



HAL
open science

Rôle des variants de PRKCD, IKZF1 et LYN dans l'homéostasie lymphocytaire B et le développement du lupus érythémateux systémique juvénile

Marion Moreews

► **To cite this version:**

Marion Moreews. Rôle des variants de PRKCD, IKZF1 et LYN dans l'homéostasie lymphocytaire B et le développement du lupus érythémateux systémique juvénile. Immunologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2022. Français. NNT : 2022LYO10009 . tel-04356469

HAL Id: tel-04356469

<https://theses.hal.science/tel-04356469v1>

Submitted on 20 Dec 2023

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.



**THESE de DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

**Ecole Doctorale N° 340
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire (ED BMIC)**

Discipline : Biologie

Soutenue publiquement le 28/09/2022, par :
Marion MOREEWS

**Rôle des variants de *PRKCD*, *IKZF1* et *LYN*
dans l'homéostasie lymphocytaire B et
le développement du lupus érythémateux
systémique juvénile**

Devant le jury composé de :

Dr. Marion ESPELI, Chargée de Recherche, INSERM, Rapporteur
Pr. Marie-Elise TRUCHETET, PU-PH, Université de Bordeaux, Rapporteur

Pr. Pierre SUJOBERT, PU-PH, Université Claude Bernard Lyon 1, Président du jury
Dr. Sylvain LATOUR, Directeur de Recherche, CNRS, Examineur

Pr. Alexandre BELOT, PU-PH, Université Claude Bernard Lyon 1, Directeur de thèse

Université Claude Bernard - LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Petru MIRONESCU
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humain	Directrice : Mme Laetitia BIGNON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. Jean-Christophe MAURIN
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Jacques LUAUTE
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directeur : M. Claude DUSSART

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosario FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur : M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : M. Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Directeur : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Michel MASSENZIO
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : M. Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Directrice : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Guillaume BODET
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

Résumé en Français

Le lupus érythémateux systémique (LES) est une maladie auto-immune rare pouvant affecter divers organes. Le LES apparaît habituellement chez l'adulte et moins fréquemment chez les enfants, où la pathologie est plus sévère. Certaines formes de LES associées à la mutation d'un seul gène ont été récemment identifiées, essentiellement dans les LES juvéniles. Une large cohorte de patients a été constituée sur laquelle des analyses génétiques à grande échelle ont été réalisées. Un variant de *PRKCD* a été identifié dans une famille ainsi que des variants de *LYN* et de *IKZF1* dans une autre famille. Du fait de la rareté des échantillons pédiatriques, il est difficile d'étudier les conséquences fonctionnelles des variants sélectionnés à partir de matériel humain. Pour cette raison, nous avons généré plusieurs modèles murins ayant les mêmes mutations que celles retrouvées chez les patients. L'objectif de mes travaux de thèse était d'une part de déterminer l'effet des nouveaux variants sur la fonctionnalité des protéines LYN et IKAROS, d'étudier le phénotype des modèles murins porteurs de ces mutations et d'autre part de confirmer le rôle de la mutation homozygote de *PRKCD* G510S dans le développement du LES, de réaliser un immunophénotypage approfondi du modèle murin et de disséquer les mécanismes moléculaires altérés.

Titre en Anglais

Role of *PRKCD*, *IKZF1* and *LYN* variants in B cell homeostasis and the development of juvenile systemic lupus erythematosus

Résumé en Anglais

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a rare autoimmune disease that can affect multiple organs. SLE usually appears in adults and less frequently in children, where the pathology is more severe. Some forms of SLE associated with a single gene mutation have been recently identified, primarily in children. A large-scale genetic analysis was performed in a cohort of pediatric SLE patients. A variant of *PRKCD* was identified in one family, as well as mutations of *LYN* and *IKZF1* in another family. Due to difficulties in accessing pediatric samples, functional studies are challenging. For this reason, we have generated several mouse models carrying the mutations found in patients. The goal of my PhD work was, on one hand to determine the effect of new variants on the functionality of LYN and IKAROS proteins, and on the other hand, to determine the role of the G510S homozygous mutation of *PRKCD* in the development of SLE, to dissect the altered underlying molecular mechanisms.

Discipline

Immunologie

Mots clés en Français

Auto-immunité, Lupus, Lymphocytes B, Immunogénétique, *PRKCD*, *IKZF1*, *LYN*

Mots clés en Anglais

Autoimmunity, Lupus, B cells, Immunogenetics, *PRKCD*, *IKZF1*, *LYN*

Intitulé et adresse du laboratoire

Equipe « Activation et transduction du signal dans les lymphocytes »

CIRI, INSERM U1111

21 Avenue Tony Garnier

69007 Lyon

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury et de mon comité de suivi de thèse

Je souhaiterais tout d'abord remercier le Dr. Marion Espeli et le Pr. Marie-Elise Truchetet d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Je souhaite également remercier le Pr. Pierre Sujobert et le Dr. Sylvain Latour pour avoir accepté d'examiner mon travail. Enfin, je souhaiterais chaleureusement remercier le Dr. Pauline Soulas-Sprauel et le Dr. Laurent Genestier pour m'avoir conseillé tout au long de ma thèse lors des CST.

A mon directeur de thèse

Je tenais particulièrement à remercier le Pr. Alexandre Belot pour m'avoir permis de travailler sur cette thématique passionnante. Merci de m'avoir permis de participer à de nombreux projets dont celui sur les patients MIS-C qui a été une superbe opportunité. Merci également pour ton soutien et tes conseils notamment dans ma recherche de post-doc. Et surtout, merci de m'avoir encadré durant ces années de thèse qui ont été très enrichissantes, j'ai appris beaucoup de choses aussi bien sur le plan professionnel que humain.

A notre chef d'équipe

Merci beaucoup Thierry de m'avoir permis d'intégrer cette équipe où j'ai passé plus de quatre années dans une ambiance exceptionnelle. Tu as su vraiment créer une très bonne équipe où chacun se sent libre et où l'on a envie de donner le meilleur de nous-même ! Merci pour toutes tes discussions et conseils qui ont permis de recadrer le sujet lorsque c'était nécessaire.

A l'équipe Walzer

Un grand merci à Anne-laure pour ces années partagées au labo. Cette thèse n'aurait vraiment pas pu se faire sans toi. Merci pour ton aide, tes conseils et les balades à cheval (à refaire rapidement). Comme on te l'a déjà dit, tu es vraiment l'un des piliers de ce labo !

Je tiens particulièrement à remercier Antoine, mais à qui vais-je poser toutes mes questions après ? Merci de toujours prendre le temps de discuter et de répondre à mes mille et une questions.

Ma thèse n'aurait vraiment pas été la même sans toi Annabelle, alias ma Nana ou ma Poule. Tu es vraiment devenue une véritable amie, je t'attends à Stockholm avec Norman dans quelques mois. Merci pour tout, pour nos looongues discussions, fou rires, mojitos et tous ces beaux moments partagés !

Durant ma thèse, l'équipe a beaucoup changé et j'ai pu tout au long de mon passage au labo rencontrer des personnes exceptionnelles.

Merci à l'équipe Walzer 1.0 : Un grand merci à Ommar, tu seras à jamais le « chouchou » ! Merci pour ton accueil quand je suis arrivée au labo alors que j'étais encore un petit padawan. Merci à Antoinette et Jiang, mes PhD partners avec qui j'ai partagé beaucoup de rires et d'excellents moments durant ces années ensemble. Merci à tous les autres : Aurore, Marie, Yamila, Emilie et Laurie pour votre bonne humeur !

Merci à l'équipe Walzer 2.0 : à Kevin pour tous nos Cocas partagés ainsi que les très nombreux fous-rires ! Merci à Lucie d'avoir été une superbe voisine de labo même si tu as finalement préféré le calme du 2^{ème} plutôt que le bruit des centri et des frigos du 5^{ème} (je ne m'en suis toujours pas remise) ! Tu auras bientôt le titre de thésarde aînée donc je compte sur toi pour tenir les petits jeunes. Merci aussi à Maud, pour toutes nos discussions lupus ! Noëmi et Louis, les Tic et Tac, vous formez un duo infernal, votre bonne humeur me manquera ! Merci à Sarah pour m'avoir appris une multitude de mots qui me permettront de briller en société ! Merci également à toutes les personnes du 2^{ème} et à Lyon Sud : Nicolas, Sophie, Michelle, Marine, Magali, Rémi et Sébastien, je vous souhaite le meilleur pour la suite. Et merci à tous les stagiaires qui ont fait un passage dans l'équipe Walzer, j'ai vraiment fait de belles rencontres.

A toutes les personnes impliquées dans ce projet

Ce projet n'aurait vraiment pas pu se faire sans l'aide de nombreuses personnes. Tout d'abord, un grand merci à Pierre pour ta gentillesse et ton éternel sourire. Merci également à Farida pour ton aide et ta disponibilité. Merci aussi à Sébastien, les soirées cytométrie à discuter de tout et de rien me manqueront. Et un grand merci à Elise, le soleil de l'accueil du CIRI.

A tout ceux qui m'ont soutenu

Un grand merci à mes copines de Savoie et spécialement à Marie pour ton soutien, j'espère finir en beauté comme toi lors de la soutenance. Merci aussi à mes copains de Fac (Caro, Julie, Diana et Talip), ça y est on a tous fini ! Nous avons passé le Master ensemble et depuis nous voilà toujours à vadrouiller pour partager des aventures, merci tout. Une spéciale dédicace à Diana avec qui on a partagé tant de choses dont de nombreux restos à Lyon et ils nous restent tant à découvrir !

Merci à Isabelle, Marc et Laura pour votre soutien tout au long de mon « stage » ;)

Merci également à ma voisine Berengère qui a pris le temps de relire une partie de ce manuscrit.

A ma famille

Ca y est, depuis tout ce temps, je vais enfin arrêter d'être étudiante. Maintenant, vous savez ce qu'est le lupus (n'est-ce pas Maman ? ;)), le système immunitaire... Merci à mes sœurs d'avoir supporté mon blabla sur le lupus et un grand merci à mes parents pour m'avoir soutenu tout au long de mon cursus. Spécial dédicace à mon Papa, super relecteur !

A « mon » Alex

Après toutes ces années et toutes les choses que nous avons traversé à deux, nous voilà prêt à partir vivre une prochaine aventure ensemble. Merci pour ton soutien, de m'avoir écouté sur mes projets, d'avoir discuté de mes résultats et surtout merci d'avoir toujours cru en moi. Maintenant, en route pour une nouvelle étape à deux.

LISTE DES PUBLICATIONS

Article 1 :

mTOR activation underlies enhanced B cell proliferation and autoimmunity in *Prkcd*^{G510S/G510S} mice

Marion Moreews, Anne-Laure Mathieu , Kevin Pouxvielh , Quentin Reuschlé , Annabelle Drouillard, Penelope Dessay , Marie Meignien, Jiang Zhang , Lucie Fallone, Noëmi Rousseaux, Michelle Ainouze, Amaury Rey, Ommar Omarjee, Elodie Decembre, Vanina Lenief, Sophia Djebali , Olivier Thaunat, Marlène Dreux , Laurent Genestier, Thierry Defrance , Pauline Soulas-Sprauel, Antoine Marçais, Thierry Walzer, Alexandre Belot

En preparation

Article 2 (en annexe) :

Polyclonal expansion of TCR Vbeta 21.3+ CD4+ and CD8+ T cells is a hallmark of Multisystem Inflammatory Syndrome in Children

Moreews Marion, Kenz Le Gouge, Samira Khaldi-Plassart, Rémi Pescarmona, Anne-Laure Mathieu, Christophe Malcus, Sophia Djebali, Alicia Bellomo, Olivier Dauwalder, Magali Perret, Marine Villard, Emilie Chopin, Isabelle Rouvet, Francois Vandenesch, Céline Dupieux, Robin Pouyau, Sonia Teyssedre, Margaux Guerder, Tiphaine Louazon, Anne-Moulin-Zinsch, Marie Duperril, Hugues Patural, Lisa Giovannini-Chami, Aurélie Portefaix, Behrouz Kassai, Fabienne Venet, Guillaume Monneret, Christine Lombard, Hugues Flodrops, Jean-Marie De Guillebon, Fanny Bajolle, Valérie Launay, Paul Bastard, Shen-Ying Zhang, Valérie Dubois, Olivier Thaunat, Jean-Christophe Richard, Mehdi Mezidi, Omran Allatif, Kahina Saker, Marlène Dreux, Laurent Abel, Jean-Laurent Casanova, Jacqueline Marvel, Sophie Trouillet-Assant, David Klatzmann, Thierry Walzer, Encarnita Mariotti-Ferrandiz, Etienne Javouhey, and Alexandre Belot

Science Immunology. 2021 May 25;6(59):eabh1516.
doi: 10.1126/sciimmunol.abh1516.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES.....	14
LISTE DES TABLEAUX.....	16
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	17
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....	23
1 – LE LUPUS ÉRYTHÉMATEUX SYSTÉMIQUE: Une maladie chronique auto-immune.....	23
1.1/ Historique	23
1.2/ Symptômes et épidémiologie.....	24
2 – LES FORMES MONOGÉNIQUES DE LUPUS: Les étudier pour comprendre la physiopathologie de la maladie	29
2.1/ Prédispositions génétiques dans le lupus	29
2.2/ Mutations induisant un excès d’autoantigènes	30
2.2.1/ Défauts du complément.....	30
2.2.2/ Défauts des DNases extracellulaires	33
2.3/ Mutations induisant une production anormale d’interféron de type I	34
2.3.1/ Le syndrome d’Aicardi-Goutières.....	36
2.3.2/ Vasculopathie de l’enfant associée à STING	40
2.3.3/ Le syndrome de COPA	40
2.3.4/ Les syndromes auto-inflammatoires liés au protéasome.....	41
2.3.5/ Dysplasie spondylo-enchondrale	41
2.4/ Mutations induisant une hypersensibilité aux cytokines pro-inflammatoires	42
2.5/ Mutations induisant un défaut de tolérance	44
2.5.1/ Le syndrome lymphoprolifératif auto-immun	44
2.5.2/ Les RASopathies	45
2.5.3/ Défauts de tolérance des lymphocytes B.....	46
2.6/ Autres mutations retrouvées dans les LES monogéniques.....	48
3 – LES LYMPHOCYTES B : Leurs rôles majeurs dans le développement de la maladie	49
3.1/ Généralités	49
3.1.1/ Développement des lymphocytes B.....	49
3.1.2/ Signalisation dans les lymphocytes B.....	53
a- Voie de signalisation du BCR.....	53
b- Corécepteurs activateurs et inhibiteurs	55

c- Autres voies de signalisations	57
3.1.3/ Activation des lymphocytes B	62
a- Réponse T-indépendante.....	62
b- Réponse T-dépendante.....	64
3.1.4/ Mécanismes d'action des lymphocytes B	65
3.2/ Maintien de la tolérance des lymphocytes B	67
3.2.1/ Tolérance centrale.....	67
3.2.2/ Tolérance périphérique.....	69
3.3/ Rôle pathologique des lymphocytes B dans le lupus	72
3.3.1/ Dérégulation des lymphocytes B chez les patients	73
a- Altération de la répartition des sous-populations de LB	73
b- Dérégulation des voies de signalisations des LB.....	76
3.3.2/ Rôle pathogénique des LB dans le LES	76
a- en tant que cellules productrices d'auto-anticorps.....	76
b- en tant que cellules présentatrices d'antigènes et productrices de cytokines	78
3.3.3/ Variants associés à une dérégulation des lymphocytes B dans le LES.....	79
a- Le rôle de la signalisation BCR dans la prédisposition au LES.....	79
b- Autres variants relatifs aux LB dans la prédisposition au LES.....	82
4 – DÉFICIT DE LA PROTÉINE PKC- δ : Une cause de lupus monogénique	85
4.1/ Présentation de la famille avec la mutation G510S	85
4.2/ La protéine PKC- δ	92
4.2.1/ Classification et structure de la famille PKC.....	92
4.2.2/ Fonction générale de PKC- δ	94
4.2.3/ Rôle de PKC- δ dans le système immunitaire.....	95
a- Dans les cellules de l'immunité innée.....	95
b- Dans les LT	97
c- Dans les LB	98
5– MUTATIONS DANS LES GÈNES <i>IKZF1</i> et <i>LYN</i> : Une cause digénique de lupus?.....	103
5.1/ Le facteur de transcription IKAROS	104
5.1.1/ Structure et expression d'IKAROS	104
5.1.2/ Rôle dans les lymphocytes B	105
5.1.3/ Association entre les mutations d' <i>IKZF1</i> et le lupus	107
5.2/ L'enzyme Tyrosine Kinase LYN	108

5.2.1/ Structure et expression LYN	108
5.2.2/ Rôle dans les lymphocytes B	109
5.2.3/ Association entre les mutations de <i>LYN</i> et le lupus	110
OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE TRAVAIL	113
PARTIE RÉSULTATS	115
1– ÉTUDE DE LA MUTATION <i>Prkcd</i> G510S/G510S CHEZ LA SOURIS: Comprendre le rôle de cette mutation dans les mécanismes menant à l’auto-immunité.....	115
1.1/ Article sur le modèle murin avec la mutation <i>Prkcd</i> ^{G510S/G510S}	115
1.2/ Résultats complémentaires de l’article 1	160
1.2.1/ Rôle de PKC- δ dans la production d’IFN- α	160
1.2.2/ Tests d’inhibiteurs <i>in vitro</i> sur la signalisation du BCR.....	161
1.2.3/ Matériel et méthodes complémentaires	163
2– ÉTUDE DES MUTATIONS <i>IKZF1</i> D120V/+, <i>LYN</i> F258S/+ : Déterminer leurs rôles dans le lupus.....	165
2.1/ Présentation de la famille avec les mutations de <i>IKZF1</i> D120V/+, <i>LYN</i> F258S/+	167
2.2/ Étude <i>in vitro</i> sur le variant <i>IKZF1</i> D120V	169
2.2.1/ Impact de la mutation sur l’expression de la protéine	169
2.2.2/ Impact de la mutation sur la dimérisation et la reconnaissance de l’ADN	170
2.2.3/ Impact de la mutation sur l’activité transcriptionnelle d’IKAROS.....	172
2.3/ Étude <i>in vitro</i> sur le variant <i>LYN</i> F258S.....	174
2.3.1/ Impact de la mutation sur l’expression de la protéine	174
2.3.2/ Impact de la mutation sur l’activité de la protéine.....	175
2.4/ Étude <i>in vivo</i>	176
2.4.1/ Générations des modèles murins.....	176
2.4.2/ Caractérisation de l’auto-immunité dans les différents modèles.....	178
2.4.3/ Étude des défauts des lymphocytes B.....	180
2.5/ Matériel et méthodes complémentaires	184
3 – DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	189
3.1/ Forces et faiblesses de notre étude : utilisation des modèles murins pour étudier le LES	189
3.1.1/ La souris : un modèle expérimental de choix.....	189
3.1.2/ ... avec ses limites : vers une approche globale	190
3.2/ Préciser le rôle de PKC- δ dans les lymphocytes B	194

3.3/ Vers la thérapie personnalisée	197
3.3.1/ Personnaliser les traitements.....	197
3.3.2/ Avancer vers la thérapie génique.....	200
3.4/ De l'étude des LES monogéniques aux LES adultes	200
4- CONCLUSION GENERALE	203
ANNEXES.....	204
Article 2	204
Articles supplémentaires	216

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Phénomène des "LE cells", premier marqueur biologique dans le lupus.....	24
Figure 2 : Hétérogénéité des symptômes cliniques dans LES.....	25
Figure 3 : Influence des variants sur la maladie en fonction de leur fréquence et leurs effets ...	29
Figure 4 : L'activation du complément et son action sur différents effecteurs	31
Figure 5: Elimination des microparticules et de l'ADN circulants dans l'espace extracellulaire par DNase1 et DNase1L3.....	33
Figure 6 : Reconnaissance des PAMP par les P-δ RR	35
Figure 7 : Protéines dérégulées induisant des interferonopathies	39
Figure 8 : Les différentes voies d'activations des protéines JAK/STAT.....	43
Figure 9 : Le développement des LB	50
Figure 10 : Assemblage des chaînes d'immunoglobulines	51
Figure 11 : Devenir des LB MZ et FO.....	52
Figure 12 : La signalisation du BCR	55
Figure 13 : Les corécepteurs de la voie de signalisation du BCR	56
Figure 14 : Les voies de signalisation induites par les récepteurs de BAFF et CD40	59
Figure 15 : Synergie entre le BCR et les TLR7/9.....	61
Figure 16 : Réponse T-indépendante des LB	63
Figure 17 : Réponse T-dépendante des LB	65
Figure 18 : Mécanismes d'actions des lymphocytes B	66
Figure 19 : Tolérance centrale des LB.....	68
Figure 20 : Mécanisme de tolérance des LB	70
Figure 21 : Baisse des anticorps anti-ADNs chez les souris (NZB X NZW)F1 x xid/xid	73
Figure 22 : Fréquence des LB auto- et poly-réactifs chez les patients avec un LES	74
Figure 23 : Conséquence de la dérégulation du niveau d'activité du BCR	81
Figure 24 : Arbre généalogique des patients avec la mutation de <i>PRKCD</i>	87
Figure 25 : Modélisation de la protéine PKC-δ au niveau du résidu G510.....	88
Figure 26 : Effet de la mutation G510S sur l'expression de PKC-δ	88
Figure 27 : Représentation schématique de la structure des protéines de la famille PKC	92
Figure 28 : Effet du BAFF sur les LB <i>Prkcd</i> ^{-/-}	99
Figure 29 : Les LB avec un déficit en PKC-δ ont une réduction de p-Erk et sont résistantes à l'apoptose médié par une augmentation du flux calcique causée par la surexpression de Stim1	100
Figure 30 : Variants rares prédits pathogéniques dans une cohorte de patients avec un LES à début pédiatrique	103
Figure 31 : Les différentes isoformes d'IKAROS entre l'Homme et la souris.....	104
Figure 32 : Manifestations cliniques chez les patients atteints de mutations <i>IKZF1</i> hétérozygotes germinales.....	107
Figure 33 : Structure de la protéine Lyn	109
Figure 34 : Production d'IFN-α par les pDC des souris <i>Prkcd</i> ^{+/+} et <i>Prkcd</i> ^{G510S/G510S}	160
Figure 35 : Mesure de la phosphorylation de S6 en présence d'inhibiteurs dans les LB <i>Prkcd</i> ^{+/+} et <i>Prkcd</i> ^{G510S/G510S} après stimulation du BCR	162

Figure 36 : Arbre généalogique de la famille avec les variants de <i>IKZF1</i> et <i>LYN</i>	168
Figure 37 : Alignement des séquences ADN des orthologues de <i>IKZF1</i> et <i>LYN</i> dans différentes espèces.....	168
Figure 38 : Expression de IKAROS dans les LCL de patients.....	169
Figure 39 : Expression de IKAROS dans les cellules 293T transfectées avec IKZF1 WT ou D120V	169
Figure 40 : Dimérisation de IKAROS WT et D120V	170
Figure 41 : Distribution intranucléaire de IKAROS WT et D120V	171
Figure 42 : Capacité de liaison à l'ADN de IKAROS WT et D120V	172
Figure 43 : Altération de la régulation des gènes sous le contrôle de IKAROS par le variant <i>IKZF1</i> D120V.....	173
Figure 44 : Expression de <i>LYN</i> dans les LCLs de patients	174
Figure 45 : Expression de <i>LYN</i> dans les cellules 293T transfectées avec <i>LYN</i> WT ou F258S	174
Figure 46 : Mesure de l'autophosphorylation de <i>LYN</i> <i>in vitro</i>	175
Figure 47 : Modèles de souris générées avec les mutations de <i>Ikzf1</i> et <i>Lyn</i>	176
Figure 48 : Génération des modèles murins par CrispR Cas9 porteurs des mutations de <i>IKZF1</i> et <i>LYN</i> identifiées chez les patients.....	177
Figure 49 : Caractérisation du phénotype dans les différents modèles.....	179
Figure 50 : Répartitions des populations lymphocytaires dans les différents modèles.....	180
Figure 51 : Répartitions des sous-populations de LB dans les différents modèles	181
Figure 52 : Expression de marqueurs d'activations dans les LB dans les différents modèles...	182
Figure 53 : Localisation de la mutation dans le modèle WeeB	193
Figure 54 : Analyse du compartiment B des patients.....	193
Figure 55 : Schéma expérimental de la création de la souris transgénique par CrispR/Cas9 à la masse spectrométrie	197
Figure 56 : Schéma de l'approche de thérapie génique par édition du génome	200
Figure 57 : Vers la thérapie personnalisée dans le lupus	202

Les figures 5, 6, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 56 et 57 ont été créées avec Biorender.com.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Critères EULAR/ACR pour la classification du LES	27
Tableau 2 : Effets des cytokines sur les LB.....	62
Tableau 3 : Auto-anticorps associées au niveau d'activité du LES	78
Tableau 4 : Caractéristiques cliniques des patients de la famille avec la mutation G510S de <i>PRKCD</i>	86
Tableau 5 : Caractérisations cliniques et biologiques des patients présentant des mutations bialleliques de <i>PRKCD</i>	91
Tableau 6 : Activation des PKC.....	93
Tableau 7 : Expression des isoformes de la famille PKC et phénotype des souris KO correspondantes	95
Tableau 8 : Caractéristiques cliniques des patients de la famille avec les variants de <i>IKZF1</i> et <i>LYN</i>	167

LISTE DES ABBREVIATIONS

7-AAD	7-aminoactinomycine
AAN	Anticorps anti-nucléaire
ABC	Age-associated B Cells
ACR	American College of Rheumatology
ADAR1	Adenosine deaminase acting on RNA1
ADA2	Adénosine désaminase 2
ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity
ADNc	ADN complémentaire
ALPS	Auto-immune lymphoproliferative syndrome
aPKC	PKC atypique
AP-1	Activator protein 1
APRIL	A Proliferation Inducing Ligand
ARNdb	ARN double brin
ARNsb	ARN simple brin
ATP	Adénosine triphosphate
BAFF	B-cell activating factor
BCAP	B-Cell phosphoinositide 3-kinase adapter protein
BCR	B-cell Receptor
BCMA	B-cell maturation antigen
BTK	Bruton's tyrosine kinase
Cbp	Csk-binding protein
cGAS	Cyclic GMP-AMP synthase
cGAMP	Cyclic GMP-AMP
CLP	Commun lymphoid progenitor
CLR	C-type lectin receptor
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe
CMP	Commun myeloïd progenitor
COP	Coat protein I
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
cPKC	PKC conventionnelle
CR	Complement receptor
CREB	C-AMP Response Element-binding protein
CSH	Cellule souche hématopoïétique
CTBP	C terminal binding protein
CTIP	Ctbp-interacting protein
CVID	Common variable immunodeficiency
CYBB	Cytochrome B-245 Beta Chain
CYTOF	Cytometry by Time of Flight
D	Diversité
DAG	Diacylglycérol
DAMP	Damage-associated molecular patterns
DD	Défaut de dimérisation
DDX58	DExD/H-Box Helicase 58
DN	Dominant négatif
DNA-PK	DNA dependent protein kinase

DNMT	DNA méthyltransférase
DOCK8	Dedicator Of Cytokinesis 8
EBF	Early B-Cell Factor
EBV	Epstein-Barr Virus
EMSA	Electrophoretic mobility-shift assay
FASL	Fas ligand
Fc	Fragment cristallisable
FDA	Food and drug administration
FDC	Follicular dendritic cell
FLT3	FMS-like tyrosine kinase 3
FO	Folliculaire
GGG	S-geranyl-geranyl-L-glutathione
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2
GVH	Graft versus host
GWAS	Genome Wide Association Study
HEL	Hen Egg Lysozyme
HI	Haploinsuffisance
HRAS	Harvey Rat sarcoma virus
IC	Immun complex
ICOS	Inducible t-cell costimulator
ICOSL	Inducible t-cell costimulator ligand
IFIH1	Interferon Induced With Helicase C Domain 1
IFN	Interféron de type
IFNAR	Interferon- α/β receptor
I κ B	Inhibitor of κ B
IKZF1	Ikaros Zinc Finger Protein 1
IL	Interleukine
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphate
IPDL	Intolérance aux protéines dibasiques avec lysinurie
IRF	IFN regulatory factors
ISG	Interferon Stimulated Genes
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-base Activation Motif
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine based Inhibitory Motif
J	Jonction
JAK	JANus Kinase
KLC	Known Lupus Causing
KO	Knock-out
KRAS	Kirsten rat sarcoma virus
LB	Lymphocyte B
LCL	Lignée cellulaire lymphoblastique
LE	Lupus Erythematosus
LES	Lupus érythémateux systémique
LILRB	Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily b member
LMPP	Lymphoid-primed multipotent progenitors
LP	Lipoprotéine
LPS	Lipopolysaccharide
LSK	Lin-Sca1+c-kit+

LT	Lymphocyte T
LTfh	Lymphocyte T follicular helper
LTh	Lymphocyte T helper
LTreg	Lymphocyte T régulateur
LZTR1	Leucine zipper like transcription regulator 1
MAC	Membrane attack complex
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MASP	Mannan-binding lectin serine protease
MBL	Mannose binding lectine
MCP	Membrane cofactor protein
MDA5	Melanoma differentiation-associated protein 5
MO	Moelle osseuse
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
MZ	Marginal zone
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NK	Natural Killer
NLR	Nucleotide Oligomerization Domain like receptors
NOD	Nucleotide Oligomerization Domain
nPKC	Nouvelle PKC
NRAS	Neuroblastoma rat sarcoma virus
OLS	Organe lymphoïde secondaire
P	Properdin
P2RY8	P2Y Receptor Family Member 8
PAG	Phosphoprotein associated with glyco-sphingolipid microdomains
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PB1	Phox and Bem 1 domain
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PECAM1	Platelet and endothelial cell adhesion molecule
PD-1	Programmed cell Death protein 1
PDBu	Phorbol 12, 13-Dibutyrate
pDC	Plasmacytoid dendritic cell
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase-1
PECAM1	Platelet and endothelial cell adhesion molecule 1
PIR-B	Paired immunoglobulin-like receptor B
PG	Peptidoglycane
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PH	Pleckstrin Homology
PKC	Proteine Kinase C
PLC	Putative Lupus Causing
PLC γ 2	phosphatidylinositol-specific phospholipase C γ 2
PMA	Phorbol 12-myristate12-acétate
PPP1CB	Protein Phosphatase 1 Catalytic Subunit Beta
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PRAAS	Proteasome-associated autoinflammatory syndromes
PRR	Pattern recognition receptor

RALD	RAS-Associated Lymphoproliferative Disease
RAS	Rat sarcoma virus
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene I
RLR	Retinoic acid-Inducible gene-I-like receptor
ROS	Reactive oxygen species
SAG	Syndrome d'Aicardi-Goutières
SAMHD1	SAM domain and HD domain-containing protein 1
SAVI	STING-associated vasculopathy with onset in infancy
SCID	Severe combined immunodeficiency
SFK	Src kinase family
SH2	Src Homology 2
SHIP	SH2-containing inositol phosphatase
SHP	SH2-containing phosphatase
SIGLEC	Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins
SLAI	Syndrome lymphoprolifératif auto-immun
SMS2	Sphingomyelin synthase 2
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOCS1	Suppressor of cytokine signaling protein
SOS	Son of sevenless
SPENCD	Dysplasie spondylo-enchondrale
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription proteins
STIM1	stromal interaction molecule 1
STING	Stimulator of Interferon Genes
RAG	Recombination-activating gene
RB	Retinoblastoma protein
RSS	Recombination signal sequences
TACI	Transmembrane Activator and CAML Interactor
TCR	T cell receptor
TI	T-indépendante
TIRAP	TIR domain containing adaptor protein
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
TRAF	TNF Receptor-Associated Factors
TRAM	Translocating chain-associated membrane protein
TRAP	Phosphatase acide tartrate-résistante
TREX1	Three Prime Repair Exonuclease 1
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
TSNE	T-distributed stochastic neighbor embedding)
TYK2	Tyrosine kinase 2
UPR	Unfolded Protein Response
USP18	Ubiquitin specific peptidase 18
UV	Ultraviolet
ZF	Zinc finger

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1 – LE LUPUS ÉRYTHÉMATEUX SYSTÉMIQUE: Une maladie chronique auto-immune

1.1/ Historique

Le lupus a intrigué les populations dès le moyen-âge. Le mot "lupus", tiré du latin signifiant "loup", est mentionné pour la première fois dans un récit médiéval datant approximativement de 855. Il relate la guérison miraculeuse de l'évêque de Liège, Eraclius, après un pèlerinage au tombeau de Saint-Martin de Tours (Felten et al., 2020 ; Mallavarapu et al., 2007). Dans cet ouvrage, le lupus est décrit comme une maladie qui "mange la chair", comme le loup. Le terme "lupus" est utilisé pour parler des ulcérations et nécroses du visage et des membres inférieurs jusqu'à la moitié du 19^{ème} siècle. La première description concrète du lupus est réalisée par Laurent Theodore Biett dépeignant le lupus comme étant un érythème centrifuge rare retrouvé plus fréquemment chez les femmes. La notion de maladie systémique est introduite par Moriz Kaposi en 1872 et rapporte les symptômes comme la fièvre, la perte de poids, l'arthrite, l'anémie et la lymphadénopathie. Les atteintes cardiaques, pulmonaires, rénales et la photosensibilité furent ajoutées à la description du lupus au début du 20^{ème} siècle (Scofield et al., 2009).

La compréhension de la maladie s'accélère rapidement les années suivantes. Malcom Hargraves réalise le premier test *in vitro* permettant de détecter les "LE cells" pour "*Lupus Erythematosus Cells*" (Figure 1). Les "LE cells" sont généralement des macrophages ou polynucléaires neutrophiles qui ont phagocyté du matériel nucléaire dégradé (Sathiavageesan et al., 2021). Ce phénomène se produit lorsque le sérum des patients contient des anticorps anti-nucléaires. Ces auto-anticorps se lient au matériel nucléaire dégradé et causent leur phagocytose. Cette observation devient alors l'un des premiers biomarqueurs immunologiques de la maladie (Reeves et al., 2011). La description des "LE cells" fut suivie par l'identification des anticorps anti-nucléaires et anti-ADN. Ces dernières observations ont permis de démontrer que le lupus est un processus auto-immun et ont ouvert la voie sur l'étude de la physiopathologie des maladies auto-immunes.

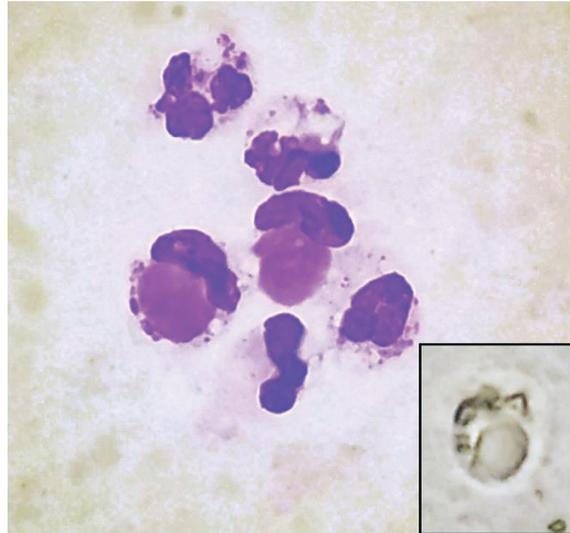


Figure 1 : Phénomène des "LE cells", premier marqueur biologique dans le lupus

Les cellules sanguines sont dégradées de manière à ce qu'elles libèrent leur matériel nucléaire. La présence d'anticorps anti-nucléaires dans l'échantillon induit la phagocytose du matériel génétique libéré par les phagocytes. Après centrifugation, la couche leuco-plaquettaire du prélèvement sanguin est récupérée, déposée sur lame et colorée avec de l'hématoxyline afin de distinguer les structures cellulaires. On distingue le noyau plurilobé d'un granulocyte (polynucléaire neutrophile) avec la présence d'un amas de matériel nucléaire dans le cytoplasme de la cellule ingérée lors de la phagocytose. (Ningombam et al., 2020)

1.2/ Symptômes et épidémiologie

On distingue quatre types de lupus : le lupus érythémateux systémique (LES), le lupus érythémateux cutané, le lupus néonatal et le lupus induit d'origine médicamenteuse. Ces deux derniers sont transitoires. Les symptômes disparaissent spontanément dans le cas du lupus néonatal avec l'élimination progressive des auto-anticorps de la mère (Gryka-Marton et al., 2021). Dans le lupus induit, ils diminuent progressivement avec l'arrêt de la prise du médicament (He et al., 2018). L'utilisation du terme "lupus" fait habituellement référence au LES. Le lupus érythémateux cutané se limite aux manifestations cutanées sans aucune autre atteinte. La maladie peut toutefois évoluer vers des atteintes systémiques par la suite.

Le LES est une maladie auto-immune chronique évoluant par poussées et caractérisé par un large spectre de manifestations cliniques. Les atteintes peuvent être cutanées, notamment au niveau du visage (avec la présence caractéristique du "masque du loup"), rénales, neurologiques, pulmonaires, cardiaques et articulaires (Figure 2). Afin de mieux identifier la maladie, l'*American College of Rheumatology* (ACR) a créé une classification basée sur l'évaluation de plusieurs critères clinico-biologiques qui a été récemment mise à jour en 2019 (Tableau 1). La détection

d'anticorps anti-nucléaires (AAN) à une dilution supérieure ou égale au 1:80 est nécessaire pour être éligible aux critères d'évaluation de l'ACR. Si le patient présente des AAN, des critères cliniques (constitutionnel, hématologique, neuropsychiatrique, cutanéomuqueux, sérologique, musculosquelettique, rénal) et immunologiques (présence d'anticorps anti-phospholipides, protéines du complément, anticorps spécifiques au LES) permettent l'établissement d'un score. Un poids de 2 à 10 est attribué à chaque critère. Si le score du patient est de 10 ou plus, et si au moins un critère clinique est rempli, la maladie est classée comme un LES (Aringer et al., 2019).

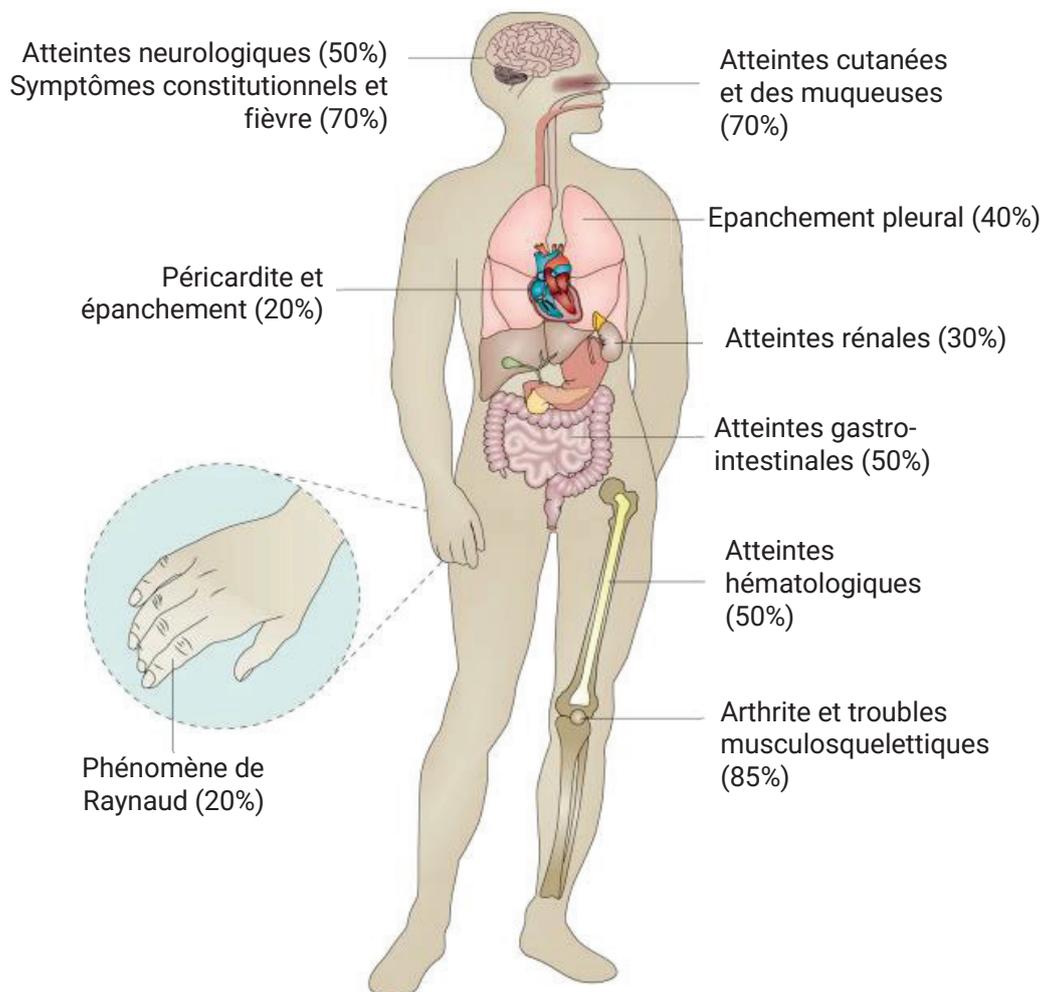


Figure 2 : Hétérogénéité des symptômes cliniques dans LES

Le diagnostic du LES est souvent long dû à la diversité des symptômes pouvant être retrouvés chez les patients. La plupart des symptômes pris indépendamment ne sont pas spécifiques au LES. Des examens biologiques sont nécessaires pour valider le diagnostic au vu de l'hétérogénéité des symptômes. (Kaul et al., 2016)

En France, la prévalence de la maladie est de 47 pour 100 000 individus (Arnaud et al., 2014; Rees et al., 2017). Le LES peut se manifester quel que soit l'âge mais touche majoritairement les femmes entre 20 et 40 ans, mettant en avant l'influence de certaines hormones sur l'activation du système immunitaire (Tsokos et al., 2011). On compte 9 femmes touchées pour 1 homme. Le LES est plus fréquent dans certains groupes ethniques, notamment chez les personnes d'origines afro-américaines et antillaises. Les LES à début pédiatrique ne représentent que 8% des cas mais sont souvent plus sévères. Le taux de concordance du LES chez les jumeaux monozygotes est entre 25 % et 50 % alors qu'il est de 2% chez les jumeaux dizygotiques, ce qui montre l'influence de la génétique dans le développement du LES pédiatrique. De plus, le sex-ratio de la maladie chez l'enfant est d'autant plus équilibré que le début est précoce, ce qui renforce l'hypothèse que les LES à début pédiatrique ont le plus souvent des causes génétiques indépendantes des hormones. Néanmoins, des facteurs environnementaux, comme l'exposition aux ultraviolets (UV), le tabagisme et des infections virales comme le virus Epstein-Barr, sont associés au LES (Barbhaiya et al., 2016 ; Kaul et al., 2016).

Domaine clinique	Constitutionnel:	• 2
	• Fièvre (> 38° C)	
	Hématologiques:	• 3
	• Leucopénie (< 4000/mcL)	• 4
	• Thrombopénie (numération plaquettaire < 100 000/mcL)	• 4
	• Hémolyse auto-immune	
	Neuropsychiatriques:	• 2
	• Confusion	• 3
	• Psychose	• 5
	• Convulsions (généralisées ou partielles/focales)	
Signes cutanéomuqueux:	• 2	
• Alopécie non cicatricielle	• 2	
• Ulcères buccaux	• 4	
• Lupus érythémateux subaigu cutané <i>ou</i> lupus érythémateux discoïde	• 6	
• Lupus érythémateux cutané aigu		
Séreux:	• 5	
• Épanchement pleural ou épanchement péricardique	• 6	
• Péricardite aiguë		
Musculosquelettiques:	• 6	
• Atteinte articulaire		
Rénal:	• 4	
• Protéinurie (> 0,5 g/24 heures)	• 8	
• Néphrite rénale à biopsie rénale de classe II ou V	• 10	
• Néphrite lupique de biopsie rénale de classe III ou IV		
Domaine immunologique	Anticorps antiphospholipides:	• 2
	• Anticorps anticardiolipine <i>ou</i>	
	• Anticorps anti-glycoprotéine 1 anti-bêta2 <i>ou</i>	
	• Anticoagulant lupique	
	Protéines du complément:	• 3
• C3 bas <i>ou</i> C4 bas	• 4	
• C3 bas <i>et</i> C4 bas		
Anticorps spécifiques du lupus:	• 6	
• Anticorps anti-dsDNA <i>ou</i>		
• Anticorps Anti-Smith		

Tableau 1 : Critères EULAR/ACR pour la classification du LES

Chaque critère (à gauche) est associé à un score (à droite). (Adapté de Aringer et al., 2019)

2 – LES FORMES MONOGÉNIQUES DE LUPUS: Les étudier pour comprendre la physiopathologie de la maladie

2.1/ Prédispositions génétiques dans le lupus

Les études d'association pangénomique (*Genome-Wide Association Study* (GWAS)) ont permis d'identifier plus de 80 loci associés au LES (Bentham et al., 2015; Oparina et al., 2019). Ces facteurs de susceptibilité n'expliquent cependant que dans une certaine mesure la composante génétique de la maladie. Ces loci ne représentent que 10 % de l'héritabilité génétique alors qu'elle est estimée à 66 % dans le lupus. Au contraire, dans certaines formes familiales ou LES à début pédiatrique, la composante génétique joue un rôle prédominant puisque la mutation d'un seul gène peut entraîner le développement de la maladie, il s'agit de lupus dit "monogénique" (Figure 3) (Manolio et al., 2009).

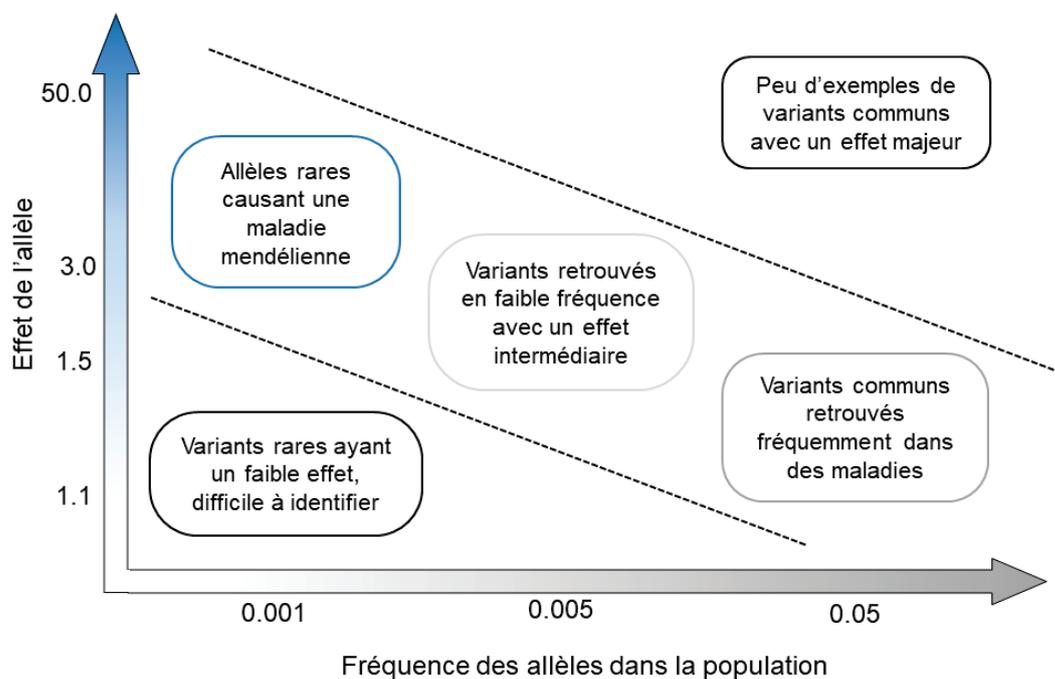


Figure 3 : Influence des variants sur la maladie en fonction de leur fréquence et leurs effets

Les études GWAS incluent un grand nombre d'individus et permettent d'identifier les variants les plus fréquemment retrouvés dans la maladie. Toutefois, à eux seuls, ces variants ont une influence mineure sur le développement de la maladie. Au contraire, les variants rares dans la population ont plus de chance d'avoir un effet majeur dans la pathologie. Les variants d'intérêts et retrouvés fréquemment dans les différentes études se situent entre les lignes en diagonale. (Adapté de Manolio et al., 2009)

Environ 25 % des patients avec un LES à début pédiatrique seraient porteurs d'un variant prédit rare et pathogénique (Belot et al., 2020). Actuellement, environ 30 gènes chez l'Homme et plus de 60 chez la souris ont été associés à des formes monogéniques. Ces variants sont retrouvés dans la partie de l'ADN codante pour des protéines contrairement à la majorité des altérations retrouvées en GWAS (Chen et al., 2017). Bien que ces formes mendéliennes de lupus soient rares, elles permettent de comprendre les mécanismes impliqués dans la pathogenèse.

2.2/ Mutations induisant un excès d'autoantigènes

Constamment, de nombreuses cellules meurent dans notre organisme après avoir assumé leurs fonctions. L'apoptose est un programme de mort cellulaire extrêmement efficace évitant à la fois la libération de matériels intracellulaires immunogènes et l'activation des mécanismes inflammatoires (Poon et al., 2014). Ce processus induit la formation de corps apoptotiques qui sont éliminés par les phagocytes dit professionnels comme les macrophages, les monocytes, les cellules dendritiques et les phagocytes non professionnels comme certaines cellules épithéliales (Boada-Romero et al., 2019). Ce phénomène appelé "efferocytose" permet d'éviter la nécrose des corps apoptotiques, qui libérerait dans l'espace extra-cellulaire des antigènes intracellulaires pouvant provoquer une réponse auto-immune. L'efferocytose est un mécanisme complexe finement régulé par de nombreuses molécules. L'altération de l'expression de certaines de ces molécules, comme celles de la voie du complément et de DNases extracellulaires, est suffisante pour déréguler ce processus d'efferocytose et conduire au développement d'un LES.

2.2.1/ Défauts du complément

Le système du complément est essentiel dans l'immunité innée et adaptative. Il constitue une première ligne de défense contre les pathogènes, favorise l'élimination des cellules en apoptose et des complexes immuns et régule la production de certaines cytokines (Sturfelt et al., 2012 ; Truedsson et al., 2007). Le complément est composé de plus d'une trentaine de protéines et peut être activé par trois voies distinctes (Figure 4) :

- la voie classique, activée par des molécules retrouvées sur les corps apoptotiques, les anticorps de type IgG et IgM et les complexes immuns.
- la voie des lectines activée suite à la reconnaissance de certains carbohydrates de type mannoses bactériens ou de corps apoptotiques par le *mannose binding lectine* (MBL).

- La voie alterne activée par des molécules d'origines bactériennes, virales, parasitaires...

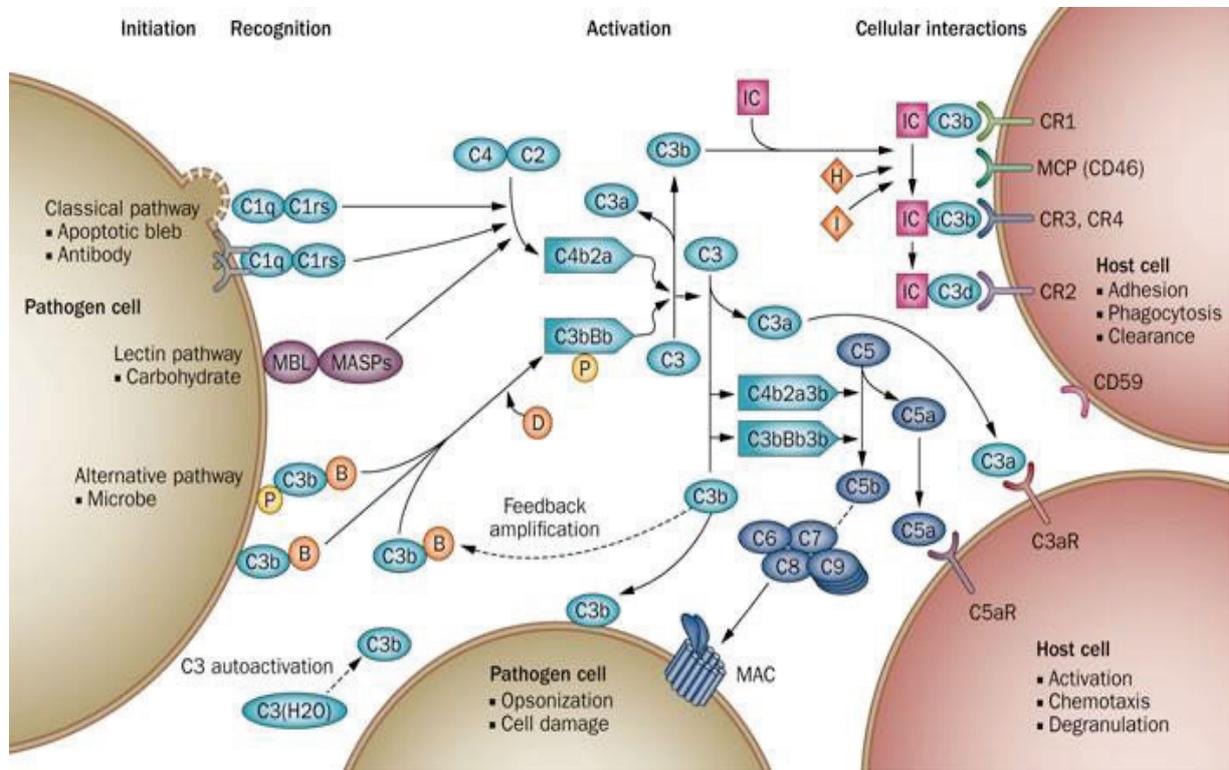


Figure 4 : L'activation du complément et son action sur différents effecteurs

La cascade du complément peut être activée par différents stimuli à travers trois voies principales : la voie classique, des lectines et alternative. Chacune de ces voies mène au clivage et à l'activation du C3, entraînant la génération d'un petit fragment C3a et d'un plus grand fragment C3b qui peut opsoniser les cellules pathogènes et les IC et se lier au récepteur CR1 sur les cellules hôtes. La dégradation de C3b par le facteur de complément I en présence de cofacteurs (facteur de complément H, MCP et CR1) crée des fragments plus petits, iC3b et C3d, qui interagissent avec CR3 ou CR4 et CR2, respectivement, qui sont présents principalement sur les phagocytes et les lymphocytes B. L'activation d'autres voies du complément conduit au clivage C5 et à la formation du MAC. Le fragment de C5a est un puissant facteur chimiotactique pour les phagocytes et, comme C3a, est également une anaphylatoxine causant la dégranulation des mastocytes et des basophiles par les interactions des récepteurs. B : *complement factor B*; C3aR : *C3a anaphylatoxin chemotactic receptor*; C5aR : *C5a anaphylatoxin chemotactic receptor*; CR : *complement receptor*; D : *complement factor D*; H : *complement factor H*; I : *complement factor I*; IC : *immune complex*; MAC : *membrane attack complex*; MASP : *mannan-binding lectin serine protease*; MBL : *mannose-binding lectin*; MCP : *membrane cofactor protein*; P : *properdin*. (Sturfelt et al., 2012)

Ces trois voies mènent à l'activation de la C3 convertase. L'hydrolyse de C3 induit la formation de l'anaphylatoxine C3a et de C3b. Ce dernier est capable d'opsoniser les éléments pathogènes, de se fixer aux complexes immuns, d'interagir avec les cellules exprimant le récepteur CR1 et favorise la formation des C5 convertases. Le C5 est ainsi clivé et mène à la formation du complexe d'attaque membranaire qui forme un pore dans la cellule cible et favorise sa lyse.

Des mutations conduisant à des déficits du complément ont été associées au LES monogénique et plus particulièrement les variants touchant les molécules de la voie classique. Les individus avec un déficit en C1q, C1r et C1s, impliqués dans la voie classique, ont 90 % de risque de développer un lupus. Les défauts en C4 et C2 induisent un risque moindre avec respectivement une prévalence de 75 % et 10 % (Truedsson et al., 2007 ; Belot et al., 2012). Les déficits en complément mettent en avant le rôle crucial de ce processus dans la pathogenèse du LES. Le complément joue notamment un rôle majeur dans l'élimination des complexes immuns qui peuvent induire, lorsqu'ils sont en excès, une forte inflammation avec des lésions tissulaires par différents mécanismes. L'opsonisation des antigènes par le C3b réduit la formation des complexes immuns en bloquant l'accès des sites de reconnaissance des antigènes aux anticorps. Le fragment C3b se fixe également aux complexes immuns et peut interagir avec des récepteurs aux compléments comme CR1 (*complement receptor 1*). C3b est ensuite dégradé pour former d'autres fragments permettant la liaison des complexes immuns avec des récepteurs du complément présent notamment sur les phagocytes et induit l'élimination de ces complexes immuns. Le complément est également primordial pour l'élimination des corps apoptotiques (Botto et al., 2019). Ils sont reconnus par le C1q et le MBL qui induisent l'activation du complément et la production de C3b. C3b, par le même mécanisme décrit ci-dessus, permet l'élimination de ces corps apoptotiques. De plus, le C1q se lie au CD91 exprimé à la surface des phagocytes entraînant directement la phagocytose du matériel apoptotique (Duus et al., 2010). Les molécules du complément possèdent également des fonctions immunomodulatrices dont l'induction de la tolérance et la régulation de la production de cytokines. Les auto-antigènes sont reconnus par le complément ce qui favorisent l'élimination des lymphocytes auto-réactifs. Un déficit en complément conduit ainsi à une élimination réduite des lymphocytes auto-réactifs dont les lymphocytes B (LB) qui produisent des auto-anticorps (Carroll et al., 2000 ; Simoni et al., 2020). Il a été également montré que C1q est un régulateur de la production de cytokines (Lood et al., 2009). C1q peut réduire *in vitro* la production d'interféron de type I (IFN-I) par des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). En conséquence, une réduction de l'activité de C1q favorise l'augmentation de l'IFN-I, molécule centrale dans le lupus.

2.2.2/ Défauts des DNases extracellulaires

Différents processus de mort cellulaire, comme la nécrose, la NETose et l'apoptose, libèrent une quantité importante de composants intracellulaires et nucléaires dans l'espace extracellulaire. Les DNases extracellulaires, DNase1 et DNase1L3, sont des enzymes spécialisées dans la digestion d'ADN libres circulants (Figure 5). DNase1 est une endonucléase permettant la dégradation de la chromatine en fragments de petites tailles (Baranovskii et al., 2005). DNase1L3 contient une partie C-terminale chargée positivement lui conférant la capacité d'éliminer l'ADN contenu dans les microparticules libérées suite à l'apoptose (Napirei et al., 2009). Ces enzymes jouent donc un rôle primordial dans l'élimination des composants intracellulaires relargués dans l'espace extracellulaire. Un défaut de ces DNases mène à l'accumulation de ces composants dont du matériel nucléaire. Normalement, les cellules du système immunitaire ne rencontrent pas les antigènes intracellulaires ; qui sont alors reconnus comme "étrangers". Cela conduit à l'activation des lymphocytes auto-réactifs et induit une rupture de la tolérance.

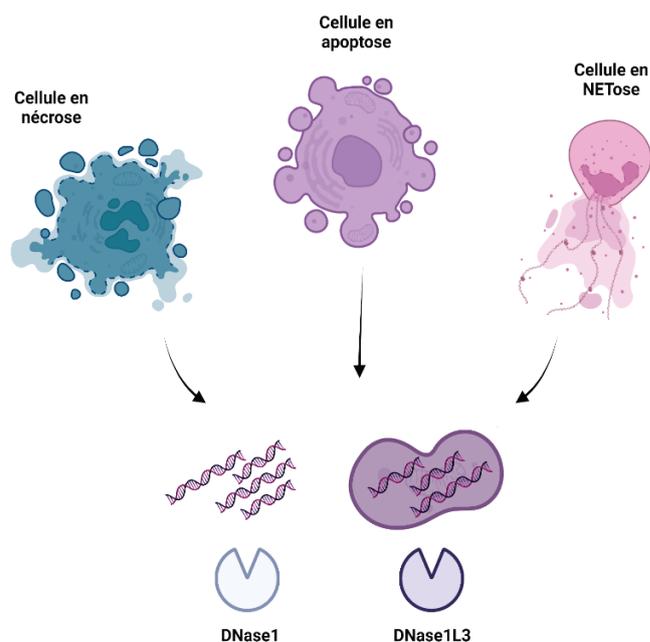


Figure 5 : Elimination des microparticules et de l'ADN circulants dans l'espace extracellulaire par DNase1 et DNase1L3

Lors de l'apoptose, des corps apoptotiques et des microparticules se forment tandis que lors de la nécrose, la membrane cellulaire se brise et le contenu intracellulaire est libéré dans l'espace extracellulaire. Dans le cas de la NETose, les neutrophiles relâchent un réseau de protéines et d'ADN afin de piéger un pathogène cible. Ces différents processus conduisent à la présence de matériel nucléaire dans le milieu extracellulaire avec une forte capacité antigénique nécessitant sa dégradation par des enzymes comme DNase1 et DNase1L3.

De manière intéressante, une baisse de l'activité de ces enzymes est retrouvée chez les patients avec un LES (Chitrabamrung et al., 1981 ; Hartl et al., 2021). De plus, plusieurs mutations altérant l'expression ou l'activité de certaines DNases ont été retrouvées dans des formes familiales de lupus (Carbonella et al., 2017 ; Yasutomo et al., 2001 ; Tusseau et al., 2022). Des variants de *DNASE1L3* ont également été retrouvés chez des patients avec une vascularite urticarienne hypocomplémentémique. D'ailleurs, les modèles murins déficients pour *Dnase1* et *Dnase1l3* développent un phénotype auto-immun avec des auto-anticorps, une splénomégalie et une glomérulonéphrite (Napirei et al., 2004 ; Sisirak et al., 2016). En effet, un déficit en DNase1/Dnase1L3 induit une accumulation de composants intracellulaires dont du matériel nucléaire, conduisant à l'activation de LB auto-réactifs et mène à une rupture de la tolérance.

2.3/ Mutations induisant une production anormale d'interféron de type I

L'IFN-I appartient à la famille des protéines interférons qui ont un rôle central dans l'activation du système immunitaire. L'IFN-I regroupe l'IFN- α composé de 13 sous-types, l'IFN- β et également l'IFN ω , IFN ϵ , IFN κ qui sont moins étudiés. Ces derniers ont une action limitée à certains organes contrairement à l'IFN- α et l'IFN- β que l'on retrouve de manière quasiment ubiquitaire dans l'organisme. Une grande partie des cellules peut produire de l'IFN-I mais les cellules dendritiques plasmacytoïdes sont les plus puissantes productrices d'IFN-I puisqu'elles peuvent en produire jusqu'à 100 fois plus en moyenne comparé aux autres cellules (Fitzgerald-Bocarsly et al., 2008). Afin de détecter les pathogènes tels que les bactéries et les virus, le système immunitaire est équipé de récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (*Pattern recognition receptor (PRR)*) (Figure 6). Ils sont principalement exprimés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) telles que les cellules dendritiques et les macrophages, mais ils sont également trouvés dans d'autres cellules immunitaires et non immunitaires. Les PRR peuvent être classés en cinq familles :

- les récepteurs de type Toll (*Toll-like receptor (TLR)*) composés de TLR1/2/4/5/6 reconnaissant les lipides, les lipoprotéines, les glycoprotéines, les lipopolysaccharides etc. d'origines virales, bactériennes et fongiques et des TLR3/7/8/9 reconnaissant l'ARN double brin (ARNdb), l'ARN simple brin (ARNsb) et l'ADN CpG non méthylé d'origine étrangère.
- les récepteurs de lectine de type C (*C-type lectin receptor (CLR)*) reconnaissant principalement des composants fongiques.
- les récepteurs de type NOD (*Nucleotide Oligomerization Domain like receptors (NLR)*) reconnaissant principalement des composants bactériens.

- les récepteurs de type RIG-I (*Retinoic acid-Inducible gene-I-like receptor* (RLR)) contenant RIG-I (*Retinoic acid-inducible gene I*), MDA5 (*Melanoma differentiation-associated protein 5*) et LGP2 (*Laboratory of Genetics and Physiology 2*) spécialisés dans la reconnaissance d'ARN simple et double brins.
- L'enzyme cGAS (*Cyclic GMP-AMP synthase*), un senseur d'ADN cytosolique.

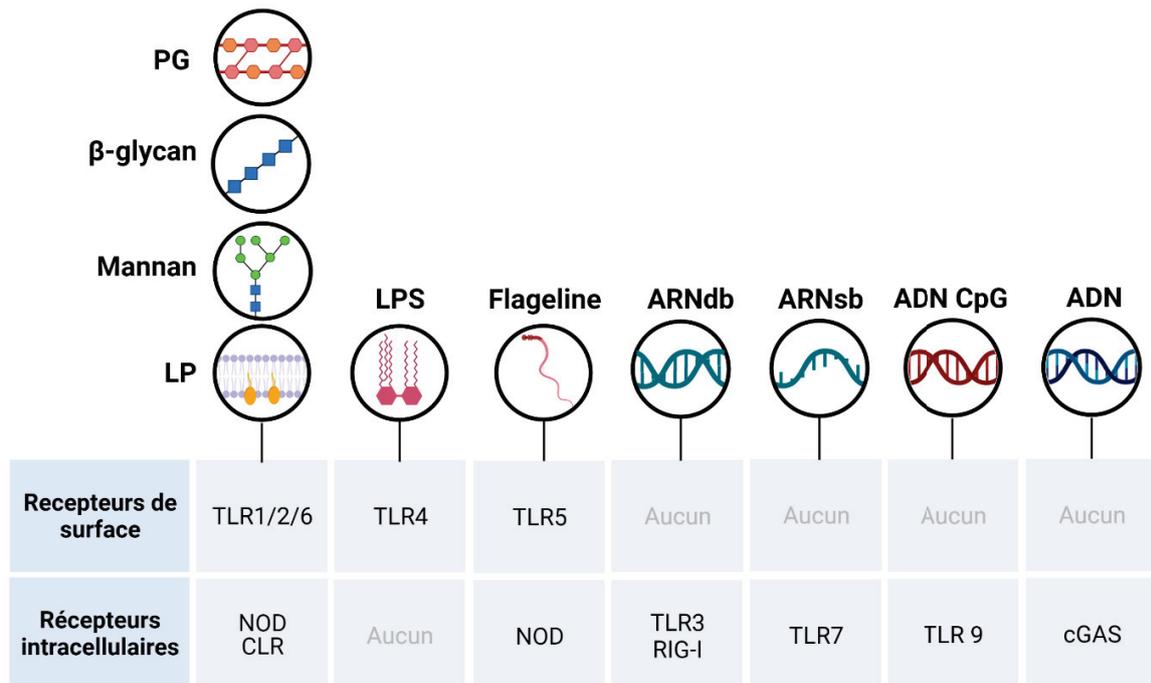


Figure 6 : Reconnaissance des PAMP par les PRR

Chaque PRR reconnaît un ou plusieurs motifs moléculaires, généralement par interaction directe avec des molécules du pathogène. PG : Peptidoglycane, LP : Lipoprotéine, LPS : Lipopolysaccharide.

Les mécanismes de défense antivirale dépendent majoritairement des motifs nucléiques et impliquent donc principalement les TLR3/7/8/9, les récepteurs de type RIG-I et cGAS. La stimulation de ces récepteurs par les PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) ou les DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) active différents adaptateurs comme TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*) pour TLR3, MYD88 pour TLR7, TLR8 et TLR9, MAVS (*mitochondrial antiviral signaling protein*) dans le cas des RLR et STING (*Stimulator of Interferon Genes*) dans le cas de cGAS. Différentes voies de signalisation sont induites suite à la reconnaissance des PAMPs et mènent à l'activation de facteurs de transcription de type IRF (*IFN regulatory factors*) entraînant la production d'IFN-I. La liaison de l'IFN-I aux récepteurs

IFNAR (*interferon- α/β receptor*) stimule la voie JAK-STAT (*JAnus Kinase - Signal Transducer and Activator of Transcription proteins*) et induit la transcription de nombreux ISGs (*Interferon Stimulated Genes*). L'expression de ces gènes permet de limiter la réplication du virus et adapte le système immunitaire à une réponse antivirale.

La réponse interféron est essentielle pour réaliser une réponse efficace face aux virus. Toutefois, une production excessive de l'IFN-I peut devenir pathologique. Les mutations conduisant à une surproduction d'IFN-I ont donné naissance au concept d'interferonopathie. Dans le cas du LES, un niveau élevé d'IFN-I est retrouvé chez une grande partie des patients notamment chez les enfants. De plus, le développement d'un lupus induit après la prise d'IFN recombinant dans le cadre d'un traitement contre des tumeurs malignes ou l'hépatite C, souligne le rôle primordial de l'IFN-I dans le LES (Ho et al., 2008 ; Niewold et al., 2008).

2.3.1/ Le syndrome d'Aicardi-Goutières

Le syndrome d'Aicardi-Goutières (SAG) est une encéphalopathie d'origine génétique, ressemblant à une infection virale congénitale, affectant les jeunes enfants et pouvant causer un handicap mental et physique sévère. Les patients ont un niveau élevé d'IFN-I dans le sang et dans le liquide cérébro-spinal. Le SAG est également associé au LES par la présence chez ces patients de signes spécifiques comme des anticorps anti-nucléaires, d'arthrite, d'anomalies hématologiques comme la thrombocytopénie et la leucocytopénie. En effet, certains patients avec le SAG remplissent les critères de l'ACR concernant le diagnostic de lupus (Ramantani et al., 2010). Le LES et le SAG font partie d'un même spectre de maladies puisque des patients ayant une mutation sur un même gène peuvent avoir un phénotype clinique différent tendant plutôt vers un LES ou un SAG (Rodero et al., 2016). Plusieurs mutations causant un excès de production d'IFN-I ont été identifiées dans les SAG et peuvent être classées selon les mécanismes impactés comme :

- **les défauts menant à une accumulation d'acides nucléiques endogènes.**

TREX1 (Three Prime Repair Exonuclease 1) code une exonucléase dégradant l'ADN simple et double brin du cytoplasme. Un déficit de TREX1 cause une accumulation d'acides nucléiques et particulièrement d'ADN provenant de rétroéléments (Chowdhury et al., 2006 ; Stetson et al., 2008). Ces acides nucléiques induisent une activation anormale de la voie cGAS-STING menant à une production d'IFN-I élevée. Environ 25 % des patients avec un SAG sont porteurs d'une mutation dans le gène *TREX1* et une majorité présentent des caractéristiques du LES. De manière intéressante, des mutations du gène codant pour DNase II, une endonucléase lysosomale impliquée dans la dégradation d'acides nucléiques provenant de la phagocytose notamment des corps apoptotiques, ont été identifiées chez plusieurs familles avec symptômes inflammatoires et auto-immuns (Rodero et al., 2017). *SAMHD1 (SAM domain and*

HD domain-containing protein 1) est une triphosphohydrolase métabolisant les dNTP lors de la réplication de l'ADN et lors de la réplication virale, permettant de réguler le stock de dNTPs disponible dans la cellule. Un déficit en SAMHD1 promeut l'augmentation inappropriée de la synthèse de l'ADN (Beloglazova et al., 2013). De plus, SAMHD1 possède une activité exonucléase ciblant l'ADN et l'ARN simple brin. Des mutations de *SAMHD1* sont retrouvées chez approximativement 13 % des patients atteints du SAG. La ribonucléase H2 (RNase H2) codée par *RNASEH2A*, *RNASEH2B* et *RNASEH2C* dégrade les complexes d'ARN:ADN pouvant se former lors de la réplication de l'ADN. L'altération de RNASEH2 conduit à une hausse de l'activité de la voie de signalisation cGAS-STING et des récepteurs reconnaissant l'ARN (Mackenzie et al., 2016). Les variants induisant un défaut dans les gènes codants pour la RNASEH2 sont retrouvés chez la moitié des patients avec un SAG (Crow et al., 2015). On notera également que des variants de *POLA1*, codant pour une sous-unité catalytique de l'ADN polymérase- α nécessaire pour la synthèse des hybrides ARN : ADN, sont mis en cause dans le développement de la pigmentation réticulée liée au chromosome X (Starokadomskyy et al., 2016). Cette pathologie a de fortes similarités avec le SAG, d'une part avec les symptômes auto-immuns des patients et d'autre part via la surproduction d'IFN-I découlant des mutations de *POLA1*. Enfin, ADAR1 (*Adenosine deaminase acting on RNA1*) est une enzyme modifiant l'ARN, catalysant la désamination de l'adénosine en inosine de l'ARN double brin. De ce fait, ADAR1 modifie l'ARN afin d'éviter sa reconnaissance par les senseurs d'ARN comme MDA5. L'absence d'activité de ADAR1 résulte en une accumulation d'ARN non modifié et potentiellement reconnaissable. D'après les données actuelles, 7% des patients avec un SAG sont porteurs de mutations dans le gène ADAR1.

- **les mutations menant à l'activation constitutive des voies de signalisation de l'IFN-I ou à une sensibilité accrue aux ligands d'acides nucléiques cytosoliques.**

La stimulation du récepteur de type RIG-I, codé par *DDX58* (*DExD/H-Box Helicase 58*), ou MDA5, codé par *IFIH1* (*Interferon Induced With Helicase C Domain 1*), induit une cascade de signalisation menant à la production d'IFN-I. Des variants gain de fonction de *DDX58* et de *IFIH1*, induisant une activité constante de cette voie de signalisation, sont associés au SAG et au LES. En conséquence, les patients porteurs de ces variants présentent d'un taux élevé d'IFN-I (Jang et al., 2014). La protéine SKIV2L participe également à l'activation du récepteur RIG-I. Il s'agit d'une hélicase retrouvée dans l'exosome d'ARN cytosolique (Eckard et al., 2014). Une perte de fonction de SKIV2L augmente l'activité des RLRs et induit une forte signature interféron chez les patients porteurs de ces variants.

- **les défauts de protéines régulatrices de l'IFN-I.**

ISG15 et *USP18* (*Ubiquitin specific peptidase 18*) sont deux ISGs. *ISG15* joue à la fois le rôle de cytokine, en favorisant la production IFN- γ des lymphocytes T (LT) et des cellules Natural Killer

(NK). C' est également une protéine clé dans la réponse anti-virale par son activité d'ISGylation (Villarroya-Beltri et al., 2017 ; Martin-Fernandez et al., 2020). Un déficit en ISG15 cause un défaut de production d'IFN- γ et entraîne une susceptibilité élevée aux infections notamment aux mycobactéries. De plus, le manque d'ISG15 conduit à une diminution de USP18, un régulateur négatif puissant du récepteur d'IFN-I, et se traduit par la signalisation continue de la voie JAK-STAT et par des niveaux d'expressions d'ISGs anormalement élevés. Des mutations de *USP18* ont également été identifiées et causent le Pseudo TORCH syndrome similaire au SAG. USP18 joue un rôle de régulateur négatif de la voie IFN-I en se liant à la sous-unité IFNAR2 du récepteur à l'IFN-I, empêchant ainsi l'interaction entre JAK et IFNAR (Meuwissen et al., 2016).

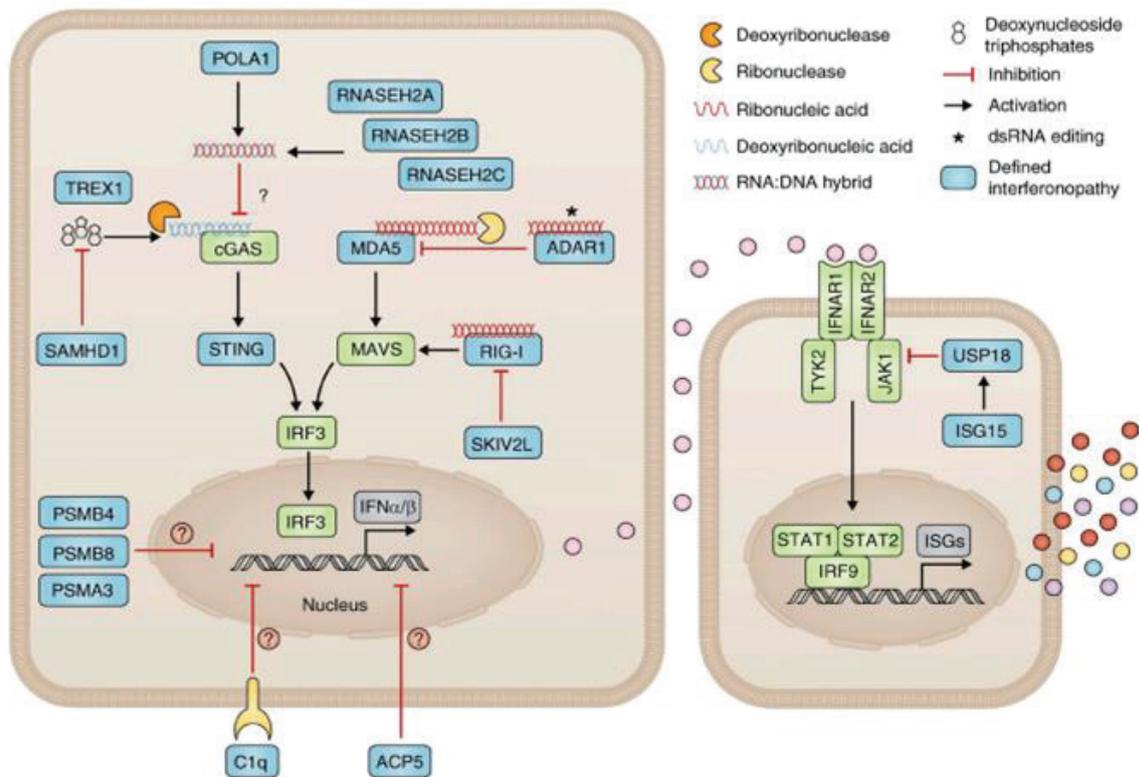


Figure 7 : Protéines dérégulées induisant des interféropathies

Les altérations génétiques conduisant à des pathologies considérées comme des interféropathies monogéniques sont représentées par des boîtes bleues. Ce schéma représente les principaux mécanismes cellulaires possibles entraînant une activation soutenue de la voie de signalisation l'interféron causée par : (1) les défauts menant à une accumulation d'acides nucléiques endogènes (*TREX1*, *SAMHD1*, *RNASEH2A*, *RNASEH2B*, *RNASEH2C*, *POLA1*, *ADAR1*, *SKIV2L*), (2) les mutations menant à l'activation constitutive des voies de signalisation de l'IFN-I/sensibilité accrue aux ligands d'acides nucléiques cytosoliques (*MDA5*, *RIG-I*, *STING*, *COPA*), (3) les mutations de perte de fonction dans les molécules responsables de la limitation du récepteur de l'interféron (IFNAR1/2) conduisant à une production non contrôlée d'ISGs (*ISG15* et *USP18*), (4) un dysfonctionnement du protéasome conduisant à une signalisation accrue d'interféron par un mécanisme inconnu (*PSMA3*, *PSMB4* et *PSMB8*) et (5) les mutations de *ACP5* causant une perte de fonction de TRAP dont le mécanisme d'action n'est pas encore clairement élucidé. (Rodero et al., 2016)

2.3.2/ Vasculopathie de l'enfant associée à STING

La protéine STING a un rôle essentiel dans la réponse interféron de type I. La reconnaissance de l'ADN double brin dans le cytoplasme par cGAS induit la synthèse de cGAMP (*Cyclic GMP-AMP*). Ce second messager est reconnu par l'homodimère formé par STING. Sous cette forme active, STING déclenche la phosphorylation de IRF3 par TBK1 (*TANK-binding kinase 1*) et mène à la transcription de l'IFN-I. Les patients souffrant de vasculopathie de l'enfant associée à STING (*STING-associated vasculopathy with onset in infancy (SAVI)*) sont porteurs de mutations gain de fonction avec effet dominant causant une activation constitutive de STING (Wang et al., 2021). La voie de signalisation associée à STING présente un niveau d'activité anormalement élevée conduisant à une production excessive d'IFN-I. Le SAVI se caractérise par une inflammation systémique néo-natale, une vasculopathie cutanée menant à des lésions aux niveaux des extrémités et une pneumopathie interstitielle. La forte réponse interféron chez ces patients conduit à l'expression de gènes associés à l'inflammation, l'apoptose, l'adhésion cellulaire et la coagulation notamment dans les cellules endothéliales. Les altérations de ces cellules jouent un rôle prédominant dans le SAVI au vu des atteintes vasculaires observées chez les patients. Au cours de ces 40 dernières années, seulement une cinquantaine de cas de SAVI a été rapportée dans la littérature.

2.3.3/ Le syndrome de COPA

Les symptômes observés dans le SAVI sont proches du syndrome de COPA. Cette pathologie se caractérise par une pneumopathie interstitielle pouvant être accompagnée d'une hémorragie pulmonaire, d'arthrite et dans certains cas d'une atteinte rénale. La pénétrance est incomplète dans le syndrome de COPA (autour de 60%) puisque l'on retrouve des formes asymptomatiques jusqu'à des atteintes les plus graves, y compris au sein d'une même famille. La protéine COPA est une sous-unité du coatamère COP I (*coat protein*) impliquée dans le transport rétrograde de protéines dans des vésicules allant de l'appareil de golgi au réticulum endoplasmique (Frémond et al., 2021). Chez les individus sains, la reconnaissance d'acides nucléiques par cGAS mène à la liaison de cGAMP à STING au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique. La protéine STING est alors transportée vers l'appareil de golgi par des vésicules COP II, phosphoryle TBK1 et conduit à la production d'IFN-I. STING est ensuite dégradé par les autophagosomes afin d'éviter une production excessive d'IFN-I ou retourne dans le réticulum endoplasmique par le coatamère COP I. La sous-unité COPA reconnaît les protéines cargo et permet le recrutement de STING aux vésicules COP I. Dans le syndrome de COPA, la protéine est mutée dans le domaine WD40 permettant la reconnaissance des protéines cargo. En conséquence, le rapatriement de STING vers le réticulum endoplasmique est bloqué et la protéine sous sa forme active se maintient dans l'appareil de golgi provoquant une stimulation

continue de la voie de l'IFN I. De plus, la réduction du transport rétrograde des protéines oblige les cellules à augmenter la traduction de nouvelles protéines pour compenser ce défaut et cause alors un stress du réticulum endoplasmique. Un stress cellulaire important mène à une cascade de réponses de la part de la cellule, qui si elles sont insuffisantes, conduisent à l'apoptose de la cellule.

2.3.4/ Les syndromes auto-inflammatoires liés au protéasome

Les syndromes auto-inflammatoires liés au protéasome ou PRAAS (*proteasome-associated autoinflammatory syndromes*) regroupent plusieurs pathologies auto-inflammatoires définies par des atteintes cutanées, une lipodystrophie, une atrophie musculaire, des poussées inflammatoires récurrentes accompagnées d'un déficit immunitaire, de la présence d'auto-anticorps et d'un niveau élevé d'IFN-I. Les PRAAS font référence aux pathologies causées par des mutations perte de fonction, récessives ou digéniques, touchant les sous-unités ou les protéines chaperonnes associées au protéasome (Crow et al., 2021).

Le protéasome constitue un complexe enzymatique essentiel au maintien de l'homéostasie cellulaire. Il catalyse la dégradation non-lysosomale des protéines ubiquitinylées. Toutes les cellules eucaryotes sont dotées du protéasome 26S constitué d'un cœur catalytique 20S et de deux sous-unités régulatrices 19S. Le complexe 20S est constitué de sous-unités $\alpha 1$ à $\alpha 7$ et $\beta 1$ à $\beta 7$. Les cellules immunitaires et les cellules répondant à l'interféron- γ possèdent les unités $\beta 1i$ (codé par *PSMB9*), $\beta 2i$ (codé par *PSMB10*) et $\beta 5i$ (codé par *PSMB8*) qui possèdent une activité protéase et forment l'immunoprotéasome. Les mutations associées aux PRAAS sont retrouvées notamment dans les gènes codant pour l'immunoprotéasome, pour les sous-unités $\alpha 3$ (*PSMA3*) et $\beta 7$ (*PSMB4*) et pour des protéines chaperonnes associées au protéasome essentielles à son assemblage (*POMP* et *PSMG2*). La perte d'activité du protéasome associée à ces mutations est à l'origine d'une accumulation de protéines ubiquitinylées qui active la réponse UPR (*Unfolded Protein Response*). L'activation de manière continue de la réponse UPR pourrait induire une réponse inflammatoire sans la présence de pathogène (Ebstein et al., 2019). Toutefois, les mécanismes précis reliant les défauts du protéasome à la production excessive d'IFN-I sont encore à élucider.

2.3.5/ Dysplasie spondylo-enchondrale

Les mutations de *ACP5* codant pour la phosphatase acide tartrate-résistante (TRAP) sont responsables de la dysplasie spondylo-enchondrale (SPENCD). Cette pathologie se transmet de façon autosomique récessive et se caractérise par des anomalies osseuses (dysplasie osseuse, retard de croissance...), neurologiques et par la présence de symptômes semblables au LES. Les patients avec un SPENCD présentent une perte d'expression de TRAP (Briggs et al., 2016).

L'absence de cette phosphatase cause un niveau anormalement élevé de l'ostéopontine phosphorylée. Sous cette forme, l'ostéopontine provoque une réduction de l'activité des ostéoclastes résultant en un épaissement osseux et des lésions plus ou moins sévères. L'ostéopontine est également impliquée dans la production de l'IFN-I par les pDC. En l'absence de TRAP, l'ostéopontine phosphorylée se lie avec TLR9 menant à l'activation de la voie de signalisation en aval du TLR9 et une production d'IFN-I anormalement élevée. Bien que le rôle de régulateur négatif de TRAP sur l'ostéopontine semble essentiel dans cette pathologie, les mécanismes moléculaires précis menant au SPENCD restent encore mal compris et n'expliquent pas la variabilité phénotypique observée chez les patients.

2.4/ Mutations induisant une hypersensibilité aux cytokines pro-inflammatoires

Les patients avec un LES présentent des niveaux de cytokines pro-inflammatoires anormalement élevés. Ces dérégulations altèrent l'homéostasie du système immunitaire et causent une inflammation systémique chronique nocive pour l'organisme. La plupart de ces cytokines exercent leurs fonctions biologiques en transitant par la voie JAK/STAT (Figure 8). Les JAK sont des tyrosines kinases intracellulaires regroupant quatre protéines : JAK-1, -2, -3 et TYK-2. Les facteurs de transcription STAT sont composés de sept membres : STAT-1, -2, -3, -4, -5A, -5B, -6 et sont les cibles des JAK. La phosphorylation des STAT entraîne leur dimérisation et leur migration dans le noyau afin de jouer leur rôle de facteur de transcription. Selon les différents ligands et récepteurs stimulés, de multiples combinaisons de JAK et STAT peuvent être activées et induire un panel de réponses cellulaires à la fois complexes et variées. La régulation fine de cette voie de signalisation entraîne une réponse cellulaire appropriée par rapport aux signaux intégrés.

La protéine SOCS1 (*suppressor of cytokine signaling protein 1*) participe au contrôle de l'activation de la voie JAK/STAT. Sa liaison à JAK-1 et JAK-2 empêche l'accès des substrats de la kinase à la poche catalytique. Des variants hétérozygotes de *SOCS1* provoquant une haploinsuffisance dominante ont été retrouvés chez plusieurs patients avec des symptômes auto-immuns et une lymphoprolifération (Hadjadj et al., 2020). Ces mutations causent une hypersensibilité des cellules en réponse aux cytokines induisant la voie JAK/STAT et provoquent un défaut de l'homéostasie de nombreuses cellules immunitaires dont les LT. Ces lymphocytes T présentent un excès de prolifération en réponse à l'IL-2 et on observe également une diminution des LT régulateurs (LTreg). Bien que SOCS1 soit impliqué dans la régulation de différentes cellules immunitaires, cette protéine semble jouer un rôle spécifique dans les LT permettant d'éviter une rupture de tolérance.

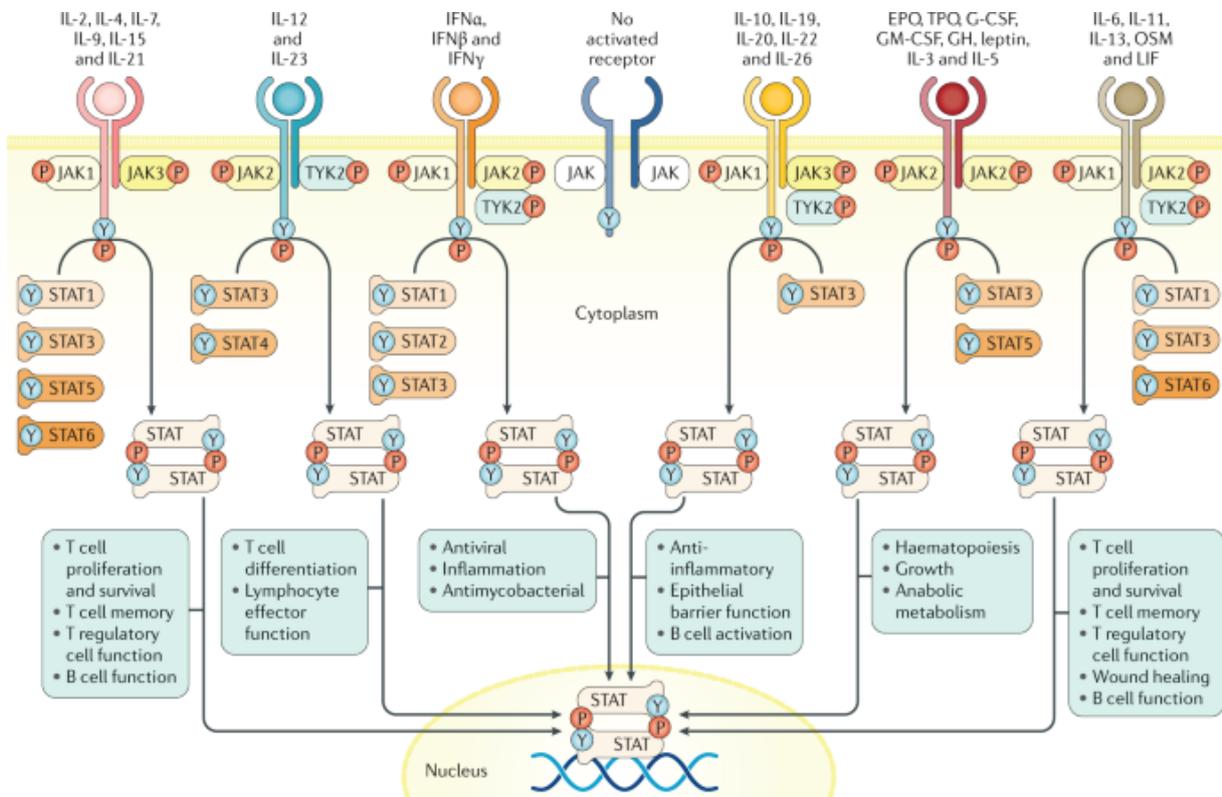


Figure 8 : Les différentes voies d'activations des protéines JAK/STAT

Les effets biologiques de plus de 50 cytokines et facteurs de croissance sont médiés par les voies JAK-STAT. Lors de la liaison d'un ligand à son récepteur, les protéines de la famille des JAK, composées de JAK1, JAK2, JAK3 et de la tyrosine kinase 2 (TYK2), s'autophosphorylent et/ou phosphorylent d'autres JAK ainsi que certains résidus du récepteur. L'activation de JAK entraîne des changements conformationnels qui amènent les JAK associés à chaque sous-unité réceptrice à proximité les unes des autres, déclenchant une série d'événements de phosphorylation subséquents qui aboutissent finalement à la dimérisation et l'activation des protéines STAT. Selon le ligand et le récepteur, différentes combinaisons de JAK et de STAT sont activées avec un haut degré de spécificité. Les STAT en hétéro- ou homo-dimères migrent ensuite dans le noyau et régulent la transcription de gènes conduisant à la modulation des processus immunologiques fondamentaux, y compris la survie, la prolifération et la différenciation des LT, des fonctions antivirales, le métabolisme ... (boîtes vertes). (Salas et al., 2020)

Des mutations gain de fonction dans d'autres gènes de la voie JAK/STAT induisant des manifestations auto-immunes ont été retrouvées dans les gènes *STAT3* et *STAT1*. Le phénotype clinique observé chez la majorité des patients porteurs de variants gain de fonction de *STAT3* est

proche de celui observé dans l'haploinsuffisance de SOCS1 avec une lymphoprolifération et une symptomatologie auto-immune (Flanagan et al., 2014 ; Milner et al., 2015). L'hypersensibilité aux cytokines causée par ces mutations provoque également une réduction du nombre de LTreg et pourrait expliquer en partie le phénotype auto-immun chez ces patients. Les mutations hétérozygotes gain de fonction de *STAT1* sont davantage associées à une immunodéficiência se traduisant par des infections fongiques, bactériennes, virales, etc. récurrentes. De manière intéressante, 37 % des patients avec des mutations gain de fonction de *STAT1* présentent des manifestations auto-immunes dont 2 % qui sont diagnostiqués avec un LES (Toubiana et al., 2016).

La découverte de ces nouveaux variants de la voie JAK-STAT met en avant l'importance capitale de la régulation de ces cytokines et met en lumière une nouvelle voie causale de LES qui est l'hypersensibilité aux cytokines pro-inflammatoires. Les traitements personnalisés inhibant des composants de la voie JAK/STAT ont montré des premiers résultats fortement encourageants et ouvrent la voie à l'élargissement de la médecine personnalisée dans le LES (Hadjadj et al., 2020).

2.5/ Mutations induisant un défaut de tolérance

2.5.1/ Le syndrome lymphoprolifératif auto-immun

Le LES, comme toutes les maladies auto-immunes, se caractérise par une rupture de la tolérance. Lors du développement des lymphocytes T et B, une certaine proportion du répertoire immun a la capacité de reconnaître le soi. Une majorité de ces cellules auto-réactives est éliminée notamment par le mécanisme d'apoptose. Des mutations dans la voie de signalisation FAS ont été identifiées dans le syndrome lymphoprolifératif auto-immun (SLAI ou ALPS pour *auto-immune lymphoproliferative syndrome*). Les défauts d'apoptose de la voie FAS entraînent une lymphoprolifération non-maligne et non-infectieuse associée à des manifestations auto-immunes. Le tableau clinique du SLAI est très hétérogène mais l'on retrouve fréquemment une splénomégalie, une lymphadénopathie, une cytopénie auto-immune et au niveau biologique, une augmentation des LT CD4- CD8- dit double négatives. Les patients présentent également un risque accru de développer un lymphome au cours de leur vie.

Après avoir reconnu son ligand FASL, le récepteur FAS forme un multi-complexe protéique comprenant la caspase 8 et 10 (Rieux-Laucat et al., 2017). L'activation des caspases entraîne la mise en route d'une cascade de signalisation par l'intermédiaire d'autres caspases menant à l'apoptose de la cellule. Ce mécanisme est primordial afin de maintenir l'homéostasie lymphocytaire après l'activation des cellules et pour éliminer les lymphocytes auto-réactifs. En effet, l'activation d'un lymphocyte T par un antigène promeut la production de FASL. Sa

reconnaissance par le récepteur FAS induit l'apoptose soit des cellules auto-réactives soit des cellules en phase de contraction après leur expansion clonale. Dans le SLAI, un défaut de cette voie de signalisation entraîne une expansion des lymphocytes, dont les cellules auto-réactives expliquant ainsi les manifestations auto-immunes. Actuellement, des variants ont été identifiés dans cette voie de signalisation chez 2/3 des patients (Shah et al., 2014). Des mutations germinales de *FAS* sont retrouvées dans 72 % des cas de SLAI. De manière intéressante, des mutations somatiques principalement dans les LT doubles négatifs ont été identifiées et causent un phénotype clinique semblable aux formes germinales (Dowdell et al., 2010 ; Martínez-Feito et al., 2015). D'autres défauts de protéines de la voie FAS sont impliqués dans le développement de la maladie dont des mutations dans les gènes codant pour FASL et la caspase 10 chez environ 2 % des patients. Actuellement, les altérations génétiques chez une partie des patients n'ont pas été trouvées. Leurs identifications permettraient de faciliter le diagnostic de ses patients et d'améliorer la compréhension sur la pathogénèse de la maladie.

2.5.2/ Les RASopathies

Les RASopathies rassemblent des pathologies caractérisées par des mutations dans la voie RAS/MAPK (*rat sarcoma virus/ mitogen-activated protein kinases*). Ces pathologies, dont la plus connue est le syndrome de Noonan, sont définies par une petite taille, une dysmorphie faciale, des troubles cardiaques, neurologiques et immunologiques. Même si les RASopathies partagent un socle commun de symptômes, chaque syndrome possède des caractéristiques particulières. Les RASopathies sont également associées à des manifestations auto-immunes puisqu'une étude a montré la présence d'auto-anticorps chez 52 % des patients (Bader-Meunier et al., 2013). D'ailleurs, certains ont été diagnostiqués pour une RASopathie associée à un LES et mettent ainsi en avant le rôle de cette signalisation dans le processus de développement d'un LES.

La voie de signalisation RAS/MAPK transduit de multiples signaux extracellulaires impliqués dans des processus comme la prolifération, la différenciation et la survie. Suite à la reconnaissance d'un ligand par un récepteur associé à la voie RAS/MAPK, la protéine adaptatrice GRB2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) active le facteur d'échange SOS (*son of sevenless*) qui convertit les RAS-GDP en forme active RAS-GTP. Sous cette forme, les RAS-GTP telles que HRAS (*Harvey Rat sarcoma virus*), KRAS (*Kirsten rat sarcoma virus*) et NRAS (*Neuroblastoma rat sarcoma virus*) induisent une cascade de signalisation via RAF1 (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma 1*) et BRAF menant à l'activation de différentes MAPK (Hebron et al., 2022). La régulation fine de cette voie est primordiale et est donc contrôlée par plusieurs mécanismes. Différentes phosphatases comme la neurofibrine-1 (*NF1*), PPP1CB, SHP-2 (*PTPN11*) vont cibler respectivement des RAS, RAF1 et les récepteurs associés à la voie RAS/MAPK. Des protéines

comme LZTR1 (*leucine zipper like transcription regulator 1*) et CBL favorisent l'ubiquitination des éléments de la voie de signalisation et par conséquent participent à leur dégradation par le protéasome. Enfin, la myristoylation de SHOC2 ancre la protéine à la membrane et cause sa liaison avec RAS pour favoriser son activation. Plusieurs mutations associées aux RASopathies ont été retrouvées dans les gènes codant pour les RAS et les kinases de cette voie de signalisation (*HRAS, KRAS, NRAS...*) et les protéines régulatrices associées (*NF1, PPP1CB, PTPN11, LZTR1, CBL, SHOC2...*). La fréquence de ces variants chez les patients varie selon la pathologie associée. Toutefois, des altérations de *PTPN11* sont présentes dans la plupart des RASopathies et sont retrouvées chez 50 % des syndromes de Noonan (Tartaglia et al., 2002).

2.5.3/ Défauts de tolérance des lymphocytes B

Une des principales caractéristiques du LES est le développement d'auto-anticorps. Ils sont produits par des LB matures, différenciés en plasmocytes, et sont secondaires à une rupture de tolérance du soi des LB. Le développement des LB est finement régulé à diverses étapes. Cependant, une certaine proportion du répertoire immunitaire a la capacité de reconnaître le soi. Ces cellules sont alors neutralisées par différents processus comme l'anergie, l'édition du BCR (*B-cell Receptor*) ou la délétion clonale afin d'éviter le développement de l'auto-immunité. Ces mécanismes seront présentés plus en détails dans la suite du manuscrit.

La diversité du répertoire des LT et LB est dû notamment au mécanisme de recombinaison V(D)J qui permet de former de multiples combinaisons entre les fragments "variable" (V), de "jonction" (J) et de "diversité" (D). Ce processus est contrôlé par les enzymes RAG (*Recombination-activating gene*) 1 et RAG2 qui initient la recombinaison V(D)J. Ce mécanisme de recombinaison intervient également lors de l'édition du BCR afin de modifier à nouveau la chaîne légère du BCR des LB auto-réactifs. Des mutations induisant une perte ou une baisse de fonction de RAG1/RAG2 sont associées à des immunodéficiences pouvant être combinées à de l'auto-immunité. Le cas d'une patiente porteuse d'une mutation hétérozygote de *RAG2* a été reporté dans la littérature avec un tableau clinique classique du LES (Walter et al., 2015). Ce phénotype est probablement dû à un défaut de tolérance des LT et des LB, induit par le défaut de RAG2 (Notarangelo et al., 2016). La réduction du niveau de recombinaison V(D)J mène à une restriction du répertoire des LB enrichi en cellules auto-réactives suite à la diminution de l'édition du BCR. De plus, les patients avec un défaut de RAG ont un niveau élevé de BAFF (*B-cell activating factor*). Cette cytokine favorise la survie des LB. Dans le cas de LB auto-réactives, la forte concentration de BAFF chez les patients permettrait de sauver ces cellules en fournissant un signal de survie.

Le développement des LB implique également le facteur de transcription IKAROS codé par *IKZF1*. Plus globalement, cette protéine joue un rôle essentiel dans l'hématopoïèse et la

lymphopoïèse. Les modèles de souris *knock-out* (KO) pour ce gène présentent une absence de LT, LB et NK et de différents progéniteurs précoces. Concernant le rôle d'IKAROS dans les LB, ce facteur de transcription contrôle la différenciation des progéniteurs des LB puisqu'une baisse du niveau d'IKAROS entraîne un blocage dans la différenciation des LB au stade pro-B (Kirstetter et al., 2002). En périphérie, IKAROS régule le seuil d'activation des LB et participe à la commutation isotypique (Sellars et al., 2009). Ces dernières années, des altérations d'IKAROS ont été associées au LES. Une étude de GWAS sur plus de 4000 patients a notamment rapporté plusieurs SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) de *IKZF1* associés au LES (Chen et al., 2020). De plus, une baisse du niveau d'expression d'IKAROS est retrouvée dans de nombreux cas de LES. C'est finalement la découverte de mutations d'*IKZF1* induisant une haplo-insuffisance ou un effet dominant-négatif chez plusieurs patients qui a confirmé le rôle essentiel d'IKAROS dans le LES (Hoshino et al., 2017 ; Nieuwenhove et al., 2018).

Chaque cellule B possède un BCR unique reconnaissant des antigènes du soi ou non-soi. Selon l'état de maturation de la cellule et les signaux qu'elle reçoit, la stimulation du BCR induit la prolifération, l'anergie ou l'apoptose. À la suite d'une rencontre avec un antigène, les LB matures reçoivent des signaux pour proliférer alors que durant les étapes de développement, la reconnaissance excessive d'un auto-antigène par le BCR entraîne l'édition du BCR ou la délétion clonale. La signalisation du BCR joue ainsi un rôle primordial dans la tolérance des LB. La protéine kinase C δ (PKC- δ), codée par *PRKCD*, est impliquée dans le contrôle de la prolifération et de l'apoptose des lymphocytes B. Plusieurs patients avec un LES ont été décrits avec des mutations homozygotes de *PRKCD*. Il a été montré que les lymphocytes B des patients déficients en PKC- δ sont moins sensibles à l'apoptose et prolifèrent davantage, ce qui entraîne un défaut de sélection négative. Cette fonction régulatrice de PKC- δ serait notamment médiée par son influence sur la signalisation du BCR et sera abordée ultérieurement dans le manuscrit. Enfin, des mutations de *P2RY8* (*P2Y Receptor Family Member 8*) ont également été identifiées et sont suspectées d'altérer la tolérance des LB. Actuellement, trois variants de *P2RY8* chez huit patients avec un LES ont été rapportés dans la littérature (He et al., 2022). Ils entraînent une augmentation du niveau des voies PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*)/AKT et ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) perturbant respectivement la sélection négative et la formation des plasmocytes. En outre, *P2RY8* est un récepteur couplé aux protéines G reconnaissant le S-geranyl-geranyl-L-glutathione (GGG). La liaison de ce ligand à *P2RY8* permet de confiner les LB dans le centre germinatif afin de permettre la diversification du répertoire des LB lors de l'hypermutation somatique et la commutation isotypique. A cause des altérations de *P2RY8*, les LB reçoivent moins de signaux inhibant leur migration en réponse aux cytokines comme CXCL12. *P2RY8* est donc impliqué dans de multiples mécanismes essentiels pour maintenir la tolérance des LB et met en lumière l'importance de la régulation des différents points de contrôle de ce processus.

2.6/ Autres mutations retrouvées dans les LES monogéniques

Les dysfonctionnements du système immunitaire dans les déficits immunitaires sont fréquemment associés à des manifestations auto-immunes. Certaines immunodéficiences primaires présentent des caractéristiques du LES mais le mécanisme sous-jacent n'est pas toujours élucidé. Dans le cas de la granulomatose septique chronique, le déficit immunitaire est causé par une altération de l'une des 5 sous-unités de la NADPH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*) oxydase. Ce complexe est notamment responsable du burst oxydatif des cellules phagocytaires. Une altération de ce complexe résulte en un défaut de production de ROS (*Reactive oxygen species*). Des défauts de CYBB (*cytochrome B-245 Beta Chain*), une protéine composant également la NADPH oxydase, sont fréquemment associés au LES (Battersby et al., 2013). Par ailleurs, le déficit en Dedicator Of Cytokinesis 8 (DOCK8) est une des causes génétiques du syndrome hyper-IgE de transmission autosomique récessive. Une dizaine de cas associant ce syndrome et un LES ont été décrits dans la littérature (Jouhadi et al., 2014). D'autres pathologies d'origine plus auto-inflammatoire sont également associées au LES. Par exemple, le déficit en ADA2 (adénosine désaminase 2) est principalement associé à une fièvre récurrente et une vasculopathie. Une publication récente a recensé deux patients dont l'un présentait un phénotype proche du LES (Schepp et al., 2016). Enfin, des associations entre lupus et maladies métaboliques comme le déficit en prolidase, l'alpha-mannosidose ou l'intolérance aux protéines dibasiques avec lysinurie (IPDL) ont également été rapportées dans la littérature (Kamoda et al., 1998 ; Urushihara et al., 2004 ; Butbul Aviel et al., 2012 ; Contreras et al., 2021) .

3 – LES LYMPHOCYTES B : Leurs rôles majeurs dans le développement de la maladie

3.1/ Généralités

Les LB ont une place primordiale dans le système immunitaire. Ce sont les piliers de la réponse humorale. Cette réponse intervient lors de la phase adaptative pour permettre l'élimination des agents pathogènes, des cellules cancéreuses, etc. Les LB reconnaissent de manière spécifique un antigène par un récepteur transmembranaire : le BCR. Grâce à des mécanismes complexes de recombinaison de gènes codant les chaînes du BCR, les LB forment un répertoire pouvant reconnaître une immense diversité d'antigènes offrant ainsi un spectre de protection large et efficace.

3.1.1/ Développement des lymphocytes B

Dans les premières semaines de vie embryonnaire, une première population de LB apparaît : les lymphocytes B1. Ils apparaissent dans le foie fœtal puis migrent vers les muqueuses et les cavités pleurale et péritonéale (Figure 9) (Rothstein et al., 2016). Ils représentent une catégorie unique de LB appartenant davantage à l'immunité innée qu'adaptative. Ils sont définis par un répertoire oligoclonal et produisent en majorité des anticorps de type IgM. Ils permettent de former une première ligne de défense face aux pathogènes extérieurs dans les zones à l'interface avec l'extérieur.

La majorité des LB sont des LB dits conventionnels (B2). Ils proviennent de la moelle osseuse (MO) où ils vont effectuer une grande partie de leur différenciation. Ces LB sont issus des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Les CSH vont donner naissance à deux types de progéniteurs : les progéniteurs myéloïdes communs (CMP) qui génèrent toutes les cellules myéloïdes et les progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) qui vont donner les différents sous-types de lymphocytes. Différents facteurs de transcription induits par l'environnement du CLP engagent la cellule dans la différenciation en LB et donnent naissance en premier lieu au Pre-Pro-B (Clark et al., 2014).

Développement des lymphocytes B-1



Développement des lymphocytes B-2

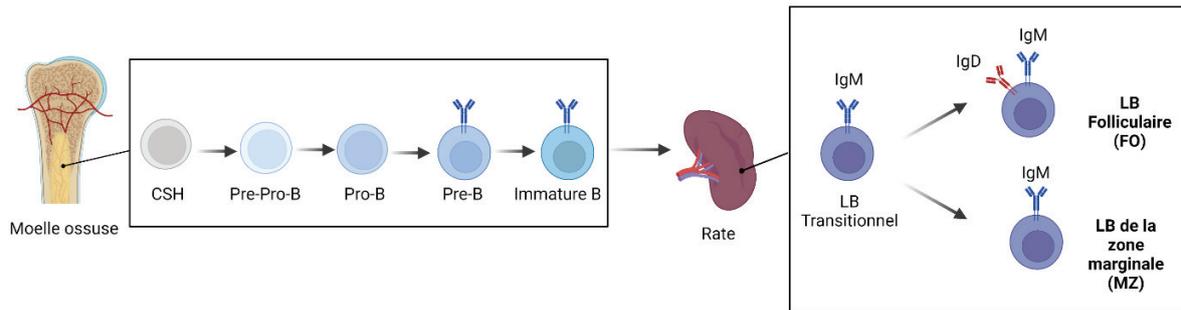


Figure 9 : Le développement des LB

Durant le stade embryonnaire, les premiers LB de type B-1 se développent dans le foie fétal puis circulent et se maintiennent en périphérie. En majorité, les LB sont issus des cellules souches hématopoïétiques (CSH) provenant de la MO et donnent les cellules B-2. Lors des premiers stades de développement, le phénomène de réarrangement des gènes des immunoglobulines a lieu afin d'obtenir des cellules exprimant un BCR unique pouvant induire une cascade de signalisation suite à la reconnaissance d'un antigène. Ce processus est suivi d'une étape de sélection négative pour éliminer les LB immatures auto-réactifs. Les LB migrent ensuite dans la rate où elles se différencient en LB transitionnel qui deviendront soit des cellules de la zone marginale (MZ) ou des LB folliculaires (FO).

A ce stade, la recombinaison du locus de la chaîne lourde du BCR débute par la recombinaison des fragments D et J puis se poursuit au stade Pro-B avec le réarrangement V-DJ (Nemazee et al., 2017). La recombinaison V(D)J permet de réarranger et d'assembler de manière aléatoire les différents fragments V, D et J afin de d'obtenir une large diversité dans le répertoire des LB (Figure 10). En conséquence, une multitude d'antigènes pourront être reconnus par ce répertoire. L'assemblage d'une combinaison V(D)J avec un fragment constant (C) conduit à l'expression d'une chaîne lourde d'immunoglobuline de type IgM qui va être exprimée à la surface de la cellule en association avec la chaîne légère de substitution composée de λ 5 et V-preB, c'est le Pre-BCR (Winkler et al., 2018).

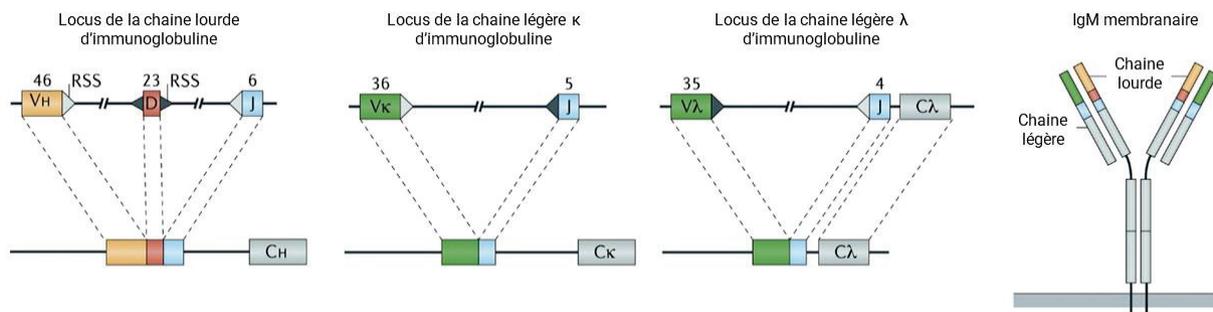


Figure 10 : Assemblage des chaînes d'immunoglobulines

La partie variable des gènes codant pour les immunoglobulines est composée des segments V, D et J pour la chaîne lourde et des segments V et J pour les chaînes légères, λ et κ . Les triangles indiquent les séquences RSS (*recombination signal sequence*) adjacentes aux segments des gènes. Le nombre indiqué au-dessus de chaque élément est une estimation du nombre d'éléments pour chaque segment V, D ou J chez l'Homme.

L'assemblage des chaînes lourdes et légères, suite à la recombinaison V(D)J et de la liaison à partie constante (C), permet la formation de l'IgM membranaire. V_H = segments V de la chaîne lourde, V_κ = segments V de la chaîne légère κ , V_λ = segments V de la chaîne légère λ , C_H = partie constante de la chaîne lourde, C_κ = partie constante de la chaîne légère κ , C_λ = partie constante de la chaîne légère λ . (Adapté de Nemazee et al., 2017)

A ce stade de différenciation, la cellule dite Pre-B reçoit des signaux de prolifération par l'intermédiaire du Pre-BCR. Par la suite, la recombinaison des fragments V et J du locus de la chaîne légère, κ ou λ , débute à son tour. Chez l'homme, environ 60% des LB expriment des chaînes légères Ig κ , tandis que 40% expriment Ig λ , contre un rapport à 20:1 Ig κ :Ig λ chez la souris (Ghia et al., 1996). Dans le cas où la recombinaison V(D)J conduit à l'expression de chaîne légère et lourde non-défectueuses, elles s'assemblent à la surface du LB immatures avec les protéines transmembranaires CD79a et CD79b pour former le BCR. Les LB immatures rencontrent à cette étape de leur différenciation des antigènes dont en majorité des auto-antigènes. Les cellules auto-réactives sont alors éliminées par différents mécanismes qui seront détaillés plus tard dans le manuscrit. Par la suite, les LB sortent de la MO pour continuer leur différenciation dans la rate. Ils passent par le stade transitionnel, où les cellules auto-réactives sont encore éliminées, avant de se différencier en LB folliculaire (FO) ou de la zone marginale (MZ) (Cyster et al., 2019 ; Zhou et al., 2020). Les LB MZ sont des cellules non circulantes localisées entre la pulpe rouge composée d'une multitude de vaisseaux sanguins, et la pulpe blanche constituée d'un amas de tissus lymphoïde. Cette localisation spécifique permet aux LB de la MZ de détecter rapidement les antigènes de la circulation sanguine se retrouvant dans la rate (Martin et al., 2002). Toutefois, les LB MZ chez l'Homme sont également présents dans le sang périphérique, ce qui suggère qu'ils recirculent contrairement à la souris. Après leur activation suite à la reconnaissance d'un

antigène, ils se différencient rapidement en plasmablastes à courte durée de vie, producteurs d'IgM de manière T-indépendante (Figure 11). Toutefois, les LB MZ peuvent dans une moindre mesure réaliser une réponse T-dépendante et effectuer l'hypermutation somatique et la commutation isotypique (Song et Cerny., 2003). Concernant les LB FO, ils représentent la sous-population majoritaire des LB. Ils naviguent entre la circulation sanguine et les organes lymphoïdes secondaires (OLS) dont la rate à la recherche de l'antigène reconnu par leur BCR (Pieper et al., 2013 ; Wang et al., 2020). La rencontre entre le LB et son antigène provoque son activation de manière T-dépendante qui mène le LB à plusieurs possibilités de différenciation.

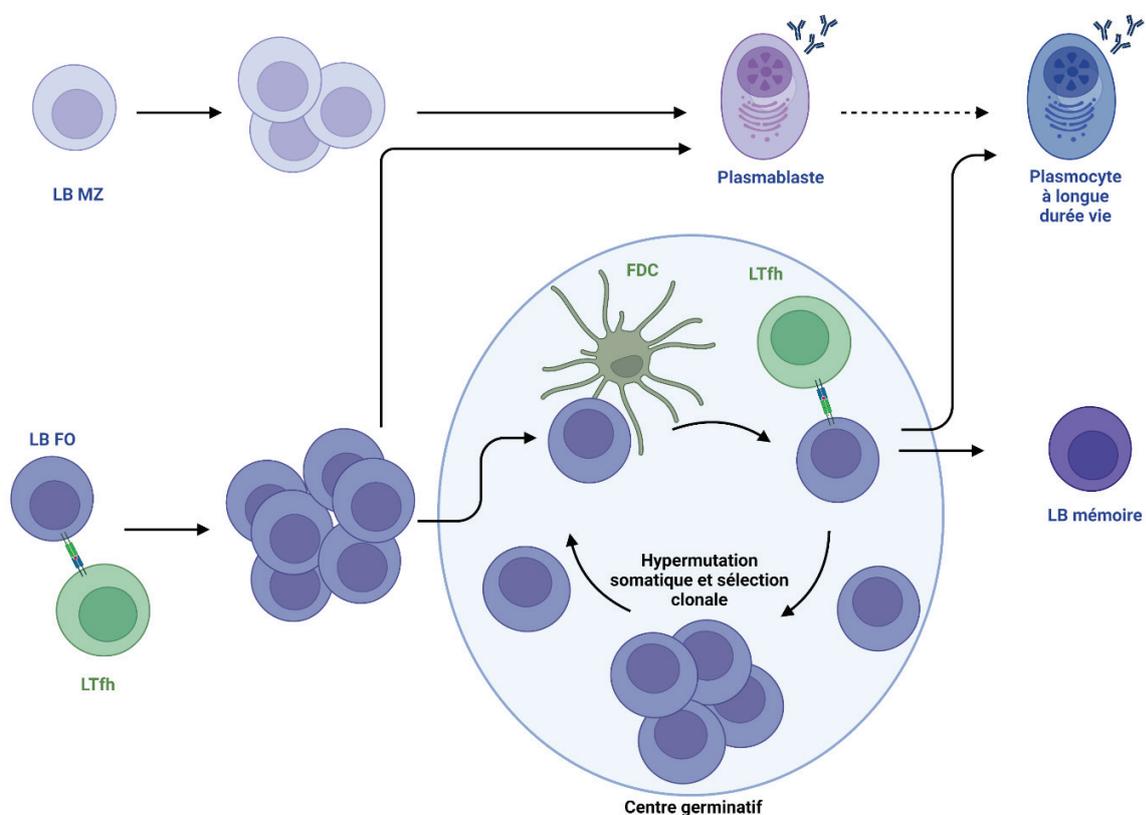


Figure 11 : Devenir des LB MZ et FO

La reconnaissance d'un antigène par un LB MZ conduit à sa prolifération et différenciation en plasmablastes producteurs majoritairement d'IgM. La contribution des LB MZ à l'enrichissement du compartiment des plasmocytes à longue durée de vie est encore mal comprise. Les LB FO font une réponse T-dépendante induisant une prolifération rapide et la formation de centre germinatif où les cellules folliculaires dendritiques (FDC) et les LT auxiliaires folliculaires ou *follicular helper* (LTfh) sélectionnent les LB de haute affinité pour l'antigène. Les LB sortant du centre germinatif se différencient en cellules B mémoires ou en plasmocytes à longue durée de vie. (Adapté de Nutt et al., 2015)

Premièrement, les cellules peuvent subir une différenciation plasmocytaire ; elles se différencient en plasmablastes extrafolliculaires sécrétant majoritairement des IgM. Ces cellules n'ont pas de mutation de leurs chaînes d'immunoglobulines et ont une courte durée de vie, mais fournissent une réponse initiale rapide contre l'antigène. L'autre possibilité pour les LB est de migrer dans les follicules primaires où ils prolifèrent de manière intensive. Les lymphocytes B nouvellement formés subissent un processus de commutation isotypique et d'hypermutation somatique et se structurent en centre germinatif. En conséquence, les cellules issues de ces processus produisent des anticorps ayant une haute spécificité de reconnaissance de l'antigène et expriment un isotype d'immunoglobuline adapté à la nature de l'antigène. Suite à leurs passages dans le centre germinatif, les LB se différencient en lymphocytes B mémoires ou en plasmocytes. Les cellules mémoires restent en dormance jusqu'à leurs rencontres avec leurs antigènes. La reconnaissance de l'antigène par une cellule B mémoire induit sa prolifération rapide et la production d'anticorps de haute affinité pour permettre l'élimination efficace du pathogène lors d'une réponse secondaire. Concernant les plasmocytes, ceux issus des centres germinatifs sont principalement des plasmocytes à longue durée de vie. Une majorité d'entre eux regagne la MO et produit une grande quantité d'anticorps hautement spécialisés, fournissant ainsi une protection à long terme.

3.1.2/ Signalisation dans les lymphocytes B

Au cours de leur développement, les LB sont soumis à une multitude de signaux extracellulaires entraînant des réponses diverses allant de l'apoptose à la prolifération. Durant plusieurs années, la signalisation du BCR a été placée au cœur de ce processus. Toutefois, les récentes recherches ont mis en avant l'organisation d'un réseau de signalisation complexe et interconnecté avec d'autres récepteurs.

a- Voie de signalisation du BCR

Le BCR est un complexe composé d'une immunoglobuline membranaire associée à un hétérodimère CD79a/b (Ig α / β) possédant des motifs cytoplasmiques ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-base Activation Motif*) dont la séquence consensus est la suivante : YxxL/Ix(6-8)YxxL/I (Harwood et al., 2010 ; Kurosaki et al., 2010 ; Nemazee et al., 2017). La liaison avec l'antigène du BCR entraîne la phosphorylation des tyrosines des motifs ITAM de CD79a/b par la famille de kinases SRC. La tyrosine kinase SYK est recrutée au niveau des tyrosines phosphorylées des ITAM par l'intermédiaire de son domaine SH2 (*Src Homology 2*). SYK joue un rôle majeur dans l'induction d'autres voies de signalisation dont : PI3K/AKT/mTOR (*mammalian target of rapamycin*), MAPKs et NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*). L'activation de la cascade de signalisation du BCR est illustrée par la figure 12. Plus précisément, la voie PI3K/AKT/mTOR est activée suite à

la phosphorylation au niveau de la queue cytoplasmique du corécepteur CD19 par SYK ou BCAP (*B-Cell phosphoinositide 3-kinase adapter protein*), lui-même activé par SYK. Cet événement provoque le recrutement de la PI3K, capable de convertir le PI(4,5)P2 (PIP2) membranaire en PI(3,4,5)P3 (PIP3). Le PIP3 est un motif reconnu par de nombreuses protéines par l'intermédiaire d'un domaine PH (*Pleckstrin Homology*) et permet le recrutement de nombreuses protéines à la surface proche du BCR activé. Parmi ces protéines, on retrouve les sérine/thréonine kinases PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase-1*) et AKT. AKT induit une cascade de signalisation, en particulier via mTOR, et promeut la survie et la prolifération de la cellule notamment par le facteur de transcription c-MYC.

D'autre part, PIP3 entraîne le recrutement d'autres protéines comme BTK (*Bruton's tyrosine kinase*), VAV, PLC γ 2 (*phosphatidylinositol-specific phospholipase C γ 2*) à la membrane. La phosphorylation de BLNK par SYK modifie sa conformation et lui permet de fonctionner comme une plateforme de recrutement pour certaines protéines comme BTK, VAV, GREB2 et PLC γ 2. PLC γ 2, sous sa forme active, hydrolyse le PIP2 en diacylglycérol (DAG) et en inositol-1,4,5-trisphosphate (IP3). Le DAG recrute les PKC à la membrane qui, à leur tour et en complément de l'initiation de la voie induite par GRB2, active la voie des MAPK. L'induction de la voie des MAPK conduit à l'activation de facteurs de transcription comme AP-1 (*Activator protein 1*) et CREB (*C-AMP Response Element-binding protein*). Concernant IP3, il favorise la libération de Ca $^{2+}$ du réticulum endoplasmique en se liant à son récepteur IP3R. Une boucle de rétroaction positive est enclenchée pour favoriser la mobilisation du Ca $^{2+}$. Le senseur STIM1 (*stromal interaction molecule 1*) en réponse à l'élévation du niveau de Ca $^{2+}$ dans le cytoplasme entraîne l'ouverture du canal calcique de la membrane plasmique ORAI. La forte concentration cytoplasmique de Ca $^{2+}$ conduit à l'activation de la Calcineurine, une phosphatase permettant l'activation et la translocation dans le noyau des facteurs de transcription de la famille NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*). D'autre part, le Ca $^{2+}$ permet l'activation des PKC conventionnelles. Celles-ci jouent notamment un rôle essentiel dans l'activation de la voie NF- κ B. Elle conduit à l'activation de facteurs de transcription de la famille Rel fonctionnant en homo- ou hétéro- dimère formant un complexe multiprotéique que l'on nomme NF- κ B. Cet ensemble est maintenu dans un état d'inactivation par la protéine I κ B (*inhibitor of κ B*) en absence de stimulation. L'activation du BCR conduit à la phosphorylation de I κ B, causant son ubiquitinylation et en conséquence sa dégradation. De ce fait, les facteurs de transcription sont relâchés et migrent vers le noyau pour fournir une réponse cellulaire le plus souvent associée à des facteurs anti-apoptotiques.

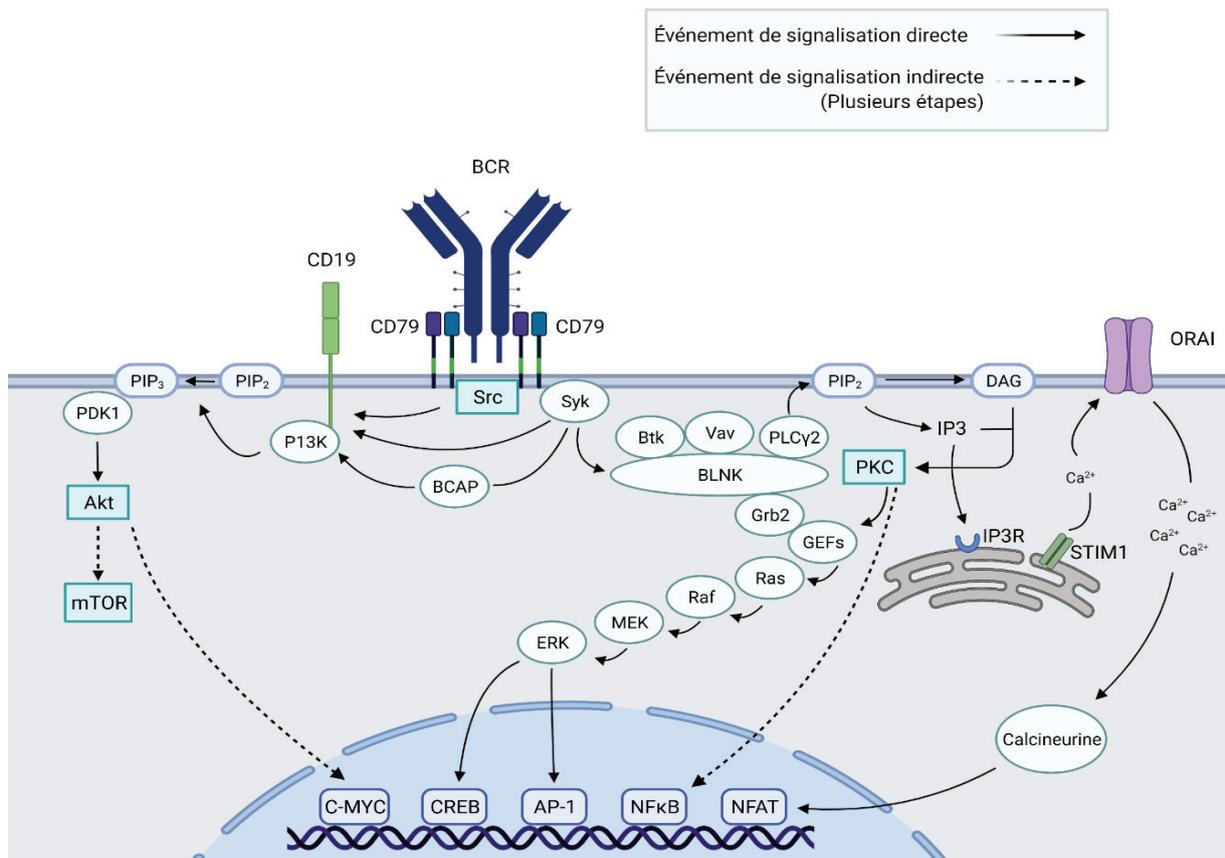


Figure 12 : La signalisation du BCR

La reconnaissance d'un antigène par le BCR induit l'activation de protéines de la famille des SRC qui vont propager le signal. La phosphorylation de différents substrats conduit à l'activation de différentes voies de signalisation. Elles vont moduler la réponse du LB en induisant un programme transcriptionnel spécifique via l'activation ou inhibition de certains facteurs de transcriptions, en remaniant le cytosquelette, en adaptant la réponse métabolique de la cellule notamment via la voie mTOR.

b- Corécepteurs activateurs et inhibiteurs

La voie de signalisation du BCR est un élément central du LB et nécessite une régulation fine. Plusieurs corécepteurs activateurs ou inhibiteurs modulent la réponse du BCR (Figure 13). Parmi les corécepteurs activateurs, les protéines CD19, CD21 et CD81 forment un complexe multiprotéique à la surface du LB (Clark et al., 2018 ; Sicard et al., 2020). La reconnaissance d'un ligand par ce complexe simultanément à la stimulation du BCR renforce la signalisation sous-jacente du BCR. CD21 est un récepteur du complément reconnaissant les fragments iC3b, C3dg, C3d (Molina et al., 1995). La présence d'un pathogène reconnu par le complément conduit à la reconnaissance des fragments du complément par CD21 qui cause la phosphorylation du récepteur CD19 au niveau de sa partie cytoplasmique. Les tyrosines phosphorylées de CD19

offrent un site d'ancrage à la protéine PI3K qui, par conséquent, favorise la signalisation de la voie PI3K/AKT/mTOR et la signalisation du BCR en général en générant des sites de fixation à la membrane à de nombreuses protéines effectrices par la production de PIP3 (Xu et al., 2014). A l'heure actuelle, la fonction de CD81 dans ce complexe multiprotéique est encore mal comprise mais des études suggèrent que CD81 favoriserait l'ancrage de CD19 à la surface (Shoham et al., 2003 ; Susa et al., 2020).

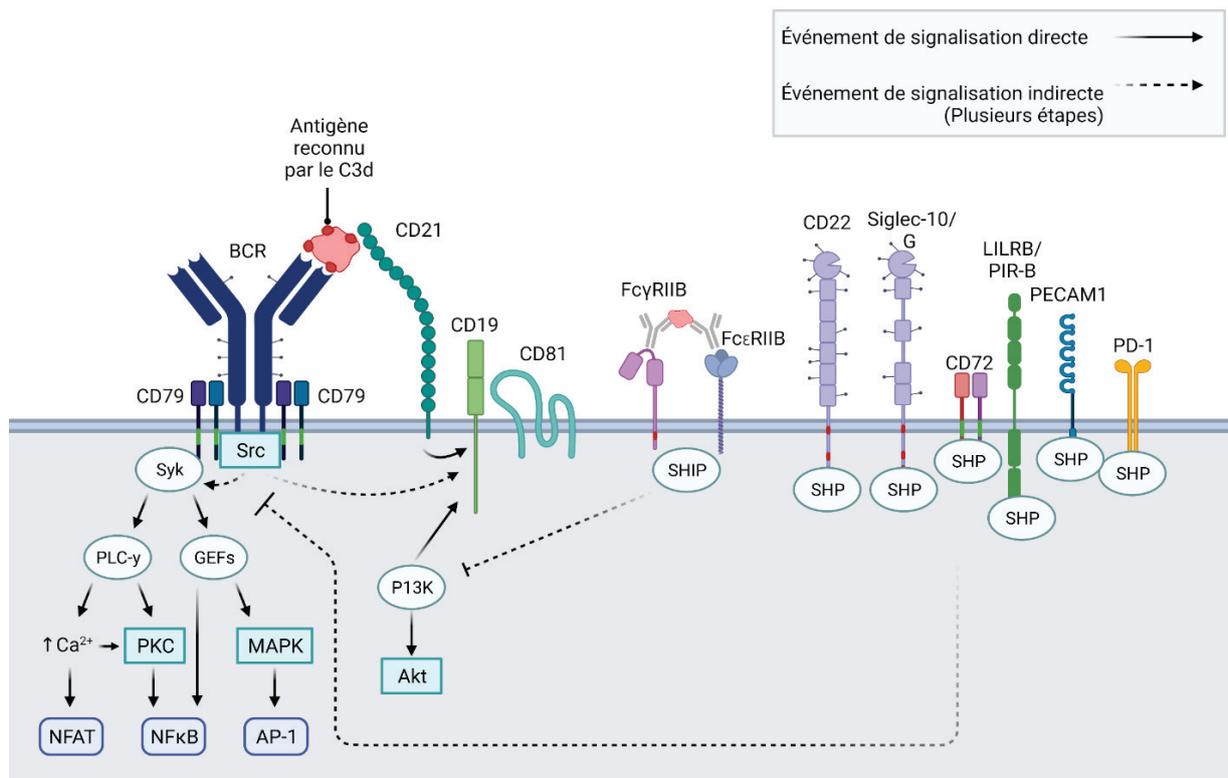


Figure 13 : Les corécepteurs de la voie de signalisation du BCR

La stimulation du BCR induit une cascade de signalisation notamment par la phosphorylation de tyrosines au niveau de site activateur de certaines protéines. La stimulation du complexe CD21-CD19-CD81 amplifie la signalisation du BCR en favorisant l'activité de la PI3K. Au contraire, les phosphatases SHP (SHP-1 et SHP-2) sont induites suite à la liaison du ligand des corécepteurs inhibiteurs et vont entraîner la perte de tyrosines phosphorylées des protéines effectrices. La phosphatase SHIP convertie la PIP3 en PIP2 ce qui mène à une baisse de l'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR et une diminution des sites d'ancrage à la membrane cytoplasmique des protéines effectrices.

D'autres récepteurs avec une action inhibitrice sur la signalisation du BCR possèdent un motif nommé ITIM pour "*Immunoreceptor Tyrosine based Inhibitory Motif*" ayant pour séquence consensus : S/I/V/LxYxxI/V/L (Veillette et al., 2002). La phosphorylation des tyrosines de ce motif suite à la reconnaissance du substrat d'un récepteur inhibiteur induit le recrutement des phosphatases SHP (*SH2-containing phosphatase*) comme SHP-1 et SHP-2 et SHIP (*SH2-containing inositol phosphatase*). SHP est une tyrosine phosphatase ciblant une large variété de protéines tandis que SHIP a la spécificité d'hydrolyser le PIP3 membranaire en PIP2. Par conséquent, SHP diminue l'activation d'un grand nombre de protéines de la voie du BCR et SHIP réduit le recrutement des protéines effectrices à la membrane en diminuant le PIP3. Parmi les corécepteurs inhibiteurs des LB, FcγRIIB et FcεRII (CD23) reconnaissent respectivement la région Fc (Fragment cristallisable) des anticorps IgG et IgE (Smith et al., 2010). Par exemple, les complexes immuns formés à partir des immunoglobulines de type IgG induisent une signalisation inhibitrice du BCR via FcγRIIB pouvant conduire à l'apoptose. La formation des complexes immuns de type IgG régulent ainsi la production des IgG et induisent une boucle de rétroaction négative pour éviter la surproduction potentiellement pathogénique de ces immunoglobulines. Le corécepteur FcεRII peut réduire la signalisation du BCR lors de liaison d'une IgE au récepteur mais l'unique présence du récepteur permet d'atténuer l'activité du BCR (Liu et al., 2016). On retrouve également le corécepteur inhibiteur CD22 à la surface des LB, plus particulièrement sur les LB matures. CD22 appartient à la famille des protéines SIGLEC (*sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins*) et reconnaît des sucres de type acide sialique, comme l'acide N-acétylneuraminique, présent sur la majorité des cellules de mammifères contrairement aux bactéries (Nitschke et al., 1997). Par conséquent, CD22 favorise une réponse B modérée lors d'une rencontre avec des éléments du soi. Les LB expriment d'autres récepteurs inhibiteurs comme CD72, PECAM1, LILRB (PIR-B chez la souris), SIGLEC-10 (Siglec-G chez la souris) et PD-1. Toutes ces molécules possèdent un domaine ITIM ou similaire et régulent négativement la signalisation du BCR via le recrutement de phosphatases (Thibult et al., 2013 ; Tsubata et al., 2019). Chez la souris, les LB déficients pour CD72, Pecam-1 et Siglec-G présentent un niveau d'activité de la voie de signalisation du BCR anormalement élevé. D'autres études ont montré que la liaison d'un ligand reconnu à la fois par les récepteurs PIR-B ou PD-1 et le BCR réduisait drastiquement la signalisation du BCR. Cette diversité de corécepteurs module la signalisation du BCR et permet au LB de renforcer sa réponse dans certaines situations ou au contraire de l'inhiber afin d'éviter un emballement de la réponse immunitaire.

c- Autres voies de signalisation

La signalisation du BCR est impliquée dans différentes réponses biologiques et dans le développement des LB. Toutefois, d'autres stimuli ont un rôle crucial à des étapes clés de leur

développement ainsi que pour leur survie et leur prolifération... L'activation d'autres voies de signalisation peut notamment agir en synergie ou au contraire s'opposer à celle du BCR.

CD40 et les récepteurs de BAFF

CD40 et les récepteurs de BAFF (BAFF-R pour *B-cell activating factor receptor*) sont membres de la famille des récepteurs au facteur de nécrose tumorale (TNF pour *tumor necrosis factor*). CD40 est exprimé sur les LB, à la surface d'autres cellules immunitaires comme les macrophages, les cellules dendritiques mais aussi sur certaines cellules endothéliales, épithéliales, musculaires et les fibroblastes (Elgueta et al., 2009). Le ligand de CD40, connu sous le nom de CD40L ou CD154, est une protéine transmembranaire retrouvée le plus souvent à la surface de LT activés. Dans un contexte inflammatoire, CD40L peut être produit par les LB, les monocytes, les NK, les mastocytes, les basophiles et les plaquettes. Outre la forme membranaire, il existe une forme soluble de CD40L circulant dans le sang. Elle provient du clivage enzymatique du CD40L présent à la surface des plaquettes à la suite de leur activation. Concernant les récepteurs de BAFF, ils reconnaissent la protéine BAFF qui est sécrétée dans le milieu extracellulaire. On distingue 3 types de récepteurs :

- TNFRSF17 ou BCMA pour *B-cell maturation antigen*
- TNFRSF13B ou TACI pour *Transmembrane Activator and CAML Interactor*
- TNFRSF13C ou BAFF-R

Ces récepteurs présentent une affinité de liaison différente entre eux pour le BAFF et les protéines TACI et BCMA reconnaissent également un autre ligand, proche de BAFF, APRIL pour *A Proliferation Inducing Ligand*. Ils sont tous exprimés chez les LB matures même si on retrouve une variabilité dans l'expression des récepteurs selon le stade de maturation. La liaison du substrat aux récepteurs de BAFF et de CD40 conduit au recrutement de protéines adaptatrices nommées TRAF (*TNF Receptor-Associated Factors*) au niveau de la queue cytoplasmique des récepteurs (Figure 14). Les TRAF sont composées de six membres allant de TRAF-1 à TRAF-6. Chaque membre possède une fonction distincte pouvant être chevauchante avec une autre protéine TRAF. Suite au recrutement de ces protéines par les récepteurs au BAFF et le CD40, plusieurs voies de signalisation sont activées dont principalement la voie canonique et non-canonique de NF- κ B, la voie des MAPK et la voie PI3K/AKT/mTOR. La voie canonique de NF- κ B est davantage induite par l'activation de CD40 alors que les récepteurs de BAFF mènent principalement à la voie non-canonique (Mackay et al., 2009). De surcroît, les voies de signalisation de CD40 et des récepteurs de BAFF sont interconnectées avec la signalisation du BCR. Des études ont montré que la stimulation des cellules avec du BAFF induisait une augmentation de la phosphorylation de SYK, protéine clé de la signalisation BCR, et permettait

d'activer les voies des MAPKs et PI3K/AKT/mTOR (Schweighoffer et al., 2013 ; Jellusova et al., 2013).

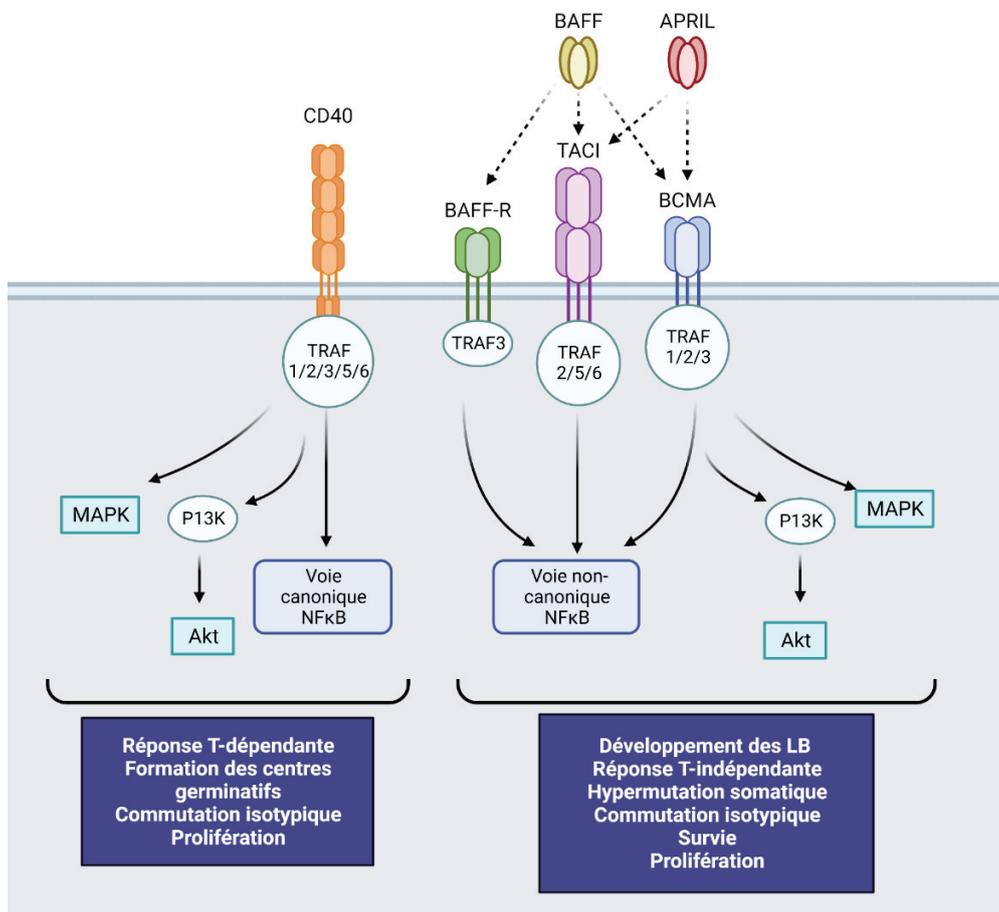


Figure 14 : Les voies de signalisation induites par les récepteurs de BAFF et CD40

L'activation des récepteurs présents à la surface des LB entraîne le recrutement de différentes protéines TRAF au niveau de la queue cytoplasmique des récepteurs. Plusieurs voies de signalisation sont induites et peuvent mener à différentes réponses des LB (rectangle bleu foncé).

De plus, le BCR est impliqué dans la régulation de la voie non-canonique de NF-κB induite suite à la stimulation de BAFF. En effet, l'induction de la voie du BCR conduit à la transcription d'une protéine impliquée dans la voie non canonique de NF-κB : p100. Cette protéine est rapidement épuisée suite à la stimulation des récepteurs de BAFF alors que la voie du BCR ne conduit pas à l'activation de la voie non canonique de NF-κB (Stadanlick et al., 2008). Par conséquent, la signalisation du BCR est nécessaire pour produire la molécule p100, indispensable à la signalisation des récepteurs de BAFF. Concernant les connexions entre la voie du BCR et le

CD40, plusieurs études ont montré que la stimulation de CD40 favorisait l'induction des voies MAPK et NF- κ B suite à l'induction du BCR indépendamment de BTK et de la PLC γ 2 (Mizuno et al., 2003 ; Mizuno et al., 2005). Le CD40 est indispensable pour que les LB effectuent plusieurs types de réponse. Ce fait est illustré par le développement du syndrome hyper-IgM lié au chromosome X chez les personnes ayant des mutations du CD40L (Winkelstein et al., 2003). Cette pathologie est caractérisée par une réduction dans le sérum des IgG, IgA, IgE et en conséquence, une augmentation des IgM. Les patients présentent une réponse des LB T-médiée fortement endommagée avec une réduction des centres germinatifs, des LB mémoires, de la commutation isotypique, etc. Les récepteurs de BAFF sont quant à eux impliqués dans la survie des LB, la production d'anticorps, la commutation isotypique, la prolifération, etc. Plus spécifiquement, la stimulation de BAFF-R joue un rôle indispensable dans la survie des LB en périphérie puisque l'absence de ce récepteur conduit à une réduction drastique des LB matures (Schiemann et al., 2001). BAFF-R joue spécifiquement un rôle essentiel dans le développement des LB dans la rate. En effet, les souris déficientes en BAFF ou BAFF-R ont un arrêt du développement de leurs LB entre le stade T1 et T2 et conduit à une réduction globale des LB FO et MZ. La stimulation du récepteur TACI permet également de fournir un signal de survie au LB mais promeut également la commutation isotypique, l'hypermutation somatique, la prolifération des LB et favorise la réponse des LB T-indépendante (Garcia-Carmona et al., 2018). Concernant le récepteur BCMA, il favorise la différenciation et le maintien des plasmocytes en plus de son rôle dans la survie et la prolifération des LB.

TLR

Les TLRs appartiennent à la famille des PRRs présentée dans la partie 2.3. Au sein des LB, l'expression des différents types de TLR varie en fonction du niveau d'activation de la cellule, le stade de développement, etc. Chez l'Homme, on retrouve une faible expression des TLRs dans les LB naïfs alors que les TLR1/3/4/6/7/9/10 sont retrouvés dans les plasmocytes, les LB activés ou mémoires (Buchta et al., 2014). Les TLRs semblent jouer un rôle plus important dans les LB de souris puisqu'ils ont un plus haut niveau d'expression comparé à l'Homme. La reconnaissance de leurs ligands respectifs initie le recrutement de protéines adaptatrices comme MYD88 (*Myeloid differentiation primary response 88*), TIRAP (*TIR domain containing adaptor protein*), TRAM (*Translocating chain-associated membrane protein*) ou TRIF au niveau du domaine TIR situé sur la queue cytoplasmique du TLR. Selon les protéines adaptatrices activées, différentes kinases sont induites afin de propager le signal vers les voies NF- κ B et des MAPKs. La signalisation du BCR

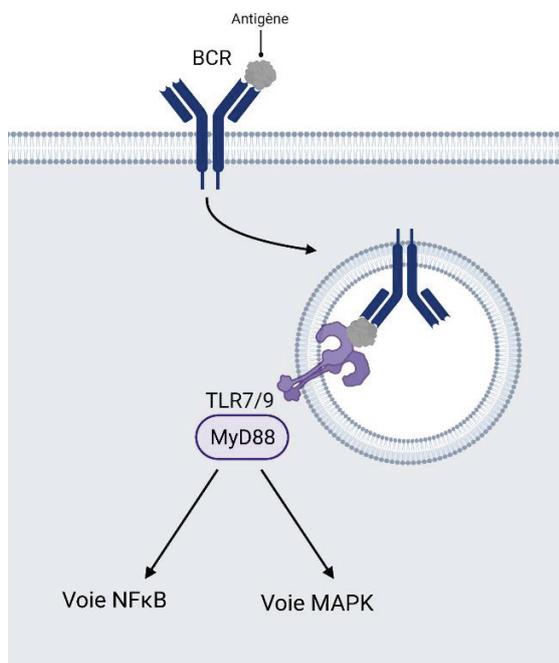


Figure 15 : Synergie entre le BCR et les TLR7/9

L'endocytose du complexe BCR-ligand permet de présenter l'antigène au TLR7/9 et induit l'activation des voies NF- κ B et MAPK.

est particulièrement interconnectée à celle du TLR7/9 (Celhar et al., 2012 ; Suthers et al., 2017). La reconnaissance d'un antigène induit par la suite l'endocytose du complexe antigène-BCR qui se retrouve dans les endosomes où sont localisés les TLR7 et TLR9 (Figure 15). Cette colocalisation permet au BCR de présenter l'antigène aux TLRs et augmente la réponse du LB face aux pathogènes. Grâce à cette synergie de la voie des TLR et BCR, les LB améliorent leurs capacités pour proliférer, produire des cytokines, exprimer les molécules de costimulation, produire des anticorps, réaliser l'hypermutation somatique et la commutation isotypique, etc.

Les récepteurs aux cytokines

Les cytokines correspondent à un ensemble d'une centaine de protéines ou glycoprotéines, produites et sécrétées par différentes cellules de l'organisme. Elles transmettent différents signaux permettant aux cellules d'agir à distance sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction. Elles exercent leurs fonctions suite à leur reconnaissance par des récepteurs de cytokines présents à la surface des cellules. De nombreuses cytokines agissent sur les LB que ce soit durant les étapes de développement des LB ou alors pour moduler leurs fonctions (Vazquez et al., 2015). L'action des différentes cytokines jouant un rôle majeur sur les LB est récapitulé dans le tableau suivant :

Cytokines	Actions sur les LB
IL-2	Prolifération
IL-4	Prolifération, survie, favorise la commutation isotypique vers les IgG1, IgG4 et IgE
IL-6	Prolifération, favorise la production d'IgG
IL-7	Développement des LB, réarrangement des chaînes d'immunoglobulines
IL-10	Régulation de la réponse des LB, favorise la commutation isotypique vers les IgG1 et IgG3
IL-12	Différenciation en cellules productrices d'anticorps de type IgM
IL-13	Prolifération, favorise la commutation isotypique vers les IgG1, IgG4 et IgE
IL-15	Prolifération, favorise la production d'IgM, IgG1 et IgA
IL-21	Prolifération, survie, différenciation en plasmocyte, favorise la commutation isotypique vers IgG1, IgG3, IgA et IgE
IFN-α	Développement des LB, augmentation de la sensibilité du BCR
IFN-β	Développement des LB, augmentation de la sensibilité du BCR
IFN-γ	Inhibition de l'activation des LB, prolifération des LB activés, favorise la commutation isotypique vers l'IgG2a et IgG3

Tableau 2 : Effets des cytokines sur les LB

(Adapté de Vazquez et al., 2015 ; Moens et Tangye., 2014)

3.1.3/ Activation des lymphocytes B

a- Réponse T-indépendante

L'activation des LB peut se faire en absence des LT, il s'agit de la réponse T-indépendante (TI) c'est-à-dire Thymus-Indépendante puisque cette réponse peut avoir lieu chez les individus n'ayant pas de LT. Elle est induite par des antigènes non protéiques n'ayant pas les attributs moléculaires permettant leur reconnaissance par les LT (Allman et al., 2019). Il s'agit souvent de molécules retrouvées sur un grand nombre de pathogènes. Par exemple, les polysaccharides à motifs répétés de la paroi bactérienne des bactéries à Gram positif ou le LPS de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Les antigènes induisant une réponse TI peuvent être divisés en type 1 ou type 2 selon les mécanismes d'activation des LB qu'ils induisent (Figure 16). Les antigènes de la réponse TI de type 1 (TI-1) sont reconnus par les TLR des LB. Une forte concentration des antigènes TI-1 peut causer la prolifération et la différenciation de la plupart des LB indépendamment de leur spécificité d'antigène ; ceci est connu comme l'activation polyclonale. Les antigènes TI-1 sont donc des mitogènes des LB. À faible concentration, seuls les

LB ayant un BCR spécifique à un antigène TI-1 sont activés. Néanmoins, ces cellules ont besoin d'un second signal amené par la liaison d'un antigène de TI-1 à un TLR. La reconnaissance de l'antigène par le BCR optimise cette réponse étant donné que l'activation du BCR chez LB naïfs conduit à une augmentation de l'expression de certains TLR comme les TLR7 et TLR9 (Bernasconi et al., 2003). Concernant la réponse TI initiée par les antigènes de type 2 (TI-2), elle est causée par la reconnaissance d'un ligand agrégeant de façon extrêmement efficace plusieurs BCR et permettant de délivrer un signal suffisamment important ne nécessitant pas de co-signal. La densité avec laquelle les antigènes agrègent le récepteur est déterminante. Lorsque celle-ci est trop faible, elle est insuffisante pour activer la cellule. L'un des exemples le plus connu d'antigène de ce type est la structure formée par des motifs répétés retrouvée sur la paroi cellulaire des streptocoques.

Ce type de réponse joue un rôle important dans la défense spécifique contre une grande variété de pathogènes extracellulaires. En effet, cette réponse est plus rapide que la réponse thymo-dépendante car elle ne requiert pas d'activation préalable et l'expansion des LT. Cependant, les antigènes thymo-indépendant de type 1 n'induisent généralement pas de commutation isotypique, d'hypermutation somatique ou de cellules B mémoires.

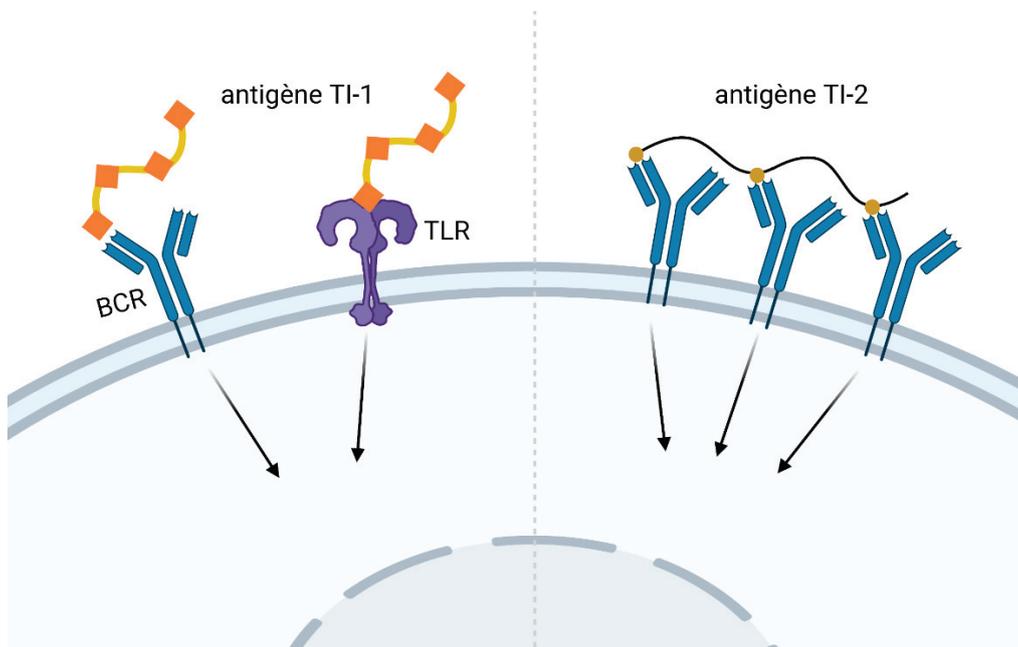


Figure 16 : Réponse T-indépendante des LB

La reconnaissance d'un antigène de type I (TI-1) par le BCR et le TLR est suffisante pour induire une réponse B. A forte concentration, ce type d'antigène est suffisant pour activer les LB de manière non spécifique. Les antigènes de type 2 (TI-2) active les LB en agrégeant plusieurs BCR. (Adapté de Murphy et al., 2008)

La réponse TI est généralement réalisée par les LB MZ et B1 (Martin et al., 2001). Ces cellules, du fait de leur localisation, peuvent rapidement détecter un pathogène et induire une première ligne de défense efficace via la réponse T-indépendante. Suite à leur activation, les LB MZ se différencient en plasmablastes à courte durée de vie et produisent une importante quantité d'IgM et en faible proportion des IgG et IgA (Cerruti et al., 2013). Les cellules B1 sont quant à elles responsables de la production d'anticorps polyréactifs avec une faible affinité et principalement de type IgM.

b- Réponse T-dépendante

Selon la nature de l'antigène, les LB ont besoin des LT afin de pouvoir répondre de manière optimale. Pour cela, différents processus sont mis en place pour aboutir à cette réponse. Dans un premier temps, la reconnaissance de l'antigène par le BCR conduit à l'internalisation de ce complexe dans les endosomes ou lysosomes où l'antigène est dégradé (Figure 17). Les peptides issus de cette dégradation sont associés au CMHII et transportés à la membrane pour être présenté au LTCD4+. De plus, la stimulation du BCR conduit à l'expression de molécules co-stimulatrices telles que CD80/CD86 et ICOSL (*inducible t-cell costimulator ligand*) qui vont reconnaître respectivement à la surface du LT les molécules CD28 et ICOS (*inducible t-cell costimulator*). La reconnaissance d'un complexe CMH-peptide et des molécules de costimulation par un LT induit son activation et conduit à l'expression à sa surface de CD40L (Bishop et al., 2001). Cette molécule est reconnue par le récepteur CD40 à la surface des LB et entraîne l'activation d'une cascade de signalisation, décrite en partie 3.1.2.c, nécessaire à l'activation optimale du LB. De plus, l'engagement du CD40 des LB stimule la production de molécules co-stimulatrices comme le CMHII, CD80/CD86, et entraîne une boucle de rétroaction positive favorisant l'activation des LT et des LB. L'activation des LB via le BCR et des molécules co-stimulatrices conduit également à la transcription d'une multitude de gènes dont certains codant pour des récepteurs de cytokines. En effet, les LT activés produisent un grand nombre de cytokines pour orienter la réponse des LB afin qu'elle soit adaptée au pathogène rencontré, via notamment la commutation isotypique (Mingari et al., 1984 ; Shen et al, 2015). Par exemple, l'IL-12 favorise la production des IgM alors que l'IL-4 induit l'augmentation des IgG1, IgG4 et IgE (Kim et al., 2008). La commutation isotypique est le processus au cours duquel l'isotype des immunoglobulines est modifié. Par ailleurs, alors que ce phénomène a souvent été décrit comme un évènement ayant lieu spécifiquement dans les centres germinatifs, des travaux récents ont montré que la commutation isotypique aurait lieu précocement, avant la formation des centres germinatifs (Roco et al., 2019). Les isotypes sont déterminés par la région constante de la chaîne lourde. Cette région se fixe aux différents récepteurs Fc retrouvés sur une multitude de cellules comme les NK, les macrophages, les mastocytes et permet d'apporter une réponse immunitaire adaptée au pathogène rencontré.

L'activation des cellules B par les LT peut induire la formation de centres germinatifs. Il s'agit d'une structure transitoire localisée dans les follicules des organes lymphoïdes secondaires. Plusieurs cellules composent les centres germinatifs comme les LB matures activés, principalement des LB folliculaires, les LTfh et les cellules dendritiques folliculaires (FDC). Contrairement aux cellules dendritiques conventionnelles, elles ne sont pas issues des cellules souches hématopoïétiques de la MO mais sont d'origine mésenchymateuse (Rezk et al., 2013). Elles sont spécialisées dans la présentation des complexes immuns, formés d'un antigène et d'un anticorps, aux LB. Les LTfh et les FDC permettent de sélectionner les LB présentant la meilleure affinité pour l'antigène après avoir subi le processus d'hypermutation somatique. Il s'agit d'un mécanisme de diversification du répertoire immunitaire par l'introduction de points de mutations aléatoires dans des régions variables des gènes codant pour les chaînes lourdes et légères dans le but de former une immunoglobuline avec une plus haute affinité pour l'antigène cible.

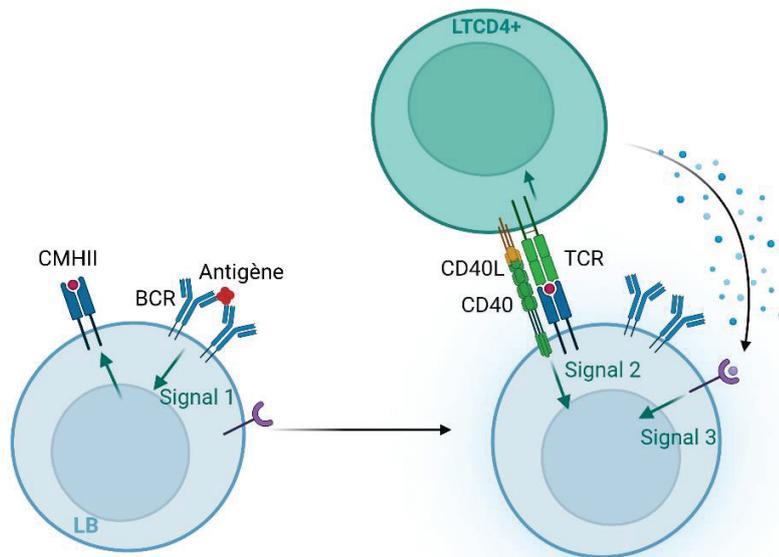


Figure 17 : Réponse T-dépendante des LB

Pour être activé de façon T-dépendante, le LB a besoin de 3 signaux. Le premier provient de la reconnaissance d'un antigène par le BCR. Les LB présentent les peptides de l'antigène par le CMHII au LTCD4+ qui sont alors activés. Les LT fournissent un deuxième signal au LB en stimulant le CD40 des LB et un troisième en sécrétant des cytokines.

3.1.4/ Mécanismes d'action des lymphocytes B

Les LB sont principalement connus comme des cellules productrices d'anticorps. Les anticorps, éléments principaux de la réponse humorale, agissent par différents modes d'action (Figure 18). Un premier mécanisme est la neutralisation ; processus au cours duquel les anticorps

reconnaissent leur antigène cible et empêchent leur fixation afin de neutraliser leurs effets. Par exemple, un anticorps reconnaissant une molécule d'un virion se fixe sur sa cible et empêche son attachement à des récepteurs situés sur la membrane cytoplasmique de la cellule hôte ; bloquant ainsi son entrée dans la cellule. Les anticorps sont également capables d'induire l'activation du complément. En se fixant sur leurs cibles, ils entraînent la formation d'un site de liaison à la molécule du complément C1q qui conduit à la mise en place des effecteurs du complément. On retrouve également le mécanisme d'opsonisation. L'anticorps se fixe au pathogène et par l'intermédiaire des récepteurs des régions Fc, les anticorps favorisent la phagocytose, la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC pour *Antibody-dependent cellular cytotoxicity*) et la dégranulation des mastocytes et certains granulocytes (Lebien et al., 2008). En plus de leurs fonctions pour éliminer les pathogènes, ils permettent de réguler la réponse immunitaire en se fixant sur des récepteurs Fc spécifiques de certaines cellules (Liu et al., 2019).

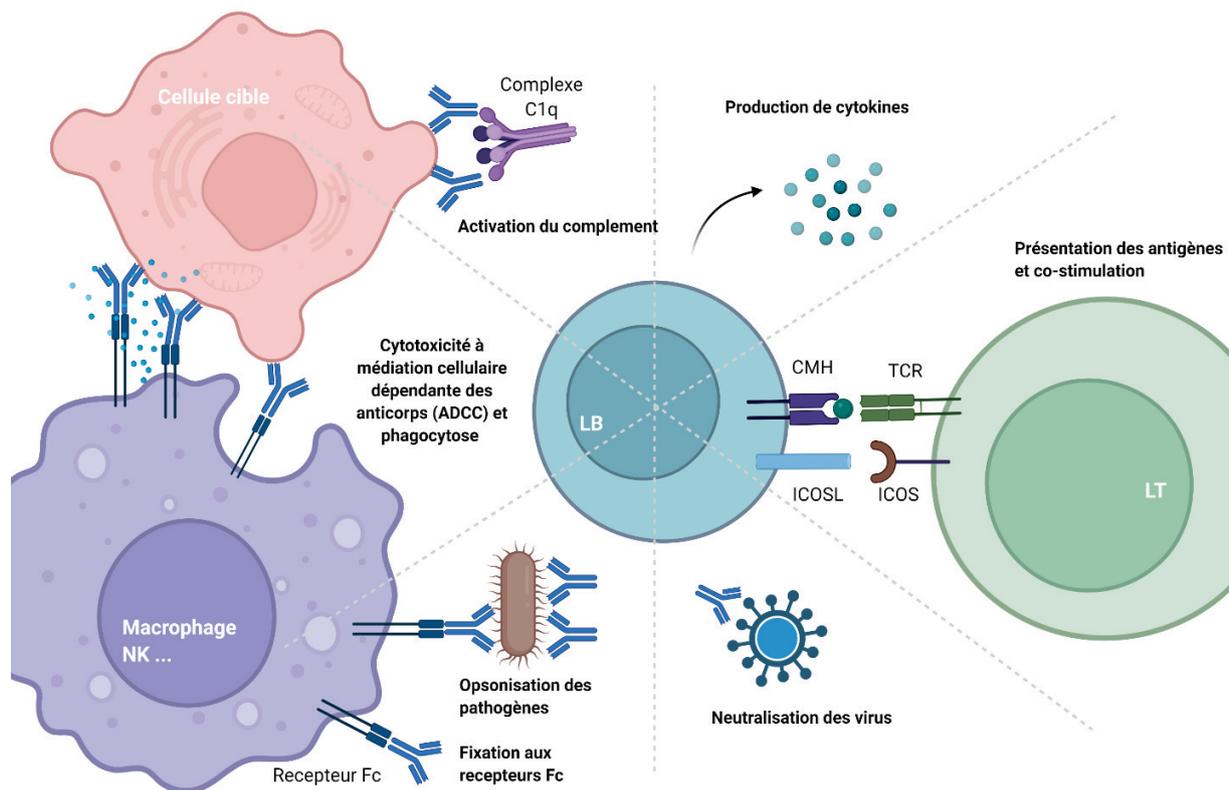


Figure 18 : Mécanismes d'actions des lymphocytes B

Les lymphocytes B modulent la réponse immunitaire directement par la production de cytokines, la présentation d'antigènes et la costimulation des lymphocytes T mais également à travers leur fonction de cellules productrices d'anticorps.

Indépendamment de leur statut de producteurs d'anticorps, les LB influencent par différents aspects la réponse immunitaire. En tant que CPA, les LB activés interagissent avec les LTCD4+ et leurs présentent les peptides de l'antigène par le CMHII ainsi que des molécules de costimulation comme ICOSL. Cela entraîne l'activation des LTCD4+ (Rubien et al., 2019). Les LTfh interagissent avec les LB apparentés pour sélectionner les LB suite à l'hypermutation somatique et favoriser la commutation isotypique. D'autre part, les cellules B modulent la réponse immunitaire sur une multitude d'aspects par la sécrétion de cytokines (Shen et al., 2015). Certaines vont jouer sur l'organisation des organes lymphoïdes comme les ganglions, d'autres vont polariser la réponse T vers les LTh1 par l'IFN- γ , vers les LTh2 via l'IL-2 et l'IL-4 ou encore les LTh17 par l'IL-6. La réponse cytokinique peut promouvoir une réponse pro-inflammatoire par le GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) ou à l'inverse anti-inflammatoire via l'IL-10 et l'IL-35.

3.2/ Maintien de la tolérance des lymphocytes B

Le large répertoire formé par les LB offre une défense efficace contre de nombreux pathogènes. La nature en grande partie aléatoire de la recombinaison V(D)J et des mutations somatiques causées par l'hypermutation somatique génère un répertoire d'anticorps qu'on estime être davantage limité par le nombre de LB que par le nombre de spécificités d'anticorps possible qui peuvent être produits (Winter et al., 1991). Toutefois, ces mécanismes ont le défaut de produire également des LB auto-réactifs.

Afin d'éviter l'expansion de ces cellules, plusieurs processus permettent d'établir la tolérance du soi. Ce terme fait référence à une absence ou une faible activation face à un antigène du soi. La tolérance acquise dans la moelle osseuse est nommée "tolérance centrale" alors qu'on parle de "tolérance périphérique" dans les tissus lymphoïdes périphériques. L'efficacité de ces mécanismes dans l'élimination des LB auto-réactifs a notamment été démontrée par plusieurs études (Jacobi et al., 2005 ; Yurasov et al., 2005). En effet, environ 75% des LB de la MO présentant un phénotype précoce et immature (CD34-CD19+CD10+IgM-) sont auto-réactifs. Les différents mécanismes impliqués dans la tolérance centrale et périphérique réduisent ce chiffre à 20% de LB auto-réactifs matures naïfs. Même si ce pourcentage montre qu'un grand nombre de LB reste potentiellement auto-réactifs en périphérie, l'activité de ces LB peut être réduite par des mécanismes de tolérance en périphérie

3.2.1/ Tolérance centrale

Les LB passent par différentes étapes de développement dans la MO jusqu'à atteindre le stade immature où ils expriment un BCR fonctionnel. Autrement dit, le BCR exprimé est constitué

d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère de type IgM associées aux protéines CD79a et CD79b et est capable de transduire un signal. Les LB au stade pre-B n'ayant pas réussi à exprimer un BCR à la surface continuent de recombinaison la chaîne légère ou meurent à défaut d'avoir reçu des signaux de survie. Lorsqu'un LB immature non auto-réactif exprime son BCR à la surface, l'expression de ce BCR suffit à induire un signal tonique favorisant la survie des LB.

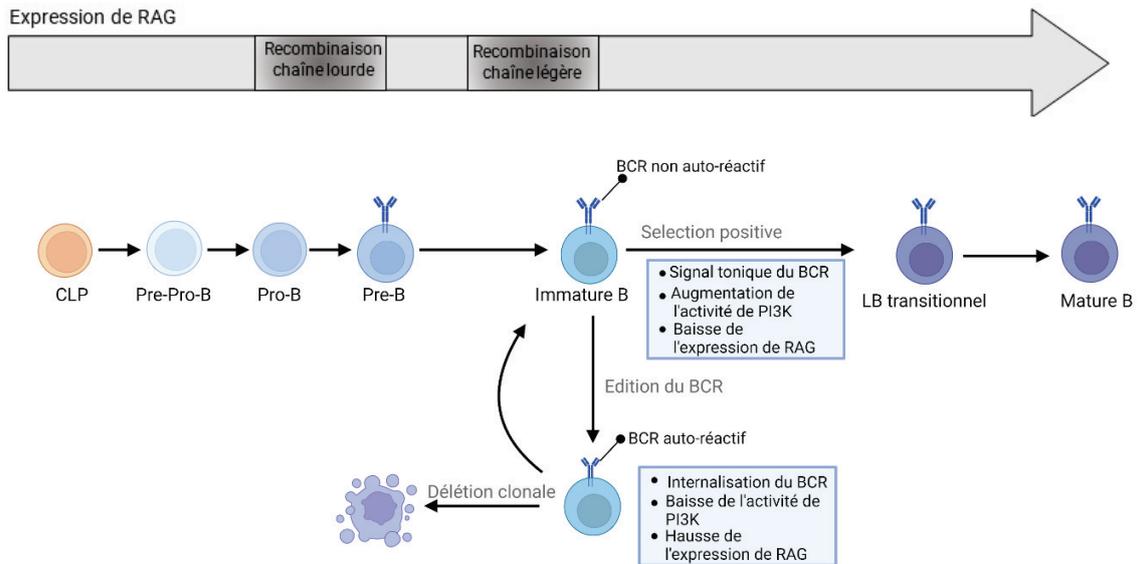


Figure 19 : Tolérance centrale des LB
(Adapté de Nemazee et al., 2017)

Ce mécanisme est notamment médié par l'activation de la voie PI3K/AKT (Figure 19). Cette voie promeut la survie du LB, empêche la migration du facteur de transcription FOXO vers le noyau qui ne peut alors pas induire la transcription de *RAG1/RAG2* nécessaire à l'édition du BCR. En conséquence, le LB immature non auto-réactif migre jusqu'à la rate pour continuer son développement. Lorsqu'un LB reconnaît un antigène du soi, les mécanismes d'édition du BCR se mettent en place. Il s'agit du principal processus de la tolérance centrale. Cela conduit à plusieurs réactions au niveau moléculaire et cellulaire (Nemazee et al., 2017). Au niveau cellulaire, la molécule d'adhésion CD62L favorisant la migration des LB vers les organes lymphoïdes secondaires et le BAFF-R fournissant un signal de survie à la cellule, ne sont plus exprimés à la surface des LB. Au niveau moléculaire, le BCR est internalisé et conduit à une baisse d'activité de la PI3K. En conséquence, FOXO peut migrer jusqu'au noyau pour jouer son rôle de facteur de transcription et induire l'expression de *RAG1/2*, responsable de la recombinaison V(D)J. Des réarrangements secondaires de la région variable de la chaîne légère et plus rarement de la chaîne lourde sont alors enclenchés. Ce processus a pour but de modifier le BCR jusqu'à ce qu'il

ne soit plus auto-réactif ou que le réarrangement ne puisse continuer faute de segment génique disponible. Cependant, ce processus peut échouer à présenter un BCR non auto-réactif et un programme de mort cellulaire appelé "délétion clonale" est induit. Ce programme se met en place suite à l'absence de réception de signaux de survie notamment causés par la non-expression du BCR et de récepteurs de BAFF. En conséquence, le programme d'apoptose médié par la voie dite intrinsèque, mettant en jeu la mitochondrie, est mis en place dans ces cellules. Le facteur de transcription FOXO est notamment impliqué dans l'induction de l'apoptose. Il promeut l'expression du facteur pro-apoptotique BIM, capable d'inhiber l'activité des protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2. De manière intéressante, la délétion clonale peut également avoir lieu en périphérie. Environ 40% des LB sortant de la MO ayant migré dans la rate, dit LB transitionnels, sont autoréactifs alors que ce chiffre tombe à 20% lorsque les LB atteignent le stade mature (Yurasov et al., 2005). La délétion clonale à cette étape est donc nécessaire afin d'éliminer les LB auto-réactifs reconnaissant des antigènes retrouvés uniquement en périphérie (Russell et al., 1991 ; Jacobi et al., 2005). Au cours de leur maturation, la sensibilité à l'apoptose induite par la reconnaissance d'un antigène est fortement réduite et les LB auto-réactifs restants sont inactivés par d'autres mécanismes.

3.2.2/ Tolérance périphérique

Malgré l'efficacité de l'édition du BCR et de la délétion clonale, des LB auto-réactifs réussissent à sortir de la MO et à atteindre la périphérie. L'élimination ou l'inactivation de ces clones est possible grâce à la délétion clonale en périphérie mais aussi grâce à l'anergie et l'ignorance (Figure 20).

L'anergie est un mécanisme mettant la cellule dans un état d'inactivation même en présence de son antigène. Ce phénomène est causé par une exposition prolongée du LB face à son antigène. Des modèles murins ont été développés afin de montrer que c'est la nature de l'antigène et non son affinité pour le BCR qui conduit à l'anergie ou la délétion clonale. Les souris transgéniques MD4 possèdent des LB avec un BCR unique (IgHEL) reconnaissant avec une haute affinité l'antigène HEL (*Hen Egg Lysozyme*). L'un des modèles murins développés exprime la protéine HEL sous forme membranaire (mHEL) (KLK3) tandis qu'un autre exprime HEL sous forme soluble (sHEL) (MD5) (Goodnow et al., 1988 ; Hartley et al., 1991). Les LB des souris transgéniques IgHEL:mHEL (MD4xKLK3) sont éliminés dans la MO par la délétion clonale alors que dans le modèle IgHEL:sHEL (MD4xMD5), les LB autoréactifs continuent leur migration en périphérie. Toutefois, ils présentent un phénotype anergique caractérisé par une baisse de l'expression de l'IgM à la membrane et ne sont pas capables d'induire la production d'autoanticorps contre la protéine HEL. En plus de présenter une réduction de l'expression du BCR, on retrouve une augmentation des phosphatases inhibitrices comme SHP-1 ou SHIP-1 au niveau du complexe

protéique du BCR des cellules anergiques (Getahun et al., 2016). Le recrutement de ces molécules permet de maintenir un état d'inactivation du LB par la déphosphorylation des molécules de la signalisation du BCR.

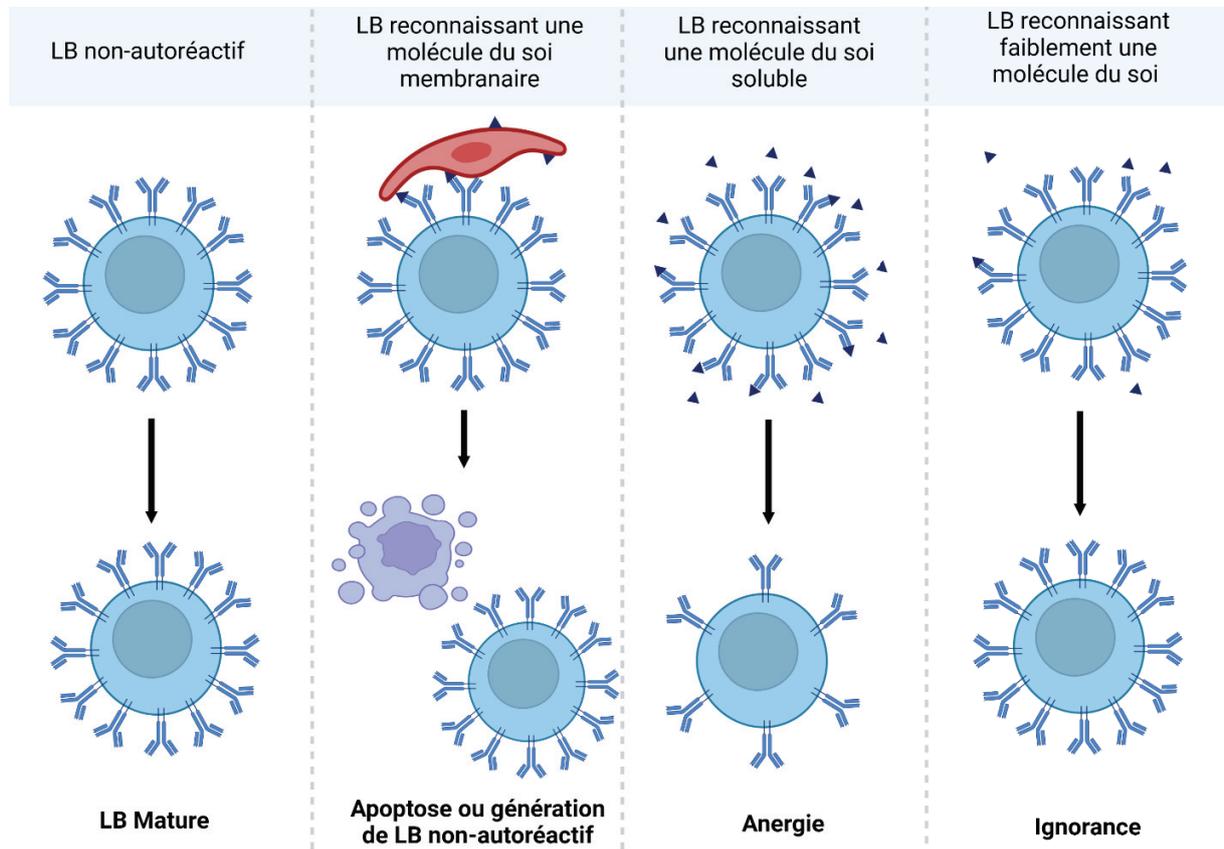


Figure 20 : Mécanisme de tolérance des LB

Selon la nature de l'antigène et sa concentration, les LB auto-réactifs sont éliminés par différents mécanismes de tolérance. (Adapté de Murphy et al., 2008)

Malgré le fait que les cellules anergiques réussissent à migrer jusqu'en périphérie, la plupart ne réussit pas à aller dans les follicules, lieu de rencontre des LTfh. En effet, le processus d'anergie induit une baisse de l'expression du récepteur CXCR5 reconnaissant la chimiokine CXCL13 permettant aux LB d'intégrer les follicules (Seo et al., 2002 ; Ekland et al., 2004). Ce mécanisme est appelé l'exclusion folliculaire. Les LB anergiques présentent également une survie réduite estimée à 4 jours contre environ 40 pour des LB folliculaires non auto-réactifs (Fulcher et al., 1994). Certaines molécules médiant la survie des LB comme BAFF sont limitées en périphérie et créent une compétition entre les cellules. En l'absence de stimulation, les LB anergiques expriment moins de récepteurs tels que BAFF-R et sont défavorisés en contexte compétitif

(Lesley et al., 2004 ; Thien et al., 2004). Par ailleurs, la stimulation chronique du BCR des LB auto-réactifs par leurs auto-antigènes conduit à une hausse de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bim, ce qui crée alors un besoin accru de la cellule en BAFF.

Les cellules ayant une interaction faible avec un antigène du soi sont ignorées en raison de la faible affinité de leur BCR ou de la faible concentration d'antigène accessible aux stades B immatures et transitionnels (Pillai et al., 2011). Ces LB restent viables dans la périphérie et continuent leur maturation dans la rate en LB MZ ou FO. Toutefois, dans des conditions inflammatoires ou lorsque l'antigène devient accessible ou présent dans des fortes concentrations, ces LB peuvent s'activer. En effet, contrairement à l'état d'anergie, l'ignorance ne conduit pas à l'inactivation des cellules. Lorsqu'elles sont activées, ces cellules B à faible affinité peuvent être converties en LB à haute affinité par le processus d'hypermutation somatique. Ces cellules sont potentiellement auto-réactives et présentent un risque d'induire une rupture de tolérance.

Toutefois, des mécanismes de tolérance au sein des centres germinatifs permettent d'éviter l'activation des LB auto-réactifs. En effet, il a été montré chez la souris que, lors de la rencontre d'un LB du centre germinatif produit lors d'une réponse primaire avec un auto-antigène entraînant une réaction croisée, la cellule impliquée migre hors de la zone riche en FDC et LTfh du centre germinatif et entre en apoptose suite à cette rencontre (Shokat et Goodnow., 1995 ; Han et al., 1995). L'occupation chronique des auto-antigènes sur les sites de reconnaissance du BCR conduit à une diminution de l'expression du BCR à la surface et à une baisse de l'expression de molécules comme LFA-1 et le CMH-II, diminuant respectivement les interactions avec les FDC et les LTfh (Alabyev et al., 2007 ; Goodnow et al., 2010). En conséquence, les LB auto-réactifs reçoivent moins de signaux favorisant leur prolifération et leur survie comme le CD40L, l'IL-4, l'IL-21, ICOS, etc. (Shokat et Goodnow., 1995, Allen et al., 2007). Par ailleurs, les LTfh sélectionnent les LB reconnaissant le même antigène. Or, les LT sont également soumis à des mécanismes de tolérance permettant l'élimination des LT auto-réactifs. En conséquence, les probabilités qu'un LT et un LB reconnaissant le même auto-antigène aient réussi à échapper aux mécanismes de tolérance T et B, sont extrêmement faibles. Cela s'illustre notamment avec le nombre très faible de personnes infectées par la bactérie *Campylobacter jejuni* développant le syndrome de Guillain-Barré, dû à une réaction croisée entre les antigènes du pathogène et des composants du nerf périphérique. En effet, seulement 1 personne sur 1000 développe les auto-anticorps caractéristiques de la maladie suite à cette infection montrant ainsi l'efficacité des mécanismes de tolérance (Wim ang et al., 2004 ; Nyati et al., 2013). De plus, les FDC sont également impliqués dans ce processus de sélection des LB dans les centres germinatifs. Les FDC présentent les antigènes par l'intermédiaire du système du complément aux LB du centre germinatif (Fisher et al., 1998 ; Heesters et al., 2013). Les FDC favorisent la survie du LB reconnaissant l'antigène présenté en produisant de l'IL-6 et du BAFF (Wu et al., 2006 ; Reijm et

al., 2020). Néanmoins, la plupart des auto-antigènes n'activent pas le système du complément et ne sont donc pas présentés par les FDC aux LB auto-réactifs des centres germinatifs (Yau et al., 2013). Par conséquent, les LB auto-réactifs ne reçoivent normalement ni de signaux de costimulation de la part des FDC et ni des LTfh.

3.3/ Rôle pathologique des lymphocytes B dans le lupus

Les LB sont souvent placés au centre de la physiopathologie du lupus car ils sont responsables de la production des auto-anticorps caractéristiques de la maladie. L'utilisation de modèles murins et l'efficacité de traitements visant les LB ont effectivement montré que ces cellules jouaient un rôle primordial dans le lupus.

Dès les années 1980, Steinberg et al. ont montré que la déplétion de la majorité des LB par la mutation du gène *xid*, induisant l'inactivation de BTK qui est essentiel au développement des LB, réduisait fortement le phénotype auto-immun dans deux modèles de souris lupiques : (NZB X NZW)F1 et MRL-lpr/lpr (Steinberg et al., 1982 ; Steinberg et al., 1983). La perte des LB dans ces modèles induit une baisse des anticorps anti-ADN, de l'atteinte rénale et une amélioration drastique de la survie des souris (Figure 21). Néanmoins, les travaux de Reininger et al. ont permis de mettre en avant le rôle intrinsèque des LB dans le développement du lupus chez la souris. Ils ont montré que le transfert d'une lignée cellulaire de Pre-B fœtaux établie à partir de cellules provenant du modèle lupique (NZB X NZW)F1 dans une souris SCID, sans LT et LB, induisait la production d'anticorps anti-nucléaires et de symptômes auto-immuns (Reininger et al., 1992) .

Ces dernières années, des traitements visant spécifiquement les LB ont été étudiés pour le LES. Parmi eux, le rituximab est un anticorps monoclonal ciblant la protéine CD20, exprimée sur les LB du stade pre-B au stade mémoire. Ce traitement permet l'élimination des cellules CD20+ par l'induction de l'apoptose, de la phagocytose, du complément et de l'ADCC (Seyfizadeh et al., 2016). Cependant, les plasmocytes, cellules productrices d'anticorps, n'expriment pas la molécule CD20 et ne sont alors pas éliminés par ce traitement. Par ailleurs, le rituximab n'a pas reçu d'autorisation de mise sur le marché pour le lupus. Un autre traitement nommé Belimumab visant cette fois-ci le facteur de survie BAFF a été accepté par la FDA (*Food and drug administration*) et est prescrit pour les patients présentant des autoanticorps et une activité élevée de la maladie malgré la prise de traitement standard (Blair et al., 2018). Ces traitements sont prometteurs pour les patients ne répondant pas aux thérapies classiques et mettent en avant l'importance des LB dans la physiopathologie du lupus.

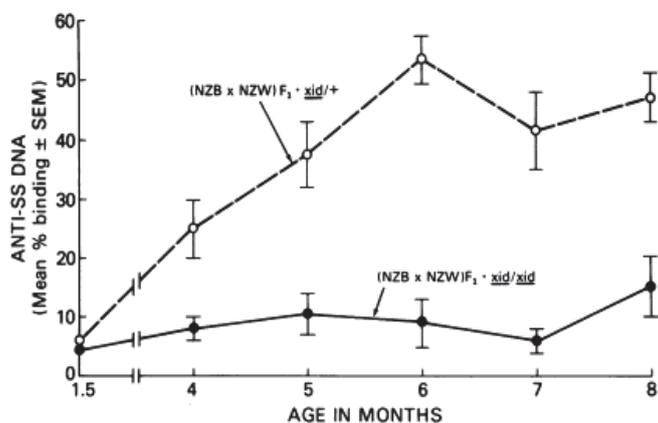


Figure 21 : Baisse des anticorps anti-ADNsb chez les souris (NZB X NZW)F1 x xid/xid
(Steinberg et al., 1982)

FIGURE 1 Effect of *xid/xid* upon spontaneous anti-ssDNA. Control (NZB × NZW)F₁ · *xid/+* mice (open circles, dashed line) developed anti-ssDNA by 4 mo of age. There was a progressive increase until 6 mo of age. Thereafter, the anti-ssDNA varied, but remained high. In individual mice, anti-ssDNA fell just before death. In contrast, the (NZB × NZW) · *xid/xid* mice made very little anti-ssDNA. Their values were not elevated at 1 yr of age (data not shown). Although a few *xid/xid* mice made anti-ssDNA, the groups were significantly different, *P* < 0.01, at all ages starting at 4 mo. A total of 64 *xid/xid* mice were studied at all points. A total of 62 *xid/+* mice were studied through 6 mo of age; 59 *xid/+* mice were studied at 7 mo and 50 *xid/+* mice at 8 mo of age.

3.3.1/ Dérégulation des lymphocytes B chez les patients

a- Altération de la répartition des sous-populations de LB

De nombreuses anomalies des LB ont été reportées chez les patients avec un LES. Dans un premier temps, on observe une rupture de tolérance des LB avec une augmentation des LB auto-réactifs sortant de la MO et des LB auto-réactifs matures (Figure 22). Les LB transitionnels reflétant le répertoire des LB sortant de la MO, la hausse de la fréquence de LB auto-réactifs à ce stade indique un défaut de la tolérance centrale tandis que les anomalies observées au stade mature sont le reflet en partie des défauts de la tolérance périphérique (Wardemann et al., 2007). Les patients avec un LES en rémission clinique (SLE-CR) continuent de présenter un biais dans leur répertoire de cellules B ce qui pourrait expliquer les apparitions de poussées même sous traitement.

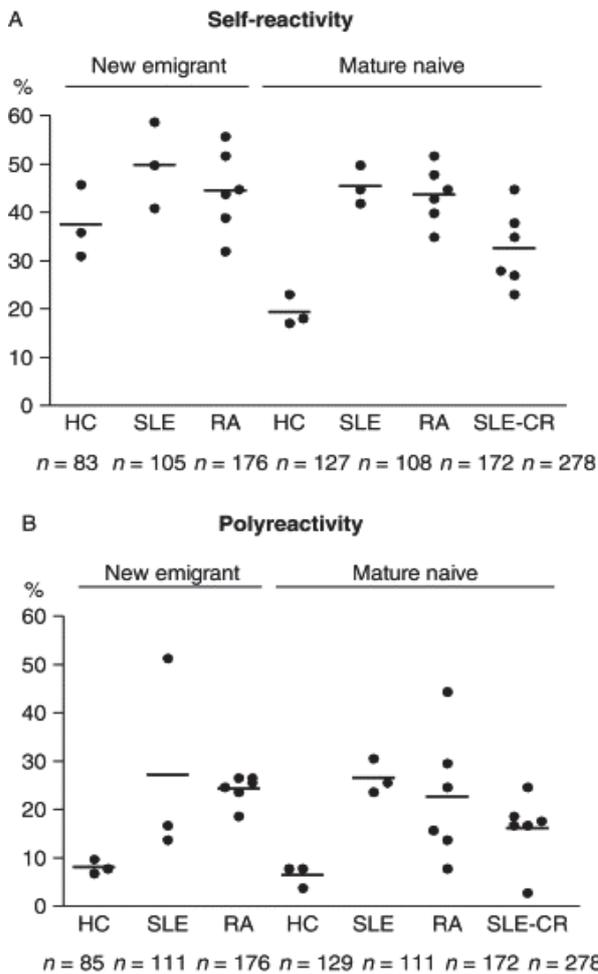


Figure 22 : Fréquence des LB auto- et poly-réactifs chez les patients avec un LES

Des anticorps monoclonaux clonés à partir de LB isolés chez l'Homme à différents stades de différenciation ont été testés pour leur auto-réactivité par ELISA avec des antigènes de lignée Hep-2 humaines (A) ou pour leur polyréactivité (B). Des échantillons provenant de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (RA) et de patients avec un lupus en rémission (SLE-CR) ont également été testés.

Chaque point représente un donneur et les lignes horizontales indiquent les moyennes. Le nombre d'anticorps testé dans chaque population de LB est en-dessous des graphiques. (Wardemann et al., 2007)

Deuxièmement, la proportion de LB est fréquemment réduite chez les patients et ils présentent des dérégulations de la répartition des sous-populations de LB. Le rôle des LB B1 dans le lupus est encore mal connu. Toutefois, une expansion d'une population de LB B1 CD11b+ a été retrouvée chez les patients lupiques et présentent un phénotype particulier comparé au LB B1 CD11b-. Ces cellules produisent spontanément moins d'anticorps de type IgM mais expriment un plus haut niveau de la protéine de costimulation CD86 (Griffin et al., 2011). Cette sous-population particulière est également capable de promouvoir la prolifération de LTCD4+ *in vitro*. Ainsi, ces LB pourraient favoriser l'activité des LTCD4+. Toutefois, les caractéristiques et fonctions des LB B1 sont encore mal comprises puisque des résultats contradictoires ont été obtenus chez la souris. D'une part, l'élimination des LB B1 du péritoine dans le modèle de souris lupique NZB/W F1 favorise la diminution des symptômes relatifs à l'auto-immunité alors qu'une autre étude sur ce même modèle murin propose que LB B1 joueraient un rôle protecteur (Sang et al., 2014).

Le rôle d'une autre population de LB, les LB MZ, reste également flou à l'heure actuelle. Dans certaines pathologies auto-immunes comme le syndrome Sjögren, la fréquence des LB MZ est augmentée. Toutefois dans le lupus, seuls les modèles murins nous apportent des informations sur leurs fonctions. Ces cellules sont expandues dans plusieurs modèles de souris lupiques, que ce soit ceux développant un lupus spontané suite à leur fond génétique comme les NZB et NZB/W (20% de LB MZ contre 7% chez les BALB/C contrôle) et les souris transgéniques produisant une grande quantité de BAFF (environ 20 % contre 8% chez les contrôles) ou des modèles de lupus induits par l'administration d'œstrogènes (20% contre 8% chez les BALB/c) (Amano et al., 2003 ; Palm et al., 2021). Dans certains de ces modèles murins, les LB MZ peuvent produire jusqu'à 25 fois plus d'anticorps IgM anti-ADN que les LB non-MZ (Zeng et al., 2000). Néanmoins, d'autres modèles présentent une baisse des LB MZ comme chez les souris transgéniques avec une perte d'expression d'Ikaros au stade mature (1% contre 7%) ou le modèle BXSb.Yaa (1% contre 6% chez les contrôles) (Amano et al., 2003 ; Schwickert et al., 2019). Finalement, le rôle des LB MZ semble varier selon le modèle étudié et leur influence dans le lupus doit encore être élucidée, notamment chez les patients.

On retrouve également chez les patients une augmentation de la proportion des LB mémoires (CD19+ CD27+) relative à la baisse de la part des LB naïves (Iwata et al., 2016). Une sous-population mémoire (IgD-CD27-) est augmentée chez les patients et son expansion est associée à une hausse de l'activité de la maladie et à une atteinte rénale. En effet, ces cellules peuvent être activées plus rapidement du fait que les LB mémoires ont un seuil d'activation plus bas et qu'elles ont déjà passé les check-points de tolérance (Dörner et al., 2009).

Le nombre de plasmablastes et plasmocytes est élevé chez les patients comparés aux individus sains. L'expansion des cellules productrices d'anticorps est proportionnelle à l'activité de la maladie. Toutefois, une hausse de la production d'auto-anticorps chez les plasmablastes est associée au LES tandis que pour les plasmocytes à longue durée de vie produiraient les auto-anticorps généralement retrouvés dans le lupus comme les anticorps anti-Sm, -Ro ou -La indépendamment de l'activité de la maladie (Dörner et al., 2009).

Enfin, ces dernières années, une nouvelle population de LB, augmentant avec l'âge et retrouvée dans des modèles murins lupiques et chez les patients, est au centre de nombreuses recherches. Ces cellules nommées "ABC" pour *Age-associated B Cells* forment une population hétérogène se distinguant par l'expression des marqueurs suivant : CD19+, CD21-, CD11c+, Tbet+ chez la souris et CD19+ ,IgD- ,CD27-, CXCR5- ,T-BET+ chez l'Homme (Sachinidis et al., 2020). On retrouve une élévation de cette population dans d'autres pathologies auto-immunes comme le syndrome de Sjögren, la maladie de Crohn, la sclérose en plaque mais aussi dans certaines infections. Dans un contexte inflammatoire, les ABC prolifèrent rapidement et produisent des anticorps potentiellement auto-réactifs. De plus, elles favorisent la présentation de l'antigène au LTCD4+ et de ce fait, la formation des centres germinatifs. De manière intéressante, les ABC répondent faiblement à la stimulation du BCR alors qu'elles sont activées suite à la stimulation

des TLR7 et TLR9. La délétion de l'expression de T-bet chez les LB, facteur de transcription clé des ABC, montre une amélioration des symptômes auto-immuns dans des modèles murins (Rubtsova et al., 2017). L'élimination de cette population par des thérapies constitue une piste prometteuse pour le développement de nouveaux traitements dans les pathologies auto-immunes.

b- Dérégulation des voies de signalisation des LB

Parallèlement aux altérations dans la répartition des sous-populations des cellules B, les LB des patients présentent un phénotype hyperactivé. Cela se traduit par une élévation du flux calcique et du niveau de phosphorylation des molécules de signalisation de manière spontanée ou en réponse à la stimulation du BCR chez les LB de patients comparés à ceux venant de contrôles sains (Liossis et al., 1996). Des analyses de kinome, permettant d'évaluer le niveau d'expression et d'activité des kinases, ont mis en avant que le niveau d'activation de certaines kinases jouant un rôle clé dans le contrôle des LB était profondément modifié chez les patients atteints de LES (Taher et al., 2010). On retrouve notamment une élévation de l'activité des protéines de la voie PI3K/AKT, ainsi qu'une baisse chez certains patients de l'activité de phosphatases comme SHIP. De plus, l'activation de la protéine FAK est diminuée. Cette kinase est un régulateur négatif de RhoA impliqué dans la migration des LB (Pirone et al., 2006 ; Cuesta-Mateos et al., 2012). Par conséquent, la réduction de l'activité de FAK (Focal adhesion kinase) favorise la migration des cellules B par l'augmentation de RhoA. Par ailleurs, l'hyperactivation des LB des patients peut s'expliquer par un défaut de l'expression de la tyrosine kinase inhibitrice LYN ou des récepteurs inhibiteurs comme FcγRII, CD72 et CD22, un défaut de l'activité de la phosphatase PTEN (Phosphatase and tensin homolog), ou encore une surexpression de la molécule de costimulation comme CD19 (Flores-Borja et al., 2005 ; Kil et al., 2013 ; Wu et al., 2014).

3.3.2/ Rôle pathogénique des LB dans le LES

Les cellules B sont des initiateurs et effecteurs important de la réponse immunitaire en temps normal. Dans le cadre de pathologies auto-immunes, les LB remplissent les mêmes rôles mais cette fois-ci, leur arsenal cible les auto-antigènes.

a- en tant que cellules productrices d'auto-anticorps

Les auto-anticorps, et particulièrement les anticorps anti-ADNdb, sont au centre de la pathologie. Des études chez la souris ont montré que le transfert passif de certains anticorps anti-ADN suffisaient à induire l'apparition de symptômes (Ehrenstein et al., 1995 ; Gaynor et al., 1997). Les anticorps anti-ADNdb sont présents chez 70% des patients atteints de LES alors qu'ils sont retrouvés dans moins de 0,5% des autres pathologies auto-immunes (Giles et al., 2013). Les

auto-anticorps apparaissent le plus souvent avant l'apparition des signes cliniques (Arbuckle et al., 2003). Bien qu'on retrouve des auto-anticorps également chez les individus sains, les auto-anticorps détectés chez les patients sont quasiment spécifiques au LES comme les anticorps anti-ADNdb, anti-Sm, anti-phospholipide et anti-ribosomes. Contrairement à d'autres maladies auto-immunes, une importante diversité d'auto-anticorps est présente dans le lupus. Plus de 180 auto-anticorps ont été identifiés dont 24 corrélant avec une progression de la maladie contre 4 qui seraient protecteurs (Table 3) (Yaniv et al., 2015). Les auto-anticorps produits vont former des complexes immuns en s'associant avec leur antigène cible. Ils déclenchent une réaction inflammatoire notamment par l'activation du complément induisant des dommages tissulaires. Leur présence est souvent corrélée à l'activité de la maladie et particulièrement à la néphrite lupique. Il s'agit d'une inflammation du rein retrouvée chez 30% des patients se traduisant par une protéinurie positive dans les urines et pouvant conduire à une insuffisance rénale nécessitant une greffe. Les complexes immuns circulant se déposent dans certaines structures du rein comme les glomérules conduisant à une inflammation nommée "glomérulonéphrite" (Nowling et al., 2011). Par un mécanisme de réaction croisée, certains anticorps réagissent contre d'autres protéines notamment certaines présentes dans les glomérules. Une étude chez la souris a montré que des anticorps antinucléaires ont la propriété d'interagir avec l' α -actinine retrouvée en abondance dans le rein (Zhao et al., 2005). Certains anticorps conduisent à l'apparition de symptômes spécifiques comme les anticorps ciblant les globules rouges et qui sont à l'origine d'anémie hémolytique auto-immune. Néanmoins, tous les anticorps retrouvés dans le lupus n'ont pas tous un rôle pathogène. Les anticorps de type IgM anti-ADN pourraient même jouer un rôle protecteur (Witte et al., 2008).

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

Tableau 3 : Auto-anticorps associées au niveau d'activité du LES
(Adapté de Yaniv et al., 2015)

b- en tant que cellules présentatrices d'antigènes et productrices de cytokines

Le rôle des LB sur le LES en tant que cellules présentatrices d'antigènes et productrices de cytokines a été démontré dans des modèles lupiques murins. D'une part, l'absence de LB dans ces modèles induit une réduction du nombre de LT mémoires et de l'activation des LT CD4+ et CD8+ (Shlomchik et al., 1994). Les LB permettraient alors d'induire l'activation et la différenciation des LT dans un contexte lupique. D'autre part, un modèle murin lupique

transgénique a été généré où les LB sont présents mais incapable de sécréter des anticorps. Malgré l'absence d'immunoglobulines circulantes, ces souris développent une néphrite et présentent une survie réduite (Chan et al., 1999). Les LT dans ce modèle présentent un phénotype activé et une augmentation des LTCD4+ mémoires. Ces travaux montrent que les cellules B contribuent à la pathogenèse auto-immune indépendamment de la production des anticorps. Le rôle exact des différentes cytokines produites par les LB dans le LES reste encore flou. Les cellules B participent à l'inflammation via la sécrétion d'IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ et de TNF- α mais elles peuvent aussi réduire l'inflammation par la production d'IL-10. Cependant, le rôle de l'IL-10 dans le lupus demeure controversé. De manière surprenante, le blocage d'IL-10 par un anticorps monoclonal réduit l'activité de la maladie chez certains patients (Llorente et al., 2000). De plus, un polymorphisme favorisant la production de l'IL-10 est associé au LES (Chong et al., 2004).

3.3.3/ Variants associés à une dérégulation des lymphocytes B dans le LES

a- Le rôle de la signalisation BCR dans la prédisposition au LES

La signalisation BCR est nécessaire pour la survie des LB immatures de la MO et matures en périphérie par l'induction d'un signal de survie par les voies PI3K/Akt et NF- κ B. A l'inverse, une forte activité du BCR favorise l'apoptose des LB immatures de la MO et transitionnelles de la rate. L'induction de la signalisation BCR, à un niveau intermédiaire au stade immature, fournit un signal tonique optimal pour la survie de la cellule.

Dans un premier temps, la majorité des recherches ont montré que l'augmentation de la signalisation du BCR pouvait induire l'auto-immunité. Des polymorphismes induisant une surexpression de BANK1 sont notamment associés à une augmentation du flux calcique et de l'activité de PLC γ 2 (Gómez Hernández et al., 2021). De plus, des mutations dans le gène codant pour la protéine WAS, responsable du syndrome de Wiskott-Aldrich, entraînent une signalisation légèrement améliorée en aval du BCR et des TLRs. Les LB transitionnels avec un défaut de WAS chez la souris montrent des capacités prolifératives améliorées (Kolhatkar et al., 2015). On retrouve également des polymorphismes associés à une baisse d'activité de la kinase régulatrice LYN (Lu et al., 2009). Chez la souris, la délétion intrinsèque du gène codant pour Lyn conduit au développement d'un lupus spontané. En particulier, les LB ayant un défaut de Lyn présentent une augmentation du flux de calcium suite à la stimulation du BCR expliquée probablement par le rôle du Lyn dans la transmission du signal de récepteurs inhibiteurs comme CD22 ou par le récepteur Fc γ IIb (Brodie et al., 2018). Enfin, un variant de *PTEN* a également été identifié et pourrait également induire une hausse de l'activité de la signalisation du BCR (Al-Mayouf et al., 2020). PTEN est une phosphatase qui limite la signalisation de la voie PI3K en convertissant le PIP3 produit par la PI3K en PI(4,5)P2. La voie PI3K/AKT joue un rôle clé dans la tolérance centrale

et périphérique. Comme vu dans le chapitre 3.2.1, cette voie induit un signal tonique qui favorise la sélection positive de LB immatures dans la MO ayant réussi à assembler un BCR fonctionnel mais non auto-réactif. Un équilibre approprié de l'activité PI3K et PTEN est nécessaire pour induire la sélection positive, l'édition du BCR ou la délétion clonale selon la réactivité aux autoantigènes des LB immatures de la MO. En périphérie, PTEN est également impliqué dans l'anergie des LB. Chez l'Homme, son expression est élevée dans les LB anergiques d'individus sains et son inhibition restaure une réponse normale des LB (Wu et al., 2014). Dans le modèle murin IgHEL:sHEL décrit dans le chapitre 3.2.2, le niveau d'expression de PTEN est également augmenté dans les LB anergiques et la perte de son expression entraîne une perte de tolérance dans ce système (Bacalao et al., 2021). D'autre part, la stimulation du BCR, du CD40 et de certains TLR engage la voie de signalisation menant à la PI3K qui module la réponse B. Notamment, une forte activité de la PI3K dans les LB limite la commutation isotypique. On notera également que la voie PI3K est essentielle dans la survie des LB. Les LB n'exprimant plus de BCR au stade mature présentent une baisse de leur survie ; mettant ainsi en avant le rôle essentiel de la signalisation BCR dans le maintien des LB matures. Or, l'activation constitutive dans ces LB de la PI3K permet de restaurer la survie des LB (Srinivasan et al., 2009). En somme, l'activité de la PI3K et de PTEN s'alternent et s'équilibrent au cours de la réponse du LB. Cependant, l'altération de cet équilibre est associée au LES puisqu'on retrouve chez certains patients, une élévation de la voie PI3K et une baisse de l'expression de PTEN dans les LB.

Dans un deuxième temps, des études ont montré que, à l'opposé d'une augmentation de la signalisation du BCR, une diminution était associée au LES. Dans la mesure où la sélection négative des LB immatures de la MO dépend de la signalisation du BCR, une réduction de cette signalisation permet l'échappement des LB auto-réactifs qui peuvent migrer alors en périphérie. Ce processus est notamment illustré par les anomalies de la tyrosine kinase BTK, jouant un rôle central dans la signalisation BCR. Les patients avec un défaut de BTK sont atteints d'une immunodéficience appelé agammaglobulinémie. Les patients atteints par cette pathologie présentent un répertoire de cellules B enrichi en clones auto-réactifs (Ng et al., 2004). De plus, un variant de *PTPN22* a été identifié et également associé à une diminution de la signalisation du BCR. *PTPN22* est une phosphatase inhibant la signalisation du BCR et du TCR. Dans la signalisation BCR, *PTPN22* induit la déphosphorylation de protéines proximales du BCR comme les kinases de la famille SRC. Un polymorphisme de ce gène entraînant un gain de fonction, R620W, a été associé à plusieurs pathologies auto-immunes. Les souris porteuses d'un variant analogue au variant *PTPN22* humain présentent des altérations des LB notamment une résistance à l'apoptose et développent des signes d'auto-immunité. En outre, chez la souris greffée de cellules souches hématopoïétiques humaines, l'expression intrinsèque de l'allèle R620W est suffisante pour altérer la tolérance des LB.

En résumé, la dérégulation de la signalisation du BCR peut favoriser le développement du LES par différents processus (Figure 23). D'une part, l'augmentation de la signalisation du BCR favorise l'activation des LB auto-réactifs ayant réussi à atteindre la périphérie. D'autre part, les altérations atténuant la signalisation du BCR permettent aux LB immatures ou transitionnelles auto-réactifs d'échapper à la sélection négative et de devenir des cellules immunocompétentes pouvant contribuer à la pathogénèse du lupus.

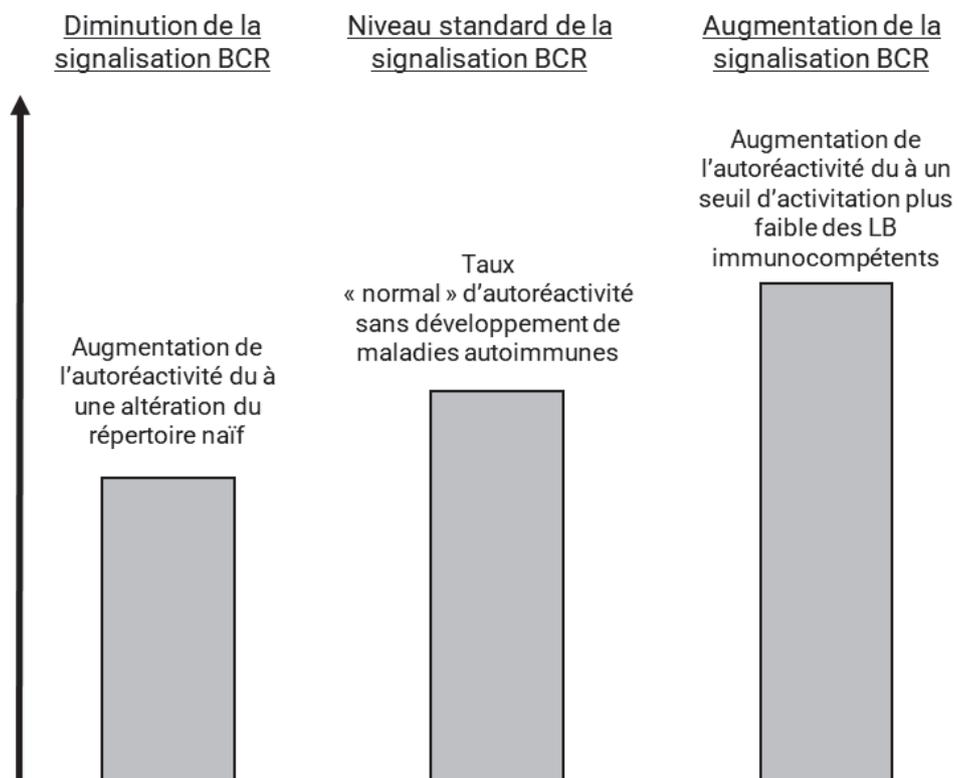


Figure 23 : Conséquence de la dérégulation du niveau d'activité du BCR
(Adapté de Nashi et al., 2010)

b- Autres variants relatifs aux LB dans la prédisposition au LES

Bien que la signalisation BCR joue un rôle central dans le développement et la réponse B, d'autres voies de signalisation sont impliquées dans ces processus. L'identification des variants participant à ces voies et associés au lupus a souligné leur importance.

D'une part, des polymorphismes de certains TLR ont été associés au LES (Shen et al., 2010 ; Zhou et al., 2010). Récemment, une mutation provoquant un gain de fonction de TLR7 a notamment été identifiée comme causale dans un LES monogénique (Brown et al., 2022). Dans un premier temps, les TLR ont été incriminés pour le rôle dans la production d'IFN-I. Toutefois, ces récepteurs ont une place centrale chez les LB, notamment TLR7 et TLR9, puisqu'ils coopèrent avec la signalisation du BCR (vu dans le chapitre 3.1.2.c). Pour rappel, les ligands de TLR7 et TLR9 sont respectivement l'ARN monocaténaire et l'ADN riche en CpG non méthylé. Dans le lupus, le haut niveau d'inflammation entraîne des dommages tissulaires conduisant notamment à un excès d'ADN et d'ARN dans l'espace extracellulaire. Les LB auto-réactifs reconnaissant ces molécules, ayant échappé aux processus de tolérance, peuvent être activés par le BCR et les TLR7 ou TLR9 de façon T-indépendante et devenir pathogénique. D'autre part, des variants de CD40 ont été identifiés chez des patients avec un LES (Bae et al., 2019). De manière intéressante, il a été montré que les patients avaient également une augmentation de l'expression de CD40L et CD40s. L'induction de la voie de signalisation du CD40 promeut la survie des LB matures et permet de favoriser le maintien des LB auto-réactifs en périphérie. De plus, les patients présentent également un excès de production de BAFF qui favorise également la survie. Néanmoins, aucun polymorphisme dans les gènes codant pour BAFF ou ses récepteurs n'a été associé au lupus. Toutefois, des mutations hétérozygotes dans le gène codant le récepteur TACI sont associées à l'immunodéficiences commune variable avec des manifestations auto-immunes (Romberg et al., 2013). De plus, les souris transgéniques surexprimant BAFF développent un phénotype auto-immun (Groom et al., 2007).

D'autres polymorphismes altérant la réponse B ont également été associés au LES (Karrar et al., 2018). Certains variants sont retrouvés dans des gènes impliqués dans le développement des LB à des stades précoces, comme *IKZF1* et *IKZF3* (Cai et al., 2014 ; Nieuwenhove et al., 2018). Comme mentionné dans le chapitre 2.6, des mutations de *IKZF1* peuvent induire un lupus monogénique. Toutefois, les mécanismes par lesquels les variants peuvent favoriser la rupture de tolérance B sont encore mal compris. Certains polymorphismes joueraient davantage sur les LB matures. Par exemple, la baisse d'expression de *ETS1* enrayerait la mise en place de l'anergie tandis que des variants dans des gènes codant pour le CMHII comme *HLA-DRB1*, *DQA1*, et *DQA2* favoriseraient la reconnaissance d'autoantigènes (Sullivan et al., 2000 ; Castaño-Rodríguez et al., 2008 ; Russel et al., 2015 ; Selvaraja et al., 2015). Enfin, des polymorphismes ont une influence sur la différenciation des LB en cellules mémoires et en plasmocytes à longue durée de vie. Par exemple, les variants identifiés de *P2RY8* perturbent les mécanismes d'hypermutation somatique

et de commutation isotypique tandis que des polymorphismes de OX40L favorisent l'interaction entre les LB et les LTCD4+ (He et al., 2014 ; Jacquemin et al., 2015)

Pour conclure, nous avons vu que, intrinsèquement et par leurs différentes fonctions, les LB peuvent induire un lupus. La dérégulation du seuil d'activation des LB, causée par des altérations dans la signalisation sous-jacente au BCR, aux TLR, aux récepteurs CD40 et BAFF, peut mener à la rupture de tolérance. Cela souligne également que la signalisation des LB est en équilibre constant grâce à l'action de molécules activatrices et inhibitrices permettant de fournir une réponse mesurée et adéquate ; toutefois modifier cet équilibre peut impacter les LB à la fois dans leur développement et leur fonction.

4 – DÉFICIT DE LA PROTÉINE PKC- δ : Une cause de lupus monogénique

Comme vu dans le chapitre 3.3.3, plusieurs mutations impliquées dans la rupture de la tolérance des LB sont associées au LES. Certaines sont des polymorphismes prédisposant à la maladie tandis que d'autres sont suffisantes pour induire le développement d'un LES. Parmi cette dernière catégorie, nous avons évoqué les mutations de *PRKCD* dans le chapitre 2.6. Plusieurs hypothèses ont été faites quant au mécanisme par lequel les mutations de *PRKCD* conduisent au LES. Néanmoins, celui-ci n'est toujours pas élucidé. Notre équipe a identifié une mutation homozygote de ce gène dans une famille suivie à Lyon. Une étude sur ces patients a été réalisée afin d'évaluer l'impact de cette mutation notamment sur la biologie des LB. Les résultats de ces travaux ont été publiés par Belot et al. (2013). Ils ont permis de mieux comprendre les conséquences de la mutation sur l'expression et l'activité de PKC- δ et à étudier les anomalies des LB chez ses patients. Cependant, beaucoup de questions subsistent au sujet de cette mutation et l'un des buts de mon projet de thèse est d'élucider le rôle de cette mutation dans l'homéostasie lymphocytaire B. Avant d'aborder plus précisément celui-ci, nous allons en premier lieu présenter les données cliniques et biologiques de la famille avec cette mutation. En second lieu, une revue de la littérature sera réalisée à propos de la protéine PKC- δ . Finalement, nous décrirons les conséquences d'un déficit en PKC- δ sur les différents types cellulaires chez l'Homme et chez la souris.

4.1/ Présentation de la famille avec la mutation G510S

Trois patients d'une même fratrie ont été diagnostiqués pour un LES selon les critères de l'ACR de 1982. Les caractéristiques des patients sont décrites dans le tableau 4. Les 3 membres de la famille avec un LES sont originaires d'Europe du Nord et issus d'une union consanguine (Figure 24). Les parents sont en bonne santé et aucune pathologie auto-immune n'a été décelée dans la famille proche. Etant donné qu'il s'agit d'une forme familiale de lupus et que les patients ont commencé à développer des symptômes durant l'enfance, une analyse génétique par séquençage d'exome a été réalisée. Une mutation homozygote de *PRKCD* (c.1528G>A; p.G510S) a été identifiée chez les 3 membres de la famille avec un LES alors que les parents sont hétérozygotes. La substitution c.1528G>A n'est pas retrouvée dans les bases de données de dbSNP, ClinSeq et le projet 1000 génomes, ni dans le "*Exome Variant Server*" référencant les allèles de ce gène parmi 13006 chromosomes contrôles. Les prédictions sur la fonctionnalité de la protéine ont classé ce variant comme délétère (analyse SIFT) ou probablement dommageable (analyse Polyphen). De plus, le résidu de G510, localisé dans la boucle d'activation de la protéine, est fortement conservé à travers les espèces jusqu'à la levure parmi les orthologues de PKC- δ suggérant un rôle important de cet acide aminé.

Subject	V-1	V-3	V-4	IV-1
Age at sampling, years	24	8	13	44
Sex	Female	Female	Male	Female
<i>PRKCD</i> mutation(s)	G510S/G510S	G510S/G510S	G510S/G510S	WT/G510S
Clinical manifestations				
Autoimmune disorder/SLE features	Skin involvement, alopecia, lupus nephritis, arthritis, neurologic involvement, dsDNA antibodies, ANAs, low C3 and C4	Skin involvement, autoimmune anemia, thrombocytopenia, antiphospholipid syndrome, lupus nephritis, CNS vasculitis, dsDNA antibodies, ANAs, low C3 and C4	Lupus nephritis, dsDNA antibodies, ANAs	None
Lymphoproliferative disease	Hepatomegaly	Lymphadenopathy, hepatosplenomegaly	None	None
Followup data	Chronic cutaneous lupus, CNS vasculitis, chronic renal failure	Death age 13 years (septic shock pseudomonas)	Asymptomatic with treatment	Asymptomatic
Immunologic features				
Lymphocyte count/ μ l (normal range)	1,073 (1,270–3,230)	778 (2,000–2,700)	1,861 (1,400–4,170)	2,714 (1,270–3,230)
T cell population, % (normal range)	21 (28–39)	9 (36–43)	32 (30–43)	31 (28–39)
CD3+	91 (61–80)	82 (65–80)	70 (59–77)	83 (61–80)
CD4+	53 (33–52)	46 (30–45)	41 (29–45)	51 (33–52)
CD8+	40 (21–40)	34 (19–43)	27 (20–45)	45 (20–45)
CD4+CD45RA+	ND	31 (55–67)	49 (55–67)	ND
CD4+CD25+CD127–	10 (4–10)	ND	4.4 (4–10)	ND
Natural killer CD56+CD16+ cells, % (normal range)	3 (8–25)	10 (8–25)	19 (10–23)	8 (9–18)
CD19+ B cells, % (normal range)	4 (9–18)	5 (10–20)	19 (10–23)	8 (9–18)
Immature B cells, CD19+CD21–	49 (9–18)	ND	20 (0–10)	7 (9–18)
Naive B cells, CD19+CD27–IgD+	ND	ND	93 (43–87)	55 (43–87)
Memory B cells, CD19+CD27+	ND	ND	2 (14–46)	42 (14–46)
T cell proliferation after stimulation $\times 10^{-3}$ cpm (normal threshold)				
With concanavalin A	12 (>10)	Normal	81 (>10)	ND
With PMA	36 (>10)	Normal	88 (>10)	ND
With antigen		Normal	ND	ND
Tuberculin	23 (>10)	Normal	ND	ND
Candidin	71 (>10)	Normal	ND	ND
Immunoglobulin, gm/liter (normal range)				
IgG	10.4 (6.78–12.6)	12.10 (6.65–12.3)	11.2 (6.62–12.29)	ND
IgA	3.43 (0.75–2.38)	0.69 (0.51–1.63)	1.04 (0.6–1.9)	ND
IgM	1 (0.71–2.02)	1.27 (0.51–1.63)	0.8 (0.53–1.53)	ND

* All thresholds and ranges are adjusted for age. PCK δ = protein kinase C δ ; SLE = systemic lupus erythematosus; dsDNA = double-stranded DNA; ANAs = antinuclear antibodies; CNS = central nervous system; ND = not done; PMA = phorbol myristate acetate.

Tableau 4 : Caractéristiques cliniques des patients de la famille avec la mutation G510S de *PRKCD*
(Yaniv et al., 2015)

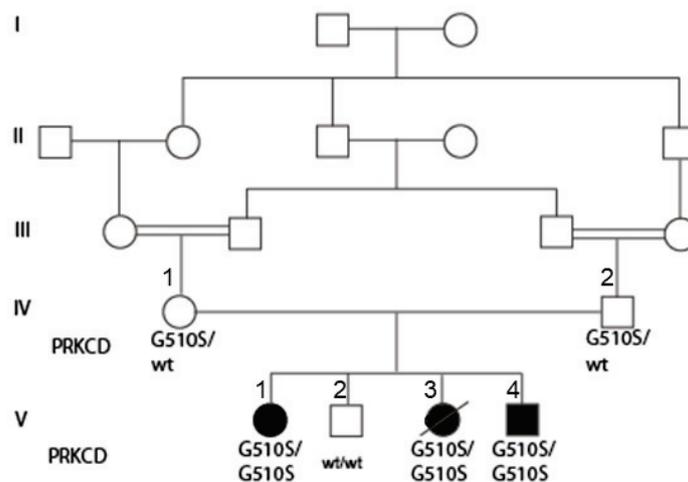


Figure 24 : Arbre généalogique des patients avec la mutation de *PRKCD*

Les symboles pleins représentent les personnes avec un LES; les symboles ouverts représentent les personnes asymptomatiques. La ligne diagonale indique que le patient est décédé. (Belot et al., 2013)

Les modélisations par rayon X de PKC- δ ont notamment prédit que la substitution de la glycine en sérine en position 1528 conduit à une perturbation de la boucle d'activation de la protéine (Figure 25). L'expression de *PRKCD* au niveau ARN n'est pas impactée par la mutation puisque les isoformes 1 et 2 sont exprimés à des niveaux similaires à l'allèle de référence (Figure 26.A). Toutefois, l'expression du mutant G510S de PKC- δ dans les cellules H157 et HEK293T a montré que la forme mutée de la protéine ne pouvait pas être phosphorylée dans la boucle d'activation de la protéine (T507). Cela entraîne une diminution de la phosphorylation de certains sites comme S645 et S662, indispensable à l'activation de PKC- δ (Figure 26.B). L'absence de phosphorylation de certains résidus de PKC- δ , à cause de la mutation c.1528G>A, réduit la stabilité de la protéine, de sorte que la forme mutée de la protéine se dégrade plus rapidement que la forme WT (*Wild Type*) après sa transfection dans des cellules H157 (Figure 26.C). De manière concordante, l'expression de PKC- δ chez les patients homozygotes pour la mutation c.1528G>A de *PRKCD* est diminuée dans les PBMC (cellules mononuclées du sang périphérique) (Figure 26.D). Ces résultats indiquent que la mutation identifiée dans cette famille altère l'expression de PKC- δ ce qui pourrait être la cause de la pathologie en particulier à la lumière des données de la littérature. En effet, 14 autres patients de huit familles différentes diagnostiqués pour un LES ou un ALPS sont répertoriés avec une mutation de *PRKCD* conduisant à un déficit de la protéine. Les données cliniques et biologiques de ces patients sont regroupées dans le tableau 5.

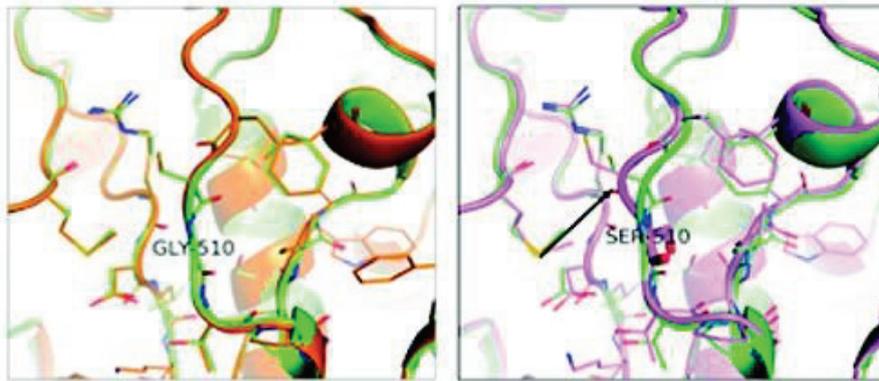


Figure 25 : Modélisation de la protéine PKC- δ au niveau du résidu G510
(Belot et al., 2013)

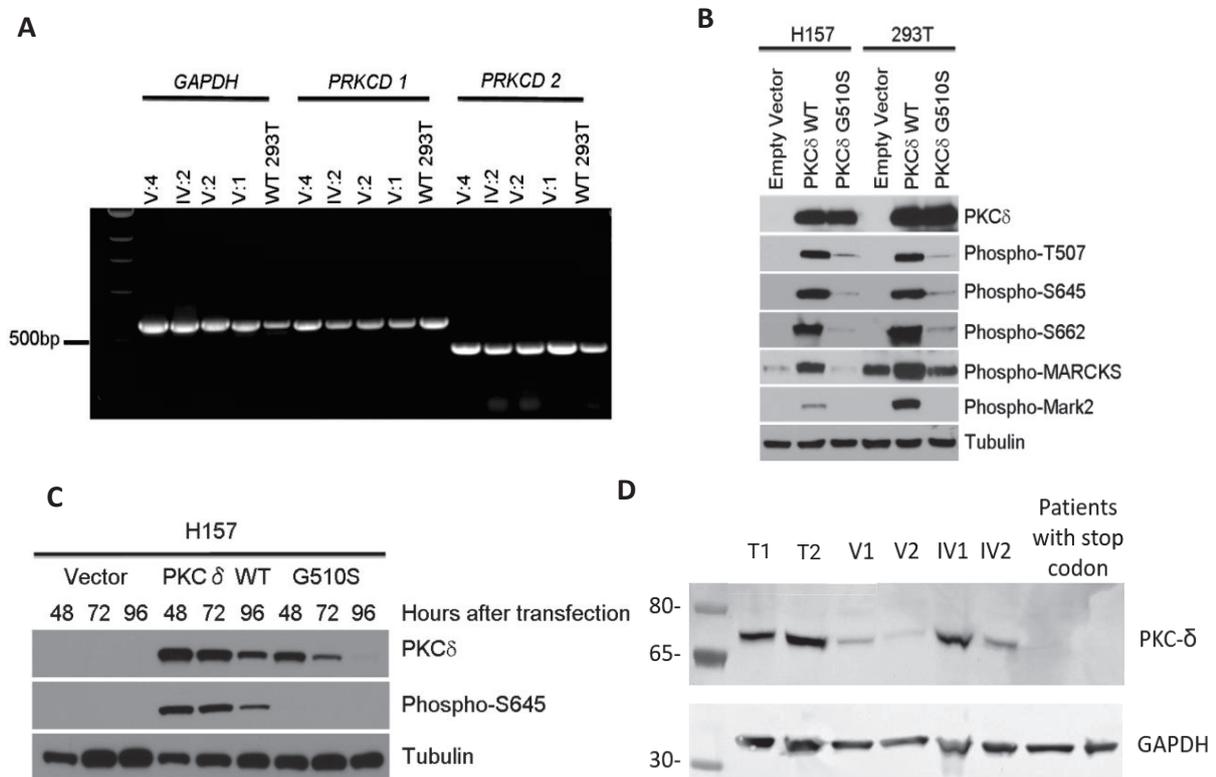


Figure 26 : Effet de la mutation G510S sur l'expression de PKC- δ

A/ Détection par RT-PCR de *PRKCD* et *GAPDH* provenant de l'ARN extrait des lignées cellulaires lymphoblastiques (LCL) établies chez les membres de cette famille et les cellules HEK 293T. B/ Détection de la phosphorylation de résidus de PKC- δ et de substrat de PKC- δ : MARCKS et Mark2. C/ Expression de PKC- δ WT ou avec la mutation après transfection et mesure de la phosphorylation du résidu S645. D/ Mesure de l'expression de PKC- δ à partir de PBMCs de patients et témoins (T1/T2). (Belot et al., 2013)

	Salzer et al.	Kuehn et al.	Belot et al.		Kiykim et al.	Sharifinejad et al.	Gu et al.	Nanthapaisal et al. ; Lei et al.	Meyts et al.		Neehus et al.		
Patient/origin	P1/Turkey	P2/Mexico	P3/North Europe	P4/North Europe	P5/North Europe	P6/Turkey	P7/Afghanistan (P8 sister)	P9 China	P10/P11/P12 Pakistan	P13/UK	P14/UK	P15/Turkey	P16 and P17/Turkey
Consanguinity	Yes	Probable	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Unknown	Unknown	No	Unknown
Disease onset/gender	1 year/M	3 years/M	10 years/F	3 years/F	6 years/M	3.5 years/M	4 years/M	6 years/M	1 year/F (P10+P11) 2 years/M (P12)	9 months/M	6 months/F	1 year/F	7 months/M
Lymphoproliferation													
Hepato/spleno megalaly	+	+	+	+	-	+	+	+	+	n.d	n.d	n.d	+
Lymphadenopathy	+	+	-	+	-	+	+	+	n.d	n.d	n.d	+	+
Autoimmunity													
Antiphospholipid syndrome	+	-	-	+	-	-	-	-	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
SLE-like skin manifestations	n.d	+	+	-	+	+	+	+	+	n.d	n.d	+	n.d
Kidney involvement	+	-	+	+	+	-	-	-	-	n.d	n.d	n.d	n.d
CNS vasculitis	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d	n.d	n.d	n.d
Recurrent infections	+	+	-	-	-	+	+	n.d	+	+	+	+	n.d
Other	Polychondritis		Arthritis	Autoimmune anemia		Thrombocytopenia	Augmentation of DN T cells	Arthritis				Arthritis	Autoimmune anemia
Autoantibodies													
ANA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Anti-dsDNA	+	+	-	-	+	-	+	+	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Other	IgG anti-cardiolipin	Anti-RMP, Smith, SSA	-	-	-	-	-	-	-				

Laboratory findings														
	Progressively ↓	↑	↓	↓	↓	Normal	↑	Normal	Normal	n.d	n.d	n.d	n.d	
CD19+ B cells		↑	↓	↓	Normal	Normal	↑	Normal	Normal	n.d	n.d	n.d	n.d	
Naive B cells	Normal	↑	n.d	n.d	↑	Normal	↑	n.d	n.d	n.d	n.d	↑	n.d	
IgM memory B cells (CD19+, CD27+)	↓	↑	n.d	n.d	↓	(CD19+CD27+)	↓	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	
IgG memory B cells	↓	↓	n.d	n.d	n.d	n.d	↓	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	
IgG levels	Normal	↑	Normal	Normal	Normal	Normal	↑	↑	n.d	n.d	n.d	↓	n.d	
IgM levels	↑	↑	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal/+	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	
IgA levels	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	n.d	n.d	n.d	Normal	n.d	
NK cells number/function	Normal/-	Slightly ↓/↓	↓/-	↓/-	Normal/h.d	Normal/-	Normal/-	Normal/↓	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	
Lymph node histology	Reactive follicular hyperplasia with predominant B cells	Expansion of B cell areas and prominent B follicles	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	
PKCRD mutation	c.1352 + 1G>A	c.1840C>T, p.Arg614Trp	c.1258G>A p.Gly510Ser	c.1258G>A p.Gly510Ser	c.1258G>A p.Gly510Ser	c.1258G>A p.Gly510Ser	c.742G>A, p.Gly248Ser	c.1293_1294insAp.Gly432Argfs*15	c.36T>G, p.Tyr12X	c.1294G>T; p.Gly432Trp	c.788-2A>G/c.571C>T (?/p.Q191*)	c.788-2A>G/c.571C>T (?/p.Q191*)	c.571+2dup/c.571+2dup (?/?)	c.1384C>T/c.1384C>T (p.Q462*/p.Q462*)
Treatments	IVIg, anti-CD20 (2x), Corticosteroid	Sirolimus and corticosteroid	Cyclophosphamide, MMF, rituximab, Corticoide, hydroxychloroquine	Cyclophosphamide, MMF, rituximab, Corticoide, hydroxychloroquine	Cyclophosphamide, MMF, rituximab, Corticoide, hydroxychloroquine	MMF, Corticoide, hydroxychloroquine	IVIg, Hydroxychloroquine, cotrimoxazole	Corticosteroid	Sirolimus	methylprednisolone, hydroxychloroquine, azathioprine and after Rituximab. Cessation of rituximab for p11/p12, improvement with ofatumumab	Sirolimus, anti-CD20 (rituximab); prophylaxis: IVIG	MMF, anti-CD20 (rituximab); prophylaxis: IVIG	antimicrobial treatment, ceftriaxone; corticosteroid s; prophylaxis: amoxicillin, IVIG	P16: rifampicin; corticosteroid s; P17: rifampicin; corticosteroid s; prophylaxis: IVIG

Outcome	Disease controlled	Excellent clinical response to therapy	Treating severe SLE manifestations	Died at age of 13 years	Clinical and laboratory remission	Clinical and laboratory remission	P7: No improvement / P8: Died at 10 years due to heart failure	Excellent clinical response to therapy	anaphylaxis for P1, successful for all after switch for ofatumumab for P10 and P11	n.d	n.d	Free from mycobacterial and other infectious diseases but SLE and the high levels of ANA persist.	Good response
---------	--------------------	--	------------------------------------	-------------------------	-----------------------------------	-----------------------------------	--	--	--	-----	-----	---	---------------

+: present, -: absence, nd: No data. ↑: increased, ↓: decreased

Tableau 5 : Caractérisations cliniques et biologiques des patients présentant des mutations bialleliques de PRKCD. (Adapté de Salzer et al., 2016)

4.2/ La protéine PKC- δ

Les PKC constituent une famille ubiquitaire de sérine/thréonine kinases qui sont essentielles à de nombreuses fonctions cellulaires, tels que l'apoptose, la prolifération, la survie, la différenciation cellulaire, etc. Ces protéines appartiennent au grand groupe des kinases AGC retrouvé dans le règne eucaryote. Depuis leur découverte à la fin des années 70, les PKC ont suscité un énorme intérêt scientifique se rapportant à plusieurs domaines d'études. Même si les données actuelles permettent une meilleure compréhension de leurs fonctions, l'implication spécifique de chaque isoforme dans les processus physiologiques est encore mal comprise.

4.2.1/ Classification et structure de la famille PKC

La famille des PKC comprend 9 isoformes divisée en trois grandes classes : les PKC conventionnelles (cPKC) composés de α , β et γ , les nouvelles PKC (nPKC) avec η , ϵ , δ et θ et les PKC atypiques (aPKC) regroupant ζ et ι . Toutes les isoformes partagent une organisation similaire avec une région catalytique en C-terminale et une région régulatrice en N-terminale (Figure 27) (Newton et al., 2018).

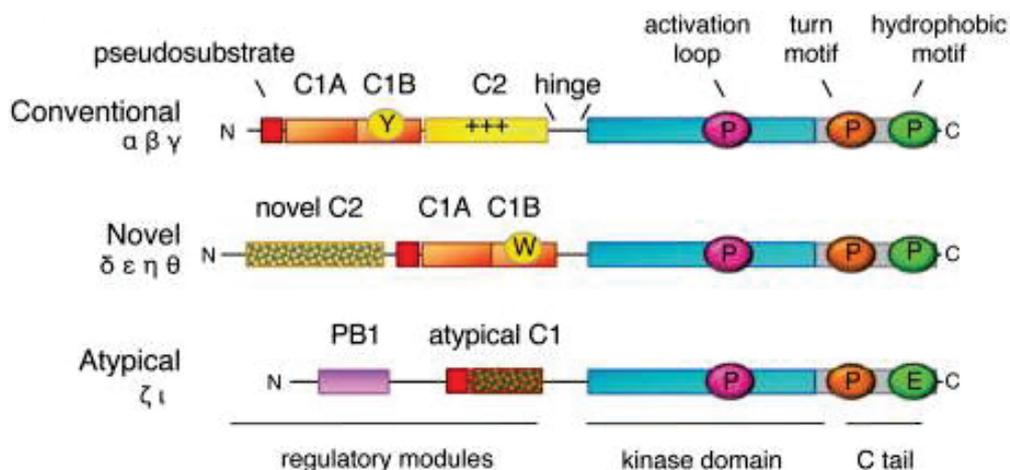


Figure 27 : Représentation schématique de la structure des protéines de la famille PKC

Les lettres Y/W dans les cercles jaunes représentent le résidu impliqué dans la reconnaissance du DAG. Les lettres P représentent le site de phosphorylation de la boucle d'activation dans les cercles roses, dans le "turn" motif dans les cercles oranges et dans le motif hydrophobe dans les cercles verts (les aPKC ont un acide glutamique (G) à cette position dans le motif hydrophobe). (Newton et al., 2016)

Famille de PKC	Second messagers	
	Ca ²⁺	DAG
Conventionnelle (cPKC) : α , β et γ	+	+
Nouvelle (nPKC) : η , ϵ , δ et θ	-	++
Atypique (aPKC) : ζ et ι	-	-

Tableau 6 : Activation des PKC

Cette dernière est composée d'un domaine C1, présent dans toutes les isoformes de PKC. Le domaine C1 offre un site de liaison pour le DAG. Néanmoins, il a perdu sa capacité de liaison à ces ligands chez les PKC atypiques. Le domaine C1 est divisé en deux chez les isoformes cPKC et nPKC avec C1A et C1B. Le domaine C1B des nPKC a une affinité plus élevée pour le DAG que celui des cPKC, permettant aux nPKC de répondre suite à l'élévation de DAG tandis que les cPKC ont besoin également de reconnaître le Ca²⁺ (Tableau 6). Cette différence d'affinité est due à la modification d'un acide aminé dans le domaine C1B. Lorsqu'il s'agit d'une tyrosine comme chez les cPKC, l'affinité pour le DAG est plus faible tandis que le tryptophane à cet endroit, retrouvé chez les nPKC, augmente la fixation au DAG. Le domaine C2 est sensible au Ca²⁺ des cPKC et permet le recrutement de la protéine à la membrane d'une part via la formation d'un pont entre le Ca²⁺ des cPKC et certains phospholipides de la membrane et d'autre part par le PIP₂. Chez les nPKC, le domaine C2 ne peut pas se lier au Ca²⁺ dû à l'absence de certains résidus acides. Néanmoins, ce domaine permet le recrutement de protéines avec un domaine SH2 reconnaissant les tyrosines phosphorylées des nPKC. Le pseudo-substrat, quant à lui, est une courte séquence d'acides aminés présente dans les trois sous-familles des PKC en mesure d'imiter le motif de reconnaissance du substrat et donc de bloquer l'accès au domaine catalytique. Lorsque les PKC sont transférés à la membrane après leur activation, le pseudo-substrat est relâché, permettant à l'enzyme de se lier à son substrat. Les aPKC sont insensibles aux DAG et Ca²⁺ mais le domaine PB1 (*Phox and Bem 1 domain*) assure la liaison avec des protéines partenaires. En ce qui concerne le domaine catalytique, il est très conservé entre tous les membres de la famille des PKC et partage une forte homologie avec d'autres sérine/thréonine kinases. Enfin, les PKC possèdent une queue C-terminale impliquée dans la régulation de l'activité des PKC en facilitant la liaison à l'adénosine triphosphate (ATP), favorisant la liaison à certains substrats et structurant la protéine pour permettre son activité enzymatique selon sa conformation.

Pour être sous forme active, les PKC doivent dans un premier temps être phosphorylés sur trois sites : la boucle d'activation située dans le domaine kinase, le motif hydrophobe et "turn" dans la queue C-terminale. La phosphorylation de ces sites permet à la protéine de se lier au Ca²⁺ et DAG mais induit aussi une conformation inhibitrice du domaine kinase pour empêcher l'activation

basale de la protéine en l'absence des seconds messagers. La reconnaissance de ces derniers conduit à la libération du pseudosubstrat et à l'activation des PKC ; qui peuvent alors phosphoryler leurs protéines cibles. Les PKC retournent dans une conformation auto-inhibitrice en l'absence de seconds messagers. La déphosphorylation des PKC rend la protéine sensible à sa dégradation par le protéasome.

4.2.2/ Fonction générale de PKC- δ

L'isoforme PKC- δ est exprimée de façon ubiquitaire et a été reliée à de multiples fonctions selon le type cellulaire. En premier lieu, la protéine est associée à la régulation de la prolifération. D'une part, PKC- δ promeut la prolifération notamment dans des cellules cancéreuses de type mammaires métastatiques ou des cellules souches cancéreuses en partie par la voie MAPK (Grossoni et al., 2007 ; Chen et al., 2014). A l'inverse, il a été démontré que PKC- δ inhibe la croissance dans de nombreux types de cellules, y compris les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules gliales et les cellules musculaires lisses des voies aériennes. Dans ce cas de figure, la protéine jouerait sur l'expression des facteurs qui influent sur la progression du cycle cellulaire (Kronfeld et al., 2000 ; Steinberg et al., 2004 ; Liu et al., 2007). En deuxième lieu, PKC- δ exerce une fonction pro-apoptotique. La protéine est notamment activée par une variété de stimuli conduisant à l'apoptose comme les rayons UV, le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), TNF- α , FAS-L et les ROS (Zhao et al., 2012). Un défaut de PKC- δ conduit à une résistance à l'apoptose selon les stimuli notamment dans les fibroblastes embryonnaires, les cellules épithéliales salivaires, les cellules musculaires lisses, etc. Dans certains modèles, PKC- δ est clivé notamment par la caspase 3 ce qui libère le domaine kinase du pseudosubstrat et permet à la protéine d'être constitutivement active. La forme clivée de PKC- δ est majoritairement localisée dans le noyau où elle cible plusieurs protéines nucléaires ayant des fonctions dans l'apoptose comme : p53 coordonnant le cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose, DNA-PK (*DNA dependent protein kinase*) dont la fonction de réparation de l'ADNdb est inhibée suite à sa phosphorylation, Rad9 impliqué dans l'arrêt du cycle nucléaire, etc. De manière intéressante, la surexpression du fragment catalytique seule est suffisante pour induire l'apoptose dans certains modèles. Néanmoins, le clivage de PKC- δ n'est pas obligatoire pour mener à l'apoptose. La voie extrinsèque et intrinsèque dépendante de la mitochondrie peuvent également être induites par PKC- δ et induire l'apoptose. A l'opposé, PKC- δ exerce aussi un rôle anti-apoptotique dans certains cas. Par conséquent, le rôle de PKC- δ dans l'apoptose semble dépendre du stimulus et du type de cellule. Enfin, PKC- δ est impliqué dans des processus de différenciation notamment chez les kératinocytes et de migration après l'induction d'un stress chez les cellules musculaires lisses (Steinberg et al., 2004).

4.2.3/ Rôle de PKC- δ dans le système immunitaire

La plupart des membres de la famille PKC est retrouvée dans les cellules immunitaires, mais leur expression diffère d'un isotype à l'autre et souligne la spécificité de chaque isoforme. L'expression spécifique des isoformes PKC dans les cellules immunitaires et le phénotype des souris KO correspondantes sont présentés dans le tableau 7.

PKC	Expression dans les tissus	Phénotype des souris KO
PKC α	Ubiquitaire, LT, pDC	Activation des LT et immunodéficite T
PKC β	Ubiquitaire, LB et mastocytes	Défaut de survie et de signalisation des LB, défaut des mastocytes
PKC δ	Ubiquitaire, LB, mastocytes et macrophages	Défaut de l'homéostasie des LB
PKC ϵ	Ubiquitaire	Défaut d'activation des macrophages
PKC η	Ubiquitaire, LT et macrophages	Défaut dans l'homéostasie des LT et défaut des LTreg
PKC θ	LT, mastocytes, plaquettes, cellules musculaires	Défaut d'activation des LT
PKC ζ	Ubiquitaire	Défaut de signalisation du BCR, défaut dans la réponse des LTh2
PKC λ/ι	Ubiquitaire	Létal au stade embryonnaire

Tableau 7 : Expression des isoformes de la famille PKC et phénotype des souris KO correspondantes

PKC γ n'est pas indiqué car cette isoforme s'exprime principalement dans le cerveau. (Lim et al., 2015)

a- Dans les cellules de l'immunité innée

Dans le chapitre 2.3, nous avons vu que l'IFN-I joue un rôle majeur dans la physiopathologie du lupus. Une étude a notamment établi un lien entre PKC- δ et les voies de signalisation de l'IFN-I. La stimulation par l'IFN α/β conduit à l'activation de PKC- δ , qui phosphoryle la sérine en position 727 de la protéine STAT1 et favorise son activation dans des lignées cellulaires (Uddin et al., 2002). De ce fait, PKC- δ serait impliqué dans la transduction du signal sous les récepteurs IFNAR et participerait à la synthèse des ISG. Ce résultat est à l'opposé de ce qu'on aurait pu attendre dans le cadre de la recherche d'un lien entre le déficit en PKC- δ et le LES. Ainsi, un déficit en PKC- δ pourrait même réduire l'inflammation causée par l'IFN-I.

Plusieurs études ont également mis en avant que PKC- δ est impliqué dans certaines fonctions des neutrophiles. Un déficit en PKC- δ permet de réduire les lésions de reperfusion dans les accidents vasculaires cérébraux causées notamment par l'afflux de neutrophiles dans les tissus cérébraux chez la souris (Chou et al., 2004). Les neutrophiles avec un défaut de PKC- δ présentent une réduction dans leur capacité à adhérer à l'épithélium de la zone inflammatoire, à migrer dans les tissus cérébraux ischémiés, à dégranuler et à produire des ROS. Un défaut similaire des neutrophiles a été retrouvé dans un modèle de sepsis induit chez le rat où un déficit de PKC- δ réduit l'inflammation dans les tissus pulmonaires (Mondrinos et al., 2014). La stimulation des neutrophiles par l'IL1- β et fMLP (*Formyl peptide receptor 1*), conduisant à l'expression de molécules d'adhésion comme ICAM1 et VCAM et à la production de ROS, est réduite en absence de PKC- δ . Cela pourrait lier notamment à la baisse de l'induction de la voie NF- κ B. De plus, les neutrophiles de patients avec un déficit en PKC- δ présentent également un défaut de certaines fonctions comme la NETose et la production de ROS, qui pourrait être expliqué par la réduction de l'activité du complexe NADPH. Ce défaut a été également observé dans d'autres cellules myéloïdes et pourrait être l'une des causes de la sensibilité aux infections de certains patients (Neehus et al., 2021).

PKC- δ a été également étudié pour son rôle dans les macrophages. La protéine stimule les fonctions effectrices des macrophages suite à une infection chez les souris par *Listeria monocytogenes*, *Leishmania major*, *Candida albicans* ou de *Mycobacterium tuberculosis* (Schwegmann et al., 2007 ; Duan et al., 2018). Chez l'Homme, on retrouve une augmentation de l'expression de PKC- δ chez des patients atteints de tuberculose (Schwegmann et al., 2007). Ces études montrent que PKC- δ favorise la production de composés effecteurs des macrophages comme les ROS, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et l'oxyde nitrique (NO) des macrophages. Néanmoins, plusieurs questions demeurent sur le rôle exacte de PKC- δ dans les macrophages et plusieurs hypothèses ont été suggérées. Duan et al. proposent que PKC- δ favoriserait la production de cytokines pro-inflammatoires chez les macrophages lors d'une infection à la tuberculose chez la souris alors que Parihar.al montrent qu'un déficit en PKC- δ réduirait les fonctions effectrices des macrophages dans le modèle murin *Prkcd* $-/-$ (Parihar et al., 2018 ; Duan et al., 2018).

PKC- δ régulerait aussi la dégranulation des mastocytes; un défaut de PKC- δ chez des mastocytes dérivés de la MO de souris entraîne notamment une augmentation de la dégranulation des mastocytes. Deux études proposent des mécanismes différents sur lesquels PKC- δ jouerait pour influencer ce processus. D'une part, la phosphorylation de PKC- δ par Lyn favoriserait son interaction avec SHIP pour réguler son activation et conduirait à l'inhibition de la dégranulation (Leitges et al., 2002). D'autre part, Madera-Salcedo et al. ont montré que PKC- δ régulerait l'activité de la protéine Tomosyn-1 qui inhibe la dégranulation des mastocytes (Madera-Salcedo et al., 2018)

Finalement, PKC- δ jouerait aussi un rôle dans les cellules NK. Un patient avec un déficit en PKC- δ a une diminution du pourcentage de NK parmi les PBMC. De manière intéressante, ce patient présente une réduction de l'activité cytotoxique des NK qui pourrait en partie expliquer le maintien de l'EBV (*Epstein-Barr virus*) chez ce patient. Un autre patient avec un défaut d'expression de PKC- δ a également une diminution de la cytotoxicité des NK. Toutefois, aucune autre étude, à l'heure actuelle, n'a étudié le rôle de PKC- δ dans les cellules NK notamment dans des modèles murins (Kuehn et al., 2013 ; Kiykim et al., 2015).

En résumé, PKC- δ est impliqué dans la régulation de nombreuses cellules de l'immunité innée. Toutefois, ces travaux ne suggèrent pas d'association entre PKC- δ et le LES.

b- Dans les LT

Les LT ont un rôle central dans le lupus. La présence de lymphocytes T auto-réactifs dans le LES a été rapportée à plusieurs reprises. De plus, on retrouve généralement chez les patients lupiques un phénotype activée des LT CD4+ et CD8+, avec notamment une élévation du flux calcique. Il a également été montré que dans le cadre du lupus, les LT produisent moins d'IL-2. Cette cytokine promeut la survie des LTreg et inhibe la différenciation en LTh17. De manière intéressante, plusieurs études suggèrent un lien entre PKC- δ et les LT qui pourrait notamment participer à la pathogénèse du LES.

En premier lieu, une diminution de l'expression de PKC- δ a été retrouvée dans les LT de patients avec un LES idiopathique ou induit par l'hydralazine (Gorelik et al., 2007). Un déficit en PKC- δ conduit à une baisse la phosphorylation de ERK de la voie des MAPK ce qui mène notamment à une baisse de l'expression de la DNA méthyltransférase (DNMT) et en conséquence une hypométhylation de l'ADN. De ce fait, des gènes comme CD70, molécule co-stimulatrice des LB via sa liaison au CD27 retrouvée sur les LB mémoires, sont davantage exprimés. Ainsi, la diminution de PKC- δ est associée à des modifications épigénétiques qui favorisent l'expression de gènes retrouvés dans les LT des patients atteints de LES. Néanmoins, le mécanisme précis par lequel un défaut de PKC- δ conduit à la baisse de ERK et de la méthylation de l'ADN n'est pas encore bien compris. De plus, l'effet de ce déficit dans les LT sur la pathogénèse du lupus n'est lui aussi pas encore établi.

Par ailleurs, un rôle pro-apoptotique de PKC- δ a été décrit dans les LT. Les thymocytes provenant de souris *Prkcd* $-/-$ sont moins sensibles à l'apoptose induites par FasL, le dexaméthasone, le phorbol 12,13-dibutyrate ou PDBu (un phorbol ester activateur de PKC), la staurosporine induisant l'apoptose via la caspase 3, ou l'etoposide (Lutz-Nicoladoni et al., 2005). Etant donné que la majorité des cellules du thymus sont CD4+CD8+, stade de sélection positive des LT, ce résultat suggère qu'un déficit en PKC- δ pourrait altérer ce processus. En outre, PKC- δ agirait également sur l'apoptose des LT matures. L'induction de l'apoptose par privation de

cytokine sur une lignée de cellules T humaines conduit à l'augmentation de la forme tronquée de PKC- δ dans le noyau (Scheel-Toellner et al., 1999). Quant au rôle de PKC- δ dans la prolifération des LT, plusieurs études décrivent une réponse différente selon les stimuli. D'un côté, Gruber et al. montrent une augmentation de la prolifération de LT déficients en PKC- δ de souris *in vitro* par stimulation allogénique du CMH comparés aux LT contrôle tandis que les capacités prolifératives des LT de souris *Prkcd* $-/-$ sont normales suite à la stimulation par CD3/CD28 et PBDu/ionomycine (Miyamoto et al., 2002 ; Gruber et al., 2005). Chez l'Homme, aucune différence de prolifération des LT n'a été observée entre un patient avec un déficit en PKC- δ et les témoins (Kuehn et al., 2013).

Enfin, PKC- δ régule l'exocytose des granules cytotoxiques des LTCD8+. Une étude a montré que l'engagement du TCR (*T cell receptor*) de LTCD8+ provenant de souris *Prkcd* $-/-$ réduit considérablement la libération des granules cytotoxiques (Ma et al., 2007). Le défaut de PKC- δ aurait un impact sur l'exocytose de ces granules alors que l'expression des molécules cytolytiques, l'activation et la production de cytokines seraient normales.

c-Dans les LB

En 2002, deux équipes publient simultanément leurs travaux sur les souris *Prkcd* $-/-$ générés sur fond C57BL/6. Ils observent que les souris développent un phénotype auto-immun avec la présence d'auto-anticorps dont des AAN, une augmentation des IgG dans le sérum, une splénomégalie, une adénopathie, une glomérulonéphrite associée à la déposition de complexes immuns et une infiltration lymphocytaire dans de nombreux organes (Miyamoto et al., 2002 ; Mecklenbräuker et al., 2002). Malgré ce phénotype, les animaux sont viables jusqu'à l'âge de 12 mois. Ce phénotype a notamment été associé à une hyperprolifération des LB par Miyamoto et al. On retrouve notamment une expansion des LB dans la rate et les ganglions avec une augmentation du nombre de centres germinatifs dans les OLS. L'hyperprolifération des LB est notamment B autonome puisque le transfert de LB *Prkcd* $+/+$ et *Prkcd* $-/-$ dans des souris *Rag1* $-/-$ montre une meilleure capacité d'expansion de la part des LB avec un déficit en PKC- δ comparé aux LB contrôles. Les LB dans ce modèle ont également été stimulés *in vitro* et montrent une réponse proliférative améliorée suite à une stimulation IgM/CD40 ou par le LPS. Ainsi, PKC- δ apparaît comme un régulateur négatif critique important dans la prolifération des LB. Cette étude propose que l'amélioration des capacités prolifératives des LB déficients en PKC- δ soit médiée par l'augmentation de la production d'IL-6 dans ces cellules. Etant donné que la transcription du gène codant pour l'IL-6 est régulée principalement par les facteurs de transcription NF- κ B et NF-IL6, leur capacité de liaison à l'ADN a été mesurée par EMSA (*Electrophoretic mobility-shift assay*) et a montré que NF-IL6 interagissait davantage à son site de reconnaissance à l'ADN chez les LB *Prkcd* $-/-$. Cette étude suggère notamment que la phosphorylation de la sérine 240 par PKC- δ

réduirait l'activité de liaison à l'ADN de NF-IL6. De manière intéressante, l'augmentation d'IL-6 dans le sérum est retrouvée chez les patients avec un LES et la perte d'expression d'IL-6 réduit le phénotype auto-immun des souris lupiques *Was*^{-/-} (Arkatkar et al., 2017). Néanmoins, Mecklenbräuker et al. ont montré qu'il n'y avait pas de différence de production d'IL-6 entre les LB *Prkcd*^{+/+} et *Prkcd*^{-/-} lors d'une stimulation des cellules par le LPS (Mecklenbräuker et al., 2004). Par conséquent, ces résultats contradictoires indiquent que le rôle de l'IL-6 dans la pathogénèse du phénotype auto-immun n'est pas encore bien compris chez les souris avec un déficit en PKC- δ .

Un rôle de PKC- δ dans la signalisation sous-jacente au BAFF-R a également été décrit. Comme vu dans le chapitre 3.1.2.c, la reconnaissance du ligand par le récepteur BAFF-R induit un signal de survie aux LB. Mecklenbräuker et al. ont montré que BAFF favorisait la présence de PKC- δ dans le cytoplasme plutôt que dans le noyau ce qui inhiberait l'apoptose des cellules ; la présence de PKC- δ dans le noyau étant associée à l'induction du programme de mort cellulaire (Figure 28.A) (Mecklenbräuker et al., 2004). En conséquence, les LB avec un défaut de PKC- δ seraient indépendants de l'effet anti-apoptotique de BAFF, à défaut d'exprimer la protéine. Cela pourrait expliquer l'augmentation de la survie des LB *Prkcd*^{-/-}. Toutefois, il n'est pas clair si cet effet reflète un impact direct du BAFF sur PKC- δ étant donné que les LB de souris *Prkcd*^{-/-} restent répondeuses au BAFF (Figure 28.B).

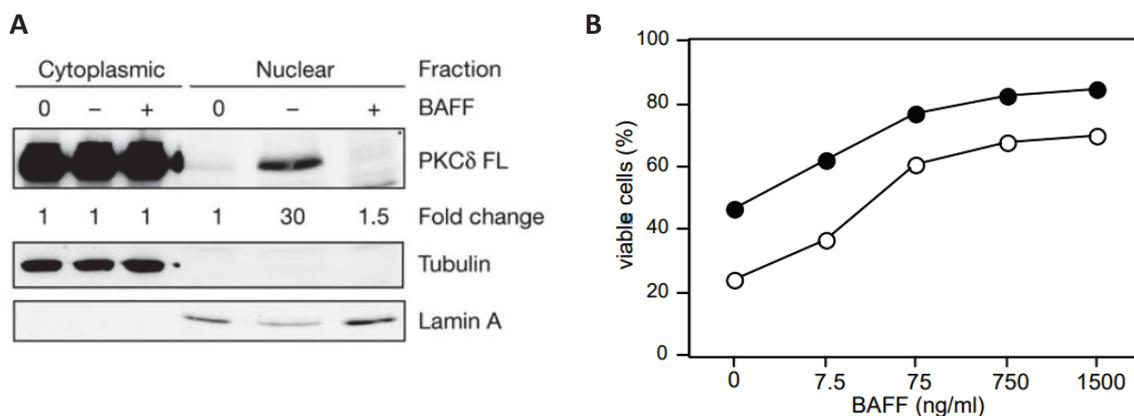


Figure 28 : Effet du BAFF sur les LB *Prkcd*^{-/-}

A/ Mesure de l'expression de PKC- δ dans le cytoplasme ou le noyau provenant de LB purifiés à partir de rate de souris après 24h de co-culture sans ou avec du BAFF. B/ Les LB triées de souris *Prkcd*^{+/+} (cercles ouverts) et de *Prkcd*^{-/-} (cercles fermés) ont été incubées pendant 24 heures dans du milieu puis différentes quantités de BAFF ont été ajoutées dans le milieu. La fréquence des cellules viables a été analysée suite aux marquages des cellules avec l'annexine V en combinaison avec le 7-aminoactinomycine D (7-AAD). (Mecklenbräuker et al., 2004)

D'autres études ont rapporté que PKC- δ était associé aux différents mécanismes de tolérance de LB : l'anergie et la délétion clonale. Le rôle de PKC- δ dans l'anergie a été étudié dans le modèle IgHEL:sHEL (MD4xMD5) vu dans le chapitre 3.2.2. Les LB *Prkcd*^{-/-} dans ce modèle présentent une résistance à l'anergie caractérisée par la production d'autoanticorps contre la protéine HEL et le maintien d'une réponse au BCR dont l'induction de la voie NF- κ B (Mecklenbräuer et al., 2002). L'activation de cette voie de signalisation est normalement réduite dans les LB anergiques. Néanmoins, le mécanisme expliquant la non-induction de l'anergie en l'absence de PKC- δ demeure inconnu.

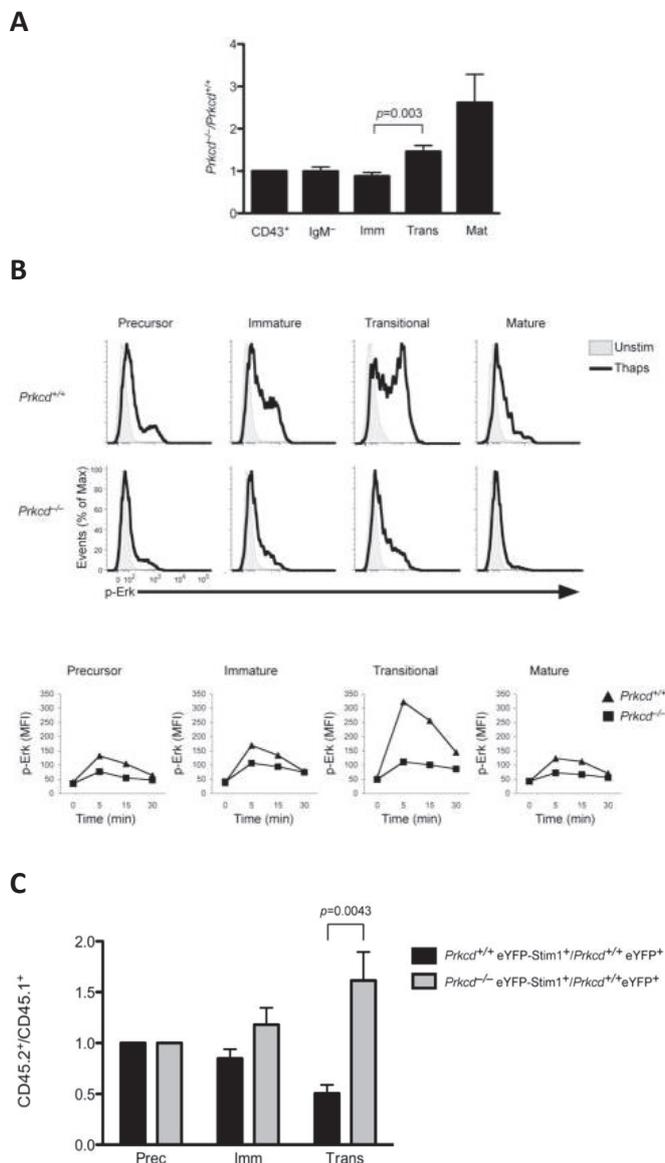


Figure 29 : Les LB avec un déficit en PKC- δ ont une réduction de p-Erk et sont résistantes à l'apoptose médié par une augmentation du flux calcique causée par la surexpression de Stim1

A/ Ratio de cellules *Prkcd*^{-/-} et *Prkcd*^{+/+} aux différents stades de développement des LB dans des souris WT ayant été irradiées et dont le système immunitaire a été reconstitué à partir de cellules de MO de souris *Prkcd*^{-/-} et *Prkcd*^{+/+} dans un rapport 1:1. B/ Mesure de la phosphorylation de Erk dans les cellules de MO à différents stades de développement des LB provenant de souris *Prkcd*^{-/-} et *Prkcd*^{+/+}. C/ Des CSH CD45.1^{+/+} ont été infectés par des rétrovirus porteurs d'eYFP et mélangés avec un rapport 1:1 avec des CSH CD45.2^{+/+} infectés par eYFP-Stim1 provenant de souris WT ou *Prkcd*^{-/-}. Les cellules ont été injectées dans des hôtes CD45.1^{+/+} CD45.2^{+/+} irradiés. Le rétrovirus eYFP Stim1 conduit à une surexpression de Stim1 qui, par l'induction d'un flux calcique, favorise l'apoptose des cellules. Les LB avec un défaut de de PKC- δ sont résistantes à l'apoptose induite par ce processus. (Mecklenbräuer et al., 2004)

D'autres travaux ont été réalisés concernant le rôle de PKC- δ dans la délétion clonale des LB. Limnander et al. ont montré que l'induction d'un flux calcique, notamment par la stimulation du BCR, augmente l'apoptose par l'activation de la kinase ERK dans une lignée cellulaire B (DT40) et dans les LB de souris ; notamment au stade immature et transitionnel au cours desquels les LB auto-réactifs sont notamment éliminées par apoptose (Limnander et al., 2011 ; Limnander et al., 2014). Ils ont alors montré que PKC- δ est nécessaire pour l'activation de ERK dépendante du Ca²⁺ dans les LB et favorise la sélection négative (Figure 29). Il suggère alors qu'un déficit en PKC- δ altérerait la délétion clonale dans la MO et dans la rate aux stades transitionnels. Cela pourrait conduire à une rupture de la tolérance B ; néanmoins plusieurs questions restent en suspens :

- Comment l'induction du flux calcique conduit à l'activation de PKC- δ , appartenant à la famille des nPKC ne répondant pas au Ca²⁺ ?
- Est-ce que l'activation de ERK par PKC- δ est suffisante pour induire l'apoptose lors de la délétion clonale ?
- Est-ce que le défaut de PKC- δ à cette étape est suffisant pour conduire à une rupture de tolérance ?
- Retrouve-t-on une augmentation de ERK dans les LB immatures ou transitionnels des patients avec un déficit en PKC- δ ?

Par ailleurs, le déficit en PKC- δ est associé à une résistance à l'apoptose sur l'ensemble des LB et non à un stade spécifique que ce soit dans les LB chez les souris *Prkcd* ^{-/-} ou chez les patients avec un déficit en PKC- δ (Mecklenbräuker et al., 2004 ; Limnander et al., 2011 ; Limnander et al., 2014 ; Kuehn et al., 2013 ; Belot et al., 2013). Cela peut donc jouer également sur d'autres étapes où l'induction de la mort cellulaire des LB est primordiale pour le maintien de la tolérance. Des travaux ont notamment été publiés il y a peu concernant le rôle pro-apoptotique de PKC- δ dans les centres germinatifs. Ou et al. ont montré que PKC- δ permettait d'induire l'apoptose des LB anti-ADNdb des centres germinatifs suite à l'activation de la protéine SMS2 (Ou et al., 2021). Plus précisément, SMS2 (Sphingomyelin synthase 2) interagit avec PKC- δ pour faciliter sa translocation nucléaire après son activation par le DAG dans les cellules autoréactives de la zone claire des centres germinatifs où a lieu la sélection négative des cellules B médiée par les FDC.

En résumé, un déficit en PKC- δ est associé au développement d'un phénotype auto-immun chez la souris ce qui renforce l'idée qu'un défaut de PKC- δ chez les patients est à l'origine de la pathogenèse de la maladie. PKC- δ intervient dans un grand nombre de processus. Il est donc difficile de déterminer quels changements dans ces processus mènent au lupus lors d'un défaut de PKC- δ . Néanmoins, les dérégulations observées des LT et principalement des LB semblent être

les plus susceptibles d'être lié à la rupture de tolérance. Pour autant, de nombreuses questions restent en suspens. Mon projet de thèse avait pour but d'essayer de répondre à certaines d'entre elles. Les objectifs et hypothèses de ce projet seront détaillés par la suite dans le manuscrit.

5– MUTATIONS DANS LES GÈNES *IKZF1* et *LYN*: Une cause digénique de lupus?

Comme vu dans le chapitre 2.1, environ 25% des patients atteints LES à début pédiatrique serait porteur d'un variant rare et prédit pathogénique en étudiant un panel de gènes de lupus (Belot et al., 2020). La majorité d'entre eux ont un seul variant causal. Toutefois, un peu moins de 5% des sujets avec lupus à début précoce aurait deux mutations qui seraient associées au LES (Figure 30). Il est difficile de déterminer si c'est l'effet combiné des deux variants ou un seul de ces variants qui est réellement impliqué dans la pathogénèse du lupus. Nous avons été confronté à ce questionnement lors de la découverte de mutations identifiées dans une famille atteint de LES : une mutation hétérozygote dans le gène *IKZF1*, dont des mutations ont déjà associées à des LES monogéniques ou des déficits immunitaires communs variables, et un variant hétérozygote dans le gène *LYN*, dont plusieurs polymorphismes ont été retrouvés enrichis chez les patients avec un LES. Dans ce chapitre, une revue de la littérature sera réalisée à propos de la protéine IKAROS et les connaissances actuelles sur lien entre IKAROS et le LES. Enfin, la même présentation sera réalisée à propos de la protéine LYN.

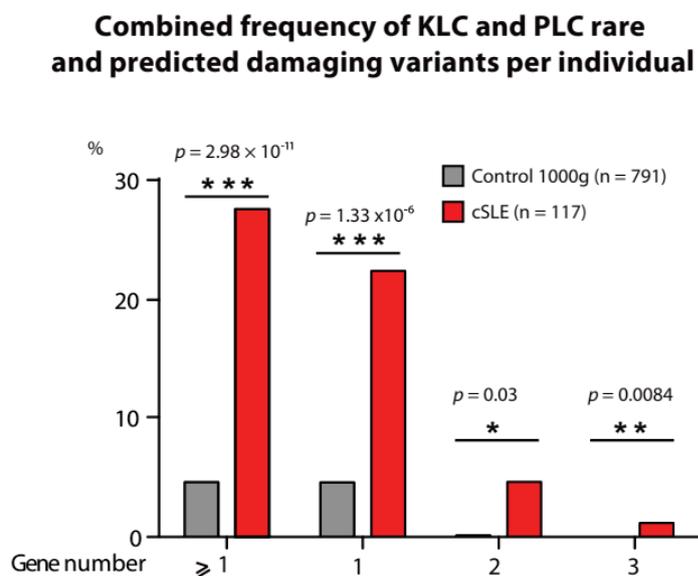


Figure 30 : Variants rares prédits pathogéniques dans une cohorte de patients avec un LES à début pédiatrique

Fréquence dans la population contrôle (base de données 1000 génomes) et dans une cohorte de patients avec un LES à début pédiatrique (cSLE) parmi lesquels un ou plusieurs variants rares et prédit dommageable ont été identifiés. KLC: Known Lupus Causing, PLC: Putative Lupus Causing. (Belot et al., 2020)

5.1/ Le facteur de transcription IKAROS

5.1.1/ Structure et expression d'IKAROS

IKZF1 (*Ikaros Zinc Finger Protein 1*), codant pour IKAROS, est un facteur de transcription à doigt de zinc essentiel au développement, à l'homéostasie et au fonctionnement des cellules immunitaires (John et al., 2011 ; Boast et al., 2021). Il régule les programmes transcriptionnels de nombreuses cellules grâce à six domaines à doigt de zinc (ZF) de type C2H2 hautement conservés; les quatre premiers en N-terminal sont essentiels pour réguler la transcription des gènes par la liaison de l'ADN, et les deux derniers au C-terminal facilitent la formation multimère de type homodimère et hétérodimère avec d'autres membres de la famille : HELIOS (*IKZF2*), AIOLOS (*IKZF3*), EOS (*IKZF4*), et PEGASUS (*IKZF5*). Un autre degré de complexité s'ajoute avec la présence de plusieurs isoformes d'IKAROS chez l'Homme et la souris, tous produits de l'épissage alternatif (Figure 31). Les exons 4-7 sont alternativement épissés, générant des isoformes d'IKAROS avec des capacités de liaison d'ADN différentes. Les isoformes sans ou avec uniquement un doigt de zinc impliqués dans la liaison à l'ADN, induisent un effet négatif dominant.

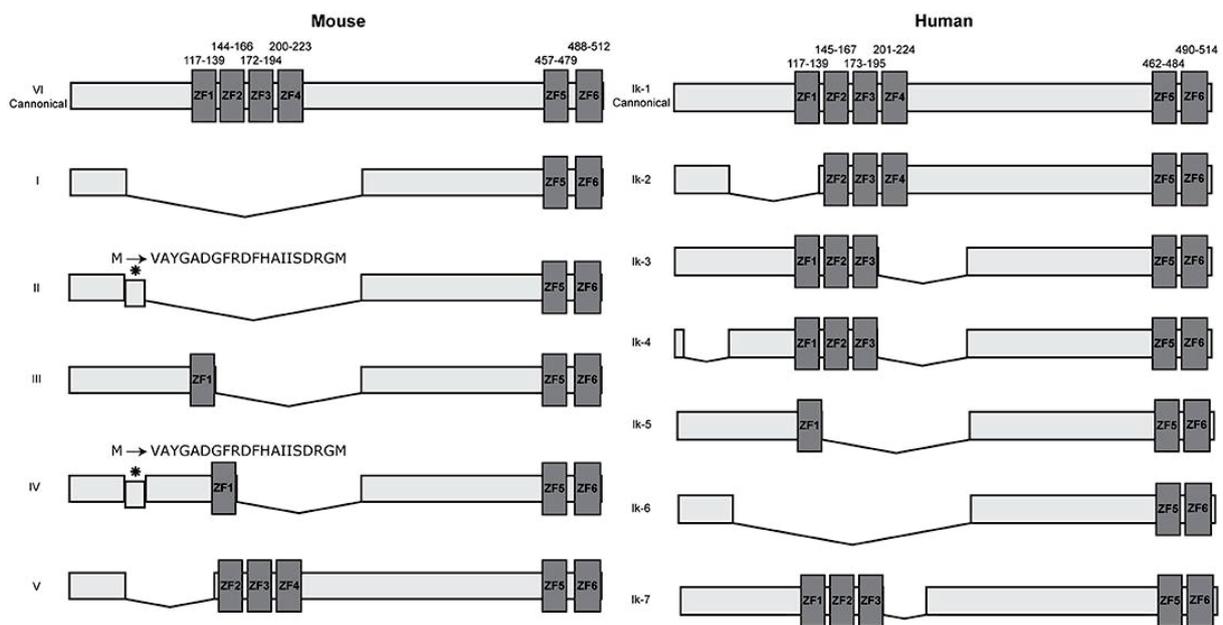


Figure 31 : Les différentes isoformes d'IKAROS entre l'Homme et la souris

Toutes les isoformes ont le domaine de dimérisation en C-terminal composé de ZF5 et ZF6. Chez la souris, seulement deux des six isoformes contiennent un domaine de liaison de l'ADN avec au moins trois doigts de zinc en N-terminal alors que chez l'Homme, on en retrouve environ la moitié des isoformes. Cela suggère une différence dans le fonctionnement de la régulation et de l'activité d'IKAROS entre l'Homme et la souris. (Boast et al., 2021)

Plus de six isoformes ont été découvertes chez la souris et l'Homme, avec de légères différences entre les isoformes murines et humaines. Ces isoformes peuvent interagir les unes avec les autres dans différentes configurations, soit en tant qu'homo- ou hétéro-dimères, dont le résultat produit différentes activités transcriptionnelles.

IKAROS est capable de réguler l'expression des gènes par liaison directe et activation des régions promotrices, mais régule aussi négativement la transcription. IKAROS utilise différents mécanismes pour réprimer l'expression de gènes comme la modification de la chromatine, le recrutement de corépresseurs et la compétition avec d'autres facteurs de transcription. Premièrement, IKAROS se lie aux régions répétées retrouvées dans l'hétérochromatine péricentromérique et interagit avec des complexes protéiques réprimant l'expression de gènes (ex : le complexe Mi2/NurD, Sin3..). IKAROS contribuerait ainsi à la répression transcriptionnelle en recrutant des complexes modificateurs de la chromatine au niveau de gènes cibles. Deuxièmement, IKAROS peut recruter des corépresseurs de type CTBP (*C terminal binding protein*), CTIP (*ctbp-interacting protein*) et RB (*retinoblastoma protein*) qui interagissent avec les composants principaux de la machinerie transcriptionnelle et favorisent la répression des gènes. Enfin, IKAROS est en concurrence avec des facteurs de transcription favorisant l'expression de gènes et peut ainsi les empêcher de promouvoir leurs transcriptions.

5.1.2/ Rôle dans les lymphocytes B

Les études chez l'Homme et les nombreux modèles développés chez la souris ont facilité la compréhension sur la fonction d'IKAROS. D'une part, la diminution de l'expression ou de la fonction de la protéine IKAROS entraîne d'importants défauts lors de la différenciation lymphocytaire et myéloïde. D'autre part, un défaut d'IKAROS favorise la transformation leucémique des précurseurs des LT et LB.

L'importance d'IKAROS dans la différenciation lymphocytaire s'illustre notamment par l'absence de LT d'origine fœtal, de LB et de NK chez les souris *Ikzf1* ^{-/-}, où la suppression de l'exon 7 entraîne une perte des domaines de dimérisation (ZF5-ZF6) qui déstabilise la structure de la protéine et la rend non-fonctionnelle (Boast et al., 2021 ; Kuehn et al., 2021). Le modèle murin avec un effet dominant négatif (DN), causé par la perte des domaines de liaison à l'ADN ZF1-ZF2-ZF3, a montré des défauts lymphocytaires plus graves avec une absence complète de LT, de LB, de NK et des CLP. Ces souris *Ikzf1* DN/DN n'ont qu'un thymus très rudimentaire et aucun ganglion lymphatique, et meurent précocement en raison d'infections opportunistes et de septicémie. Le phénotype plus sévère observé dans le modèle dominant négatif homozygote met en avant l'importance des interactions possibles d'Ikaros avec d'autres membres de la famille dans le développement lymphocytaire ; notamment Aiolos qui intervient dans ce processus (Morgan et al., 1997).

Dans les LB, Ikaros joue un rôle crucial à plusieurs étapes de leur différenciation et dans leur fonction (Sellars et al., 2011 ; Kuehn et al., 2021). Très précocement, Ikaros est impliqué puisque les souris *Ikaros*^{-/-} n'ont pas de cellules pre-pro B ce qui conduit un arrêt complet de la lymphopoïèse B. Des travaux ont montré que cela pourrait être dû à un rôle d'Ikaros dans la promotion de l'expression *Flt3* (*FMS-like tyrosine kinase 3*) et/ou IL-7R dans les progéniteurs hématopoïétiques précoces. Ces deux protéines sont impliquées dans l'engagement des CLP vers la lignée B. En effet, on retrouve dans différents types de progéniteurs provenant des souris *Ikaros*^{-/-} une absence d'expression de l'ARNm *Flt3* (dans les cellules LSK (Lin-Sca1+c-kit+)) et un niveau réduit d'ARNm *Il7r* (dans les *lymphoid-primed multipotent progenitors* (LMPP)). Toutefois, l'expression rétrovirale d'IL-7R ou de *Flt3* indépendamment dans les cellules LSK *Ikaros*^{-/-}, ne conduit pas au développement des LB indiquant que l'expression des deux protéines est nécessaire ou qu'IKAROS joue aussi sur d'autres facteurs. Néanmoins, l'expression de EBF (*Early B-Cell Factor*) par expression rétrovirale est suffisante pour induire le développement des LB au stade pro-B. L'induction de EBF n'est toutefois pas suffisante pour induire la différenciation des pre-pro B jusqu'au stade pro-B et indique que Ikaros intervient indépendamment de EBF dans ces étapes. En effet, il a été montré qu'Ikaros intervient dans l'expression de *Rag1* et *Rag2* au stade pro-B pour promouvoir le réarrangement de la chaîne lourde. Ikaros contribue également à la condensation du locus *Igh*, une étape critique requise pour la recombinaison V(D)J. Le facteur de transcription Ikaros apparaît alors essentiel pour le développement des premiers progéniteurs des LB et à des stades ultérieurs pour la recombinaison V(D)J.

Dès lors que le LB exprime un pre-BCR ou un BCR, un défaut d'Ikaros conduit à une réduction du seuil d'activation des LB (Fan et al., 2016). Les LB de souris *Ikaros*^{L/L}, porteuse d'une mutation hypomorphique entraînant l'expression d'Ikaros à environ 10 % du niveau normal, prolifèrent davantage en réponse à de faibles concentrations d'anti-IgM comparés à des cellules contrôles. Néanmoins, le mécanisme sous-jacent à cette observation n'est pas encore élucidé et plusieurs hypothèses ont été proposées. Étant donné que Ikaros régule le cycle cellulaire dans les LT en favorisant la transcription de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27^{Kip1}, un défaut d'Ikaros pourrait modifier le seuil d'activation par l'intermédiaire de la régulation de protéines impliquées dans le cycle cellulaire dans les LB. Une autre possibilité serait qu'en l'absence ou baisse de l'activité Ikaros, certains gènes de la voie Notch qui devait être réprimés, sont surexprimés et favorisent l'activation des LB. Enfin, Ikaros pourrait influencer l'expression de protéines impliqués dans la signalisation du BCR. Il a été montré que Ikaros jouait directement sur l'expression de la phosphatase SHIP et avait un impact sur la signalisation du BCR à plusieurs niveaux (Nera et al., 2006 ; Alinikula et al., 2010). Quel que soit le mécanisme altéré par un déficit en Ikaros conduisant à une diminution du seuil d'activation des LB, une baisse de ce seuil est associée à un risque de rupture de tolérance comme vu dans le chapitre 3.3.3. D'ailleurs, une élévation du taux d'auto-anticorps a été trouvé dans les modèles murins *Ikaros*^{L/L} et les souris *Vλ2-Ik7tg*, exprimant une isoforme d'Ikaros ayant un effet dominant négatif à partir du stade pro-B (Wojcik et al., 2007 ;

Sellars et al., 2011) Un modèle murin a également été généré conduisant une perte d'expression d'*Ikzf1* uniquement chez les LB matures (dépendant de CD23-Cre). Dans ce modèle, le développement des LB n'est ainsi pas altéré mais les souris développent un phénotype auto-immun (Schwickert et al., 2019). Ils ont montré qu'*Ikzf1* est impliqué dans l'induction de l'anergie dans les LB FO en régulant directement des gènes impliqués dans la mise en place de ce processus. De plus, les LB FO de leurs modèles sont hyperactivés suite à la stimulation des TLR ce qui pourrait également favoriser la rupture de tolérance.

5.1.3/ Association entre les mutations d'*IKZF1* et le lupus

Une myriade de mutations différentes de *IKZF1* a été identifiée, couvrant l'ensemble du gène et causant des réponses cliniques différentes chez les patients, allant de l'immunodéficiences, l'auto-immunité au cancer. Plus de 30 variants différents d'*IKZF1* hétérozygotes germinales ont été rapportés dans les pathologies dysimmunitaires. La majorité de ces mutations se trouvent dans les régions fonctionnelles d'*IKZF1*, se concentrant principalement autour de ZF2 et ZF3 (une partie du domaine de liaison de l'ADN) ou ZF5 et ZF6 (le domaine de dimérisation). Peu de mutations ont été trouvées en dehors de ces domaines fonctionnels. Différents défauts d'IKAROS peuvent être causés selon la mutation : 1) une haploinsuffisance (HI) causée par la réduction de l'expression de la protéine IKAROS WT ; 2) les défauts de dimérisation (DD) dus principalement à une perturbation du domaine de dimérisation. Ce type de mutation génère des protéines incapables de dimériser avec la protéine IKAROS WT, mais elles sont toujours capables de lier les séquences cibles d'IKAROS en tant que monomères ;

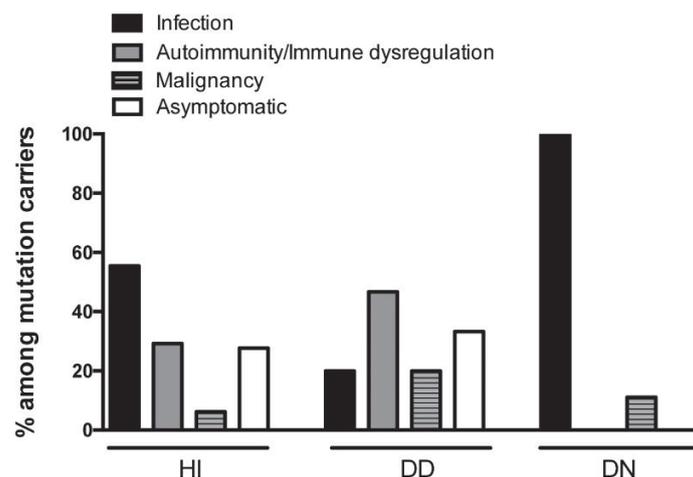


Figure 32 : Manifestations cliniques chez les patients atteints de mutations *IKZF1* hétérozygotes germinales

HI : haploinsuffisance ; DD : Défaut de dimérisation ; DN : dominant négatif.
(Kuehn et al., 2021)

3) les dominants négatifs (DN) produisant une protéine IKAROS ayant perdu/réduit ses capacités de liaison à l'ADN mais affectent également la forme WT d'IKAROS. Les patients avec des mutations de type HI développent majoritairement un syndrome d'immunodéficience commune variable ou CVID pour *Common variable immunodeficiency* tandis que les mutations DN sont davantage associées à un déficit immunitaire combiné sévère (SCID pour *Severe combined immunodeficiency*) (Figure 32). Ces pathologies induisent une sensibilité accrue aux infections. Les patients présentant des mutations DD présentent le plus souvent des pathologies auto-immunes et associées à des dérégulations du système immunitaire de type thrombopénie, neutropénie et l'anémie hémolytique auto-immune.

Les patients avec une mutation de *IKZF1* conduisant à un LES présentent notamment des anomalies dans la répartition des sous-populations B et une réponse anormalement élevée des LB suite à une stimulation du BCR comparée aux contrôles (Hoshino et al., 2017 ; Nieuwenhove et al., 2018). Un défaut d'IKAROS pourrait entraîner une rupture de tolérance via différents mécanismes. Par exemple, un défaut d'induction d'anergie ou une diminution du seuil d'activation comme présenté dans le chapitre 5.2.2 pourrait expliquer le développement du LES chez ces patients.

5.2/ L'enzyme Tyrosine Kinase LYN

5.2.1/ Structure et expression LYN

LYN est une sérine thréonine kinase appartenant à la famille des kinases SRC (SFK). LYN existe sous deux isoformes, p53 et p56, résultant de l'épissage alternatif de l'exon 2 mais aucune différence fonctionnelle entre les isoformes n'est actuellement connue. La protéine est exprimée dans toutes les cellules sanguines à l'exception des LT et également dans certains tissus non-hématopoïétiques. LYN est composé en partie N-terminale d'une région "unique" comportant un site de palmylation et de myristoylation permettant son ancrage dans les radeaux lipidiques de la membrane plasmique, d'un domaine SH3 et SH2 et en C-terminale d'un domaine catalytique (Figure 33) (Ingley et al., 2012). L'activité de LYN est régulée par ses interactions avec d'autres protéines grâce à ses domaines SH2/SH3 ainsi que par son état de phosphorylation. Dans son état inactif, le résidu Y508 est phosphorylé et interagit avec le domaine SH2 ce qui lui confère une conformation "fermée". Le domaine SH3 peut se lier à un motif enrichi en proline afin de renforcer la conformation inactive de la protéine. Afin que LYN soit activé, le résidu tyrosine en C-terminale doit être déphosphorylé et LYN doit interagir avec une protéine cible via son domaine SH2 et/ou SH3 ; qui libère alors la protéine de sa conformation auto-inhibitrice. Les protéines LYN activées peuvent alors s'autophosphoryler au niveau du résidu Y397 de la boucle d'activation pour augmenter leur capacité enzymatique.

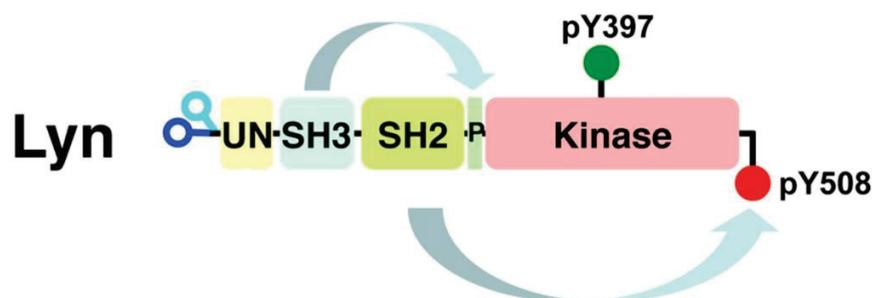


Figure 33 : Structure de la protéine LYN

Les sites de myristoylation et de palmitoylation sont indiqués respectivement en bleu et cyan. Les sites de phosphorylation associés à l'inactivation (pY508) ou l'activation de la protéine (pY397) sont indiqués respectivement en rouge et en vert. P=Motif enrichi en proline (Adapté de Ingley et al., 2012)

5.2.2/ Rôle dans les lymphocytes B

LYN est impliqué dans la transduction du signal de nombreux récepteurs tels que le BCR, le récepteur au GM-CSF, FcεR1, le récepteur c-kit, etc. LYN phosphoryle de nombreuses molécules impliquées dans les voies de signalisations sous ces récepteurs dont les motifs ITAM/ITIM (Brodie et al., 2018). Les souris *Lyn*^{-/-} sont viables mais présentent entre autres des anomalies des lignées lymphoïdes et myéloïdes (Hibbs et al., 1995). La protéine LYN joue notamment un rôle essentiel dans les LB en étant à la fois activateur et inhibiteur ITIM (Brodie et al., 2018 ; Xu et al., 2005). En tant qu'activateur, LYN est impliqué dès la reconnaissance d'un antigène par le BCR. Les kinases SRC dont LYN phosphorylent les motifs ITAM de CD79a/b et permettent d'initier la cascade de signalisation sous le BCR décrite dans le chapitre 3.1.2.a. LYN peut également cibler PLCγ2 qui favorise l'hydrolyse du PIP2 en IP3 et DAG ou promouvoir la voie PI3K/Akt en phosphorylant CD19. Le rôle de LYN en tant qu'activateur dans les LB n'est pas essentiel et peut être compensé par les autres membres de la famille SRC. Cependant, LYN a une importance centrale dans la répression du signal. LYN phosphoryle les motifs ITIM des récepteurs inhibiteurs des LB vu dans le chapitre 3.1.2.c. SHP1 est notamment recruté au niveau des motifs ITIM et peut cibler les protéines BTK, SYK et LYN pour inhiber la transduction du signal. LYN peut agir plus directement sur la répression du signal en phosphorylant Cbp/PAG (*Csk-binding protein/phosphoprotein associated with glyco-sphingolipid microdomains*) qui active CSK, permettant de réduire l'activation de LYN et des autres protéines SFK. Enfin, LYN semble jouer un rôle majeur sur les LB en périphérie. Le développement des LB est normal dans la MO des souris *Lyn*^{-/-} mais dans la rate, le nombre de LB mature est fortement réduit. La perte de Lyn réduirait la transduction du signal tonique à cette étape nécessaire à la survie des cellules.

Néanmoins, les LB des souris *Lyn* *-/-* ont des capacités prolifératives augmentées en réponse à la stimulation du BCR *in vitro*, associées à une hausse de la signalisation du BCR et une réduction de la phosphorylation des ITIM des récepteurs inhibiteurs. Lyn aurait ainsi des fonctions opposées au cours du développement des LB.

5.2.3/ Association entre les mutations de *LYN* et le lupus

Etant donnée le rôle de *LYN* comme inhibiteur de la signalisation des LB, les souris *Lyn* *-/-* développent un phénotype auto-immun caractérisé par une augmentation des AAN, une splénomégalie et une glomérulonéphrite associée à des dépôts de complexes immuns. Un autre modèle murin avec une mutation induisant une réduction de l'activité catalytique de Lyn nommé WeeB développent un phénotype similaire à celui des souris *Lyn* *-/-* mais plus tardivement (Barouch-Bentov et al., 2009). De manière surprenante, les souris *Lyn* *up/up* surexprimant la protéine développent également des symptômes auto-immuns (Hibbs et al., 2002). Les LB de ces souris sont caractérisés par la phosphorylation constitutive des récepteurs inhibiteurs mais présentent aussi une augmentation des protéines impliquées dans la transduction du signal comme Syk et Btk. L'observation d'un même phénotype avec un défaut ou la surexpression de Lyn met en avant l'importance de cette protéine dans le maintien d'un équilibre du signal des LB.

Chez l'Homme, des polymorphismes de *LYN* ont été associés au LES (Lu et al., 2019). Néanmoins, à l'heure actuelle, aucun lupus monogénique associé à une mutation de *LYN* n'a été identifié. Cela met en avant les différences entre l'Homme et la souris. En conséquence, le rôle de *LYN* chez l'Homme a besoin d'être mieux compris indépendamment des études chez la souris.

OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE TRAVAIL

J'ai effectué mon travail de thèse dans le groupe du Pr. Alexandre Belot dans l'équipe du Dr. Thierry Walzer. Le but de notre groupe est d'identifier des anomalies génétiques impliquées dans les formes familiales de LES ou à début pédiatrique ; où la génétique est considérée comme un facteur contributif majeur à l'apparition de la maladie. Une large cohorte de patients a été constituée sur laquelle des analyses génétiques à grande échelle (séquençage d'un large panel de gènes ou exome) ont été réalisées. De ces analyses, un variant de *PRKCD* a été identifié dans une famille ainsi que des mutations de *LYN* et de *IKZF1* dans une autre famille. Ces 3 gènes sont notamment connus pour coder pour des protéines ayant un rôle primordial dans la biologie des LB. La présentation clinique et les défauts biologiques observés dans la famille avec la mutation *PRKCD* ont été reportés dans une étude publiée en 2013. Du fait de la rareté des échantillons, il est cependant difficile d'étudier les conséquences fonctionnelles des différents variants à partir de matériel humain. Pour cette raison, nous avons notamment généré des souris transgéniques portant les mêmes mutations que celles retrouvées chez les patients. Ce projet est organisé en deux parties :

1- ÉTUDE DE LA MUTATION *Prkcd* G510S/G510S CHEZ LA SOURIS : Comprendre le rôle de cette mutation dans les mécanismes menant à l'auto-immunité.

Nous avons vu dans le chapitre 4 de la partie bibliographie que des défauts de PKC- δ avaient déjà été associés au LES mais que les mécanismes conduisant à une rupture de tolérance en absence de PKC- δ restaient flous à l'heure actuelle. Au début de ce projet, nous avons comme objectifs de :

- Déterminer si la présence uniquement de la mutation de *PRKCD* que nous avons identifiée est suffisante pour induire le développement d'un phénotype auto-immun chez la souris. En effet, le modèle murin *Prkcd* $-/-$ conduit à une absence totale de l'expression de la protéine PKC- δ . Or, la mutation de *PRKCD* c.1528G>A,G510S ne mène pas à une perte totale de l'expression de PKC- δ mais à une réduction de l'expression de la protéine. De plus, ce variant a été identifié dans une famille consanguine où potentiellement d'autres variations génétiques situées dans les régions d'homozygotie pourraient avoir un effet.
- Caractériser le phénotype observé et réaliser un immunophénotypage approfondi afin de déterminer les anomalies induites par la mutation. Comme présenté dans le chapitre 4.2.3, PKC- δ est impliqué dans le développement et le fonctionnement de diverses cellules du système immunitaire. Nous avons alors étudié l'impact de la mutation *Prkcd* G510S/G510S de manière globale sur le système immunitaire avant de nous focaliser sur les LB au vu de la littérature.

- Décortiquer les mécanismes moléculaires altérés par ces mutations pouvant mener à une rupture tolérance. On retrouve PKC- δ dans un grand nombre de mécanismes que ce soit l'apoptose, la prolifération, etc. Pour cela, PKC- δ est impliqué dans plusieurs voies de signalisations. Nous avons étudié les voies de signalisations impactées par la mutation G510S/G510S spécifiquement dans les LB.

2- ÉTUDE DES MUTATIONS *IKZF1* D120V/+, *LYN* F258S/+ : Déterminer leurs rôles dans le lupus.

Ces variants n'ont jamais été décrits dans la littérature auparavant. On ne connaît pas également l'impact de ces mutations sur les protéines qu'elles codent. Ainsi, ce projet avait initialement pour but de :

- Déterminer l'impact de ces variants sur l'expression de leurs protéines.
- Déterminer les conséquences fonctionnelles de ces variants *in vitro*.
- Déterminer si la mutation de *IKZF1*, de *LYN* ou les 2 sont suffisantes pour induire le développement d'un phénotype auto-immun chez la souris.

PARTIE RÉSULTATS

1– ÉTUDE DE LA MUTATION *Prkcd* G510S/G510S CHEZ LA SOURIS : Comprendre le rôle de cette mutation dans les mécanismes menant à l'auto-immunité

1.1/ Article sur le modèle murin avec la mutation *Prkcd*^{G510S/G510S}

Ce premier article présente l'étude réalisée sur les souris *Prkcd*^{G510S/G510S} que nous avons généré grâce à la technologie CrispR/Cas9 dans le laboratoire.

Etat de l'art :

- Des mutations de *PRKCD* sont retrouvées dans des familles avec un LES monogénique.
- L'absence de l'expression de PKC- δ conduit au développement d'un phénotype auto-immun similaire à ceux retrouvés chez les patients.
- Les LB des patients et des souris avec un déficit en PKC- δ ont une meilleure survie et un avantage prolifératif.
- L'absence de PKC- δ impacte de nombreuses voies de signalisation notamment, elle conduit à une baisse de la phosphorylation de Erk dans les LB.

Principaux résultats :

- La mutation *Prkcd*^{G510S/G510S} est suffisante pour induire le développement d'un phénotype auto-immun.
- La mutation *Prkcd*^{G510S/G510S} impacte de manière intrinsèque le développement et l'homéostasie des cellules NK.
- Les LB avec la mutation *Prkcd*^{G510S/G510S} suffisent à induire un phénotype auto-immun.
- L'engagement du BCR entraîne une activation accrue de la voie PI3K/AKT/mTOR dans les LB porteurs de la mutation *Prkcd*^{G510S/G510S}.
- Le traitement à la rapamycine, un inhibiteur de mTORC1, permet de réduire les symptômes liés à l'auto-immunité.

Impacts :

- Ce modèle permet d'améliorer notre compréhension sur le rôle de PKC- δ dans le maintien de l'homéostasie des LB.
- Il s'agit du premier modèle murin avec une mutation de *PRKCD* ayant étudié l'impact d'un défaut de PKC- δ sur les NK.
- Le défaut NK pourrait en partie expliquer les susceptibilités aux infections retrouvées chez les patients.
- PKC- δ est impliqué dans la régulation de la voie PI3K/AKT/mTOR.
- La rapamycine pourrait être un traitement personnalisé pour les patients avec un déficit en PKC- δ ne répondant pas au traitement standard.

mTOR activation underlies enhanced B cell proliferation and autoimmunity in *Prkcd*^{G510S/G510S} mice

Marion Moreews¹, Anne-Laure Mathieu¹, Kevin Pouxvielh¹, Quentin Reuschlé², Annabelle Drouillard¹, Penelope Dessay¹, Marie Meignien^{1,3}, Jiang Zhang¹, Lucie Fallone¹, Noëmi Rousseaux¹, Michelle Ainouze¹, Amaury Rey¹, Ommar Omarjee¹, Elodie Decembre¹, Vanina Lenief¹, Sophia Djebali¹, Olivier Thauinat^{1,4,5}, Marlène Dreux¹, Laurent Genestier¹, Thierry Defrance¹, Pauline Soulas-Sprauel², Antoine Marçais¹, Thierry Walzer^{1,*}, Alexandre Belot^{1,3,*}

¹CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie - Inserm, U1111, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, UMR5308, Lyon, France

²INSERM UMR-S1109, Department of Clinical Immunology and Internal Medicine, National Reference Center for Systemic Autoimmune Diseases (CNR RESO), Tertiary Center for Primary Immunodeficiency, Faculty of Pharmacy, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

³Hospices Civils de Lyon, Edouard Herriot Hospital, Immunology Laboratory, 69437 Lyon, France

⁴Department of Transplantation, Nephrology and Clinical Immunology, Edouard Herriot Hospital, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

⁵Lyon-Est Medical Faculty, Claude Bernard University (Lyon 1), Lyon, France.

*Co-senior authors: Thierry Walzer and Alexandre Belot

Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), INSERM U1111 – CNRS UMR5308, Université Lyon 1, ENS de Lyon. 21 Avenue Tony Garnier - 69365 LYON cedex 07, France. Tel +33 (0)437 28 23 73. E-mail: thierry.walzer@inserm.fr; alexandre.belot@chu-lyon.fr

Abstract

Autosomal recessive *PRKCD* deficiency has previously been associated with the development of systemic lupus erythematosus (SLE) in human patients, but the mechanisms underlying autoimmunity remain poorly understood. We introduced the *Prkcd* G510S mutation that we previously associated to a Mendelian cause of SLE in the mouse genome, by means of CRISPR-Cas9 gene editing. *Prkcd*^{G510S/G510S} mice recapitulated the human phenotype, presenting with glomerulonephritis, splenomegaly, and various serum autoantibodies, including anti-nuclear, and had reduced lifespan. We demonstrate that this phenotype is linked to a B cell autonomous role of PRKCD in immune regulation. A detailed analysis of B cell activation in *Prkcd*^{G510S/G510S} mice shows an upregulation of the PI3K/mTOR pathway following the engagement of the BCR in these cells, leading to lymphoproliferation. Treatment of mice with rapamycin, a specific mTORC1 inhibitor, significantly improves autoimmune symptoms, demonstrating *in vivo* the deleterious effect of mTOR pathway activation in *Prkcd*^{G510S/G510S} mice. Additional defects in *Prkcd*^{G510S/G510S} mice include a strong decrease in peripheral mature Natural Killer (NK) cells that might contribute to the known susceptibility to viral infections of patients with *PRKCD* mutations.

One Sentence Summary:

Transgenic mice bearing the *Prkcd* G510S mutation develop a severe auto-immune phenotype associated with hyperactivation of the PI3K/mTOR pathway in B cells that can be specifically treated with rapamycin.

Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a devastating autoimmune disease whose symptoms may include joint pain, fever, skin rash and organ damage. SLE is currently incurable and the therapeutic arsenal to treat SLE remains very limited, without specific treatment for the different clinical forms of the disease. SLE usually occurs in adults and less frequently in children (juvenile onset SLE or jSLE), but in the latter case it is usually more severe. In jSLE, genetics is thought to be a major contributing factor to the onset of the disease; and a subset of jSLE is driven by inborn errors of a single gene, defining the concept of monogenic SLE¹. Using next generation sequencing (NGS), we recently found that at least 7% cases of jSLE are in fact monogenic¹. Gene mutations may alter different immunological pathways such as the clearance of apoptotic bodies (ie efferocytosis), the production of type I interferon (IFN-I), or B cell tolerance².

Mechanistically, SLE is caused by an aberrant immune response resulting in the production of inflammatory cytokines such as IFN-I, and autoantibodies (autoAbs) directed against components of apoptotic bodies (nucleosomes, chromatin, histones etc) as well as the formation and deposition of immune complexes responsible for tissue inflammation and damage³. AutoAbs identified in SLE are generally high-affinity, somatically mutated IgG, which suggests they have arisen in germinal centers, where T cells provide help to B cells for class switching and somatic mutation³. They are produced by mature B cells, differentiated into plasma cells, secondary to a break in B cell tolerance. B cell tolerance ensures that B cells expressing B cell receptors (BCRs) with the ability to recognize self-antigens are either modified (BCR editing) or eliminated to avoid the development of autoimmunity. In particular, strong BCR signaling upon engagement by self-antigens induces apoptosis of developing B cells⁴. Consequently mutations in genes affecting the strength or the quality of BCR signal transduction can cause B cells tolerance breakdown and autoimmunity, as previously reviewed^{4,5}.

Others and we previously identified *PRKCD* mutations in jSLE patients. *PRKCD* encodes for Protein Kinase C-delta (PKC- δ), a cytosolic kinase of the novel diacylglycerol-dependent and calcium-independent serine/threonine PKC group. In our own study, we

described a homozygous mutation (c.1528G>A, p.G510S) of the *PRKCD* gene in 3 jSLE patients from the same family⁶. The causality of these mutations in SLE was supported by genetic analyses and by previous observations of a lupus phenotype in *Prkcd*^{-/-} mice^{7,8}. Moreover, multiple other mutations in *PRKCD* were associated with jSLE since original observations⁹⁻¹². The G510S missense mutation affects a highly conserved amino acid of the protein activation loop and is associated with a low but not abrogated PKC- δ expression⁶. We also demonstrated that the mutated protein displays a reduced activity and that it was refractory to stimulation by Phorbol Myristate Acetate. PKC- δ is broadly expressed and plays multiple roles in cells of the innate and adaptive immune systems. For example, PKC- δ regulates neutrophil migration and oxidative burst¹³ and also influences macrophage effector functions¹⁴. T cell proliferation and cytokine production are slightly increased in *Prkcd*^{-/-} mice following TCR triggering⁷. In B cells, PKC- δ is phosphorylated following BCR engagement^{15,16} and is involved in BCR signaling. A previous study proposed that PKC- δ amplified the Ca²⁺ dependent Ras/Erk pathway, thereby inducing apoptosis of autoreactive transitional B cells¹⁷. Another study showed that PKC- δ translocation into the nucleus was a pro-apoptotic event that could be prevented by BAFF signaling¹⁸. PKC- δ nuclear translocation was recently shown to occur in germinal center (GC) B cells, downstream of sphingomyelin synthase 2 (SMS2)¹⁹. Overall, several lines of evidence point to PKC- δ as an important regulator of B cell tolerance, and the proposed mechanism involved the induction of apoptosis in immature cells. Yet, most studies have used *Prkcd*^{-/-} mice as disease model, which may not adequately model SLE pathogenesis in patients with *PRKCD* mutations. To address this issue, we generated a knock-in mouse strain bearing the *Prkcd* G510S mutation. Our results showed that *Prkcd*^{G510S/G510S} mice developed a strong autoimmune phenotype recapitulating the disease observed in patients. We hypothesized that B cells were the major drivers of the disease. We performed a detailed analysis of their phenotype and of their response to BCR engagement to tackle this question and to find a specific treatment for the disease.

Results

***Prkcd*^{G510S/G510S} mice develop a severe lupus phenotype**

To study the mechanisms of SLE associated with *PRKCD* mutations, we generated a novel knock-in mouse model bearing the *PRKCD* G510S mutation identified in the patients we previously described⁶ using CRISPR/Cas9 genome editing (Fig.1A). Capillary electrophoresis analysis showed that *Prkcd*^{G510S/G510S} mice had a decreased expression of PKC- δ at the protein level in various lymphoid organs such as spleen, thymus and bone marrow (BM), compared to control mice (Fig.1B), which suggests a similar impact of the *PRKCD* mutation on protein expression in mouse and human⁶. *Prkcd*^{G510S/G510S} mice had a reduced lifespan compared to *Prkcd*^{+G510S} and *Prkcd*^{+/+} control mice (Fig.1C). Indeed, all *Prkcd*^{G510S/G510S} mice died before the age of 48 weeks while about 80% of control mice (to *Prkcd*^{+G510S} and *Prkcd*^{+/+}) were still alive at this age. Of note, *Prkcd*^{G510S/G510S} males died slightly earlier than *Prkcd*^{G510S/G510S} females. To address the causes of this premature death, we then carried out a clinical, biological and histological examination of knock-in mice in comparison with controls. Spleens and LN were significantly enlarged in *Prkcd*^{G510S/G510S} mice, especially in males (Fig.1D and Supplementary Fig.1A). Kidneys from *Prkcd*^{G510S/G510S} mice and not controls exhibited extensive infiltration in the glomeruli, which correlated with the presence of IgG deposit and proteinuria (Fig.1E-F, Supplementary Fig.1B). Anti-nuclear antibodies, a hallmark of SLE were already detected at 2 months of age in *Prkcd*^{G510S/G510S} mice (Fig. 1G). Moreover, ELISA assays revealed the presence of anti-dsDNA IgG, anti-dsDNA IgM and Rheumatoid factor (RF) in the serum of *Prkcd*^{G510S/G510S} mice and their levels increased with time except for anti-dsDNA IgM (Fig.1H, Supplementary Fig.1C). In addition, total IgG and IgM concentrations were strongly increased (Fig.1I). We also monitored the expression of several interferon-stimulated genes (ISGs) in blood cells, since the production of type-I interferon (IFN-I) is often elevated in SLE patients. We calculated an IFN score, following a method previously used for human cells²⁰. This score was significantly higher in *Prkcd*^{G510S/G510S} mice compared to controls (Fig.1J).

Overall, *Prkcd*^{G510S/G510S} mice develop an early onset and severe autoimmune phenotype combining lymphoproliferation, kidney failure, various autoantibodies and positive IFN score, leading to premature death. This phenotype recapitulates clinical features observed in SLE patients bearing the *PRKCD* G510S mutation, validating our translational approach.

Impaired NK cell homeostasis in *Prkcd*^{G510S/G510S} mice

To gain insight into the immunological mechanism leading to SLE in *Prkcd*^{G510S/G510S} mice, we performed a large-scale flow cytometry analysis of immune subsets in these mice in comparison with controls. We first focused our analysis on innate immune cells. Macrophages, neutrophils, eosinophils, plasmacytoid and conventional dendritic cells (pDC and cDC) were observed at similar frequencies in the spleen of *Prkcd*^{G510S/G510S} mice and control mice, and no further investigations were performed for these subsets (Fig.2A). By contrast, the frequency of NK cells was reduced three-fold in the spleen of *Prkcd*^{G510S/G510S} mice compared to controls. We observed that these cells had a bigger size and higher Ki67 expression than control NK cells (Supplementary Fig.2A-B). Furthermore, *Prkcd*^{G510S/G510S} NK cells displayed defective maturation with an increase of immature CD11b⁻ CD27⁺ cells and a decrease of mature CD11b⁺ CD27⁻ cells (Supplementary Fig.2C). We stimulated spleen cells with YAC-1 cells that are classical NK cell targets. We observed higher cell surface expression of the cytotoxic marker CD107a cell surface expression following stimulation in *Prkcd*^{G510S/G510S} NK cells than in control NK cells (Supplementary Fig.2D). To test if this NK cell phenotype was due to a cell-intrinsic impact of the *Prkcd* mutation or to the inflammatory environment, we generated mixed BM chimeric mice by reconstituting lethally irradiated Ly5a x C57BL/6 (CD45.1xCD45.2) with a 1:1 mixture of BM from *Prkcd*^{G510S/G510S} or *Prkcd*^{+/+} (CD45.2) mice and Ly5a mice (CD45.1), taking advantage of CD45.1 and CD45.2 specific antibodies to identify cells of the different genotypes. In WT/*Prkcd*^{G510S/G510S} BM chimeric mice, a lower percentage of NK cells was found in spleen cells from the *Prkcd*^{G510S/G510S} genotype compared to the WT genotype (Supplementary Fig.2E) and their maturation was also impaired (Supplementary Fig.2F). However, the degranulation capacity of *Prkcd*^{G510S/G510S} NK cells was similar to that of WT counterparts in mixed BM chimeras

(Supplementary Fig.2G). Altogether, these results show a cell-intrinsic impact of the *Prkcd*^{G510S/G510S} mutation on NK cell development and homeostasis while the impact on degranulation capacities is probably cell extrinsic.

B cell homeostasis is altered in *Prkcd*^{G510S/G510S} mice

Next, we examined adaptive lymphocyte features in *Prkcd*^{G510S/G510S} mice in comparison with controls. As shown in Fig. 2A we observed a decreased frequency of CD8 T cells and a normal frequency of CD4 T cells in the spleen of *Prkcd*^{G510S/G510S} mice compared to controls. The proportion of B cells was similar in the BM and spleen of *Prkcd*^{G510S/G510S} and control mice, but this proportion was higher in the LN of *Prkcd*^{G510S/G510S} than in controls. B cell size was bigger in *Prkcd*^{G510S/G510S} than in controls, irrespective of the organ analyzed (Fig.2B), suggesting ongoing activation. In agreement with this hypothesis, peripheral *Prkcd*^{G510S/G510S} B cells expressed significantly higher levels of activation markers CD69, MHCII and CD86 and proliferation marker Ki67 than control B cells (Fig.2C and Supplementary Fig.3A). We then performed a detailed analysis of immature and mature B cell subsets. The frequencies of precursor, immature, transitional and mature B cells in the BM were similar in *Prkcd*^{G510S/G510S} mice and controls (Fig.2D), and so were the proportions of transitional and follicular B cells in the spleen of both strains (Fig.2E-F). However, marked differences were observed for other B cell subsets. In particular the proportion of marginal zone (MZ) B cells, was strongly reduced while the proportions of germinal center (GC) and plasma cells (PC) were elevated in the spleen of *Prkcd*^{G510S/G510S} compared with controls (Fig.2G). We then inspected Aging-associated B Cells (ABCs) defined as CD3⁻CD19⁺B220⁺IgM⁺CD11b⁺CD11c⁺T-bet⁺. This population is known to expand with age and in SLE patients²¹. We observed an elevated proportion of these cells in the spleen of *Prkcd*^{G510S/G510S} mice. Of note, plasma and MZ B cells had an increased Ki67 expression in *Prkcd*^{G510S/G510S} mice compared to controls (Supplementary Fig.3B). Overall, the analysis of activation markers and peripheral B cell subsets in *Prkcd*^{G510S/G510S} mice is evocative of B-cell driven autoimmunity.

To test if this phenotype was intrinsically caused by the *Prkcd* mutation in B cells, we analyzed the B cell compartment in the spleen of BM chimeras described above. In WT:

Prkcd^{G510S/G510S} chimeric mice, *Prkcd*^{G510S/G510S} splenic B cells had a clear competitive advantage over control B cells (Fig.2H), while no difference in B cell proportion was observed between CD45.1 and CD45.2 genotypes in WT/*Prkcd*^{+/+} chimeric mice. Moreover, *Prkcd*^{G510S/G510S} B cells had an activated phenotype in chimeric mice, as shown by high expression level of activation markers (Fig.2I), and among *Prkcd*^{G510S/G510S} B cells, plasma cells, and ABC were over-represented compared to controls (Fig.2J). These results indicate a cell-intrinsic role of the *Prkcd*^{G510S/G510S} mutation in B cells, leading to autoimmunity. Of note, MZ B cells were also increased in the *Prkcd*^{G510S/G510S} compartment of BM chimeric mice compared to controls (Fig.2J), which did not correspond to the phenotype of *Prkcd*^{G510S/G510S} mice. This suggests that the reduction of MZ B cells in *Prkcd*^{G510S/G510S} mice was not due to a cell intrinsic role of PKC-δ in these cells.

B cell autonomous role of the *Prkcd*^{G510S/G510S} mutation in the autoimmune phenotype

Analyses of immune subsets in *Prkcd*^{G510S/G510S} mice point towards an important role of B cells in driving the autoimmune phenotype. To test if this role was B cell autonomous, we generated mixed BM chimeric mice using a 4:1 ratio of BM from the B cell deficient mice μ MT and *Prkcd*^{+/+} or *Prkcd*^{G510S/G510S} mice. In those chimeric mice, most peripheral immune cells are derived from the μ MT donor, except B cells that are only derived from the *Prkcd*^{+/+} or the *Prkcd*^{G510S/G510S} donors. Autoimmune features and immune subsets were analyzed 3 months after BM injection. We first measured PKC-δ expression in B cells. As shown in Fig.3A, PKC-δ expression was much lower in B cells from μ MT: *Prkcd*^{G510S/G510S} than in those from μ MT: *Prkcd*^{+/+} chimeric mice, whereas its expression was comparable in other immune cells from both mice validating the models. Moreover, μ MT: *Prkcd*^{G510S/G510S} and not μ MT: *Prkcd*^{+/+} mice developed an autoimmune phenotype very similar to that of *Prkcd*^{G510S/G510S} mice in terms of splenomegaly, glomerulonephritis, IgG deposits, IFN score and serum anti-nuclear and anti-dsDNA IgG (Fig.3B-F). Of note, some autoimmune features such as the rheumatoid factor, the anti-dsDNA IgM and total immunoglobulins were more moderate in these chimeric mice compared to *Prkcd*^{G510S/G510S} mice suggesting that other cells than B cells may influence the

phenotype. Yet, for the most part the autoimmune phenotype was recapitulated in those mice, demonstrating a B cell autonomous role of the *Prkcd*^{G510S/G510S} mutation in driving B cell tolerance break and autoimmunity.

BCR engagement drives higher PI3K/mTOR activation and proliferation in *Prkcd*^{G510S/G510S} B cells than in control B cells

We then dissected the mechanism driving autoimmune B cell activation in *Prkcd*^{G510S/G510S} mice. Considering the splenomegaly and the B cell over-proliferation in these mice, and the previous literature on *Prkcd*^{-/-} mice, we hypothesized that *Prkcd*^{G510S/G510S} B cells responded more than control B cells to BCR engagement. To test this point, we labeled splenic B cells with Cell Trace Violet (CTV) and stimulated them with αIgM +/- αCD40 crosslinking antibodies for 3 days. *Prkcd*^{G510S/G510S} B cells proliferated more than control B cells (Fig.4A, Supplementary Fig.3C). Specifically, *Prkcd*^{G510S/G510S} B cells performed more than 4 division cycles while control B cells only divided twice on average upon stimulation by αIgM and αCD40 antibodies. By contrast, *Prkcd*^{G510S/G510S} and control B cells responded equally well to LPS stimulation (Supplementary Fig.3D), indicating a specific hyper-reactivity of *Prkcd*^{G510S/G510S} B cells to BCR-mediated stimulation. This phenotype was also associated to a better survival of *Prkcd*^{G510S/G510S} B cells than control B cells to growth factor deprivation (Fig.4B).

In a first attempt to understand how *Prkcd*^{G510S/G510S} dysregulated B cell activation, we performed RNA sequencing on sorted *Prkcd*^{+/+} and *Prkcd*^{G510S/G510S} follicular B cells stimulated or not through their BCR. While the transcriptional profile of resting *Prkcd*^{+/+} and *Prkcd*^{G510S/G510S} follicular B cells was relatively similar, there were greater differences between cells of both genotypes after BCR-mediated activation, with 143 differentially expressed genes (DEG) (Fig.4C). A functional annotation of these DEG using Metascape (Fig.4D) retrieved pathways related to cellular activation (leukocyte activation, mononuclear cell proliferation...) confirming the impact of the *Prkcd*^{G510S/G510S} mutation on B cell activation. The mTOR-signaling pathway was also differentially regulated between both cell types, pointing to a link between mTOR and PKC-δ. To substantiate this link, we analyzed signal transduction downstream of the BCR in *Prkcd*^{G510S/G510S} vs

Prkcd^{+/+} B cells using phospho-specific antibodies and flow cytometry, focusing on the major players of this pathway. Syk and Btk were phosphorylated at similar levels and following similar kinetics in B cells of both genotypes following BCR stimulation (Fig.4E). However, baseline phosphorylation levels tended to be higher in *Prkcd*^{G510S/G510S} B cells. ERK phosphorylation was also higher in *Prkcd*^{G510S/G510S} B cells than in control B cells at baseline but also following BCR stimulation, especially at the latest time points. These results contrasted with a previous study where *Prkcd*^{-/-} B cells displayed lower ERK phosphorylation than controls upon thapsigargin stimulation. To test if the discrepancy was explained by the difference in the stimulation mode, we used thapsigargin to stimulate B cells, but a higher ERK phosphorylation was also observed in *Prkcd*^{G510S/G510S} B cells in these conditions (Supplementary Fig.3E). We then assessed activation of the pathway following BCR engagement. Basal phosphorylation levels of classical mTOR targets Akt (pAkt), S6 (pS6) and 4EBP1 were higher in *Prkcd*^{G510S/G510S} B cells compared to controls and remained significantly higher upon BCR stimulation, indicating higher mTOR activity in *Prkcd*^{G510S/G510S} B cells than in control B cells (Fig.4E-F). As the mTOR kinase is activated by PI3K upon conversion of PIP2 into PIP3 we then measured PI3K activation upon BCR engagement using a PIP3-specific antibody. PIP3 levels increased earlier than mTOR activity upon BCR engagement, and their levels were higher in *Prkcd*^{G510S/G510S} B cells than in control B cells (Fig.4F). We also evaluated mTOR activation following BCR engagement in B cells from Ly5a:*Prkcd*^{G510S/G510S} BM chimeric mice by measuring S6 phosphorylation. pS6 levels were higher in CD45.2+ *Prkcd*^{G510S/G510S} B cells compared to CD45.1+ WT B cells (Fig.4G), confirming the B cell intrinsic role of the *Prkcd*^{G510S/G510S} mutation in regulating the PI3K/mTOR pathway. Collectively, our results indicate that BCR engagement induces higher PI3K/mTOR activation and proliferation in *Prkcd*^{G510S/G510S} B cells than in control B cells.

Rapamycin treatment reduces disease activity in *Prkcd*^{G510S/G510S} mice

Based on the above characterization of BCR signaling in *Prkcd*^{G510S/G510S} B cells, we treated *Prkcd*^{G510S/G510S} and control mice with rapamycin or vehicle for 28 days (Fig.5A). Rapamycin controlled lymphoproliferation in *Prkcd*^{G510S/G510S} mice, reducing the spleen size to nearly WT levels (Fig.5B). IgG and IgM deposits in kidneys also decreased upon

rapamycin treatment (Fig.5C). Specifically, the level of IgG deposits was almost halved in rapamycin-treated mice. The IFN score increased over time after treatment and there was no difference between vehicle and rapamycin groups (Supplementary Fig.4A). We also monitored serum anti-nuclear antibody levels (Fig.5D). We observed a global increase of ANA level in vehicle treated mice while the rapamycin treatment prevented it. Next, we examined the effect of rapamycin treatment on B cell phenotype and activation status. *Prkcd*^{G510S/G510S} B cells displayed lower CD69 and CD86 activation markers in the rapamycin group compared to the vehicle group, and their levels were close to those of WT B cells (Fig.5E). In addition, the proportion of plasma cells and germinal center B cells were normalized by rapamycin treatment. Aging B cells were not significantly increased in the young *Prkcd*^{G510S/G510S} mice used in this experiment (Fig.5F). Rapamycin treatment also decreased mTOR activity in *Prkcd*^{G510S/G510S} B cells, close to the control levels, both at basal state and following BCR engagement (Fig.5G). Altogether, these data demonstrate the effectiveness of rapamycin as specific treatment of autoimmunity linked to *Prkcd* mutations.

Discussion

Since 2013, 17 patients with autosomal recessive PKC- δ deficiency have been described^{6,9-12,22,23}. In most cases, these patients suffered from typical SLE often associated with lupus nephritis and lymphoproliferation. In the familial form associated with *PRKCD* G510S mutations that we previously described²⁴, all three patients had lupus nephritis and various autoantibodies, while two had skin involvement and other autoimmune manifestations including arthritis, hepatomegaly and neurologic involvement for one patient and autoimmune anemia, thrombocytopenia, antiphospholipid syndrome, and lymphoproliferative disease for the other, most severe patient. The novel mouse model bearing homozygous *Prkcd* G510S mutations that we present here essentially recapitulates the SLE features, including glomerulonephritis associated with IgG deposits, splenomegaly and serum autoantibodies. Moreover mice had a reduced lifespan, which correlates with the premature death of one of the patients with *PRKCD* G510S mutation. *Prkcd*^{G510S/G510S} mice are a near phenocopy of previously described *Prkcd*^{-/-} mice^{7,8}. However, there is residual expression of PKC- δ protein in *Prkcd*^{G510S/G510S} mice and one cannot exclude a contribution of this mutated protein to the autoimmune phenotype. Moreover, knockout constructs can sometimes generate artifactual results by modifying expression patterns of adjacent genes or the sequence of noncoding structural elements in the genome. Thus, the point mutant mouse model we describe here represents a more reliable model of the human disease than the knockout mouse.

PKC- δ deficient patients also display variable levels of immune deficiency, associated with susceptibility to bacterial, fungal or viral infections. Chronic Epstein Barr virus or cytomegalovirus infection have been reported⁹. One of our patients also presented at the age of 30 with severe papillomatosis due to human papilloma virus (HPV) infection². A previous study reported a decrease in NK cells and in their cytotoxic activity in one patient with PKC- δ deficiency. However, a decrease in peripheral NK cell numbers is often observed in SLE patients, especially when the disease is active²⁵. We report here that *Prkcd*^{G510S/G510S} mice have a specific decrease in mature NK cells, and that this deficiency is caused by a role of PKC- δ in NK cell development and maturation. While further studies will be needed to understand the precise role of PKC- δ in NK cells, a deficiency in mature

NK cells can contribute to the susceptibility to viral infections in patients, as shown in mouse models²⁶.

We show that the autoimmune phenotype in *Prkcd*^{G510S/G510S} mice is due to a B cell autonomous impact of the *Prkcd* G510S mutation, confirming previous studies that used PKC- δ knockout mice⁷, and pointing to PKC- δ as an important player in B cell central tolerance. Multiple B cell subsets were altered in *Prkcd*^{G510S/G510S} mice, with the most dramatic effect on MZ, GC and plasma cells, the latter two expanding in the mice, which is evocative of ongoing autoimmune GC reactions. B cell tolerance mechanisms ensure that B cells with high avidity for self-antigens are eliminated in the BM. Central tolerance of B cells operates via two distinct mechanisms, which are BCR editing and clonal deletion, BCR editing being the predominant route. BCR editing is induced in immature B lymphocytes which express an autoreactive BCR in the BM. This mechanism only operates if the tonic signal emanating from the BCR is weak, because the recombination machinery and in particular the RAG1/2 enzymes are repressed by a strong tonic signal. Moreover, strong tonic signaling also dampens BM retention mechanism in immature B cells. In transgenic mouse models, expression of the protein N-Ras-D12 that constitutively activates Erk1/2 phosphorylation, or expression of a constitutively active form of PI3K δ suppress BCR editing in autoreactive B cells, which leads to a failure of central tolerance⁵. The results we present here support a model by which PKC- δ is a negative regulator of BCR signaling, especially important to limit ERK phosphorylation and PI3K/mTOR activation. In particular *Prkcd*^{G510S/G510S} B cells display elevated basal levels of pAkt, pS6 and pERK, evocative of strong tonic BCR signaling. This higher tonic signaling may therefore prevent BCR editing in auto-reactive clones which would result in B cell tolerance break and autoimmunity. Of note, a previous article reported a decrease in Erk phosphorylation upon thapsigargin stimulation in PKC- δ -deficient B cells¹⁷. We also used thapsigargin in our study but obtained opposite results *ie* *Prkcd*^{G510S/G510S} B cells displayed stronger ERK phosphorylation following stimulation with thapsigargin. Technical differences may explain this discrepancy, but our results were supported by a comprehensive analysis of other BCR signaling branches that matched with the pErk data. Previous reports also showed that PKC- δ was essential for B cell tolerance by shuttling to the nucleus and inducing apoptosis upon BCR engagement in order to induce

clonal deletion. Our observation that *Prkcd*^{G510S/G510S} B cells survive better than control B cells during *in vitro* cultures are in agreement with this possibility. PKC- δ could therefore have several roles in B cell tolerance by promoting both clonal deletion and BCR editing in immature cells. Further studies will be required to determine the conditions that allow each of these PKC- δ functions and how they are coordinated during B cell development. Mature B cells in the periphery of *Prkcd*^{G510S/G510S} mice displayed higher proliferation than controls upon BCR engagement, a phenotype also observed in *Prkcd*^{-/-} mice⁷ and in PKC- δ deficient patients⁹. Mechanistically, we linked this hyper-reactivity to unrestrained BCR signaling, in particular at the level of the PI3K/mTOR pathway. This pathway is known to have multiple roles in mature B cells, promoting survival, proliferation and differentiation of activated B cells²⁷. In particular, the reduced survival of mature BCR-deficient B cells can be rescued by activation of PI3K signaling²⁸. In agreement with our findings, gain-of-function mutations in the *PIK3CD* gene encoding the catalytic subunit p110 δ of PI3K cause Activated-PI3K- δ syndrome that combines massive lymphoproliferation with immunodeficiency and/or autoimmune features. While this phenotype resembles that of PKC- δ deficiency, a recent article that reviewed genetic defects associated with an autoimmune lymphoproliferative phenotype found highest correspondence in terms of clinical features and immunophenotyping between PKC- δ deficiency and Ras-associated lymphoproliferative diseases (RALD)²⁹. RALD is caused by somatic activating mutations in *KRAS* or *NRAS* that appear in hematopoietic progenitor or stem cells and are subsequently detectable in lymphocytes and monocytes³⁰. RALD presents with B cell lymphocytosis and may present with laboratory and clinical features not seen in patients with ALPS due to *FAS* mutations such as SLE-like autoimmunity. Ras mediates the cellular response to growth factors, which leads to modulation of gene expression necessary for cell growth and proliferation. Ras operates through multiple downstream effectors, including PI3K and mTORC2³¹, and PKC- δ has been proposed to be an effector of oncogenic Ras in lung tumors³². In B cells, Ras is activated downstream BCR engagement through the guanine nucleotide exchange factors RasGRP1 and RasGRP3³³. Further studies will be needed to clarify the link between PKC- δ and the activation of Ras in B cells, and more broadly to the 22 proteins whose defect have been associated with ALPS-like disorders²⁹.

Despite the knowledge gained on the role of PKC- δ in immune regulation, no specific treatment was identified for *PRKCD*-mutated patients thus far. Such treatments may benefit to a broader group of patients since PKC- δ expression appears to be silenced in PBMC from adult-onset lupus patients³⁴. Based on the *in vitro* evidence of strong PI3K/mTOR activation in *Prkcd*^{G510S/G510S} B cells, we selected rapamycin as specific treatment of autoimmune features in *Prkcd*^{G510S/G510S} mice. This strategy proved to be relevant as a 28-day daily treatment with rapamycin was sufficient to restore spleen homeostasis and alleviate autoimmune features in mice. This effectiveness correlated with a normalization of PI3K/mTOR activation in B cells after treatment. Thus, and even though the usual clinical practice is to use rapamycin to treat lymphoproliferative disorders, our translational study provides a strong rationale to do it when the cause of the disease is proven to be PKC- δ deficiency.

Material and Methods

Mice

Prkcd^{G510S/G510S} mice were generated using CRISPR/Cas9 gene editing. gRNA and ssODN were designed using CRISPOR (Tefor) and Mainworkbench softwares (Qiagen) and were synthesized by Eurogentec. Mouse zygotes were electroporated with ribonucleoprotein complex in our animal facility (Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris (PBES), as previously described³⁵. Littermate mice were backcrossed three times to C57BL/6 mice, purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle). Mice were bred and maintained under specific pathogen-free conditions in the PBES. Age-matched (8-20-weeks old) and sex-matched littermate mice were used as controls. This study was carried out in accordance with the French recommendations in the Guide for the ethical evaluation of experiments using laboratory animals and the European guidelines 86/609/CEE. The local bioethics committee CECCAPP approved all experimental studies.

Generation of BM chimeras

For the generation of mixed BM chimeras, donor-derived BM cells of the indicated genotypes (CD45.2+) were mixed with BM cells from Ly5a (CD45.1) mice and transferred intravenously into sub lethally (10Gy) irradiated Ly5aC57BL/6 (CD45.1, CD45.2) recipients. Mice were analyzed 8–12 weeks after BM reconstitution. For the generation of μ MT: *Prkcd*^{+/+} and μ MT: *Prkcd*^{G510S/G510S} mixed BM chimeras, 4:1 ratio of donor-derived BM cells from μ MT mice and *Prkcd*^{+/+} or *Prkcd*^{G510S/G510S} mice were transferred intravenously into sub lethally (10Gy) irradiated Ly5aC57BL/6 (CD45.1, CD45.2) recipients.

Rapamycin treatment

Mice were treated with either vehicle: PBS 1X (Gibco) or Rapamune (rapamycine, Pfizer) (2 mg/ kg/day) by gavage during 28 days. Blood sampling from the retro-orbital sinus was

performed before and after treatment to analyze anti-nuclear autoantibodies and ISG expression.

Measurement of *in vivo* cell proliferation

Mice were given two intraperitoneal injections of 0.5 mg EdU (BD Bioscience). 12 h after the last EdU injection, mice were killed and organs were harvested. Spleen cells were stained for surface antigens. After fixation and permeabilization, cells were then stained with FITC anti-EdU antibody, according to manufacturer instructions. EdU incorporation was measured by flow cytometry.

Antinuclear antibodies assays

Anti-nuclear Antibodies (ANA) reactivity were detected by indirect immunofluorescence staining of HEp-2 cell slides (Biorad) using sera from indicated mice at a 1:50 dilution, and probed with FITC conjugated goat anti-murine IgG F(ab')₂ (ImmunoJackson Research). All images were obtained with a Nikon Eclipse T&2R (Nikon) microscope and were analyzed using ImageJ (NIH). For each experiment, the fluorescence intensity of 10 nuclei in each micrograph was quantified and normalized to the value obtained using an ANA positive serum.

ELISA

Total murine IgG or IgM serum levels were measured as follows. Briefly, 96 microwell plates (Nunc Maxisorp, ThermoFisher) were coated with purified goat anti-mouse IgG or IgM (Jackson ImmunoResearch) in carbonate buffer (Na₂CO₃ 0,1M, NaHCO₃ 0,1M pH 9,5) for 1 hour at 37°C and total IgG or IgM were detected with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse γ or μ (Jackson ImmunoResearch). Levels of Ig were determined by comparison with a standard curve using purified IgG or IgM (Jackson ImmunoResearch). Serum anti-dsDNA and Rheumatoid Factor activities were analysed as follows. Briefly, 96 microwell plates (Nunc Maxisorp, ThermoFisher) were coated with

purified Calf-Thymus DNA at 100ng/mL (Sigma–Aldrich) in Tris-HCl buffer (Tris HCl 50mM, EDTA 10mM, pH 7.5) for 1h at 37°C. Then, ssDNA was digested with S1 nuclease at 0,001U/μL (Promega) in Acetate buffer (50mM Na Acétate, 50mM NaCl, 1mM ZnSO₄, 5% Glycerol, pH 4.5) for 1h at 37°C. For Rhumatoid Factor detection, 96 microwell plates (Nunc Maxisorp, ThermoFisher) were coated with purified mouse IgG at 50μg/mL (Jackson Immunoresearch,) in carbonate buffer (Na₂CO₃ 0,1M, NaHCO₃ 0,1M pH 9,5) for 1h at 37°C. Serum samples were incubated at several dilution overnight at RT. Plates were then incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse γ or μ (Jackson ImmunoResearch) for 1h at 37°C. For all ELISA tests, the wells were developed with Fast Ortho-Phenylene Diamine substrate (Sigma–Aldrich). The reaction was stopped with addition of H₂SO₄ solution (1 M) after 20 minutes at RT and absorbance was measured at 490 nm.

IFN score

RNA was extracted from whole blood with Direct-zol™ RNA MicroPrep (Ozyme) and cDNA was generated using the high-capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems). PCR was carried out with a FastStart Universal SYBR Green Master (Roche) on a StepOne plus instrument (Applied Biosystems). Primers were designed using the Roche software. The following primers were used for quantitative PCR: MM-ISG15-F AAGCAGCCAGAAGCAGACTC;MM-ISG15-R CACGGACACCAGGAAATCGT;MM-IFIT1-F AAGGCACTGAACAACAAGACC; MM-IFIT1-R TGACTGCTTATGAAACTGTAGGAAA; MM-RSAD2-FGTGGACGAAGACATGAATGAAC; MM-RSAD2-R CTCAATTAGGAGGCACTGGAA; MM-GAPDH-F GCATGGCCTTCCGTGTTC; MM-GAPDH-R TGTCATCATACTTGGCAGGTTTCT. The expression of ISGs was normalized to the level of GAPDH, and the IFN score was calculated as the median of the normalized count of the three ISGs.

Kidney histopathology

Kidneys were fixed in 10% neutral buffered formalin and embedded in paraffin. Kidney sections were cut at 5 μ m thickness for H&E staining (Sigma-Aldrich). All images were obtained with an Axioimager Z1 microscope (Zeiss) and Coolsnap camera using Metamorph software (Molecular Devices).

Proteinuria measurement

Urine was collected from mice and deposited on Albustix strip (Siemens). Proteinuria score was determined as followed: 0= negative, 1=trace, 2=30 mg/dL, 3=100 mg/dL, 4=300 mg/dL and 5=>2000 mg/dL.

Immunofluorescence analysis

Mouse kidneys were embedded in OCT and snap frozen over liquid nitrogen. 6 μ m thin sections were cut on a cryostat, mounted on SuperFrost Plus Gold slides (Thermo Fisher scientific) and fixed in cold acetone for 20 min. Kidney sections were saturated with BSA 1% and donkey serum 5% blocking solution during 30 min, then with BSA 1% blocking solution containing anti-CD16/CD32 (BD Bioscience) during 30 min and were stained using FITC-anti-IgG (Jackson ImmunoResearch) or FITC-anti-IgM (Jackson ImmunoResearch). The images of stained kidney sections were captured using Axioimager Z1 microscope (Zeiss) and Coolsnap camera using Metamorph software (Molecular Devices) and were analyzed using ImageJ (NIH).

Automated Western immunoblotting

Cells were lysed in RIPA lysis buffer (25 mM Tris, HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate and 0.1% SDS containing protease and phosphatase Inhibitors (Sigma-Aldrich)) for 30 min at 4°C. Supernatant was collected following centrifugation at 16,000 g, 4°C, and protein content was quantified using the μ BCA quantification kit (Thermo Fisher Scientific). PKC- δ protein expression was detected using automated JessTM Simple Western system (ProteinSimple). Briefly, cell lysates were diluted to 0.5 μ g/ μ l in 0.1x sample buffer and Fluorescent 5X Master mix containing 400mM DTT (ProteinSimple). Samples were denatured at 95°C for 5min and proteins were separated

in capillaries using 12-230-kDa Jess separation module and following manufacturer's standard method (ProteinSimple). Anti-PKC- δ (Cell signaling Technology) were used for protein detection and revealed using HRPO-coupled secondary antibodies (ProteinSimple). Digital image of chemiluminescence of the capillary was analysed using Compass Simple Western software (version 4.1.0, Protein Simple) that calculated automatically heights (chemiluminescence intensity), area, and signal/noise ratio. PKC- δ level was normalized on total protein expression, using the JESS protein Normalization assay and according manufacturer's instructions.

Flow cytometry

Single cell suspensions of BM, LN and spleens were stained with antibody cocktails. The following monoclonal antibodies from eBioscience, BD Biosciences or Biolegend were used for flow cytometry: anti-CD19 (6D5), anti-B220 (RA3-6B2), anti-CD3 (145-2C11, 500A2), anti-CD8a (53-6.7), anti-CD4 (GK1.5), anti-NK1.1 (PK136), anti-CD11b (M1/70), anti-CD11c (N418), anti-IgM (R6-60.2), anti-IgD (11-26c.2a), anti-IgG1 (A85-1), anti-CD21 (7E9), anti-CD23 (B3B4), anti-CD24 (M1/69), anti-CD27 (LG.7F9), anti-CD45.1 (A20), anti-CD45.2 (104), anti-CD64 (X54-5/7.1), anti-CD69 (H1.2F3), anti-CD86 (GL1), anti-CD95 (Jo2), anti-CD138 (281-2), anti-CD317 (927), anti-TACI (8F10), anti-MHCII (M5/114.15.2), anti-GL7 (GL7), anti-KI67 (solA15), anti-Ly6C (HK1.4), anti-Ly6G (RB6-8C5), anti-Siglec F (E50-2440), anti-Siglec H (440c), anti-F4/80 (T45-2342), anti-CD107a (1D4B). Intracellular stainings and stainings for phosphorylated proteins were performed using the Foxp3 fixation/permeabilization or Lyse/Fix and Perm-III kits (BD Bioscience). The following antibodies from eBioscience, BD Biosciences, Biolegend and Tube-Bio were used for intracellular staining and phospho-specific flow cytometry: anti-P-Syk (pY348) (I120-722), anti-P-Btk (pY223) (N35-86), anti-p-Akt (pS473) (M89-61), anti-p-Erk (T202/pY204) (201), anti-p-S6 (p240/244) (D57.2.2E), anti-P-4E-BP1 (Thr37/46) (236B4), anti-T-bet (4B10), anti-PIP3 (Z-P345). Cell viability was measured by staining with the fixable viability dye eFluor 506 or Near IR (Thermo Fisher Scientific). Flow cytometry was carried out on a FACS Fortessa (Becton-Dickinson). Data were analyzed using FlowJo (Treestar).

***In vitro* B cell apoptosis experiments**

2×10^6 splenocytes were cultured in complete medium (RPMI-1640 supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 10mM HEPES, 1mM sodium pyruvate and $50 \mu\text{M}$ β -mercaptoethanol). After 48h or 72h, B cells viability was assessed by flow cytometry.

***In vitro* B cell stimulation experiments**

Splenocytes were labeled with $5 \mu\text{M}$ CellTrace Violet dye (Thermo Fisher Scientific) in PBS for 20min at 37°C . After washing with complete medium (RPMI-1640 supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 10mM HEPES, 1mM sodium pyruvate and $50 \mu\text{M}$ β -mercaptoethanol), cells were seeded at a density of 2×10^6 cells in 1ml of stimulation medium containing $10 \mu\text{g/mL}$ of AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgM, μ chain specific (Jackson ImmunoResearch) and $5 \mu\text{g/mL}$ of CD40 (mouse) monoclonal antibody (FGK45). At day 3, proliferation of stimulated B cells was assessed by flow cytometry.

For the measurement of phosphorylated proteins, different CD45 antibodies or CellTrace Violet dye (Thermo Fisher Scientific) dilutions were used to barcode splenocytes from the indicated genotypes after 1 hour at 4°C . Next, barcoded cells of each genotype were pooled and incubated during 15min at 4°C with $10 \mu\text{g/mL}$ of AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgM, μ chain specific (Jackson ImmunoResearch), then with $10 \mu\text{g/mL}$ of Rabbit anti-Goat IgG (H+L), Superclonal™ Recombinant Secondary Antibody (Thermo Fisher scientific) during 15 minutes. In some experiments, some inhibitors were used at the following concentrations: Cerdulatinib (Sigma–Aldrich; 20 nM), PRT062607 (Sigma–Aldrich; 11.11 nM), Wortmannin (Sigma–Aldrich; 37 nM) and Rapamycin (Merck; 1.85 nM). Splenocytes were incubated at 37°C for the stimulation and fixed by addition of 10 volumes of Lyse/Fix at the indicated time point.

***In vitro* stimulation of NK cells**

Spleen cell suspension were incubated with biotinylated mAb against: CD3 (14–2 C11), TCR β (H57-597), TCR $\gamma\delta$ (GL3), CD19 (ebio1D3), TER-119 (ter119) (eBioscience),

followed by incubation with anti-biotin microbeads (Miltenyi), and NK cell enrichment by magnetic separation using the AutoMACS device (Miltenyi). Enriched NK cells were co-cultured for 4 hr with YAC-1 cells at 1:1 ratio calculated based on the cell number and the percentage of NK cells after purification. The expression of surface CD107a was then measured on NK cells by flow cytometry.

RNA-sequencing

FO B cells CD3-CD19+CD45R+CD24intCD21intCD23+ were sorted using a FACSAria Cell Sorter (Becton-Dickinson). Purity of sorted cell populations was over 98% as measured by flow cytometry. FO B cells were stimulated with 10 µg/mL of AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgM, µ chain specific (Jackson ImmunoResearch) during 4 hours. RNA libraries were prepared as follows. Briefly, total RNA was purified using the Direct-Zol RNA microprep kit (Zymo Research) according to manufacturer instructions and was quantified using QuantiFluor RNA system (Promega). The preparation of library was performed using the SENSE mRNA-Seq Library Prep Kit (Lexogen) according to manufacturer instructions. Tagged library quality was checked on D1000 screen tape and analyzed on Tape station 4200 (Agilent). Sequencing was performed by the GenomEast platform, a member of the “France Génomique” consortium (ANR-10-INBS- 0009), on an Illumina HiSeq 4000 sequencing machine (read length 1 x 50 nt).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with the GraphPad Prism 6 software. We used unpaired Student's t-test or Mann-Whitney test to calculate statistical significance when comparing a single parameter between two experimental groups. If more than one parameter (sex or cell subsets) was compared, a false discovery rate (FDR) adjustment was applied. One-way analysis of variance (ANOVA) was used when more than two experimental groups were compared, and the statistical significance was determined using the Tukey's post-hoc test. Two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni

multiple comparison correction was used when comparing two parameters between more than two experimental groups.

References and Notes

1. A. Belot, G. I. Rice, S. O. Omarjee, Q. Rouchon, E. M. D. Smith, M. Moreews, M. Tusseau, C. Frachette, R. Bournhonesque, N. Thielens, C. Gaboriaud, I. Rouvet, E. Chopin, A. Hoshino, S. Latour, B. Ranchin, R. Cimaz, P. Romagnani, C. Malcus, N. Fabien, M.-N. Sarda, B. Kassai, J.-C. Lega, S. Decramer, P. Abou-Jaoude, I. N. Bruce, T. Simonet, C. Bardel, P. A. Rollat-Farnier, S. Viel, H. Reumaux, J. O'Sullivan, T. Walzer, A.-L. Mathieu, G. Marenne, T. Ludwig, E. Genin, J. Ellingford, B. Bader-Meunier, T. A. Briggs, M. W. Beresford, Y. J. Crow, D. Champion, J.-F. Dartigues, J.-F. Deleuze, J.-C. Lambert, R. Redon, E. Allain-Launay, K. Bouayed, S. Burtey, V. Despert, O. Fain, M. Fischbach, E. Hachulla, Y. Hatchuel, J.-F. Kleinmann, I. Kone-Paut, I. Lemelle, F. Maurier, U. Meinzer, I. Melki, M. Piram, J. Sibilia, O. Weill, E. Al-Abadi, K. Armon, K. Bailey, M. Brennan, C. Ciurtin, J. Gardner-Medwin, K. Haslam, D. Hawley, A. Leahy, V. Leone, D. Mewar, R. Moots, C. Pilkington, A. Ramanan, A. Ratcliffe, A. Sridhar, P. Riley, R. Satyapal, E. Sen, N. Wilkinson, F. Wood, Contribution of rare and predicted pathogenic gene variants to childhood-onset lupus: a large, genetic panel analysis of British and French cohorts. *Lancet Rheumatol.* 2, e99–e109 (2020).
2. O. Omarjee, C. Picard, C. Frachette, M. Moreews, F. Rieux-Laucat, P. Soulas-Sprauel, S. Viel, J.-C. Lega, B. Bader-Meunier, T. Walzer, A.-L. Mathieu, R. Cimaz, A. Belot, Monogenic lupus: Dissecting heterogeneity. *Autoimmun. Rev.* 18, 102361 (2019).
3. G. C. Tsokos, M. S. Lo, P. Costa Reis, K. E. Sullivan, New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat. Rev. Rheumatol.* 12, 716–730 (2016).
4. K. S. Cashman, S. A. Jenks, M. C. Woodruff, D. Tomar, C. M. Tipton, C. D. Scharer, F. Eun-Hyung Lee, J. M. Boss, I. Sanz, Understanding and measuring human B-cell tolerance and its breakdown in autoimmune disease. *Immunol. Rev.* 292, 76–89 (2019).
5. R. Pelanda, S. A. Greaves, T. Alves da Costa, L. M. Cedrone, M. L. Campbell, R. M. Torres, B-cell intrinsic and extrinsic signals that regulate central tolerance of mouse and human B cells*. *Immunol. Rev.* 307, 12–26 (2022).
6. A. Belot, P. R. Kasher, E. W. Trotter, A.-P. Foray, A.-L. Debaud, G. I. Rice, M. Szykiewicz, M.-T. Zobot, I. Rouvet, S. S. Bhaskar, S. B. Daly, J. E. Dickerson, J. Mayer, J. O'Sullivan, L. Juillard, J. E. Urquhart, S. Fawdar, A. A. Marusiak, N. Stephenson, B. Waszkowycz, M. W. Beresford, L. G. Biesecker, G. C M Black, C. René, J.-F. Eliaou, N. Fabien, B. Ranchin, P. Cochat, P. M. Gaffney, F. Rozenberg, P. Lebon, C. Malcus, Y. J. Crow, J. Brognard, N. Bonnefoy, Protein kinase cδ deficiency causes mendelian systemic lupus erythematosus with B cell-defective apoptosis and hyperproliferation. *Arthritis Rheum.* 65, 2161–2171 (2013).
7. A. Miyamoto, K. Nakayama, H. Imaki, S. Hirose, Y. Jiang, M. Abe, T. Tsukiyama, H. Nagahama, S. Ohno, S. Hatakeyama, K. I. Nakayama, Increased proliferation of B cells and auto-immunity in mice lacking protein kinase Cdelta. *Nature* 416, 865–869 (2002).

8. I. Mecklenbräuker, K. Saijo, N.-Y. Zheng, M. Leitges, A. Tarakhovsky, Protein kinase Cdelta controls self-antigen-induced B-cell tolerance. *Nature* 416, 860–865 (2002).
9. H. S. Kuehn, J. E. Niemela, A. Rangel-Santos, M. Zhang, S. Pittaluga, J. L. Stoddard, A. A. Hussey, M. O. Evbuomwan, D. A. L. Priel, D. B. Kuhns, C. L. Park, T. A. Fleisher, G. Uzel, J. B. Oliveira, Loss-of-function of the protein kinase C δ (PKC δ) causes a B-cell lymphoproliferative syndrome in humans. *Blood* 121, 3117–3125 (2013).
10. E. Salzer, E. Santos-Valente, S. Klaver, S. A. Ban, W. Emminger, N. K. Prengemann, W. Garncarz, L. Müllauer, R. Kain, H. Boztug, A. Heitger, K. Arbeiter, F. Eitelberger, M. G. Seidel, W. Holter, A. Pollak, W. F. Pickl, E. Förster-Waldl, K. Boztug, B-cell deficiency and severe autoimmunity caused by deficiency of protein kinase C δ . *Blood* 121, 3112–3116 (2013).
11. A. Kiykim, I. Ogulur, S. Baris, E. Salzer, E. Karakoc-Aydiner, A. O. Ozen, W. Garncarz, T. Hirschmugl, A. Krolo, A. D. Yucelten, K. Boztug, I. B. Barlan, Potentially Beneficial Effect of Hydroxychloroquine in a Patient with a Novel Mutation in Protein Kinase C δ Deficiency. *J. Clin. Immunol.* 35, 523–526 (2015).
12. I. Meyts, G. Buccioli, I. Quinti, B. Neven, A. Fischer, E. Seoane, E. Lopez-Granados, C. Gianelli, A. Robles-Marhuenda, P.-Y. Jeandel, C. Paillard, V. G. Sankaran, Y. Y. Demirdag, V. Lougaris, A. Aiuti, A. Plebani, C. Milito, V. A. Dalm, K. Guevara-Hoyer, S. Sánchez-Ramón, L. Bezrodnik, F. Barzaghi, L. I. Gonzalez-Granado, G. R. Hayman, G. Uzel, L. O. Mendonça, C. Agostini, G. Spadaro, R. Badolato, A. Soresina, F. Vermeulen, C. Bosteels, B. N. Lambrecht, M. Keller, P. J. Mustillo, R. S. Abraham, S. Gupta, A. Ozen, E. Karakoc-Aydiner, S. Baris, A. F. Freeman, M. Yamazaki-Nakashimada, S. Scheffler-Mendoza, S. Espinosa-Padilla, A. R. Gennery, S. Jolles, Y. Espinosa, M. C. Poli, C. Fieschi, F. Hauck, C. Cunningham-Rundles, N. Mahlaoui, IUIS Committee of Inborn Errors of Immunity, K. Warnatz, K. E. Sullivan, S. G. Tangye, Coronavirus disease 2019 in patients with inborn errors of immunity: An international study. *J. Allergy Clin. Immunol.* 147, 520–531 (2021).
13. L. E. Kilpatrick, S. Sun, H. Li, T. C. Vary, H. M. Korchak, Regulation of TNF-induced oxygen radical production in human neutrophils: role of δ -PKC. *J. Leukoc. Biol.* 87, 153–164 (2010).
14. S. P. Parihar, M. Ozturk, M. J. Marakalala, D. T. Loots, R. Hurdoyal, D. B. Maasdorp, M. Van Reenen, D. E. Zak, F. Darboe, A. Penn-Nicholson, W. A. Hanekom, M. Leitges, T. J. Scriba, R. Guler, F. Brombacher, Protein kinase C-delta (PKC δ), a marker of inflammation and tuberculosis disease progression in humans, is important for optimal macrophage killing effector functions and survival in mice. *Mucosal Immunol.* 11, 496–511 (2018).
15. C. Pracht, S. Minguet, M. Leitges, M. Reth, M. Huber, Association of protein kinase C- δ with the B cell antigen receptor complex. *Cell. Signal.* 19, 715–722 (2007).
16. I. J. Popoff, J. P. Deans, Activation and tyrosine phosphorylation of protein kinase C δ in response to B cell antigen receptor stimulation. *Mol. Immunol.* 36, 1005–1016 (1999).

17. A. Limnander, J. Zikherman, T. Lau, M. Leitges, A. Weiss, J. P. Roose, Protein kinase C δ promotes transitional B cell-negative selection and limits proximal B cell receptor signaling to enforce tolerance. *Mol. Cell. Biol.* 34, 1474–1485 (2014).
18. I. Mecklenbräuker, S. L. Kalled, M. Leitges, F. Mackay, A. Tarakhovsky, Regulation of B-cell survival by BAFF-dependent PKC δ -mediated nuclear signalling. *Nature* 431, 456–461 (2004).
19. P. Ou, A. Stanek, Z. Huan, C. A. J. Roman, C. Huan, SMS2 deficiency impairs PKC δ -regulated B cell tolerance in the germinal center. *Cell Rep.* 36, 109624 (2021).
20. R. Pescarmona, A. Belot, M. Villard, L. Besson, J. Lopez, I. Mosnier, A.-L. Mathieu, C. Lombard, L. Garnier, C. Frachette, T. Walzer, S. Viel, Comparison of RT-qPCR and Nanostring in the measurement of blood interferon response for the diagnosis of type I interferonopathies. *Cytokine* 113, 446–452 (2019).
21. A. Sachinidis, K. Xanthopoulos, A. Garyfallos, Age-Associated B Cells (ABCs) in the Prognosis, Diagnosis and Therapy of Systemic Lupus Erythematosus (SLE). *Mediterr. J. Rheumatol.* 31, 311–318 (2020).
22. S. Nanthapaisal, E. Omoyinmi, C. Murphy, A. Standing, M. Eisenhut, D. Eleftheriou, P. A. Brogan, Early-Onset Juvenile SLE Associated With a Novel Mutation in Protein Kinase C δ . *Pediatrics* 139, e20160781 (2017).
23. L. Lei, S. Muhammad, M. Al-Obaidi, N. Sebire, I. L. Cheng, D. Eleftheriou, P. Brogan, Successful use of ofatumumab in two cases of early-onset juvenile SLE with thrombocytopenia caused by a mutation in protein kinase C δ . *Pediatr. Rheumatol. Online J.* 16, 61 (2018).
24. J.-M. Andre, R. Cimaz, B. Ranchin, C. Galambrun, Y. Bertrand, R. Bouvier, F. Rieux-Laucat, M. C. Trescol-Biemont, P. Cochat, N. Bonnefoy-Berard, Overexpression of the antiapoptotic gene Bfl-1 in B cells from patients with familial systemic lupus erythematosus. *Lupus* 16, 95–100 (2007).
25. A. Henriques, L. Teixeira, L. Inês, T. Carvalheiro, A. Gonçalves, A. Martinho, M. L. Pais, J. A. P. da Silva, A. Paiva, NK cells dysfunction in systemic lupus erythematosus: relation to disease activity. *Clin. Rheumatol.* 32, 805–813 (2013).
26. C. A. Biron, K. B. Nguyen, G. C. Pien, L. P. Cousens, T. P. Salazar-Mather, Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 17, 220 (1999).
27. D. Fruman, J. Limon, Akt and mTOR in B Cell Activation and Differentiation. *Front. Immunol.* 3 (2012) (available at <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2012.00228>).

28. L. Srinivasan, Y. Sasaki, D. P. Calado, B. Zhang, J. H. Paik, R. A. DePinho, J. L. Kutok, J. F. Kearney, K. L. Otipoby, K. Rajewsky, PI3 Kinase signals BCR dependent mature B cell survival. *Cell* 139, 573–586 (2009).
29. M. López-Nevado, L. I. González-Granado, R. Ruiz-García, D. Pleguezuelo, O. Cabrera-Marante, N. Salmón, P. Blanco-Lobo, N. Domínguez-Pinilla, R. Rodríguez-Pena, E. Sebastián, J. Cruz-Rojo, P. Olbrich, J. Ruiz-Contreras, E. Paz-Artal, O. Neth, L. M. Allende, Primary Immune Regulatory Disorders With an Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome-Like Phenotype: Immunologic Evaluation, Early Diagnosis and Management. *Front. Immunol.* 12, 671755 (2021).
30. S. Meynier, F. Rieux-Laucat, FAS and RAS related Apoptosis defects: From autoimmunity to leukemia. *Immunol. Rev.* 287, 50–61 (2019).
31. S. F. Smith, S. E. Collins, P. G. Charest, Ras, PI3K and mTORC2 – three’s a crowd? *J. Cell Sci.* 133, jcs234930 (2020).
32. A. M. Ohm, A.-C. Tan, L. E. Heasley, M. E. Reyland, Co-dependency of PKC δ and K-Ras: inverse association with cytotoxic drug sensitivity in KRAS mutant lung cancer. *Oncogene* 36, 4370–4378 (2017).
33. A. Limnander, P. Depeille, T. S. Freedman, J. Liou, M. Leitges, T. Kurosaki, J. P. Roose, A. Weiss, STIM1, PKC- δ and RasGRP set a threshold for proapoptotic Erk signaling during B cell development. *Nat. Immunol.* 12, 425–433 (2011).
34. T. Bíró, Z. Griger, E. Kiss, H. Papp, M. Aleksza, I. Kovács, M. Zeher, E. Bodolay, T. Csépany, K. Szûcs, P. Gergely, L. Kovács, G. Szegedi, S. Sipka, Abnormal Cell-Specific Expressions of Certain Protein Kinase C Isoenzymes in Peripheral Mononuclear Cells of Patients with Systemic Lupus Erythematosus: Effect of Corticosteroid Application. *Scand. J. Immunol.* 60, 421–428 (2004).
35. M. Teixeira, B. F. Py, C. Bosc, D. Laubretton, M.-J. Moutin, J. Marvel, F. Flamant, S. Markossian, Electroporation of mice zygotes with dual guide RNA/Cas9 complexes for simple and efficient cloning-free genome editing. *Sci. Rep.* 8, 474 (2018).

Acknowledgments: We acknowledge the contribution of the SFR Biosciences (UAR3444/CNRS, US8/Inserm, ENS de Lyon, UCBL) facilities: ANIRA-Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris (PBES), ANIRA-Cytométrie, PSF and ANIRA-AGC.

Funding: This work was supported by Agence Nationale pour la Recherche (ANR JCJC to AB), Fondation pour la Recherche Médicale (FDT202106012999), and by institutional grants from INSERM, CNRS, Université Lyon I and ENS de Lyon.

Author contributions: MMo designed, performed, and analyzed experiments. ALM performed experiments and analyzed the data. KP, QR, AD, PD, MMe, JZ, LF, NR, MA, AR, OO, ED, VL, and SD provided technical assistance for some experiments. OT, MD, LG, TD, PSS and AM provided conceptual input for some of the experiments and help for writing the manuscript. TW and AB designed the study, analyzed the data, and wrote the manuscript. MMo prepared the initial draft. T. Walzer and A. Belot reviewed and finalized the paper.

Competing interests: The authors have no competing interests.

Figure legends

Figure 1: Autoimmune phenotype in *Prkcd*^{G510S/G510S} mice

(A) Cartoon showing the method used to generate *Prkcd*^{G510S/G510S} mice using CrispR/Cas9 mediated genome editing. (B) Capillary electrophoresis analysis of PKC- δ expression in lymphoid organs of the indicated mice (representative of two independent experiments). (C) Survival curves of *Prkcd*^{+/+} (n=126), *Prkcd*^{+/G510S} (n=20) and *Prkcd*^{G510S/G510S} (n=43) mice (left: all sex combined, and right: sex indicated; *Prkcd*^{+/+} females=45, males=81; *Prkcd*^{G510S/G510S} females=8, male=35). Statistical test: Mantel-Cox. (D) Spleen size and cellularity in *Prkcd*^{+/+} (n females=12), (n males=19) and *Prkcd*^{G510S/G510S} (n females=12), (n males=19) mice. Statistical test: Mann-Whitney using FDR adjustment. (E) Microscopy analysis of kidney inflammation. Hematoxylin-eosin staining (left) and anti-mouse IgG staining (right) of kidney sections (x40). (F) Proteinuria in mice aged 5-6 months (n=7) as measured using Albustix dipstick. Statistical test: Mann-Whitney. (G) Detection of anti-nuclear antibodies by labeling Hep2 cells with serum from the indicated mice. (H) Quantification of dsDNA-IgG, rheumatoid factor (RF) and (I) total IgM and IgG as measured by ELISA in the serum of mice of the indicated age. For each group, n=6; statistical test: Mann-Whitney. (J) IFN score in blood cells of the indicated mice (n=29). Statistical test: Unpaired t-test. Scale bar, 20 μ m. Data are presented as the mean \pm SD; no marks indicate lack of statistical significance.

Figure 2: Alteration of immune cell populations in *Prkcd*^{G510S/G510S} mice

(A) Flow cytometry analysis of NK cells, macrophages, neutrophils, eosinophils, plasmacytoid (pDC) and conventional (cDC) dendritic cells (left histogram, n=5), CD4+ and CD8+ T cells (middle histogram, n=13) or B cells (right histogram n=9-22). Data show the percentages of indicated subsets among live cells in cell suspensions from spleen (left and middle) or indicated organs (right) of *Prkcd*^{+/+} and *Prkcd*^{G510S/G510S} mice. Statistical test: Mann-Whitney. (B) Flow cytometry analysis of B cell FSC-A in BM, spleen and LN of the indicated mice. Left: representative FACS panels; Right: Dot plots showing normalized mean FSC-A in different experiments. Statistical test: Mann-Whitney. (C) Normalized mean fluorescence intensity (MFI) of CD69, MHCII and CD86 staining in gated B cells from the spleen of the indicated mice, as measured by flow cytometry (n=9

in three independent experiments, MFI relative to WT levels). Statistical test: Mann-Whitney. **(D-G)** Flow cytometry analysis of the frequency of indicated B cells subsets in the BM (n=7) **(D)** or spleen (n=5-19) **(E-G)** of the indicated mice. Statistical test: Mann-Whitney. **(H-J)** Flow cytometry analysis of mixed BM chimeras, reconstituted with a 1:1 mixture of BM from CD45.1⁺ WT mice and BM from CD45.2⁺ mice (WT or *Prkcd*^{G510S/G510S} as indicated). The following parameters were analyzed: **(H)** frequency of total B cells among cells of the indicated genotype; **(I)** MFI of CD69, MHCII and CD86 staining in gated B cells of the indicated genotype; **(J)** frequency of MZ B cells, ABC, PC cells in total B cells of the indicated genotype. Statistical test: Wilcoxon matched-pairs signed rank. Lines connect data obtained for the same chimeric mice. Chimeric mice (n=6-9 for each combination) were analyzed 8-12 weeks post transplantation. Data are presented as the mean ± SD; no mark indicates lack of statistical significance.

Figure 3: B cell autonomous role of the *Prkcd*^{G510S/G510S} mutation in autoimmunity

Mixed BM chimeras were generated by reconstituting mice with a 4:1 mixture of BM from μ MT mice and BM from WT or *Prkcd*^{G510S/G510S} mice. **(A)** Capillary electrophoresis analysis of PKC- δ expression in purified B cells and non-B cells from the spleen of the indicated mice. **(B)** Spleen size and cells number in spleen of *Prkcd*^{+/+} and *Prkcd*^{G510S/G510S} mice (n=5-6). Statistical test: Mann-Whitney. **(C)** Hematoxylin eosin staining (left) and immunofluorescence staining with anti-mouse IgG antibody (right) of kidneys sections of the indicated mice (x40). **(D)** IFN score in blood cells of the indicated mice (n=6). Statistical test: Mann-Whitney. **(E)** Detection of anti-nuclear antibodies by labeling Hep2 cells with serum from the indicated mice. **(F)** Quantification of dsDNA-IgG, rheumatoid factor (RF), IgM and IgG by ELISA in serum from the indicated mice. For each group, n=6; statistical test: Mann-Whitney. The chimeric mice (n=5-6 for each genotype in two independent experiments) were analyzed 8-12 weeks post transplantation. Scale bar, 20 μ m. Data are presented as the mean ± SD; no mark indicates lack of statistical significance.

Figure 4: Elevated PI3K/AKT/mTor signaling in B cells with *Prkcd*^{G510S/G510S} mutation

(A) Flow cytometry analysis of B cell proliferation upon stimulation with α IgM and α CD40 antibodies, as measured by CTV dilution. (Left) Representative Histograms; (Right) Percentage of B cells in each division round (n=13, data pooled from 4 independent experiments). Statistical test: Bonferroni multiple comparisons. **(B)** Flow cytometry analysis of B cell viability following *in vitro* culture without stimulation. Results are normalized to the WT condition at the 48h time point (n=8 in two independent experiments). Statistical test: Mann-Whitney. **(C)** RNAseq analysis of gene transcription of *Prkcd*^{+/+} and *Prkcd*^{G510S/G510S} B cells at basal state or 4 hours after BCR stimulation (n = 3 per group). Volcano plots of differential expression and p-value are shown. Genes significantly up regulated or down regulated in *Prkcd*^{G510S/G510S} B cells are shown in red and in grey respectively (p-value threshold=0.05). **(D)** Functional annotation of differentially expressed genes between groups upon BCR stimulation using Metascape. Bar graphs show selected terms among the most significant ones. **(E-G)** Flow cytometry analysis of different phosphorylation events in gated B cells from the spleen of *Prkcd*^{+/+}, *Prkcd*^{G510S/G510S} or BM chimera mice following stimulation with α IgM antibodies for different times. **(E)** Representative FACS histogram plots (top) and dot plots (one dot=one mouse bottom) of mean fluorescence intensity (MFI) of pSyk, pBtk, pErk, pAkt and pS6 stainings in *Prkcd*^{G510S/G510S} vs WT B cells, normalized to the unstimulated WT condition (bottom) (n=6, data pooled from two independent experiments). Statistical test: Bonferroni multiple comparisons. **(F)** Dot plots of MFI of 4EBP-1 and PIP3 stainings in *Prkcd*^{G510S/G510S} vs WT B cells, normalized to the unstimulated WT (n=3-9 in one to three independent experiments). Statistical test: Bonferroni multiple comparisons. **(G)** Dot plots of MFI of pS6 staining in gated CD45.1+ and CD45.2+ B cells from BM chimera mice (CD45.1 WT / CD45.2 *Prkcd*^{G510S/G510S}) normalized to the unstimulated WT condition (n=3-9 in one to three independent experiments). Connecting lines between dots indicate that the corresponding B cells were from the same chimeric mouse. Statistical test: Wilcoxon matched-pairs signed rank. The chimeric mice (n=4 for each genotype) were analyzed 8-12 weeks post transplantation. Data are presented as the mean \pm SD; no marks indicate lack of statistical significance.

Figure 5: Improvement of autoimmune manifestations in *Prkcd*^{G510S/G510S} mice upon rapamycin treatment

(A) Outline of the experiment showing how *Prkcd*^{G510S/G510S} mice were treated. (B) (Left) Photographs of representative spleens of *Prkcd*^{+/+} and *Prkcd*^{G510S/G510S} mice treated with vehicle (+veh) or rapamycin (+rapa). (Right) Spleen cell numbers in the different groups (n=4 in each group). Statistical test: Tukey multiple comparisons. (C) Immunofluorescence microscopy analysis of IgG and IgM deposits in kidneys. (Left) representative photographs (x40). (Right) Quantification of the staining in the different groups. Statistical test: Mann-Whitney. (D) Detection of anti-nuclear antibodies by labeling Hep2 cells with mouse serum. Analyses were made before and after treatment with rapamycin or vehicle, as indicated and mean fluorescence intensity was quantified. Statistical test: Wilcoxon matched-pairs signed rank. (E) Flow cytometry measurement of CD69, MHCII and CD80 mean fluorescence intensity (MFI) normalized to WT in gated B cells from spleen of the indicated mice (n=4 in each group). Statistical test: Tukey multiple comparisons. (F) Flow cytometry analysis of ABC, GC B cells, PC cells percentages of the indicated mice. Statistical test: Tukey multiple comparisons. (G) Flow cytometry measurement of P-S6 mean fluorescence intensity (MFI) normalized on unstimulated WT in gated B cells from spleen following treatment with α IgM of the indicated mice. Statistical test: Tukey multiple comparisons. Data are presented as the mean \pm SD; no marks indicate lack of statistical significance.

Supplementary Figure Legends

Figure S1: Other autoimmune features in *Prkcd*^{G510S/G510S} mice

(A) Representative images of LN from *Prkcd*^{+/+} and *Prkcd*^{G510S/G510S} mice. (B) Numeration of glomeruli-infiltrating cells in the glomeruli based on kidney sections stained with hematoxylin and eosin of the indicated mice. 5 glomeruli per mouse were analyzed (n=3). Statistical test: Mann-Whitney. (C) Quantification of serum dsDNA-IgM according to age of the indicated mice. For each group, n=6; statistical test: Mann-Whitney. Data are presented as the mean ± SD; no marks indicate lack of statistical significance.

Figure S2: Analysis of NK cells in *Prkcd*^{G510S/G510S} mice

(A) Flow cytometry analysis of FSC-A parameter in NK cells from the indicated mice. (Left) representative FACS histograms for each group. (Right) Dot plots showing normalized mean FSC-A in NK cells from spleen of different experiments (n=11). Statistical test: Mann-Whitney. (B) Flow cytometry analysis of Ki67 expression in NK cells from the indicated mice. (Left) representative FACS histograms for each group. (Right) Mean±SD percentage of Ki67⁺ cells in NK cells in both groups (n=7). Statistical test: Mann-Whitney. (C) Flow cytometry analysis of the proportions of NK cells subsets (n=6) in the spleen of *Prkcd*^{+/+} and *Prkcd*^{G510S/G510S} mice (n=6). Statistical test: Mann-Whitney. (D) Percentage of CD107a⁺ cells among spleen NK cells following a 4-hour stimulation with YAC-1 cells (n=6, data pooled from two independent experiments). Statistical test: Mann-Whitney using FDR adjustment. (E-G) Flow cytometry analysis of mixed BM chimeras reconstituted with a 1:1 mixture of BM from CD45.1⁺ WT mice and BM from CD45.2⁺ WT or CD45.2⁺ *Prkcd*^{G510S/G510S} mice. (E) Percentage of NK cells derived from each donor genotype in the spleen (n=6 in each group, data pooled from two independent experiments). Statistical test: Wilcoxon matched-pairs signed rank. (F) Proportions of NK cell subsets of each genotype in the spleen (n=6, data pooled from two independent experiments). Statistical test: Wilcoxon matched-pairs signed rank. (G) Percentage of CD107a⁺ cells in spleen NK cells of each genotype following a 4 hour stimulation with YAC-1 cells (n=6, pooled from two independent experiments). In E-G, connecting lines between dots indicate that cells from the indicated genotype were from the same chimeric

mouse. Data are presented as the mean \pm s.d; no marks indicate lack of statistical significance.

Figure S3: B cell phenotype and proliferation in *Prkcd*^{G510S/G510S} mice

(A) Flow cytometry analysis of Ki67 positive cells (n=6) in gated B cells from spleen of the indicated mice. Statistical test: Mann-Whitney. (B) Flow cytometry measurement of Ki67⁺ expression in B cell subsets from BM (CD19^{int}B220^{int}, CD19^{high}B220^{high}) and from spleen (T1, T2, T3, FO, MZ, PC, CD21-CD23⁻, ABC) of the indicated mice. Statistical test: Mann-Whitney (n=7). (C) Flow cytometry analysis of B cell proliferation upon stimulation with α IgM antibodies, as measured by CTV dilution. Percentage of B cells in each division round (n=15, data pooled from 5 independent experiments). Statistical test: Bonferroni multiple comparisons. (D) Flow cytometry analysis of B cell proliferation induced by LPS. Representative FACS histograms (left) and mean \pm SD percentage of divided B cells (right, n=9, data pooled from three independent experiments). Statistical test: Mann-Whitney. (E) Flow cytometry analysis of pERK in gated B cells from spleen of the indicated mice following stimulation with thapsigargin. Results show mean fluorescence intensity (MFI) of pERK staining, normalized to the level in unstimulated WT B cells. (n=7, data pooled from three independent experiments). Statistical test: Bonferroni multiple comparisons.

Figure S4: Interferon signature in *Prkcd*^{G510S/G510S} mice treated with vehicle and rapamycin

(A) Measurement of the IFN score in blood cells before and after treatment in *Prkcd*^{G510S/G510S} mice (n=4 in each group). Statistical test: Mann-Whitney.

Fig. 1

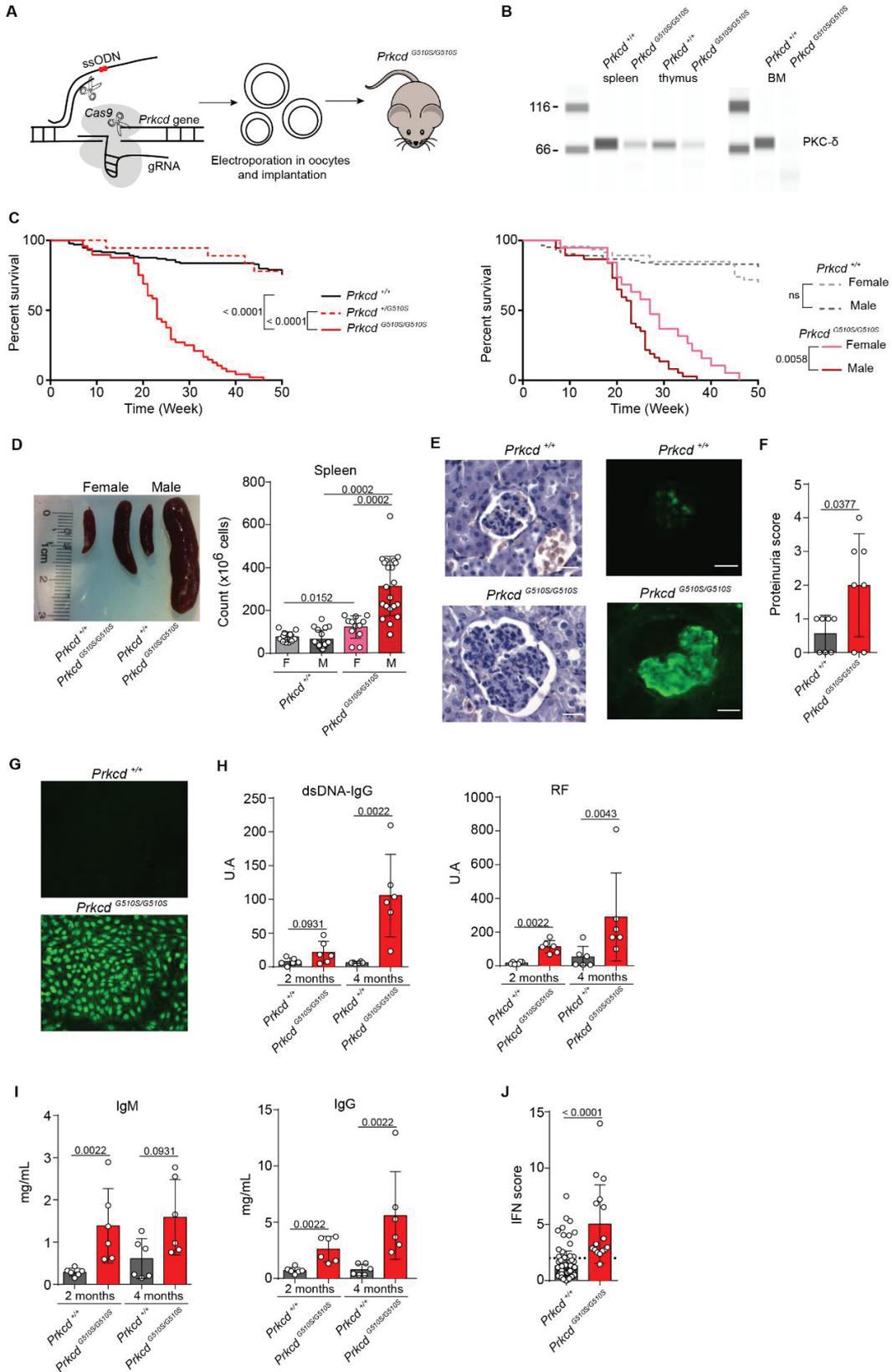


Fig. 2

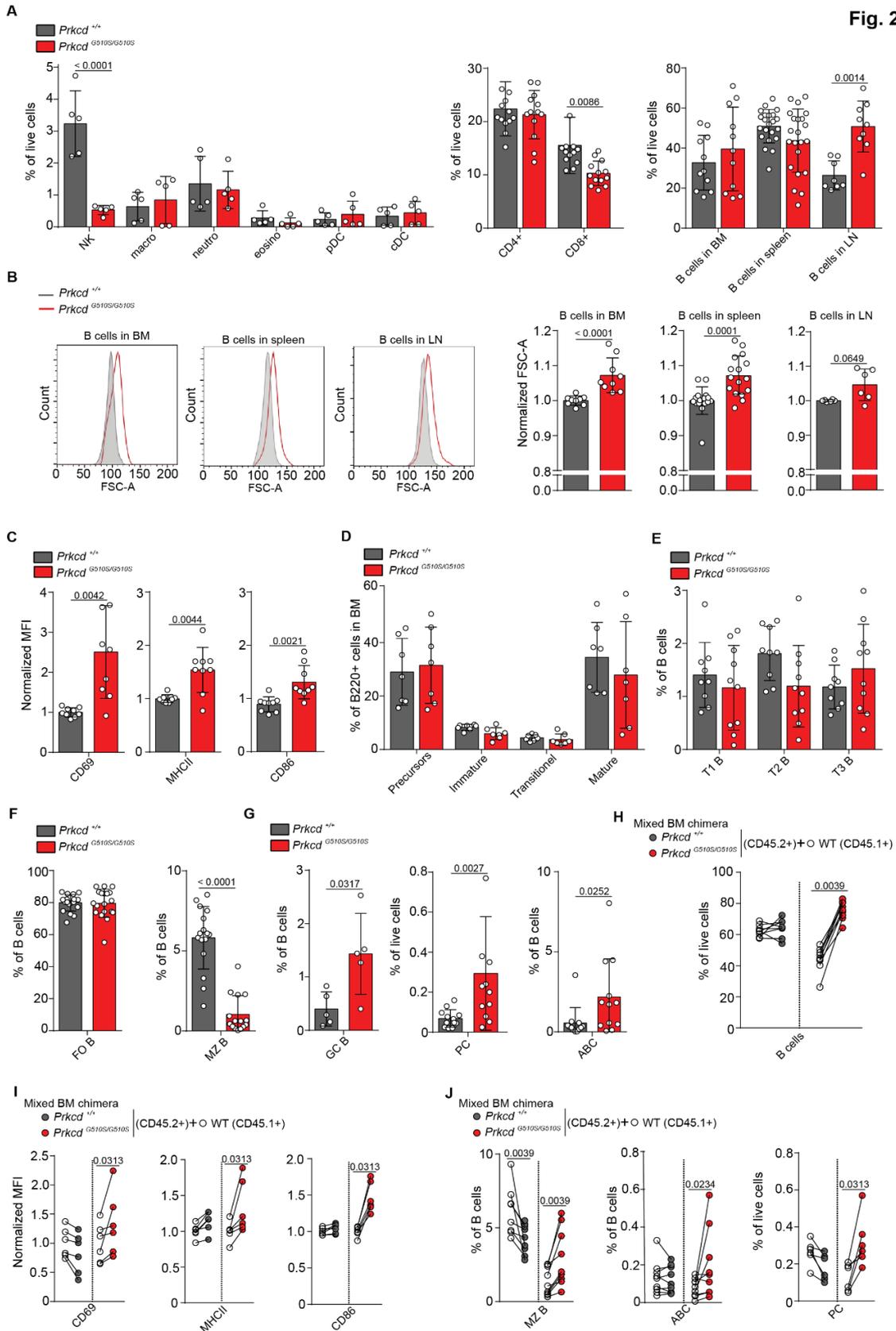


Fig. 3

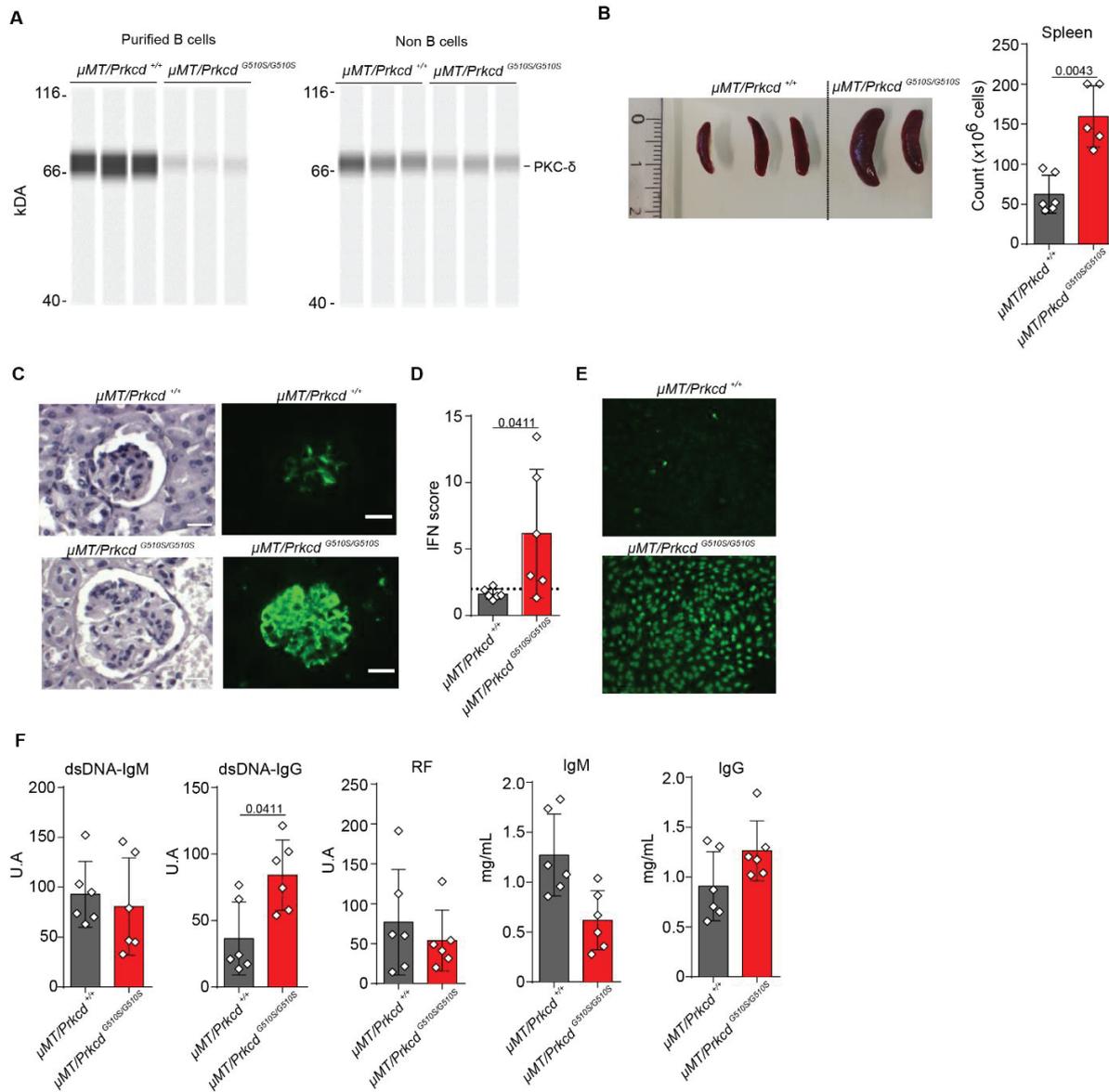


Fig. 4

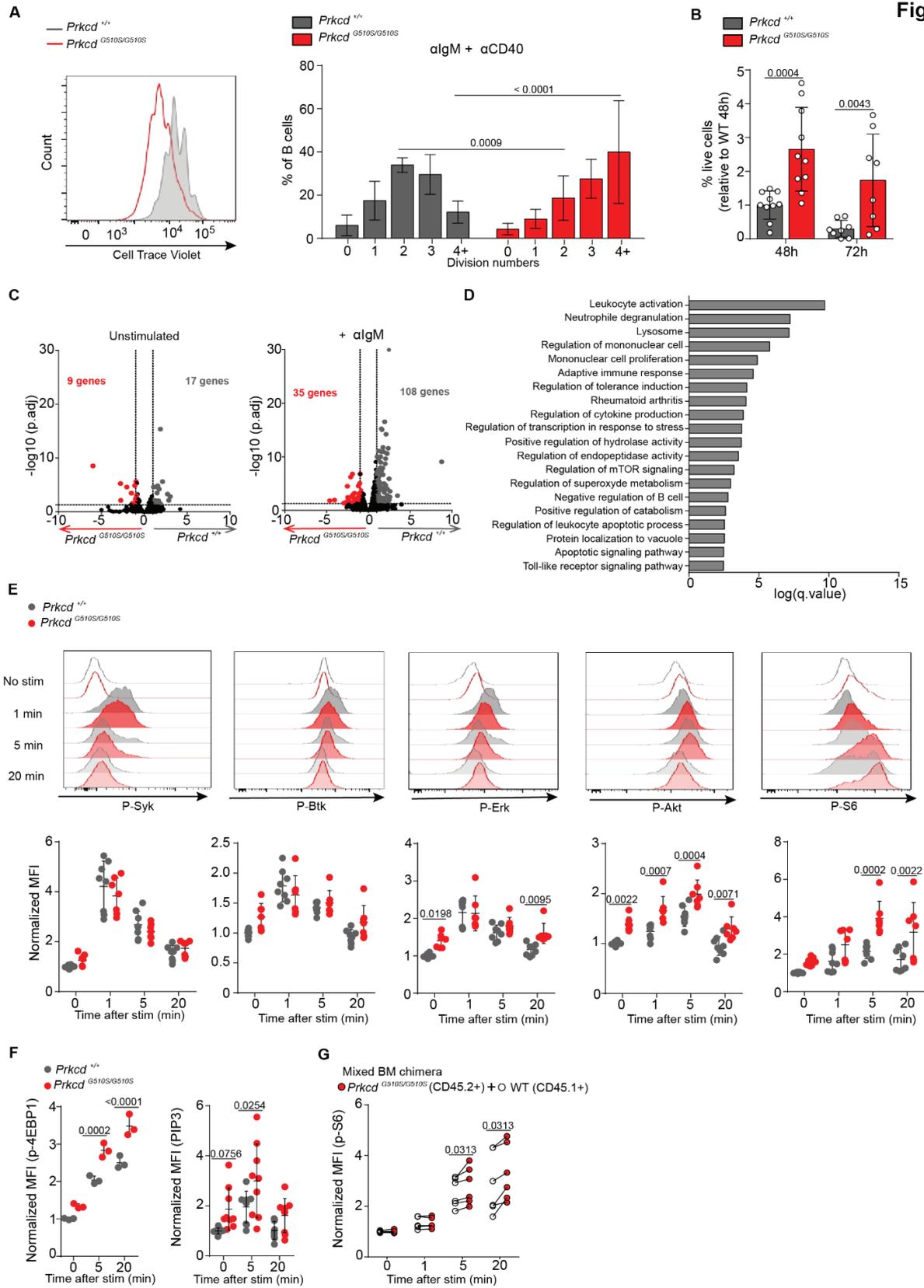
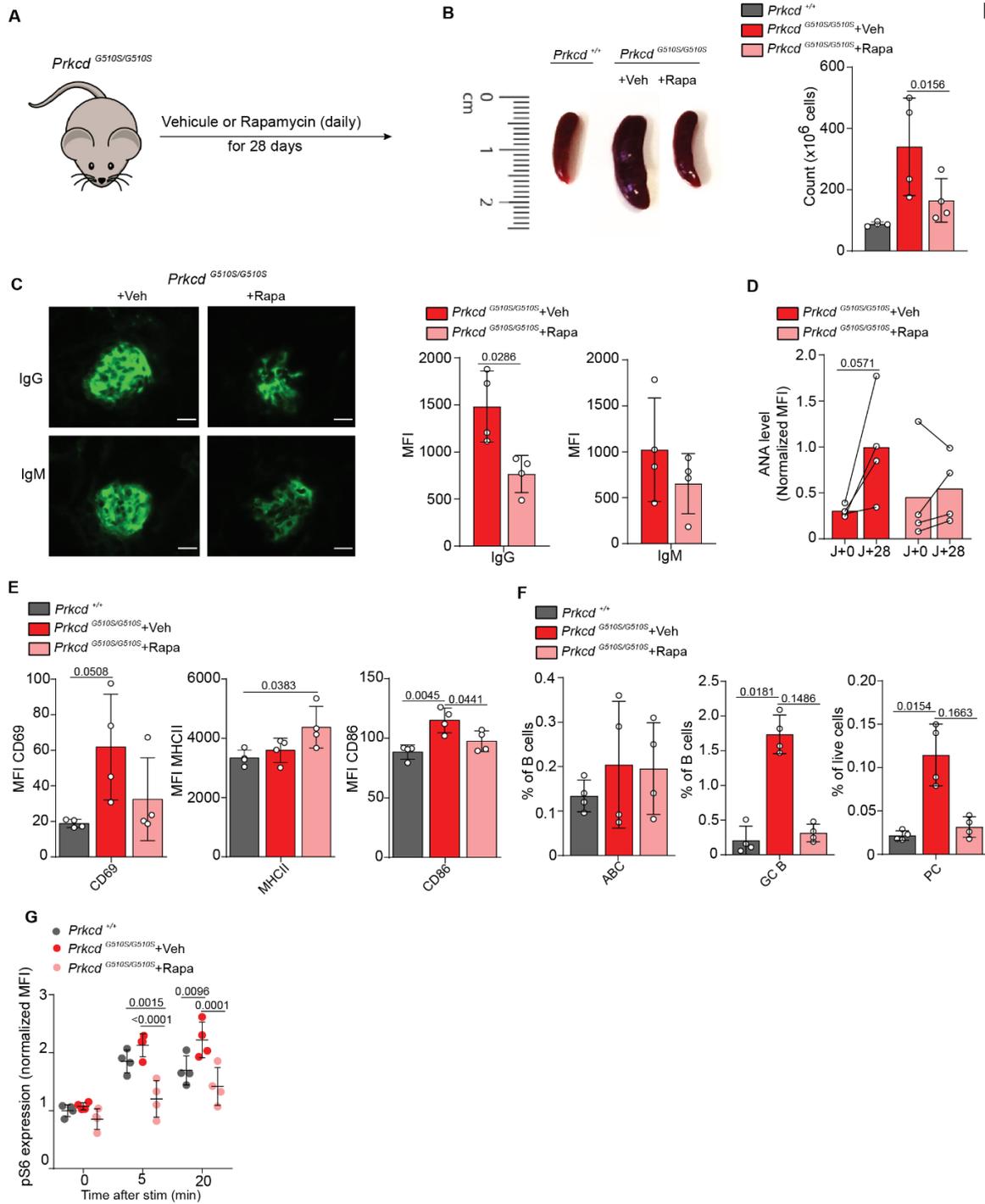


Fig. 5



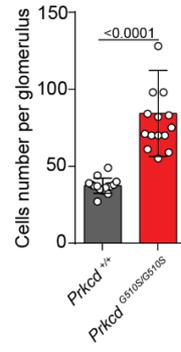
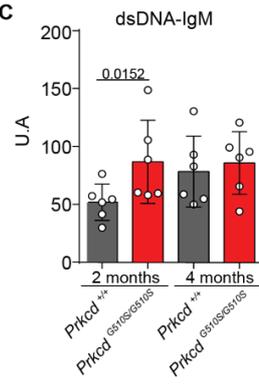
A**B****C****Fig. S1**

Fig. S2

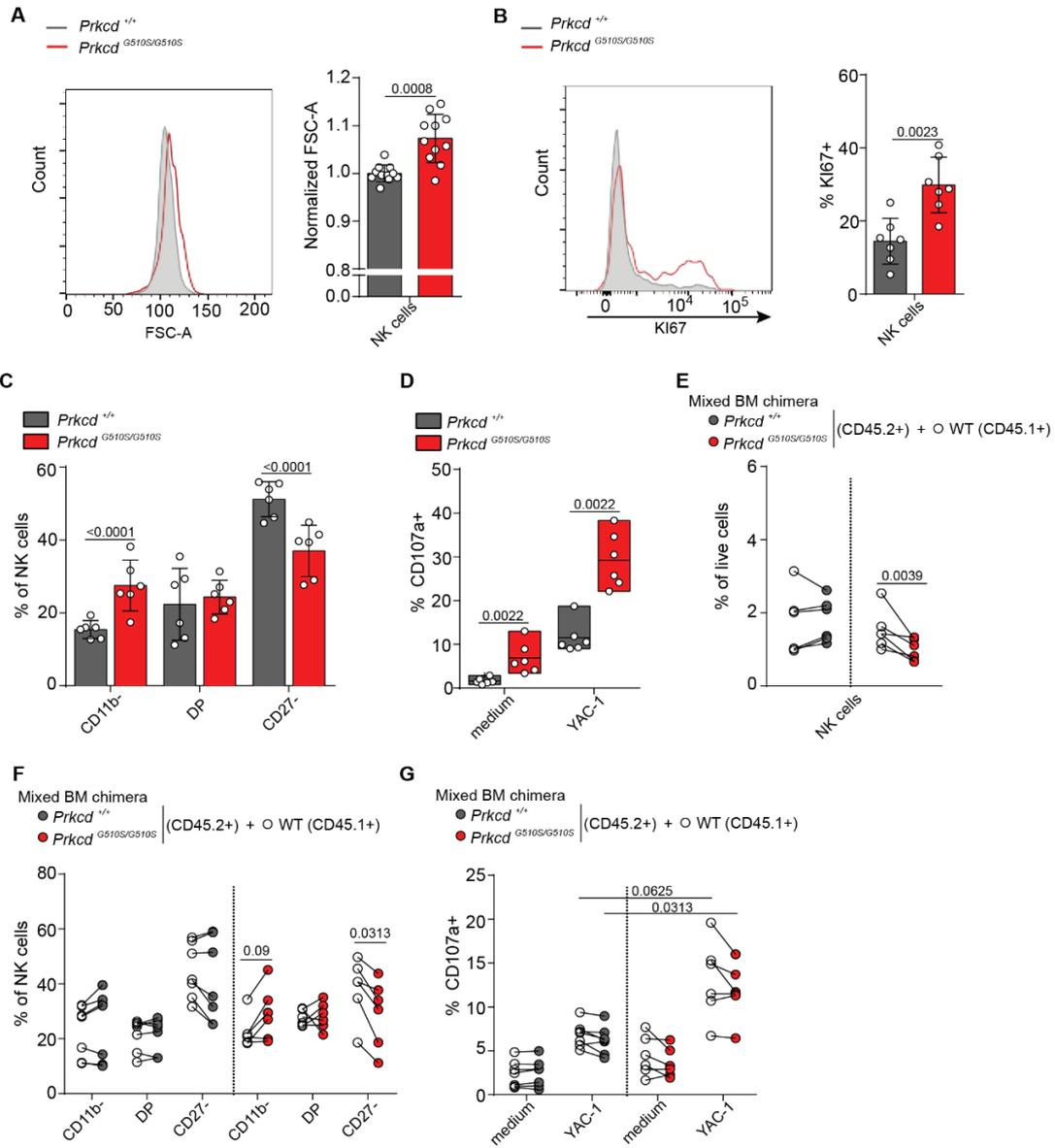


Fig. S3

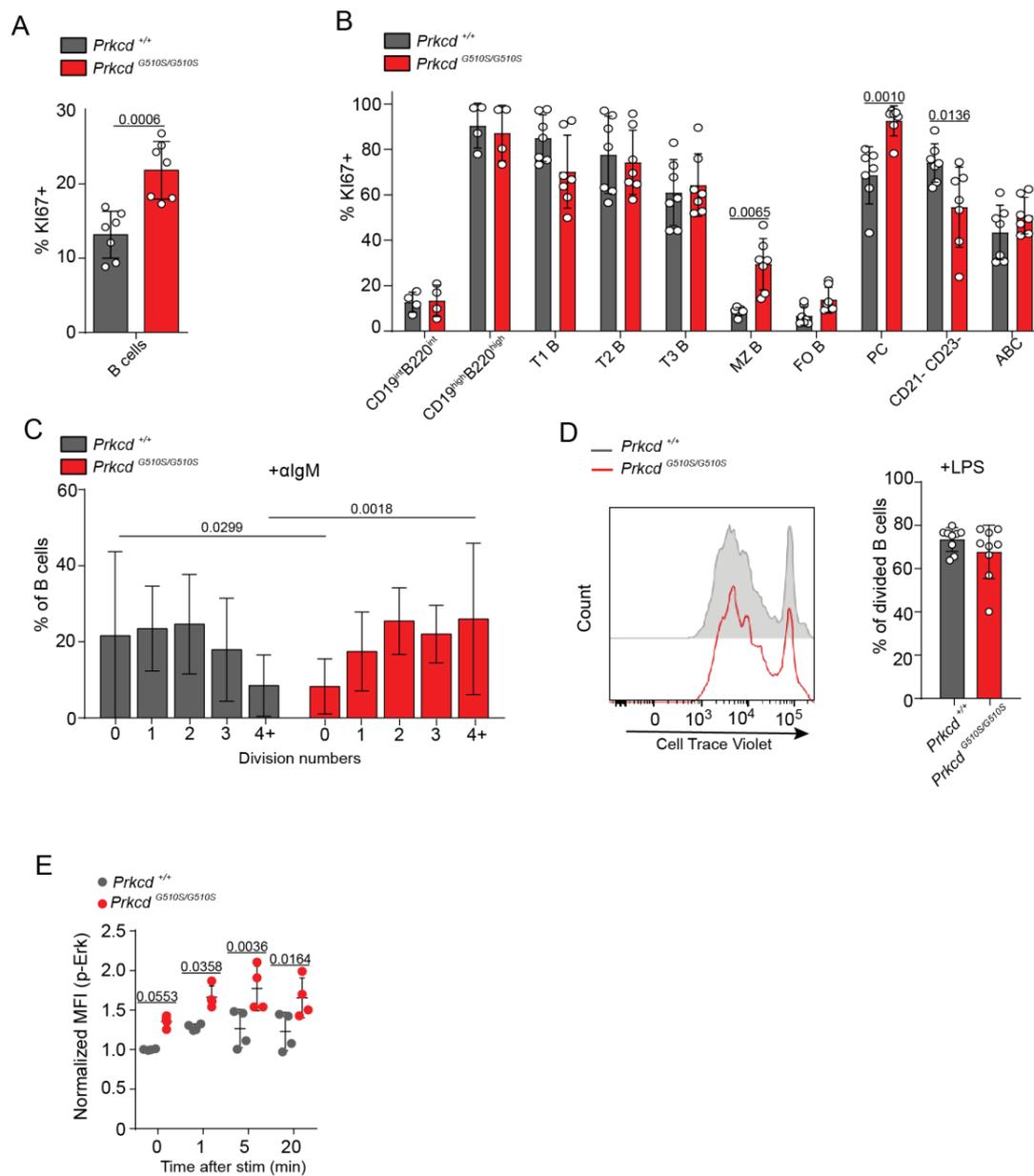
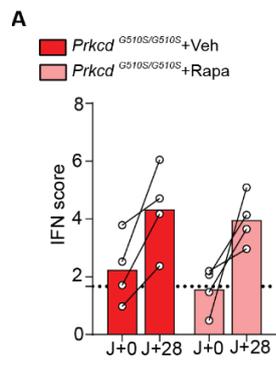


Fig. S4



1.2/ Résultats complémentaires de l'article 1

1.2.1/ Rôle de PKC- δ dans la production d'IFN- α

Nous avons vu dans l'article 1 que les souris homozygotes pour la mutation *Prkcd* G510S développaient de manière précoce un phénotype auto-immun sévère. Nos travaux se sont focalisés principalement sur les LB. Nous avons notamment montré que grâce au modèle μ MT/*Prkcd*^{G510S/G510S}, que les LB porteurs de la mutation suffisaient à l'apparition de symptômes auto-immuns. Néanmoins, le rôle des IFN-I dans le LES n'est plus à démontrer et au vu du peu de littérature traitant du lien entre PKC- δ et l'IFN-I, nous avons voulu savoir ce qu'il en était dans notre modèle.

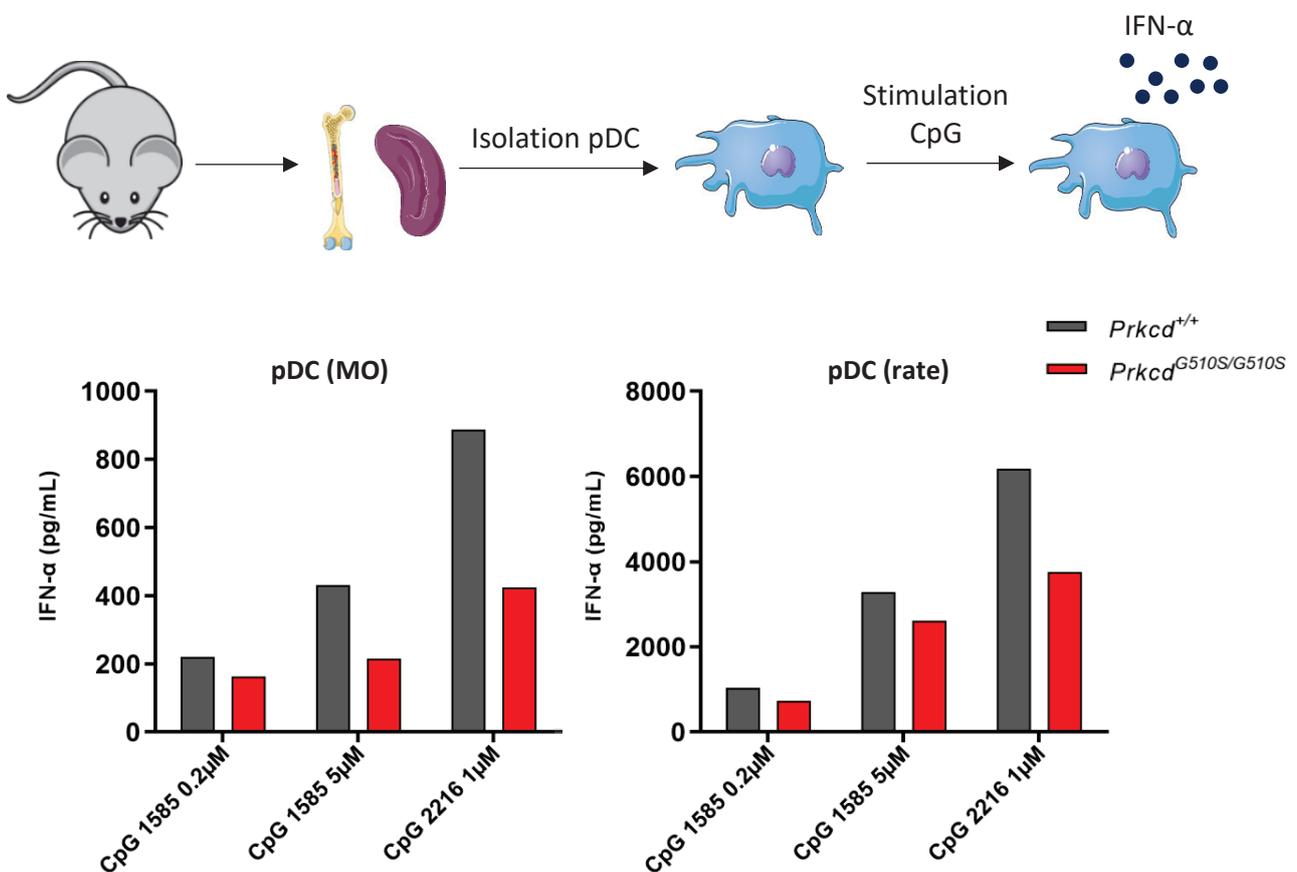


Figure 34 : Production d'IFN- α par les pDC des souris *Prkcd*^{+/+} et *Prkcd*^{G510S/G510S}

Les pDC ont été isolées à partir de la MO ou de la rate provenant de 3 souris *Prkcd*^{+/+} et 3 souris *Prkcd*^{G510S/G510S}. Au vu du faible nombre de pDC retrouvé dans ces organes, les pDC provenant de chaque groupe de souris ont été regroupées. 5×10^4 pDC ont été exposées à différentes concentrations de ligand de TLR9 (CpG 1585 et 2216) pendant 18 heures. Le surnageant des différentes conditions ont été récupérés et un dosage d'IFN- α a été réalisé par ELISA. n=3, N=1.

Pour ce faire, des pDC extrait de la MO et de la rate de souris *Prkcd*^{+/+} et *Prkcd*^{G510S/G510S} ont été isolées et stimulées avec des ligands de TLR9 (CpG 1585 et CpG 2216). Le surnageant a été récupéré et la production d'IFN- α a été mesurée (Figure 34). De manière intéressante, la production d'IFN- α par les pDC avec la mutation G510S est plus faible comparée aux cellules contrôles quel que soit le ligand ou l'origine des pDC (MO ou rate). Ainsi, PKC- δ serait un régulateur négatif de la production d'IFN-I. Uddin et al. avaient montré sur des lignées cellulaires que PKC- δ réprimait la transduction du signal sous les récepteurs IFNAR (Uddin et al., 2002). En conséquence, PKC- δ serait impliqué sur la régulation de la voie IFN-I à plusieurs niveaux : la production directe de l'IFN-I et la transduction du signal sous les récepteurs IFNAR. Un défaut de PKC- δ réduirait alors la production d'IFN-I et pourrait favoriser les susceptibilités aux infections. Cependant, les résultats de la figure 34 sont préliminaires puisque l'expérience n'a été réalisée qu'une seule fois. L'expérience devrait être répétée afin de confirmer cette tendance. Concernant les travaux de Uddin et al., ils ont été réalisés sur des lignées cellulaires. Il n'y a pas eu de nouvelles études depuis celle-ci publiée en 2002 allant de sens et réalisées sur d'autres modèles (souris *Prkcd*^{-/-} ou cellules provenant de patients avec un déficit en PKC- δ).

1.2.2/ Tests d'inhibiteurs *in vitro* sur la signalisation du BCR

Nos résultats ont montré une augmentation de l'activité de la voie PI3K/Akt/mTOR dans les LB des souris *Prkcd*^{G510S/G510S}. Cette hausse est notamment due au rôle intrinsèque de la mutation *Prkcd*^{G510S/G510S} dans les LB. Nous avons alors traité les souris *Prkcd*^{G510S/G510S} avec la rapamycine, un inhibiteur de mTOR, et avons observé rapidement une amélioration des symptômes auto-immuns. Néanmoins, nous avons testé d'autres inhibiteurs ciblant des protéines de la voie du BCR *in vitro* dans le but d'identifier plus précisément à quel niveau de la voie de signalisation agissait PKC- δ . De manière intéressante, les inhibiteurs de SYK (Cerdulatinib et PRT062607) échouent à réduire le niveau phosphorylation de S6, représentatif de l'activité de la voie mTOR, dans les LB *Prkcd*^{G510S/G510S} (Figure 35). Toutefois, la Wortmaninn (inhibiteur de la PI3K) et la rapamycine ont un fort impact négatif sur la phosphorylation de S6 et permettent d'avoir un niveau similaire entre les LB WT et *Prkcd*^{G510S/G510S}. Ce résultat met en avant l'action spécifique de PKC- δ spécifiquement sur la voie PI3K/Akt/mTOR. Néanmoins, nous ne savons toujours pas par quel moyen PKC- δ agit sur cette voie de signalisation. Nous souhaitons alors rechercher les partenaires de PKC- δ via des études protéomiques. Pour cela, nous avons inséré par CrispR/Cas9 un "tag" en C-ter de la protéine PKC- δ dans un modèle murin qui nous permet de rechercher des interactants par masse spectrométrie après stimulation de la voie du BCR. Nous sommes actuellement dans l'attente des premiers résultats et espérons identifier des interactants de PKC- δ qui pourrait expliquer son rôle dans la régulation de la voie PI3K/Akt/mTOR.

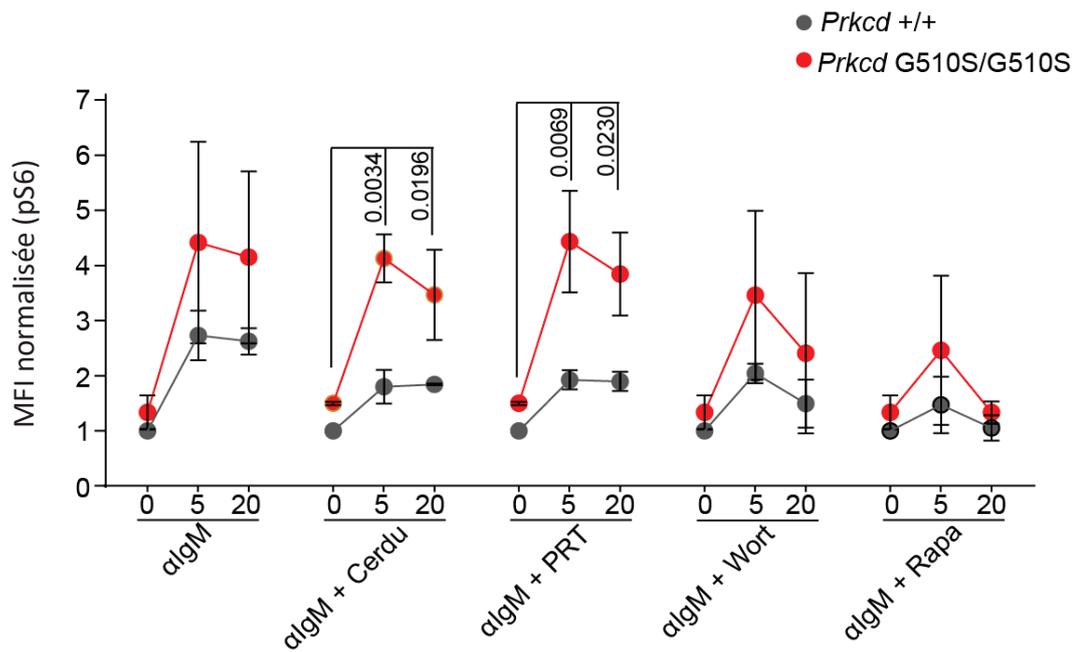


Figure 35 : Mesure de la phosphorylation de S6 en présence d'inhibiteurs dans les LB *Prkcd*^{+/+} et *Prkcd*^{G510S/G510S} après stimulation du BCR

Mesure par cytométrie de la MFI (*Mean fluorescence intensity*) de la phosphorylation de S6 normalisée sur la MFI mesurée chez les WT pour chaque expérience dans les LB de la rate après stimulation du BCR en présence ou en absence d'inhibiteurs de Syk : Cerdulatinib (Cerdu) et PRT062607 (PRT), inhibiteur de PI3K : Wortmaninn (Wort) et inhibiteur mTor : Rapamycine (Rapa). n=2 à 4. Test statistique : Comparaisons multiples avec correction de Bonferroni.

1.2.3/ Matériel et méthodes complémentaires

Stimulation des pDC in vitro en présence de ligands de TLR9

Les pDC ont été isolées en marquant les cellules avant un anticorps anti-PDCA1 Biotin et un anticorps secondaire anti-Biotin couplé à des billes sur des colonnes MACSQuant (Miltenyi). 5×10^4 cellules ont été placées en plaque 96 puits en présence de ligands de TLR9 : CpG 1585 et 2216 pendant 18 heures. Les surnageants ont été récupérés et l'IFN- α a été dosé avec le kit (PBL Interferon Source).

Stimulation des LB in vitro en présence d'inhibiteurs

Différents anticorps anti-CD45 (BD Bioscience) ont été utilisés pour barcoder les splénocytes de chaque souris afin de les stimuler dans les mêmes conditions. Les cellules barcodées ont été regroupées et incubées pendant 15 minutes à 4°C avec une concentration à 10 ug/mL de " AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgM, μ chain specific" (Jackson ImmunoResearch), puis avec une concentration à 10 ug/mL de " Rabbit anti-Goat IgG (H+L), Superclonal™ Recombinant Secondary Antibody" (Thermo Fisher scientific) pendant 15 minutes. Les cellules ont ensuite été incubées avec les inhibiteurs suivants : Cerdulatinib (Sigma-Aldrich; 20 nM), PRT062607 (Sigma-Aldrich; 11.11 nM), Wortmannin (Sigma-Aldrich; 37 nM) and Rapamycin (Merck; 1.85 nM). Enfin, les splénocytes ont été incubés à 37 °C pour les stimuler et ont été fixés en ajoutant un volume 10 fois plus important de Lyse/Fix (BD Bioscience). Les cellules ont ensuite été perméabilisées avec le kit Perm III (BD Bioscience) et marquées avec les anticorps suivants : anti-B220 (RA3-6B2) et anti-p-S6 (p240/244) (D57.2.2E). Les échantillons ont été analysés sur un appareil FACS Fortessa (Becton-Dickinson). Les données ont été analysées à l'aide de FlowJo (Treestar).

2– ÉTUDE DES MUTATIONS *IKZF1* D120V/+, *LYN* F258S/+ : Déterminer leurs rôles dans le lupus

Contrairement au premier article où nous avons étudié une mutation induisant un LES monogénique, cette deuxième étude s'est concentrée sur deux mutations potentiellement pathogéniques retrouvées en hétérozygotie chez les patientes. En outre, nous souhaitons déterminer si le concept de LES digénique peut être relevant et s'intégrer parmi les causes génétiques de LES. Pour ce projet, j'ai participé à la réalisation d'expériences *in vitro* mais j'ai principalement travaillé sur le développement et l'étude des modèles murins .

Etat de l'art :

- Des mutations de *IKZF1* sont retrouvées dans des familles avec un LES monogénique.
- Des polymorphismes de *LYN* sont associés au LES.
- Les modèles murins avec des défauts de *Ikzf1* et *Lyn* développent un phénotype auto-immun.
- Le facteur de transcription IKAROS est impliqué dans la lymphopoïèse et la mise en place des mécanismes d'anergie des LB.
- La tyrosine kinase *LYN* module de nombreuses voies de signalisation et en particulier la signalisation sous-jacente au BCR en ayant à la fois un rôle activateur et inhibiteur.

Principaux résultats :

- Le variant D120V de *IKZF1* induit une baisse de l'activité du facteur de transcription IKAROS.
- Le variant F258S de *LYN* n'altère pas l'expression de la protéine.
- Les modèles murins avec la mutation de *IKZF1* à l'état hétérozygote ou homozygote ne présentent pas de phénotype auto-immun.
- Certaines souris avec la mutation F258S de *LYN* présentent quelques symptômes relatifs à l'auto-immunité .

Impacts :

- Identification d'un variant *IKZF1* potentiellement défectueux.
- Génération de modèles murins avec les mutations de *Ikzf1* D120V et *Lyn* F258S qui pourront être utilisés pour poursuivre l'étude de ces mutations dans un contexte plus physiologique.

2.1/ Présentation de la famille avec les mutations de *IKZF1* D120V/+, *LYN* F258S/+

Des jumelles monozygotes ont été diagnostiquées pour un LES dont les premiers symptômes sont apparus à l'âge de 14 ans. Les patientes présentent une lymphopénie avec une altération de la répartition des sous-populations lymphocytaires : une diminution des compartiments B transitionnels et naïfs et une augmentation des LB mémoires (CD19⁺CD27⁺). Les patientes sont originaires de France et sont issues d'une union non-consanguine. Le père est en bonne santé tandis que la mère a été diagnostiquée pour un LES tardivement. Ses symptômes sont légers avec principalement une photosensibilité et la présence d'AAN. Le frère des patientes est atteint d'un diabète de type 1. Les données cliniques et biologiques sont présentées dans le tableau 8. Au vu des antécédents familiaux d'auto-immunité, une analyse génétique par séquençage d'un panel de 147 gènes a été réalisée. Cette liste de gènes regroupe ceux étant actuellement connus pour induire un lupus chez l'Homme et ceux potentiellement causals identifiés par GWAS et dans les modèles animaux. De cette analyse, deux mutations ont été identifiées chez les jumelles (II.2 et II.3): une mutation hétérozygote de *IKZF1* (c.359A>T;p.D120V) et une mutation hétérozygote de *LYN* (c.773T>C;p.F258S) (Figure 36). Le père (I.1) est porteur du variant de *LYN* et la mère (I.2) de la mutation de *IKZF1* à l'état hétérozygote. La sœur asymptomatique (II.4) ne possède aucun des allèles mutés tandis que nous n'avons pas ces données pour le frère (II.1). Les variants de *LYN* et *IKZF1* ne sont pas retrouvés dans les bases de données de Exac et gnomAD v2 1.1. Les prédictions sur la fonctionnalité des protéines ont classé ces variants comme délétères (analyse SIFT) ou probablement dommageables (analyse Polyphen).

	I.1	I.2	II.2	II.3	II.4
Age (years) at onset, sex (M/F)	x, M	x, F	13, F	6, F	x, F
Lupus type	x	x	Arthritis. Nephropathy Pericarditis		
Lymphocyte/ μ l (normal range)	2300 (1200-3600)	2358 (1000-2800)	894 (1000-2800)	942 (1000-2800)	x
% CD19+ (normal range)	16.8 (5.0-20.0)	7.6 (7.9-19.6)	10.4 (7.9-19.6)	1.1 (7.9-19.6)	x
%CD3+ (normal range)	70.0 (58.0-84.0)	85 (61-83)	67 (61-83)	96 (61-83)	x
Lupus anticoagulant Ab	positive	NA	NA	NA	NA
Anticardiolipin Ab (GPL/ml) Anticardiolipin IgG Anticardiolipin IgM. Other	4 (<20)	Negative	SSA+ SmRNP+	SSA+ SmRNP+ Sm+	Negative
ANA	Positive: nuclear, fine speckled 1/160	Positive:1/640, fine speckled	Positive: chromatin, homogeneous 1/1280	Positive: nuclear, fine speckled 1/1280	Negative
Farr (IU/ml)	\leq 7	<4	67.6	20.2	< 1
IgG (g/L)	8.85	4.13	13.2	13.1	12.6
IgG2	(7.51 – 15.60)	2.26	4.14	3.39	2.94
IgG3		0.16	0.62	0.72	0.49
IgA (g/L)	1.12 (0.82 – 4.53)	0.70 (0.78-4.11)	3.06 (0.78-4.11)	0.12 (0.78-4.11)	1.07 (0.43-2.68)
IgM (g/L)	0.42 (0.46 – 3.04)	0.37 (0.40-2.80)	0.63 (0.40-2.80)	0.73 (0.40-2.80)	0.86 (0.65-2.40)

Tableau 8 : Caractéristiques cliniques des patients de la famille avec les variants de *IKZF1* et *LYN*

Les deux variants induisent une substitution sur des résidus très conservés à travers les espèces (Figure 37). La mutation de *IKZF1* est localisée dans la région codant le premier doigt de zinc de la protéine IKAROS tandis que le variant de *LYN* se trouve dans le domaine kinase.

Au vu du phénotype plus sévère et précoce observé chez les patientes, comparé au LES tardif et plus léger observé chez la mère, nous avons fait l'hypothèse que l'effet combiné des deux variants pourraient favoriser le développement du LES chez ses patientes. Nous avons alors étudié l'effet de chaque variant *in vitro* et avons généré des modèles murins avec ces mutations afin d'étudier leurs implications dans le développement d'un phénotype auto-immun.

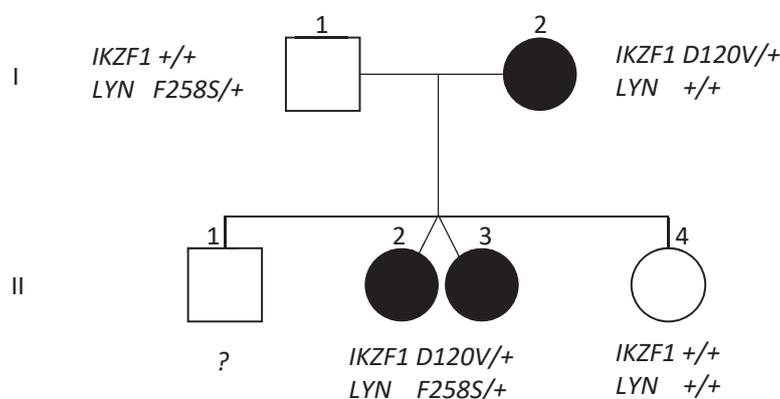


Figure 36 : Arbre généalogique de la famille avec les variants de *IKZF1* et *LYN*

Les symboles pleins représentent les individus diagnostiqués pour un LES; les symboles ouverts représentent les personnes asymptotiques. +=allèle WT.

<i>IKZF1</i>	<i>LYN</i>	
109 GIRLPNGK L KCDICGIICIG	249 LVKRLGAGQ F GEVWMGYNN	<i>H. Sapiens</i>
109 GIRLPNGK L KCDICGIVCIG	249 LVK K LGAGQ F GEVWMGYNN	<i>M. Musculus</i>
115 GIRLPNGK L KCDICGIVCIG	247 MV K KL G AGQ F GEVWMAFYNN	<i>D. Rerio</i>
109 GIRLPNGK L KCDICGIICIG	249 LVKRLGAGQ F GEVWMGYNN	<i>P. Troglodytes</i>
165 GIRLPNGK L KCDVCGIICIG	249 LVKRLGAGQ F GEVWMGYNN	<i>C. Lupus</i>
109 GIRLPNGK L KCDICGIICIG	249 LVKRLGAGQ F GEVWMGYNN	<i>M. Mulatta</i>
106 GIRLPNGK L KCDVCGIICIG	249 LVKRLGAGQ F GEVWMGYNN	<i>B. Taurus</i>
61 GIRLPNGK L KCDVCGIICIG	275 LVKRLGAGQ F GEVWMGYNN	<i>O. Aries</i>
109 GIRLPNGK L KCDICGIICIG	229 LVK K LGAGQ F GEVWMGYHN	<i>G. Gallus</i>

Figure 37 : Alignement des séquences ADN des orthologues de *IKZF1* et *LYN* dans différentes espèces

Les encadrements correspondent aux résidus modifiés par les mutations identifiées chez les patientes.

2.2/ Étude *in vitro* sur le variant *IKZF1* D120V

2.2.1/ Impact de la mutation sur l'expression de la protéine

Pour commencer, nous nous sommes intéressés à l'impact de la mutation *IKZF1* D120V sur l'expression de la protéine IKAROS. Pour cela, nous avons dans un premier temps évalué l'expression de la protéine dans des lignées cellulaires lymphoblastiques (LCL) établies à partir des cellules des patients. Nos résultats n'ont pas montré de différence d'expression entre la patiente et la mère avec la mutation (II.2, I.2) et les autres membres de la famille (I.1, II.4) (Figure 38). Néanmoins, étant donné que les patientes sont hétérozygotes pour cette mutation, une variation de l'expression de la protéine peut être difficile à évaluer. Par conséquent, nous avons transfecté des cellules HEK293T, n'exprimant pas IKAROS de manière endogène, avec un vecteur exprimant l'ADN complémentaire (ADNc) de *IKZF1* WT ou D120V. Nous avons observé que l'expression du variant *IKZF1* D120V n'impactait pas l'expression de IKAROS qui est similaire à la forme WT (Figure 39). Ces différentes expériences suggèrent que la mutation identifiée de *IKZF1* n'impacte pas l'expression de la protéine.

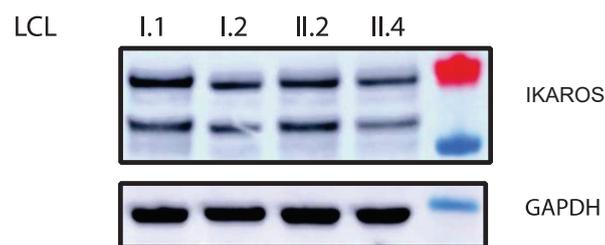


Figure 38 : Expression de IKAROS dans les LCL de patients

Détection par Western-Blot de IKAROS et GAPDH à partir de LCL établies chez les membres de cette famille.

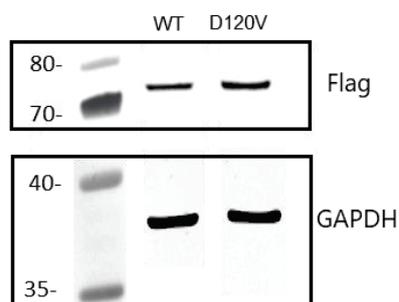


Figure 39 : Expression de IKAROS dans les cellules 293T transfectées avec *IKZF1* WT ou D120V

Détection par Western-Blot de IKAROS par une séquence "Flag" et GAPDH dans des cellules 293T transfectées un vecteur CMV3 exprimant l'ADNc de *IKZF1* WT ou D120V.

2.2.2/ Impact de la mutation sur la dimérisation et la reconnaissance de l'ADN

IKAROS agit en multimère pour réguler la transcription de ses gènes cibles en formant des homodimères ou des hétérodimères. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux capacités de dimérisation de IKAROS avec la mutation D120V. Les formes WT et mutée de *IKZF1* couplées à un tag "HA" ont été co-transfectées dans des cellules HEK293T avec *IKZF1* WT couplé à un tag "Flag", permettant de réaliser des expériences de co-immunoprécipitation. L'immunoprécipitation de IKAROS-Flag entraîne la détection de IKAROS-Tag WT et D120V de manière similaire, indiquant ainsi que la protéine IKAROS D120V est capable d'interagir avec une autre protéine IKAROS (Figure 40). Afin de confirmer que cela n'est dû à un différentiel d'expression de IKAROS selon le génotype ou les différents tags, nous avons étudié l'expression de IKAROS-HA et -Flag dans le lysat total et n'avons pas observé de différence entre les différentes formes de la protéine. La capacité de dimérisation d'IKAROS n'est donc pas affectée par le variant D120V.

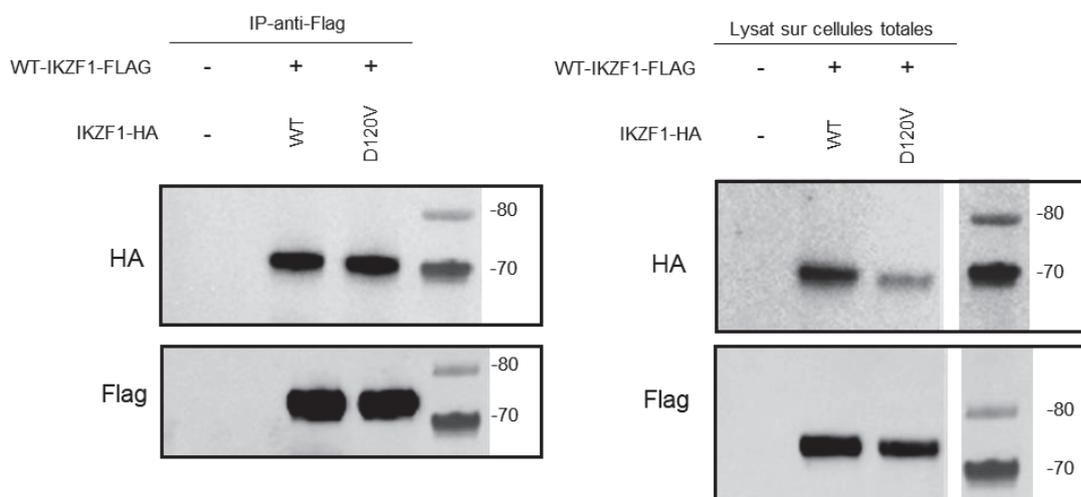


Figure 40 : Dimérisation de IKAROS WT et D120V

Les lysats cellulaires de cellules HEK293T transfectées avec IKZF1-Flag WT et IKZF1-HA WT ou D120V ont été immunoprécipités (IP) avec un anticorps anti-Flag et révélés avec un anticorps anti-Flag pour démasquer une dimérisation. Les images de Western-blot représentent la migration des échantillons de l'IP (à gauche) et de lysats de cellules entières (à droite) marquées avec un anticorps anti-HA (en haut) et un anticorps anti-Flag (en bas). Les données présentées sont représentatives de 3 expériences.

La fonctionnalité de la protéine peut également être évaluée sur sa capacité à se lier aux régions d'hétérochromatines péri-centromériques et former des foyers dans le noyau où l'on retrouve une forte concentration d'IKAROS. Les formes d'IKAROS WT, D120V et R162Q (décrite précédemment dans la littérature comme une mutation induisant une perte des capacités d'IKAROS à se lier à l'ADN) ont été chacune exprimées de manière transitoire dans des cellules NIH 3T3 et la formation de foyers a été évaluée dans chaque cellule. L'expression de *IKZF1* D120V entraîne une diminution significative du nombre de foyers formés par noyau par rapport au nombre de foyers détectés dans les cellules transfectées avec *IKZF1* WT seul (Figure 41).

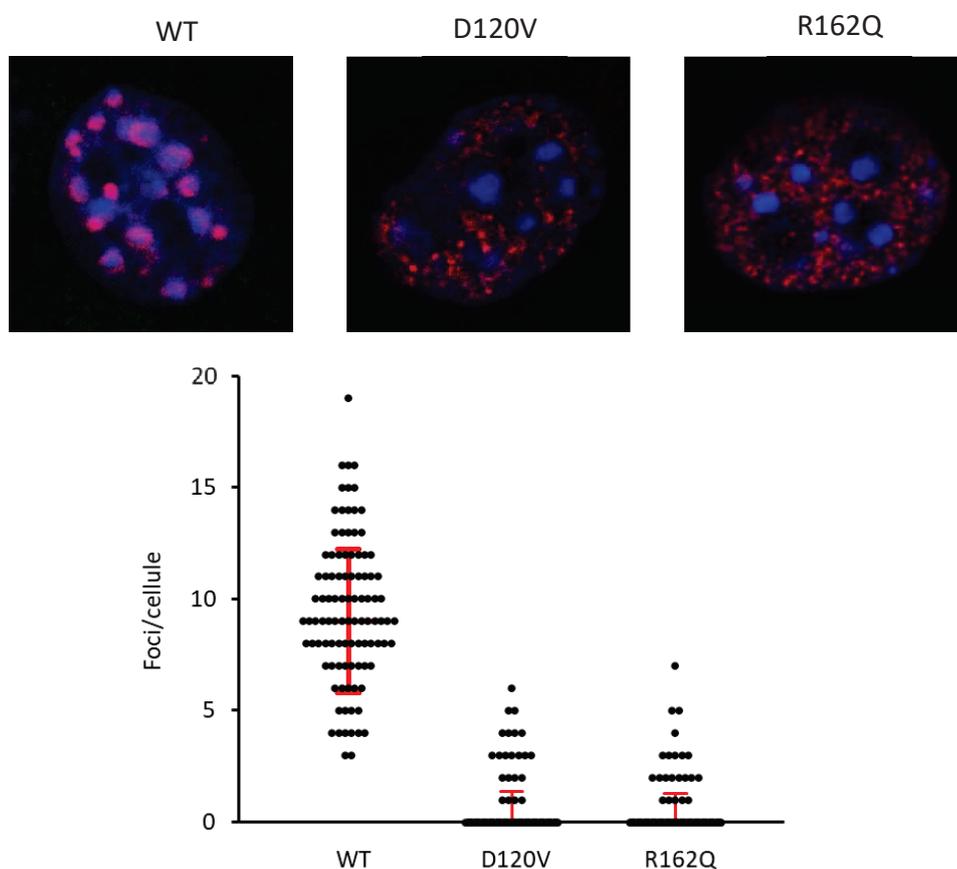


Figure 41 : Distribution intranucléaire de IKAROS WT et D120V

Les cellules NIH3T3 ont été transfectées avec IKZF1 WT ou D120V. Après 36 heures, les cellules ont été marquées avec un anticorps primaire anti-*IKZF1* et un anticorps secondaire (rouge) puis avec le DAPI. Les cellules ont été visualisées par microscopie confocale (en haut). Les foyers formés par IKAROS ont été comptés dans 100 cellules de chaque condition. Les lignes horizontales représentent l'intervalle de confiance médian à 95 %. Les données présentées sont représentatives de 1 expérience.

Ce profil d'expression est notamment similaire au variant *IKZF1* R162Q. Le variant D120V entraînerait alors une altération de la capacité de IKAROS à se lier aux régions d'hétérochromatines péri-centromériques.

Au vu de ce résultat, nous avons évalué la capacité de liaison à l'ADN de IKAROS avec la mutation D120V. La liaison de IKAROS WT et D120V à une séquence cible (IK-bs4) a été évaluée par EMSA en utilisant des extraits protéiques de cellules HEK293T transfectées avec *IKZF1* WT, D120V ou R164Q. De manière intéressante, la capacité de liaison de IKAROS D120V à la séquence de IK-bs4 est fortement réduite comparée à la forme WT comme le mutant connu R164Q (Figure 42). Ces résultats indiquent que la mutation D120V induit une diminution de la capacité de liaison à l'ADN d'IKAROS, ce qui réduirait la fonctionnalité de ce facteur de transcription.

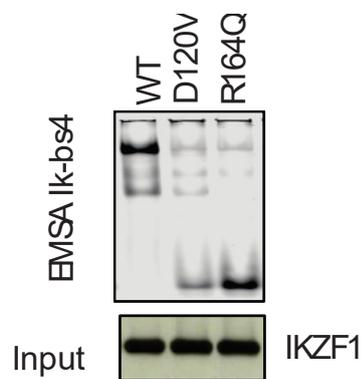


Figure 42 : Capacité de liaison à l'ADN de IKAROS WT et D120V

L'EMSA a été réalisé avec des extraits nucléaires de cellules HEK293T transfectées transitoirement avec *IKZF1* WT ou *IKZF1* D120V. *IKZF1* R162Q a été utilisé comme contrôle positif. La séquence nucléotidique IK-bs4, connue pour être une cible d'IKAROS, a été incubée à des extraits nucléaires contenant les différentes formes d'IKAROS. Puis les protéines ont été déposées sur gel d'acrylamide.

L'expression de la protéine a été contrôlée par Western-blot avec un anticorps anti-*IKAROS*. Un retard de migration est observé lorsque *IKAROS* interagit avec la sonde ADN. Les données présentées sont représentatives de 2 expériences.

2.2.3/ Impact de la mutation sur l'activité transcriptionnelle d'IKAROS

Enfin, nous avons évalué l'activité transcriptionnelle de IKAROS D120V par rapport à la forme WT. Pour cela, les formes de *IKZF1* WT et D120V ont été clonées dans un vecteur sous le contrôle d'un promoteur inductible à la doxycycline et exprimées chacune dans des cellules GRANTA. Un séquençage ARN a été réalisé dans les conditions suivantes : sans ou avec doxycycline et avec le vecteur exprimant *IKZF1* WT ou D120V. Le profil transcriptomique obtenu sans doxycycline est extrêmement similaire que ce soit en présence de *IKZF1* WT ou du variant D120V, ce qui est attendu vu que les protéines ne sont pas exprimées dans ces conditions. On observe en revanche des différences lors de l'ajout de la doxycycline lorsqu'on exprime IKAROS WT ou le variant D120V (Figure 43). Le nombre total de gènes régulés de manière positive et négative a été comptabilisé dans chaque condition. La comparaison des séquençages ARN entre la condition *IKZF1* WT +doxycycline/-doxycycline et *IKZF1* D120V +doxycycline/-doxycycline a permis d'identifier que 397 gènes étaient régulés par *IKZF1* WT alors que seulement 138 gènes

sont modulés en présence de *IKZF1* D120V. Parmi ces 138 gènes, 123 sont communs entre *IKZF1* WT et D120V. Ce résultat indique que même si IKAROS D120V continue à réguler l'expression d'un panel de gènes, la mutation D120V conduit à une diminution de l'activité transcriptionnelle d'IKAROS.

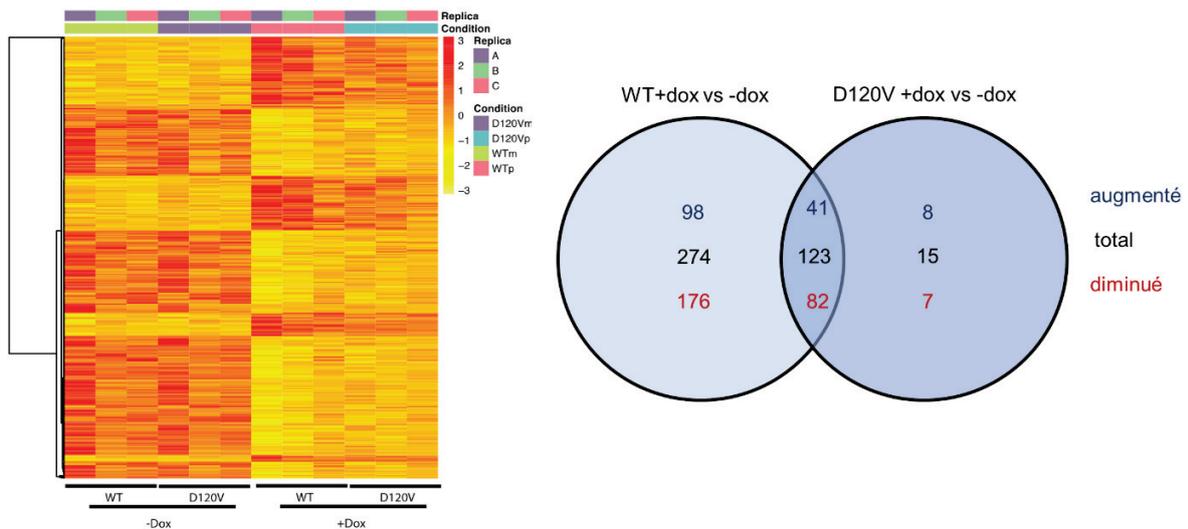


Figure 43 : Altération de la régulation des gènes sous le contrôle de IKAROS par le variant *IKZF1* D120V

Heat map montrant l'expression des gènes régulés par IKAROS dans les cellules GRANTA sans ou avec induction par la doxycycline de l'expression des *IKZF1* WT ou D120V (à gauche). Représentation du nombre de gènes totaux, augmentés ou diminués, sous le contrôle de *IKZF1* WT, *IKZF1* D120V ou les 2 (à droite).

En résumé, ces données démontrent que la mutation D120V n'altère ni l'expression ni la capacité de dimérisation de IKAROS ; néanmoins elle induit une réduction de sa faculté de liaison à l'ADN et de l'activité transcriptionnelle de la protéine. Le variant pourrait causer une altération profonde du programme transcriptionnel dans diverses cellules. Toutefois, le variant a été retrouvé à l'état hétérozygote chez les patientes. Des analyses supplémentaires dans des conditions avec un ratio 50 : 50 de *IKZF1* WT et D120V reflèteraient davantage la situation retrouvée chez les patientes.

2.3/ Étude *in vitro* sur le variant *LYN F258S*

2.3.1/ Impact de la mutation sur l'expression de la protéine

Concernant l'étude du variant *LYN*, nous avons également commencé par évaluer l'expression de la protéine dans les LCL des patients. Nos résultats n'ont pas montré de différence d'expression entre la patiente et le père avec la mutation (I.1, II.2) et les autres membres de la famille (I.2, II.4) (Figure 44). Toutefois, comme pour le variant *IKZF1*, nous avons transfecté des cellules HEK293T avec *LYN* WT et F258S. Nous avons de nouveau observé que l'expression du variant *LYN F258S* n'impactait pas l'expression de la protéine qui est similaire à la forme WT (Figure 45). Ces différentes expériences montrent que la mutation F258S de *LYN* n'impacte pas l'expression de la protéine.

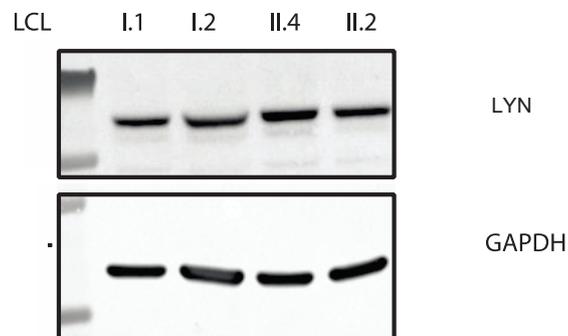


Figure 44 : Expression de *LYN* dans les LCLs de patients

Détection par Western-Blot de *LYN* et *GAPDH* à partir de LCL établies chez les membres de cette famille.

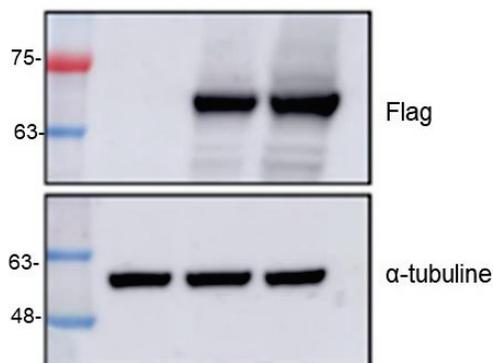


Figure 45 : Expression de *LYN* dans les cellules 293T transfectées avec *LYN* WT ou F258S

Détection par Western-Blot de *LYN* par une séquence "Flag" et de α-tubuline dans des cellules 293T transfectées un vecteur CMV3 exprimant l'ADNc de *LYN* WT ou F258S.

2.3.2/ Impact de la mutation sur l'activité de la protéine

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 5.2 de la partie bibliographie, LYN est une kinase qui est notamment capable de s'autophosphoryler sur certains résidus et d'entraîner son activation. Nous avons alors cherché à identifier l'influence de la mutation F258S sur les capacités d'auto-phosphorylation de LYN. Pour cela, les cellules HEK293T ont été transfectées avec des vecteurs exprimant LYN WT ou F258S qui ont ensuite été immunoprécipités. Nous avons alors mesuré la phosphorylation des tyrosines de LYN WT ou F258S. Nous n'avons pas observé de différence du niveau de phosphorylation des résidus tyrosine entre la forme mutée et contrôle (Figure 46). Ce résultat suggère alors que l'activité kinase de LYN n'est pas affectée par la mutation.

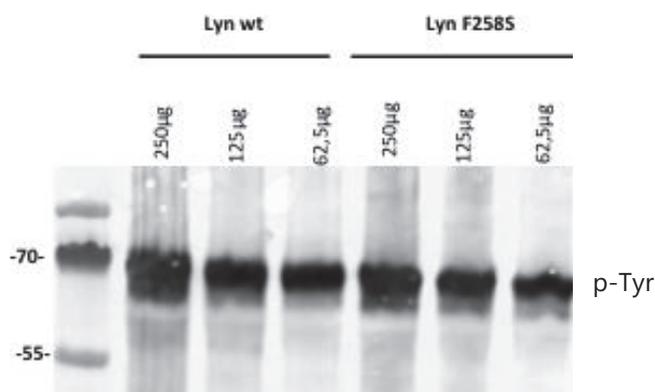


Figure 46 : Mesure de l'autophosphorylation de LYN *in vitro*

Détection par Western-Blot de la phosphorylation des tyrosines après immunoprécipitation de LYN WT ou F258S transfectées dans des cellules 293T. Les données présentées sont représentatives de 3 expériences.

Néanmoins, en absence de contrôle positif induisant une réduction de l'activité kinase, il est difficile d'évaluer la vraisemblance de ce résultat. L'ajout de ce contrôle permettrait de répondre à cette interrogation. De plus, la mesure par Western-Blot de la phosphorylation sur quelques résidus pourrait ne pas être assez fine pour révéler une différence. Par conséquent, nous essayons actuellement d'évaluer l'activité kinase à travers des tests *in vitro* mesurant la phosphorylation de peptides cibles de LYN.

En conclusion, le variant F258S de LYN n'altère pas l'expression de la protéine et ne semble pas modifier l'activité kinase de la protéine. Toutefois, ces résultats sont à confirmer grâce à l'aide de tests ayant une meilleure sensibilité.

2.4/ Étude in vivo

2.4.1/ Générations des modèles murins

Nous avons vu précédemment que le variant de *IKZF1* identifié dans l'équipe causait un défaut de l'activité transcriptionnelle de IKAROS. Quant à la mutation de *LYN*, nous n'avons pas encore déterminé l'impact de la mutation sur la protéine. Nous savons seulement que l'expression de celle-ci n'est pas altérée par la mutation. Etant donné que la souris est un modèle qui a grandement contribué à l'étude des gènes *IKZF1* et *LYN*, nous avons décidé d'étudier l'impact des mutations identifiées chez les patients chez la souris (fond C57BL/6). Cela nous permettra notamment d'identifier le rôle de chaque variant dans le développement de l'auto-immunité. Nous avons alors généré des souris avec la mutation F258S de *Lyn*, avec la mutation D120V de *Ikzf1* ou porteuses à la fois des mutations de *Lyn* et *Ikzf1* afin de reproduire la situation génétique des patientes les plus sévères. Nous avons décidé d'étudier ces différents modèles à l'état hétérozygote (comme dans la famille) ou à l'état homozygote afin de déterminer si le phénotype différait chez la souris en fonction du nombre d'allèles mutés. Les différents modèles générés sont présentés dans la figure 47.

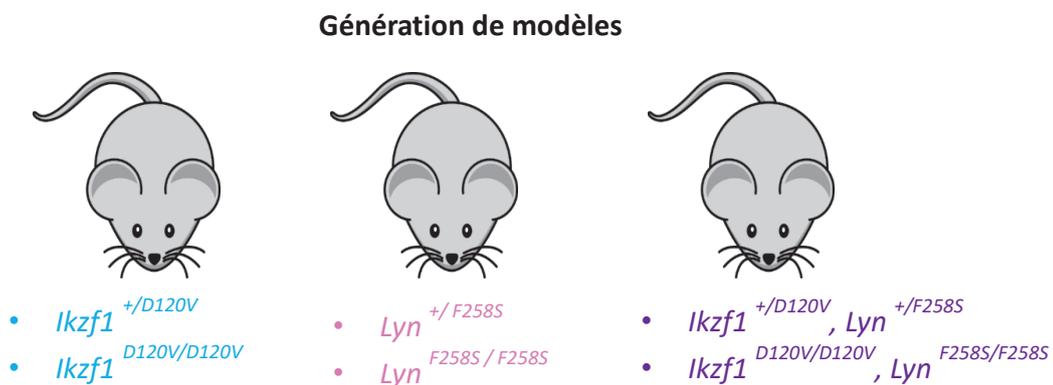


Figure 47 : Modèles de souris générées avec les mutations de *Ikzf1* et *Lyn*

Nous avons utilisé la technologie CrispR/Cas9 pour obtenir les différents modèles murins. Le séquençage par Sanger des animaux montre que les mutations ont été insérées et induisent les modifications d'acides aminés prédites sans altérer le reste des séquences (Figure 48). Dans un premier temps, nous avons suivi les premières souris générées durant 6 mois (*Lyn*^{+/F258S}; *Lyn*^{F258S/F258S}; *Ikzf1*^{+/D120V}; *Ikzf1*^{D120V/D120V}) en regardant la prise de poids, l'apparition d'AAN et la signature IFN. Nos résultats n'ont montré aucune anomalie chez les souris (données non montrées).

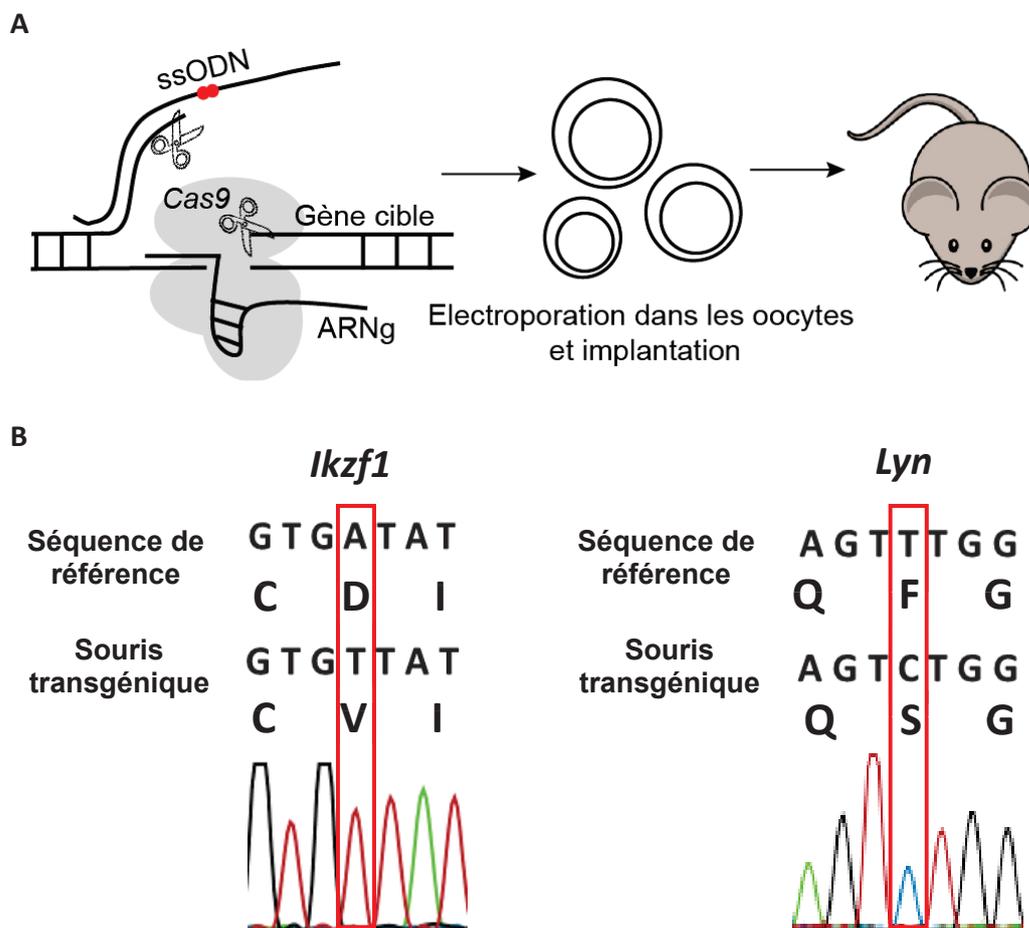


Figure 48 : Génération des modèles murins par CrispR Cas9 porteurs des mutations de *IKZF1* et *LYN* identifiées chez les patients

A/ Schéma illustrant la méthode utilisée pour la création des modèles murins.

B/ Résultat de séquençage des souris transgéniques générées. Les mutations de *Ikzf1* et *Lyn* conduisent respectivement à une substitution d'un acide aspartique (D) en valine (V) et d'une phénylalanine (F) en sérine (S).

Nous avons alors décidé d'étudier le phénotype des souris plus âgées. Cette approche est notamment motivée par le modèle WeeB portant une mutation dans *Lyn*. Pour rappel, ce modèle développe un phénotype auto-immun de manière tardive comparé aux souris *Lyn* $-/-$ (Barouch-Bentov et al., 2009). De manière intéressante, le modèle WeeB est porteur d'une mutation induisant un changement d'un acide aminé extrêmement proche de la mutation F258S de *Lyn* que nous avons identifiée. Par conséquent, nous nous attendons à observer également le développement d'un phénotype tardivement notamment dans le modèle avec la mutation de *Lyn*. Nous avons étudié le phénotype des différents modèles lorsque les souris avaient entre 7-

10 mois et entre 14 et 18 mois. Cependant, au vu du développement de signes auto-immuns dans les souris contrôles dans le groupe le plus âgé et l'absence de résultats probants dans nos modèles, seuls les résultats concernant le groupe de souris âgé de 7 à 10 mois seront présentés dans ce manuscrit.

2.4.2/ Caractérisation de l'auto-immunité dans les différents modèles

Dans le but de détecter les symptômes auto-immuns, nous avons réalisé un examen clinique, biologique et histologique des différents modèles comparés à des souris contrôles du même âge. Les dosages par ELISA sur le sérum des souris n'ont pas révélé la présence d'un taux élevé d'anticorps anti-ADNdb de type IgG ou IgM chez les souris *Ikzf1*^{+/D120V} et *Ikzf1*^{D120V/D120V}; tandis que les souris *Lyn*^{F258S/F258S} présentent une augmentation des IgM anti-ADNdb (Figure 49.A). On retrouve également une hausse du facteur rhumatoïde dans les modèles *Lyn*^{F258S/F258S} et *Ikzf1*^{+/D120V}, *Lyn*^{F258S/+}. En outre, les concentrations totales d'IgG et d'IgM sont similaires aux contrôles, excepté chez les souris *Lyn*^{F258S/F258S} (Figure 49.B). De manière surprenante, les différences observées notamment dans le modèle *Lyn*^{F258S/F258S} ne sont pas retrouvées dans les animaux double homozygotes pour *Lyn* et *Ikzf1*. Même si on observe une tendance à la hausse des taux d'auto-anticorps, du facteur rhumatoïde et des immunoglobines dans les modèles *Ikzf1*^{+/D120V}, *Lyn*^{F258S/+} et *Ikzf1*^{D120V/D120V}, *Lyn*^{F258S/F258S}, ils semblent exister une grande variété chez ces animaux au vu de l'importance des écarts-types.

Nous avons également mesuré l'expression des ISG dans les cellules sanguines, puisque la production d'IFN-I est souvent élevée chez les patients atteints de LES. Nous avons calculé un score IFN, en suivant une méthode précédemment utilisée chez l'Homme. Nous n'avons pas observé de différence entre les contrôles et les différents groupes excepté chez les souris *Ikzf1*^{D120V/D120V}, *Lyn*^{F258S/F258S} (Figure 49.C). Néanmoins, on retrouve également une variabilité importante chez ces animaux. Les animaux ont été mis à mort et nous n'avons pas observé d'hépatosplénomégalie et ni d'adénopathie. Les structures rénales ont été observées après coloration par hématoxyline/éosine des coupes de reins et nous n'avons pas observé de signes relatifs à une glomérulonéphrite (Figure 49.D).

En résumé, nous avons observé la présence d'auto-anticorps dans certains modèles notamment ceux avec la mutation de *Lyn*. Toutefois, nous n'avons pas observé d'autres signes d'auto-immunité. La présence des deux mutations, *Lyn* et *Ikzf1*, ne semblent pas créer un effet synergique favorisant le développement d'un phénotype auto-immun. Il semble avoir une grande hétérogénéité dans les différents groupes ce qui suggère une pénétrance incomplète des variants chez la souris.

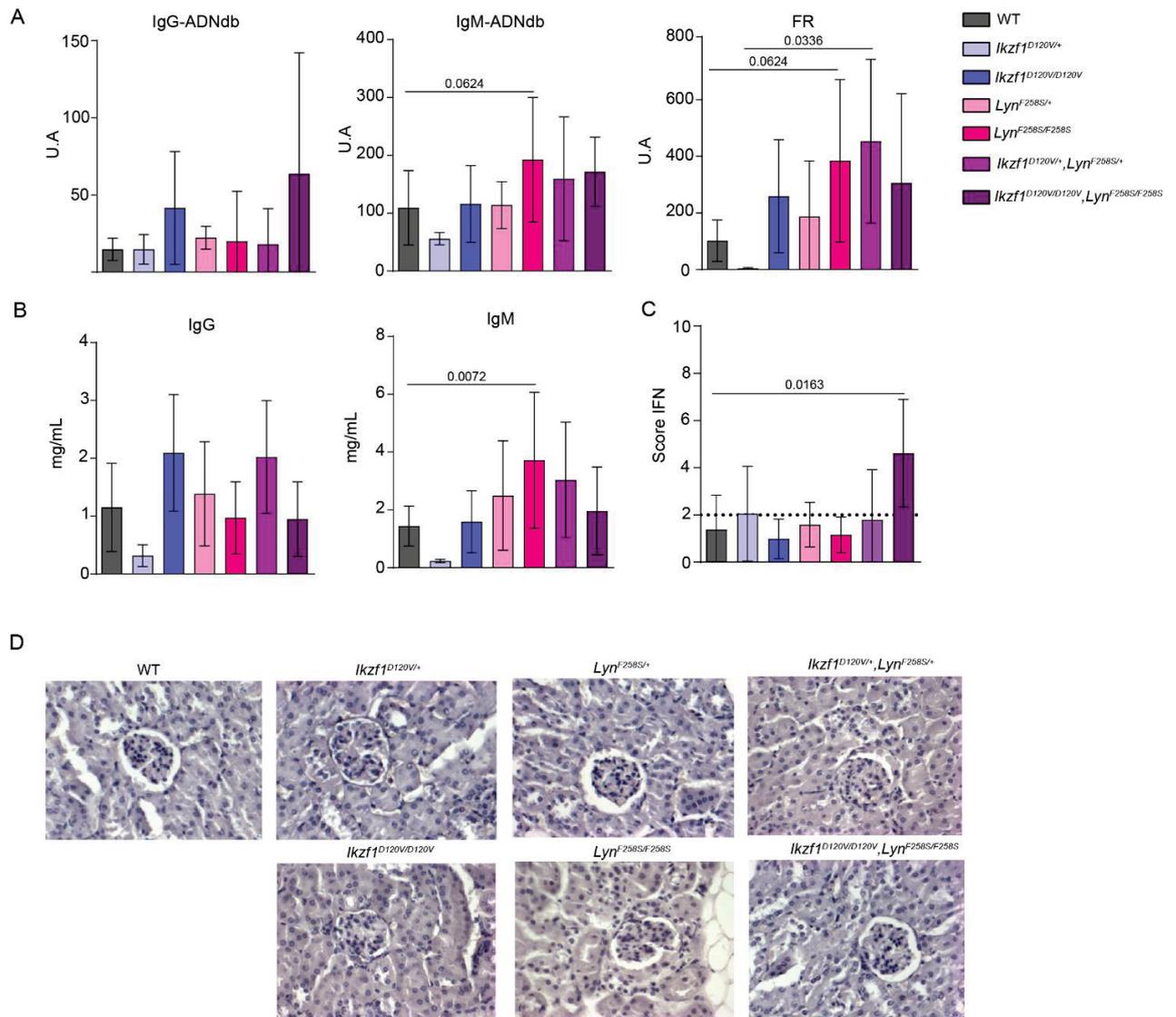


Figure 49 : Caractérisation du phénotype dans les différents modèles

A-B/ Quantification des anticorps IgG et IgM anti-ADNdb et du facteur rhumatoïde (FR) (A) et dosage des immunoglobulines (B) mesurée par ELISA dans le sérum des souris. n=5-15; test statistique= Comparaison multiples avec correction de Dunn.

C/ Mesure du score IFN des cellules sanguines des souris des différents groupes. n=5-12 ; test statistique= Comparaison multiples avec correction de Dunn.

D/Photographies de coupes de rein colorées par hématoxyline/éosine représentatives de l'observation réalisée dans chaque groupe. Objectif=x40.

2.4.3/ Étude des défauts des lymphocytes B

Les défauts dans les protéines codant pour Ikaros et Lyn sont principalement associés à une perturbation du développement des populations lymphocytaires : Ikaros est impliqué dans la différenciation des CLP, des LB et des NK tandis que Lyn est nécessaire à la maturation des LB dans la rate. Pour commencer, nous avons alors étudié la répartition des différentes populations lymphocytaires dans la rate : les LB, les LTCD4+, les LT CD8+ et les NK. Nous n'avons pas observé d'anomalies majeures dans les différents modèles malgré le fait que quelques souris présentent une réduction important du nombre de LB, principalement chez les souris *Ikzf1*^{+/-D120V}, *Lyn*^{F258S/+} (Figure 50).

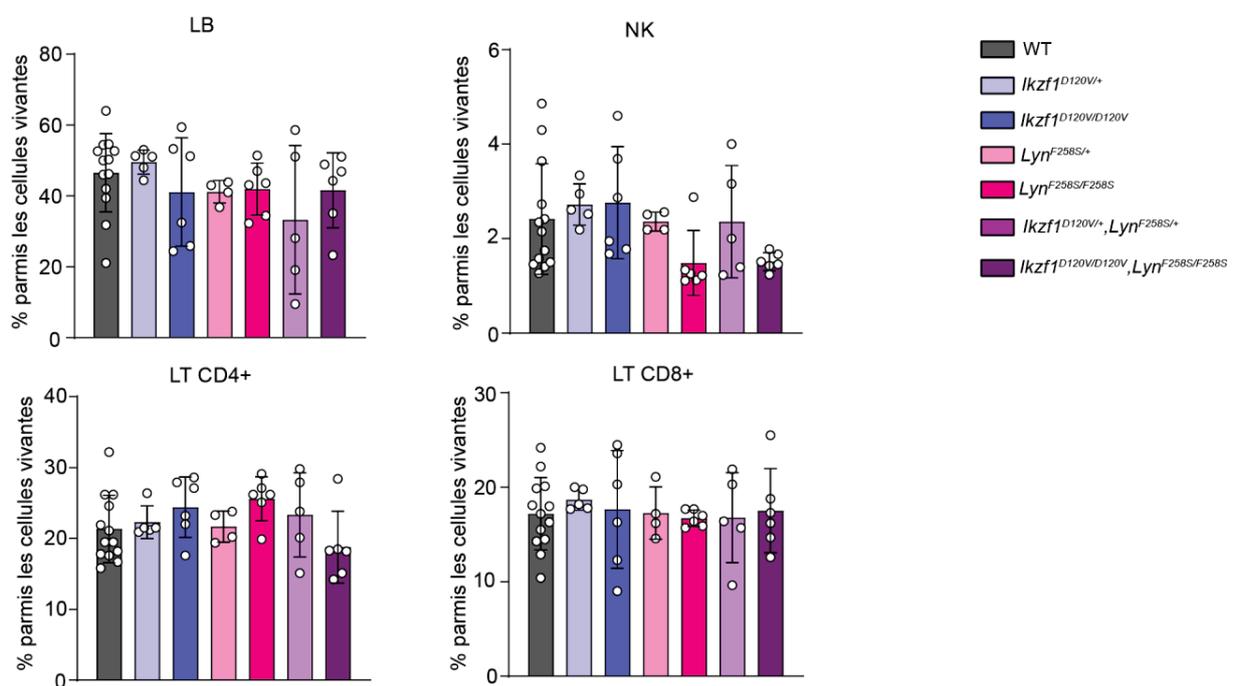


Figure 50 : Répartitions des populations lymphocytaires dans les différents modèles
 Les pourcentages de LB (CD19+, B220+,CD3-), LTCD4+ (CD19-, B220-,CD3+, CD4+), LTCD8+ (CD19-, B220-,CD3+, CD8+),NK (CD19-, B220-,CD3-, NK1.1+) de la rate des souris ont été évalués dans les différents groupes. Les résultats ont été présentés en pourcentage au vu de la similitude du nombre observé de cellules dans la rate dans les différents groupes. n=4-6 ; test statistique= Comparaison multiples avec correction de Dunn.

Etant donné le rôle majeur de *Ikzf1* et *Lyn* dans le développement des LB, nous avons réalisé un phénotypage approfondi permettant d'évaluer le pourcentage de LB aux principaux stades de leur développement de la MO à la rate.

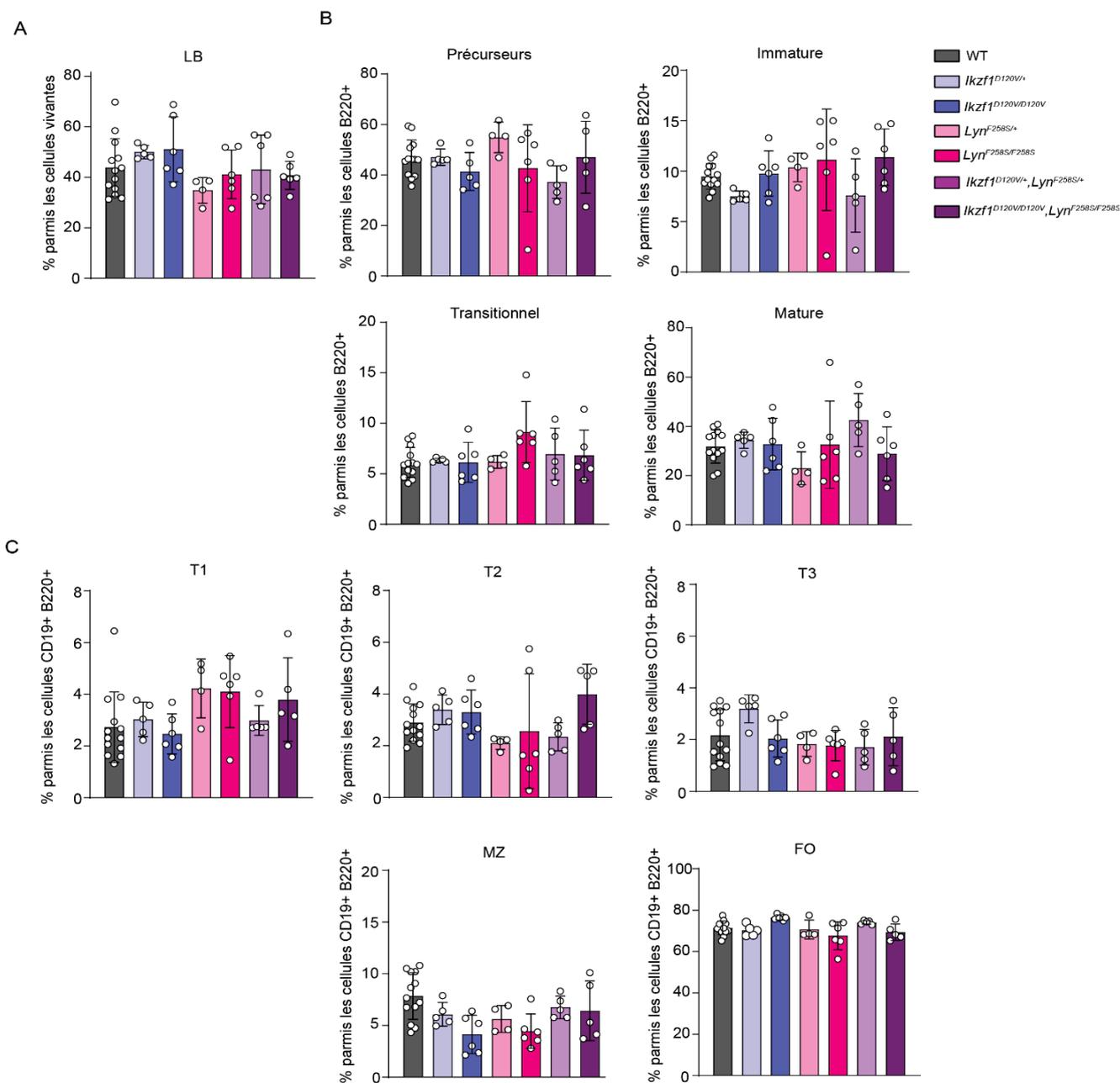


Figure 51 : Répartitions des sous-populations de LB dans les différents modèles

Les pourcentages de LB de la MO (A) et les sous-populations de LB de la MO (B) et de la rate ont été évalués dans les différents groupes. Les résultats sont présentés en pourcentage au vu de la similitude du nombre observé de cellules dans la rate dans les différents groupes. n=4-6 ; test statistique= Comparaison multiples avec correction de Dunn.

Tout d'abord, nous n'avons pas observé de réduction du nombre de LB MO dans les différents modèles murins (Figure 51.A). Les pourcentages des différentes sous-populations de LB sont similaires entre les différents groupes et les contrôles (Figure 51.B). Nos résultats n'indiquent pas de défauts des LB dans la MO dans les différents modèles. Nous avons continué notre analyse dans la rate. De nouveau, aucune différence majeure n'a été observée dans les différentes sous-populations allant des stades transitionnels aux cellules B de la zone marginale et folliculaires (Figure 51.C).

Les données de la littérature indiquent que les LB avec un défaut d'Ikaros ou Lyn pourraient être activés à partir d'un seuil d'activation plus faible que les cellules contrôles. Nous avons alors comparé l'expression de différents marqueurs d'activations des LB : CD69, CD86 et le CMHII. Ces protéines sont davantage exprimées lors de l'activation de la cellule. Nos résultats n'ont pas montré de différence concernant l'expression de CD69 entre les différents groupes et les contrôles (Figure 52). Néanmoins, nous avons observé une augmentation significative de l'expression de CD86 et du CMHII respectivement chez les souris *Lyn*^{F258S/+} et *Ikzf1*^{D120V/D120V}, *Lyn*^{F258S/F258S}. Même si les autres groupes ne montrent pas de différences significatives, nous observons une tendance à la hausse de l'expression des marqueurs CD86 et CMHII dans les groupes *Lyn*^{F258S/+}; *Lyn*^{F258S/F258S}; *Ikzf1*^{+/D120V}, *Lyn*^{+/F258S} et *Ikzf1*^{D120V/D120V}, *Lyn*^{F258S/F258S}. En conséquence, seuls les modèles exprimant uniquement le variant de *Ikzf1* à l'état hétérozygote ou homozygote ne montrent pas de différence.

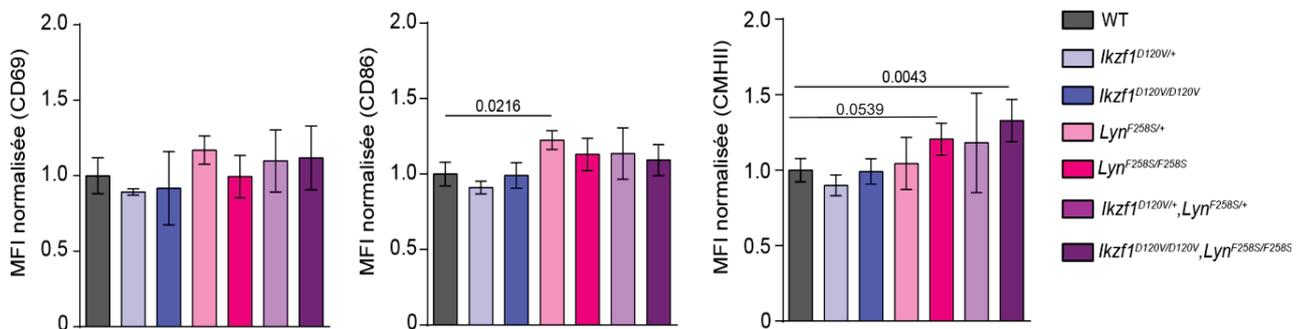


Figure 52 : Expression de marqueurs d'activations dans les LB dans les différents modèles
 Mesure par cytométrie de la MFI de l'expression des marqueurs CD69, CD86 et CMHII normalisés sur la MFI mesurée chez les WT pour chaque expérience dans les LB de la rate. n=4-6 ; test statistique= Comparaison multiples avec correction de Dunn.

Pour conclure, les modèles murins que nous avons générés ne développent de phénotype auto-immun évident. Nous avons uniquement constaté une augmentation du taux d'auto-anticorps dans les souris *Lyn*^{F258S/+}; *Lyn*^{F258S/F258S}; *Lyn*^{F258S/+}, *Ikzf1*^{D120V/+} et *Lyn*^{F258S/F258S}, *Ikzf1*^{D120V/D120V}. Nous n'avons également pas observé d'anomalies dans la répartition des populations

lymphocytaires et les sous-populations des LB. Cependant, nous avons identifié une hausse de l'expression des marqueurs d'activations CD86 et CMHII dans les modèles avec la mutation de *Lyn* à l'état hétérozygote ou homozygote. Nous n'avons toutefois pas constaté de différence entre les contrôles et les modèles ayant seulement la mutation hétérozygote ou homozygote de *Ikzf1* D120V.

En résumé, les données générées *in vitro* nous ont permis de déterminer que le variant *IKZF1* D120V conduisait à une diminution de l'activité de ce facteur de transcription alors que les données *in vivo* n'ont pas montré de phénotype particulier des souris porteuses de la mutation. Ces résultats nous permettent de formuler différentes hypothèses. Premièrement, les expériences *in vitro* ont étudié l'effet de la mutation *IKZF1* D120V en condition de surexpression et non en présence de *IKZF1* WT ; ce qui refléterait davantage la distribution hétérozygote de la mutation des patientes. Cependant, la mutation *IKZF1* D120V pourrait causer une haploinsuffisance. Des expériences avec *IKZF1* WT permettrait de conforter cette hypothèse. De plus, des mutations de *IKZF1* menant à une haploinsuffisance retrouvée à l'état hétérozygote ont déjà été décrites chez des patients présentant des symptômes auto-immuns (Kuehn et al., 2021). Deuxièmement, étant donné le phénotype sévère observé dans les autres modèles murins causé par une perte ou baisse de fonction de Ikaros chez la souris lors de la délétion des doigts de zinc (ZF3-4, ZF6-7), la fonction du doigt de zinc 1 (où est localisée la mutation D120V) pourrait être différente entre l'Homme et la souris (Georgopoulos et al., 1994 ; Wang et al., 1996). Enfin, même si nous n'avons pas identifié de défaut de l'activité de *LYN* avec la mutation F258S pour l'instant ; certaines souris ont présenté des signes d'auto-immunité (auto-anticorps, baisse des LB, hyperactivation des LB). Ce résultat suggère que la mutation de *LYN* pourrait induire une prédisposition à l'auto-immunité et pourrait avoir un effet synergique avec le variant *IKZF1* D120V. Toutefois, des expériences complémentaires sont nécessaires afin de comprendre plus précisément le rôle de chaque variant dans le développement du LES.

2.5/ Matériel et méthodes complémentaires

Plasmides

Les ADNc humains de *IKZF1* WT (*IKZF1* ; NM_006060) et du variant D120V ont été clonés dans les vecteurs p3X-FLAG et pcDNA3-HA pour ajout respectif d'un Tag 3xFlag ou HA en N-terminal de la protéine. Les ADNc humains de *LYN* WT (*Lyn* ; NM_002350) et du variant F258S ont été clonés dans le vecteur p3X-FLAG pour ajout d'un Tag 3xFlag en N-terminal de la protéine.

Co-Immunoprécipitation

Les cellules 293T ont été co-transfectées de façon transitoire avec les constructions p3X-FLAG-IKAROS (WT ou D120V) et pcDNA3-HA (WT ou D120V) en utilisant le réactif JetPEI (Polyplus Transfection) et selon les instructions du fournisseur. 48h après transfection, les cellules sont récoltées et lysées avec du tampon NP40 à 0.5% (150mM NaCl ; 500mM Tris, HCl pH8 ; 5mM EDTA ; 0.5% NP40) avec inhibiteurs de protéases (Sigma Aldrich). Après 30 minutes d'incubation et 10 minutes de centrifugation à 10 000g à 4°C, les protéines contenues dans le surnageant ont été dosées avec le kit micro-BCA (Pierce). 500µg de lysat protéique ont été incubés sur la nuit avec 30µl de billes d'agarose anti-Flag (Sigma) ou anti-HA (ThermoFisher scientific). Les billes ont ensuite été lavées 4x avec 500µl de tampon de lyse sans inhibiteur. Les billes ont resuspendues dans 30µl de tampon de lyse avec 10µl de tampon de charge avec SDS et 2µl d'agent dénaturant (ThermoFisher scientific). Les billes sont mises à 96°C pendant 10min pour éluer les protéines puis centrifugées 5min à 10 000rpm ; Le surnageant contenant l'éluat est mis dans un nouvel eppendorf et déposé sur gel d'acrylamide pour réaliser une analyse par western blot et détecter la présence des protéines taggées HA ou Flag. En contrôle de transfection, 50µg de lysat total sont déposés sur gel.

Etude transcriptomique

Les cellules GRANTA stablement transduites avec les constructions *IKZF1* WT ou *IKZF1* D120V ont été traitées 6h avec de la doxycycline (Sigma Aldrich) afin d'induire l'expression du facteur de transcription, ou laissées 6h sans traitement à la doxycycline. Après 6h, l'ARN des cellules a été purifié en utilisant le kit Direct-Zol (Ozyme) et selon les instructions du fournisseur. Des banques d'ARN messagers de ces échantillons ont été construites en utilisant le kit mRNA-Seq Library Prep kit V2 (Lexogen) à partir de 1µg d'ARN total et selon les instructions du fournisseur. L'expérience a été réalisée en triplicat. Chaque échantillon a été tagmenté avec un primer index. Les 12 échantillons (4 échantillons en triplicats : WT non induit, WT induit, D120V non induit, D120V induit) ont été multiplexés à une concentration de 0.63nM chacun et envoyé pour séquençage à la plateforme GENOMEAST à Starsbourg.

Phosphorylation de Lyn

Les cellules 293T ont été co-transfectées de façon transitoire avec les constructions p3X-FLAG-Lyn (WT ou F258S) en utilisant le réactif JetPEI (Polyplus Transfection) et selon les instructions du fournisseur. 48h après transfection, les cellules sont récoltées et lysées avec du tampon NP40 à 1% (150mM NaCl ; 50mM Tris, HCl pH8 ; 20mM EDTA ; 1mM Na₃VO₄ ; 1mM NaF 1% NP40) avec inhibiteurs de protéases (Sigma Aldrich). Après 30 minutes d'incubation et 10 minutes de centrifugation à 10 000g à 4°C, les protéines contenues dans le surnageant ont été dosées avec le kit micro-BCA (Pierce). 250, 125 ou 62.5µg de lysat protéique ont été incubés 1h30 avec 30µl de billes d'agarose anti-Flag (Sigma). Les billes ont ensuite été lavées 3x avec 500µl de tampon de lyse sans inhibiteur puis deux fois en tampon kinase (10mM MgCl₂ ; 20mM MnCl₂ ; 20mM Tris, HCl pH7.5 ; 100µM ATP) et resuspendues dans 35µl de tampon kinase. Les billes ont été incubées à température ambiante pendant 15min avec agitation. La réaction est stoppée par ajout de 10µl de tampon de charge avec SDS et 2µl d'agent dénaturant (ThermoFisher scientific). Les billes sont mises à 96°C pendant 10min pour éluer les protéines puis centrifugées 5min à 10 000rpm ; Le surnageant contenant l'éluat est mis dans un nouvel eppendorf et déposé sur gel d'acrylamide pour réaliser une analyse par western blot et détecter la présence de Lyn phosphorylée avec un anticorps anti phospho Lyn Tyrosine 507 (Cell Signaling Technology).

Western Blot

Les cellules ont été récupérées et lysées avec du NP40 à 1% d'un inhibiteur de protéases (Sigma Aldrich). Après 30 minutes d'incubation et 10 minutes de centrifugation à 10 000g à 4°C, les protéines contenues dans le surnageant ont été dosées avec le kit micro-BCA (Pierce). 50 µg de protéines ont été mélangées à du tampon de charge 4X (Bleu Nupage (Thermo Fischer Scientific)) et à un agent réducteur TCEP 20x (Perbio). Les échantillons ont été chauffés 5 min à 95°C, déposés sur gels NuPage (4-12% acrylamide) précoulés (Thermo Fischer Scientific) et la migration a été faite en tampon MES (Thermo Fischer Scientific) à 150 Volt puis transférés sur les membranes BioRad avec l'appareil de transfert Biorad Thermo Fischer Scientific pendant 10 minutes à 1,3 A. Les membranes ont été saturées 30 minutes dans du lait à 5% mélangé à du tampon TBS-Tween 0.5 %, incubées avec un anticorps IKAROS, LYN, FLAG, GAPDH et α-tubuline (Cell Signaling Technologies) puis avec un anticorps secondaire (Jackson Immunoresearch). Les membranes ont été marquées avec de l'ECL (Amersham) et révélées avec l'Imagequant Las4000 (GE Healthcare).

Mesure de la capacité de liaison à l'ADN par microscopie confocale

Les cellules NIH3T3 ont été transfectées avec un plasmide exprimant IKZF1 WT et D120V à l'aide de Lipofectamine 3000 (Invitrogen) conformément aux instructions du fabricant. Les

cellules ont été fixées avec 4 % de paraformaldéhyde et perméabilisées et placées dans un solution de blocage (PBS + 2 % BSA + 10 % SVF + 0,1 % triton X-100). Les cellules ont été marquées avec un anticorps anti-IKZF1 (Cell signaling technologies) et du DAPI (Invitrogen). Les images ont été recueillies sur un microscope LSM 510 Meta confocal (Zeiss) avec un objectif d'immersion 60X.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Les cellules HEK293T ont été transfectées avec un plasmide exprimant IKZF1 WT, D120V ou R164Q avec le kit Transfection GeneJuice (Novagen) et mises en culture pendant 24 heures. Les extraits nucléaires ont été récupérés et l'EMSA a été réalisée comme décrit Van Nieuwenhove et al. (2019).

Génération des souris

Les souris avec les mutations *Ikzf1* D120V et *Lyn* F258S ont été générées en utilisant la technologie CrispR/Cas9. L'ARNg et le ssODN ont été conçus à l'aide des logiciels CRISPOR (Tefor) et Mainworkbench (Qiagen), ont été synthétisés par Eurogentec et fournis au Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris (PBES) (Lyon) qui a réalisé l'électroporation du mélange avec la protéine recombinante Cas9 (PNA Bio) dans des cellules embryonnaires de souris C57BL/6. Les cellules mutantes embryonnaires ont été injectées dans des blastocystes de C57BL/6 puis inséminées dans des souris mères porteuses. Les descendants obtenus ont été croisés sur trois générations au moins avec des souris C57BL/6 afin de sélectionner la mutation au fur des croisements. Cette étude a été réalisée conformément aux recommandations françaises du Guide d'évaluation éthique des expériences sur animaux de laboratoire et des lignes directrices européennes 86/609/CEE. Le comité local de bioéthique CECCAPP a approuvé toutes les études expérimentales.

Histologie rénale

Les reins ont été fixés dans de la formaline à 10 %, imprégnés dans la paraffine, coupés à 5 µm et colorés avec de l'hématoxyline et de l'éosine (H&E) (Sigma). Les coupes colorées par Hématoxyline/Eosine ont été observées à l'Axiomager (Zeiss). Les images obtenues ont été analysées sur ImageJ (NIH).

ELISA

Les concentrations sériques d'IgG et IgM murins ont été mesurées selon la procédure suivante. Brièvement, des plaques 96 puits (ThermoFisher) ont été incubées avec un anticorps

anti-IgM ou IgG de souris pendant 1 heure à 37°C. Les IgG et IgM totaux ont été détectées avec un anticorps anti-souris γ ou μ conjugué à la horseradish peroxidase (HRP) (Jackson ImmunoResearch). La détection d'autoanticorps et de FR ont été mesurées selon la procédure suivante. Brièvement, des plaques 96 puits (ThermoFisher) ont été incubées avec de l'ADN purifié provenant de thymus de veau (Sigma–Aldrich) pendant 1 heure à 37°C. Ensuite, l'ADNs_b a été digéré avec de la nucléase S1 (Promega) pendant 1 heure à 37°C. Pour la détection du FR, des plaques 96 puits (ThermoFisher) ont été incubées avec des IgG purifiées (Jackson ImmunoResearch,) pendant 1 heure à 37°C. Les échantillons de sérum ont été incubés à plusieurs dilutions pendant la nuit à température ambiante. Les plaques ont ensuite été incubées avec un anticorps anti-souris γ ou μ conjugué à la horseradish peroxidase (HRP) (Jackson ImmunoResearch). La réaction a été arrêtée avec l'ajout de solution de H₂SO₄ après 20 minutes à RT et l'absorbance a été mesurée à 490 nm.

Score IFN

L'ARN a été extrait du sang total avec Direct-zol RNA MicroPrep (Ozyme) et l'ADNc a été généré à l'aide du kit high-capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems). La PCR a été réalisée avec le kit FastStart Universal SYBR Green Master (Roche) sur le StepOne plus (Applied Biosystems). Les amorces ont été conçues à l'aide du logiciel Roche. Les amorces suivantes ont été utilisées pour la PCR quantitative : MM-ISG15-F AAGCCCAGAAGCAGACTC; MM-ISG15-R CACGGACACCAGGAAATCGT; MM-IFIT1-F AAGGCACTGAACAACAAGACC; MM-IFIT1-R TGACTGCTTATGAAACTGTAGGAAA; MM-RSAD2-FGTGGACGAAGACATGAATGAAC; MM-RSAD2-R CTCAATTAGGCACAGGTGGAA; MM-GAPDH-F GCATGGCCTTCCGTGTTC; MM-GAPDH-R TGTCATCATACTTGGCAGGTTTCT. L'expression des ISG a été normalisée au niveau de la GAPDH, et le score IFN a été calculé comme la médiane des 3 ISG normalisés.

Cytométrie en flux

Les cellules extraites de la rate ou de la MO ont été marquées avec différents cocktails d'anticorps. Les anticorps monoclonaux suivant provenant de BD Biosciences, Biolegend, eBioscience ont été utilisés : anti-CD19 (6D5), anti-B220 (RA3-6B2), anti-CD3 (145-2C11, 500A2), anti-CD8a (53-6.7), anti-CD4 (GK1.5), anti-NK1.1 (PK136), anti-CD11c (N418), anti-IgM (R6-60.2), anti-IgD (11-26c.2a), anti-CD21 (7E9), anti-CD23 (B3B4), anti-CD24 (M1/69), anti-CD69 (H1.2F3), anti-CD86 (GL1) et un anti-CMHII (M5/114.15.2). Les échantillons ont ensuite été analysés sur le cytomètre Fortessa 5L (BD Bioscience) et analysés sur FlowJo (Treestar).

3 – DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Au cours de ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à trois mutations identifiées dans des formes familiales de LES. Chacune est notamment connue pour coder des protéines ayant un rôle essentiel dans l'homéostasie des LB : 1) PKC- δ qui est impliqué dans la régulation de l'apoptose et de la prolifération via notamment son action dans la signalisation sous-jacente au BCR ; 2) LYN qui est important dans le développement et l'activation à travers son rôle d'activateur et d'inhibiteur dans la signalisation des LB et 3) IKAROS qui est un facteur de transcription impliqué à la fois dans le développement et la régulation du seuil d'activation des LB. Les mutations induisant un défaut de tolérance des LB ont été identifiées depuis plusieurs années maintenant. Toutefois, alors que les dérégulations causées par les mutations conduisant aux interféronopathies et à un excès d'autoantigènes sont de mieux en mieux comprises, les mécanismes précis à l'origine des défauts de tolérance B restent encore méconnus et nécessitent d'être explorés davantage. Ceci est dû en particulier au fait que dans les formes monogéniques de lupus, les formes liées à l'immunité adaptative sont plus rares comparées à celles associées à l'immunité innée (Belot et al., 2020).

Les mécanismes impliqués dans la mise en place de la tolérance B sont multiples. De plus, ils ne s'excluent pas mutuellement et peuvent fonctionner à des degrés et à des moments variables rendant leur étude complexe. C'est pourquoi la recherche sur les LES monogéniques permet de décrypter ces différents mécanismes en identifiant des mutations causant une altération d'un élément clé. Cependant, la réalisation de ce type d'étude est confrontée à de nombreuses difficultés. Il y a un véritable essor concernant la recherche sur la génétique du LES, mais les connaissances actuelles restent incomplètes. En effet, les formes de LES monogéniques sont extrêmement rares rendant l'accès aux échantillons difficiles. De plus, les patients sont généralement sous traitement, complexifiant ainsi l'analyse des échantillons. De ce fait, les travaux sur les modèles animaux ont grandement contribué à l'étude des LES monogéniques.

3.1/ Forces et faiblesses de notre étude : utilisation des modèles murins pour étudier le LES

3.1.1/ La souris : un modèle expérimental de choix...

Les modèles murins représentent des outils inestimables pour mieux comprendre la pathogénèse du LES. Tout d'abord, de nombreuses techniques ont été développées ces dernières années afin de générer rapidement des souris transgéniques comme nous l'avons fait lors de ces travaux de thèse. Les animaux générés par la technologie CrispR/Cas9 permettent d'avoir des modèles avec la même mutation que celle retrouvée chez les patients ; ce qui reflète davantage

la pathologie humaine contrairement aux souris KO où les modifications génétiques peuvent altérer l'expression de gènes adjacents ou des séquences non-codantes essentielles. Nous avons notamment pu générer les souris *Prkcd*^{G510S/G510S} où l'on retrouve une expression réduite de la protéine PKC-δ comme chez les patients. Nous avons également obtenu les différents modèles murins avec les mutations de *Lyn* et *Ikzf1* à l'état simple ou double hétérozygote et homozygote dans le but d'étudier l'influence de chaque variant et leurs effets combinés. Deuxièmement, la souris est un modèle de choix dans le LES du fait de la similitude des symptômes lupiques retrouvés chez l'Homme et la souris comme observé dans le projet concernant la mutation *Prkcd* G510S/G510S. On retrouve un grand nombre d'auto-anticorps contre les complexes nucléaires, une atteinte rénale sévère se traduisant par une glomérulonéphrite avec un dépôt de complexes immuns aussi bien chez l'Homme que chez la souris. De manière intéressante, alors que la splénomégalie est un symptôme peu fréquent dans le LES (environ 13% des patients), elle est présente chez la majorité des patients avec un défaut de PKC-δ comme dans le modèle murin *Prkcd*^{G510S/G510S} que nous avons développé (Tableau 5) (Oubelkacem et al., 2015). La similitude des symptômes entre les patients et le modèle murin *Prkcd*^{G510S/G510S}, suggère que le mécanisme sous-jacent à leur développement est similaire entre les deux espèces et fait de la souris un excellent modèle pour étudier l'impact de la mutation homozygote G510S de *PRKCD*. Au-delà de l'étude spécifique de l'effet des défauts de PKC-δ, la souris *Prkcd*^{G510S/G510S} pourrait représenter un très bon modèle pour l'étude des LES causés par une dérégulation des LB. Actuellement, les modèles murins principalement utilisés dans l'étude du lupus sont les modèles induits notamment par l'injection de pristane qui mène à une hyperproduction d'IFN-I, et les modèles spontanés comme les NZB/W F1, NZM, BXSB/Yaa et les MRL/lpr (Li et al., 2020). Alors que la majorité de ces modèles est associée à des formes liées à une anomalie de l'immunité innée, le modèle MRL/lpr reflète davantage les LES associés à des atteintes de l'immunité adaptative. En effet, les souris MRL/lpr présentent un défaut de FAS, comme dans les SLAI (Cohen et al., 1991). Alors que ce modèle fait partie de ceux les plus utilisés dans les modèles pré-cliniques, il ne reflète pas réellement la symptomatologie retrouvée chez les patients soit principalement une cytopénie auto-immune et une lymphoprolifération (Andrews et al., 1978 ; Consonni et al., 2022). Par conséquent, le modèle MRL/lpr pourrait ne pas être le plus adapté pour l'étude des LES causés par un défaut B à l'inverse des souris avec un défaut de PKC-δ.

3.1.2/ ... avec ses limites : vers une approche globale

Malgré leur utilité, l'utilisation de la souris dans l'étude du LES présente des limites. Bien que semblable, les systèmes immunitaires humain et murin présentent des différences et laissent supposer que certains éléments présents chez l'un ne soient pas transposables à l'autre. Cette divergence s'est notamment illustrée lors de l'étude des mutations *IKZF1* D120V et *LYN* F258S. Alors que les expérimentations *in vitro* ont démontré une haploinsuffisance d'IKAROS causée par

le variant *IKZF1* D120V, nous n'avons pas observé de phénotype particulier chez les souris hétérozygotes ou homozygotes. Ce résultat nous pousse à réfléchir à propos des potentielles différences entre l'Homme et la souris, notamment à propos de la fonctionnalité des doigts de zinc de IKAROS chez chacune des espèces. En effet, IKAROS agit par différents modes d'actions notamment à travers ses différentes isoformes. Or, il a été montré de nombreuses différences entre celles-ci chez les deux espèces (Li et al., 2011 ; Mitchell et al., 2017). Concernant la fonctionnalité des doigts de zinc chez la souris, il a été démontré que les doigts de zinc 2 et 3 sont suffisants pour permettre la fixation de la protéine à l'ADN de manière stable et efficace tandis que les doigts de zinc 1 et 4 régulent la liaison à des sites spécifiques (Schjerven et al., 2013). Toutefois, alors qu'une réduction des LB chez les souris *Ikzf1*^{ΔF1/ΔF1} met en avant l'importance du doigt de zinc 1 dans le développement des LB chez la souris, nous n'avons pas observé de phénotype similaire dans le modèle *Ikzf1*^{D120V/D120V}. Le modèle murin *Ikzf1*^{L132P/L132P} avec une mutation ponctuelle dans le doigt de zinc 1 développe un phénotype similaire aux souris *Ikzf1*^{ΔF1/ΔF1}, avec une réduction du nombre de LB. Néanmoins, aucun symptôme relatif à l'auto-immunité n'a été reporté dans ces modèles (Boast et al., 2021). D'après ces données de la littérature, le doigt de zinc 1 joue un rôle dans l'homéostasie des LB chez la souris ; toutefois, la mutation D120V n'induit pas de phénotype particulier ce qui n'exclut pas un impact chez l'Homme. Comment alors expliquer l'absence de phénotype chez la souris alors que le variant D120V entraîne un défaut de IKAROS *in vitro* et que le doigt de zinc 1 apparaît bel et bien important chez la souris d'après la littérature ?

1/ Nous devons avant tout valider la diminution de l'activité de IKAROS D120V en répétant les expérimentations clés qui n'ont été réalisées qu'une seule fois pour certaines.

2/ Etant donné que la mutation est présente à l'état hétérozygote chez les patientes, les expériences *in vitro* dans des conditions avec un ratio 50 : 50 de *IKZF1* WT et D120V reflèteraient davantage la situation retrouvée chez les patientes. Néanmoins, cela n'explique pas l'absence de phénotype observé dans le modèle murin *Ikzf1*^{D120V/D120V}.

3/ Nous pourrions évaluer les capacités transcriptionnelles du variant *Ikzf1* D120V chez la souris dans le but de déterminer si le variant induit le même défaut chez la souris que chez l'Homme. Même si la mutation touche un acide aminé conservé entre l'Homme et la souris, cela ne signifie pas qu'il a la même importance chez les 2 espèces.

4/ A l'heure actuelle, les modèles murins sont dans un environnement stérile peu immunogène. Afin de conclure sur la vraisemblance de l'utilisation de la souris pour étudier la mutation D120V d'*Ikzf1*, nous pourrions créer un environnement favorisant la rupture de tolérance. Plusieurs méthodes existent pour cela comme l'injection de pristane, de corps apoptotiques syngéniques ou de ligand de TLR7 (Sato et al., 1994 ; Mevorach et al., 1998 ; Yokogawa et al., 2014). Nous pourrions alors comparer les symptômes entre les modèles de LES

induits porteurs ou non du variant *Ikzf1* D120V et déterminer l'influence du variant sur le développement du phénotype.

Ces expériences permettraient de conclure sur l'effet réel de la mutation sur la fonctionnalité de la protéine et sur la vraisemblance de l'utilisation du modèle murin pour cette mutation.

Concernant le variant F258S de *LYN*, nous n'avons pas pu déterminer pour l'instant l'effet de cette mutation sur la fonctionnalité de *LYN*. Nous avons uniquement déterminé *in vitro* que la mutation n'altérerait pas l'expression de la protéine et ces capacités d'autophosphorylation. Toutefois, des expériences complémentaires permettant de déterminer de manière plus fiable l'activité kinase de la protéine sont en cours. L'étude des modèles murins avec la mutation de *Lyn* ont montré la présence d'autoanticorps et une augmentation de l'expression de marqueurs d'activations des LB. Néanmoins, le phénotype est beaucoup plus léger que celui observé chez la souris WeeB (Barouch-Bentov et al., 2009). Dans ce modèle, une splénomégalie et une glomérulonéphrite sont détectables chez les souris âgées. La mutation des souris WeeB est une substitution en position 260 ; soit à deux acides aminés de la mutation F258S (Figure 53). Les acides aminés impliqués dans notre modèle murin avec la mutation *Lyn* F258S et WeeB sont localisés dans un motif consensus extrêmement conservé à travers la famille des Src : [K/R]-4LGxG0xF[G/A][E/D]+4V. L'acide aminé en position 260 joue un rôle clé puisqu'il participe à la formation d'un point salin impliqué dans la stabilisation d'une structure riche en glycine appelée boucle G de la protéine qui permet la liaison à un ATP. La phénylalanine en position 258 pourrait jouer un rôle dans la stabilisation de cette structure. La mesure de l'activité kinase du variant F258S permettra de déterminer l'importance de cette acide aminée dans la structure de la protéine. Même si les résultats *in vitro* et *in vivo* obtenus à l'heure actuelle ne nous permettent pas de conclure définitivement sur l'effet du variant de *LYN* F258S, des analyses complémentaires suggèrent tout de même un effet de la mutation F258S. Des analyses par cytométrie de masse (CyTOF pour *Cytometry by Time of Flight*) ont été réalisées sur les PBMC de la famille et ont révélées une profonde altération de la répartition des LB chez les patientes et leur mère, qui ont été diagnostiquées pour un LES, et de manière surprenante également chez le père (Figure 54). Pour rappel, celui-ci ne présente pas de symptômes particuliers et est porteur de la mutation *LYN* F258S. Par conséquent, la mutation *LYN* F258S pourrait causer une altération du répertoire B. En outre, les patientes ont développé un LES durant l'adolescence. Or, on connaît le rôle catalyseur des hormones féminines dans le LES (Costenbader et al., 2007). Cela suggère alors que le variant *LYN* F258S serait un facteur de prédisposition ou aggravant du lupus.

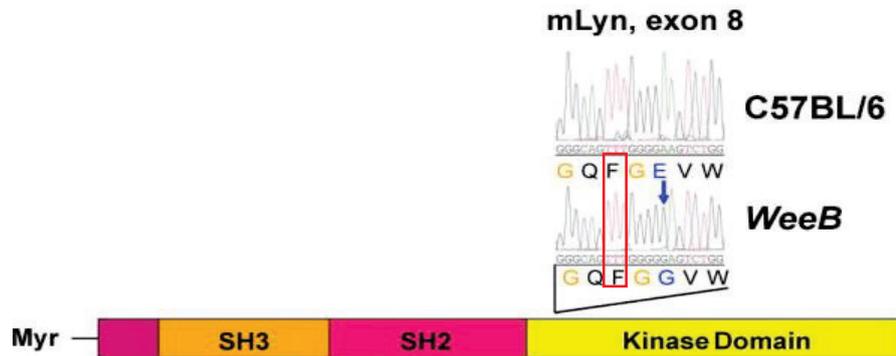


Figure 53 : Localisation de la mutation dans le modèle WeeB

Schéma de la protéine *Lyn* et localisation de la mutation dans le modèle WeeB induisant une substitution d'un acide glutamique (E) en glycine (G) en bleu. La mutation que nous avons identifié induit une substitution de la phénylalanine (F) encadrée en rouge. (Adapté de Barouch-Bentov et al., 2009)

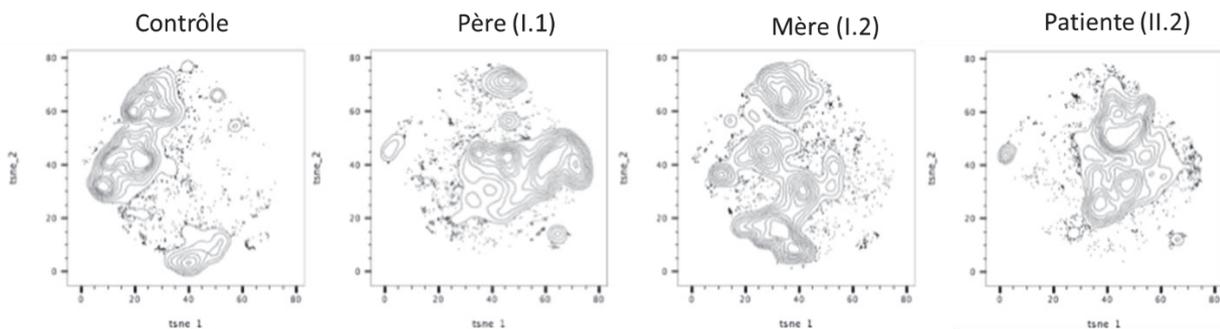


Figure 54 : Analyse du compartiment B des patients

Analyse tSNE (*t-distributed stochastic neighbor embedding*) sur les LB d'un individu sain et des membres de la famille avec les mutations d'*IKZF1* et *LYN* permettant de représenter les données de Cytof de manière à rassembler les populations similaires en cluster.

Même si pour l'instant, nous n'avons pas pu conclure sur le rôle précis des mutations *IKZF1* D120V et *LYN* F258S, une approche globale mettant en relation les informations cliniques, les expérimentations *in vitro* et *in vivo* pourrait nous permettre de conclure sur l'impact des variants et leurs rôles dans la pathogénèse du LES. Plus généralement, l'utilisation d'une stratégie avec une vision d'ensemble allant du patient jusqu'à la recherche d'une explication moléculaire et biologique permettrait de comprendre les rôles des nouveaux variants identifiés dans le LES qui sont de plus en plus nombreux grâce aux avancées technologiques de génétique.

3.2/ Préciser le rôle de PKC- δ dans les lymphocytes B

Les connaissances sur la signalisation des LB se sont considérablement étendues ces dernières années. Alors que la signalisation du BCR apparaissait comme prépondérante, il est apparu au fur et à mesure qu'elle était en réalité interconnectée avec une multitude d'autres voies allant des corécepteurs activateurs et inhibiteurs proches du BCR aux voies de signalisations des TLRs, des cytokines, etc. La signalisation des LB apparaît alors comme un réseau complexe où plusieurs acteurs rentrent en jeu à des degrés et à des moments variables. PKC- δ semble être un de ces acteurs. Les données de la littérature et nos résultats montrent son implication dans une multitude de fonction comme la prolifération et de l'apoptose ; qui pourrait expliquer son rôle clé dans le maintien de la tolérance B (Miyamoto et al., 2002 ; Mecklenbrauker et al., 2004). Plusieurs hypothèses ont été proposées concernant les mécanismes moléculaires par lesquelles PKC- δ effectuerait ses actions :

1/ La forme clivée de PKC- δ a notamment été décrite pour sa capacité à migrer dans le noyau et induire l'apoptose en phosphorylant des protéines cibles dans les LB (Mecklenbrauker et al., 2004). Ce mécanisme a notamment été décrit en réponse à une diminution de la cytokine BAFF mais également lors de la sélection négative des cellules autoréactives dans la zone claire des centres germinatifs (Ou et al., 2021). Ce dernier mécanisme serait notamment régulé par SMS2 qui faciliterait la translocation nucléaire de PKC- δ . Néanmoins, les mécanismes précis conduisant au clivage de PKC- δ , à sa migration dans le noyau et à l'induction de l'apoptose par PKC- δ restent encore très flous, notamment dans les LB. De plus, la voie extrinsèque et intrinsèque dépendante de la mitochondrie peuvent également être induites par PKC- δ et induire l'apoptose (Sumitomo et al., 2002 ; Gonzalez-Guerrico et al., 2005). Néanmoins à l'heure actuelle, nous ne savons pas précisément le moyen par lequel PKC- δ mène à l'apoptose dans les LB : directement en migrant dans le noyau ou par l'induction des voies extrinsèque ou intrinsèque de l'apoptose, ou indirectement par son rôle de kinase dans des voies de signalisation menant à l'apoptose. Même si les mécanismes sous-jacents à l'induction de l'apoptose par PKC- δ sont encore flous, la protéine apparaît comme un régulateur de la mort cellulaire jouant un rôle primordial tout au long de la vie du LB, essentiel au maintien de tolérance notamment dans les LB des centres germinatifs.

2/ Plusieurs éléments relient également PKC- δ à la voie des MAPK. Tout d'abord, certains patients avec un défaut de PKC- δ ont été diagnostiqués pour un "*RAS-Associated Lymphoproliferative Disease*" (RALD) proche des SLAI par la symptomatologie et la physiopathologie sous-jacente de la pathologie (voir tableau 5). De plus, nos résultats ont notamment montré une augmentation du niveau basal de la phosphorylation de ERK dans les LB des souris *Prkcd*^{G510S/G510S}. Ces observations sont similaires à ce qui a pu être observé au sein des LB de patients avec un LES et certains modèles murins, suggérant une contribution de cette voie dans la génération ou la survie des cellules B autoréactives (Grammer et al., 2004 ; Wu et al.,

2007 ; Wong et al., 2009). L'expression d'une forme constitutivement active de NRAS conduit notamment à une augmentation de la phosphorylation de ERK, à la différenciation des LB immatures en transitionnels et favorise le développement de LB autoréactifs (Rowland et al., 2010 ; Teodorovic et al., 2014). Toutefois, l'activation spécifique de la voie MEK-ERK n'empêche pas la mise en place de tolérance centrale des LB (Greaves et al., 2018). Au vu de la légère augmentation de cette voie de signalisation dans les LB *Prkcd*^{G510S/G510S}, celle-ci pourrait participer à l'augmentation du signal tonique des LB des souris *Prkcd*^{G510S/G510S} et favoriser la survie des LB.

3/ Nos résultats ont mis en avant l'implication de PKC- δ dans la régulation de la voie PI3K/AKT/mTOR dans les LB, ce qui n'avait encore jamais été décrit à notre connaissance. Cette voie de signalisation joue un rôle important dans de nombreux aspects du développement et de l'activation des LB (Abdelrasoul et al., 2018). Tout d'abord, l'augmentation inappropriée de l'activité de PI3K est notamment associée à une rupture de la tolérance centrale dû à l'absence notamment de l'induction de *RAG1/RAG2* (Verkoczy et al., 2007 ; Greaves et al., 2019). Toutefois, la tolérance centrale ne semble pas être le processus majeur altéré par l'absence de PKC- δ . Mecklenbräuker et al. affirment que les LB des souris *Prkcd*^{-/-} croisées avec les souris transgéniques IgHEL:mHEL (présentées dans le chapitre 3.2.2 de la partie bibliographie) sont bien éliminés par délétion clonale (Mecklenbräuker et al. 2002). Néanmoins, ces données ne sont pas présentées dans l'article et ne nous permettent pas de réfuter le rôle de PKC- δ dans la tolérance centrale. D'un autre côté, Limnander et al. proposent que la perte de PKC- δ conduise à un défaut d'apoptose spécifiquement aux stades transitionnels, lorsque les LB sont encore sensibles à la délétion clonale (Limander et al., 2011 ; Limnander et al., 2013). Cependant, nos résultats n'ont pas montré d'avantages spécifiques des LB *Prkcd*^{G510S/G510S} aux stades transitionnels lors des expériences de reconstitution de moelle osseuse à partir d'un ratio 50 : 50 de cellules provenant de souris *Prkcd*^{+/+} et *Prkcd*^{G510S/G510S} (données non montrées). Par ailleurs, le mécanisme sous-jacent proposé dans ces études, qui serait une baisse de l'activation de ERK dans les LB en l'absence de PKC- δ , n'a été retrouvé ni dans la population de LB totale, ni aux stades transitionnels chez les souris *Prkcd*^{G510S/G510S}. De manière intéressante, Mecklenbräuker et al. ont aussi mis en avant la résistance à l'anergie des LB provenant des souris *Prkcd*^{-/-} (Mecklenbräuker et al. 2002). A l'inverse, un défaut de SHIP-1 ou PTEN, dont la fonction est opposée à celle de la PI3K, conduit à une perte de l'anergie, suggérant que ces phosphatases favorisent l'anergie en limitant la signalisation de PI3K (O'Neill et al., 2011). Etant donné qu'un défaut de PKC- δ conduit à une augmentation de l'activité de la PI3K, la mutation homozygote G510S de *Prkcd* empêcherait la mise en place des processus de l'anergie. D'autre part, la voie PI3K favorise la survie et la prolifération des LB matures en périphérie. Alors que la perte du BCR des LB en périphérie conduit rapidement à l'apoptose des cellules, l'activation constitutive de la voie PI3K peut reverser ce phénotype et permettre la survie des LB (Srinivasan et al., 2009). Ces

travaux mettent en avant l'importance de cette voie de signalisation dans le signal tonique du BCR. Nos résultats ont montré que l'activation des molécules de la voie PI3K/AKT/mTOR (PIP3, pAKT, pS6) était initialement supérieure dans les LB *Prkcd*^{G510S/G510S} comparé aux contrôles. De ce fait, un défaut de PKC- δ favoriserait l'activation de cette voie de signalisation, ce qui conduirait à une hausse du signal tonique des LB. Enfin, la voie PI3K/AKT conduit à un élément central de la machinerie cellulaire : mTOR. Ce complexe enzymatique est au centre du métabolisme cellulaire en intégrant une multitude de signaux associés à la disponibilité en acides aminés, en ATP, en facteurs de croissances, etc. Dans des conditions satisfaisantes, la signalisation mTOR est active et entraîne la synthèse des protéines. En plus de favoriser la croissance cellulaire et la prolifération des LB, la voie mTOR contribue également à la mise en place des centres germinatifs et à la différenciation des LB en plasmocytes (Jones et al., 2016 ; Lee et al., 2017). De manière intéressante, ces données concordent avec nos observations chez la souris *Prkcd*^{G510S/G510S} soit : l'augmentation des LB des centres germinatifs, des plasmocytes et la hausse d'autoanticorps de type IgG.

En résumé, il apparaît que PKC- δ soit une protéine à plusieurs facettes, impliquée dans divers processus essentiels au maintien de la tolérance par son rôle dans la régulation de l'apoptose et la régulation de la voie PI3K/AKT/mTOR. Désormais, nous souhaitons comprendre précisément par quel moyen PKC- δ agit sur la régulation de cette voie de signalisation. Nos résultats ont notamment montré que l'augmentation de la phosphorylation de S6 était un effet intrinsèque de la mutation *Prkcd*^{G510S/G510S} dans les LB. Nous avons également montré que seuls les inhibiteurs de PI3K et de mTOR permettaient de réduire l'excès de phosphorylation de S6 dans les LB *Prkcd*^{G510S/G510S} contrairement aux inhibiteurs de Syk ; mettant ainsi en avant le rôle régulateur spécifique de PKC- δ dans la voie PI3K/AKT/mTOR. Nous souhaitons alors rechercher les partenaires de PKC- δ via des études protéomiques. Le schéma expérimental décrit dans la figure 55 a été en majorité réalisé puisque nous sommes actuellement en attente des premiers résultats.

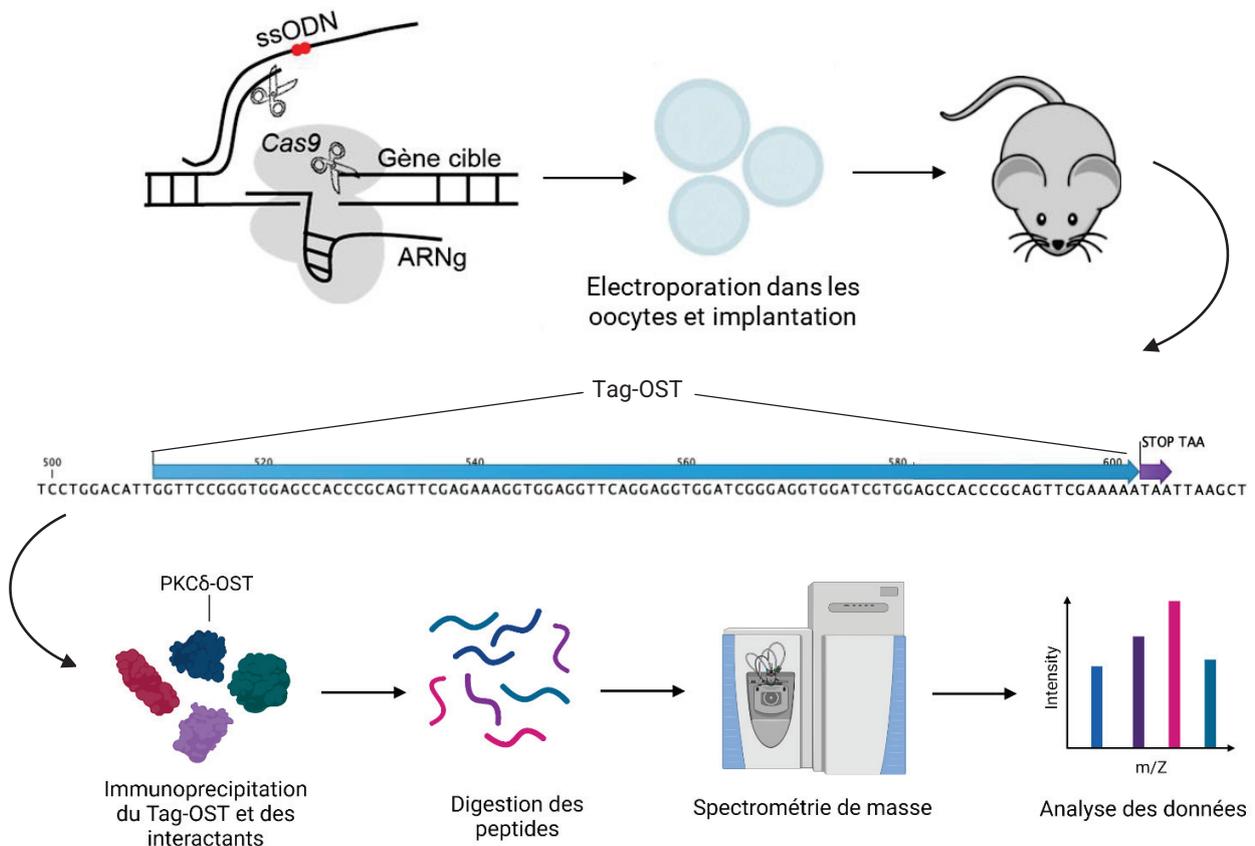


Figure 55 : Schéma expérimental de la création de la souris transgénique par CrispR/Cas9 à la masse spectrométrie

3.3/ Vers la thérapie personnalisée

3.3.1/ Personnaliser les traitements

Le LES est caractérisé par sa large hétérogénéité ; ce qui représente un défi pour les cliniciens, tant pour le diagnostic que pour le choix du traitement. Bien que l'espérance de vie des patients se soit grandement améliorée passant de 60% de survie 10 ans après le diagnostic dans les années 1950 à plus 90% ces dernières décennies, cette progression est beaucoup plus lente ces dernières années notamment avec la manifestation de comorbidités associées au LES apparaissant avec l'augmentation de la durée de vie des patients (Cervera et al., 2009 ; Mak et al., 2012). A l'heure actuelle, la majorité des patients reçoivent un traitement de fond efficace permettant de prévenir les nouvelles poussées (Kuhn et al., 2015 ; Ruiz-Irastorza et al., 2020). Celui-ci repose sur l'utilisation de médicaments utilisés à l'origine contre le paludisme : l'hydroxychloroquine ou la chloroquine. Les patients présentant des manifestations articulaires

peuvent recevoir également des anti-inflammatoires non stéroïdiens ou des immunosuppresseurs comme le méthotrexate ou le thalidomide. En cas d'atteinte rénale et selon le type et la gravité des lésions observées, le traitement repose sur une association de corticoïdes à fortes doses avec des immunosuppresseurs. Toutefois, l'utilisation de ces médicaments entraînent de nombreux effets indésirables du fait de leur manque de spécificité. Ces dernières années, les biothérapies ont fait leur apparition dans le traitement du LES mais sont utilisées dans des conditions très restreintes. Le belimumab, un anticorps monoclonal humain ciblant la forme soluble du BAFF, est préconisé pour les patients adultes uniquement, avec une forme grave de la maladie ayant des atteintes cutanées, articulaires et présentant des auto-anticorps. Son efficacité est cependant modeste et tardive (Horowitz et al., 2012). Le rituximab est un anticorps monoclonal ciblant la protéine CD20, exprimée sur la majorité des LB et entraînant leur déplétion. Cependant, les plasmocytes produisant notamment les autoanticorps, n'expriment pas cette molécule et ne sont donc pas éliminés (Hiepe et al., 2011). Le rituximab est uniquement utilisé en cas d'impasse thérapeutique notamment lors d'atteinte rénale ou en cas d'anémies périphériques auto-immunes mais n'a pas reçu d'autorisation de mise sur le marché pour le lupus (Faustini et al., 2022). Il apparaît alors que les traitements standards proposés causent un trop grand nombre d'effets secondaires tandis que les biothérapies ont montré pour l'instant une efficacité réduite. Le développement de thérapies novatrices semble donc nécessaire et cela passe notamment par la prise en compte de l'hétérogénéité de la maladie pour proposer différentes lignes de traitements prenant en compte cette diversité dans le LES. L'étude des LES monogéniques a notamment permis de mettre en lumière cette diversité en permettant d'identifier des voies clés impliquées dans la pathogénèse de la maladie. C'est pourquoi la thérapie personnalisée apparaît extrêmement prometteuse chez les patients avec un LES d'origine monogénique en cas d'échec thérapeutique au traitement standard.

Dans le cas de patients atteints d'interféronopathies, l'inhibition de la voie de l'interféron de type I semble judicieuse. Une étude a montré l'efficacité du baracitinib, un inhibiteur de JAK, chez des patients atteints d'interféronopathies (Sanchez et al., 2018). De manière intéressante, deux patients inclus dans l'étude, dont la cause génétique n'avait pas été établie, ont peu répondu aux traitements comparés à ceux dont le diagnostic génétique avait confirmé l'atteinte génétique parmi les gènes associés aux interféronopathies. En outre, le traitement de patients diagnostiqués pour un SAVI avec un inhibiteur de JAK, le ruxolitinib, a montré son efficacité (Frémond et al., 2016 ; König et al., 2017). Par ailleurs, nous avons rapporté qu'un patient ayant une mutation dans le gène *SOCS1* a également présenté une très bonne réponse au ruxolitinib (Hadjadj et al., 2020). Même si ces traitements sont bien tolérés, un risque d'infection est à prendre en compte et à surveiller. Concernant les patients dont la mutation conduirait à une altération des LB, les traitements ciblant ces cellules semblent particulièrement indiqués. Des patients avec une mutation de *PRKCD* ont notamment reçu du rituximab qui a montré son efficacité sur l'un des patients tandis que deux autres ont vu une progression de l'activité de la

maladie et ont été stabilisé sous ofatumumab, un autre anticorps monoclonal ciblant CD20 (Lei et al., 2018). L'ofatumumab permet de potentiellement éliminer les cellules résistantes au rituximab en ciblant notamment un épitope différent du CD20. Une des patientes avec la mutation *PRKCD* G510S/G510S suit également un traitement par rituximab. Néanmoins, elle montre toujours une activité importante de la maladie avec notamment une sévère atteinte rénale. De manière intéressante, deux patients avec un défaut de *PRKCD* ont reçu du sirolimus, qui correspond à la rapamycine, et ont présenté une excellente réponse clinique au traitement (Kuehn et al., 2013 ; Gu et al., 2020). De surcroît, l'arrêt du traitement pendant six mois chez l'un des patients a entraîné une rechute importante. L'effet immunomodulateur du sirolimus est notamment connu à travers son action sur les LT ; en diminuant la réponse T effectrice et en favorisant le développement des LT régulateurs (Battaglia et al., 2005 ; Haxhinasto et al., 2008). En effet, des travaux ont montré que l'activation constitutive de la voie PI3K/AKT/mTOR empêchait l'induction de FOXP3 dans les LT, qui conduit normalement à la différenciation des cellules T en LT régulateurs (Sauer et al., 2008). Explorer le rôle de PKC- δ dans ces cellules au vu de son effet sur la voie PI3K/AKT/mTOR pourrait par ailleurs être d'un grand intérêt et constituer une autre voie potentielle sur laquelle PKC- δ pourrait avoir un effet en dehors des LB. Par conséquent, au vu de nos résultats montrant une amélioration rapide des manifestations auto-immunes chez les souris *Prkcd*^{G510S/G510S} et de l'efficacité de ces traitements chez deux patients avec un défaut de *PRKCD*, la rapamycine apparaît comme un traitement efficace et personnalisé pour les patients présentant un défaut de PKC- δ . Une autre possibilité de traitement pour ces patients serait de cibler la PI3K. Nos résultats ont effet montré l'efficacité d'un de ces inhibiteurs, la wortmaninn, sur la réduction de l'activité de mTOR dans les LB *Prkcd*^{G510S/G510S} (Figure 35). Néanmoins, cet inhibiteur ne peut pas être utilisé en clinique du fait de sa toxicité élevée (Workman et al., 2010). L'un des plus utilisés en clinique est l'idelalisib ; il cible l'isoforme PI3K δ . Il est notamment utilisé dans le traitement de leucémies, de lymphomes non-hodgkiniens et de lymphome folliculaire récidivant (Do et al., 2016). De manière intéressante, un autre inhibiteur de PI3K δ a été testé sur des modèles murins lupiques et a montré une amélioration du phénotype (Scuron et al., 2021). Par conséquent, des inhibiteurs de la PI3K ont déjà été approuvés pour d'autres pathologies et pourraient être potentiellement intéressants au vu de leur spécificité pour les patients avec un défaut de PKC- δ .

En résumé, alors que de nombreux essais cliniques n'ont pas encore démontré un effet convaincant pour traiter le LES, il apparaît nécessaire de prendre en compte l'hétérogénéité notamment génétique du LES afin d'identifier des sous-ensembles de patients ayant des réponses thérapeutiques distinctes. Cela permettrait alors de proposer des traitements personnalisés en fonction du contexte génétique et de l'altération moléculaire.

3.3.2/ Avancer vers la thérapie génique

Certains mécanismes ne peuvent toutefois pas être modifiés par voies médicamenteuses. C'est notamment le cas dans les LES causés par des défauts du complément ou de DNases conduisant à une accumulation d'auto-antigènes. La greffe de moelle osseuse est alors proposée dans les cas les plus graves (Arkwright et al., 2014). Néanmoins, cette pratique se heurte à de nombreuses limitations, telles que la difficulté de trouver un donneur compatible et les complications souvent graves comme le rejet de greffe ou la réaction du greffon contre l'hôte (GVH) (Mohty et al., 2010). La thérapie génique apparaît alors comme une alternative intéressante permettant de "corriger" directement la mutation. Plusieurs méthodes existent aujourd'hui : l'utilisation de vecteur virale pour apporter la copie fonctionnelle du gène et l'édition du génome par la technologie CrispR/Cas9. Cette dernière approche permet notamment de pouvoir corriger les mutations perte de fonction mais également gain de fonction contrairement à la méthode utilisant les vecteurs viraux (Figure 56). La principale limite de cette approche est le risque de "off-target". De nombreux outils sont actuellement développés afin d'améliorer cette approche et pourrait permettre de la proposer dans les cas les plus graves de LES monogéniques.

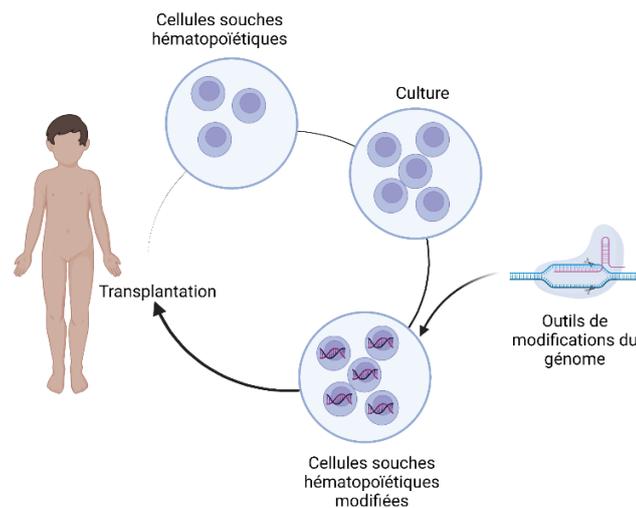


Figure 56 : Schéma de l'approche de thérapie génique par édition du génome

3.4/ De l'étude des LES monogéniques aux LES adultes

Quelques différences existent entre les LES juvéniles et les LES classiques se développant à l'âge adulte, principalement en ce qui concerne la gravité de la pathologie. Au vu de l'hétérogénéité des mutations impliquées dans les LES monogéniques, le lupus juvénile ne serait pas une seule maladie, mais constituerait un ensemble de groupes hétérogènes ayant des défauts uniques (Omarjee et al., 2019). De manière intéressante, les variants associés au LES

retrouvés chez l'adultes touchent les mêmes mécanismes que dans les LES monogéniques soit : la libération d'auto-antigènes, la production de cytokines pro-inflammatoires et de l'IFN-I et la dérégulation des cellules de l'immunité adaptative (Kaul et al., 2016). Par ailleurs, les éléments environnementaux associés au LES altèrent ces mêmes mécanismes. Par exemple, les UV favorisent la libération de matériel nucléaire et l'apoptose des cellules ; le tabac et les infections virales créent un contexte inflammatoire, etc. (Costenbader et al., 2004 ; Kang et al., 2004 ; Wolf et al., 2018). Par conséquent, les LES classiques pourraient partager les anomalies moléculaires des LES juvéniles mais dont les causes seraient secondaires à des éléments de l'environnement ou des facteurs épigénétiques. Au vu de l'hétérogénéité du spectre clinique et biologique retrouvé également chez les patients adultes, le lupus classique serait également composé d'un ensemble de groupes hétérogènes ayant des altérations spécifiques. Cela expliquerait l'échec de plusieurs essais cliniques pour des médicaments pourtant prometteurs. Paradoxalement, ces essais cliniques ciblent souvent un élément clé de l'un des mécanismes retrouvés altérés dans le LES mais ne prennent pas toujours en compte l'hétérogénéité clinique et biologique des patients inclus dans ces études. Prendre en compte cette hétérogénéité apparaît ainsi primordial pour le développement de nouvelles thérapies. Par exemple, l'anifrolumab ciblant le récepteur IFNAR a montré son efficacité à une dose de 300 mg après 52 semaines de traitement chez 32,3% des patients dont la signature interféron était élevée initialement ; alors que ce chiffre chute à 7,7% des patients ayant une faible signature interféron au départ (Furie et al., 2017). Ce traitement a récemment reçu une autorisation de mise sur le marché pour le lupus et semble donc particulièrement intéressant pour les patients avec une signature interféron élevée (Morand et al., 2022). Dörner et al. proposent de redéfinir les critères de la classification du LES et de tester des thérapies couvrant plusieurs cibles thérapeutiques ; afin que la thérapie personnalisée devienne possible (Dörner et al., 2019). Par conséquent, une approche globale considérant le spectre clinique mais aussi biologique, génétique et moléculaire permettrait de prendre en compte toute la complexité du lupus et de faciliter l'identification des patients appropriés pour recevoir des thérapies ciblées particulières (Figure 57).

De manière intéressante, Gorelik et al. ont reporté une baisse de la phosphorylation de PKC- δ dans les LT de deux patients avec un LES classiques comparés à des contrôles (Gorelik et al., 2017). En outre, une augmentation de l'activité de la voie PI3K/AKT/mTOR a également été reportée dans le LES (Taher et al., 2010). Il serait intéressant de voir si un défaut de PKC- δ peut être retrouvé chez d'autres patients, d'étudier les aspects cliniques, biologiques, génétiques et moléculaires de ses patients afin de déterminer s'il pourrait constituer un sous-groupe de lupus. Par ailleurs, nous pourrions également déterminer l'existence d'une corrélation entre le défaut de PKC- δ et la hausse de l'activité de la voie PI3K/AKT/mTOR. Ces travaux permettraient notamment de déterminer si le défaut de PKC- δ retrouvé dans les LES juvéniles pourrait être transposable au LES adulte et élargir à un plus grand nombre de patients la possibilité d'une thérapie personnalisée.

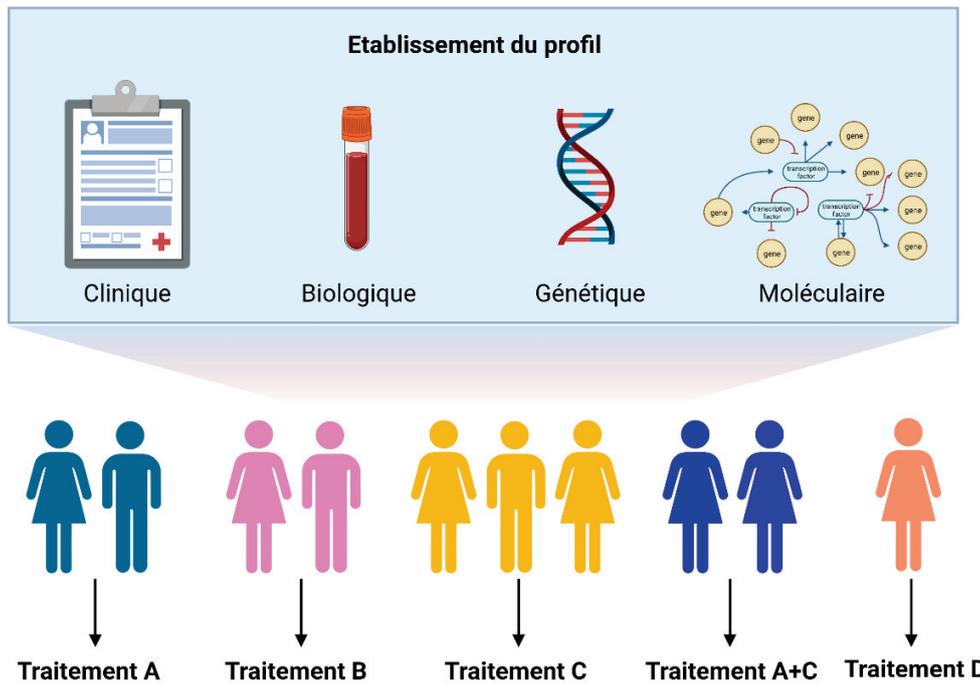


Figure 57 : Vers la thérapie personnalisée dans le lupus

4- CONCLUSION GENERALE

L'objectif de mes travaux de thèse était d'une part de déterminer l'effet de nouveaux variants sur la fonctionnalité des protéines IKAROS et LYN, d'étudier le phénotype des modèles murins porteurs de ces mutations et d'autre part de confirmer le rôle de la mutation de *PRKCD* G510S/G510S dans le développement du LES, de réaliser un immunophénotypage approfondi du modèle murin et de disséquer les mécanismes moléculaires altérées.

Concernant le projet sur les variants de *IKZF1* et *LYN*, nos travaux ont permis de déterminer que le variant *IKZF1* D120V conduit à un défaut des capacités transcriptionnelles et de liaison à l'ADN de IKAROS. Toutefois, des expériences complémentaires devront être réalisées pour confirmer ce défaut. Quant au variant *LYN* F258S, nous n'avons pas observé de défaut de la protéine LYN porteuse de cette mutation. Néanmoins, des expérimentations sont en cours afin de déterminer plus précisément l'influence de la mutation sur l'activité kinase de la protéine. Concernant l'étude des modèles murins, elle ne nous a pas permis de répondre à nos interrogations sur un potentiel effet synergique des deux mutations sur le développement d'un phénotype auto-immun. Nous avons observé quelques altérations chez les souris avec la mutation *Lyn* F258S suggérant que ce variant pourrait potentiellement avoir un effet.

Dans le projet sur l'étude de la mutation *Prkcd* G510S/G510S chez la souris, nous avons montré que ce modèle développait un phénotype auto-immun sévère et précoce, associé à une dérégulation des NK et des LB. Nous avons notamment observé une diminution des NK matures et déterminé que ce défaut serait causé par la mutation de *Prkcd*. Par ailleurs, nous avons démontré que le phénotype auto-immun est lié à un rôle autonome des LB *Prkcd*^{G510S/G510S}. De plus, les LB dans notre modèle présentent une augmentation de leur capacité proliférative et une altération de la voie PI3K/AKT/mTOR. Plus précisément, nos résultats indiquent que l'engagement du BCR induit une activation plus élevée de PI3K/AKT/mTOR dans les LB de souris *Prkcd*^{G510S/G510S} que dans les LB contrôles. Nous avons alors traité des souris *Prkcd*^{G510S/G510S} avec de la rapamycine, un inhibiteur spécifique de mTORC1 spécifique, ou un véhicule. Nous avons vu que le traitement avec la rapamycine améliore considérablement les symptômes auto-immuns, démontrant *in vivo* l'effet délétère de l'activation de la voie mTOR chez les souris avec la mutation *Prkcd*.

L'identification et l'étude de formes génétiques du lupus permettent de mieux comprendre les mécanismes de tolérance et de proposer des thérapies ciblées.

ANNEXES

Article 2 :

Polyclonal expansion of TCR Vbeta 21.3+ CD4+ and CD8+ T cells is a hallmark of Multisystem Inflammatory Syndrome in Children

Moreews Marion, Kenz Le Gouge, Samira Khaldi-Plassart, Rémi Pescarmona, Anne-Laure Mathieu, Christophe Malcus, Sophia Djebali, Alicia Bellomo, Olivier Dauwalder, Magali Perret, Marine Villard, Emilie Chopin, Isabelle Rouvet, Francois Vandenesch, Céline Dupieux, Robin Pouyau, Sonia Teyssedre, Margaux Guerder, Tiphaine Louazon, Anne-Moulin-Zinsch, Marie Duperril, Hugues Patural, Lisa Giovannini-Chami, Aurélie Portefaix, Behrouz Kassai, Fabienne Venet, Guillaume Monneret, Christine Lombard, Hugues Flodrops, Jean-Marie De Guillebon, Fanny Bajolle, Valérie Launay, Paul Bastard, Shen-Ying Zhang, Valérie Dubois, Olivier Thaunat, Jean-Christophe Richard, Mehdi Mezidi, Omran Allatif, Kahina Saker, Marlène Dreux, Laurent Abel, Jean-Laurent Casanova, Jacqueline Marvel, Sophie Trouillet-Assant, David Klatzmann, Thierry Walzer, Encarnita Mariotti-Ferrandiz, Etienne Javouhey, and Alexandre Belot

Science Immunology. 2021 May 25;6(59):eabh1516.
doi: 10.1126/sciimmunol.abh1516.

CORONAVIRUS

Polyclonal expansion of TCR V β 21.3⁺ CD4⁺ and CD8⁺ T cells is a hallmark of multisystem inflammatory syndrome in children

Marion Moreews¹, Kenz Le Gouge^{2†}, Samira Khaldi-Plassart^{3,4†}, Rémi Pescarmona^{1,4,5†}, Anne-Laure Mathieu^{1†}, Christophe Malcus^{6,7}, Sophia Djebali¹, Alicia Bellomo¹, Olivier Dauwalder^{1,8}, Magali Perret^{1,5}, Marine Villard^{1,5}, Emilie Chopin⁹, Isabelle Rouvet⁹, Francois Vandenesch^{1,8}, Céline Dupieux^{1,8}, Robin Pouyau¹⁰, Sonia Teysseire¹⁰, Margaux Guerder¹⁰, Tiphaine Louazon¹¹, Anne Moulin-Zinsch¹², Marie Duperril¹³, Hugues Patural^{13,14}, Lisa Giovannini-Chami^{15,16}, Aurélie Portefaix¹⁷, Behrouz Kassai¹⁷, Fabienne Venet^{1,6}, Guillaume Monneret^{6,7}, Christine Lombard⁵, Hugues Flodrops¹⁸, Jean-Marie De Guillebon¹⁹, Fanny Bajolle²⁰, Valérie Launay²¹, Paul Bastard^{22,23}, Shen-Ying Zhang^{22,23,24}, Valérie Dubois²⁵, Olivier Thauinat^{1,25,26,27}, Jean-Christophe Richard^{28,29}, Mehdi Mezidi^{28,29}, Omran Allatif¹, Kahina Saker^{1,30}, Marlène Dreux¹, Laurent Abel^{22,23,24}, Jean-Laurent Casanova^{22,23,24,31}, Jacqueline Marvel¹, Sophie Trouillet-Assant^{1,30}, David Klatzmann^{2,32}, Thierry Walzer^{1*}, Encarnita Mariotti-Ferrandiz^{2,32†}, Etienne Javouhey^{7,10†}, Alexandre Belot^{1,6*}

Copyright © 2021 The Authors, some rights reserved; exclusive licensee American Association for the Advancement of Science. No claim to original U.S. Government Works. Distributed under a Creative Commons Attribution License 4.0 (CC BY).

Multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) is a delayed and severe complication of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection that strikes previously healthy children. As MIS-C combines clinical features of Kawasaki disease (KD) and toxic shock syndrome (TSS), we aimed to compare the immunological profile of pediatric patients with these different conditions. We analyzed blood cytokine expression and the T cell repertoire and phenotype in 36 MIS-C cases, which were compared with 16 KD, 58 TSS, and 42 coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases. We observed an increase of serum inflammatory cytokines (IL-6, IL-10, IL-18, TNF- α , IFN- γ , sCD25, MCP1, and IL-1RA) in MIS-C, TSS, and KD, contrasting with low expression of HLA-DR in monocytes. We detected a specific expansion of activated T cells expressing the V β 21.3 T cell receptor β chain variable region in both CD4 and CD8 subsets in 75% of patients with MIS-C and not in any patient with TSS, KD, or acute COVID-19; this correlated with the cytokine storm detected. The T cell repertoire returned to baseline within weeks after MIS-C resolution. V β 21.3⁺ T cells from patients with MIS-C expressed high levels of HLA-DR, CD38, and CX3CR1 but had weak responses to SARS-CoV-2 peptides *in vitro*. Consistently, the T cell expansion was not associated with specific classical HLA alleles. Thus, our data suggested that MIS-C is characterized by a polyclonal V β 21.3 T cell expansion not directed against SARS-CoV-2 antigenic peptides, which is not seen in KD, TSS, and acute COVID-19.

¹CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Univ Lyon, Inserm, U1111, Université Claude Bernard, Lyon 1, CNRS, UMR5308, ENS de Lyon, Lyon F-69007, France. ²Sorbonne Université, UPMC Univ Paris 06, INSERM UMR5 959, Immunology Immunopathology-Immunotherapy (i3), Paris, France. ³Pediatric Nephrology, Rheumatology, Dermatology Unit, Hôpital Femme Mère Enfant, Hospices Civils de Lyon (RAISE), Lyon, France. ⁴National Referee Centre for Rheumatic and Autoimmune and Systemic diseases in childrEn, Lyon, France. ⁵Immunology Laboratory, Hospices Civils de Lyon, Lyon Sud Hospital, Pierre-Bénite, France. ⁶Hospices Civils de Lyon, Edouard Herriot Hospital, Immunology Laboratory, 69437 Lyon, France. ⁷EA 7426 "Pathophysiology of Injury-Induced Immunosuppression" (Université Claude Bernard Lyon 1 - Hospices Civils de Lyon - bioMérieux), Joint Research Unit HCL-bioMérieux, 69003 Lyon, France. ⁸Centre National de Référence des Staphylocoques, Institut des Agents Infectieux, Hospices Civils de Lyon, F-69004 Lyon, France. ⁹Cellular Biotechnology Department and Biobank, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France. ¹⁰Réanimation Pédiatrique Hôpital Femme-Mère-Enfant Hospices Civils de Lyon, Bron, France. ¹¹Service de pédiatrie, Centre Hospitalier de Valence, Valence, France. ¹²Unité médico-chirurgicale des cardiopathies congénitales, hôpital Louis-Pradel, hospices civils de Lyon, 69677 Bron, France. ¹³Pediatric intensive care unit, University hospital of Saint-Étienne, Saint-Priest-en-Jarez, France. ¹⁴U1059 INSERM - SAINBIOSE - DVH - Université de Saint-Étienne, 42055 Saint-Étienne, France. ¹⁵Pediatric Pulmonology and Allergology Department, Hôpitaux pédiatriques de Nice CHU-Lenval, Nice, France. ¹⁶Université Côte d'Azur, Nice, France. ¹⁷Center of Clinical Investigation, Lyon University Hospital, Bron, France. ¹⁸Service de Pédiatrie, Groupe Hospitalier Sud Réunion, CHU de La Réunion, Saint Pierre, La Réunion, France. ¹⁹Service de Néphrologie, Rhumatologie pédiatrique, Hôpitaux pédiatriques de Nice CHU-Lenval, Nice, France. ²⁰Hôpital Necker Enfants Malades, Centre de référence M3C, AP-HP, Paris, France. ²¹Urgences pédiatriques, Hôpital femme Mère Enfant, Hospices Civils de Lyon, Bron, France. ²²Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, Necker Branch, INSERM U1163, Necker Hospital for Sick Children, Paris, France. ²³University of Paris, Imagine Institute, Paris, France. ²⁴St. Giles Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, Rockefeller Branch, Rockefeller University, New York, NY, USA. ²⁵EFS Auvergne Rhône Alpes, laboratoire Histocompatibilité, 111, rue Elisée-Reclus, 69150 Décines, France. ²⁶Department of Transplantation, Nephrology, and Clinical Immunology, Edouard Herriot University Hospital, Lyon, France. ²⁷Lyon-Est Medical Faculty, Claude Bernard University (Lyon 1), 8, avenue Rockefeller, 69373 Lyon, France. ²⁸Médecine Intensive-Réanimation, Hôpital de la Croix-Rousse, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France. ²⁹Lyon University, Lyon, France. ³⁰Laboratoire de Virologie, Institut des Agents Infectieux, Laboratoire associé au Centre National de Référence des virus des infections respiratoires, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France. ³¹Howard Hughes Medical Institute, New York, NY, USA. ³²Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Biotherapy and Département Hospitalo-Universitaire Inflammation-Immunopathology-Biotherapy (i2B), Paris, France.

*Corresponding author. Email: alexandre.belot@chu-lyon.fr

†These authors contributed equally to this work.

INTRODUCTION

At the end of April 2020, European clinicians warned public health agencies about an abnormal increase of Kawasaki-like diseases and myocarditis requiring critical care support in the context of the ongoing coronavirus disease 2019 (COVID-19) epidemic in children (1–3). American clinicians also reported a large outbreak of severe inflammation in children after COVID-19 infection, a condition that is now named pediatric inflammatory multisystemic syndrome or MIS-C (4–6). The clinical phenotype of this emerging disease is broad and encompasses features of Kawasaki disease (KD) and toxic shock syndrome (TSS). Many cases require intensive care support, making MIS-C one of the most severe manifestation of COVID-19 in children. MIS-C occurs 3 to 4 weeks after acute COVID-19 in children (3, 5–7).

To date, reports on MIS-C show slight differences in cytokine profiling and immunophenotype between MIS-C and KD or pediatric COVID-19 (8, 9). Analysis of T cells reveals a lower number of T cells in MIS-C with no or subtle signs of activation (10). Multi-dimensional immune profiling on small numbers of patients shows differences between acute COVID-19 and prepandemic KD (8, 11). A subset of activated CD8 T cells expressing the CX3C chemokine receptor (CX3CR1) is observed in MIS-C (12), and both CD8 and natural killer (NK) cells demonstrate an elevated expression of cytotoxicity genes (13). Anti-severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) antibodies (Abs) are equally produced in pediatric COVID-19 and MIS-C. Autoantibodies are uniquely found during MIS-C or KD, which supports the contribution of the humoral response to both diseases (8, 11). Last, a role for genetic factors is evoked in MIS-C pathogenesis because it occurs more frequently in Hispanic or African children (14–16). Despite these pioneer studies, the immunological mechanism underlying MIS-C remains unknown.

To address this question, we compared the immune profile of patients with MIS-C with that of patients with COVID-19 and that of patients with other clinically similar entities such as KD and TSS. For this, we explored the cytokine and cellular immune profile using different techniques. Using flow cytometry and transcriptomic analyses, we uncovered a specific $V\beta 21.3^+$ T cell expansion in 24 of 32 tested patients with MIS-C when assessed in the first month after onset. T cell receptor (TCR) sequencing revealed the polyclonal nature of the $V\beta 21.3^+$ expansion. No specific human leukocyte antigen (HLA) bias was identified in patients, but we found a specific activation profile within $V\beta 21.3^+$ T cells. This activation was transient with a normalization of the repertoire within days to weeks after the inflammatory episode. Together, our findings provide an immunological signature in MIS-C with potential implication in the diagnosis and treatment of this rare disease.

RESULTS

MIS-C presentation overlapped with TSS and KD

We took a cohort of 36 children with MIS-C and compared them with 16 KD cases diagnosed during and before the pandemic, 58 retrospective cases of patients with TSS, and 42 patients with acute COVID-19 (11 children and 31 adults). This comparison was motivated by previous descriptions of MIS-C in Europe and in the United States, showing a clinical overlap between staphylococcal toxin-mediated TSS and KD in patients with MIS-C (1–3). Figure 1A outlines the study flowchart and the clinical and biological

parameters we evaluated. Patients diagnosed for MIS-C, classical KD, TSS, or acute COVID-19 were included. Patients were then subjected to deep immunological analyses combining cytokine profiling, TCR $V\beta$ analysis, and T cell stimulation assays (Fig. 1A). We confirmed the strong clinical overlap between MIS-C, TSS, and KD. Many patients in the MIS-C group also fulfilled some of the five major criteria for TSS and KD, respectively (Fig. 1B). Considering the clinical parameters, the most frequent features of patients with MIS-C in our cohort were fever, cardiac dysfunction, gastrointestinal symptoms, coagulopathy, and systemic inflammation (table S1). Additional clinical data are presented in table S2 for KD, TSS, and acute COVID-19 and in table S3 for all patients. Moreover, table S4 gives a list of the patients analyzed in each of the following figure panels.

High levels of proinflammatory cytokines in MIS-C contrasted with lymphopenia and low HLA-DR expression in monocytes

SARS-CoV-2 can cause fatal acute respiratory distress syndrome in patients at risk. This manifestation is caused by delayed and poorly controlled immune responses, with a deleterious role of inflammatory cytokines. Moreover, we and others have identified a subgroup of severe COVID-19 patients with impaired type I interferon (IFN) production (17–20). Thus, a regulated production of cytokines is paramount for control of SARS-CoV-2 infection. This prompted us to investigate how cytokines could contribute to MIS-C pathogenesis. We compared the serum levels of IFN- α , IFN- γ , tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin 10 (IL-10), soluble CD25 (sCD25), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1), IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra), IL-6, and IL-18 between healthy controls and MIS-C, KD, TSS, and different forms of COVID-19 (mild pediatric, mild, or severe adult-onset COVID-19; see table S2 for a list of clinical features in the different patients' groups).

The expression of IFN-stimulated genes (ISGs) in blood cells was significantly higher in MIS-C compared with controls but rather low compared with patients with COVID-19 (Fig. 2, A to C). The level of serum IFN- $\alpha 2$ followed the same trends, whereas serum IFN- γ was variable among patients with MIS-C, with very high levels in a few patients. The expression of the other cytokines measured (IL-6, IL-10, IL-18, TNF- α , MCP1, IL-1Ra, and sCD25) was very high in patients with MIS-C compared with controls and very similar to that of patients with KD, TSS, and severe COVID-19 (Fig. 2, B and C). The level of sCD25 was significantly higher in patients with TSS than in patients with MIS-C and significantly lower in patients with severe COVID-19 than in patients with MIS-C (Fig. 2, B and C). A previous study found higher levels of serum IL-6 in patients with KD than in patients with MIS-C, contrasting with our data (8).

To further explore the MIS-C immunological profile, we quantified the number of peripheral lymphocytes of different types and the expression of HLA-DR in patients' monocytes. T and NK cell counts were, on average, very low in patients with MIS-C and KD, whereas B cell counts were normal (Fig. 2D and fig. S1). We found a decreased expression of HLA-DR in monocytes in both patients with KD and MIS-C compared with controls (Fig. 2E and fig. S1). Together, our data show a strong similarity in cytokine profiles between MIS-C, KD, and TSS and highlight the decreased lymphocyte counts and low HLA-DR expression in monocytes in patients with MIS-C compared with controls.

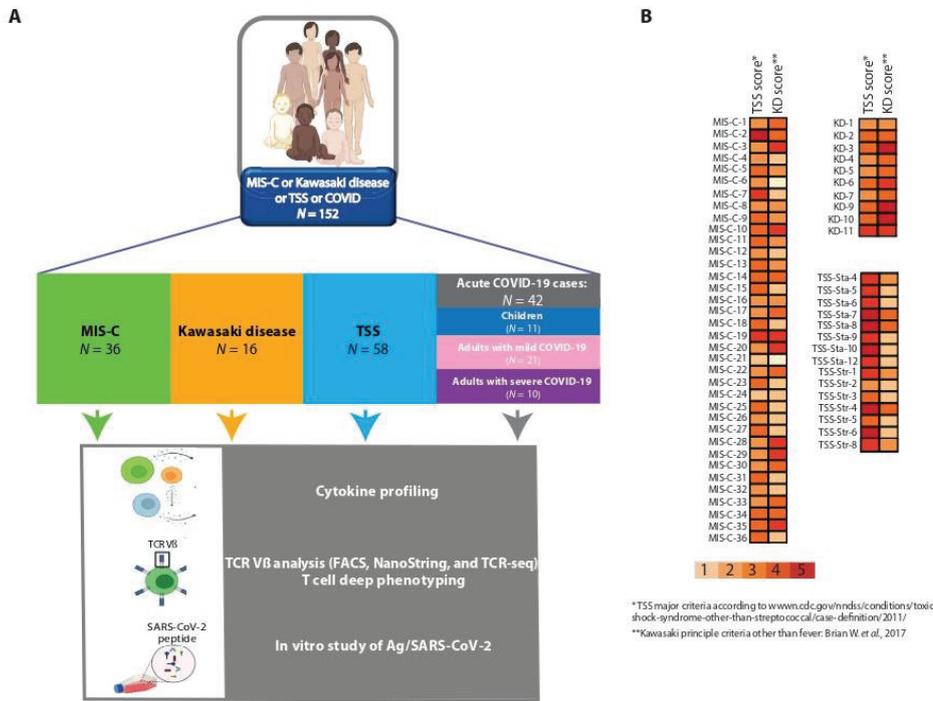


Fig. 1. Study design and clinical features of patients with MIS-C. (A) Outline of the study including patients with MIS-C, KD, TSS, and acute COVID-19 and the immunological investigation workflow. (B) Heatmap showing the number of major criteria of TSS or KD for patients with TSS, MIS-C, and KD included in our study, considering the following case definition criteria: five clinical items for TSS (fever, rash, desquamation, hypotension, and multisystem involvement) and five clinical items for KD in addition to fever (rash, cervical lymphadenopathy, bilateral conjunctivitis, oral mucosal changes, and peripheral extremity changes).

Expansion of Vβ21.3⁺ peripheral T cells in a large fraction of patients with MIS-C

TSS toxin 1 (TSST1)-related TSS is associated with a skewing of the T cell repertoire toward Vβ2 as a result of TSST1 superantigen-induced proliferation of Vβ2⁺ T cells (21). Every other *Staphylococcus aureus* superantigenic toxin induces the expansion of specific TCR Vβ subsets, i.e., Vβ 5.2, 5.3, 7.2, 9, 16, 18, and 22 for staphylococcal enterotoxin A (SEA) or Vβ 3, 12, 13.2, 14, 17, and 20 for SEB (22). Given the similarities between TSS and MIS-C, we explored the possibility that MIS-C was also associated with specific T cell expansions. To explore the T cell repertoire in MIS-C, we first used flow cytometry to assess the distribution of Vβ subunits in T cells from patients with MIS-C, in comparison with patients with KD, TSS, and COVID-19 (Fig. 3A and fig. S2A). As expected, patients with TSS displayed the hallmark expansion of the Vβ2⁺ subset. Several Vβ-specific expansions were also visible in patients with MIS-C and, in most cases, Vβ21.3⁺ expansions (Fig. 3A) in both CD4 and CD8 T subsets (fig. S3A). These expansions had similar amplitudes as the Vβ2⁺ expansions in TSS (Fig. 3A). A principal components analysis (PCA) of the Vβ distribution in CD4 and CD8 T cells showed that the main parameters separating the different patients were the frequency of Vβ2⁺ and of Vβ21.3⁺ cells (fig. S3, B and C). Overall, the expansion of Vβ21.3⁺ T cell subsets was seen in 15 of 26 (58%) patients with MIS-C and in none of the other

conditions analyzed by flow cytometry, i.e., KD, TSS, and COVID-19 (Fig. 3A). Next, we wanted to use a different technique to test the specificity of this expansion, and we therefore performed transcriptomic analyses of Vβ expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using the NanoString technology. This technique also requires much less material than flow cytometry, which allowed us to run lymphopenic samples from severe COVID-19 cases. This transcriptomic analysis firmly established that the Vβ21.3⁺ T cell expansion is a hallmark of MIS-C because it was seen in 18 of 23 patients with MIS-C tested (fig. S3D). Thus, taking together flow cytometry and NanoString analyses, we found that 24 of 32 (75%) patients with MIS-C and none in the other clinical groups displayed *T cell receptor beta variable genes 11-2 (TRBV11-2)/Vβ21.3⁺* expansions.

We then compared the level of serum cytokines between MIS-C patients with and without Vβ21.3⁺ T cell expansions at the time of the acute episode. The levels of IL-18 and IL-1RA (Fig. 3, C and D) were associated with the polyclonal Vβ21.3 expansions, but not those of the other cytokines tested (fig. S4, A and B), suggesting that Vβ21.3⁺ T cells were associated with the cytokine storm.

TCR sequencing highlighted the polyclonal nature of TCR Vβ21.3 expansions

To investigate the clonality of Vβ21.3⁺ expanded cells, we analyzed the TCR repertoire of 11 patients with MIS-C for whom whole-blood

Downloaded from https://www.science.org on July 07, 2022

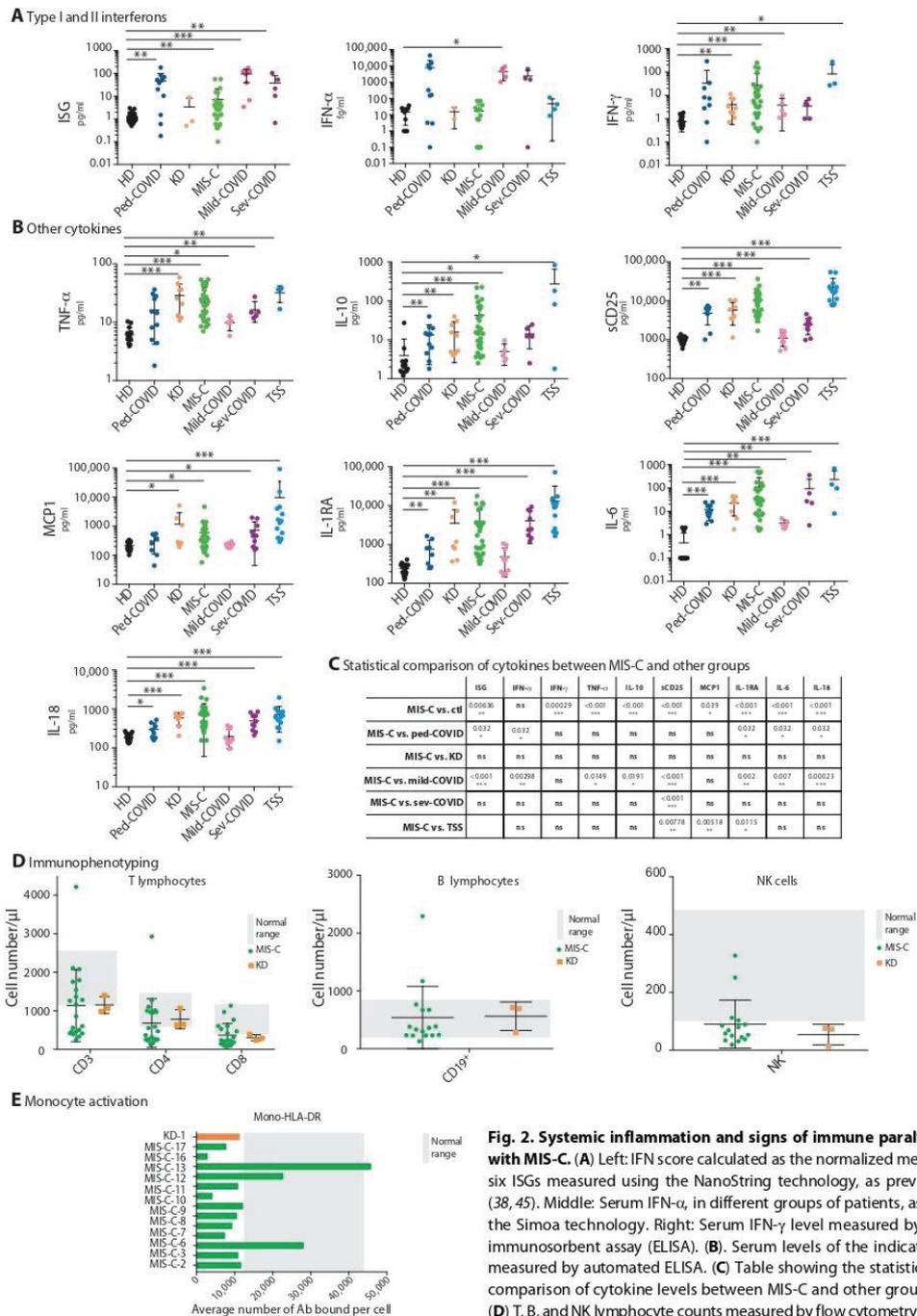
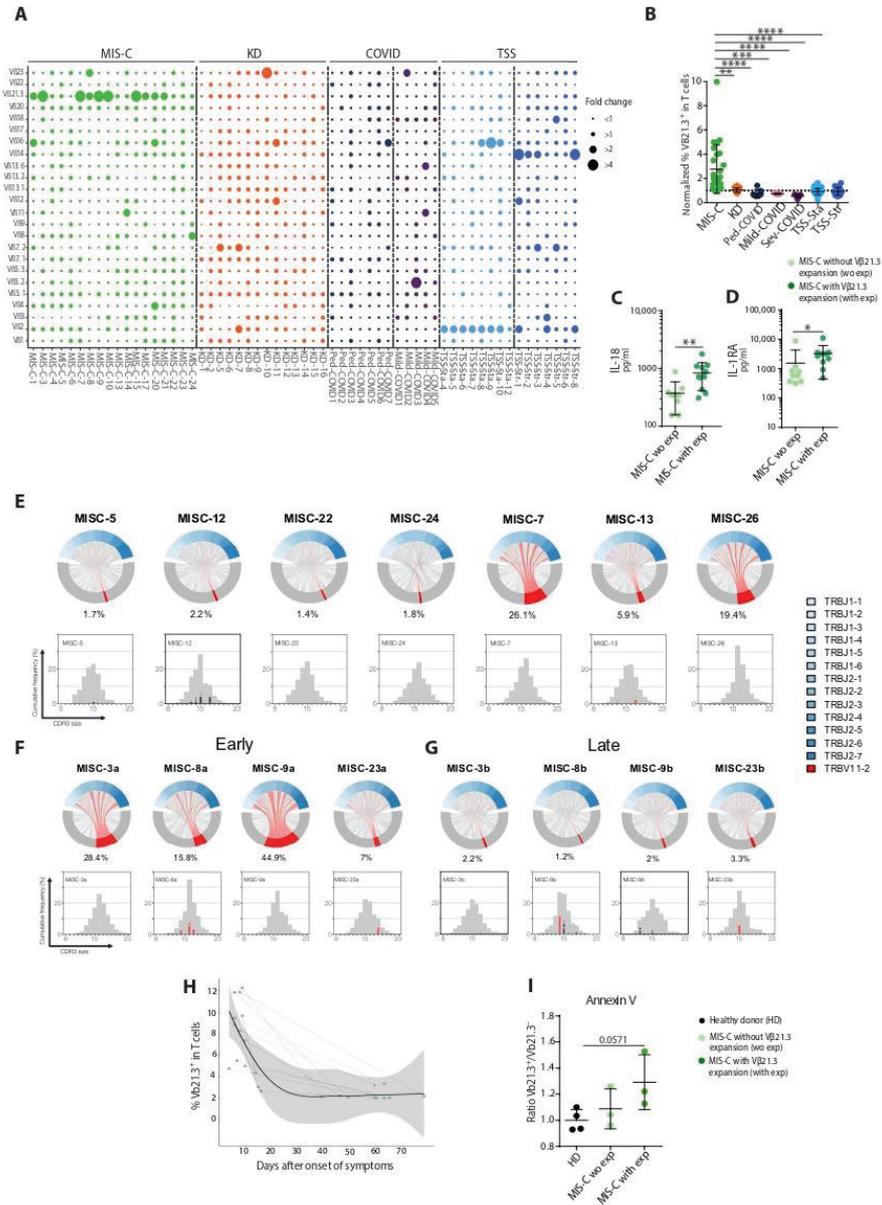


Fig. 2. Systemic inflammation and signs of immune paralysis in patients with MIS-C. (A) Left: IFN score calculated as the normalized mean expression of six ISGs measured using the NanoString technology, as previously described (38, 45). Middle: Serum IFN-α, in different groups of patients, as measured with the Simoa technology. Right: Serum IFN-γ level measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). (B) Serum levels of the indicated cytokines as measured by automated ELISA. (C) Table showing the statistical results of the comparison of cytokine levels between MIS-C and other groups, as indicated. (D) T, B, and NK lymphocyte counts measured by flow cytometry in MIS-C and KD. (E) HLA-DR expression in T cells and monocytes, as measured by flow cytometry in

MIS-C. Gray shading indicates the derived central 95% HD (healthy donor) reference interval (D and E). See table S4 for subject numbers per panel. Statistical test: Kruskal-Wallis test between healthy donors and all other groups with adjustment for multiple comparisons using Benjamini-Hochberg correction (A and B) or between MIS-C and all other groups (C) with the same strategy. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001. ns, not significant.

Fig. 3. Polyclonal Vβ21.3⁺ T cell expansion in patients with MIS-C.

(A) Frequency of total CD3⁺ T cells expressing the indicated Vβ chains, as measured by flow cytometry using specific Abs against the corresponding Vβ within PBMCs of patients of the indicated group. Patients with TSS, mild COVID-19, pediatric COVID-19 (ped-COVID), KD, and MIS-C are colored in blue, pink, dark blue, orange, and green, respectively. Bubbles represent the normalized individual Vβ frequency reported to the mean frequency for each Vβ in the general adult population. (B) Normalized frequency of Vβ21.3⁺ T cells in different clinical conditions, as indicated. (C and D) Serum IL-18 (C) and IL-1RA (D) levels in MIS-C patients with or without (wo) Vβ21.3⁺ T cell expansions (exp). (E to G) Chord diagrams of the TRBV (bottom, gray) and TRBJ (top, blue) combinations assessed by TCR sequencing of TCRβ chains in whole blood of patients with MIS-C. The relative frequency of all TRBV/J combinations have been calculated per sample on the full TRB repertoire data. Combinations using TRBV11-2 are highlighted in red. Each red line indicates pairing with a given TRBJ, and the thickness indicates the frequency of this pairing. The percentage values under each chart indicate the percentage of clonotypes composed with the TRBV11-2 gene. In (E) to (G), the CDR3 length distribution of clonotypes using TRBV11-2 is shown as a histogram graph. Each clonotype is represented as a gray line. The thickness of the line represents the frequency of the clonotype within each repertoire. Because most of the clonotypes are not abundant, all the gray lines are stacked together and appear as a unique gray bar, which reflects the lack of expansion. Expanded clonotypes identified as detailed in Materials and Methods are shown in red. In (F) and (G), the same four patients are shown during the MIS-C episode (F) and after resolution (G). (H) Frequency of Vβ21.3⁺ T cells at different time points during and after the MIS-C episode in different patients, as assessed by flow cytometry. (I) Annexin-V staining of T cells in the indicated patients' groups. Results show the ratio of the annexin-V fluorescence in Vβ21.3⁺ versus Vβ21.3⁻ T cells. See table S4 for subject numbers per panel. (B) Statistical test: Kruskal-Wallis test between MIS-C and all other groups with adjustment for multiple comparisons using Benjamini-Hochberg correction and (C, D, and I) unpaired Wilcoxon test comparing two groups. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, and ****P < 0.0001.



Downloaded from https://www.science.org on July 07, 2022

RNA was available by TCR sequencing. We analyzed the composition of the TCR β rearrangements involving the TRBV11-2 gene (which corresponds to V β 21.3). First, by representing the TRBV11-2/T cell receptor beta joining genes (TRBJ) combination usage as chord diagrams (Fig. 3, E and F), we confirmed the expansion of T cells using TRBV11-2 in 7 of 11 patients. These TRBV11-2 rearrangements were associated with multiple TRBJ genes, suggesting the polyclonal nature of the expansions. To further evaluate polyclonality, we analyzed the hypervariable sequence CDR3 length distribution of TRBV11-2 clonotypes (bar plots, Fig. 3, E to G). The CDR3 size distributions showed a bell-shaped Gaussian distribution as expected in polyclonal repertoires (23–25). To evaluate the degree of polyclonality, we identified the expanded clonotypes by setting a threshold based on the binomial distribution of the clonotype frequencies per sample (see Materials and Methods and fig. S5A). No major monoclonal expansions (red lines in the CDR3 spectratypes) explaining the global TRBV11-2 expansion were detected. Instead, most of the clonotypes were found at low frequencies (gray lines), typical of a polyclonal diverse repertoire. The percentages of expanded clonotypes were not significantly different between patients with or without TRBV11-2. We calculated the cumulative frequencies of these expanded clonotypes within the full repertoire and found that they were always far below the frequency of the full TRBV11-2 expansion in patients with expansions, representing, on average, 0.51% of the total repertoire. Last, these limited expansions represented, on average, 4.47% of the TRBV11-2 repertoire in patients with TRBV11-2 expansions and 6.31% in patients without TRBV11-2 expansions (table S6 and fig. S5B). To confirm the polyclonality of the TRBV11-2 expansion, we computed the Berger-Parker index (BPI) on TRBV11-2 clonotype for patients with MIS-C harboring or not TRBV11-2 expansions (fig. S5C). This index measures the proportional abundance of the most frequent clonotypes within TRBV11-2 clonotypes. There were no significant differences when we compared the BPI on TRBV11-2 clonotypes between patients with or without TRBV11-2 expansions, further confirming that TRBV11-2 expansions in the seven patients were not explained by monoclonal expansions.

Next, to address whether the V β 21.3⁺ T cell expansion persisted overtime, we repeated the TCR sequencing and the flow cytometry V β analyses in a group of patients for which blood samples were available during and after the acute inflammatory episode. As shown in Fig. 3 (F to H), the V β 21.3/TRBV11-2 distributions for all the patients returned to normal within days to weeks after MIS-C. When we compared the CDR3 length distributions by calculating the perturbation score using the ISEapeaks tool between repertoires obtained during and after the acute response, we found no differences between the two groups, further supporting the polyclonal expansion profile of TRBV11-2 during the acute response (fig. S5D). Last, this transient expansion suggested a proapoptotic phenotype of V β 21.3⁺ T cell. To test this hypothesis, we stained PBMCs from patients with MIS-C with annexin-V that marks early apoptotic cells. A higher fraction of V β 21.3⁺ compared with V β 21.3⁻ T cells were stained with annexin-V in MIS-C patients with V β 21.3⁺ expansions (Fig. 3I and fig. S2B), which substantiated our hypothesis.

V β 21.3⁺ T cells had an activated phenotype but did not react against SARS-CoV-2 peptides

Because V β 21.3⁺ T cells expand in patients with MIS-C, we investigated their activation status and the mechanisms underlying their

proliferation. We found that the activation markers HLA-DR and CD38 were expressed at high levels in both CD4 and CD8 T cells from MIS-C patients with V β 21.3⁺ expansions compared with those without expansions and to healthy controls (Fig. 4, A and B). This was due to a specific up-regulation of CD38 and HLA-DR in V β 21.3⁺ CD4 and CD8 T cells in MIS-C patients with V β 21.3 expansions compared with those without V β 21.3 expansions (Fig. 4, C and D). A recent paper reports a specific activation of CX3CR1⁺ CD4 and CD8 T cells in patients with MIS-C, as assessed by HLA-DR/CD38 levels (12). This prompted us to measure CX3CR1 levels in V β 21.3⁺ T cells. As shown in Fig. 4E and fig. S6A, V β 21.3⁺ T cells overexpressed CX3CR1 in both CD4 and CD8 T cells in MIS-C patients with V β 21.3⁺ expansions compared with those without expansions, although the percentage of CX3CR1⁺ cells was not higher in MIS-C than in control patients (fig. S7A). Moreover, in patients with MIS-C, a large frequency of non-naïve CX3CR1⁺ CD4 and CD8 T cells had an activated phenotype as previously reported (fig. S7B) (12).

Given that MIS-C came about weeks after COVID-19, we wondered whether V β 21.3⁺ T cells were raised against SARS-CoV-2 antigens. To test this possibility, we stimulated PBMCs from patients with MIS-C or convalescent COVID-19 with a commercial cocktail of SARS-CoV-2 peptides spanning S, N, and M viral proteins. T cells from patients with MIS-C responded poorly to stimulation with viral peptides, regardless of V β 21.3 expansion, compared with T cells from patients with convalescent COVID-19 that responded well (Fig. 4, F and G, and fig. S6, B and C). This was not due to a lack of adaptive anti-SARS-CoV-2 response, because all patients with MIS-C tested had high SARS-CoV-2-specific Ab levels (fig. S7, C and E). Last, we could not identify any specific allele nor mutations of classical HLA class I or class II genes associated with TRBV11-2 expansions by genomic sequencing of the HLA loci of 13 patients with MIS-C (table S4). Together with the lack of V β 21.3⁺ expansion in patients with COVID-19, these data showed that V β 21.3⁺ T cells were not specific for HLA-restricted SARS-CoV-2 peptides. Together, these data revealed that the V β 21.3⁺ CD4 and CD8 T cell expansion were highly activated and expressed CX3CR1 but had poor responsiveness to SARS-CoV-2 antigens.

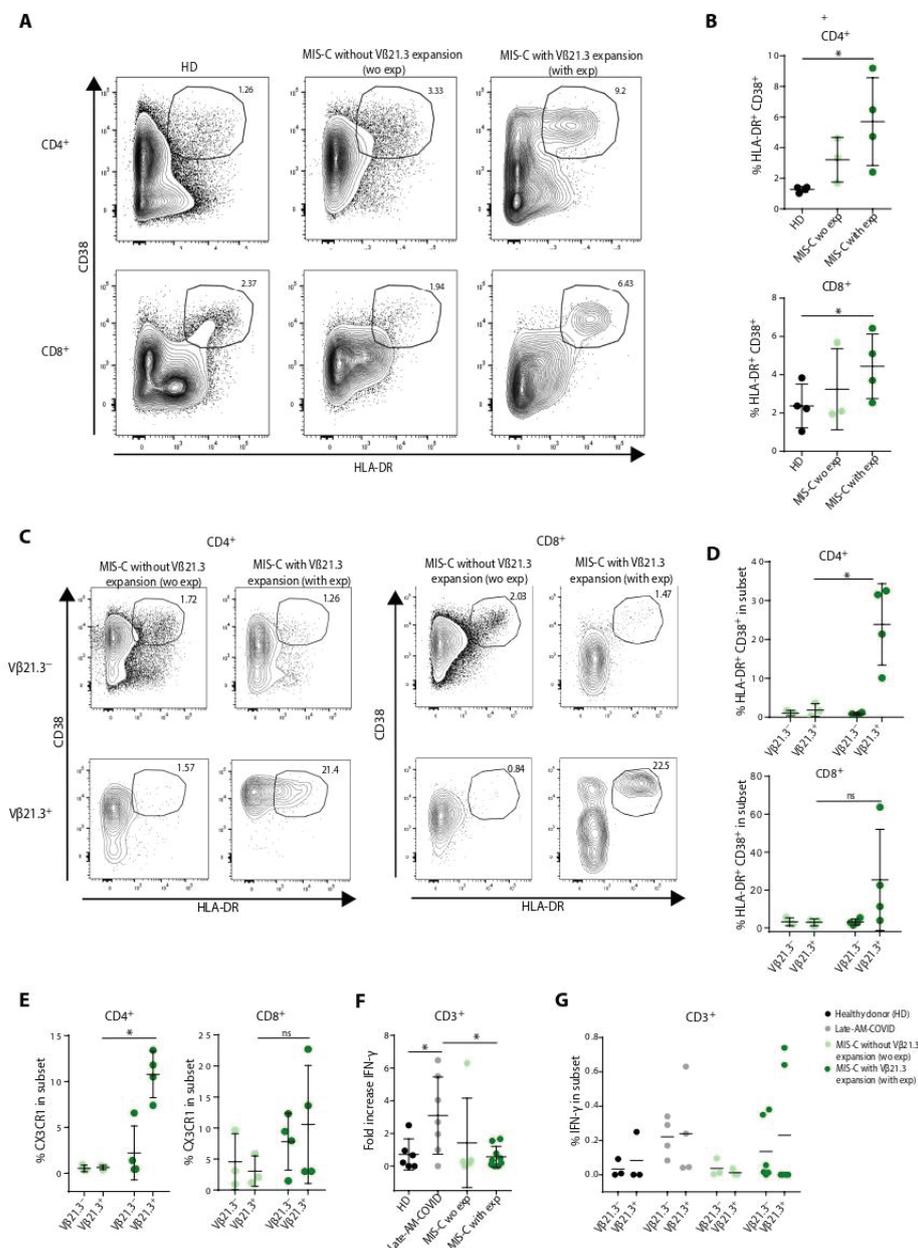
DISCUSSION

Here, we confirmed the strong overlap in clinical phenotype between KD, MIS-C, and TSS; MIS-C and TSS had similar defining features, specifically cardiac dysfunction, hypotension, maculopapular skin rash, and conjunctivitis. We recently identified the critical importance of early steroid therapy in the management of MIS-C, similarly to what has been previously shown in TSS (26, 27). MIS-C and TSS are obviously linked to infections, whereas many KD features suggest an infectious cause for KD as well (28). The epidemic of a novel coronavirus in 2005 (New Haven) was associated to KD and linked the viral infection to vascular inflammation (29).

We found important similarities in terms of cytokine expression between MIS-C, TSS, and KD, such as high TNF- α , IL-6, IL-18, and IL-1Ra levels. A previous study noted that a subgroup of patients with severe MIS-C had higher levels of IFN- γ , IL-18, GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), RANTES (regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted), IP-10 (interferon gamma-induced protein 10), IL-1 α , and SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) than patients with mild MIS-C or KD (30). We also observed a subset of patients with MIS-C with high serum

Fig. 4. T cell activation within Vβ21.3 and stimulation of T cells with viral peptides in vitro.

(A to D) Flow cytometry analysis of CD38 and HLA-DR expression in CD4 or CD8 T cells from the indicated patients' groups (exp: Vβ21.3⁺ T cell expansion). (A) A representative staining and (B) the mean ± SD frequency of CD38⁺HLA-DR⁺ CD4⁺ (top) and CD8⁺ (bottom) T cells. (C and D) A Vβ21.3⁺ Ab was also included in the flow cytometry panel used in (A) and (B), allowing a specific comparison of the Vβ21.3⁻ and Vβ21.3⁺ T cells in patients with MIS-C. (C) A representative dot plot of CD38 and HLA-DR expression in the indicated subsets; (D) means ± SD frequency of CD38⁺HLA-DR⁺ in the indicated CD4 (top) and CD8 (bottom) T cell subsets. (E) Frequency of CX3CR1⁺ cells in gated Vβ21.3⁻ and Vβ21.3⁺ CD4⁺ (left) and CD8⁺ (right) T cells in MIS-C without and MIS-C with expansion. (F) PBMCs from control, patients with COVID-19 (adults, 6 months after infection, Late-AM-COVID), or patients with MIS-C (with or without Vβ21.3⁺ T cell expansions) were stimulated for 6 hours with a commercial cocktail of synthetic peptides from S, N, and M SARS-CoV-2 proteins in the presence of Golgi secretion inhibitors for the last 5 hours. Intracellular IFN-γ expression was then measured in T cells by flow cytometry. The fold increase was calculated as the ratio between the stimulated and the unstimulated conditions. (G) The frequency of Vβ21.3⁺ and Vβ21.3⁻ T cells expressing IFN-γ after stimulation with S, N, and M SARS-CoV-2 peptides in the different patient groups as indicated (one dot, one patient). See table S4 for subject numbers per panel. (B) Kruskal-Wallis test between three groups with adjustment for multiple comparisons using Benjamini-Hochberg correction and (D to G) Wilcoxon test comparing two groups. *P < 0.05.



Downloaded from <https://www.science.org> on July 07, 2022

IFN-γ, IL-18, and sCD25. These observations confirm previous reports showing a clinical and biological overlap between MIS-C and macrophage activation syndrome (3) and suggest the importance of IFN-γ in the disease.

Here, we reported the expansion of a TCR Vβ21.3⁺ T cell subset with an activated phenotype in as many as 75% of patients with MIS-C. Vβ21.3⁺ T cell expansions were also reported in smaller

numbers of patients with MIS-C in two recent studies (13, 31). In both Porritt *et al.* (31) and our study, Vβ21.3⁺ T cell expansions appeared polyclonal as judged by the large number of TRBJ gene segments associated with TRBV11.2 and by the even distribution of the CDR3 domain. Our study further showed that Vβ21.3⁺ CD4 and CD8 T cell expansions are a discriminating feature of patients with MIS-C compared with patients with KD, TSS, and COVID-19.

We observed a correlation between V β 21.3⁺ T cell expansions and the level of serum cytokines IL-18 and IL-1RA from matching samples, confirming a previous study (31) and indicating that V β 21.3⁺ T cell expansions were associated with the cytokine storm. Our data also showed that V β 21.3⁺ T cells have an activated phenotype, with high HLA-DR and CD38 expression, and that activated V β 21.3⁺ T cells expressed high levels of CX3CR1, a marker of patrolling monocytes and of cytotoxic lymphocytes. CX3CR1 binds to CX3CL1, a membrane-bound chemokine induced on vascular endothelial cells upon inflammation (12). The CX3CL1-CX3CR1 axis is thought to have an important role in vascular inflammation in different inflammatory diseases (32) and could contribute to MIS-C pathogenesis. This interaction could promote the cytotoxic action of different lymphocyte populations, which fits with the reported elevated expression of cytotoxicity genes in NK and CD8⁺ T cells in patients with MIS-C (13).

We demonstrated that both TSS and MIS-C were marked by the polyclonal proliferation of a specific V β subset, i.e., V β 2⁺ cells for TSS related to TSST1 and V β 21.3⁺ cells for MIS-C. The amplitude of the expansion was also similar in both syndromes. Considering the other clinical phenotype similarities between MIS-C and TSS shown in this study, cytokine production and treatment, this raises the hypothesis that V β 21.3⁺ cell expansions are caused by a superantigen structure in MIS-C. The term superantigen has been coined by Kappler and Marrack as an operational definition of various T cell-activating substances with specificity for T cell antigen receptors V β subunits regardless of the rearrangement and antigen specificity (33). Superantigens bind external regions of TCR and MHC molecules (34) and can induce massive expansions of T cells expressing one specific TCR V β chain, whereas classical antigens induce the expansion of T cells bearing different V β . Previous papers have suggested that the SARS-CoV-2 spike protein could behave as a superantigen structure (35). Using *in silico* modeling, Porritt *et al.* identified a putative interaction between V β 21.3 and a superantigen-like motif in spike. However, V β 21.3⁺ T cell expansions occur in a delayed manner relative to SARS-CoV-2 infection, and the virus is often undetectable in patients with MIS-C at the time of the acute inflammation. The kinetics of MIS-C relative to COVID-19 is compatible with a causal role of anti-SARS-CoV-2 Abs. One can hypothesize that immune complexes composed of SARS-CoV-2 bound to Abs may act as superantigen structures. However, a previous study failed to detect these immune complexes in patients with MIS-C (30). In addition, V β -restricted T cells adhere to endothelial cells after superantigen activation (36), and, thus, the CX3CR1⁺ V β 21.3-expanded T cells may play a role in vascular injury in MIS-C. Alternative mechanisms may be put forward, such as secondary autoimmune reactions. Several studies have indeed reported the appearance of autoantibodies in patients with MIS-C, some of which directed against endothelial antigens (8, 11), whereas others have reported immune events consistent with autoimmunity, such as the expansion of proliferating plasmablasts (13) or the persistence of functional SARS-CoV-2-specific monocyte-activating Abs (37). How B cell-mediated autoimmunity would be linked to V β -specific T cell expansions is, however, unclear. One could speculate that immune complexes composed of autoantibodies and endogenous antigens could behave as superantigens.

Last, given the rarity of MIS-C, there could be a genetic susceptibility to this postinfectious disease, promoting hyperinflammatory reaction of adaptive immunity in response to SARS-CoV-2 (16). We limited our analysis to classical HLA alleles but did not find any

significant association, although a previous study reported an HLA-I bias in a smallest group of patients with MIS-C (31). Our MIS-C samples were obtained in most of cases after anti-inflammatory treatments (see table S3), and it is likely that those treatments affect the level of serum cytokines, which could have affected the comparisons we made between clinical conditions and the associations between cytokines and T cell expansions. Together, MIS-C shared clinical and immunological anomalies with KD and TSS but was specifically characterized by a polyclonal V β 21.3 expansion in CD4 and CD8 T cells associated to activation and CX3CR1 expression.

MATERIALS AND METHODS

More information for all of these protocols can be found in the Supplementary Materials.

Study design and human subjects

The immunological profiles of 36 MIS-C, 16 KD, 58 TSS, and 42 non-MIS-C COVID-19 cases were included (Fig. 1A). Samples were collected within the first week of symptoms and analyzed for cytokine immunoprofiling, standard immunophenotyping, V β expression, TCR sequencing, and SARS-CoV-2-dependent T cell response. Because of low-volume sampling of pediatric patients, we did not have the same availability for research blood draws. The samples used for each experiment are detailed in table S4. The main clinical features are summarized in tables S1 to S3. Written informed consent was obtained for all data collection and blood sampling as detailed in the Supplementary Materials.

Immunological analyses

Cytokines and IFN score assessment

Plasma concentrations of IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-18, MCP-1, IL-1RA, and sCD25 were measured by Simple Plex technology using an enzyme-linked lectin assay instrument (ProteinSimple). Plasma IFN- α concentrations were determined by single-molecule array (Simoa) on an HD-1 analyzer (Quanterix) using a commercial kit for IFN- α 2 quantification (Quanterix). RNA was extracted from whole blood, and IFN score was obtained using nCounter analysis technology (NanoString Technologies) by calculating the median of the normalized count of six ISGs as previously described (38).

T cell V β repertoire analysis and immunophenotyping

PBMCs were stained with surface markers, CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CCR7, CD38, V β 21.3, HLA-DR, CX3CR1, and CD45RA (further details on these stains are included in the Supplementary Materials). Cell apoptosis was assessed by annexin-V staining. All samples were acquired on a BD LSRFortessa (BD Biosciences) flow cytometer and analyzed using FlowJo version 10 software. Monocyte HLA-DR expression was determined on EDTA-anticoagulated peripheral whole blood as previously described (39). The phenotypic analysis of T cell V β repertoire was performed on whole blood sample using the IOTest Beta Mark kit (Beckman Coulter). Whole-blood cells were stained for CD3, CD4, CD8, and each combination of three fluorescein isothiocyanate (FITC)-, phycoerythrin (PE)-, and FITC/PE-conjugated anti-V β monoclonal Abs (mAbs) (Beckman Coulter) in eight sample tubes. Expansions were defined, respectively, for values above the mean + 2 SD or below the minimum reference values of the corresponding family. Additional samples were analyzed for TRBV from total RNA with NanoString technology (Supplementary Materials).

TCR sequencing and analysis

TCR α/β libraries were prepared from 300 ng of RNA from each sample with the SMARTer Human TCR α/β Profiling Kit (Takara Bio) (40). The sequencing was carried out on a MiSeq Illumina sequencer using the MiSeq v3 PE300 protocol at the Biomics Platform (Institut Pasteur, Paris, France). Single-end sequences were aligned and annotated using MiXCR 3.0.13 (41), providing a list of clonotypes. Analyses were performed in R 4.0.3 on the TRB clonotype lists obtained with MiXCR. For each clonotype, read count was recorded. Frequencies for TRBV, TRBJ, and clonotypes were calculated on the basis of the total read counts per sample. Chord diagrams were made using the circlize package (42) on TRBVBJ frequencies, and CDR3 length spectratypes were made using ggplot2 (43) using clonotype frequencies. To identify TRBV11-2 expanded clonotypes, the first (Q1) and third (Q3) quartiles and the interquartile range (IQR) were computed for all patients without TRBV11-2 expansion. Expanded clonotypes are defined as those with counts superior to $Q3 + (1.5 \times IQR)$.

Stimulation with SARS-CoV-2 overlapping peptide pools and flow cytometry

PBMCs were stimulated with SARS-CoV-2 PepTivator pooled S, N, and M peptides (Miltenyi Biotec) at a final concentration of $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ for 1 hour in the presence of $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ of mAbs CD28 and CD49d and then for an additional 5 hours with GolgiPlug and GolgiStop (BD Biosciences). Similar surface markers were stained. Cells were then washed, fixed with Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences), and stained with V450-conjugated anti-IFN- γ . All samples were acquired on a BD LSRFortessa (BD Biosciences) flow cytometer and analyzed using FlowJo version 10 software.

Serology

Serum samples were tested with three commercial assays: the Wantai Ab assay detecting total Abs against the receptor binding domain (RBD) of the S protein, the bioMérieux VIDAS assay detecting immunoglobulin G (IgG) to the RBD, and the Abbott ARCHITECT assay detecting IgG to the N protein.

Statistical analyses

All tests were performed two sided with a nominal significance threshold of $P < 0.05$. We used nonparametric tests appropriated to the low number of observations in each of our experimental conditions, i.e., the Wilcoxon or Kruskal-Wallis test depending on whether we have two or more conditions to compare, respectively. Multiple comparisons performed with the Dunn's all-pairs comparison for Kruskal-type ranked data were corrected by the false discovery rate method of Benjamini-Hochberg (44). PCA was made in R with stats package and visualized with ggplot2 (43) for V β frequencies obtained by flow cytometry. All statistical analyses were performed using GraphPad with the help of a professional biostatistician.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

immunology.sciencemag.org/cgi/content/full/6/59/eabh1516/DC1

Methods

Figs. S1 to S7

Tables S1 to S7

View/request a protocol for this paper from Bio-protocol.

REFERENCES AND NOTES

1. S. Riphagen, X. Gomez, C. Gonzalez-Martinez, N. Wilkinson, P. Theocharis, Hyperinflammatory shock in children during COVID-19 pandemic. *Lancet* **395**, 1607–1608 (2020).

2. L. Verdoni, A. Mazza, A. Gervasoni, L. Martelli, M. Ruggeri, M. Giuffreda, E. Bonanomi, L. D'Antiga, An outbreak of severe Kawasaki-like disease at the Italian epicentre of the SARS-CoV-2 epidemic: An observational cohort study. *Lancet* **395**, 1771–1778 (2020).
3. A. Belot, D. Antona, S. Renolleau, E. Javouhey, V. Hentgen, F. Angoulvant, C. Delacourt, X. Iriart, C. Ovaert, B. Bader-Meunier, I. Kone-Paut, D. Levy-Bruhl, SARS-CoV-2-related paediatric inflammatory multisystem syndrome: An epidemiological study, France, 1 March to 17 May 2020. *Eurosurveillance* **25**, 2001010 (2020).
4. M. Levin, Childhood multisystem inflammatory syndrome—A new challenge in the pandemic. *N. Engl. J. Med.* **383**, 393–395 (2020).
5. E. M. Dufort, E. H. Koumans, E. J. Chow, E. M. Rosenthal, A. Muse, J. Rowlands, M. A. Barranco, A. M. Maxted, E. S. Rosenberg, D. Easton, T. Udo, J. Kumar, W. Pulver, L. Smith, B. Hutton, D. Blog, H. Zucker; New York State and Centers for Disease Control and Prevention Multisystem Inflammatory Syndrome in Children Investigation Team, Multisystem inflammatory syndrome in children in New York State. *N. Engl. J. Med.* **383**, 347–358 (2020).
6. L. R. Feldstein, E. B. Rose, S. M. Horwitz, J. P. Collins, M. M. Newhams, M. B. F. Son, J. W. Newburger, L. C. Kleinman, S. M. Heidemann, A. A. Martin, A. R. Singh, S. Li, K. M. Tarquinio, P. Jaggi, M. E. Oster, S. P. Zackaj, J. Gillen, A. J. Ratner, R. F. Walsh, J. C. Fitzgerald, M. A. Keenaghan, H. Alharash, S. Doymaz, K. N. Clouser, J. S. Giuliano Jr., A. Gupta, R. M. Parker, A. B. Maddux, V. Havalad, S. Ramsingh, H. Bukulmez, T. T. Bradford, L. S. Smith, M. W. Tenforde, C. L. Carroll, B. J. Riggs, S. J. Gertz, A. Daube, A. Lansell, A. Coronado Munoz, C. V. Hobbs, K. L. Marohn, N. B. Halasa, M. M. Patel, A. G. Randolph; Overcoming COVID-19 Investigators; CDC COVID-19 Response Team, Multisystem inflammatory syndrome in U.S. children and adolescents. *N. Engl. J. Med.* **383**, 334–346 (2020).
7. A. Belot, D. Levy-Bruhl, Multisystem inflammatory syndrome in children in the United States. *N. Engl. J. Med.* **383**, 1793–1794 (2020).
8. C. R. Consiglio, N. Cotugno, F. Sardu, C. Pou, D. Amodio, L. Rodriguez, Z. Tan, S. Zicari, A. Ruggiero, G. R. Pascucci, V. Santilli, T. Campbell, Y. Bryceson, D. Eriksson, J. Wang, A. Marchesi, T. Lakshminathan, A. Campana, A. Villani, P. Rossi; CACTUS Study Team, N. Landegren, P. Palma, P. Brodin, The immunology of multisystem inflammatory syndrome in children with COVID-19. *Cell* **183**, 968–981.e7 (2020).
9. C. Diorio, S. E. Henrickson, L. A. Vella, K. O. McNerney, J. Chase, C. Burudpakdee, J. H. Lee, C. Jansen, F. Balamuth, D. M. Barrett, B. L. Banwell, K. M. Bernt, A. M. Blatz, K. Chiotos, B. T. Fisher, J. C. Fitzgerald, J. S. Gerber, K. Gollomp, C. Gray, S. A. Grupp, R. M. Harris, T. J. Kilbaugh, A. R. O. John, M. Lambert, E. J. Liebling, M. E. Paessler, W. Petrosa, C. Phillips, A. F. Reilly, N. D. Romberg, A. Seif, D. A. Sesok-Pizzini, K. E. Sullivan, J. Vardaro, E. M. Behrens, D. T. Teachey, H. Bassiri, Multisystem inflammatory syndrome in children and COVID-19 are distinct presentations of SARS-CoV-2. *J. Clin. Invest.* **130**, 5967–5975 (2020).
10. M. J. Carter, M. Fish, A. Jennings, K. J. Doores, P. Wellman, J. Seow, S. Acors, C. Graham, E. Timms, J. Kenny, S. Neil, M. H. Malim, S. M. Tibby, M. Shankar-Hari, Peripheral immunophenotypes in children with multisystem inflammatory syndrome associated with SARS-CoV-2 infection. *Nat. Med.* **26**, 1701–1707 (2020).
11. C. N. Gruber, R. S. Patel, R. Trachtman, L. Lepow, F. Amanat, F. Krammer, K. M. Wilson, K. Onel, D. Geanon, K. Tuballes, M. Patel, K. Mouskas, T. O'Donnell, E. Merritt, N. W. Simons, V. Barcessat, D. M. Del Valle, S. Udondem, G. Kang, S. Gaugadharan, G. Ofori-Amanfo, U. Laserson, A. Rahman, S. Kim-Schulze, A. W. Chamey, S. Grnjatic, B. D. Gelb, M. Merad, D. Bogunovic, Mapping systemic inflammation and antibody responses in multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C). *Cell* **183**, 982–995.e14 (2020).
12. L. A. Vella, J. R. Giles, A. E. Baxter, D. A. Oldridge, C. Diorio, L. Kuri-Cervantes, C. Alanio, M. B. Pampena, J. E. Wu, Z. Chen, Y. J. Huang, E. M. Anderson, S. Gouma, K. O. McNerney, J. Chase, C. Burudpakdee, J. H. Lee, S. A. Apostolidis, A. C. Huang, D. Mathew, O. Kuthuru, E. C. Goodwin, M. E. Weirick, M. J. Bolton, C. P. Arevalo, A. Ramos, C. J. Jansen, P. E. Conrey, S. Sayed, H. M. Giannini, K. D'Andrea; UPenn COVID Processing Unit, N. J. Meyer, E. M. Behrens, H. Bassiri, S. E. Hensley, S. E. Henrickson, D. T. Teachey, M. R. Betts, E. J. Wherry, Deep immune profiling of MIS-C demonstrates marked but transient immune activation compared to adult and pediatric COVID-19. *Sci. Immunol.* **6**, eabf7570 (2021).
13. A. Ramaswamy, N. N. Brodsky, T. S. Sumida, M. Comi, H. Asashima, K. B. Hoehn, N. Li, Y. Liu, A. Shah, N. G. Ravindra, J. Bishai, A. Khan, W. Lau, B. Sellers, N. Bansal, P. Guerrero, A. Unterman, V. Habet, A. J. Rice, J. Catanzaro, H. Chandnani, M. Lopez, N. Kaminski, C. S. Dela Cruz, J. S. Tsang, Z. Wang, X. Yan, S. H. Kleinstein, D. van Dijk, R. W. Pierce, D. A. Hafler, C. L. Lucas, Immune dysregulation and autoreactivity correlate with disease severity in SARS-CoV-2-associated multisystem inflammatory syndrome in children. *Immunity* **54**, 1083–1095.e7 (2021).
14. A. Schwartz, A. Belot, I. Kone-Paut, Pediatric inflammatory multisystem syndrome and rheumatic diseases during SARS-CoV-2 pandemic. *Front. Pediatr.* **8**, 833 (2020).
15. J.-L. Casanova, H. C. Su, A global effort to define the human genetics of protective immunity to SARS-CoV-2 infection. *Cell* **181**, 1194–1199 (2020).
16. V. Sancho-Shimizu, P. Brodin, A. Cobat, C. M. Biggs, J. Toubiana, C. L. Lucas, S. E. Henrickson, A. Belot; MIS-C@CHGE, S. G. Tangye, J. D. Milner, M. Leung, L. Abel,

- D. Bogunovic, J.-L. Casanova, S.-Y. Zhang, SARS-CoV-2-related MIS-C: A key to the viral and genetic causes of Kawasaki disease? *J. Exp. Med.* **218**, e20210446 (2021).
17. S. Trouillet-Assant, S. Viel, A. Gaymard, S. Pons, J.-C. Richard, M. Perret, M. Villard, K. Brengel-Pesce, B. Lina, M. Mezidi, L. Bitker, A. Belot, Type I IFN immunoprofiling in COVID-19 patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* **146**, 206–208.e2 (2020).
 18. J. Hadjadj, N. Yatim, L. Barnabei, A. Corneau, J. Bouscier, N. Smith, H. Péré, B. Charbit, V. Bondet, C. Chenevier-Gobeaux, P. Breillat, N. Carlier, R. Gauzit, C. Morbieu, F. Pène, N. Marin, N. Roche, T.-A. Szebel, S. H. Merklung, J.-M. Treluyer, D. Veyer, L. Mouthon, C. Blanc, P.-L. Tharaux, F. Rozenberg, A. Fischer, D. Duffy, F. Rieux-Laucat, S. Kernéis, B. Terrier, Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science* **369**, 718–724 (2020).
 19. P. Bastard, L. B. Rosen, Q. Zhang, E. Michailidis, H.-H. Hoffmann, Y. Zhang, K. Dorgham, Q. Philippot, J. Rosain, V. Béziat, J. Manry, E. Shaw, L. Haljasmägi, P. Peterson, L. Lorenzo, L. Bizien, S. Trouillet-Assant, K. Dobbs, A. A. de Jesus, A. Belot, A. Kallaste, E. Catherinot, Y. Tandjaoui-Lambiotte, J. L. Pen, G. Kemer, B. Bigio, Y. Seeleuthner, R. Yang, A. Bolze, A. N. Spaan, O. M. Delmonte, M. S. Abers, A. Aiuti, G. Casari, V. Lampasona, L. Piemonti, F. Cceri, K. Bilguvar, R. P. Lifton, M. Vasse, D. M. Smadja, M. Migaud, J. Hadjadj, B. Terrier, D. Duffy, L. Quintana-Murci, D. van de Beek, L. Roussel, D. C. Vinh, S. G. Tangye, F. Haerynck, D. Dalmau, J. Martinez-Picado, P. Brodin, M. C. Nussenzweig, S. Boisson-Dupuis, C. Rodríguez-Gallego, G. Vogt, T. H. Mogensen, A. J. Oler, J. Gu, P. D. Burbelo, J. I. Cohen, A. Biondi, L. R. Bettini, M. D'Angio, P. Bonfanti, P. Rossignol, J. Mayaux, F. Rieux-Laucat, E. S. Husebye, F. Fusco, M. V. Ursini, L. Imberti, A. Sottini, S. Paghera, E. Quiros-Roldan, C. Rossi, R. Castagnoli, D. Montagna, A. Licari, G. L. Marseglia, X. Duval, J. Ghosn; HGID Lab; NIAID-USUHS Immune Response to COVID Group; COVID Clinicians; COVID-STORM Clinicians; Imagine COVID Group; French COVID Cohort Study Group; Milieu Intérieur Consortium; CoV-Contact Cohort; Amsterdam UMC Covid-19 Biobank; COVID Human Genetic Effort; J. S. Tsang, R. Goldbach-Mansky, K. Kisand, M. S. Lionakis, A. Puel, S.-Y. Zhang, S. M. Holland, G. Gorochov, E. Jouanguy, C. M. Rice, A. Cobat, L. D. Notarangelo, L. Abel, H. C. Su, J.-L. Casanova, Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science* **370**, eabd4585 (2020).
 20. Q. Zhang, P. Bastard, Z. Liu, J. L. Pen, M. Moncada-Velez, J. Chen, M. Ogishi, I. K. D. Sabli, S. Hodeib, C. Korol, J. Rosain, K. Bilguvar, J. Ye, A. Bolze, B. Bigio, R. Yang, A. A. Arias, Q. Zhou, Y. Zhang, F. Onodi, S. Komiotis, L. Karpf, Q. Philippot, M. Chbibi, L. Bonnet-Madin, K. Dorgham, N. Smith, W. M. Schneider, B. S. Razooki, H.-H. Hoffmann, E. Michailidis, L. Moens, J. E. Han, L. Lorenzo, L. Bizien, P. Meade, A.-L. Neehus, A. C. Ugurbil, A. Corneau, G. Kemer, P. Zhang, F. Rapaport, Y. Seeleuthner, J. Manry, C. Masson, Y. Schmitt, A. Schlüter, T. L. Voyer, T. Khan, J. Li, J. Fellay, L. Roussel, M. Shahrooei, M. F. Alosaimi, D. Mansouri, H. Al-Saud, F. Al-Mulla, F. Almourfi, S. Z. Al-Muhsen, F. Alshime, S. A. Turki, R. Hasanato, D. van de Beek, A. Biondi, L. R. Bettini, M. D'Angio, P. Bonfanti, L. Imberti, A. Sottini, S. Paghera, E. Quiros-Roldan, C. Rossi, A. J. Oler, M. F. Tompkins, C. Alba, I. Vandernoot, J.-C. Goffard, G. Smits, I. Migeotte, F. Haerynck, P. Soler-Palacin, A. Martin-Nalda, R. Colobran, P.-E. Morange, S. Keles, F. Çölkese, T. Özcelik, K. K. Yasar, S. Senoglu, S. N. Karabela, C. Rodriguez-Gallego, G. Novelli, S. Hraich, Y. Tandjaoui-Lambiotte, X. Duval, C. Laouénan; COVID-STORM Clinicians; COVID Clinicians; Imagine COVID Group; French COVID Cohort Study Group; CoV-Contact Cohort; Amsterdam UMC Covid-19 Biobank; COVID Human Genetic Effort; NIAID-USUHS/TAGC COVID Immunity Group, A. L. Snow, C. L. Dalgaard, J. D. Milner, D. C. Vinh, T. H. Mogensen, N. Marr, A. N. Spaan, B. Boisson, S. Boisson-Dupuis, J. Bustamante, A. Puel, M. J. Ciancanelli, I. Meyts, T. Maniatis, V. Soumelis, A. Amara, M. Nussenzweig, A. Garcia-Sastre, F. Kramer, A. Pujol, D. Duffy, R. P. Lifton, S.-Y. Zhang, G. Gorochov, V. Béziat, E. Jouanguy, V. Sancho-Shimizu, C. M. Rice, L. Abel, L. D. Notarangelo, A. Cobat, H. C. Su, J.-L. Casanova, Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science* **370**, eabd4570 (2020).
 21. Y. Choi, J. A. Lafferty, J. R. Clements, J. K. Todd, E. W. Gelfand, J. Kappler, P. Marrack, B. L. Kotzin, Selective expansion of T cells expressing V beta 2 in toxic shock syndrome. *J. Exp. Med.* **172**, 981–984 (1990).
 22. D. Thomas, O. Dauwalder, V. Brun, C. Badiou, T. Ferry, J. Etienne, F. Vandenesch, G. Lina, *Staphylococcus aureus* superantigens elicit redundant and extensive human Vβ patterns. *Infect. Immun.* **77**, 2043–2050 (2009).
 23. C. Pannetier, S. Delassus, S. Darche, C. Saucier, P. Kourilsky, Quantitative titration of nucleic acids by enzymatic amplification reactions run to saturation. *Nucleic Acids Res.* **21**, 577–583 (1993).
 24. C. Fozza, F. Barraqueddu, G. Corda, S. Contini, P. Virdis, F. Dore, S. Bonfigli, M. Longinotti, Study of the T-cell receptor repertoire by CDR3 spectratyping. *J. Immunol. Methods* **440**, 1–11 (2017).
 25. G. Gorochov, A. U. Neumann, A. Kereveur, C. Parizot, T. Li, C. Katlama, M. Karmochkine, G. Raguin, B. Autran, P. Debré, Perturbation of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell repertoires during progression to AIDS and regulation of the CD4⁺ repertoire during antiviral therapy. *Nat. Med.* **4**, 215–221 (1998).
 26. N. Ouldali, J. Toubiana, D. Antona, E. Javouhey, F. Madhi, M. Lorrot, P.-L. Léger, C. Galeotti, C. Claude, A. Wiedemann, N. Lacharme, C. Ovaert, M. Dumortier, J.-E. Kahn, A. Mandelcwojaj, L. Percheron, B. Biot, J. Bordet, M.-L. Girardin, D. D. Yang, M. Grimaud, M. Oualha, S. Allali, F. Bajolle, C. Beyler, U. Meinzer, M. Levy, A.-M. Paullet, C. Levy, R. Cohen, A. Belot, F. Angoulvant; French Covid-19 Paediatric Inflammation Consortium, Association of intravenous immunoglobulins plus methylprednisolone vs immunoglobulins alone with course of fever in multisystem inflammatory syndrome in children. *JAMA* **325**, 855–864 (2021).
 27. J. K. Todd, M. Ressler, S. A. Caston, B. H. Todd, A. M. Wiesenthal, Corticosteroid therapy for patients with toxic shock syndrome. *JAMA* **252**, 3399–3402 (1984).
 28. D. Y. M. Leung, C. Meissner, D. Fulton, P. M. Schlievert, The potential role of bacterial superantigens in the pathogenesis of Kawasaki syndrome. *J. Clin. Immunol.* **15**, S11–S17 (1995).
 29. F. Esper, E. D. Shapiro, C. Weibel, D. Ferguson, M. L. Landry, J. S. Kahn, Association between a novel human coronavirus and Kawasaki disease. *J. Infect. Dis.* **191**, 499–502 (2005).
 30. A. Esteve-Sole, J. Anton, R. M. Pino-Ramirez, J. Sanchez-Manubens, V. Fumadó, C. Fortuny, M. Rios-Barnes, J. Sanchez-de-Toledo, M. Girona-Alarcón, J. M. Mosquera, S. Ricart, C. Launes, M. F. de Sevilla, C. Jou, C. Muñoz-Almagro, E. González-Roca, A. Vergara, J. Carrillo, M. Juan, D. Cuadras, A. Noguera-Julian, I. Jordan, L. Alsina, Similarities and differences between the immunopathogenesis of COVID-19-related pediatric multisystem inflammatory syndrome and Kawasaki disease. *J. Clin. Invest.* **131**, e144554 (2021).
 31. R. A. Porritt, L. Paschold, M. Noval Rivas, M. H. Cheng, L. M. Yonker, H. Chandnani, M. Lopez, D. Simnica, C. Schultheiß, C. Santiskulvong, J. van Eyk, J. K. McCormick, A. Fasano, I. Bahar, M. Binder, M. Arditi, HLA class I-associated expansion of TRBV11-2 T cells in multisystem inflammatory syndrome in children. *J. Clin. Invest.* **131**, e146614 (2021).
 32. Y. Tanaka, K. Hoshino-Negishi, Y. Kuboi, F. Tago, N. Yasuda, T. Imai, Emerging role of Fractalkine in the treatment of rheumatic diseases. *Immunotargets Ther.* **9**, 241–253 (2020).
 33. J. Kappler, B. Kotzin, L. Herron, E. W. Gelfand, R. D. Bigler, A. Boylston, S. Carrel, D. N. Posnett, Y. Choi, P. Marrack, V beta-specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins. *Science* **244**, 811–813 (1989).
 34. M. Hoffman, "Superantigens" may shed light on immune puzzle. *Science* **248**, 685–686 (1990).
 35. M. H. Cheng, S. Zhang, R. A. Porritt, M. Noval Rivas, L. Paschold, E. Willscher, M. Binder, M. Arditi, I. Bahar, Superantigenic character of an insert unique to SARS-CoV-2 spike supported by skewed TCR repertoire in patients with hyperinflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **117**, 25254–25262 (2020).
 36. P. A. Brogan, V. Shah, N. Klein, M. J. Dillon, V beta-restricted T cell adherence to endothelial cells: A mechanism for superantigen-dependent vascular injury. *Arthritis Rheum.* **50**, 589–597 (2004).
 37. Y. C. Bartsch, C. Wang, T. Zohar, S. Fischinger, C. Atyeo, J. S. Burke, J. Kang, A. G. Edlow, A. Fasano, L. R. Baden, E. J. Nilles, A. E. Woolley, E. W. Karlson, A. R. Hopke, D. Irimia, E. S. Fischer, E. T. Ryan, R. C. Charles, B. D. Julg, D. A. Lauffenburger, L. M. Yonker, G. Alter, Humoral signatures of protective and pathological SARS-CoV-2 infection in children. *Nat. Med.* **27**, 454–462 (2021).
 38. R. Pescamona, A. Belot, M. Villard, L. Besson, J. Lopez, I. Mosnier, A.-L. Mathieu, C. Lombard, L. Garnier, C. Frachette, T. Walzer, S. Viel, Comparison of RT-qPCR and Nanostring in the measurement of blood interferon response for the diagnosis of type I interferonopathies. *Cytokine* **113**, 446–452 (2019).
 39. J. Demaret, A. Walencik, M.-C. Jacob, J.-F. Timsit, F. Venet, A. Lepape, G. Monneret, Interlaboratory assessment of flow cytometric monocytic HLA-DR expression in clinical samples. *Cytometry B Clin. Cytom.* **84B**, 59–62 (2013).
 40. J. Hadjadj, C. N. Castro, M. Tusseau, M.-C. Stolzenberg, F. Mazerolles, N. Aladjidi, M. Armstrong, H. Ashrafian, I. Cutcutache, G. Ebetsberger-Dachs, K. S. Elliott, I. Durieu, N. Fabien, M. Fusaro, M. Heeg, Y. Schmitt, M. Bras, J. C. Knight, J.-C. Lega, G. Lesca, A.-L. Mathieu, M. Moreeys, B. Moreira, A. Nosbaum, M. Page, C. Picard, T. Ronan Leahy, I. Rouvet, E. Ryan, D. Sanlaville, K. Schwarz, A. Skelton, J.-F. Viallard, S. Viel, M. Villard, I. Callebaut, C. Picard, T. Walzer, S. Ehl, A. Fischer, B. Neven, A. Belot, F. Rieux-Laucat, Early-onset autoimmunity associated with SOCS1 haploinsufficiency. *Nat. Commun.* **11**, 5341 (2020).
 41. D. A. Bolotin, S. Poslavsky, I. Mitrophanov, M. Shugay, I. Z. Mamedov, E. V. Putintseva, D. M. Chudakov, MiXCR: Software for comprehensive adaptive immunity profiling. *Nat. Methods* **12**, 380–381 (2015).
 42. Z. Gu, L. Gu, R. Eils, M. Schlesner, B. Brors, *circize* implements and enhances circular visualization in R. *Bioinformatics* **30**, 2811–2812 (2014).
 43. H. Wickham, *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* (Springer, 2009).
 44. Y. Benjamini, Y. Hochberg, Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. B* **57**, 289–300 (1995).
 45. G. I. Rice, G. M. A. Forte, M. Szykiewicz, D. S. Chase, A. Aebly, M. S. Abdel-Hamid, S. Ackroyd, R. Alcock, K. M. Bailey, U. Balottin, C. Barnerias, G. Bernard, C. Bodemer, M. P. Botella, C. Cereda, K. E. Chandler, L. Dabydeen, R. C. Dale, C. De Laet,

C. G. E. L. De Goede, M. D. Toro, L. Effat, N. N. Enamorado, E. Fazzi, B. Gener, M. Haldre, J.-P. S.-M. Lin, J. H. Livingston, C. M. Lourenco, W. Marques Jr., P. Oades, P. Peterson, M. Rasmussen, A. Roubertie, J. L. Schmidt, S. A. Shalev, R. Simon, R. Spiegel, K. J. Swoboda, S. A. Temtamy, G. Vassallo, C. N. Vilain, J. Vogt, V. Wermenbol, W. P. Whitehouse, D. Soler, I. Olivieri, S. Orcesi, M. S. Aglan, M. S. Zaki, G. M. H. Abdel-Salam, A. Vanderver, K. Kisand, F. Rozenberg, P. Lebon, Y. J. Crow, Assessment of interferon-related biomarkers in Aicardi-Goutières syndrome associated with mutations in *TREX1*, *RNA5H2A*, *RNA5H2B*, *RNA5H2C*, *SAMHD1*, and *ADAR*: A case-control study. *Lancet Neurol.* **12**, 1159–1169 (2013).

Acknowledgments: This work is dedicated to the memory of T. Kawasaki. We thank the patients and families who contributed to this work. We also thank L. Ma and L. Lemée from the Biomics Platform C2RT, Institut Pasteur (Paris, France), supported by France Génomique (ANR-10-INBS-09-09) and IBISA. Human biological samples and associated data were obtained from NeuroBioTec (CRB HCL, Lyon France, Biobank BB-0033-00046), and we thank N. Duffay for advice and help for the collection. We acknowledge G. Oriol for technical advice. We thank C. Bailey for discussion and NanoString for providing kits. **Funding:** This work was supported by Hospices Civils de Lyon, Fondation Hospices Civils de Lyon, Square Foundation, Grandir-Fonds de solidarité pour l'enfance, and Olympique Lyonnais Foundation. K.L.G.'s work is supported by the AIR-MI grant (ANR-18-ECVD-0001). E.M.-F. is funded by AIR-MI (ANR-18-ECVD-0001), iReceptorPlus (H2020 Research and Innovation Programme 825821), and SirocCo (ANR-21-CO12-0005-01) grants. D.K.'s contributions are funded by iMAP (ANR-16-RHUS-0001), Transimmunom LabEX (ANR-11-IDEX-0004-02), and TriPoD ERC Research Advanced (Fp7-IdEAS-ERC-322856) grants. T.W. and J.M.'s lab was funded by IDEX Université de Lyon 1 grant. A. Belot, S.T.-A., and M.D. were funded by ANR ANR-20-COVI-0064. **Author contributions:** A. Belot, T.W., D.K., J.M., and E.M.-F. designed and analyzed experiments. M. Moreews, K.L.G., A. Bellomo, C.M., R. Pescarmona, S.K.-P., S.D., A.-L.M., M.P., M.V., E.C., K.S., I.R., F. Vandenesch, M. Dreux, P.B., and S.-Y.Z. performed and analyzed experiments. C.M., G.M., and F. Venet conceptualized the fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis. C.M. and R. Pescarmona supervised cytokine experiments. E.J. performed inclusions, chaired the clinical investigation, and took care of all ethical committee agreements. A.P., E.J., and B.K. set up the clinical trial. R. Pouyau, S.T., M.G., T.L., F. Venet, A.M.Z., M. Duperril, H.P., L.G.-C., J.-C.R., M. Mezidi, O.D., J.-M.D.G., F.B., and V.L. provided clinical samples

and clinical details for all cohorts. O.T. and V.D. explored HLA in patients with MIS-C, and J.-L.C. and L.A. supervised genetic inference exploration of HLA. O.A. reviewed all statistics. I.R. and E.C. provided biobanking and helped generate material for the study. T.W. and A. Belot supervised, designed, and funded this study. T.W. and A. Belot prepared the initial draft. All authors critically reviewed the paper and agreed on the final form. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests. **Data and materials availability:** All information and data are available upon request, and Fastq data for TRB sequencing were deposited in the NCBI Sequence Read Archive repository under the BioProject ID PRJNA727805. All data needed to evaluate the conclusions in the paper are present in the paper or the Supplementary Materials. This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. To view a copy of this license, visit <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. This license does not apply to figures/photos/artwork or other content included in the article that is credited to a third party; obtain authorization from the rights holder before using such material.

Submitted 19 February 2021
Resubmitted 30 April 2021
Accepted 18 May 2021
Published First Release 25 May 2021
Final published 28 June 2021
10.1126/sciimmunol.abh1516

Citation: M. Moreews, K. Le Gouge, S. Khaldi-Plassart, R. Pescarmona, A.-L. Mathieu, C. Malcus, S. Djebali, A. Bellomo, O. Dauwalder, M. Perret, M. Villard, E. Chopin, I. Rouvet, F. Vandenesch, C. Dupieux, R. Pouyau, S. Teyssedre, M. Guerder, T. Louazon, A. Moulin-Zinsch, M. Duperril, H. Patural, L. Giovannini-Chami, A. Portefaix, B. Kassai, F. Venet, G. Monneret, C. Lombard, H. Flodrops, J.-M. De Guillebon, F. Bajolle, V. Launay, P. Bastard, S.-Y. Zhang, V. Dubois, O. Thauinat, J.-C. Richard, M. Mezidi, O. Allatif, K. Saker, M. Dreux, L. Abel, J.-L. Casanova, J. Marvel, S. Trouillet-Assant, D. Klatzmann, T. Walzer, E. Mariotti-Ferandiz, E. Javouhey, A. Belot, Polyclonal expansion of TCR V β 21.3⁺ CD4⁺ and CD8⁺ T cells is a hallmark of multisystem inflammatory syndrome in children. *Sci. Immunol.* **6**, eabh1516 (2021).

Articles supplémentaires:

Sequential actions of EOMES and T-BET promote stepwise maturation of natural killer cells

Zhang, J., Le Gras, S., Pouxvielh, K., Faure, F., Fallone, L., Kern, N., Moreews, M., Mathieu, A.-L., Schneider, R., Marliac, Q., Jung, M., Berton, A., Hayek, S., Vidalain, P.-O., Marçais, A., Dodard, G., Dejean, A., Brossay, L., Ghavi-Helm, Y., Walzer, T.

Abstract : EOMES and T-BET are related T-box transcription factors that control natural killer (NK) cell development. Here we demonstrate that EOMES and T-BET regulate largely distinct gene sets during this process. EOMES is dominantly expressed in immature NK cells and drives early lineage specification by inducing hallmark receptors and functions. By contrast, T-BET is dominant in mature NK cells, where it induces responsiveness to IL-12 and represses the cell cycle, likely through transcriptional repressors. Regardless, many genes with distinct functions are co-regulated by the two transcription factors. By generating two gene-modified mice facilitating chromatin immunoprecipitation of endogenous EOMES and T-BET, we show a strong overlap in their DNA binding targets, as well as extensive epigenetic changes during NK cell differentiation. Our data thus suggest that EOMES and T-BET may distinctly govern, via differential expression and co-factors recruitment, NK cell maturation by inserting partially overlapping epigenetic regulations.

Nat Commun, 2021, 12, 5446.

Contribution of rare and predicted pathogenic gene variants to childhood-onset lupus: a large, genetic panel analysis of British and French cohorts

Belot, A; Rice, GI; Omarjee, SO; Rouchon, Q; Smith, EMD; Moreews, M; Tusseau, M; Frachette, C; Bournhonesque, R; Thielens, N; Gaboriaud, C; Rouvet, I; Chopin, E; Hoshino, A; Latour, S; Ranchin, B; Cimaz, R; Romagnani, P; Malcus, C; Fabien, N; Sarda, MN; Kassai, B; Lega, JC; Decramer, S; Abou-Jaoude, P; Bruce, IN; Simonet, T; Bardel, C; Rollat-Farnier, PA; Viel, S; Reumaux, H; O'Sullivan, J; Walzer, T; Mathieu, AL; Marenne, G; Ludwig, T; Genin, E; Ellingford, J; Bader-Meunier, B; Briggs, TA; Beresford, MW; Crow, YJ; Campion, D; Dartigues, JF; Deleuze, JF; Lambert, JC; Redon, R; Allain-Launay, E; Bouayed, K; Burtey, S; Despert, V; Fain, O; Fischbach, M; Hachulla, E; Hatchuel, Y; Kleinmann, JF; Kone-Paut, I; Lemelle, I; Maurier, F; Meinzer, U; Melki, I; Piram, M; Sibilila, J; Weill, O; Al-Abadi, E; Armon, K; Bailey, K; Brennan, M; Ciurtin, C; Gardner-Medwin, J; Haslam, K; Hawley, D; Leahy, A; Leone, V; Mewar, D; Moots, R; Pilkington, C; Ramanan, A; Ratcliffe, A; Sridhar, A; Riley, P; Satyapal, R; Sen, E; Wilkinson, N; Wood, F.

Abstract : Background Systemic lupus erythematosus (SLE) is a rare immunological disorder and genetic factors are considered important in its causation. Monogenic lupus has been associated with around 30 genotypes in humans and 60 in mice, while genome-wide association studies have identified more than 90 risk loci. We aimed to analyse the contribution of rare and predicted pathogenic gene variants in a population of unselected cases of childhood-onset SLE. Methods For this genetic panel analysis we designed a next-generation sequencing panel comprising 147 genes, including all known lupus-causing

genes in humans, and potentially lupus-causing genes identified through GWAS and animal models. We screened 117 probands fulfilling American College of Rheumatology (ACR) criteria for SLE, ascertained through British and French cohorts of childhood-onset SLE, and compared these data with those of 791 ethnically matched controls from the 1000 Genomes Project and 574 controls from the FREX Consortium. Findings After filtering, mendelian genotypes were confirmed in eight probands, involving variants in C1QA, C1QC, C2, DNASE1L3, and IKZF1. Seven additional patients carried heterozygous variants in complement or type I interferon-associated autosomal recessive genes, with decreased concentrations of the encoded proteins C3 and C9 recorded in two patients. Rare variants that were predicted to be damaging were significantly enriched in the childhood-onset SLE cohort compared with controls; 25% of SLE probands versus 5% of controls were identified to harbour at least one rare, predicted damaging variant ($p=2.98 \times 10^{-11}$). Inborn errors of immunity were estimated to account for 7% of cases of childhood-onset SLE, with defects in innate immunity representing the main monogenic contribution. Interpretation An accumulation of rare variants that are predicted to be damaging in SLE-associated genes might contribute to disease expression and clinical heterogeneity.

The Lancet Rheumatology, Elsevier, 2020, 2 (2), pp.e99-e109.

Early-onset autoimmunity associated with SOCS1 haploinsufficiency

Hadjadj J, Castro CN, Tusseau M, Stolzenberg MC, Mazerolles F, Aladjidi N, Armstrong M, Ashrafian H, Cutcutache I, Ebetsberger-Dachs G, Elliott KS, Durieu I, Fabien N, Fusaro M, Heeg M, Schmitt Y, Bras M, Knight JC, Lega JC, Lesca G, Mathieu AL, MOREEWS M, Moreira B, Nosbaum A, Page M, Picard C, Ronan Leahy T, Rouvet I, Ryan E, Sanlaville D, Schwarz K, Skelton A, Viallard JF, Viel S, Villard M, Callebaut I, Picard C, Walzer T, Ehl S, Fischer A, Neven B, Belot A, Rieux-Laucat F.

Abstract : Autoimmunity can occur when a checkpoint of self-tolerance fails. The study of familial autoimmune diseases can reveal pathophysiological mechanisms involved in more common autoimmune diseases. Here, by whole-exome/genome sequencing we identify heterozygous, autosomal-dominant, germline loss-of-function mutations in the *SOCS1* gene in ten patients from five unrelated families with early onset autoimmune manifestations. The intracellular protein SOCS1 is known to downregulate cytokine signaling by inhibiting the JAK-STAT pathway. Accordingly, patient-derived lymphocytes exhibit increased STAT activation in vitro in response to interferon- γ , IL-2 and IL-4 that is reverted by the JAK1/JAK2 inhibitor ruxolitinib. This effect is associated with a series of in vitro and in vivo immune abnormalities consistent with lymphocyte hyperactivity. Hence, *SOCS1* haploinsufficiency causes a dominantly inherited predisposition to early onset autoimmune diseases related to cytokine hypersensitivity of immune cells.

Nat Commun. 2020 Oct 21;11(1):5341.

DEF6 deficiency, a mendelian susceptibility to EBV infection, lymphoma, and autoimmunity

Fournier B, Tusseau M, Villard M, Malcus C, Chopin E, Martin E, Jorge Cordeiro D, Fabien N, Fusaro M, Gauthier A, Garnier N, Goncalves D, Lounis S, Lenoir C, Mathieu AL, Moreews M, Perret M, Picard C, Picard C, Poitevin F, Viel S, Bertrand Y, Walzer T, Belot A, Latour S.

J Allergy Clin Immunol. 2020 Jun 17:S0091-6749(20)30833-2.

Monogenic lupus: Dissecting heterogeneity

Omarjee O, Picard C, Frachette C, Moreews M, Rieux-Laucat F, Soulas-Sprauel P, Viel S, Lega JC, Bader-Meunier B, Walzer T, Mathieu AL, Cimaz R, Belot A.. Autoimmun Rev. 2019 Oct;18(10):102361.

Abstract : Systemic lupus erythematosus (SLE) is a severe lifelong multisystem autoimmune disease characterized by the presence of autoantibodies targeting nuclear autoantigens, increased production of type I interferon and B cell abnormalities. Clinical presentation of SLE is extremely heterogeneous and different groups of disease are likely to exist. Recently, childhood-onset SLE (cSLE) cases have been linked to single gene mutations, defining the concept of monogenic or Mendelian lupus. Genes associated with Mendelian lupus can be grouped in at least three functional categories. First, complement deficiencies represent the main cause of monogenic lupus and its components are involved in the clearance of dying cells, a mechanism also called efferocytosis. Mutations in extracellular DNASE have been also identified in cSLE patients and represent additional causes leading to defective clearance of nucleic acids and apoptotic bodies. Second, the study of Aicardi-Goutières syndromes has introduced the concept of type-I interferonopathies. Bona fide lupus syndromes have been associated to this genetic condition, driven by defective nucleic acids metabolism or innate sensors overactivity. Interferon signalling anomalies can be detected and monitored during therapies, such as Janus-kinase (JAK) inhibitors. Third, tolerance breakdown can occur following genetic mutations in B and/or T cell expressing key immunoregulatory molecules. Biallelic mutations in PRKCD are associated to lupus and lymphoproliferative diseases as PKC- δ displays proapoptotic activity and is crucial to eliminate self-reactive transitional B cells. Here we review the literature of the emerging field of Mendelian lupus and discuss the physiopathological learning from these inborn errors of immunity. In addition, clinical and biological features are highlighted as well as specific therapies that have been tested in these genetic contexts.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abadi, E., Armon, K., Bailey, K., Beresford, M., Brennan, M., Ciurtin, C., Gardner-Medwin, J., Haslam, K., Hawley, D., Leahy, A., Leone, V., Mewar, D., Moots, R., Pilkington, C., Ramanan, A., Rangaraj, S., Ratcliffe, A., Riley, P., Sen, E., Sridhar, A., Wilkinson, N., Wood, F., 2020. Contribution of rare and predicted pathogenic gene variants to childhood-onset lupus: a large, genetic panel analysis of British and French cohorts. *The Lancet Rheumatology* 2, e99–e109.

Abdelrasoul, H., Werner, M., Setz, C.S., Okkenhaug, K., Jumaa, H., 2018. PI3K induces B-cell development and regulates B cell identity. *Sci Rep* 8, 1327.

Al-Mayouf, S.M., ALTassan, R.S., ALOWain, M.A., 2020. Systemic lupus erythematosus in a girl with PTEN variant and transaldolase deficiency: a novel phenotype. *Clin Rheumatol* 39, 3511–3515.

Alabyev, B., Rahman, Z.S.M., Manser, T., 2007. Quantitatively Reduced Participation of Anti-Nuclear Antigen B Cells That Down-Regulate B Cell Receptor during Primary Development in the Germinal Center/Memory B Cell Response to Foreign Antigen. *The Journal of Immunology* 178, 5623–5634.

Alinikula, J., Kohonen, P., Nera, K.-P., Lassila, O., 2010. Concerted action of Helios and Ikaros controls the expression of the inositol 5-phosphatase SHIP. *European Journal of Immunology* 40, 2599–2607.

Allman, D., Wilmore, J.R., Gaudette, B.T., 2019. The Continuing Story of T-cell Independent Antibodies. *Immunol Rev* 288, 128–135.

Amano, H., Amano, E., Moll, T., Marinkovic, D., Ibnou-Zekri, N., Martinez-Soría, E., Semac, I., Wirth, T., Nitschke, L., Izui, S., 2003. The Yaa Mutation Promoting Murine Lupus Causes Defective Development of Marginal Zone B Cells. *The Journal of Immunology* 170, 2293–2301.

Andrews, B.S., Eisenberg, R.A., Theofilopoulos, A.N., Izui, S., Wilson, C.B., McConahey, P.J., Murphy, E.D., Roths, J.B., Dixon, F.J., 1978. Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *Journal of Experimental Medicine* 148, 1198–1215.

Arbuckle, M.R., McClain, M.T., Rubertone, M.V., Scofield, R.H., Dennis, G.J., James, J.A., Harley, J.B., 2003. Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus. *New England Journal of Medicine* 349, 1526–1533.

Aringer, M., Costenbader, K., Daikh, D., Brinks, R., Mosca, M., Ramsey-Goldman, R., Smolen, J.S., Wofsy, D., Boumpas, D.T., Kamen, D.L., Jayne, D., Cervera, R., Costedoat-Chalumeau, N., Diamond, B., Gladman, D.D., Hahn, B., Hiepe, F., Jacobsen, S., Khanna, D., Lerstrøm, K., Massarotti, E., McCune, J., Ruiz-Irastorza, G., Sanchez-Guerrero, J., Schneider, M., Urowitz, M., Bertsias, G., Hoyer, B.F., Leuchten, N., Tani, C., Tedeschi, S.K., Touma, Z., Schmajuk, G., Anic, B., Assan, F., Chan, T.M., Clarke, A.E., Crow, M.K., Czirják, L., Doria, A., Graninger, W., Halda-Kiss, B., Hasni, S., Izmirly, P.M., Jung, M., Kumánovics, G., Mariette, X., Padjen, I., Pego-Reigosa, J.M., Romero-Diaz, J., Rúa-Figueroa Fernández, Í., Seror, R., Stummvoll, G.H., Tanaka, Y., Tektonidou, M.G., Vasconcelos, C., Vital, E.M., Wallace, D.J., Yavuz, S., Meroni, P.L., Fritzler, M.J., Naden, R., Dörner, T., Johnson, S.R., 2019. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 78, 1151–1159.

Arkatkar, T., Du, S.W., Jacobs, H.M., Dam, E.M., Hou, B., Buckner, J.H., Rawlings, D.J., Jackson, S.W., 2017. B cell-derived IL-6 initiates spontaneous germinal center formation during systemic autoimmunity. *Journal of Experimental Medicine* 214, 3207–3217.

Arkwright, P.D., Riley, P., Hughes, S.M., Alachkar, H., Wynn, R.F., 2014. Successful cure of C1q deficiency in human subjects treated with hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 133, 265–267.

Arnaud, L., Fagot, J.-P., Mathian, A., Paita, M., Fagot-Campagna, A., Amoura, Z., 2014. Prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in France: a 2010 nation-wide population-based study. *Autoimmun Rev* 13, 1082–1089.

Astrazeneca : Update on TULIP 1 Phase III trial for anifrolumab in systemic lupus erythematosus. (2018). Disponible sur : <https://www.astrazeneca.com/media-centre/press-releases/2018/update-on-tulip-1-phase-iii-trial-for-anifrolumab-in-systemic-lupus-erythematosus-31082018.html> (accessed 7.1.22).

Bacalao, M.A., Satterthwaite, A.B., 2021. Recent Advances in Lupus B Cell Biology: PI3K, IFN γ , and Chromatin. *Frontiers in Immunology* 11.

Bader-Meunier, B., Cavé, H., Jeremiah, N., Magerus, A., Lanzarotti, N., Rieux-Laucat, F., Cormier-Daire, V., 2013. Are RASopathies new monogenic predisposing conditions to the development of systemic lupus erythematosus? Case report and systematic review of the literature. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 43, 217–219.

Bae, S.-C., Lee, Y.H., 2019. Association between CD40 polymorphisms and systemic lupus erythematosus and correlation between soluble CD40 and CD40 ligand levels in the disease: a meta-analysis. *Lupus* 28, 1452–1459.

Baranovskii, A.G., Buneva, V.N., Nevinsky, G.A., 2004. Human Deoxyribonucleases. *Biochemistry (Moscow)* 69, 587–601.

Barbhaiya, M., Costenbader, K.H., 2016. Environmental Exposures and the Development of Systemic Lupus Erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 28, 497–505.

Barouch-Bentov, R., Che, J., Lee, C.C., Yang, Y., Herman, A., Jia, Y., Velentza, A., Watson, J., Sternberg, L., Kim, S., Ziaee, N., Miller, A., Jackson, C., Fujimoto, M., Young, M., Batalov, S., Liu, Y., Warmuth, M., Wiltshire, T., Cooke, M.P., Sauer, K., 2009. A conserved salt bridge in the G loop of multiple protein kinases is important for catalysis and for in vivo Lyn function. *Mol Cell* 33, 43–52.

Battaglia, M., Stabilini, A., Roncarolo, M.-G., 2005. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood* 105, 4743–4748.

Battersby, A.C., Cale, A.M., Goldblatt, D., Gennery, A.R., 2013. Clinical manifestations of disease in X-linked carriers of chronic granulomatous disease. *J Clin Immunol* 33, 1276–1284.

Beloglazova, N., Flick, R., Tchigvintsev, A., Brown, G., Popovic, A., Nocek, B., Yakunin, A.F., 2013. Nuclease Activity of the Human SAMHD1 Protein Implicated in the Aicardi-Goutières Syndrome and HIV-1 Restriction. *J Biol Chem* 288, 8101–8110.

Belot, A., Cimaz, R., 2012. Monogenic forms of systemic lupus erythematosus: new insights into SLE pathogenesis. *Pediatr Rheumatol Online J* 10, 21.

Belot, A., Kasher, P.R., Trotter, E.W., Foray, A.-P., Debaud, A.-L., Rice, G.I., Szykiewicz, M., Zabot, M.-T., Rouvet, I., Bhaskar, S.S., Daly, S.B., Dickerson, J.E., Mayer, J., O’Sullivan, J., Juillard, L., Urquhart, J.E., Fawdar, S., Marusiak, A.A., Stephenson, N., Waszkowycz, B., Beresford, M.W., Biesecker, L.G., Black, G.C.M., René, C., Eliaou, J.-F., Fabien, N., Ranchin, B., Cochat, P., Gaffney, P.M., Rozenberg, F., Lebon, P., Malcus, C., Crow, Y.J., Brognard, J., Bonnefoy, N., 2013. Protein Kinase C δ Deficiency Causes Mendelian Systemic Lupus Erythematosus With B Cell-Defective Apoptosis and Hyperproliferation. *Arthritis & Rheumatism* 65, 2161–2171.

Belot, A., Rice, G., Omarjee, S.O., Rouchon, Q., Smith, E., Moreews, M., Frachette, C., Bournhonesque, R., Thielens, N.M., Gaboriaud, C., Rouvet, I., Chopin, E., Ranchin, B., Cimaz, R., Romagnani, P., Malcus, C., Fabien, N., Sarda, M.-N., Kassaï, B., Lega, J.-C., Decramer, S., Bardel, C., Rollat-Farnier, P.A., Viel, S., Reumaux, H., O'Sullivan, J., Ellingford, J., Briggs, T., Walzer, T., Mathieu, A.-L., Bader-Meunier, B., Beresford, M., Crow, yanick, Tusseau, M., Hoshino, A., Latour, S., Abou-Jaoude, P., Bruce, I., Simonet, T., Marenne, G., Ludwig, T., Champion, D., Dartigues, J.-F., Deleuze, J.-F., Génin, E., Lambert, J.-C., Redon, R., Allain-Launay, E., Bouayed, K., Burtey, S., Carbasse, A., Despert, V., Fain, O., Fischbach, M., Flodrops, H., Galeotti, C., Hachulla, E., Hatchuel, yves, Kleinmann, J.-F., Kone-Paut, I., Lanteri, A., Lemelle, I., Maillard, H., Maurier, F., Meinzer, U., Melki, I., Morell-Dubois, S., Pagnier, A., Piram, M., Samaille, C., Sibilis, J., Weill, O., Al-Abadi, E., Armon, K., Bailey, K., Brennan, M., Ciurtin, C., Gardner-Medwin, J., Haslam, K., Hawley, D., Leahy, A., Leone, V., Mewar, D., Moots, R., Pilkington, C., Ramanan, A., Rangaraj, S., Ratcliffe, A., Riley, P., Sen, E., Sridhar, A., Wilkinson, N., Wood, F., 2020. Contribution of rare and predicted pathogenic gene variants to childhood-onset lupus: a large, genetic panel analysis of British and French cohorts. *The Lancet Rheumatology* 2, e99–e109.

Bentham, J., Morris, D.L., Graham, D.S.C., Pinder, C.L., Tombleson, P., Behrens, T.W., Martín, J., Fairfax, B.P., Knight, J.C., Chen, L., Replogle, J., Syvänen, A.-C., Rönnblom, L., Graham, R.R., Wither, J.E., Rioux, J.D., Alarcón-Riquelme, M.E., Vyse, T.J., 2015. Genetic association analyses implicate aberrant regulation of innate and adaptive immunity genes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 47, 1457–1464.

Bernasconi, N.L., Onai, N., Lanzavecchia, A., 2003. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* 101, 4500–4504.

Bishop, G.A., Hostager, B.S., 2001. B lymphocyte activation by contact-mediated interactions with T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 13, 278–285.

Blair, H.A., Duggan, S.T., 2018. Belimumab: A Review in Systemic Lupus Erythematosus. *Drugs* 78, 355–366.

Boada-Romero, E., Martinez, J., Heckmann, B.L., Green, D.R., 2020. The clearance of dead cells by efferocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 398–414.

Boast, B., Nunes-Santos, C. de J., Kuehn, H.S., Rosenzweig, S.D., 2021. Ikaros-Associated Diseases: From Mice to Humans and Back Again. *Frontiers in Pediatrics* 9.

Boast, B., Miosge, L.A., Kuehn, H.S., Cho, V., Athanasopoulos, V., McNamara, H.A., Sontani, Y., Mei, Y., Howard, D., Sutton, H.J., Omari, S.A., Yu, Z., Nasreen, M., Andrews, T.D., Cockburn, I.A., Goodnow, C.C., Rosenzweig, S.D., Enders, A., 2021. A Point Mutation in IKAROS ZF1 Causes a B Cell Deficiency in Mice. *The Journal of Immunology* 206, 1505–1514.

Botto, M., Dell’Agnola, C., Bygrave, A.E., Thompson, E.M., Cook, H.T., Petry, F., Loos, M., Pandolfi, P.P., Walport, M.J., 1998. Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nat Genet* 19, 56–59.

Briggs, T.A., Rice, G.I., Adib, N., Ades, L., Barete, S., Baskar, K., Baudouin, V., Cebeci, A.N., Clapuyt, P., Coman, D., De Somer, L., Finezilber, Y., Frydman, M., Guven, A., Heritier, S., Karall, D., Kulkarni, M.L., Lebon, P., Levitt, D., Le Merrer, M., Linglart, A., Livingston, J.H., Navarro, V., Okenfuss, E., Puel, A., Revencu, N., Scholl-Bürgi, S., Vivarelli, M., Wouters, C., Bader-Meunier, B., Crow, Y.J., 2016. Spondyloenchondrodysplasia Due to Mutations in ACP5: A Comprehensive Survey. *J Clin Immunol* 36, 220–234.

Brodie, E.J., Infantino, S., Low, M.S.Y., Tarlinton, D.M., 2018. Lyn, Lupus, and (B) Lymphocytes, a Lesson on the Critical Balance of Kinase Signaling in Immunity. *Front Immunol* 9, 401.

Brown, G.J., Cañete, P.F., Wang, H., Medhavy, A., Bones, J., Roco, J.A., He, Y., Qin, Y., Cappello, J., Ellyard, J.I., Bassett, K., Shen, Q., Burgio, G., Zhang, Y., Turnbull, C., Meng, X., Wu, P., Cho, E., Miosge, L.A., Andrews, T.D., Field, M.A., Tvorogov, D., Lopez, A.F., Babon, J.J., López, C.A., González-Murillo, Á., Garulo, D.C., Pascual, V., Levy, T., Mallack, E.J., Calame, D.G., Lotze, T., Lupski, J.R., Ding, H., Ullah, T.R., Walters, G.D., Koina, M.E., Cook, M.C., Shen, N., de Lucas Collantes, C., Corry, B., Gantier, M.P., Athanasopoulos, V., Vinuesa, C.G., 2022. TLR7 gain-of-function genetic variation causes human lupus. *Nature* 605, 349–356.

Buchta, C.M., Bishop, G.A., 2014. Toll-like receptors and B cells: functions and mechanisms. *Immunol Res* 59, 12–22.

Butbul Aviel, Y., Mandel, H., Avitan Hersh, E., Bergman, R., Adiv, O.E., Luder, A., Brik, R., 2012. Prolidase deficiency associated with systemic lupus erythematosus (SLE): single site experience and literature review. *Pediatr Rheumatol Online J* 10, 18.

- Cai, X., Qiao, Y., Diao, C., Xu, X., Chen, Y., Du, S., Liu, X., Liu, N., Yu, S., Chen, D., Jiang, Y., 2014. Association between Polymorphisms of the IKZF3 Gene and Systemic Lupus Erythematosus in a Chinese Han Population. *PLoS One* 9, e108661.
- Carbonella, A., Mancano, G., Gremese, E., Alkuraya, F.S., Patel, N., Gurrieri, F., Ferraccioli, G., 2017. An autosomal recessive DNASE1L3-related autoimmune disease with unusual clinical presentation mimicking systemic lupus erythematosus. *Lupus* 26, 768–772.
- Carroll, M.C., 2000. The role of complement in B cell activation and tolerance. *Adv Immunol* 74, 61–88.
- Castaño-Rodríguez, N., Diaz-Gallo, L.-M., Pineda-Tamayo, R., Rojas-Villarraga, A., Anaya, J.-M., 2008. Meta-analysis of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 polymorphisms in Latin American patients with systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 7, 322–330.
- Celhar, T., Magalhães, R., Fairhurst, A.-M., 2012. TLR7 and TLR9 in SLE: when sensing self goes wrong. *Immunol Res* 53, 58–77.
- Cerutti, A., Cols, M., Puga, I., 2013. Marginal zone B cells: virtues of innatelike antibody-producing lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 13, 118–132. H
- Cervera, R., Khamashta, M.A., Hughes, G.R.V., 2009. The Euro-lupus project: epidemiology of systemic lupus erythematosus in Europe. *Lupus* 18, 869–874.
- Chan, O.T.M., Hannum, L.G., Haberman, A.M., Madaio, M.P., Shlomchik, M.J., 1999. A Novel Mouse with B Cells but Lacking Serum Antibody Reveals an Antibody-independent Role for B Cells in Murine Lupus. *Journal of Experimental Medicine* 189, 1639–1648.
- Chen, Z., Forman, L.W., Williams, R.M., Faller, D.V., 2014. Protein kinase C-delta inactivation inhibits the proliferation and survival of cancer stem cells in culture and in vivo. *BMC Cancer* 14, 90.
- Chen, L., Morris, D.L., Vyse, T.J., 2017. Genetic advances in systemic lupus erythematosus: an update. *Curr Opin Rheumatol* 29, 423–433.

Chen, L., Niu, Q., Huang, Z., Yang, B., Wu, Y., Zhang, J., 2020. IKZF1 polymorphisms are associated with susceptibility, cytokine levels, and clinical features in systemic lupus erythematosus. *Medicine (Baltimore)* 99, e22607.

Chitrabamrung, S., Rubin, R.L., Tan, E.M., 1981. Serum deoxyribonuclease I and clinical activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 1, 55–60.

Chong, W.P., Ip, W.K., Wong, W.H.-S., Lau, C.S., Chan, T.M., Lau, Y.L., 2004. Association of interleukin-10 promoter polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 5, 484–492.

Chou, W.-H., Choi, D.-S., Zhang, H., Mu, D., McMahon, T., Kharazia, V.N., Lowell, C.A., Ferriero, D.M., Messing, R.O., 2004. Neutrophil protein kinase C δ as a mediator of stroke-reperfusion injury. *J Clin Invest* 114, 49–56.

Chowdhury, D., Beresford, P.J., Zhu, P., Zhang, D., Sung, J.-S., Demple, B., Perrino, F.W., Lieberman, J., 2006. The exonuclease TREX1 is in the SET complex and acts in concert with NM23-H1 to degrade DNA during granzyme A-mediated cell death. *Mol Cell* 23, 133–142.

Clark, M.R., Mandal, M., Ochiai, K., Singh, H., 2014. Orchestrating B cell lymphopoiesis through interplay of IL-7 receptor and pre-B cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 14, 69–80.

Clark, E.A., Giltiay, N.V., 2018. CD22: A Regulator of Innate and Adaptive B Cell Responses and Autoimmunity. *Frontiers in Immunology* 9.

Cohen, P.L., Eisenberg, R.A., 1991. Lpr and gld: Single Gene Models of Systemic Autoimmunity and Lymphoproliferative Disease. *Annual Review of Immunology* 9, 243–269.

Consonni, F., Gambineri, E., Favre, C., 2022. ALPS, FAS, and beyond: from inborn errors of immunity to acquired immunodeficiencies. *Ann Hematol* 101, 469–484.

Contreras, J.L., Ladino, M.A., Aránguiz, K., Mendez, G.P., Coban-Akdemir, Z., Yuan, B., Gibbs, R.A., Burrage, L.C., Lupski, J.R., Chinn, I.K., Vogel, T.P., Orange, J.S., Poli, M.C., 2021. Immune Dysregulation Mimicking Systemic Lupus Erythematosus in a Patient With Lysinuric Protein Intolerance: Case Report and Review of the Literature. *Front Pediatr* 9, 673957.

Costenbader, K.H., Feskanich, D., Stampfer, M.J., Karlson, E.W., 2007. Reproductive and menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women. *Arthritis Rheum* 56, 1251–1262.

Costenbader, K.H., Kim, D.J., Peerzada, J., Lockman, S., Nobles-Knight, D., Petri, M., Karlson, E.W., 2004. Cigarette smoking and the risk of systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Arthritis Rheum* 50, 849–857.

Crow, Y.J., Manel, N., 2015. Aicardi–Goutières syndrome and the type I interferonopathies. *Nat Rev Immunol* 15, 429–440.

Crow, Y.J., Chase, D.S., Schmidt, J.L., Szykiewicz, M., Forte, G.M.A., Gornall, H.L., Oojageer, A., Anderson, B., Pizzino, A., Helman, G., Abdel-Hamid, M.S., Abdel-Salam, G.M., Ackroyd, S., Aeby, A., Agosta, G., Albin, C., Allon-Shalev, S., Arellano, M., Ariaudo, G., Aswani, V., Babul-Hirji, R., Baildam, E.M., Bahi-Buisson, N., Bailey, K.M., Barnerias, C., Barth, M., Battini, R., Beresford, M.W., Bernard, G., Bianchi, M., de Villemeur, T.B., Blair, E.M., Bloom, M., Burlina, A.B., Carpanelli, M.L., Carvalho, D.R., Castro-Gago, M., Cavallini, A., Cereda, C., Chandler, K.E., Chitayat, D.A., Collins, A.E., Corcoles, C.S., Cordeiro, N.J.V., Crichtutti, G., Dabydeen, L., Dale, R.C., D’Arrigo, S., De Goede, C.G.E.L., De Laet, C., De Waele, L.M.H., Denzler, I., Desguerre, I., Devriendt, K., Di Rocco, M., Fahey, M.C., Fazzi, E., Ferrie, C.D., Figueiredo, A., Gener, B., Goizet, C., Gowrinathan, N.R., Gowrishankar, K., Hanrahan, D., Isidor, B., Kara, B., Khan, N., King, M.D., Kirk, E.P., Kumar, R., Lagae, L., Landrieu, P., Lauffer, H., Laugel, V., La Piana, R., Lim, M.J., Lin, J.-P.S.-M., Linnankivi, T., Mackay, M.T., Marom, D.R., Lourenço, C.M., McKee, S.A., Moroni, I., Morton, J.E.V., Moutard, M.-L., Murray, K., Nabbout, R., Nampoothiri, S., Nunez-Enamorado, N., Oades, P.J., Olivieri, I., Ostergaard, J.R., Pérez-Dueñas, B., Prendiville, J.S., Ramesh, V., Rasmussen, M., Régál, L., Ricci, F., Rio, M., Rodriguez, D., Roubertie, A., Salvatici, E., Segers, K.A., Sinha, G.P., Soler, D., Spiegel, R., Stödberg, T.I., Straussberg, R., Swoboda, K.J., Suri, M., Tacke, U., Tan, T.Y., Naude, J. te W., Teik, K.W., Thomas, M.M., Till, M., Tonduti, D., Valente, E.M., Van Coster, R.N., van der Knaap, M.S., Vassallo, G., Vijzelaar, R., Vogt, J., Wallace, G.B., Wassmer, E., Webb, H.J., Whitehouse, W.P., Whitney, R.N., Zaki, M.S., Zuberi, S.M., Livingston, J.H., Rozenberg, F., Lebon, P., Vanderver, A., Orcesi, S., Rice, G.I., 2015. Characterization of Human Disease Phenotypes Associated with Mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, ADAR, and IFIH1. *Am J Med Genet A* 0, 296–312.

Crow, Y.J., Stetson, D.B., 2021. The type I interferonopathies: 10 years on. *Nat Rev Immunol* 1–13.

Cuesta-Mateos, C., López-Giral, S., Alfonso-Pérez, M., de Soria, V.G.G., Loscertales, J., Guasch-Vidal, S., Beltrán, A.E., Zapata, J.M., Muñoz-Calleja, C., 2010. Analysis of migratory and prosurvival pathways induced by the homeostatic chemokines CCL19 and CCL21 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Experimental Hematology* 38, 756–764.e4.

Cyster, J.G., Allen, C.D.C., 2019. B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. *Cell* 177, 524–540.

Do, B., Mace, M., Rexwinkle, A., 2016. Idelalisib for treatment of B-cell malignancies. *Am J Health Syst Pharm* 73, 547–555.

Dörner, T., Jacobi, A.M., Lipsky, P.E., 2009. B cells in autoimmunity. *Arthritis Res Ther* 11, 247.

Dowdell, K.C., Niemela, J.E., Price, S., Davis, J., Hornung, R.L., Oliveira, J.B., Puck, J.M., Jaffe, E.S., Pittaluga, S., Cohen, J.I., Fleisher, T.A., Rao, V.K., 2010. Somatic FAS mutations are common in patients with genetically undefined autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood* 115, 5164–5169.

Duan, Y.-T., Bi, K.-Y., Ma, Y.-S., 2018. PKC δ gene can induce macrophages to release inflammatory factors against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 22, 4228–4237.

Duus, K., Hansen, E.W., Tacnet, P., Frachet, P., Arlaud, G.J., Thielens, N.M., Houen, G., 2010. Direct interaction between CD91 and C1q. *FEBS J* 277, 3526–3537.

Ebstein, F., Poli Harlowe, M.C., Studencka-Turski, M., Krüger, E., 2019. Contribution of the Unfolded Protein Response (UPR) to the Pathogenesis of Proteasome-Associated Autoinflammatory Syndromes (PRAAS). *Frontiers in Immunology* 10.

Eckard, S.C., Rice, G.I., Fabre, A., Badens, C., Gray, E.E., Hartley, J.L., Crow, Y.J., Stetson, D.B., 2014. The SKIV2L RNA exosome limits activation of the RIG-I-like receptors. *Nat Immunol* 15, 839–845.

Ehrenstein, M.R., Katz, D.R., Griffiths, M.H., Papadaki, L., Winkler, T.H., Kalden, J.R., Isenberg, D.A., 1995. Human IgG anti-DNA antibodies deposit in kidneys and induce proteinuria in SCID mice. *Kidney International* 48, 705–711.

Ekland, E.H., Forster, R., Lipp, M., Cyster, J.G., 2004. Requirements for Follicular Exclusion and Competitive Elimination of Autoantigen-Binding B Cells. *The Journal of Immunology* 172, 4700–4708.

Elgueta, R., Benson, M.J., de Vries, V.C., Wasiuk, A., Guo, Y., Noelle, R.J., 2009. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev* 229, 10.1111/j.1600-065X.2009.00782.x.

Fan, Y., Lu, D., 2016. The Ikaros family of zinc-finger proteins. *Acta Pharm Sin B* 6, 513–521.

Faustini, F., Sippl, N., Stålesen, R., Chemin, K., Dunn, N., Fogdell-Hahn, A., Gunnarsson, I., Malmström, V., 2022. Rituximab in Systemic Lupus Erythematosus: Transient Effects on Autoimmunity Associated Lymphocyte Phenotypes and Implications for Immunogenicity. *Front Immunol* 13, 826152.

Felten, R., Lipsker, D., Sibilia, J., Chasset, F., Arnaud, L., 2020. The history of lupus throughout the ages. *J Am Acad Dermatol* S0190-9622(20)30772–6.

Fischer, M.B., Goerg, S., Shen, L., Prodeus, A.P., Goodnow, C.C., Kelsoe, G., Carroll, M.C., 1998. Dependence of Germinal Center B Cells on Expression of CD21/CD35 for Survival. *Science* 280, 582–585.

Fitzgerald-Bocarsly, P., Dai, J., Singh, S., 2008. Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. *Cytokine Growth Factor Rev* 19, 3–19.

Flanagan, S.E., Haapaniemi, E., Russell, M.A., Caswell, R., Allen, H.L., De Franco, E., McDonald, T.J., Rajala, H., Ramelius, A., Barton, J., Heiskanen, K., Heiskanen-Kosma, T., Kajosaari, M., Murphy, N.P., Milenkovic, T., Seppänen, M., Lernmark, Å., Mustjoki, S., Otonkoski, T., Kere, J., Morgan, N.G., Ellard, S., Hattersley, A.T., 2014. Activating germline mutations in STAT3 cause early-onset multi-organ autoimmune disease. *Nat Genet* 46, 812–814.

Flores-Borja, F., Kabouridis, P.S., Jury, E.C., Isenberg, D.A., Mageed, R.A., 2005. Decreased Lyn expression and translocation to lipid raft signaling domains in B lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 52, 3955–3965.

Frémond, M.-L., Rodero, M.P., Jeremiah, N., Belot, A., Jeziorski, E., Duffy, D., Bessis, D., Cros, G., Rice, G.I., Charbit, B., Hulin, A., Khoudour, N., Caballero, C.M., Bodemer, C., Fabre, M., Berteloot, L., Le Bourgeois, M., Reix, P., Walzer, T., Moshous, D., Blanche, S., Fischer, A., Bader-Meunier, B., Rieux-Laucat, F., Crow, Y.J., Neven, B., 2016. Efficacy of the Janus kinase 1/2 inhibitor ruxolitinib in the treatment of vasculopathy associated with TMEM173-activating mutations in 3 children. *J Allergy Clin Immunol* 138, 1752–1755.

Frémond, M.-L., Nathan, N., 2021. COPA syndrome, 5 years after: Where are we? *Joint Bone Spine* 88, 105070.

Fulcher, D.A., Basten, A., 1994. Reduced life span of anergic self-reactive B cells in a double-transgenic model. *J Exp Med* 179, 125–134.

Furie, R., Khamashta, M., Merrill, J.T., Werth, V.P., Kalunian, K., Brohawn, P., Illei, G.G., Drappa, J., Wang, L., Yoo, S., CD1013 Study Investigators, 2017. Anifrolumab, an Anti-Interferon- α Receptor Monoclonal Antibody, in Moderate-to-Severe Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol* 69, 376–386.

Garcia-Carmona, Y., Ting, A.T., Radigan, L., Athuluri Divakar, S.K., Chavez, J., Meffre, E., Cerutti, A., Cunningham-Rundles, C., 2018. TACI Isoforms Regulate Ligand Binding and Receptor Function. *Front Immunol* 9, 2125.

Gavrilova, T., Zelig, A., Lee, D.H., 2020. Variable Presentation of the CYBB Mutation in One Family, Approach to Management, and a Review of the Literature. *Case Reports in Medicine* 2020.

Gaynor, B., Putterman, C., Valadon, P., Spatz, L., Scharff, M.D., Diamond, B., 1997. Peptide inhibition of glomerular deposition of an anti-DNA antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 1955–1960.

Georgopoulos, K., Bigby, M., Wang, J.-H., Molnar, A., Wu, P., Winandy, S., Sharpe, A., 1994. The ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* 79, 143–156.

Getahun, A., Beavers, N.A., Larson, S.R., Shlomchik, M.J., Cambier, J.C., 2016. Continuous inhibitory signaling by both SHP-1 and SHIP-1 pathways is required to maintain unresponsiveness of anergic B cells. *J Exp Med* 213, 751–769.

Giles, B.M., Boackle, S.A., 2013. Linking complement and anti-dsDNA antibodies in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Immunol Res* 55, 10–21.

Ghia, P., ten Boekel, E., Sanz, E., de la Hera, A., Rolink, A., Melchers, F., 1996. Ordering of Human Bone Marrow B Lymphocyte Precursors by Single-Cell Polymerase Chain Reaction Analyses of the Rearrangement Status of the Immunoglobulin H and L Chain Gene Loci. *Journal of Experimental Medicine* 184, 2217–2230.

Gómez Hernández, G., Morell, M., Alarcón-Riquelme, M.E., 2021. The Role of BANK1 in B Cell Signaling and Disease. *Cells* 10, 1184.

Gonzalez-Guerrico, A.M., Meshki, J., Xiao, L., Benavides, F., Conti, C.J., Kazanietz, M.G., 2005. Molecular mechanisms of protein kinase C-induced apoptosis in prostate cancer cells. *J Biochem Mol Biol* 38, 639–645.

Goodnow, C.C., Crosbie, J., Adelstein, S., Lavoie, T.B., Smith-Gill, S.J., Brink, R.A., Pritchard-Briscoe, H., Wotherspoon, J.S., Loblay, R.H., Raphael, K., 1988. Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 334, 676–682.

Goodnow, C.C., Vinuesa, C.G., Randall, K.L., Mackay, F., Brink, R., 2010. Control systems and decision making for antibody production. *Nat Immunol* 11, 681–688.

Gorelik, G., Fang, J.Y., Wu, A., Sawalha, A.H., Richardson, B., 2007. Impaired T Cell Protein Kinase C δ Activation Decreases ERK Pathway Signaling in Idiopathic and Hydralazine-Induced Lupus. *The Journal of Immunology* 179, 5553–5563.

Grammer, A.C., Fischer, R., Lee, O., Zhang, X., Lipsky, P.E., 2004. Flow cytometric assessment of the signaling status of human B lymphocytes from normal and autoimmune individuals. *Arthritis Res Ther* 6, 28.

Greaves, S.A., Peterson, J.N., Torres, R.M., Pelanda, R., 2018. Activation of the MEK-ERK Pathway Is Necessary but Not Sufficient for Breaking Central B Cell Tolerance. *Frontiers in Immunology* 9.

Greaves, S.A., Peterson, J.N., Strauch, P., Torres, R.M., Pelanda, R., 2019. Active PI3K abrogates central tolerance in high-avidity autoreactive B cells. *Journal of Experimental Medicine* 216, 1135–1153.

Griffin, D.O., Rothstein, T.L., 2011. A small CD11b⁺ human B1 cell subpopulation stimulates T cells and is expanded in lupus. *Journal of Experimental Medicine* 208, 2591–2598.

Groom, J.R., Fletcher, C.A., Walters, S.N., Grey, S.T., Watt, S.V., Sweet, M.J., Smyth, M.J., Mackay, C.R., Mackay, F., 2007. BAFF and MyD88 signals promote a lupuslike disease independent of T cells. *J Exp Med* 204, 1959–1971.

Grossoni, V.C., Falbo, K.B., Kazanietz, M.G., de Kier Joffé, E.D.B., Urtreger, A.J., 2007. Protein kinase C delta enhances proliferation and survival of murine mammary cells. *Mol Carcinog* 46, 381–390.

Gruber, T., Barsig, J., Pfeifhofer, C., Ghaffari-Tabrizi, N., Tinhofer, I., Leitges, M., Baier, G., 2005. PKC δ is involved in signal attenuation in CD3⁺ T cells. *Immunology Letters* 96, 291–293.

Gryka-Marton, M., Szukiewicz, D., Teliga-Czajkowska, J., Olesinska, M., 2021. An Overview of Neonatal Lupus with Anti-Ro Characteristics. *Int J Mol Sci* 22, 9281.

Gu, H., Chen, Z., Ma, J., Wang, J., Zhang, R., Wu, R., Wang, T., 2021. Sirolimus is effective in autoimmune lymphoproliferative syndrome-type III: A pedigree case report with homozygous variation PRKCD. *Int J Immunopathol Pharmacol* 35, 20587384211025936.

Hadjadj, J., Castro, C.N., Tusseau, M., Stolzenberg, M.-C., Mazerolles, F., Aladjidi, N., Armstrong, M., Ashrafian, H., Cutcutache, I., Ebetsberger-Dachs, G., Elliott, K.S., Durieu, I., Fabien, N., Fusaro, M., Heeg, M., Schmitt, Y., Bras, M., Knight, J.C., Lega, J.-C., Lesca, G., Mathieu, A.-L., Moreews, M., Moreira, B., Nosbaum, A., Page, M., Picard, Cécile, Ronan Leahy, T., Rouvet, I., Ryan, E., Sanlaville, D., Schwarz, K., Skelton, A., Viallard, J.-F., Viel, S., Villard, M., Callebaut, I., Picard, Capucine, Walzer, T., Ehl, S., Fischer, A., Neven, B., Belot, A., Rieux-Laucat, F., 2020. Early-onset autoimmunity associated with SOCS1 haploinsufficiency. *Nat Commun* 11, 5341.

Han, S., Zheng, B., Dal Porto, J., Kelsoe, G., 1995. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. IV. Affinity-dependent, antigen-driven B cell apoptosis in germinal centers as a mechanism for maintaining self-tolerance. *J Exp Med* 182, 1635–1644.

Hartl, J., Serpas, L., Wang, Y., Rashidfarrokhi, A., Perez, O.A., Sally, B., Sisirak, V., Soni, C., Khodadadi-Jamayran, A., Tsigos, A., Caiello, I., Bracaglia, C., Volpi, S., Ghiggeri, G.M., Chida, A.S., Sanz, I., Kim, M.Y., Belmont, H.M., Silverman, G.J., Clancy, R.M., Izmirly, P.M., Buyon, J.P., Reizis, B., 2021. Autoantibody-mediated impairment of DNASE1L3 activity in sporadic systemic lupus erythematosus. *Journal of Experimental Medicine* 218, e20201138.

Hartley, S.B., Crosbie, J., Brink, R., Kantor, A.B., Basten, A., Goodnow, C.C., 1991. Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens. *Nature* 353, 765–769.

Harwood, N.E., Batista, F.D., 2010. Early events in B cell activation. *Annu Rev Immunol* 28, 185–210.

Haxhinasto, S., Mathis, D., Benoist, C., 2008. The AKT–mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4⁺Foxp3⁺ cells. *Journal of Experimental Medicine* 205, 565–574.

He, Y., Sawalha, A.H., 2018. Drug-induced lupus erythematosus: an update on drugs and mechanisms. *Curr Opin Rheumatol* 30, 490–497.

He, Y., Gallman, A.E., Xie, C., Shen, Q., Ma, J., Wolfreys, F.D., Sandy, M., Arsov, T., Wu, X., Qin, Y., Zhang, P., Jiang, S., Stanley, M., Wu, P., Tan, J., Ding, H., Xue, H., Chen, W., Xu, J., Criswell, L.A., Nititham, J., Adamski, M., Kitching, A.R., Cook, M.C., Cao, L., Shen, N., Cyster, J.G., Vinuesa, C.G., 2022. P2RY8 variants in lupus patients uncover a role for the receptor in immunological tolerance. *J Exp Med* 219, e20211004.

Hebron, K.E., Hernandez, E.R., Yohe, M.E., 2022. The RASopathies: from pathogenetics to therapeutics. *Dis Model Mech* 15, dmm049107.

Heesters, B.A., Chatterjee, P., Kim, Y.-A., Gonzalez, S.F., Kuligowski, M.P., Kirchhausen, T., Carroll, M.C., 2013. Endocytosis and Recycling of Immune Complexes by Follicular Dendritic Cells Enhances B Cell Antigen Binding and Activation. *Immunity* 38, 1164–1175.

Hibbs, M.L., Tarlinton, D.M., Armes, J., Grail, D., Hodgson, G., Maglitto, R., Stacker, S.A., Dunn, A.R., 1995. Multiple defects in the immune system of Lyn-deficient mice, culminating in autoimmune disease. *Cell* 83, 301–311.

Hibbs, M.L., Harder, K.W., Armes, J., Kountouri, N., Quilici, C., Casagrande, F., Dunn, A.R., Tarlinton, D.M., 2002. Sustained Activation of Lyn Tyrosine Kinase In Vivo Leads to Autoimmunity. *J Exp Med* 196, 1593–1604.

Hiepe, F., Dörner, T., Hauser, A.E., Hoyer, B.F., Mei, H., Radbruch, A., 2011. Long-lived autoreactive plasma cells drive persistent autoimmune inflammation. *Nat Rev Rheumatol* 7, 170–178.

Ho, V., Mclean, A., Terry, S., 2008. Severe Systemic Lupus Erythematosus Induced by Antiviral Treatment for Hepatitis C. *JCR: Journal of Clinical Rheumatology* 14, 166–168.

Horowitz, D.L., Furie, R., 2012. Belimumab is approved by the FDA: what more do we need to know to optimize decision making? *Curr Rheumatol Rep* 14, 318–323.

Hoshino, A., Okada, S., Yoshida, K., Nishida, N., Okuno, Y., Ueno, H., Yamashita, M., Okano, T., Tsumura, M., Nishimura, S., Sakata, S., Kobayashi, M., Nakamura, H., Kamizono, J., Mitsui-Sekinaka, K., Ichimura, T., Ohga, S., Nakazawa, Y., Takagi, M., Imai, K., Shiraishi, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Miyano, S., Ogawa, S., Kojima, S., Nonoyama, S., Morio, T., Kanegane, H., 2017. Abnormal hematopoiesis and autoimmunity in

human subjects with germline IKZF1 mutations. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 140, 223–231.

Ingley, E., 2012. Functions of the Lyn tyrosine kinase in health and disease. *Cell Commun Signal* 10, 21.

Iwata, S., Tanaka, Y., 2016. B-cell subsets, signaling and their roles in secretion of autoantibodies. *Lupus* 25, 850–856.

Jacobi, A.M., Diamond, B., 2005. Balancing diversity and tolerance : lessons from patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of Experimental Medicine* 202, 341–344.

Jacquemin, C., Schmitt, N., Contin-Bordes, C., Liu, Y., Narayanan, P., Seneschal, J., Maurouard, T., Dougall, D., Davizon, E.S., Dumortier, H., Douchet, I., Raffray, L., Richez, C., Lazaro, E., Duffau, P., Truchetet, M.-E., Khoryati, L., Mercié, P., Couzi, L., Merville, P., Schaefferbeke, T., Viallard, J.-F., Pellegrin, J.-L., Moreau, J.-F., Muller, S., Zurawski, S., Coffman, R.L., Pascual, V., Ueno, H., Blanco, P., 2015. OX40 Ligand Contributes to Human Lupus Pathogenesis by Promoting T Follicular Helper Response. *Immunity* 42, 1159–1170.

Jang, M.-A., Kim, E.K., Now, H., Nguyen, N.T.H., Kim, W.-J., Yoo, J.-Y., Lee, J., Jeong, Y.-M., Kim, C.-H., Kim, O.-H., Sohn, S., Nam, S.-H., Hong, Y., Lee, Y.S., Chang, S.-A., Jang, S.Y., Kim, J.-W., Lee, M.-S., Lim, S.Y., Sung, K.-S., Park, K.-T., Kim, B.J., Lee, J.-H., Kim, D.-K., Kee, C., Ki, C.-S., 2015. Mutations in DDX58, which Encodes RIG-I, Cause Atypical Singleton-Merten Syndrome. *The American Journal of Human Genetics* 96, 266–274.

Jellusova, J., Miletic, A.V., Cato, M.H., Lin, W.-W., Hu, Y., Bishop, G.A., Shlomchik, M.J., Rickert, R.C., 2013. Context-specific BAFF-R signaling by the NF- κ B and PI3K pathways. *Cell Rep* 5, 1022–1035.

John, L.B., Ward, A.C., 2011. The Ikaros gene family: Transcriptional regulators of hematopoiesis and immunity. *Molecular Immunology* 48, 1272–1278.

Jones, D.D., Gaudette, B.T., Wilmore, J.R., Chernova, I., Bortnick, A., Weiss, B.M., Allman, D., 2016. mTOR has distinct functions in generating versus sustaining humoral immunity. *J Clin Invest* 126, 4250–4261

Jouhadi, Z., Khadir, K., Ailal, F., Bouayad, K., Nadifi, S., Engelhardt, K.R., Grimbacher, B., 2014. Ten-Year Follow-Up of a DOCK8-Deficient Child With Features of Systemic Lupus Erythematosus. *Pediatrics* 134, e1458–e1463.

Kamoda, T., Nagai, Y., Shigeta, M., Kobayashi, C., Sekijima, T., Shibasaki, M., Nakamura, N., 1998. Lysinuric protein intolerance and systemic lupus erythematosus. *Eur J Pediatr* 157, 130–131.

- Kang, I., Quan, T., Nolasco, H., Park, S.-H., Hong, M.S., Crouch, J., Pamer, E.G., Howe, J.G., Craft, J., 2004. Defective control of latent Epstein-Barr virus infection in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 172, 1287–1294.
- Kaul, A., Gordon, C., Crow, M.K., Touma, Z., Urowitz, M.B., van Vollenhoven, R., Ruiz-Irastorza, G., Hughes, G., 2016. Systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Dis Primers* 2, 1–21.
- Karrar, S., Cunninghame Graham, D.S., 2018. Abnormal B Cell Development in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol* 70, 496–507.
- Kil, L.P., Hendriks, R.W., 2013. Aberrant B Cell Selection and Activation in Systemic Lupus Erythematosus. *International Reviews of Immunology* 32, 445–470.
- Kim, S.J., Caton, M., Wang, C., Khalil, M., Zhou, Z.-J., Hardin, J., Diamond, B., 2008. Increased IL-12 inhibits B cells' differentiation to germinal center cells and promotes differentiation to short-lived plasmablasts. *Journal of Experimental Medicine* 205, 2437–2448.
- Kirstetter, P., Thomas, M., Dierich, A., Kastner, P., Chan, S., 2002. Ikaros is critical for B cell differentiation and function. *European Journal of Immunology* 32, 720–730.
- Kiykim, A., Ogulur, I., Baris, S., Salzer, E., Karakoc-Aydiner, E., Ozen, A.O., Garncarz, W., Hirschmugl, T., Krolo, A., Yucelten, A.D., Boztug, K., Barlan, I.B., 2015. Potentially Beneficial Effect of Hydroxychloroquine in a Patient with a Novel Mutation in Protein Kinase C δ Deficiency. *J Clin Immunol* 35, 523–526.
- Kolhatkar, N.S., Brahmandam, A., Thouvenel, C.D., Becker-Herman, S., Jacobs, H.M., Schwartz, M.A., Allenspach, E.J., Khim, S., Panigrahi, A.K., Luning Prak, E.T., Thrasher, A.J., Notarangelo, L.D., Candotti, F., Torgerson, T.R., Sanz, I., Rawlings, D.J., 2015. Altered BCR and TLR signals promote enhanced positive selection of autoreactive transitional B cells in Wiskott-Aldrich syndrome. *J Exp Med* 212, 1663–1677.
- König, N., Fiehn, C., Wolf, C., Schuster, M., Cura Costa, E., Tüngler, V., Alvarez, H.A., Chara, O., Engel, K., Goldbach-Mansky, R., Günther, C., Lee-Kirsch, M.A., 2017. Familial chilblain lupus due to a gain-of-function mutation in STING. *Ann Rheum Dis* 76, 468–472.
- Kronfeld, I., Kazimirsky, G., Lorenzo, P.S., Garfield, S.H., Blumberg, P.M., Brodie, C., 2000. Phosphorylation of Protein Kinase C δ on Distinct Tyrosine Residues Regulates Specific Cellular Functions. *Journal of Biological Chemistry* 275, 35491–35498.

Kuehn, H.S., Niemela, J.E., Rangel-Santos, A., Zhang, M., Pittaluga, S., Stoddard, J.L., Hussey, A.A., Evbuomwan, M.O., Priel, D.A.L., Kuhns, D.B., Park, C.L., Fleisher, T.A., Uzel, G., Oliveira, J.B., 2013. Loss-of-function of the protein kinase C δ (PKC δ) causes a B-cell lymphoproliferative syndrome in humans. *Blood* 121, 3117–3125.

Kuehn, H.S., Nunes-Santos, C.J., Rosenzweig, S.D., 2021. Germline IKZF1 mutations and their impact on immunity: IKAROS-associated diseases and pathophysiology. *Expert Rev Clin Immunol* 17, 407–416.

Kuehn, H.S., Niemela, J.E., Stoddard, J., Mannurita, S.C., Shahin, T., Goel, S., Hintermeyer, M., Heredia, R.J., Garofalo, M., Lucas, L., Singh, S., Tondo, A., Jacobs, Z., Gahl, W.A., Latour, S., Verbsky, J., Routes, J., Cunningham-Rundles, C., Boztug, K., Gambineri, E., Fleisher, T.A., Chandrakasan, S., Rosenzweig, S.D., 2021. Germline IKAROS dimerization haploinsufficiency causes hematologic cytopenias and malignancies. *Blood* 137, 349–363.

Kuhn, A., Bonsmann, G., Anders, H.-J., Herzer, P., Tenbrock, K., Schneider, M., 2015. The Diagnosis and Treatment of Systemic Lupus Erythematosus. *Dtsch Arztebl Int* 112, 423–432.

LeBien, T.W., Tedder, T.F., 2008. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 112, 1570–1580.

Lee, S.-Y., Moon, S.-J., Kim, E.-K., Seo, H.-B., Yang, E.-J., Son, H.-J., Kim, J.-K., Min, J.-K., Park, S.-H., Cho, M.-L., 2017. Metformin Suppresses Systemic Autoimmunity in Roquinsan/san Mice through Inhibiting B Cell Differentiation into Plasma Cells via Regulation of AMPK/mTOR/STAT3. *The Journal of Immunology* 198, 2661–2670.

Lei, L., Muhammad, S., Al-Obaidi, M., Sebire, N., Cheng, I.L., Eleftheriou, D., Brogan, P., 2018. Successful use of ofatumumab in two cases of early-onset juvenile SLE with thrombocytopenia caused by a mutation in protein kinase C δ . *Pediatric Rheumatology* 16, 61.

Leitges, M., Gimborn, K., Elis, W., Kalesnikoff, J., Hughes, M.R., Krystal, G., Huber, M., 2002. Protein Kinase C- δ Is a Negative Regulator of Antigen-Induced Mast Cell Degranulation. *Mol Cell Biol* 22, 3970–3980.

Lesley, R., Xu, Y., Kalled, S.L., Hess, D.M., Schwab, S.R., Shu, H.-B., Cyster, J.G., 2004. Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF. *Immunity* 20, 441–453.

Li, Z., Perez-Casellas, L.A., Savic, A., Song, C., Dovat, S., 2011. Ikaros isoforms: The saga continues. *World J Biol Chem* 2, 140–145.

Li, W., Titov, A.A., Morel, L., 2017. An update on lupus animal models. *Curr Opin Rheumatol* 29, 434–441.

Limnander, A., Depeille, P., Freedman, T.S., Liou, J., Leitges, M., Kurosaki, T., Roose, J.P., Weiss, A., 2011. STIM1, PKC- δ and RasGRP set a threshold for proapoptotic Erk signaling during B cell development. *Nat. Immunol.* 12, 425–433.

Limnander, A., Zikherman, J., Lau, T., Leitges, M., Weiss, A., Roose, J.P., 2014. Protein Kinase C δ Promotes Transitional B Cell-Negative Selection and Limits Proximal B Cell Receptor Signaling To Enforce Tolerance. *Mol Cell Biol* 34, 1474–1485.

Liou, S.N., Kovacs, B., Dennis, G., Kammer, G.M., 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, B., Ryer, E.J., Kundi, R., Kamiya, K., Itoh, H., Faries, P.L., Sakakibara, K., Kent, K.C., 2007. Protein kinase C-delta (PKC δ) regulates migration and proliferation of vascular smooth muscle cells through the mitogen activated protein kinase ERK1/2. *J Vasc Surg* 45, 160–168.

Liu, C., Richard, K., Wiggins, M., Zhu, X., Conrad, D.H., Song, W., 2016. CD23 can negatively regulate B-cell receptor signaling. *Sci Rep* 6, 25629.

Liu, J., Wang, Y., Xiong, E., Hong, R., Lu, Q., Ohno, H., Wang, J.-Y., 2019. Role of the IgM Fc Receptor in Immunity and Tolerance. *Front Immunol* 10, 529.

Llorente, L., Richaud-Patin, Y., García-Padilla, C., Claret, E., Jakez-Ocampo, J., Cardiel, M.H., Alcocer-Varela, J., Grangeot-Keros, L., Alarcón-Segovia, D., Wijdenes, J., Galanaud, P., Emilie, D., 2000. Clinical and biologic effects of anti-interleukin-10 monoclonal antibody administration in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 43, 1790–1800.

Lood, C., Gullstrand, B., Truedsson, L., Olin, A.I., Alm, G.V., Rönnblom, L., Sturfelt, G., Eloranta, M.-L., Bengtsson, A.A., 2009. C1q inhibits immune complex-induced interferon-alpha production in plasmacytoid dendritic cells: a novel link between C1q deficiency and systemic lupus erythematosus pathogenesis. *Arthritis Rheum* 60, 3081–3090.

Lu, R., Vidal, G.S., Kelly, J.A., Delgado-Vega, A.M., Howard, X.K., Macwana, S.R., Dominguez, N., Klein, W., Burrell, C., Harley, I.T., Kaufman, K.M., Bruner, G.R., Moser, K.L., Gaffney, P.M., Gilkeson, G.S.,

Wakeland, E.K., Li, Q.-Z., Langefeld, C.D., Marion, M.C., Divers, J., Alarcón, G.S., Brown, E.E., Kimberly, R.P., Edberg, J.C., Ramsey-Goldman, R., Reveille, J.D., McGwin Jr, G., Vilá, L.M., Petri, M.A., Bae, S.-C., Cho, S.-K., Bang, S.-Y., Kim, I., Choi, C.-B., Martin, J., Vyse, T.J., Merrill, J.T., Harley, J.B., Alarcón-Riquelme, M.E., Nath, S.K., James, J.A., Guthridge, J.M., 2009. Genetic associations of LYN with systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 10, 397–403.

Lutz-Nicoladoni, C., Letschka, T., Leitges, M., Villunger, A., Baier, G., 2005. Essential Role of PKCdelta in Apoptosis Induction of Mouse Thymocytes. *American Journal of Immunology* 1, 14–20.

Ma, J.S.Y., Monu, N., Shen, D.T., Mecklenbräuker, I., Radoja, N., Haydar, T.F., Leitges, M., Frey, A.B., Vukmanović, S., Radoja, S., 2007. Protein Kinase Cδ Regulates Antigen Receptor-Induced Lytic Granule Polarization in Mouse CD8+ CTL. *The Journal of Immunology* 178, 7814–7821.

Mackay, F., Schneider, P., 2009. Cracking the BAFF code. *Nat Rev Immunol* 9, 491–502.

Mackenzie, K.J., Carroll, P., Lettice, L., Tarnauskaitė, Ž., Reddy, K., Dix, F., Revuelta, A., Abbondati, E., Rigby, R.E., Rabe, B., Kilanowski, F., Grimes, G., Fluteau, A., Devenney, P.S., Hill, R.E., Reijns, M.A., Jackson, A.P., 2016. Ribonuclease H2 mutations induce a cGAS/STING-dependent innate immune response. *EMBO J* 35, 831–844.

Madera-Salcedo, I.K., Danelli, L., Tiwari, N., Dema, B., Pacreau, E., Vibhushan, S., Birnbaum, J., Agabriel, C., Liabeuf, V., Klingebiel, C., Menasche, G., Macias-Silva, M., Benhamou, M., Charles, N., González-Espinosa, C., Vitte, J., Blank, U., 2018. Tomosyn functions as a PKCδ-regulated fusion clamp in mast cell degranulation. *Science Signaling* 11, eaan4350.

Mak, A., Cheung, M.W.-L., Chiew, H.J., Liu, Y., Ho, R.C., 2012. Global trend of survival and damage of systemic lupus erythematosus: meta-analysis and meta-regression of observational studies from the 1950s to 2000s. *Semin Arthritis Rheum* 41, 830–839.

Mallavarapu, R.K., Grimsley, E.W., 2007. The history of lupus erythematosus. *South Med J* 100, 896–898.

Manolio, T.A., Collins, F.S., Cox, N.J., Goldstein, D.B., Hindorff, L.A., Hunter, D.J., McCarthy, M.I., Ramos, E.M., Cardon, L.R., Chakravarti, A., Cho, J.H., Guttmacher, A.E., Kong, A., Kruglyak, L., Mardis, E., Rotimi, C.N., Slatkin, M., Valle, D., Whittemore, A.S., Boehnke, M., Clark, A.G., Eichler, E.E., Gibson, G., Haines,

J.L., Mackay, T.F.C., McCarroll, S.A., Visscher, P.M., 2009. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 461, 747–753.

Martin, F., Oliver, A.M., Kearney, J.F., 2001. Marginal Zone and B1 B Cells Unite in the Early Response against T-Independent Blood-Borne Particulate Antigens. *Immunity* 14, 617–629.

Martin, F., Kearney, J.F., 2002. Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol* 2, 323–335.

Martin-Fernandez, M., Bravo García-Morato, M., Gruber, C., Murias Loza, S., Malik, M.N.H., Alshime, F., Alakeel, A., Valdez, R., Buta, S., Buda, G., Marti, M.A., Larralde, M., Boisson, B., Feito Rodriguez, M., Qiu, X., Chrabieh, M., Al Aayed, M., Al Muhsen, S., Desai, J.V., Ferre, E.M.N., Rosenzweig, S.D., Amador-Borrero, B., Bravo-Gallego, L.Y., Olmer, R., Merkert, S., Bret, M., Sood, A.K., Al-rabiaah, A., Temsah, M.H., Halwani, R., Hernandez, M., Pessler, F., Casanova, J.-L., Bustamante, J., Lionakis, M.S., Bogunovic, D., 2020. Systemic Type I IFN Inflammation in Human ISG15 Deficiency Leads to Necrotizing Skin Lesions. *Cell Reports* 31, 107633.

Martínez-Feito, A., Melero, J., Mora-Díaz, S., Rodríguez-Vigil, C., Elduayen, R., González-Granado, L.I., Pérez-Méndez, D., Sánchez-Zapardiel, E., Ruiz-García, R., Menchén, M., Díaz-Madroñero, J., Paz-Artal, E., Del Orbe-Barreto, R., Riñón, M., Allende, L.M., 2016. Autoimmune lymphoproliferative syndrome due to somatic FAS mutation (ALPS-sFAS) combined with a germline caspase-10 (CASP10) variation. *Immunobiology* 221, 40–47.

Mecklenbräuker, I., Saijo, K., Zheng, N.-Y., Leitges, M., Tarakhovsky, A., 2002. Protein kinase C δ controls self-antigen-induced B-cell tolerance. *Nature* 416, 860–865.

Mecklenbräuker, I., Kalled, S.L., Leitges, M., Mackay, F., Tarakhovsky, A., 2004. Regulation of B-cell survival by BAFF-dependent PKC δ -mediated nuclear signalling. *Nature* 431, 456–461.

Meuwissen, M.E.C., Schot, R., Buta, S., Oudesluijs, G., Tinschert, S., Speer, S.D., Li, Z., van Unen, L., Heijman, D., Goldmann, T., Lequin, M.H., Kros, J.M., Stam, W., Hermann, M., Willemsen, R., Brouwer, R.W.W., Van IJcken, W.F.J., Martin-Fernandez, M., de Coo, I., Dudink, J., de Vries, F.A.T., Bertoli Avella, A., Prinz, M., Crow, Y.J., Verheijen, F.W., Pellegrini, S., Bogunovic, D., Mancini, G.M.S., 2016. Human USP18 deficiency underlies type 1 interferonopathy leading to severe pseudo-TORCH syndrome. *J Exp Med* 213, 1163–1174.

Mevorach, D., Zhou, J.L., Song, X., Elkon, K.B., 1998. Systemic Exposure to Irradiated Apoptotic Cells Induces Autoantibody Production. *Journal of Experimental Medicine* 188, 387–392.

Meyts, I., Bucciol, G., Quinti, I., Neven, B., Fischer, A., Seoane, E., Lopez-Granados, E., Gianelli, C., Robles-Marhuenda, A., Jeandel, P.-Y., Paillard, C., Sankaran, V.G., Demirdag, Y.Y., Lougaris, V., Aiuti, A., Plebani, A., Milito, C., Dalm, V.ASH., Guevara-Hoyer, K., Sánchez-Ramón, S., Bezrodnik, L., Barzaghi, F., Gonzalez-Granado, L.I., Hayman, G.R., Uzel, G., Mendonça, L.O., Agostini, C., Spadaro, G., Badolato, R., Soresina, A., Vermeulen, F., Bosteels, C., Lambrecht, B.N., Keller, M., Mustillo, P.J., Abraham, R.S., Gupta, S., Ozen, A., Karakoc-Aydiner, E., Baris, S., Freeman, A.F., Yamazaki-Nakashimada, M., Scheffler-Mendoza, S., Espinosa-Padilla, S., Gennery, A.R., Jolles, S., Espinosa, Y., Poli, M.C., Fieschi, C., Hauck, F., Cunningham-Rundles, C., Mahlaoui, N., Warnatz, K., Sullivan, K.E., Tangye, S.G., 2021. Coronavirus disease 2019 in patients with inborn errors of immunity: An international study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 147, 520–531.

Milner, J.D., Vogel, T.P., Forbes, L., Ma, C.A., Stray-Pedersen, A., Niemela, J.E., Lyons, J.J., Engelhardt, K.R., Zhang, Y., Topcagic, N., Roberson, E.D.O., Matthews, H., Verbsky, J.W., Dasu, T., Vargas-Hernandez, A., Varghese, N., McClain, K.L., Karam, L.B., Nahmod, K., Makedonas, G., Mace, E.M., Sorte, H.S., Perminow, G., Rao, V.K., O'Connell, M.P., Price, S., Su, H.C., Butrick, M., McElwee, J., Hughes, J.D., Willet, J., Swan, D., Xu, Y., Santibanez-Koref, M., Slowik, V., Dinwiddie, D.L., Ciaccio, C.E., Saunders, C.J., Septer, S., Kingsmore, S.F., White, A.J., Cant, A.J., Hambleton, S., Cooper, M.A., 2015. Early-onset lymphoproliferation and autoimmunity caused by germline STAT3 gain-of-function mutations. *Blood* 125, 591–599.

Mingari, M.C., Gerosa, F., Carra, G., Accolla, R.S., Moretta, A., Zubler, R.H., Waldmann, T.A., Moretta, L., 1984. Human interleukin-2 promotes proliferation of activated B cells via surface receptors similar to those of activated T cells. *Nature* 312, 641–643.

Mitchell, J.L., Seng, A., Yankee, T.M., 2017. Expression and splicing of Ikaros family members in murine and human thymocytes. *Mol Immunol* 87, 1–11.

Miyamoto, A., Nakayama, K., Imaki, H., Hirose, S., Jiang, Y., Abe, M., Tsukiyama, T., Nagahama, H., Ohno, S., Hatakeyama, S., Nakayama, K.I., 2002. Increased proliferation of B cells and auto-immunity in mice lacking protein kinase C δ . *Nature* 416, 865–869.

Mizuno, T., Rothstein, T.L., 2003. Cutting Edge: CD40 Engagement Eliminates the Need for Bruton's Tyrosine Kinase in B Cell Receptor Signaling for NF- κ B. *The Journal of Immunology* 170, 2806–2810.

Mizuno, T., Rothstein, T.L., 2005. B cell receptor (BCR) cross-talk: CD40 engagement enhances BCR-induced ERK activation. *J Immunol* 174, 3369–3376.

Moens, L. et Tangye, S., 2014. Cytokine-Mediated Regulation of Plasma Cell Generation: IL-21 Takes Center Stage. *Frontiers in Immunology* 5.

Molina, H., Perkins, S.J., Guthridge, J., Gorka, J., Kinoshita, T., Holers, V.M., 1995. Characterization of a complement receptor 2 (CR2, CD21) ligand binding site for C3. An initial model of ligand interaction with two linked short consensus repeat modules. *J Immunol* 154, 5426–5435.

Mondrinos, M.J., Zhang, T., Sun, S., Kennedy, P.A., King, D.J., Wolfson, M.R., Knight, L.C., Scalia, R., Kilpatrick, L.E., 2014. Pulmonary Endothelial Protein Kinase C-Delta (PKC δ) Regulates Neutrophil Migration in Acute Lung Inflammation. *The American Journal of Pathology* 184, 200–213.

Morand, E.F., Furie, R.A., Bruce, I.N., Vital, E.M., Dall'Era, M., Maho, E., Pineda, L., Tummala, R., 2022. Efficacy of anifrolumab across organ domains in patients with moderate-to-severe systemic lupus erythematosus: a post-hoc analysis of pooled data from the TULIP-1 and TULIP-2 trials. *The Lancet Rheumatology* 4, e282–e292.

Morgan, B., Sun, L., Avitahl, N., Andrikopoulos, K., Ikeda, T., Gonzales, E., Wu, P., Neben, S., Georgopoulos, K., 1997. Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation. *EMBO J* 16, 2004–2013.

Mohty, M., Apperley, J.F., 2010. Long-term physiological side effects after allogeneic bone marrow transplantation. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010, 229–236.

Murphy, K., Travers, P., Walport, M., & Janeway, C. (2008). *Janeway's immunobiology*. New York, Garland Science.

Napirei, M., Wulf, S., Mannherz, H.G., 2004. Chromatin breakdown during necrosis by serum Dnase1 and the plasminogen system. *Arthritis Rheum* 50, 1873–1883.

Napirei, M., Ludwig, S., Mezhhab, J., Klöckl, T., Mannherz, H.G., 2009. Murine serum nucleases – contrasting effects of plasmin and heparin on the activities of DNase1 and DNase1-like 3 (DNase113). *The FEBS Journal* 276, 1059–1073.

Nashi, E., Wang, Y., Diamond, B., 2010. The Role Of B Cells in Lupus Pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 543–550.

Neehus, A.-L., Moriya, K., Nieto-Patlán, A., Le Voyer, T., Lévy, R., Özen, A., Karakoc-Aydiner, E., Baris, S., Yildiran, A., Altundag, E., Roynard, M., Haake, K., Migaud, M., Dorgham, K., Gorochoy, G., Abel, L., Lachmann, N., Dogu, F., Haskologlu, S., Ince, E., El-Benna, J., Uzel, G., Kiykim, A., Boztug, K., Roderick, M.R., Shahrooei, M., Brogan, P.A., Abolhassani, H., Hancioglu, G., Parvaneh, N., Belot, A., Ikinogullari, A., Casanova, J.-L., Puel, A., Bustamante, J., 2021. Impaired respiratory burst contributes to infections in PKC δ -deficient patients. *Journal of Experimental Medicine* 218, e20210501.

Nemazee, D., 2017. Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat Rev Immunol* 17, 281–294.

Nera, K.-P., Alinikula, J., Terho, P., Narvi, E., Törnquist, K., Kurosaki, T., Buerstedde, J.-M., Lassila, O., 2006. Ikaros has a crucial role in regulation of B cell receptor signaling. *European Journal of Immunology* 36, 516–525.

Newton, A.C., Antal, C.E., Steinberg, S.F., 2016. Protein kinase C mechanisms that contribute to cardiac remodelling. *Clin Sci (Lond)* 130, 1499–1510.

Newton, A.C., 2018. Protein Kinase C: Perfectly Balanced. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 53, 208–230.

Ng, Y.-S., Wardemann, H., Chelnis, J., Cunningham-Rundles, C., Meffre, E., 2004. Bruton's Tyrosine Kinase Is Essential for Human B Cell Tolerance. *Journal of Experimental Medicine* 200, 927–934.

Nitschke, L., Carsetti, R., Ocker, B., Köhler, G., Lamers, M.C., 1997. CD22 is a negative regulator of B-cell receptor signalling. *Curr Biol* 7, 133–143.

Nieuwenhove, E.V., Garcia-Perez, J.E., Helsen, C., Rodriguez, P.D., Schouwenburg, P.A. van, Dooley, J., Schlenner, S., Burg, M. van der, Verhoeyen, E., Gijsbers, R., Fietze, S., Schjerven, H., Meyts, I., Claessens, F., Humblet-Baron, S., Wouters, C., Liston, A., 2018. A kindred with mutant IKAROS and autoimmunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 142, 699-702.e12.

Niewold, T.B., 2008. Interferon Alpha-Induced Lupus Proof of Principle. *J Clin Rheumatol* 14, 131–132.

Notarangelo, L.D., Kim, M.-S., Walter, J.E., Lee, Y.N., 2016. Human RAG mutations: biochemistry and clinical implications. *Nat Rev Immunol* 16, 234–246.

Nowling, T.K., Gilkeson, G.S., 2011. Mechanisms of tissue injury in lupus nephritis. *Arthritis Research & Therapy* 13, 250.

Nutt, S.L., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M., Corcoran, L.M., 2015. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol* 15, 160–171.

Nyati, K.K., Nyati, R., 2013. Role of *Campylobacter jejuni* Infection in the Pathogenesis of Guillain-Barré Syndrome: An Update. *BioMed Research International* 2013, e852195.

O'Neill, S.K., Getahun, A., Gauld, S.B., Merrell, K.T., Tamir, I., Smith, M.J., Dal Porto, J.M., Li, Q.-Z., Cambier, J.C., 2011. Monophosphorylation of CD79a and CD79b ITAM motifs initiates a SHIP-1 phosphatase-mediated inhibitory signaling cascade required for B cell anergy. *Immunity* 35, 746–756.

Omarjee, O., Picard, C., Frachette, C., Moreews, M., Rieux-Laucat, F., Soulas-Sprauel, P., Viel, S., Lega, J.-C., Bader-Meunier, B., Walzer, T., Mathieu, A.-L., Cimaz, R., Belot, A., 2019. Monogenic lupus: Dissecting heterogeneity. *Autoimmunity Reviews* 18, 102361.

Oparina, N., Martínez-Bueno, M., Alarcón-Riquelme, M.E., 2019. An update on the genetics of systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 31, 659–668.

Ou, P., Stanek, A., Huan, Z., Roman, C.A.J., Huan, C., 2021. SMS2 deficiency impairs PKC δ -regulated B cell tolerance in the germinal center. *Cell Reports* 36, 109624.

Oubelkacem, N., Khammar, Z., Atassi, M., Berrady, R., Rabhi, S., Bono, W., 2015. L'atteinte hématologique au cours du lupus érythémateux systémique. *La Revue de Médecine Interne*, 72e CONGRÈS DE LA SOCIÉTÉ NATIONALE FRANÇAISE DE MÉDECINE INTERNE, Tours, 10-12 décembre 2015 36, A147.

Palm, A.-K.E., Kleinau, S., 2021. Marginal zone B cells: From housekeeping function to autoimmunity? *Journal of Autoimmunity* 119, 102627.

Parihar, S.P., Ozturk, M., Marakalala, M.J., Loots, D.T., Hurdal, R., Maasdorp, D.B., Van Reenen, M., Zak, D.E., Darboe, F., Penn-Nicholson, A., Hanekom, W.A., Leitges, M., Scriba, T.J., Guler, R., Brombacher, F., 2018. Protein kinase C-delta (PKC δ), a marker of inflammation and tuberculosis disease progression in humans, is important for optimal macrophage killing effector functions and survival in mice. *Mucosal Immunol* 11, 496–511.

Pieper, K., Grimbacher, B., Eibel, H., 2013. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol* 131, 959–971.

Pillai, S., Mattoo, H., Cariappa, A., 2011. B cells and Autoimmunity. *Current Opinion in Immunology* 23, 721.

Pirone, D.M., Liu, W.F., Ruiz, S.A., Gao, L., Raghavan, S., Lemmon, C.A., Romer, L.H., Chen, C.S., 2006. An inhibitory role for FAK in regulating proliferation: a link between limited adhesion and RhoA-ROCK signaling. *Journal of Cell Biology* 174, 277–288.

Poon, I.K.H., Lucas, C.D., Rossi, A.G., Ravichandran, K.S., 2014. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat Rev Immunol* 14, 166–180.

Ramantani, G., Kohlhase, J., Hertzberg, C., Innes, A.M., Engel, K., Hunger, S., Borozdin, W., Mah, J.K., Ungerath, K., Walkenhorst, H., Richardt, H.-H., Buckard, J., Bevo, A., Siegel, C., von Stülpnagel, C., Ikonomidou, C., Thomas, K., Proud, V., Niemann, F., Wiczorek, D., Häusler, M., Niggemann, P., Baltaci, V., Conrad, K., Lebon, P., Lee-Kirsch, M.A., 2010. Expanding the phenotypic spectrum of lupus erythematosus in Aicardi-Goutières syndrome. *Arthritis & Rheumatism* 62, 1469–1477.

Rees, F., Doherty, M., Grainge, M.J., Lanyon, P., Zhang, W., 2017. The worldwide incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus: a systematic review of epidemiological studies. *Rheumatology (Oxford)* 56, 1945–1961.

Reeves, W.H., Xu, Y., Zhuang, H., Li, Y., Yang, L., 2011. Chapter 13 - Origins of Antinuclear Antibodies, in: Lahita, R.G. (Ed.), *Systemic Lupus Erythematosus (Fifth Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. 213–233.

Reijm, S., Kissel, T., Toes, R. e. m., 2020. Checkpoints controlling the induction of B cell mediated autoimmunity in human autoimmune diseases. *European Journal of Immunology* 50, 1885–1894.

Reininger, L., Radaszkiewicz, T., Kosco, M., Melchers, F., Rolink, A.G., 1992. Development of autoimmune disease in SCID mice populated with long-term “in vitro” proliferating (NZB x NZW)F1 pre-B cells. *J Exp Med* 176, 1343–1353.

Rezk, S.A., Nathwani, B.N., Zhao, X., Weiss, L.M., 2013. Follicular dendritic cells: origin, function, and different disease-associated patterns. *Human Pathology* 44, 937–950.

Rieux-Laucat, F., 2017. What’s up in the ALPS. *Curr Opin Immunol* 49, 79–86.

Roco, J.A., Mesin, L., Binder, S.C., Nefzger, C., Gonzalez-Figueroa, P., Canete, P.F., Ellyard, J., Shen, Q., Robert, P.A., Cappello, J., Vohra, H., Zhang, Y., Nowosad, C.R., Schiepers, A., Corcoran, L.M., Toellner, K.-M., Polo, J., Meyer-Hermann, M., Victora, G., Vinuesa, C.G., 2019. Class Switch Recombination Occurs Infrequently in Germinal Centers. *Immunity* 51, 337-350.e7.

Rodero, M.P., Crow, Y.J., 2016. Type I interferon-mediated monogenic autoinflammation: The type I interferonopathies, a conceptual overview. *Journal of Experimental Medicine* 213, 2527–2538.

Rodero, M.P., Tesser, A., Bartok, E., Rice, G.I., Della Mina, E., Depp, M., Beitz, B., Bondet, V., Cagnard, N., Duffy, D., Dussiot, M., Frémond, M.-L., Gattorno, M., Guillem, F., Kitabayashi, N., Porcheray, F., Rieux-Laucat, F., Seabra, L., Uggenti, C., Volpi, S., Zeef, L.A.H., Alyanakian, M.-A., Beltrand, J., Bianco, A.M., Boddaert, N., Brouzes, C., Candon, S., Caorsi, R., Charbit, M., Fabre, M., Faletra, F., Girard, M., Harroche, A., Hartmann, E., Lasne, D., Marcuzzi, A., Neven, B., Nitschke, P., Pascreau, T., Pastore, S., Picard, C., Picco, P., Piscianz, E., Polak, M., Quartier, P., Rabant, M., Stocco, G., Taddio, A., Uettwiller, F., Valencic, E., Voizzi, D., Hartmann, G., Barchet, W., Hermine, O., Bader-Meunier, B., Tommasini, A., Crow, Y.J., 2017. Type I interferon-mediated autoinflammation due to DNase II deficiency. *Nat Commun* 8, 2176.

Romberg, N., Chamberlain, N., Saadoun, D., Gentile, M., Kinnunen, T., Ng, Y.S., Virdee, M., Menard, L., Cantaert, T., Morbach, H., Rachid, R., Martinez-Pomar, N., Matamoros, N., Geha, R., Grimbacher, B., Cerutti, A., Cunningham-Rundles, C., Meffre, E., 2013. CVID-associated TACI mutations affect autoreactive B cell selection and activation. *J Clin Invest* 123, 4283–4293.

Rothstein, T.L., Holodick, N.E., 2016. Activation of B-1 Cells, in: Ratcliffe, M.J.H. (Ed.), *Encyclopedia of Immunobiology*. Academic Press, Oxford, pp. 237–243.

Rowland, S.L., DePersis, C.L., Torres, R.M., Pelanda, R., 2010. Ras activation of Erk restores impaired tonic BCR signaling and rescues immature B cell differentiation. *J Exp Med* 207, 607–621.

Rubin, S.J.S., Bloom, M.S., Robinson, W.H., 2019. B cell checkpoints in autoimmune rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 15, 303–315.

Rubtsova, K., Rubtsov, A.V., Thurman, J.M., Mennona, J.M., Kappler, J.W., Marrack, P., 2017. B cells expressing the transcription factor T-bet drive lupus-like autoimmunity. *J Clin Invest* 127, 1392–1404.

Ruiz-Irastorza, G., Bertsias, G., 2020. Treating systemic lupus erythematosus in the 21st century: new drugs and new perspectives on old drugs. *Rheumatology (Oxford)* 59, v69–v81.

Russell, D.M., Dembić, Z., Morahan, G., Miller, J.F.A.P., Bürki, K., Nemazee, D., 1991. Peripheral deletion of self-reactive B cells. *Nature* 354, 308–311.

Russell, L., John, S., Cullen, J., Luo, W., Shlomchik, M.J., Garrett-Sinha, L.A., 2015. Requirement for Transcription Factor Ets1 in B Cell Tolerance to Self-Antigens. *J Immunol* 195, 3574–3583.

Sachinidis, A., Xanthopoulos, K., Garyfallos, A., 2020. Age-Associated B Cells (ABCs) in the Prognosis, Diagnosis and Therapy of Systemic Lupus Erythematosus (SLE). *Mediterr J Rheumatol* 31, 311–318.

Salas, A., Hernandez-Rocha, C., Duijvestein, M., Faubion, W., McGovern, D., Vermeire, S., Vetrano, S., Vande Casteele, N., 2020. JAK–STAT pathway targeting for the treatment of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 17, 323–337.

Salzer, E., Santos-Valente, E., Klaver, S., Ban, S.A., Emminger, W., Prengemann, N.K., Garncarz, W., Müllauer, L., Kain, R., Boztug, H., Heitger, A., Arbeiter, K., Eitelberger, F., Seidel, M.G., Holter, W., Pollak, A., Pickl, W.F., Förster-Waldl, E., Boztug, K., 2013. B-cell deficiency and severe autoimmunity caused by deficiency of protein kinase C δ . *Blood* 121, 3112–3116.

Salzer, E., Santos-Valente, E., Keller, B., Warnatz, K., Boztug, K., 2016. Protein Kinase C δ : a Gatekeeper of Immune Homeostasis. *J Clin Immunol* 36, 631–640.

Sanchez, G.A.M., Reinhardt, A., Ramsey, S., Wittkowski, H., Hashkes, P.J., Berkun, Y., Schalm, S., Murias, S., Dare, J.A., Brown, D., Stone, D.L., Gao, L., Klausmeier, T., Foell, D., Jesus, A.A. de, Chapelle, D.C., Kim, H., Dill, S., Colbert, R.A., Failla, L., Kost, B., O'Brien, M., Reynolds, J.C., Folio, L.R., Calvo, K.R., Paul, S.M., Weir, N., Brofferio, A., Soldatos, A., Biancotto, A., Cowen, E.W., Digiovanna, J.J., Gadina, M., Lipton, A.J.,

Hadigan, C., Holland, S.M., Fontana, J., Alawad, A.S., Brown, R.J., Rother, K.I., Heller, T., Brooks, K.M., Kumar, P., Brooks, S.R., Waldman, M., Singh, H.K., Nickeleit, V., Silk, M., Prakash, A., Janes, J.M., Ozen, S., Wakim, P.G., Brogan, P.A., Macias, W.L., Goldbach-Mansky, R., 2018. JAK1/2 inhibition with baricitinib in the treatment of autoinflammatory interferonopathies. *J Clin Invest* 128, 3041–3052.

Sang, A., Zheng, Y.-Y., Morel, L., 2014. Contributions of B cells to lupus pathogenesis. *Mol Immunol* 62, 329–338.

Sathivageesan, S., Rathnam, S., 2021. The LE Cell—A Forgotten Entity. *Indian J Nephrol* 31, 71–72.

Satoh, M., Reeves, W.H., 1994. Induction of lupus-associated autoantibodies in BALB/c mice by intraperitoneal injection of pristane. *Journal of Experimental Medicine* 180, 2341–2346.

Satoh, M., Richards, H.B., Shaheen, V.M., Yoshida, H., Shaw, M., Naim, J.O., Wooley, P.H., Reeves, W.H., 2000. Widespread susceptibility among inbred mouse strains to the induction of lupus autoantibodies by pristane. *Clinical and Experimental Immunology* 121, 399.

Sauer, S., Bruno, L., Hertweck, A., Finlay, D., Leleu, M., Spivakov, M., Knight, Z.A., Cobb, B.S., Cantrell, D., O'Connor, E., Shokat, K.M., Fisher, A.G., Merckenschlager, M., 2008. T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 7797–7802.

Scheel-Toellner, D., Pilling, D., Akbar, A.N., Hardie, D., Lombardi, G., Salmon, M., Lord, J.M., 1999. Inhibition of T cell apoptosis by IFN- β rapidly reverses nuclear translocation of protein kinase C- δ . *European Journal of Immunology* 29, 2603–2612.

Schepp, J., Bulashevskaya, A., Mannhardt-Laakmann, W., Cao, H., Yang, F., Seidl, M., Kelly, S., Hershfield, M., Grimbacher, B., 2016. Deficiency of Adenosine Deaminase 2 Causes Antibody Deficiency. *J Clin Immunol* 36, 179–186.

Schiemann, B., Gommerman, J.L., Vora, K., Cachero, T.G., Shulga-Morskaya, S., Dobles, M., Frew, E., Scott, M.L., 2001. An Essential Role for BAFF in the Normal Development of B Cells Through a BCMA-Independent Pathway. *Science* 293, 2111–2114.

Schjerven, H., McLaughlin, J., Arenzana, T.L., Fietze, S., Cheng, D., Wadsworth, S., Lawson, G.W., Bensing, S.J., Farnham, P.J., Witte, O.N., Smale, S.T., 2013. Differential regulation of lymphopoiesis and leukemogenesis by individual zinc fingers of Ikaros. *Nat Immunol* 14, 1073–1083.

Schweighoffer, E., Vanes, L., Nys, J., Cantrell, D., McCleary, S., Smithers, N., Tybulewicz, V.L.J., 2013. The BAFF Receptor Transduces Survival Signals by Co-opting the B Cell Receptor Signaling Pathway. *Immunity* 38, 475–488.

Schwegmann, A., Guler, R., Cutler, A.J., Arendse, B., Horsnell, W.G.C., Flemming, A., Kottmann, A.H., Ryan, G., Hide, W., Leitges, M., Seoighe, C., Brombacher, F., 2007. Protein kinase C δ is essential for optimal macrophage-mediated phagosomal containment of *Listeria monocytogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 16251–16256.

Schwickert, T.A., Tagoh, H., Schindler, K., Fischer, M., Jaritz, M., Busslinger, M., 2019. Ikaros prevents autoimmunity by controlling energy and Toll-like receptor signaling in B cells. *Nat Immunol* 20, 1517–1529.

Scofield, R.H., Oates, J.C., 2009. The place of William Osler in the description of systemic lupus erythematosus. *Am J Med Sci* 338, 409–412.

Scuron, M.D., Fay, B.L., Connell, A.J., Oliver, J., Smith, P.A., 2021. The PI3K δ inhibitor piasalisib ameliorates pathology and reduces autoantibody formation in preclinical models of systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *International Immunopharmacology* 98, 107904.

Seo, S., Fields, M.L., Buckler, J.L., Reed, A.J., Mandik-Nayak, L., Nish, S.A., Noelle, R.J., Turka, L.A., Finkelman, F.D., Caton, A.J., Erikson, J., 2002. The Impact of T Helper and T Regulatory Cells on the Regulation of Anti-Double-Stranded DNA B Cells. *Immunity* 16, 535–546.

Sellars, M., Reina-San-Martin, B., Kastner, P., Chan, S., 2009. Ikaros controls isotype selection during immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med* 206, 1073–1087.

Sellars, M., Kastner, P., Chan, S., 2011. Ikaros in B cell development and function. *World J Biol Chem* 2, 132–139.

Selvaraja, M., Chin, V.K., Abdullah, M., Arip, M., Amin-Nordin, S., 2021. HLA-DRB1*04 as a Risk Allele to Systemic Lupus Erythematosus and Lupus Nephritis in the Malay Population of Malaysia. *Frontiers in Medicine* 7.

Seyfizadeh, Narges, Seyfizadeh, Nayer, Hasenkamp, J., Huerta-Yepez, S., 2016. A molecular perspective on rituximab: A monoclonal antibody for B cell non Hodgkin lymphoma and other affections. *Crit Rev Oncol Hematol* 97, 275–290.

Shah, S., Wu, E., Rao, V.K., 2014. Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome: an update and review of the literature. *Curr Allergy Asthma Rep* 14, 462.

Sharifinejad, N., Azizi, G., Behniafard, N., Zaki-Dizaji, M., Jamee, M., Yazdani, R., Abolhassani, H., Aghamohammadi, A., 2022. Protein Kinase C-Delta Defect in Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome-Like Disease: First Case from the National Iranian Registry and Review of the Literature. *Immunol Invest* 51, 331–342.

Shen, N., Fu, Q., Deng, Y., Qian, X., Zhao, J., Kaufman, K.M., Wu, Y.L., Yu, C.Y., Tang, Y., Chen, J.-Y., Yang, W., Wong, M., Kawasaki, A., Tsuchiya, N., Sumida, T., Kawaguchi, Y., Howe, H.S., Mok, M.Y., Bang, S.-Y., Liu, F.-L., Chang, D.-M., Takasaki, Y., Hashimoto, H., Harley, J.B., Guthridge, J.M., Grossman, J.M., Cantor, R.M., Song, Y.W., Bae, S.-C., Chen, S., Hahn, B.H., Lau, Y.L., Tsao, B.P., 2010. Sex-specific association of X-linked Toll-like receptor 7 (TLR7) with male systemic lupus erythematosus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 15838–15843.

Shen, P., Fillatreau, S., 2015. Antibody-independent functions of B cells: a focus on cytokines. *Nat Rev Immunol* 15, 441–451.

Shlomchik, M.J., Madaio, M.P., Ni, D., Trounstein, M., Huszar, D., 1994. The role of B cells in *lpr/lpr*-induced autoimmunity. *Journal of Experimental Medicine* 180, 1295–1306.

Shoham, T., Rajapaksa, R., Boucheix, C., Rubinstein, E., Poe, J.C., Tedder, T.F., Levy, S., 2003. The tetraspanin CD81 regulates the expression of CD19 during B cell development in a postendoplasmic reticulum compartment. *J Immunol* 171, 4062–4072.

Shokat, K.M., Goodnow, C.C., 1995. Antigen-induced B-cell death and elimination during germinal-centre immune responses. *Nature* 375, 334–338.

Sicard, T., Kassardjian, A., Julien, J.-P., 2020. B cell targeting by molecular adjuvants for enhanced immunogenicity. *Expert Review of Vaccines* 19, 1023–1039.

Simoni, L., Presumey, J., van der Poel, C.E., Castrillon, C., Chang, S.E., Utz, P.J., Carroll, M.C., 2020. Complement C4A Regulates Autoreactive B Cells in Murine Lupus. *Cell Reports* 33, 108330.

Sisirak, V., Sally, B., D'Agati, V., Martinez-Ortiz, W., Özçakar, Z.B., David, J., Rashidfarrokhi, A., Yeste, A., Panea, C., Chida, A.S., Bogunovic, M., Ivanov, I.I., Quintana, F.J., Sanz, I., Elkon, K.B., Tekin, M., Yalçinkaya, F., Cardozo, T.J., Clancy, R.M., Buyon, J.P., Reizis, B., 2016. Digestion of Chromatin in Apoptotic Cell Microparticles Prevents Autoimmunity. *Cell* 166, 88–101.

Smith, K.G.C., Clatworthy, M.R., 2010. FcγRIIB in autoimmunity and infection: evolutionary and therapeutic implications. *Nat Rev Immunol* 10, 328–343.

Song, H., Cerny, J., 2003. Functional Heterogeneity of Marginal Zone B Cells Revealed by Their Ability to Generate Both Early Antibody-forming Cells and Germinal Centers with Hypermutation and Memory in Response to a T-dependent Antigen. *J Exp Med* 198, 1923–1935.

Srinivasan, L., Sasaki, Y., Calado, D.P., Zhang, B., Paik, J.H., DePinho, R.A., Kutok, J.L., Kearney, J.F., Otipoby, K.L., Rajewsky, K., 2009. PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival. *Cell* 139, 573–586.

Starokadomskyy, P., Gemelli, T., Rios, J.J., Xing, C., Wang, R.C., Li, H., Pokatayev, V., Dozmorov, I., Khan, S., Miyata, N., Fraile, G., Raj, P., Xu, Zhe, Xu, Zigang, Ma, L., Lin, Z., Wang, H., Yang, Y., Ben-Amitai, D., Orenstein, N., Mussaffi, H., Baselga, E., Tadini, G., Grunebaum, E., Sarajlija, A., Krzewski, K., Wakeland, E.K., Yan, N., de la Morena, M.T., Zinn, A.R., Burstein, E., 2016. DNA polymerase-α regulates type I interferon activation through cytosolic RNA:DNA synthesis. *Nat Immunol* 17, 495–504.

Steinberg, S.F., 2004. Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase Cδ. *Biochemical Journal* 384, 449–459.

Sullivan, K.E., Piliero, L.M., Dharia, T., Goldman, D., Petri, M.A., 2000. 3' polymorphisms of ETS1 are associated with different clinical phenotypes in SLE. *Human Mutation* 16, 49–53.

Susa, K.J., Seegar, T.C., Blacklow, S.C., Kruse, A.C., 2020. A dynamic interaction between CD19 and the tetraspanin CD81 controls B cell co-receptor trafficking. *eLife* 9, e52337.

Suthers, A.N., Sarantopoulos, S., 2017. TLR7/TLR9- and B Cell Receptor-Signaling Crosstalk: Promotion of Potentially Dangerous B Cells. *Frontiers in Immunology* 8.

Steinberg, B.J., Smathers, P.A., Frederiksen, K., Steinberg, A.D., 1982. Ability of the *xid* gene to prevent autoimmunity in (NZB X NZW)F1 mice during the course of their natural history, after polyclonal stimulation, or following immunization with DNA. *Journal of Clinical Investigation* 70, 587.

Steinberg, E.B., Santoro, T.J., Chused, T.M., Smathers, P.A., Steinberg, A.D., 1983. Studies of congenic MRL-lpr/lpr.xid mice. *J Immunol* 131, 2789–2795.

Stetson, D.B., Ko, J.S., Heidmann, T., Medzhitov, R., 2008. *Trex1* Prevents Cell-Intrinsic Initiation of Autoimmunity. *Cell* 134, 587–598.

Sturfelt, G., Truedsson, L., 2012. Complement in the immunopathogenesis of rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol* 8, 458–468.

Sumitomo, M., Ohba, M., Asakuma, J., Asano, Takako, Kuroki, T., Asano, Tomohiko, Hayakawa, M., 2002. Protein kinase C δ amplifies ceramide formation via mitochondrial signaling in prostate cancer cells. *J Clin Invest* 109, 827–836.

Taher, T.E., Parikh, K., Flores-Borja, F., Mletzko, S., Isenberg, D.A., Peppelenbosch, M.P., Mageed, R.A., 2010. Protein phosphorylation and kinome profiling reveal altered regulation of multiple signaling pathways in B lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 62, 2412–2423.

Tartaglia, M., Kalidas, K., Shaw, A., Song, X., Musat, D.L., van der Burgt, I., Brunner, H.G., Bertola, D.R., Crosby, A., Ion, A., Kucherlapati, R.S., Jeffery, S., Patton, M.A., Gelb, B.D., 2002. PTPN11 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, genotype-phenotype correlation, and phenotypic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 70, 1555–1563.

Teodorovic, L.S., Babolin, C., Rowland, S.L., Greaves, S.A., Baldwin, D.P., Torres, R.M., Pelanda, R., 2014. Activation of Ras overcomes B-cell tolerance to promote differentiation of autoreactive B cells and production of autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E2797–E2806.

Thibult, M.-L., Mamessier, E., Gertner-Dardenne, J., Pastor, S., Just-Landi, S., Xerri, L., Chetaille, B., Olive, D., 2013. PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation. *Int Immunol* 25, 129–137.

Thien, M., Phan, T.G., Gardam, S., Amesbury, M., Basten, A., Mackay, F., Brink, R., 2004. Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. *Immunity* 20, 785–798.

Toubiana, J., Okada, S., Hiller, J., Oleastro, M., Lagos Gomez, M., Aldave Becerra, J.C., Ouachée-Chardin, M., Fouyssac, F., Girisha, K.M., Etzioni, A., Van Montfrans, J., Camcioglu, Y., Kerns, L.A., Belohradsky, B., Blanche, S., Bousfiha, A., Rodriguez-Gallego, C., Meyts, I., Kisand, K., Reichenbach, J., Renner, E.D., Rosenzweig, S., Grimbacher, B., van de Veerdonk, F.L., Traidl-Hoffmann, C., Picard, C., Marodi, L., Morio, T., Kobayashi, M., Lilic, D., Milner, J.D., Holland, S., Casanova, J.-L., Puel, A., 2016. Heterozygous STAT1 gain-of-function mutations underlie an unexpectedly broad clinical phenotype. *Blood* 127, 3154–3164.

Tsokos, G.C., 2011. Systemic Lupus Erythematosus. *New England Journal of Medicine* 365, 2110–2121.

Tsubata, T., 2019. CD72 is a Negative Regulator of B Cell Responses to Nuclear Lupus Self-antigens and Development of Systemic Lupus Erythematosus. *Immune Netw* 19, e1.

Truedsson, L., Bengtsson, A.A., Sturfelt, G., 2007. Complement deficiencies and systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 40, 560–566.

Tusseau, M., Lovšin, E., Samaille, C., Pescarmona, R., Mathieu, A.-L., Maggio, M.-C., Selmanović, V., Debeljak, M., Dachy, A., Novljan, G., Janin, A., Januel, L., Gibier, J.-B., Chopin, E., Rouvet, I., Goncalves, D., Fabien, N., Rice, G.I., Lesca, G., Labalme, A., Romagnani, P., Walzer, T., Viel, S., Perret, M., Crow, Y.J., Avčin, T., Cimaz, R., Belot, A., 2022. DNASE1L3 deficiency, new phenotypes, and evidence for a transient type I IFN signaling. *J Clin Immunol*.

Uddin, S., Sassano, A., Deb, D.K., Verma, A., Majchrzak, B., Rahman, A., Malik, A.B., Fish, E.N., Platanias, L.C., 2002. Protein Kinase C- δ (PKC- δ) Is Activated by Type I Interferons and Mediates Phosphorylation of Stat1 on Serine 727*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 14408–14416.

Urushihara, M., Kagami, S., Yasutomo, K., Ito, M., Kondo, S., Kitamura, A., Malm, D., Klenow, H., Nilssen, O., Kuroda, Y., 2004. Sisters with alpha-mannosidosis and systemic lupus erythematosus. *Eur J Pediatr* 163, 192–195.

Vazquez, M.I., Catalan-Dibene, J., Zlotnik, A., 2015. B cells responses and cytokine production are regulated by their immune microenvironment. *Cytokine* 74, 318–326.

Veillette, A., Latour, S., Davidson, D., 2002. Negative Regulation of Immunoreceptor Signaling. *Annual Review of Immunology* 20, 669–707.

Verkoczy, L., Duong, B., Skog, P., Ait-Azzouzene, D., Puri, K., Vela, J.L., Nemazee, D., 2007. Basal B Cell Receptor-Directed Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Turns Off RAGs and Promotes B Cell-Positive Selection. *The Journal of Immunology* 178, 6332–6341.

Villarroya-Beltri, C., Guerra, S., Sánchez-Madrid, F., 2017. ISGylation – a key to lock the cell gates for preventing the spread of threats. *Journal of Cell Science* 130, 2961–2969.

Walter, J.E., Lo, M.S., Kis-Toth, K., Tirosh, I., Frugoni, F., Lee, Y.N., Csomos, K., Chen, K., Pillai, S., Dunham, J., Tsokos, G.C., Luning Prak, E.T., Notarangelo, L.D., 2015. Impaired receptor editing and heterozygous RAG2 mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and erosive arthritis. *J Allergy Clin Immunol* 135, 272–273.

Wang, J.-H., Nichogiannopoulou, A., Wu, L., Sun, L., Sharpe, A.H., Bigby, M., Georgopoulos, K., 1996. Selective Defects in the Development of the Fetal and Adult Lymphoid System in Mice with an Ikaros Null Mutation. *Immunity* 5, 537–549.

Wang, Y., Liu, J., Burrows, P.D., Wang, J.-Y., 2020. B Cell Development and Maturation. *Adv Exp Med Biol* 1254, 1–22.

Wang, Y., Wang, F., Zhang, X., 2021. STING-associated vasculopathy with onset in infancy: a familial case series report and literature review. *Ann Transl Med* 9, 176.

Winkelstein, J.A., Marino, M.C., Ochs, H., Fuleihan, R., Scholl, P.R., Geha, R., Stiehm, E.R., Conley, M.E., 2003. The X-linked hyper-IgM syndrome: clinical and immunologic features of 79 patients. *Medicine (Baltimore)* 82, 373–384

Wardemann, H., Nussenzweig, M.C., 2007. B-Cell Self-Tolerance in Humans, in: *Advances in Immunology*. Academic Press, pp. 83–110.

Wim Ang, C., Jacobs, B.C., Laman, J.D., 2004. The Guillain–Barré syndrome: a true case of molecular mimicry. *Trends in Immunology* 25, 61–66.

Winkler, T.H., Mårtensson, I.-L., 2018. The Role of the Pre-B Cell Receptor in B Cell Development, Repertoire Selection, and Tolerance. *Frontiers in Immunology* 9.

Winter, G., Milstein, C., 1991. Man-made antibodies. *Nature* 349, 293–299.

Witte, T., 2008. IgM Antibodies Against dsDNA in SLE. *Clinic Rev Allerg Immunol* 34, 345–347.

Wojcik, H., Griffiths, E., Staggs, S., Hagman, J., Winandy, S., 2007. Expression of a non-DNA-binding Ikaros isoform exclusively in B cells leads to autoimmunity but not leukemogenesis. *European Journal of Immunology* 37, 1022–1032.

Wolf, S.J., Estadt, S.N., Gudjonsson, J.E., Kahlenberg, J.M., 2018. Human and Murine Evidence for Mechanisms Driving Autoimmune Photosensitivity. *Frontiers in Immunology* 9.

Wong, C.K., Wong, P.T.Y., Tam, L.S., Li, E.K., Chen, D.P., Lam, C.W.K., 2009. Activation Profile of Intracellular Mitogen-Activated Protein Kinases in Peripheral Lymphocytes of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J Clin Immunol* 29, 738.

Workman, P., Clarke, P.A., Raynaud, F.I., van Montfort, R.L.M., 2010. Drugging the PI3 Kinome: From Chemical Tools to Drugs in the Clinic. *Cancer Research* 70, 2146–2157.

Wu, Y., El Shikh, M.E.M., El Sayed, R.M., Best, A.M., Szakal, A.K., Tew, J.G., 2009. IL-6 produced by immune complex-activated follicular dendritic cells promotes germinal center reactions, IgG responses and somatic hypermutation. *International Immunology* 21, 745–756.

Wu, T., Qin, X., Kurepa, Z., Kumar, K.R., Liu, K., Kanta, H., Zhou, X.J., Satterthwaite, A.B., Davis, L.S., Mohan, C., 2007. Shared signaling networks active in B cells isolated from genetically distinct mouse models of lupus. *J Clin Invest* 117, 2186–2196.

Wu, X., Ye, Y., Niu, J., Li, Y., Li, X., You, X., Chen, H., Zhao, L., Zeng, X., Zhang, F., Tang, F., He, W., Cao, X., Zhang, X., Lipsky, P.E., 2014. Defective PTEN regulation contributes to B cell hyperresponsiveness in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 6, 246ra99.

Xu, Y., Fairfax, K., Light, A., Huntington, N.D., Tarlinton, D.M., 2014. CD19 differentially regulates BCR signalling through the recruitment of PI3K. *Autoimmunity* 47, 430–437.

Yaniv, G., Twig, G., Shor, D.B.-A., Furer, A., Sherer, Y., Mozes, O., Komisar, O., Slonimsky, E., Klang, E., Lotan, E., Welt, M., Marai, I., Shina, A., Amital, H., Shoenfeld, Y., 2015. A volcanic explosion of autoantibodies in systemic lupus erythematosus: A diversity of 180 different antibodies found in SLE patients. *Autoimmunity Reviews* 14, 75–79.

Yasutomo, K., Horiuchi, T., Kagami, S., Tsukamoto, H., Hashimura, C., Urushihara, M., Kuroda, Y., 2001. Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 28, 313–314.

Yau, I.W., Cato, M.H., Jellusova, J., Mendoza, T.H. de, Brink, R., Rickert, R.C., 2013. Censoring of Self-Reactive B Cells by Follicular Dendritic Cell–Displayed Self-Antigen. *The Journal of Immunology* 191, 1082–1090.

Yokogawa, M., Takaishi, M., Nakajima, K., Kamijima, R., Fujimoto, C., Kataoka, S., Terada, Y., Sano, S., 2014. Epicutaneous Application of Toll-like Receptor 7 Agonists Leads to Systemic Autoimmunity in Wild-Type Mice: A New Model of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis & Rheumatology* 66, 694–706.

Yurasov, S., Wardemann, H., Hammersen, J., Tsuiji, M., Meffre, E., Pascual, V., Nussenzweig, M.C., 2005. Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *Journal of Experimental Medicine* 201, 703–711.

Zeng, D., Lee, M.K., Tung, J., Brendolan, A., Strober, S., 2000. Cutting edge: a role for CD1 in the pathogenesis of lupus in NZB/NZW mice. *J Immunol* 164, 5000–5004.

Zhao, Z., Weinstein, E., Tuzova, M., Davidson, A., Mundel, P., Marambio, P., Putterman, C., 2005. Cross-reactivity of human lupus anti-DNA antibodies with alpha-actinin and nephritogenic potential. *Arthritis Rheum* 52, 522–530.

Zhao, M., Xia, L., Chen, G.-Q., 2012. Protein kinase cδ in apoptosis: a brief overview. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 60, 361–372.

Zhou, X.-J., Lv, J.-C., Cheng, W.-R., Yu, L., Zhao, M.-H., Zhang, H., 2010. Association of TLR9 gene polymorphisms with lupus nephritis in a Chinese Han population. *Clin Exp Rheumatol* 28, 397–400.

Zhou, Y., Zhang, Y., Han, J., Yang, M., Zhu, J., Jin, T., 2020. Transitional B cells involved in autoimmunity and their impact on neuroimmunological diseases. *Journal of Translational Medicine* 18, 131.