from healthy donors (**A,B**) and patients with SLE (**C,D**). Lysosomal protease inhibitors pepstatin A and E64D were added (+) or not (-) as indicated. The results are expressed as the ratio between the values with and without protease inhibitors (= autophagic flux). Densitometric analysis of MAP1LC3-II expression was done relative to ACTB. The histograms represent the means \pm SD obtained with purified T cells from 5 healthy donors and 3 SLE patients, evaluated in the presence of P140 or ScP140 peptides. *p*-values (Mann-Whitney score) are indicated.



Supplemental Figure 5 : Comparaison de HSPA8 expression as evaluated by flow cytometry at the surface of B and T cells from HD (n=8) and patients with SLE (n=8) or SSc (n=7). *p*-values are indicated (Mann-Whitney test). MFI, mean fluorescence intensity



Supplemental Figure 6: TLR ligand screening test. The screening assay (InvivoGen) is based on recombinant HEK-293 cell lines expressing functional human (h) TLRs and an NFkB inducible reporter gene. As positive control, each cell line was induced with a specific ligand, namely Pam2CysK4 (100ng/mL) for TLR2, poly I:C (100ng/mL) for TLR3, lipopolysaccharide (100ng/mL) for TLR4, flagelline (1µg/mL) for TLR5, R848 (10 µg/mL) for TLR7 and TLR8, and CpG ODN2006/ODN1826 (10 µg/mL) for TLR9. The negative control (TLR-) corresponds to HEK-293 cells expressing the reporter system only.
HEK, Human embryonic kidney; ODN, oligodeoxynucleotides



Supplemental Figure 7: Effect of P140 on inflammatory cytokine TNF- α production by DCs from healthy donors. Effect after 24h of P140 on LPS-induced production of TNF- α , in comparison with the anti-inflammatory mannoside glycolipid conjugate 2U. Data obtained from 8 HD tested each in independent experiments

1.3. Commentaires relatifs à la publication en préparation

1.3.1. Entrée du peptide P140 dans les cellules B humaines

Des expériences précédentes avaient mis en évidence qu'après administration aux souris lupiques MRL/*lpr*, le peptide P140 couplé à un fluorochrome est rapidement retrouvé dans la rate au niveau du manteau et de la zone marginale à proximité de macrophages et de LB (Page et al., 2011). Une étude plus récente a montré par des expériences d'immunofluorescence que le peptide emprunte la voie d'endocytose dépendante des clathrines dans les LB. Il se localise ensuite dans des endosomes précoces, puis rejoint les lysosomes (Macri et al., 2015). Nous avons donc cherché à étudier la voie d'entrée du peptide P140 dans les LB humains ainsi que son trafic intracellulaire. Nous avons montré que lorsque des cellules Raji (lignée cellulaire B humaine) et des LB isolés à partir du sang d'individus sains, sont préalablement incubés avec plusieurs inhibiteurs de la voie d'endocytose médiée par les clathrines (ici le Chlorpromazine hydrochloride CPZ et le Pitstop 2), le pourcentage d'internalisation du peptide P140 est significativement diminué. C'est également le cas du peptide non phosphorylé 131-151 mais dans une moindre mesure. En revanche, lorsqu'une forme tronquée du peptide P140 est utilisée, le pourcentage d'internalisation de ce peptide n'est pas différent avec ou sans inhibiteurs de la voie d'endocytose médiée par les clathrines. De plus, lorsque nous incubons les cellules B avec un inhibiteur de la voie d'endocytose médiée par les cavéolines, le pourcentage d'internalisation du peptide P140 est identique à la condition non traitée. Par conséquent, le peptide P140 utilise spécifiquement la voie d'endocytose médiée par les clathrines pour entrer dans les cellules B humaines. Nous avons également montré qu'une fois le peptide P140 internalisé, ce dernier co-localise rapidement avec des marqueurs des lysosomes. Ces résultats confirment donc ceux obtenus précédemment chez la souris lupique MRL/*lpr* (**Figure 1 du papier en préparation**).

1.3.2. Effet du peptide P140 sur l'expression des molécules du CMH-II

Une fois encore, en nous appuyant sur les résultats obtenus chez la souris, nous avons étudié l'expression des molécules du CMH-II à la surface des LB de sujets sains et d'individus atteints de LED. Notre hypothèse de départ était la suivante : si le peptide P140 affecte la présentation antigénique, les LT autoréactifs devraient être moins activés et donc moins enclins à aider les LB à se différencier en plasmocytes. Dans cette logique, j'ai tout d'abord montré que l'expression du CMH-II est augmentée à la surface des LB chez les patients lupiques en comparaison avec des

individus sains et des patients souffrant d'une autre pathologie auto-immune comme la sclérodermie. J'ai également montré que le peptide P140 réduit significativement l'expression des molécules du CMH-II à la surface des LB chez les patients lupiques et ceci, quel que soit le statut d'activation des cellules (**Figure 2**). En parallèle, j'ai vérifié que la diminution de l'expression du CMH-II n'est pas due à une augmentation de l'apoptose des LB en présence du peptide seul (**Supplemental Figure 3**). Enfin, j'ai montré que plus le score d'activité de la maladie (SLEDAI) est élevé chez les patients, plus le peptide affecte l'expression des molécules du CMH-II. Nous avons voulu poursuivre cette étude en mesurant l'expression du CMH-II à la surface d'autres CPA, ici des DC. Chez les individus sains, le peptide P140 réduit, *in vitro*, l'expression du CMH-II à la surface des LB, ce qui n'est pas le cas avec des DC (**Figure 3**). Ces résultats indiquent donc que le peptide P140 agit spécifiquement sur une seule population de cellules présentatrices d'antigènes.

1.3.3. Effet du peptide P140 sur l'autophagie

Puisqu'il existe un lien entre la présentation de peptides antigéniques et l'autophagie, nous avons voulu déterminer si le peptide P140 affecte ce processus cellulaire. En effet, plusieurs études ont montré une dérégulation de la macroautophagie dans les LB et LT de patients lupiques. J'ai tout d'abord confirmé les résultats précédemment obtenus par l'équipe à savoir que le flux autophagique est augmenté dans les LT de patients lupiques (Gros et al., 2012). Une seule expérience de microscopie électronique à transmission avait alors été réalisée à partir des cellules de patients. Dans cette nouvelle étude, j'ai confirmé par cytométrie en flux la dérégulation de la macroautophagie dans les LT CD8+ de patients. En revanche, bien qu'à l'heure actuelle le nombre de patients inclus dans cette analyse reste limité, le flux autophagique dans les LB de patients atteints de LED n'est pas statistiquement différent de celui de sujets sains. Ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus par Clarke et ses collègues (Clarke et al., 2014). Concernant l'effet du peptide P140 sur la macroautophagie, les premières expériences que j'ai effectué montrent que le peptide n'affecte pas directement cette voie (**Figure 4 et Supplemental Figure 4**). Ces travaux renforcent l'hypothèse que nous avons déjà émise lors d'une précédente publication à savoir que la macroautophagie n'est pas la cible principale du peptide P140 (Macri et al., 2015). En revanche, l'effet direct sur une autre forme d'autophagie, la CMA, pourrait être déterminant. A l'heure actuelle, nous cherchons à déterminer si l'activité de la CMA est également augmentée dans les LB chez les patients. En effet, très peu d'études ont montré des dérégulations de la CMA au cours du LED ainsi que dans d'autres maladies auto-immunes. Ce manque d'informations est sûrement dû au fait qu'aucun inhibiteur

pharmacologique pour la CMA n'est disponible à ce jour. Les premiers résultats de nos mises au point sont résumés dans la figure 5 du papier qui est en préparation. Ces travaux devront toutefois être poursuivis chez plus individus sains et patients lupiques avant de conclure sur le possible effet du peptide P140 sur la CMA.

1.3.4. Effet du peptide P140 sur la différenciation lymphocytaire B

Enfin, le laboratoire avait mis en évidence que le peptide P140 induit une diminution du taux d'anticorps anti-ADNdb chez les patients atteints de LED. Nous avons voulu approfondir cette étude et déterminer si le peptide affecte également la différenciation des cellules sécrétrices d'anticorps, les plasmocytes. Dans cette logique, j'ai différencié, *in vitro*, des LB provenant d'individus sains en présence ou en absence du peptide P140. Ce dernier réduit significativement le pourcentage de plasmablastes, qui correspond au stade précédent le stade des plasmocytes. J'ai également vérifié que le peptide n'induit pas l'apoptose des LB lors de leur différenciation. Dans ces conditions expérimentales, nous ne sommes pas capables de mesurer la sécrétion d'IgM par les LB différenciés. En revanche, le peptide P140 diminue significativement la sécrétion d'IgG (**Figure 6**). Ainsi, la baisse du taux d'anticorps anti-ADNdb observée lors des différents essais cliniques chez les patients lupiques pourrait être une conséquence du peptide P140 qui jouerait un rôle plus en amont sur la différenciation des LB.

L'ensemble de ces données associées aux travaux antérieurs du laboratoire nous a permis de proposer un mode d'action du peptide P140 chez l'homme (Figure 24). Ce mécanisme est très similaire à celui proposé chez la souris (Schall et al., article soumis).

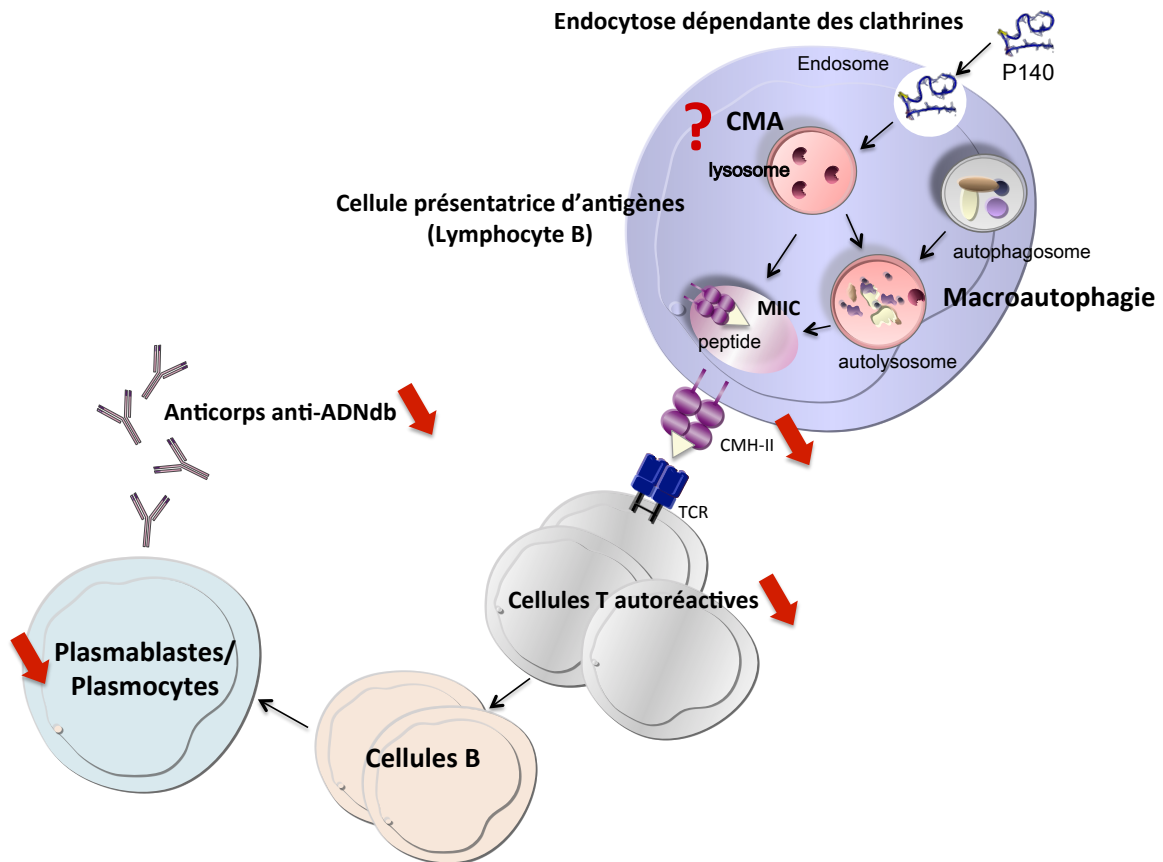


Figure 24 : Modèle d'action proposé du peptide P140 chez l'homme. Après endocytose dépendante des clathrines dans les LB, le peptide P140 est retrouvé dans les lysosomes. Cet organelle joue un rôle essentiel dans le processus d'autophagie. Cependant, à l'heure actuelle, aucune donnée n'a permis de montrer que le peptide P140 régule le processus de la CMA chez l'homme. De plus, contrairement à chez la souris, le peptide P140 n'affecte pas la macroautophagie. En revanche, le peptide P140 réduit l'expression des molécules du CMH-II ce qui conduirait à une baisse de la présentation de peptides antigéniques et à la baisse d'activation des LT potentiellement autoréactifs. Sans les signaux de co-stimulation délivrés pas les LT, les LB seul ne sont alors plus capables de se différencier en plasmocytes et de produire des autoanticorps.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

1.1. Historique de ma thèse

Durant ces 3 années de doctorat, j'ai eu pour projet d'étudier le mécanisme d'action du peptide P140 dans le traitement du LED. Le peptide qui dérive de la séquence 131-151 de la protéine U1-70K, réduit la sévérité des symptômes lupiques chez les souris MRL/*lpr* et est actuellement évalué chez l'homme dans un essai clinique de phase III. Des travaux antérieurs du laboratoire ont mis en évidence que chez la souris, le peptide P140 interagit avec la protéine chaperonne HSPA8 et affecte à la fois la macroautophagie et la CMA, ce qui, par conséquent, bloquerait le ciblage d'autoantigènes dans le lysosome (Macri et al., 2015; Page et al., 2009, 2011). Ainsi, le peptide réduirait la production de peptides dérivés de ces autoantigènes et provoquerait une diminution de l'activation des LT CD4+ autoréactifs. Grâce à ce mécanisme, le peptide P140 ralentirait la progression du LED.

Les résultats obtenus chez la souris lupique MRL/*lpr* et présentés dans ce manuscrit complètent et confirment ce mode d'action. Cependant, bien que plusieurs études aient montré l'implication de l'autophagie (et plus particulièrement de la macroautophagie) dans la présentation antigénique, aucune donnée expérimentale n'a permis de mettre en évidence que l'hyperactivation de la machinerie autophagique en condition lupique est directement responsable de l'augmentation de la présentation d'autoantigènes aux LT CD4+. De plus, une seule étude, à ce jour, a montré que la CMA pourrait contribuer à la dégradation complète de certaines protéines, la plupart du temps dans les CPA, afin d'aider celles-ci dans leur rôle de cellules présentatrices d'antigènes (Zhou et al., 2005). Or, lors de nos précédentes études nous avons montré que le peptide P140 agit principalement sur cette seconde voie autophagique. Par conséquent, il serait intéressant d'utiliser le peptide dans le but de réguler l'activité de la CMA dans les LB de souris lupiques puis de vérifier si, dans ce contexte, il y a bien une baisse de la présentation antigénique et de l'activation des LT CD4+.

L'activation chronique du système immunitaire au cours du LED conduit à la production d'une grande quantité de cytokines inflammatoires et contribue à l'inflammation locale et aux lésions tissulaires. La compréhension des voies conduisant aux phénomènes d'inflammation au cours du LED est primordiale afin de développer de nouvelles biothérapies ciblées. Outre le Belimumab qui cible la cytokine BAFF et qui est déjà commercialisé, des résultats prometteurs ont été obtenus lors de différents essais cliniques lorsque les cytokines IL-6 et IFN- α étaient ciblées.

Toutefois l'identification de nouvelles cytokines impliquées au cours du LED reste une préoccupation majeure. Parmi celles-ci la cytokine IL-17 présente un intérêt grandissant. En effet, cette cytokine est retrouvée à des taux anormalement élevés chez les modèles murins du LED ainsi que chez les patients (Wong et al., 2008). Des études ont montré que l'IL-17 pourrait avoir un rôle sur la formation des centres germinatifs ce qui par conséquent favoriserait la production des plasmocytes et des autoanticorps (Martin et al., 2014). Chez la souris lupique MRL/lpr, nous avons montré que le peptide P140 diminue la sécrétion d'IL-17 suite à son administration *in vivo*. L'IL-17 est majoritairement produite par les cellules Th17 mais également par les cellules T doubles négatives et les cellules NK chez les souris et les patients lupiques. A l'heure actuelle, nous ne savons pas si le nombre de cellules productrices d'IL-17 est également diminué suite à l'administration du peptide P140. Il serait également intéressant de poursuivre ces travaux en augmentant le nombre de cytokines puisque à ce jour, seules 7 cytokines ont pu être testées. Puisque le peptide semble agir sur la sécrétion de cytokines impliquées au cours du LED, il faudrait vérifier si le peptide modifie la « signature interféron » typiquement retrouvée chez les patients lupiques. Ces analyses pourront être réalisées au laboratoire à partir des premiers prélèvements de patients lupiques de la phase III de l'essai clinique.

Concernant le mode d'action du peptide P140 chez l'homme, nos travaux ont montré que comme chez la souris lupique MRL/lpr, le peptide P140 entre dans les LB d'individus sains par la voie d'endocytose médiée par les clathrines. Bien que le nombre de LB soit limité chez les patients lupiques, il faudra poursuivre ces travaux en étudiant la voie d'entrée du peptide dans les cellules B de patients lupiques puisque ceci n'a pas encore été fait. De plus, il faudrait étendre cette analyse à d'autres CPA (DC et macrophages) mais également vérifier si le peptide entre dans les LT puisque ces cellules sont la cible du peptide. L'endocytose médiée par les clathrines dépend de la liaison de la molécule endocytée à un récepteur transmembranaire (Doherty and McMahon, 2009). Toutefois, bien que le peptide P140 se lie à la protéine chaperonne HSPA8 qui est surexprimée chez les souris lupiques, cette dernière ne possède pas de domaine transmembranaire. De plus, j'ai montré que chez l'homme, la protéine HSPA8 est très peu exprimée à la surface des LB et des LT que ce soit chez les individus sains ou les patients lupiques. Par conséquent, cette protéine ne semble pas être le récepteur à l'origine de l'internalisation du peptide phosphorylé. D'autres protéines exprimées par des LB pourraient potentiellement interagir avec le peptide P140 et faciliter son internalisation. Etant donné que l'endocytose médiée par les clathrines s'accompagne de l'internalisation du récepteur et de son ligand nous pourrions identifier le récepteur du peptide P140 dans les LB grâce à ce mécanisme.

Ainsi, une diminution de l'expression d'une protéine de surface pourrait indiquer que le peptide s'est lié à cette protéine avant d'être internalisé dans la cellule. Il faudrait alors comparer ces résultats avec ceux obtenus pour le peptide contrôle scramble (scP140) puisque nous avons précédemment montré que ce peptide n'est pas internalisé dans les LB par cette voie.

Après endocytose, le peptide P140 est rapidement retrouvé dans les lysosomes des cellules B humaines. Des études antérieures réalisées au laboratoire ont montré que le nombre de lysosomes ainsi que leur taille est augmenté dans les LB de souris lupiques par rapport aux souris contrôles CBA/J (Macri et al., 2015). Ces résultats corrélerent avec une augmentation du pH des lysosomes. Nous pourrions compléter notre étude chez l'homme et vérifier si nous observons également des dysfonctions au sein des lysosomes dans les LB de patients lupiques en comparaison avec des individus sains. Pour rappel, les lysosomes sont des organites cellulaires majeurs impliqués au cours de l'autophagie. Lors de ce processus, ils permettent la dégradation de protéines pour leur présentation par les molécules du CMH-II aux LT CD4+.

Comme je l'ai évoqué dans l'introduction de ce manuscrit, le mode d'administration du peptide P140 est décisif afin d'obtenir un effet thérapeutique de celui-ci. L'administration intraveineuse du peptide en solution saline aux souris MRL/lpr conduit à l'amélioration des symptômes lupiques ce qui n'est pas le cas lorsque le peptide est injecté par voie intranasale. Chez les patients lupiques, l'injection du peptide P140 se fait de manière sous-cutanée. Ces résultats nous ont poussé à identifier les cellules ciblées par le peptide en fonction des différents modes d'administration. En effet, nous suggérons que ces différences d'efficacité pourraient être dues au fait que les cellules présentes autour du site de l'injection ne soient pas les mêmes.

Au cours de mon doctorat, j'ai également montré que, *in vitro*, le peptide P140 réduit significativement l'expression des molécules du CMH-II à la surface de LB de patients lupiques et ce, quelque soit leur niveau d'activation. Ces résultats ont également été retrouvés lorsque des cellules B d'individus sains étaient incubés avec le peptide à différentes concentrations. L'effet du peptide P140 était d'ailleurs plus important chez ces individus par rapport aux patients lupiques. Nous avons émis l'hypothèse que le traitement de fond des patients lupiques (corticostéroïdes et immunosuppresseurs à faible dose) rend les cellules anergiques, ce qui pourrait donc expliquer pourquoi elles répondent moins au peptide P140. Pour compléter cette étude, il serait intéressant de tester l'effet du peptide P140 sur l'expression du CMH-II au niveau des cellules B mémoires. De plus, nous n'avons pas la preuve directe que la baisse d'expression des molécules du CMH-II, qui est induite par le peptide, conduit à une diminution de la

présentation antigénique et de l'activation des LT CD4+. Nous connaissons maintenant les conditions optimales pour induire la baisse d'expression du CMH-II à la surface des LB humains. Par conséquent, nous projetons d'incuber des LB issus d'un donneur A avec le peptide P140. Puis, nous incuberons ces cellules « pré-traitées » avec des LT CD4+ issus d'un donneur B afin de générer une réaction allogénique. Lors de cette réaction, les LT du donneur B vont reconnaître comme du non-soi les peptides présentés par le CMH-II du donneur A et induire une réponse immunitaire. Le but de cette étude est de montrer que s'il y a une baisse de l'expression du CMH-II à la surface des LB, moins de peptides antigéniques seront présentés aux LT CD4+ et par conséquent ces cellules seront moins activées.

L'inhibition de la voie de la CMA et de la macroautophagie (dans une moindre mesure) par le peptide P140 chez la souris lupique MRL/lpr suggère un rôle délétère de ces deux mécanismes au cours du LED. Notre laboratoire a récemment mis en évidence une dérégulation de la CMA dans les LB de souris MRL/lpr (Macri et al., 2015) mais également une augmentation de la quantité d'autophagosomes dans les LT de souris et de patients lupiques (Gros et al., 2012). Le rôle de la macroautophagie dans la pathogénèse lupique a également été évalué par notre équipe grâce à une délétion conditionnelle du gène Atg5 dans les LB de souris développant un syndrome lupique (Arnold et al., 2016). Lors de ma thèse, alors que j'ai pu confirmer l'augmentation de l'activité de la macroautophagie dans les LT CD8+ chez les patients lupiques, je n'ai constaté aucun effet du peptide P140 sur ce processus. Ces résultats nous ont poussé à étudier l'activité de la CMA chez l'homme. Bien que la CMA semble impliquée dans plusieurs pathologies (cancers, maladies neurodégénératives,...), très peu de données ont montré une dérégulation de cette voie au cours du LED ou d'autres maladies autoimmunes. Par conséquent, nous comparons actuellement l'expression intracellulaire de la protéine LAMP-2A, qui est un marqueur spécifique de la CMA et des lysosomes, dans les LB et les LT chez les patients lupiques et les individus sains. Nous avons précédemment montré que chez la souris MRL/lpr le peptide agit sur la CMA en diminuant notamment l'expression de la protéine chaperonne HSPA8. Pour rappel, chez l'homme, cette protéine est très peu exprimée à la surface des PBMC. Il serait donc intéressant d'étudier l'expression intracellulaire de HSPA8 et de vérifier si le peptide a un effet à ce niveau là. Il serait également intéressant de réaliser un modèle murin similaire à celui généré par notre équipe pour étudier l'impact de la macroautophagie dans un contexte autoimmun. L'équipe d'Ana-Maria Cuervo a en effet créé des souris déficientes pour la protéine LAMP-2A dans les LT (Valdor et al., 2014). Nous pourrions envisager des expériences similaires et déterminer l'implication de la CMA dans la pathogénèse du lupus en utilisant dans notre cas des souris possédant un fond génétique lupique.

1.2. Conclusion et discussion générale

La mise au point de thérapies ciblées pour le LED représente un défi majeur à ce jour. L'objectif est de réduire la réponse autoimmune sans affecter la capacité du système immunitaire à se défendre contre des agents pathogènes. Parmi les nouvelles molécules thérapeutiques qui sont actuellement testées, les anticorps monoclonaux présentent un avantage de taille dû à leur spécificité vis-à-vis de leur cible. L'exemple le plus marquant est le Belimumab qui représente le premier médicament commercialisé pour le LED depuis 50 ans. Ce dernier correspond à un anticorps monoclonal humanisé qui cible spécifiquement la cytokine BAFF qui est impliquée au cours de la maladie. Toutefois, le coût élevé de leur production ainsi que la quantité d'anticorps à administrer aux patients limitent leur utilisation lors de biothérapies.

Au cours de ces dernières années, les peptides thérapeutiques ont bénéficié d'une intense recherche visant à augmenter leur stabilité, leur biodisponibilité et leur efficacité. Leur toxicité et leur immunogénicité sont généralement très faibles, ce qui réduit considérablement leurs effets secondaires. Leur coût de production est également plus abordable, ce qui fait d'eux des candidats-médicaments prometteurs pour le traitement des maladies autoimmunes telles que le LED. Comme je l'ai évoqué dans l'introduction, à l'heure actuelle, environ 70 peptides ont été approuvés par la FDA dans diverses indications thérapeutiques (Schall and Muller, 2015). Parmi ces peptides, le pCons et le hCDR1 dérivent tous les deux d'autoanticorps et sont actuellement étudiés pour leur efficacité au cours du LED. Les peptides provenant d'histones présentent également un intérêt thérapeutique sans toutefois faire l'objet d'un essai clinique pour le moment.

Enfin, le peptide P140, qui a été découvert dans mon laboratoire il y a plus de 10 ans maintenant, est un espoir pour l'amélioration de la qualité de vie des patients souffrant du lupus. Les études réalisées chez la souris et chez l'homme ont en effet montré des résultats très encourageants quant à ses effets thérapeutiques. Ainsi, lorsque je suis arrivée au laboratoire, mon objectif était de mettre au point des techniques expérimentales nous permettant d'étudier le fonctionnement du peptide P140 chez les patients lupiques de la phase III. Malheureusement, le délai de la mise en place de cet essai clinique fut plus long que prévu et par conséquent je n'ai pas pu bénéficier des premiers prélèvements de patients. Cependant, grâce à la collaboration de plusieurs médecins des hôpitaux universitaires de Strasbourg, j'ai pu obtenir des prélèvements de patients lupiques non traités par le peptide et évaluer son efficacité *ex vivo*. Les travaux présentés dans ce manuscrit ont pu être réalisés à partir d'environ 20 prélèvements provenant

de différents patients. Outre le fait que cette étude a été réalisée sur un nombre limité de patients, une des difficultés majeures de mon projet de thèse a été de développer des méthodes d'analyses permettant l'utilisation de très peu de cellules. Les patients lupiques sont très souvent lymphopéniques, ce qui rend l'étude du mécanisme d'action du peptide P140 plus complexe que chez la souris MRL/*lpr*. De plus, ces analyses ont été effectuées uniquement à partir de prélèvements de patients traités sous faibles doses d'immunosuppresseurs et de corticostéroïdes. Ces traitements sont couramment administrés aux patients, ce qui réduit encore sensiblement le nombre de patients pouvant potentiellement participer à notre étude. Enfin, pour l'interprétation des résultats, il faut garder en mémoire que la plupart des patients étaient peu actifs voir inactifs (SLEDAI<6). C'est pourquoi, il sera nécessaire d'augmenter le nombre de patients et de réaliser cette étude à partir de prélèvements de patients actifs (SLEDAI>6) pour pouvoir comparer l'efficacité du traitement en fonction de la gravité de la maladie.

Finalement, afin d'étendre nos recherches et puisque nous connaissons plus en détails son fonctionnement, l'équipe cherche à présent à déterminer si le peptide P140 peut avoir un effet thérapeutique dans d'autres formes de maladies autoimmunes. Dans ce contexte, nous étudions actuellement son efficacité dans le traitement du syndrome de Gougerot-Sjögren. Il s'agit d'une maladie autoimmune systémique qui se caractérise par l'atteinte des glandes lacrymales et salivaires due à l'infiltration de cellules lymphocytaires conduisant à un syndrome sec. L'inflammation générée par cette infiltration de cellules peut s'étendre à d'autres organes et notamment les poumons et les reins. Comme pour le LED, le syndrome de Gougerot-Sjögren touche majoritairement les femmes. Des autoanticorps anti-SSA et anti-SSB sont spécifiquement retrouvés chez les patients et aident à poser le diagnostic de la maladie. Le syndrome de Gougerot-Sjögren apparaît parfois à la suite d'une autre pathologie autoimmune, dont le LED, et c'est pourquoi mon équipe s'intéresse à cette maladie. Des premiers tests sont en cours chez la souris.

BIBLIOGRAPHIE : Partie 1 : Le lupus, une maladie autoimmune polymorphe aux nombreuses approches thérapeutiques

- Ambrosi, A.**, Espinosa, A., and Wahren-Herlenius, M. (2012). IL-17: a new actor in IFN-driven systemic autoimmune diseases. *Eur. J. Immunol.* *42*, 2274–2284.
- Arbuckle, M.R.**, McClain, M.T., Rubertone, M.V., Scofield, R.H., Dennis, G.J., James, J.A., and Harley, J.B. (2003). Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* *349*, 1526–1533.
- Arnaud, L.**, Fagot, J.-P., Mathian, A., Paita, M., Fagot-Campagna, A., and Amoura, Z. (2014). Prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in France: a 2010 nation-wide population-based study. *Autoimmun. Rev.* *13*, 1082–1089.
- Bachmann, M.F.**, and Oxenius, A. (2007). Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again. *EMBO Rep.* *8*, 1142–1148.
- Baechler, E.C.**, Batliwalla, F.M., Karypis, G., Gaffney, P.M., Ortmann, W.A., Espe, K.J., Shark, K.B., Grande, W.J., Hughes, K.M., Kapur, V., 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*, 2610–2615.
- Bakshi, J.**, Ismajli, M., and Rahman, A. (2015). New therapeutic avenues in SLE. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* *29*, 794–809.
- Barcellos, L.F.**, May, S.L., Ramsay, P.P., Quach, H.L., Lane, J.A., Nititham, J., Noble, J.A., Taylor, K.E., Quach, D.L., Chung, S.A., et al. (2009). High-Density SNP Screening of the Major Histocompatibility Complex in Systemic Lupus Erythematosus Demonstrates Strong Evidence for Independent Susceptibility Regions. *PLoS Genet* *5*, e1000696.
- Barrat, F.J.**, Meeker, T., Chan, J.H., Guiducci, C., and Coffman, R.L. (2007). Treatment of lupus-prone mice with a dual inhibitor of TLR7 and TLR9 leads to reduction of autoantibody production and amelioration of disease symptoms. *Eur. J. Immunol.* *37*, 3582–3586.
- Bavel, C.C. van**, Dieker, J.W., Kroeze, Y., Tamboer, W.P., Voll, R., Muller, S., Berden, J.H., and Vlag, J. van der (2011). Apoptosis-induced histone H3 methylation is targeted by autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* *70*, 201–207.
- van Bavel, C.C.**, Dieker, J., Muller, S., Briand, J.-P., Monestier, M., Berden, J.H., and van der Vlag, J. (2009). Apoptosis-associated acetylation on histone H2B is an epitope for lupus autoantibodies. *Mol. Immunol.* *47*, 511–516.
- Bengtsson, A.A.**, Sturfelt, G., Gullstrand, B., and Truedsson, L. (2004). Induction of apoptosis in monocytes and lymphocytes by serum from patients with systemic lupus erythematosus - an additional mechanism to increased autoantigen load? *Clin. Exp. Immunol.* *135*, 535–543.
- Bijl, M.**, Horst, G., Limburg, P.C., and Kallenberg, C.G. (2001). Effects of smoking on activation markers, Fas expression and apoptosis of peripheral blood lymphocytes. *Eur. J. Clin. Invest.* *31*, 550–553.

- Blair, P.A.**, Noreña, L.Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D.J., Isenberg, D.A., Ehrenstein, M.R., and Mauri, C. (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, 129–140.
- Block, S.R.**, Winfield, J.B., Lockshin, M.D., D'Angelo, W.A., and Christian, C.L. (1975). Studies of twins with systemic lupus erythematosus. A review of the literature and presentation of 12 additional sets. *Am. J. Med.* 59, 533–552.
- Bodaño, A.**, González, A., Ferreiros-Vidal, I., Balada, E., Ordi, J., Carreira, P., Gómez-Reino, J.J., and Conde, C. (2006). Association of a non-synonymous single-nucleotide polymorphism of DNASE1 with SLE susceptibility. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 45, 819–823.
- Bombardier, C.**, Gladman, D.D., Urowitz, M.B., Caron, D., and Chang, C.H. (1992). Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum.* 35, 630–640.
- Bonelli, M.**, Savitskaya, A., von Dalwigk, K., Steiner, C.W., Aletaha, D., Smolen, J.S., and Scheinecker, C. (2008). Quantitative and qualitative deficiencies of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Int. Immunol.* 20, 861–868.
- Botto, M.**, Dell'Agnola, C., Bygrave, A.E., Thompson, E.M., Cook, H.T., Petry, F., Loos, M., Pandolfi, P.P., and Walport, M.J. (1998). Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nat. Genet.* 19, 56–59.
- van Bruggen, M.C.**, Kramers, C., Walgreen, B., Elema, J.D., Kallenberg, C.G., van den Born, J., Smeenk, R.J., Assmann, K.J., Muller, S., Monestier, M., et al. (1997). Nucleosomes and histones are present in glomerular deposits in human lupus nephritis. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 12, 57–66.
- Cappione, A.**, Anolik, J.H., Pugh-Bernard, A., Barnard, J., Dutcher, P., Silverman, G., and Sanz, I. (2005). Germinal center exclusion of autoreactive B cells is defective in human systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 115, 3205–3216.
- Caricchio, R.**, McPhie, L., and Cohen, P.L. (2003). Ultraviolet B Radiation-Induced Cell Death: Critical Role of Ultraviolet Dose in Inflammation and Lupus Autoantigen Redistribution. *J. Immunol.* 171, 5778–5786.
- Casciola-Rosen, L.A.**, Anhalt, G., and Rosen, A. (1994). Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J. Exp. Med.* 179, 1317–1330.
- Chen, W.**, Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.-J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* 198, 1875–1886.
- Choi, J.-Y.**, Ho, J.H., Pasoto, S.G., Bunin, V., Kim, S.T., Carrasco, S., Borba, E.F., Gonçalves, C.R., Costa, P.R., Kallas, E.G., et al. (2015). Circulating follicular helper-like T cells in systemic lupus erythematosus: association with disease activity. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* 67, 988–999.
- Christensen, S.R.**, Shupe, J., Nickerson, K., Kashgarian, M., Flavell, R.A., and Shlomchik, M.J. (2006). Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. *Immunity* 25, 417–428.

- Churlaud, G.**, Pitoiset, F., Jebbawi, F., Lorenzon, R., Bellier, B., Rosenzweig, M., and Klatzmann, D. (2015). Human and Mouse CD8(+)CD25(+)FOXP3(+) Regulatory T Cells at Steady State and during Interleukin-2 Therapy. *Front. Immunol.* 6, 171.
- Cornacchia, E.**, Golbus, J., Maybaum, J., Strahler, J., Hanash, S., and Richardson, B. (1988). Hydralazine and procainamide inhibit T cell DNA methylation and induce autoreactivity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 140, 2197–2200.
- Cozzani, E.**, Drosera, M., Gasparini, G., Parodi, A., Cozzani, E., Drosera, M., Gasparini, G., and Parodi, A. (2014). Serology of Lupus Erythematosus: Correlation between Immunopathological Features and Clinical Aspects. *Autoimmune Dis. Autoimmune Dis.* 2014, 2014, e321359.
- Crispín, J.C.**, Oukka, M., Bayliss, G., Cohen, R.A., Van Beek, C.A., Stillman, I.E., Kyttaris, V.C., Juang, Y.-T., and Tsokos, G.C. (2008). Expanded Double Negative T Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus Produce IL-17 and Infiltrate the Kidneys. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 8761–8766.
- Deng, G.-M.**, Liu, L., Bahjat, F.R., Pine, P.R., and Tsokos, G.C. (2010). Suppression of skin and kidney disease by inhibition of spleen tyrosine kinase in lupus-prone mice. *Arthritis Rheum.* 62, 2086–2092.
- Dieker, J.**, Cisterna, B., Monneaux, F., Decossas, M., van der Vlag, J., Biggiogera, M., and Muller, S. (2008). Apoptosis-linked changes in the phosphorylation status and subcellular localization of the spliceosomal autoantigen U1-70K. *Cell Death Differ.* 15, 793–804.
- Ding, H.J.**, Denniston, A.K., Rao, V.K., and Gordon, C. (2015). Hydroxychloroquine-related retinal toxicity. *Rheumatology* kev357.
- Dolff, S.**, Abdulahad, W.H., Westra, J., Doornbos-van der Meer, B., Limburg, P.C., Kallenberg, C.G., and Bijl, M. (2011). Increase in IL-21 producing T-cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* 13, R157.
- Draborg, A.H.**, Duus, K., and Houen, G. (2012). Epstein-Barr Virus and Systemic Lupus Erythematosus. *Clin. Dev. Immunol.* 2012.
- Duddy, M.E.**, Alter, A., and Bar-Or, A. (2004). Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation? *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 172, 3422–3427.
- Edwards, L.J.**, Mizui, M., and Kyttaris, V. (2015). Signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 inhibition delays the onset of lupus nephritis in MRL/lpr mice. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 158, 221–230.
- Emlen, W.**, Niebur, J., and Kadera, R. (1994). Accelerated in vitro apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 152, 3685–3692.
- Enyedy, E.J.**, Mitchell, J.P., Nambiar, M.P., and Tsokos, G.C. (2001). Defective FcγRIIb1 signaling contributes to enhanced calcium response in B cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 101, 130–135.
- Friou, G.J.**, Finch, S.C., Detre, K.D., and Santarsiero, C. (1958). Interaction of Nuclei and Globulin from Lupus Erythematosus Serum Demonstrated with Fluorescent Antibody. *J. Immunol.* 80, 324–329.

- Furie, R.**, Stohl, W., Ginzler, E.M., Becker, M., Mishra, N., Chatham, W., Merrill, J.T., Weinstein, A., McCune, W.J., Zhong, J., et al. (2008). Biologic activity and safety of belimumab, a neutralizing anti-B-lymphocyte stimulator (BLyS) monoclonal antibody: a phase I trial in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* *10*, R109.
- Furie, R.**, Petri, M., Zamani, O., Cervera, R., Wallace, D.J., Tegzová, D., Sanchez-Guerrero, J., Schwarting, A., Merrill, J.T., Chatham, W.W., et al. (2011). A phase III, randomized, placebo-controlled study of belimumab, a monoclonal antibody that inhibits B lymphocyte stimulator, in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *63*, 3918–3930.
- Furie, R.A.**, Leon, G., Thomas, M., Petri, M.A., Chu, A.D., Hislop, C., Martin, R.S., Scheinberg, M.A., and PEARL-SC Study (2015). A phase 2, randomised, placebo-controlled clinical trial of blisibimod, an inhibitor of B cell activating factor, in patients with moderate-to-severe systemic lupus erythematosus, the PEARL-SC study. *Ann. Rheum. Dis.* *74*, 1667–1675.
- Giles, J.R.**, Kashgarian, M., Koni, P.A., and Shlomchik, M.J. (2015). B Cell-Specific MHC Class II Deletion Reveals Multiple Nonredundant Roles for B Cell Antigen Presentation in Murine Lupus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *195*, 2571–2579.
- Gómez-Puerta, J.A.**, Barbhuiya, M., Guan, H., Feldman, C.H., Alarcón, G.S., and Costenbader, K.H. (2015). Racial/Ethnic variation in all-cause mortality among United States medicaid recipients with systemic lupus erythematosus: a Hispanic and asian paradox. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* *67*, 752–760.
- González, D.A.**, Díaz, B.B., Rodríguez Pérez, M. del C., Hernández, A.G., Chico, B.N.D., and de León, A.C. (2010). Sex hormones and autoimmunity. *Immunol. Lett.* *133*, 6–13.
- Grayson, P.C.**, and Kaplan, M.J. (2016). At the Bench: Neutrophil extracellular traps (NETs) highlight novel aspects of innate immune system involvement in autoimmune diseases. *J. Leukoc. Biol.* *99*, 253–264.
- Greer, J.M.**, and McCombe, P.A. (2012). The role of epigenetic mechanisms and processes in autoimmune disorders. *Biol. Targets Ther.* *6*, 307–327.
- Grimaldi, C.M.** (2006). Sex and systemic lupus erythematosus: the role of the sex hormones estrogen and prolactin on the regulation of autoreactive B cells. *Curr. Opin. Rheumatol.* *18*, 456–461.
- Guerra, S.G.**, Vyse, T.J., and Cunninghame Graham, D.S. (2012). The genetics of lupus: a functional perspective. *Arthritis Res. Ther.* *14*, 211.
- Guillemin, F.**, Saraux, A., Guggenbuhl, P., Roux, C.H., Fardellone, P., Le Bihan, E., Cantagrel, A., Chary-Valckenaere, I., Euller-Ziegler, L., Flipo, R.-M., et al. (2005). Prevalence of rheumatoid arthritis in France: 2001. *Ann. Rheum. Dis.* *64*, 1427–1430.
- Hahn, B.H.** (2013). Belimumab for Systemic Lupus Erythematosus. *N. Engl. J. Med.* *368*, 1528–1535.
- Hahn, B.H.**, Singh, R.R., Wong, W.K., Tsao, B.P., Bulpitt, K., and Ebling, F.M. (2001). Treatment with a consensus peptide based on amino acid sequences in autoantibodies prevents T cell activation by autoantigens and delays disease onset in murine lupus. *Arthritis Rheum.* *44*, 432–441.
- Hahn, B.H.**, Anderson, M., Le, E., and La Cava, A. (2008). Anti-DNA Ig peptides promote Treg cell activity in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum.* *58*, 2488–2497.

- Harada, T.**, Kyttaris, V., Li, Y., Juang, Y.-T., Wang, Y., and Tsokos, G.C. (2007). Increased expression of STAT3 in SLE T cells contributes to enhanced chemokine-mediated cell migration. *Autoimmunity* *40*, 1–8.
- Hargraves, M.M.** (1969). Discovery of the LE cell and its morphology. *Mayo Clin. Proc.* *44*, 579–599.
- Harley, I.T.W.**, Kaufman, K.M., Langefeld, C.D., Harley, J.B., and Kelly, J.A. (2009). Genetic Susceptibility to Lupus: New Insights from fine mapping and genome-wide association studies. *Nat. Rev. Genet.* *10*, 285–290.
- Hayter, S.M.**, and Cook, M.C. (2012). Updated assessment of the prevalence, spectrum and case definition of autoimmune disease. *Autoimmun. Rev.* *11*, 754–765.
- Heinemann, K.**, Wilde, B., Hoerning, A., Tebbe, B., Kribben, A., Witzke, O., and Dolf, S. (2016). Decreased IL-10(+) regulatory B cells (Bregs) in lupus nephritis patients. *Scand. J. Rheumatol.* 1–5.
- Herber, D.**, Brown, T.P., Liang, S., Young, D.A., Collins, M., and Dunussi-Joannopoulos, K. (2007). IL-21 has a pathogenic role in a lupus-prone mouse model and its blockade with IL-21R.Fc reduces disease progression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 3822–3830.
- Hibbs, M.L.**, Tarlinton, D.M., Armes, J., Grail, D., Hodgson, G., Maglitta, R., Stacker, S.A., and Dunn, A.R. (1995). Multiple defects in the immune system of Lyn-deficient mice, culminating in autoimmune disease. *Cell* *83*, 301–311.
- Ho, V.**, Mclean, A., and Terry, S. (2008). Severe systemic lupus erythematosus induced by antiviral treatment for hepatitis C. *J. Clin. Rheumatol. Pract. Rep. Rheum. Musculoskelet. Dis.* *14*, 166–168.
- Hochberg, M.C.** (1997). Updating the American college of rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *40*, 1725–1725.
- Hof, D.**, Raats, J.M.H., and Pruijn, G.J.M. (2005). Apoptotic modifications affect the autoreactivity of the U1 snRNP autoantigen. *Autoimmun. Rev.* *4*, 380–388.
- Huck, S.**, Le Corre, R., Youinou, P., and Zouali, M. (2001). Expression of B cell receptor-associated signaling molecules in human lupus. *Autoimmunity* *33*, 213–224.
- Illei, G.G.**, Shirota, Y., Yarboro, C.H., Daruwalla, J., Tackey, E., Takada, K., Fleisher, T., Balow, J.E., and Lipsky, P.E. (2010). Tocilizumab in systemic lupus erythematosus: data on safety, preliminary efficacy, and impact on circulating plasma cells from an open-label phase I dosage-escalation study. *Arthritis Rheum.* *62*, 542–552.
- Jacobi, A.M.**, Odendahl, M., Reiter, K., Bruns, A., Burmester, G.R., Radbruch, A., Valet, G., Lipsky, P.E., and Dörner, T. (2003). Correlation between circulating CD27^{high} plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *48*, 1332–1342.
- Jeltsch-David, H.**, and Muller, S. (2014). Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus: pathogenesis and biomarkers. *Nat. Rev. Neurol.* *10*, 579–596.
- Joseph, F.G.**, and Scolding, N.J. (2010). Neurolyupus. *Pract. Neurol.* *10*, 4–15.

- Kaliyaperumal, A.**, Michaels, M.A., and Datta, S.K. (1999). Antigen-specific therapy of murine lupus nephritis using nucleosomal peptides: tolerance spreading impairs pathogenic function of autoimmune T and B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *162*, 5775–5783.
- Kalunian, K.C.**, Merrill, J.T., Maciuga, R., McBride, J.M., Townsend, M.J., Wei, X., Davis, J.C., and Kennedy, W.P. (2015). A Phase II study of the efficacy and safety of rontalizumab (rhuMAb interferon- α) in patients with systemic lupus erythematosus (ROSE). *Ann. Rheum. Dis.* annrheumdis-2014-206090.
- Kang, H.-K.**, Liu, M., and Datta, S.K. (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. Baltim. Md 1950* *178*, 7849–7858.
- Kim, I.**, Kim, Y.J., Kim, K., Kang, C., Choi, C.-B., Sung, Y.-K., Lee, H.-S., and Bae, S.-C. (2009). Genetic studies of systemic lupus erythematosus in Asia: where are we now? *Genes Immun.* *10*, 421–432.
- Kim, J.-M.**, Park, S.-H., Kim, H.-Y., and Kwok, S.-K. (2015). A Plasmacytoid Dendritic Cells-Type I Interferon Axis Is Critically Implicated in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *Int. J. Mol. Sci.* *16*, 14158–14170.
- Kitani, A.**, Hara, M., Hirose, T., Harigai, M., Suzuki, K., Kawakami, M., Kawaguchi, Y., Hidaka, T., Kawagoe, M., and Nakamura, H. (1992). Autostimulatory effects of IL-6 on excessive B cell differentiation in patients with systemic lupus erythematosus: analysis of IL-6 production and IL-6R expression. *Clin. Exp. Immunol.* *88*, 75–83.
- Klonowska-Szymczyk, A.**, Wolska, A., Robak, T., Cebula-Obrzut, B., Smolewski, P., and Robak, E. (2014). Expression of Toll-Like Receptors 3, 7, and 9 in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Mediat. Inflamm.* *2014*, e381418.
- Komatsuda, A.**, Wakui, H., Iwamoto, K., Ozawa, M., Togashi, M., Masai, R., Maki, N., Hatakeyama, T., and Sawada, K. (2008). Up-regulated expression of Toll-like receptors mRNAs in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* *152*, 482–487.
- Kremer, J.M.**, Genant, H.K., Moreland, L.W., Russell, A.S., Emery, P., Abud-Mendoza, C., Szechiński, J., Li, T., Teng, J., Becker, J.-C., et al. (2008). Results of a two-year followup study of patients with rheumatoid arthritis who received a combination of abatacept and methotrexate. *Arthritis Rheum.* *58*, 953–963.
- Kuhn, A.**, and Beissert, S. (2005). Photosensitivity in lupus erythematosus. *Autoimmunity* *38*, 519–529.
- Kumar, H.**, Kawai, T., and Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *Int. Rev. Immunol.* *30*, 16–34.
- Kyttaris, V.C.**, Wang, Y., Juang, Y.-T., Weinstein, A., and Tsokos, G.C. (2007). Increased Levels of NF-ATc2 Differentially Regulate CD154 and IL-2 Genes in T Cells from Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol.* *178*, 1960–1966.
- Kyttaris, V.C.**, Zhang, Z., Kampagianni, O., and Tsokos, G.C. (2011). Calcium signaling in systemic lupus erythematosus T cells: a treatment target. *Arthritis Rheum.* *63*, 2058–2066.
- La Cava, A.**, Ebling, F.M., and Hahn, B.H. (2004). Ig-reactive CD4+CD25+ T cells from tolerized (New Zealand Black x New Zealand White)F1 mice suppress in vitro production of antibodies to DNA. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *173*, 3542–3548.

- Lamoureux, J.L.**, Watson, L.C., Cherrier, M., Skog, P., Nemazee, D., and Feeney, A.J. (2007). Reduced receptor editing in lupus-prone MRL/lpr mice. *J. Exp. Med.* *204*, 2853–2864.
- Lande, R.**, Ganguly, D., Facchinetti, V., Frasca, L., Conrad, C., Gregorio, J., Meller, S., Chamilos, G., Sebasigari, R., Ricciari, V., et al. (2011). Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* *3*, 73ra19.
- Lauwerys, B.R.**, Hachulla, E., Spertini, F., Lazaro, E., Jorgensen, C., Mariette, X., Haelterman, E., Grouard-Vogel, G., Fanget, B., Dhellin, O., et al. (2013). Down-regulation of interferon signature in systemic lupus erythematosus patients by active immunization with interferon α -kinoid. *Arthritis Rheum.* *65*, 447–456.
- Le Coz, C.**, Joublin, A., Pasquali, J.-L., Korganow, A.-S., Dumortier, H., and Monneaux, F. (2013). Circulating TFH subset distribution is strongly affected in lupus patients with an active disease. *PloS One* *8*, e75319.
- Lioussis, S.N.**, Kovacs, B., Dennis, G., Kammer, G.M., and Tsokos, G.C. (1996). B cells from patients with systemic lupus erythematosus display abnormal antigen receptor-mediated early signal transduction events. *J. Clin. Invest.* *98*, 2549–2557.
- Liu, Y.**, Chen, Y., and Richardson, B. (2009). Decreased DNA methyltransferase levels contribute to abnormal gene expression in “senescent” CD4(+)CD28(-) T cells. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *132*, 257–265.
- Liu, Y.**, Liao, J., Zhao, M., Wu, H., Yung, S., Chan, T.M., Yoshimura, A., and Lu, Q. (2015). Increased expression of TLR2 in CD4(+) T cells from SLE patients enhances immune reactivity and promotes IL-17 expression through histone modifications. *Eur. J. Immunol.* *45*, 2683–2693.
- Liu, Z.**, Bethunaickan, R., Huang, W., Lodhi, U., Solano, I., Madaio, M.P., and Davidson, A. (2011). Interferon- α accelerates murine systemic lupus erythematosus in a T cell-dependent manner. *Arthritis Rheum.* *63*, 219–229.
- Looney, R.J.**, Anolik, J.H., Campbell, D., Felgar, R.E., Young, F., Arend, L.J., Sloand, J.A., Rosenblatt, J., and Sanz, I. (2004). B cell depletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus: a phase I/II dose-escalation trial of rituximab. *Arthritis Rheum.* *50*, 2580–2589.
- Lu, Q.**, Kaplan, M., Ray, D., Ray, D., Zacharek, S., Gutsch, D., and Richardson, B. (2002). Demethylation of ITGAL (CD11a) regulatory sequences in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *46*, 1282–1291.
- Lu, Q.**, Wu, A., Tesmer, L., Ray, D., Yousif, N., and Richardson, B. (2007). Demethylation of CD40LG on the inactive X in T cells from women with lupus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *179*, 6352–6358.
- Luger, D.**, Dayan, M., Zinger, H., Liu, J.-P., and Mozes, E. (2004). A peptide based on the complementarity determining region 1 of a human monoclonal autoantibody ameliorates spontaneous and induced lupus manifestations in correlation with cytokine immunomodulation. *J. Clin. Immunol.* *24*, 579–590.
- Majka, D.S.**, and Holers, V.M. (2006). Cigarette smoking and the risk of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *65*, 561–563.
- Mason, L.J.**, Ravirajan, C.T., Rahman, A., Putterman, C., and Isenberg, D.A. (2004). Is alpha-actinin a target for pathogenic anti-DNA antibodies in lupus nephritis? *Arthritis Rheum.* *50*, 866–870.

- Mathian, A.**, Hie, M., Cohen-Aubart, F., and Amoura, Z. (2015). Targeting interferons in systemic lupus erythematosus: current and future prospects. *Drugs* 75, 835–846.
- McConnell, J.R.**, Crockard, A.D., Cairns, A.P., and Bell, A.L. (2002). Neutrophils from systemic lupus erythematosus patients demonstrate increased nuclear DNA damage. *Clin. Exp. Rheumatol.* 20, 653–660.
- McGrath, H.** (1994). Ultraviolet-A1 irradiation decreases clinical disease activity and autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Rheumatol.* 12, 129–135.
- Merrill, J.T.**, Neuwelt, C.M., Wallace, D.J., Shanahan, J.C., Latinis, K.M., Oates, J.C., Utset, T.O., Gordon, C., Isenberg, D.A., Hsieh, H.-J., et al. (2010a). Efficacy and safety of rituximab in moderately-to-severely active systemic lupus erythematosus: the randomized, double-blind, phase II/III systemic lupus erythematosus evaluation of rituximab trial. *Arthritis Rheum.* 62, 222–233.
- Merrill, J.T.**, Burgos-Vargas, R., Westhovens, R., Chalmers, A., D’Cruz, D., Wallace, D.J., Bae, S.C., Sigal, L., Becker, J.-C., Kelly, S., et al. (2010b). The efficacy and safety of abatacept in patients with non-life-threatening manifestations of systemic lupus erythematosus: results of a twelve-month, multicenter, exploratory, phase IIb, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 62, 3077–3087.
- Mevorach, D.**, Zhou, J.L., Song, X., and Elkon, K.B. (1998). Systemic exposure to irradiated apoptotic cells induces autoantibody production. *J. Exp. Med.* 188, 387–392.
- Mishra, N.**, Reilly, C.M., Brown, D.R., Ruiz, P., and Gilkeson, G.S. (2003). Histone deacetylase inhibitors modulate renal disease in the MRL-lpr/lpr mouse. *J. Clin. Invest.* 111, 539–552.
- Mok, C.C.** (2015). Current role of rituximab in systemic lupus erythematosus. *Int. J. Rheum. Dis.* 18, 154–163.
- Monneaux, F.**, Dumortier, H., Steiner, G., Briand, J.P., and Muller, S. (2001). Murine models of systemic lupus erythematosus: B and T cell responses to spliceosomal ribonucleoproteins in MRL/Fas(lpr) and (NZB x NZW)F(1) lupus mice. *Int. Immunol.* 13, 1155–1163.
- Moulton, V.R.**, and Tsokos, G.C. (2011). Abnormalities of T cell signaling in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* 13, 207.
- Moulton, V.R.**, and Tsokos, G.C. (2015). T cell signaling abnormalities contribute to aberrant immune cell function and autoimmunity. *J. Clin. Invest.* 125, 2220–2227.
- Munoz, L.E.**, Gaipal, U.S., Franz, S., Sheriff, A., Voll, R.E., Kalden, J.R., and Herrmann, M. (2005). SLE--a disease of clearance deficiency? *Rheumatol. Oxf. Engl.* 44, 1101–1107.
- Mysler, E.F.**, Spindler, A.J., Guzman, R., Bijl, M., Jayne, D., Furie, R.A., Houssiau, F.A., Drappa, J., Close, D., Maciuga, R., et al. (2013). Efficacy and safety of ocrelizumab in active proliferative lupus nephritis: results from a randomized, double-blind, phase III study. *Arthritis Rheum.* 65, 2368–2379.
- Nambiar, M.P.**, Fisher, C.U., Warke, V.G., Krishnan, S., Mitchell, J.P., Delaney, N., and Tsokos, G.C. (2003). Reconstitution of deficient T cell receptor zeta chain restores T cell signaling and augments T cell receptor/CD3-induced interleukin-2 production in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 48, 1948–1955.

- Navarra, S.V.**, Guzmán, R.M., Gallacher, A.E., Hall, S., Levy, R.A., Jimenez, R.E., Li, E.K.-M., Thomas, M., Kim, H.-Y., León, M.G., et al. (2011). Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Lond. Engl.* *377*, 721–731.
- Nickerson, K.M.**, Christensen, S.R., Shupe, J., Kashgarian, M., Kim, D., Elkon, K., and Shlomchik, M.J. (2010). TLR9 Regulates TLR7- and MyD88-Dependent Autoantibody Production and Disease in a Murine Model of Lupus. *J. Immunol.* *184*, 1840–1848.
- Nursamaa Abdoel, S.B.** (2012). Linker for activation of T cells is displaced from lipid rafts and decreases in lupus T cells after activation via the TCR/CD3 pathway. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *142*, 243–251.
- Nutt, S.L.**, and Tarlinton, D.M. (2011). Germinal center B and follicular helper T cells: siblings, cousins or just good friends? *Nat. Immunol.* *12*, 472–477.
- Odendahl, M.**, Jacobi, A., Hansen, A., Feist, E., Hiepe, F., Burmester, G.R., Lipsky, P.E., Radbruch, A., and Dörner, T. (2000). Disturbed Peripheral B Lymphocyte Homeostasis in Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol.* *165*, 5970–5979.
- Ogden, C.A.**, Kowalewski, R., Peng, Y., Montenegro, V., and Elkon, K.B. (2005). IGM is required for efficient complement mediated phagocytosis of apoptotic cells in vivo. *Autoimmunity* *38*, 259–264.
- Pacheco, G.V.**, Novelo Noh, I.B., Velasco Cárdenas, R.M.-H., Angulo Ramírez, A.V., López Villanueva, R.F., Quintal Ortiz, I.G., Alonso Salomón, L.G., Ruz, N.P., and Rivero Cárdenas, N.A. (2016). Expression of TLR-7, MyD88, NF- κ B, and INF- α in B Lymphocytes of Mayan Women with Systemic Lupus Erythematosus in Mexico. *Front. Immunol.* *7*, 22.
- Page, N.**, Gros, F., Schall, N., Décossas, M., Bagnard, D., Briand, J.-P., and Muller, S. (2011). HSC70 blockade by the therapeutic peptide P140 affects autophagic processes and endogenous MHCII presentation in murine lupus. *Ann. Rheum. Dis.* *70*, 837–843.
- Parietti, V.**, Monneaux, F., Décossas, M., and Muller, S. (2008). Function of CD4⁺,CD25⁺ Treg cells in MRL/lpr mice is compromised by intrinsic defects in antigen-presenting cells and effector T cells. *Arthritis Rheum.* *58*, 1751–1761.
- Pawar, R.D.**, Ramanjaneyulu, A., Kulkarni, O.P., Lech, M., Segerer, S., and Anders, H.-J. (2007). Inhibition of Toll-like receptor-7 (TLR-7) or TLR-7 plus TLR-9 attenuates glomerulonephritis and lung injury in experimental lupus. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *18*, 1721–1731.
- Perry, D.**, Sang, A., Yin, Y., Zheng, Y.-Y., Morel, L., Perry, D., Sang, A., Yin, Y., Zheng, Y.-Y., and Morel, L. (2011). Murine Models of Systemic Lupus Erythematosus. *BioMed Res. Int.* *2011*, e271694.
- Petri, M.** (2002). Epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* *16*, 847–858.
- Petri, M.** (2008). Sex hormones and systemic lupus erythematosus. *Lupus* *17*, 412–415.
- Petri, M.**, Stohl, W., Chatham, W., McCune, W.J., Chevrier, M., Ryel, J., Recta, V., Zhong, J., and Freimuth, W. (2008). Association of plasma B lymphocyte stimulator levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *58*, 2453–2459.
- Poole, B.D.**, Scofield, R.H., Harley, J.B., and James, J.A. (2006). Epstein-Barr virus and molecular mimicry in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* *39*, 63–70.

- Rai, R.**, and Swetha, T. (2015). Association of anti-phospholipid antibodies with connective tissue diseases. *Indian Dermatol. Online J.* 6, 89–91.
- Rider, V.**, Jones, S.R., Evans, M., and Abdou, N.I. (2000). Molecular mechanisms involved in the estrogen-dependent regulation of calcineurin in systemic lupus erythematosus T cells. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 95, 124–134.
- Rigante, D.**, and Esposito, S. (2015). Infections and Systemic Lupus Erythematosus: Binding or Sparring Partners? *Int. J. Mol. Sci.* 16, 17331–17343.
- Rosser, E.C.**, and Mauri, C. (2015). Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function. *Immunity* 42, 607–612.
- Rovin, B.H.**, Furie, R., Latinis, K., Looney, R.J., Fervenza, F.C., Sanchez-Guerrero, J., Maciucă, R., Zhang, D., Garg, J.P., Brunetta, P., et al. (2012). Efficacy and safety of rituximab in patients with active proliferative lupus nephritis: the Lupus Nephritis Assessment with Rituximab study. *Arthritis Rheum.* 64, 1215–1226.
- Schall, N.**, and Muller, S. (2015). Resetting the autoreactive immune system with a therapeutic peptide in lupus. *Lupus* 24, 412–418.
- Scofield, R.H.**, and Oates, J.C. (2009). The place of William Osler in the description of systemic lupus erythematosus. *Am. J. Med. Sci.* 338, 409–412.
- Shah, K.**, Lee, W.-W., Lee, S.-H., Kim, S.H., Kang, S.W., Craft, J., and Kang, I. (2010). Dysregulated balance of Th17 and Th1 cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* 12, R53.
- Sharabi, A.**, Zinger, H., Zborowsky, M., Stoecker, Z.M., and Mozes, E. (2006). A peptide based on the complementarity-determining region 1 of an autoantibody ameliorates lupus by up-regulating CD4+CD25+ cells and TGF- β . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 8810–8815.
- Sims, G.P.**, Ettinger, R., Shirota, Y., Yarboro, C.H., Illei, G.G., and Lipsky, P.E. (2005). Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood* 105, 4390–4398.
- Singh, R.P.**, La Cava, A., and Hahn, B.H. (2008). pConsensus peptide induces tolerogenic CD8+ T cells in lupus-prone (NZB x NZW)F1 mice by differentially regulating Foxp3 and PD1 molecules. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 180, 2069–2080.
- Smith, C.D.**, and Cyr, M. (1988). The history of lupus erythematosus. From Hippocrates to Osler. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 14, 1–14.
- Susan Yung**, Tak Mao Chan, Odobasic, D., and Phan, T.G. (2015). Mechanisms of kidney injury in lupus nephritis - the role of anti-dsDNA antibodies. *Front. Immunol.* 1–11.
- Tan, E.M.**, Cohen, A.S., Fries, J.F., Masi, A.T., McShane, D.J., Rothfield, N.F., Schaller, J.G., Talal, N., and Winchester, R.J. (1982). The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 25, 1271–1277.
- Tas, S.W.**, Quartier, P., Botto, M., and Fossati-Jimack, L. (2006). Macrophages from patients with SLE and rheumatoid arthritis have defective adhesion in vitro, while only SLE macrophages have impaired uptake of apoptotic cells. *Ann. Rheum. Dis.* 65, 216–221.

- Taylor, P.R.**, Carugati, A., Fadok, V.A., Cook, H.T., Andrews, M., Carroll, M.C., Savill, J.S., Henson, P.M., Botto, M., and Walport, M.J. (2000). A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo. *J. Exp. Med.* *192*, 359–366.
- Teichmann, L.L.**, Ols, M.L., Kashgarian, M., Reizis, B., Kaplan, D.H., and Shlomchik, M.J. (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*, 967–978.
- Turner-Stokes, T.**, Lu, T.Y., Ehrenstein, M.R., Giles, I., Rahman, A., and Isenberg, D.A. (2011). The efficacy of repeated treatment with B-cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus: an evaluation. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *50*, 1401–1408.
- Urowitz, M.B.**, Isenberg, D.A., and Wallace, D.J. (2015). Safety and efficacy of hCDR1 (Edratide) in patients with active systemic lupus erythematosus: results of phase II study. *Lupus Sci. Med.* *2*, e000104.
- Vedove, C.D.**, Del Giglio, M., Schena, D., and Girolomoni, G. (2009). Drug-induced lupus erythematosus. *Arch. Dermatol. Res.* *301*, 99–105.
- Vinuesa, C.G.**, Linterman, M.A., Yu, D., and MacLennan, I.C.M. (2016). Follicular Helper T Cells. *Annu. Rev. Immunol.* *34*, null.
- Wallace, D.J.**, Stohl, W., Furie, R.A., Lisse, J.R., McKay, J.D., Merrill, J.T., Petri, M.A., Ginzler, E.M., Chatham, W.W., McCune, W.J., et al. (2009). A phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *61*, 1168–1178.
- Wallace, D.J.**, Kalunian, K., Petri, M.A., Strand, V., Houssiau, F.A., Pike, M., Kilgallen, B., Bongardt, S., Barry, A., Kelley, L., et al. (2014). Efficacy and safety of epratuzumab in patients with moderate/severe active systemic lupus erythematosus: results from EMBLEM, a phase IIb, randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre study. *Ann. Rheum. Dis.* *73*, 183–190.
- Walport, M.J.**, Davies, K.A., and Botto, M. (1998). C1q and systemic lupus erythematosus. *Immunobiology* *199*, 265–285.
- Weening, J.J.**, D'Agati, V.D., Schwartz, M.M., Seshan, S.V., Alpers, C.E., Appel, G.B., Balow, J.E., Bruijn, J.A., Cook, T., Ferrario, F., et al. (2004). The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *J. Am. Soc. Nephrol.* *JASN* *15*, 241–250.
- Wong, C.K.**, Ho, C.Y., Li, E.K., and Lam, C.W. (2000). Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* *9*, 589–593.
- Wong, C.K.**, Wong, P.T.Y., Tam, L.S., Li, E.K., Chen, D.P., and Lam, C.W.K. (2010). Activation profile of Toll-like receptors of peripheral blood lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* *159*, 11–22.
- Yang, J.-H.**, Zhang, J., Cai, Q., Zhao, D.-B., Wang, J., Guo, P.-E., Liu, L., Han, X.-H., and Shen, Q. (2005). Expression and function of inducible costimulator on peripheral blood T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *44*, 1245–1254.

- Yang, M.-J.**, Chen, C.-Y., Chang, W.-H., Tseng, J.-Y., and Yeh, C.-C. (2015). Pregnancy outcome of systemic lupus erythematosus in relation to lupus activity before and during pregnancy. *J. Chin. Med. Assoc. J. CMA* 78, 235–240.
- Yang, W.**, Tang, H., Zhang, Y., Tang, X., Zhang, J., Sun, L., Yang, J., Cui, Y., Zhang, L., Hirankarn, N., et al. (2013). Meta-analysis followed by replication identifies loci in or near CDKN1B, TET3, CD80, DRAM1, and ARID5B as associated with systemic lupus erythematosus in Asians. *Am. J. Hum. Genet.* 92, 41–51.
- Yates, J.**, Whittington, A., Mitchell, P., Lechler, R.I., Lightstone, L., and Lombardi, G. (2008). Natural regulatory T cells: number and function are normal in the majority of patients with lupus nephritis. *Clin. Exp. Immunol.* 153, 44–55.
- Yurasov, S.**, Wardemann, H., Hammersen, J., Tsuiji, M., Meffre, E., Pascual, V., and Nussenzweig, M.C. (2005). Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* 201, 703–711.
- Zhang, Q.**, and Vignali, D.A.A. (2016). Review: Co-stimulatory and Co-inhibitory Pathways in Autoimmunity. *Immunity* 44, 1034–1051.
- Zhang, H.-L.**, Xu, S.-C., Tang, D.-S., Liang, D., and Liu, H.-F. (2011). Seasonal distribution of active systemic lupus erythematosus and its correlation with meteorological factors. *Clinics* 66, 1009–1013.
- Zhang, Z.**, Song, L., Maurer, K., Petri, M.A., and Sullivan, K.E. (2010). Global H4 acetylation analysis by ChIP-chip in systemic lupus erythematosus monocytes. *Genes Immun.* 11, 124–133.
- Zhou, Y.**, and Lu, Q. (2008). DNA methylation in T cells from idiopathic lupus and drug-induced lupus patients. *Autoimmun. Rev.* 7, 376–383.
- Zhou, X.**, Lu, X., Lv, J., Yang, H., Qin, L., Zhao, M., Su, Y., Li, Z., and Zhang, H. (2011). Genetic association of PRDM1-ATG5 intergenic region and autophagy with systemic lupus erythematosus in a Chinese population. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 1330–1337.

BIBLIOGRAPHIE : Partie 2 : Une nouvelle stratégie thérapeutique : le peptide P140, un immunomodulateur de la maladie lupique

- Agarraberes, F.A.**, Terlecky, S.R., and Dice, J.F. (1997). An intralysosomal hsp70 is required for a selective pathway of lysosomal protein degradation. *J. Cell Biol.* *137*, 825–834.
- Alessandri, C.**, Barbati, C., Vacirca, D., Piscopo, P., Confaloni, A., Sanchez, M., Maselli, A., Colasanti, T., Conti, F., Truglia, S., et al. (2012). T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus are resistant to induction of autophagy. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *26*, 4722–4732.
- Arias, E.**, Koga, H., Diaz, A., Mocholi, E., Patel, B., and Cuervo, A.M. (2015). Lysosomal mTORC2/PHLPP1/Akt Regulate Chaperone-Mediated Autophagy. *Mol. Cell* *59*, 270–284.
- Awan, M.U.F.**, and Deng, Y. (2014). Role of autophagy and its significance in cellular homeostasis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *98*, 5319–5328.
- Baek, K.-H.**, Park, J., and Shin, I. (2012). Autophagy-regulating small molecules and their therapeutic applications. *Chem. Soc. Rev.* *41*, 3245–3263.
- Bandyopadhyay, U.**, Kaushik, S., Varticovski, L., and Cuervo, A.M. (2008). The Chaperone-Mediated Autophagy Receptor Organizes in Dynamic Protein Complexes at the Lysosomal Membrane. *Mol. Cell Biol.* *28*, 5747–5763.
- Bandyopadhyay, U.**, Sridhar, S., Kaushik, S., Kiffin, R., and Cuervo, A.M. (2010). NOVEL REGULATORS OF CHAPERONE-MEDIATED AUTOPHAGY. *Mol. Cell* *39*, 535–547.
- Barcellos, L.F.**, May, S.L., Ramsay, P.P., Quach, H.L., Lane, J.A., Nititham, J., Noble, J.A., Taylor, K.E., Quach, D.L., Chung, S.A., et al. (2009). High-Density SNP Screening of the Major Histocompatibility Complex in Systemic Lupus Erythematosus Demonstrates Strong Evidence for Independent Susceptibility Regions. *PLoS Genet* *5*, e1000696.
- Blum, J.S.**, Wearsch, P.A., and Cresswell, P. (2013). Pathways of antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* *31*, 443–473.
- Bonelli, M.**, Savitskaya, A., von Dalwigk, K., Steiner, C.W., Aletaha, D., Smolen, J.S., and Scheinecker, C. (2008). Quantitative and qualitative deficiencies of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Int. Immunol.* *20*, 861–868.
- Bronietzki, A.W.**, Schuster, M., and Schmitz, I. (2015). Autophagy in T-cell development, activation and differentiation. *Immunol. Cell Biol.* *93*, 25–34.
- Clarke, A.J.**, Ellinghaus, U., Cortini, A., Stranks, A., Simon, A.K., Botto, M., and Vyse, T.J. (2014). Autophagy is activated in systemic lupus erythematosus and required for plasmablast development. *Ann. Rheum. Dis.*
- Codogno, P.**, and Meijer, A.J. (2006). Atg5: more than an autophagy factor. *Nat. Cell Biol.* *8*, 1045–1047.
- Crotzer, V.L.**, and Blum, J.S. (2009). Autophagy and its role in MHC-mediated antigen presentation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 3335–3341.

- Cuervo, A.M.**, and Dice, J.F. (1996). A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* 273, 501–503.
- Cuervo, A.M.**, and Dice, J.F. (2000). Regulation of lamp2a levels in the lysosomal membrane. *Traffic Cph. Den.* 1, 570–583.
- Cuervo, A.M.**, and Wong, E. (2014). Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res.* 24, 92–104.
- Cuervo, A.M.**, Hu, W., Lim, B., and Dice, J.F. (1998). IκB Is a Substrate for a Selective Pathway of Lysosomal Proteolysis. *Mol. Biol. Cell* 9, 1995–2010.
- Cuervo, A.M.**, Mann, L., Bonten, E.J., d’Azzo, A., and Dice, J.F. (2003). Cathepsin A regulates chaperone-mediated autophagy through cleavage of the lysosomal receptor. *EMBO J.* 22, 47–59.
- Darrasse-Jèze, G.**, Deroubaix, S., Mouquet, H., Victora, G.D., Eisenreich, T., Yao, K., Masilamani, R.F., Dustin, M.L., Rudensky, A., Liu, K., et al. (2009). Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* 206, 1853–1862.
- von Delwig, A.**, Hilkens, C.M.U., Altmann, D.M., Holmdahl, R., Isaacs, J.D., Harding, C.V., Robertson, H., McKie, N., and Robinson, J.H. (2006). Inhibition of macropinocytosis blocks antigen presentation of type II collagen in vitro and in vivo in HLA-DR1 transgenic mice. *Arthritis Res. Ther.* 8, R93.
- Dengjel, J.**, Schoor, O., Fischer, R., Reich, M., Kraus, M., Müller, M., Kreymborg, K., Altenberend, F., Brandenburg, J., Kalbacher, H., et al. (2005). Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 7922–7927.
- Deretic, V.**, Saitoh, T., and Akira, S. (2013). Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 722–737.
- Dieker, J.**, Cisterna, B., Monneaux, F., Decossas, M., van der Vlag, J., Biggiogera, M., and Muller, S. (2008). Apoptosis-linked changes in the phosphorylation status and subcellular localization of the spliceosomal autoantigen U1-70K. *Cell Death Differ.* 15, 793–804.
- Eisenberg-Lerner, A.**, Bialik, S., Simon, H.-U., and Kimchi, A. (2009). Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ.* 16, 966–975.
- Fleming, A.**, Noda, T., Yoshimori, T., and Rubinsztein, D.C. (2011). Chemical modulators of autophagy as biological probes and potential therapeutics. *Nat. Chem. Biol.* 7, 9–17.
- Franch, H.A.**, Sooparb, S., Du, J., and Brown, N.S. (2001). A Mechanism Regulating Proteolysis of Specific Proteins during Renal Tubular Cell Growth. *J. Biol. Chem.* 276, 19126–19131.
- Francisco, L.M.**, Sage, P.T., and Sharpe, A.H. (2010). The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol. Rev.* 236, 219–242.
- Fred Dice, J.** (1990). Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* 15, 305–309.
- Funderburk, S.F.**, Wang, Q.J., and Yue, Z. (2010). The Beclin 1-VPS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends Cell Biol.* 20, 355–362.

- Giles, J.R.**, Kashgarian, M., Koni, P.A., and Shlomchik, M.J. (2015). B Cell-Specific MHC Class II Deletion Reveals Multiple Nonredundant Roles for B Cell Antigen Presentation in Murine Lupus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *195*, 2571–2579.
- Gros, F.**, and Muller, S. (2014). Pharmacological regulators of autophagy and their link with modulators of lupus disease. *Br. J. Pharmacol.* *171*, 4337–4359.
- Gros, F.**, Arnold, J., Page, N., Décossas, M., Korganow, A.-S., Martin, T., and Muller, S. (2012). Macroautophagy is deregulated in murine and human lupus T lymphocytes. *Autophagy* *8*, 1054–1053.
- Hampe, J.**, Franke, A., Rosenstiel, P., Till, A., Teuber, M., Huse, K., Albrecht, M., Mayr, G., De La Vega, F.M., Briggs, J., et al. (2007). A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat. Genet.* *39*, 207–211.
- Henault, J.**, Martinez, J., Riggs, J.M., Tian, J., Mehta, P., Clarke, L., Sasai, M., Latz, E., Brinkmann, M.M., Iwasaki, A., et al. (2012). Noncanonical autophagy is required for type I interferon secretion in response to DNA-immune complexes. *Immunity* *37*, 986–997.
- Hopp, A.-K.**, Rupp, A., and Lukacs-Kornek, V. (2014). Self-antigen presentation by dendritic cells in autoimmunity. *Front. Immunol.* *5*, 55.
- Hubbard, V.M.**, Valdor, R., Patel, B., Singh, R., Cuervo, A.M., and Macian, F. (2010). Macroautophagy regulates energy metabolism during effector T cell activation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 7349–7357.
- International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus Genetics (SLEGEN)**, Harley, J.B., Alarcón-Riquelme, M.E., Criswell, L.A., Jacob, C.O., Kimberly, R.P., Moser, K.L., Tsao, B.P., Vyse, T.J., Langefeld, C.D., 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*, 204–210.
- Itakura, E.**, Kishi, C., Inoue, K., and Mizushima, N. (2008). Beclin 1 Forms Two Distinct Phosphatidylinositol 3-Kinase Complexes with Mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol. Biol. Cell* *19*, 5360–5372.
- Jagannath, C.**, Lindsey, D.R., Dhandayuthapani, S., Xu, Y., Hunter, R.L., and Eissa, N.T. (2009). Autophagy enhances the efficacy of BCG vaccine by increasing peptide presentation in mouse dendritic cells. *Nat. Med.* *15*, 267–276.
- Järvinen, T.M.**, Hellquist, A., Zucchelli, M., Koskenmies, S., Panelius, J., Hasan, T., Julkunen, H., D’Amato, M., and Kere, J. (2012). Replication of GWAS-identified systemic lupus erythematosus susceptibility genes affirms B-cell receptor pathway signalling and strengthens the role of IRF5 in disease susceptibility in a Northern European population. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *51*, 87–92.
- Kambayashi, T.**, and Laufer, T.M. (2014). Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 719–730.
- Kaushik, S.**, and Cuervo, A.M. (2012). Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol.* *22*, 407–417.
- Kaushik, S.**, Massey, A.C., and Cuervo, A.M. (2006). Lysosome membrane lipid microdomains: novel regulators of chaperone-mediated autophagy. *EMBO J.* *25*, 3921–3933.

- Kaushik, S.,** Massey, A.C., Mizushima, N., and Cuervo, A.M. (2008). Constitutive Activation of Chaperone-mediated Autophagy in Cells with Impaired Macroautophagy. *Mol. Biol. Cell* *19*, 2179–2192.
- Kim, I.,** Kim, Y.J., Kim, K., Kang, C., Choi, C.-B., Sung, Y.-K., Lee, H.-S., and Bae, S.-C. (2009). Genetic studies of systemic lupus erythematosus in Asia: where are we now? *Genes Immun.* *10*, 421–432.
- Klionsky, D.J.,** and Emr, S.D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* *290*, 1717–1721.
- Koga, H.,** Martinez-Vicente, M., Macian, F., Verkhusha, V.V., and Cuervo, A.M. (2011). A photoconvertible fluorescent reporter to track chaperone-mediated autophagy. *Nat. Commun.* *2*, 386.
- Lee, H.K.,** Lund, J.M., Ramanathan, B., Mizushima, N., and Iwasaki, A. (2007). Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science* *315*, 1398–1401.
- Levine, B.,** Mizushima, N., and Virgin, H.W. (2011). Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* *469*, 323–335.
- Liang, C.,** Lee, J., Inn, K., Gack, M.U., Li, Q., Roberts, E.A., Vergne, I., Deretic, V., Feng, P., Akazawa, C., et al. (2008). Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat. Cell Biol.* *10*, 776–787.
- Lui, S.L.,** Yung, S., Tsang, R., Zhang, F., Chan, K.W., Tam, S., and Chan, T.M. (2008). Rapamycin prevents the development of nephritis in lupus-prone NZB/W F1 mice. *Lupus* *17*, 305–313.
- Lv, L.,** Li, D., Zhao, D., Lin, R., Chu, Y., Zhang, H., Zha, Z., Liu, Y., Li, Z., Xu, Y., et al. (2011). Acetylation targets the M2 isoform of pyruvate kinase for degradation through chaperone-mediated autophagy and promotes tumor growth. *Mol. Cell* *42*, 719–730.
- Macri, C.,** Wang, F., Tasset, I., Schall, N., Page, N., Briand, J.-P., Cuervo, A.M., and Muller, S. (2015). Modulation of deregulated chaperone-mediated autophagy by a phosphopeptide. *Autophagy* *11*, 472–486.
- Marchiando, A.M.,** Ramanan, D., Ding, Y., Gomez, L.E., Hubbard-Lucey, V.M., Maurer, K., Wang, C., Ziel, J.W., van Rooijen, N., Nunez, G., et al. (2013). A deficiency in the autophagy gene Atg16L1 enhances resistance to enteric bacterial infection. *Cell Host Microbe* *14*.
- Massey, A.C.,** Kaushik, S., Sovak, G., Kiffin, R., and Cuervo, A.M. (2006). Consequences of the selective blockage of chaperone-mediated autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 5805–5810.
- McCormick, P.J.,** Martina, J.A., and Bonifacino, J.S. (2005). Involvement of clathrin and AP-2 in the trafficking of MHC class II molecules to antigen-processing compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 7910–7915.
- Mizushima, N.,** Levine, B., Cuervo, A.M., and Klionsky, D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* *451*, 1069–1075.
- Mizushima, N.,** Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *27*, 107–132.
- Molitoris, J.K.,** McColl, K.S., Swerdlow, S., Matsuyama, M., Lam, M., Finkel, T.H., Matsuyama, S., and Distelhorst, C.W. (2011). Glucocorticoid elevation of dexamethasone-induced gene 2

- (Dig2/RTP801/REDD1) protein mediates autophagy in lymphocytes. *J. Biol. Chem.* *286*, 30181–30189.
- Monneaux, F.**, Briand, J.P., and Muller, S. (2000). B and T cell immune response to small nuclear ribonucleoprotein particles in lupus mice: autoreactive CD4(+) T cells recognize a T cell epitope located within the RNP80 motif of the 70K protein. *Eur. J. Immunol.* *30*, 2191–2200.
- Monneaux, F.**, Dumortier, H., Steiner, G., Briand, J.P., and Muller, S. (2001). Murine models of systemic lupus erythematosus: B and T cell responses to spliceosomal ribonucleoproteins in MRL/Fas(lpr) and (NZB x NZW)F(1) lupus mice. *Int. Immunol.* *13*, 1155–1163.
- Monneaux, F.**, Lozano, J.M., Patarroyo, M.E., Briand, J.-P., and Muller, S. (2003). T cell recognition and therapeutic effect of a phosphorylated synthetic peptide of the 70K snRNP protein administered in MRL/lpr mice. *Eur. J. Immunol.* *33*, 287–296.
- Monneaux, F.**, Parietti, V., Briand, J.-P., and Muller, S. (2004). Intramolecular T cell spreading in unprimed MRL/lpr mice: importance of the U1-70k protein sequence 131-151. *Arthritis Rheum.* *50*, 3232–3238.
- Monneaux, F.**, Hoebeke, J., Sordet, C., Nonn, C., Briand, J.-P., Maillère, B., Sibillia, J., and Muller, S. (2005). Selective modulation of CD4+ T cells from lupus patients by a promiscuous, protective peptide analog. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *175*, 5839–5847.
- Monneaux, F.**, Parietti, V., Briand, J.-P., and Muller, S. (2007). Importance of spliceosomal RNP1 motif for intermolecular T-B cell spreading and tolerance restoration in lupus. *Arthritis Res. Ther.* *9*, R111.
- Mozaffarian, N.**, Wiedeman, A.E., and Stevens, A.M. (2008). Active systemic lupus erythematosus is associated with failure of antigen-presenting cells to express programmed death ligand-1. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *47*, 1335–1341.
- Muller, S.**, Monneaux, F., Schall, N., Rashkov, R.K., Oparanov, B.A., Wiesel, P., Geiger, J.-M., and Zimmer, R. (2008). Spliceosomal peptide P140 for immunotherapy of systemic lupus erythematosus: Results of an early phase II clinical trial. *Arthritis Rheum.* *58*, 3873–3883.
- Muraille, E.**, Gounon, P., Cazareth, J., Hoebeke, J., Lippuner, C., Davalos-Misslitz, A., Aebischer, T., Muller, S., Glaichenhaus, N., and Mougneau, E. (2010). Direct visualization of peptide/MHC complexes at the surface and in the intracellular compartments of cells infected in vivo by *Leishmania major*. *PLoS Pathog.* *6*, e1001154.
- Nicklin, P.**, Bergman, P., Zhang, B., Triantafellow, E., Wang, H., Nyfeler, B., Yang, H., Hild, M., Kung, C., Wilson, C., et al. (2009). Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* *136*, 521–534.
- O'Brien, R.M.**, Cram, D.S., Coppel, R.L., and Harrison, L.C. (1990). T-cell epitopes on the 70-kDa protein of the (U1)RNP complex in autoimmune rheumatologic disorders. *J. Autoimmun.* *3*, 747–757.
- Ohsumi, Y.** (2014). Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res.* *24*, 9–23.
- Orozco, G.**, Eyre, S., Hinks, A., Bowes, J., Morgan, A.W., Wilson, A.G., Wordsworth, P., Steer, S., Hocking, L., UKRAG consortium, et al. (2011). Study of the common genetic background for rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* *70*, 463–468.

- Oshiro, N.**, Yoshino, K., Hidayat, S., Tokunaga, C., Hara, K., Eguchi, S., Avruch, J., and Yonezawa, K. (2004). Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *9*, 359–366.
- Otomo, T.**, Schweizer, M., Kollmann, K., Schumacher, V., Muschol, N., Tolosa, E., Mittrücker, H.-W., and Braulke, T. (2015). Mannose 6 phosphorylation of lysosomal enzymes controls B cell functions. *J. Cell Biol.* *208*, 171–180.
- Page, N.**, Schall, N., Strub, J.-M., Quinteret, M., Chaloin, O., Décossas, M., Cung, M.T., Van Dorselaer, A., Briand, J.-P., and Muller, S. (2009). The Spliceosomal Phosphopeptide P140 Controls the Lupus Disease by Interacting with the HSC70 Protein and via a Mechanism Mediated by $\gamma\delta$ T Cells. *PLoS ONE* *4*, e5273.
- Page, N.**, Gros, F., Schall, N., Décossas, M., Bagnard, D., Briand, J.-P., and Muller, S. (2011). HSC70 blockade by the therapeutic peptide P140 affects autophagic processes and endogenous MHCII presentation in murine lupus. *Ann. Rheum. Dis.* *70*, 837–843.
- Paludan, C.**, Schmid, D., Landthaler, M., Vockerodt, M., Kube, D., Tuschl, T., and Münz, C. (2005). Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science* *307*, 593–596.
- Pattingre, S.**, Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D., and Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* *122*, 927–939.
- Pua, H.H.**, and He, Y.-W. (2009). Autophagy and lymphocyte homeostasis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *335*, 85–105.
- Ravikumar, B.**, Sarkar, S., Davies, J.E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z.W., Jimenez-Sanchez, M., Korolchuk, V.I., Lichtenberg, M., Luo, S., et al. (2010). Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* *90*, 1383–1435.
- Roche, P.A.**, and Furuta, K. (2015). The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 203–216.
- Romieu-Mourez, R.**, François, M., Boivin, M.-N., Stagg, J., and Galipeau, J. (2007). Regulation of MHC class II expression and antigen processing in murine and human mesenchymal stromal cells by IFN- γ , TGF- β , and cell density. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *179*, 1549–1558.
- Saitoh, T.**, Fujita, N., Jang, M.H., Uematsu, S., Yang, B.-G., Satoh, T., Omori, H., Noda, T., Yamamoto, N., Komatsu, M., et al. (2008). Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production. *Nature* *456*, 264–268.
- Sanjuan, M.A.**, Dillon, C.P., Tait, S.W.G., Moshiah, S., Dorsey, F., Connell, S., Komatsu, M., Tanaka, K., Cleveland, J.L., Withoff, S., et al. (2007). Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature* *450*, 1253–1257.
- Schall, N.**, Page, N., Macri, C., Chaloin, O., Briand, J.-P., and Muller, S. (2012). Peptide-based approaches to treat lupus and other autoimmune diseases. *J. Autoimmun.* *39*, 143–153.
- Shibutani, S.T.**, Saitoh, T., Nowag, H., Münz, C., and Yoshimori, T. (2015). Autophagy and autophagy-related proteins in the immune system. *Nat. Immunol.* *16*, 1014–1024.

- Stricher, F.**, Macri, C., Ruff, M., and Muller, S. (2013). HSPA8/HSC70 chaperone protein: structure, function, and chemical targeting. *Autophagy* 9, 1937–1954.
- Stylianou, K.**, Petrakis, I., Mavroei, V., Stratakis, S., Vardaki, E., Perakis, K., Stratigis, S., Passam, A., Papadogiorgaki, E., Giannakakis, K., et al. (2011). The PI3K/Akt/mTOR pathway is activated in murine lupus nephritis and downregulated by rapamycin. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 26, 498–508.
- Tazi, J.**, Kornstädt, U., Rossi, F., Jeanteur, P., Cathala, G., Brunel, C., and Lührmann, R. (1993). Thiophosphorylation of U1-70K protein inhibits pre-mRNA splicing. *Nature* 363, 283–286.
- Teichmann, L.L.**, Ols, M.L., Kashgarian, M., Reizis, B., Kaplan, D.H., and Shlomchik, M.J. (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, 967–978.
- Thompson, L.M.**, Aiken, C.T., Kaltenbach, L.S., Agrawal, N., Illes, K., Khoshnan, A., Martinez-Vincente, M., Arrasate, M., O'Rourke, J.G., Khashwji, H., et al. (2009). IKK phosphorylates Huntingtin and targets it for degradation by the proteasome and lysosome. *J. Cell Biol.* 187, 1083–1099.
- Troncoso, R.**, Paredes, F., Parra, V., Gatica, D., Vásquez-Trincado, C., Quiroga, C., Bravo-Sagua, R., López-Crisosto, C., Rodríguez, A.E., Oyarzún, A.P., et al. (2014). Dexamethasone-induced autophagy mediates muscle atrophy through mitochondrial clearance. *Cell Cycle Georget. Tex* 13, 2281–2295.
- Valdor, R.**, Mocholi, E., Botbol, Y., Guerrero-Ros, I., Chandra, D., Koga, H., Gravekamp, C., Cuervo, A.M., and Macian, F. (2014). Chaperone-mediated autophagy regulates T cell responses through targeted degradation of negative regulators of T cell activation. *Nat. Immunol.* 15, 1046–1054.
- Viville, S.**, Neefjes, J., Lotteau, V., Dierich, A., Lemeur, M., Ploegh, H., Benoist, C., and Mathis, D. (1993). Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell* 72, 635–648.
- Wada, Y.**, Sun-Wada, G.-H., Kawamura, N., and Aoyama, M. (2014). Role of autophagy in embryogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 27, 60–66.
- Walls, K.C.**, Ghosh, A.P., Franklin, A.V., Klocke, B.J., Ballestas, M., Shacka, J.J., Zhang, J., and Roth, K.A. (2010). Lysosome Dysfunction Triggers Atg7-dependent Neural Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 285, 10497–10507.
- Wang, F.**, and Muller, S. (2015). Manipulating autophagic processes in autoimmune diseases: a special focus on modulating chaperone-mediated autophagy, an emerging therapeutic target. *Front. Immunol.* 6, 252.
- Wu, H.**, Chen, S., Ammar, A.-B., Xu, J., Wu, Q., Pan, K., Zhang, J., and Hong, Y. (2015). Crosstalk Between Macroautophagy and Chaperone-Mediated Autophagy: Implications for the Treatment of Neurological Diseases. *Mol. Neurobiol.* 52, 1284–1296.
- Yang, W.**, Tang, H., Zhang, Y., Tang, X., Zhang, J., Sun, L., Yang, J., Cui, Y., Zhang, L., Hirankarn, N., et al. (2013). Meta-analysis followed by replication identifies loci in or near CDKN1B, TET3, CD80, DRAM1, and ARID5B as associated with systemic lupus erythematosus in Asians. *Am. J. Hum. Genet.* 92, 41–51.
- Zhou, D.**, Li, P., Lin, Y., Lott, J.M., Hislop, A.D., Canaday, D.H., Brutkiewicz, R.R., and Blum, J.S. (2005). Lamp-2a facilitates MHC class II presentation of cytoplasmic antigens. *Immunity* 22, 571–581.

- Bibliographie -

- Zhou, X.**, Lu, X., Lv, J., Yang, H., Qin, L., Zhao, M., Su, Y., Li, Z., and Zhang, H. (2011). Genetic association of PRDM1-ATG5 intergenic region and autophagy with systemic lupus erythematosus in a Chinese population. *Ann. Rheum. Dis.* *70*, 1330–1337.
- Zimmer, R.**, Scherbarth, H.R., Rillo, O.L., Gomez-Reino, J.J., and Muller, S. (2012). Lupuzor/P140 peptide in patients with systemic lupus erythematosus: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb clinical trial. *Ann. Rheum. Dis.*

BIBLIOGRAPHIE : Partie Résultats, Conclusions et Perspectives

- Arnold, J.**, Murera, D., Arbogast, F., Fauny, J.-D., Muller, S., and Gros, F. (2016). Autophagy is dispensable for B-cell development but essential for humoral autoimmune responses. *Cell Death Differ.* 23, 853–864.
- Clarke, A.J.**, Ellinghaus, U., Cortini, A., Stranks, A., Simon, A.K., Botto, M., and Vyse, T.J. (2014). Autophagy is activated in systemic lupus erythematosus and required for plasmablast development. *Ann. Rheum. Dis.*
- Doherty, G.J.**, and McMahon, H.T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 857–902.
- Gros, F.**, Arnold, J., Page, N., Décossas, M., Korganow, A.-S., Martin, T., and Muller, S. (2012). Macroautophagy is deregulated in murine and human lupus T lymphocytes. *Autophagy* 8, 1054–1053.
- Macri, C.**, Wang, F., Tasset, I., Schall, N., Page, N., Briand, J.-P., Cuervo, A.M., and Muller, S. (2015). Modulation of deregulated chaperone-mediated autophagy by a phosphopeptide. *Autophagy* 11, 472–486.
- Martin, J.C.**, Baeten, D.L., and Josien, R. (2014). Emerging role of IL-17 and Th17 cells in systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol.* 154, 1–12.
- Monneaux, F.**, Hoebeker, J., Sordet, C., Nonn, C., Briand, J.-P., Maillère, B., Sibillia, J., and Muller, S. (2005). Selective modulation of CD4+ T cells from lupus patients by a promiscuous, protective peptide analog. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 175, 5839–5847.
- Monneaux, F.**, Parietti, V., Briand, J.-P., and Muller, S. (2007). Importance of spliceosomal RNP1 motif for intermolecular T-B cell spreading and tolerance restoration in lupus. *Arthritis Res. Ther.* 9, R111.
- Page, N.**, Schall, N., Strub, J.-M., Quinternet, M., Chaloin, O., Décossas, M., Cung, M.T., Van Dorsselaer, A., Briand, J.-P., and Muller, S. (2009). The Spliceosomal Phosphopeptide P140 Controls the Lupus Disease by Interacting with the HSC70 Protein and via a Mechanism Mediated by $\gamma\delta$ T Cells. *PLoS ONE* 4, e5273.
- Page, N.**, Gros, F., Schall, N., Décossas, M., Bagnard, D., Briand, J.-P., and Muller, S. (2011). HSC70 blockade by the therapeutic peptide P140 affects autophagic processes and endogenous MHCII presentation in murine lupus. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 837–843.
- Schall, N.**, and Muller, S. (2015). Resetting the autoreactive immune system with a therapeutic peptide in lupus. *Lupus* 24, 412–418.
- Schall, N.**, Wilhelm, M., Dali, H., Jouvin-Marche, E., and Muller, S. Down-regulation of excessive chaperone-mediated autophagy by a small peptide normalizes the immune responses in lupus (submitted).
- Wong, C.K.**, Lit, L.C.W., Tam, L.S., Li, E.K.M., Wong, P.T.Y., and Lam, C.W.K. (2008). Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 127, 385–393.
- Zhou, D.**, Li, P., Lin, Y., Lott, J.M., Hislop, A.D., Canaday, D.H., Brutkiewicz, R.R., and Blum, J.S. (2005). Lamp-2a facilitates MHC class II presentation of cytoplasmic antigens. *Immunity* 22, 571–581.

- *Bibliographie* -

Etude du mécanisme d'action chez l'homme d'un peptide immunomodulateur de la maladie lupique

Le lupus érythémateux disséminé est une maladie auto-immune systémique déclenchée par une combinaison de facteurs génétiques, hormonaux et environnementaux. Il se caractérise notamment par la présence d'autoanticorps dirigés principalement contre des éléments nucléaires. Les traitements proposés aux patients sont essentiellement palliatifs et non curatifs et engendrent de nombreux effets secondaires indésirables. Des nouvelles stratégies thérapeutiques plus spécifiques sont basées sur l'utilisation de peptides dérivés d'autoantigènes. Le peptide P140, découvert au laboratoire, est un candidat prometteur dans ce domaine. Il correspond à la séquence 131-151 de la protéine splicéosomale U1-70K et est chimiquement phosphorylé sur le résidu sérine 140. Son administration à des souris lupiques MRL/*lpr* diminue la sévérité des symptômes sans effet immunosuppresseur. Il est actuellement évalué chez l'homme dans un essai clinique de phase III.

Le mécanisme d'action du peptide P140 commence à être bien connu chez la souris lupique. Récemment, mon équipe a montré que le peptide P140 affecte directement ou indirectement deux formes d'autophagie, la macroautophagie et l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA). De plus, il réduit l'expression des molécules du CMH-II ce qui conduirait à une baisse de la présentation antigénique et à une diminution de l'activation des LT autoréactifs. Finalement, une baisse de la production des autoanticorps, notamment des anticorps reconnaissant l'ADN double brin est observée suite à l'injection du peptide aux souris. L'objectif de mon projet de thèse a été de consolider ces résultats et également d'étudier le mode d'action du peptide chez l'homme puisque ceci n'avait pas encore été fait.

Nous avons démontré que comme chez la souris, le peptide P140 réduit l'expression des molécules du CMH-II à la surface des LB de patients lupiques. De plus, nous avons montré que plus le score d'activité de la maladie est élevé, plus l'effet du peptide sur l'expression du CMH-II est important. En revanche, bien que nous ayons confirmé la dérégulation de la macroautophagie dans les LT CD8+ de patients, le peptide P140 ne semble pas affecter ce processus cellulaire. Nous étudions actuellement l'effet du peptide sur la CMA. Enfin, nous avons montré que chez la souris MRL/*lpr* et chez l'homme, le peptide P140 réduit le nombre de plasmablastes. Cette altération de la différenciation des LB conduit à une baisse de la production des IgM et des IgG, ce qui explique son effet bénéfique sur la maladie lupique.

Mots clés : Lupus, peptide P140, autophagie, CMH-II, plasmocytes

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a systemic autoimmune disease triggered by genetic, hormonal and environmental factors. It is mainly characterized by the presence of autoantibodies directed against nuclear elements. Most of current treatments proposed to patients are palliative and not curative and lead to numerous side effects. New therapeutic strategies are based on the use of peptides derived from autoantigens. The P140 peptide discovered in our laboratory is a promising candidate. It corresponds to the 131-151 sequence of the U1-70K spliceosomal protein and is phosphorylated on ser140 residue. Its administration to MRL/*lpr* lupus-prone mice reduces symptom severity without immunosuppressive effect. It is currently evaluated in phase III of clinical trial.

The mechanism of action of P140 peptide has been mostly elucidated in lupus mice. Recently, my team has shown that P140 peptide affects directly or indirectly macroautophagy and chaperone-mediated autophagy (CMA), two major forms of autophagy. Furthermore, it reduces the expression of MHC class II molecules, which leads to the decrease of antigenic peptide presentation and activation of autoreactive T cells. Finally, a reduction of autoantibodies levels against double stranded DNA is shown after P140 injection in mice. The aim of my thesis project was to consolidate these data and to study the mode of action of P140 in humans since this was not done until now.

We have shown that like in lupus-prone mice, P140 peptide reduces expression of MHC-II molecules on the surface of B cells from SLE patients. Furthermore, we have demonstrated that higher the disease activity score was, higher the effect of P140 peptide was. Unfortunately, although we confirmed the dysregulation of macroautophagy in CD8+ T cells from SLE patients, P140 peptide does not seem to affect this cellular process. We are currently studying the effect of the peptide on CMA. Finally, we have shown that in both MRL/*lpr* mice and humans, P140 peptide reduces the number of plasmablasts. This alteration of B cell differentiation lead to the decrease of IgM and IgG production, thus explaining the P140' beneficial effect on the course of lupus disease.

Keywords : Lupus, P140 peptide, autophagy, MHC-II, plasma cells