



HAL
open science

Néogenèse lymphoïde au cours du lupus : mécanismes fondamentaux et pistes thérapeutiques

Romain Veber

► **To cite this version:**

Romain Veber. Néogenèse lymphoïde au cours du lupus : mécanismes fondamentaux et pistes thérapeutiques. Immunologie. Université de Strasbourg, 2018. Français. NNT : 2018STRAJ092 . tel-04416249

HAL Id: tel-04416249

<https://theses.hal.science/tel-04416249v1>

Submitted on 25 Jan 2024

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

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

ÉCOLE DOCTORALE Sciences de la vie et de la santé

CNRS UPR3572 I2CT

THÈSE présentée par :

Romain WEBER

soutenue le : 14 décembre 2018

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Immunologie

**Néogenèse lymphoïde au cours du lupus :
mécanismes fondamentaux et pistes
thérapeutiques**

THÈSE dirigée par :

Mme DUMORTIER Hélène

Directrice de recherche, CNRS UPR3572, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mr BALABANIAN Karl

Chargé de recherche, INSERM UMRS996, Université Paris-Sud

Mme AME-THOMAS Patricia

MCUPH, Faculté de Médecine, Université de Rennes 1

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mr GEORGEL Philippe

Professeur, INSERM UMRS1109, Université de Strasbourg

Remerciements

Je tiens à remercier dans un premier temps mes membres de jury, le Dr Patricia AMETHOMAS, le Dr Karl BALABANIAN et le Pr Philippe GEORGEL qui ont accepté de prendre le temps d'évaluer mon travail de thèse.

Une thèse ne se réalise pas seul et j'ai pu compter durant ces trois années sur le soutien de nombreuses personnes.

Tout d'abord je voudrai remercier chaleureusement ma directrice de thèse Hélène DUMORTIER. Tout a commencé en première année de master où je devais rendre un rapport biblio et tu étais ma tutrice. Dès notre premier entretien tu as réussi à m'arracher quelques mots, ce qui n'est pas donné à tout le monde étant donné mon côté très peu loquace. J'étais à la recherche d'un stage de M2 et tu m'as tellement bien vendu le sujet que je me suis dit « c'est celui-là que je veux ! ». Bien entendu ta grande gentillesse n'y était pas pour rien non plus car il faut se sentir en confiance avant de se lancer pour plusieurs années et ce fut le cas. Je te remercie pour ta gentillesse, ta disponibilité, tes conseils et ton efficacité sur les dernières semaines de rédaction ! Merci d'également d'avoir supporté mon côté parfois un peu extravagant (que veux-tu, je ne fais jamais les choses à moitié) et de m'avoir donné et confirmé l'envie de continuer dans cette voie. Enfin bref merci pour ces 4 années et quelques !

Bien entendu, je voudrais remercier tous les autres membres de l'équipe, passés et présents : Fanny, Jacques-Eric, Hayet, Carole, Matthieu, Cécile, Renaud, Sophia, Flora, Pierre-Marie, Marie-Charlotte, Lucie, Cerise et Elisa notre nouvelle venue ! Vous avez été (et vous l'êtes encore) une équipe du tonnerre et cette petite ambiance familiale faisait plaisir ! Mentions spéciales à Hayet, qui n'a jamais perdu une occasion de me faire sursauter quand j'étais concentré au microscope et dans le noir, à Sophia, que j'aurai pu voir évoluer depuis le M2 et pour qui le tour viendra assez rapidement (si si, moi aussi je pensais avoir encore le temps) et finalement dédicace à PMD, Cerise et Lucie pour les supers moments passés dans et hors du labo !

La science est quelque chose de prenant mais parfois décourageant. Heureusement, j'ai pu compter sur de nombreuses personnes au labo pour égayer mes journées et me remonter le moral !

Quentin, ça n'a pas été facile pour toi, surtout à la fin mais tu as toujours gardé ce côté joyeux et enjoué en toutes circonstances et ça fait du bien ! Je ne parlerai pas de ton humour vaseux ni de ta grande maladresse (sauf pour mettre un papier dans la poubelle !) mais en tous cas, en tant qu'ami je n'ai rien à te reprocher. Je te remercie pour ton soutien et ton aide (bon sauf en immuno mais ça on ne te changeras plus), et pour toutes les fois où tu as été là pour me remonter le moral (comme un ours en peluche, un gros câlin et tout va mieux xD). On a passé de très bon moments, et il faudra se refaire des virées dans les Vosges et la suisse avec Pauline (que je n'ai appris à connaître que trop tard mais tu lui diras que je l'adore quand même et lui fera un gros bisou de ma part !)

Adrien, tu as été un des derniers arrivants de notre petite troupe mais pas le moins important pour autant. Petit gars timide au départ, j'ai appris à te connaître petit à petit et finalement je ne regrette rien ! Peut-être que le fait que tu sois aussi réservé que moi a bien aidé ;). Je n'oublierai pas nos discussions du midi, ça fait plaisir d'avoir un autre joueur de playstation dans ce monde impitoyable rempli de gamers sur PC ! J'ajoute que je me suis éclaté à préparer la thèse de Quentin en ta compagnie et que même si de prime abord tu ne sembles pas le plus fou, tu peux avoir des idées géniales !

Delphine Buissonnours, on a appris à se connaître plus tardivement, oui l'IPCB c'était loin pour moi, mais j'ai découvert une fille drôle, sympathique et attachante. Je ne pourrai jamais oublier ton rire (si particulier parfois...) et tous les bon moments passés ensemble dans et hors du labo (les bars à vin et les apéros).

Mon petit Florent, tu as le même caractère de cochon que moi mais ça ne m'empêche pas de te dire merci pour tous les excellent moments et délires qu'on aura pu avoir (sauf peut-être la chèvre de la honte...). Fais juste gaffe parce qu'un électron libre c'est bien mais les ROS c'est mal ! Tu peux être aussi fêlé et inventif que moi et ça apporte une bouffée d'air frais dans notre monotonie quotidienne. Nos apéros sauvages vont me manquer mais peut-être pourrons-nous remettre ça sur un autre continent ? :D

Les autres, je ne vous oublie pas non plus. Mini Quentin, Yannick, Abdou, Caroline, Farouk, Janina, Chloé et Ingrid. J'ai passé des moments géniaux avec vous et je compte bien sur le fait que ça n'ait pas été les derniers.

Bien sûr il n'y a pas que les jeunes avec qui j'ai passé de bon moments, faisons donc le tour des personnes ayant acquis plus de sagesse que les précédents.

Astrid, tu es comme une maman de substitution au labo et j'ai savouré chaque discussion et repas en ta compagnie. Tu as aussi un peu de folie qu'on a pu mettre en commun par moment, pour le meilleur comme pour le pire ;-). Continue à toujours aussi bien manier le dermatome et à m'envoyer des photos si tu trouves un tatouage étrange.

Monique, Delphine et Fabien. Vous avez été top avec mes souris mais encore plus avec moi et nos repas à l'agricas me manqueront c'est sûr (et le fait de pouvoir pourrir l'écran de Fabien bien sûr).

Jean-Daniel tu aura été mon mentor en microscopie et tu m'as appris à me méfier un peu plus de tout ce qui a une odeur étrange. Mais je n'oublie pas non plus qu'on a pu avoir de super discussions ensemble, tantôt hyper constructives, tantôt complètement délirantes et dans les deux cas j'ai apprécié !

Fred je te met une mention spéciale car tout a commencé avec toi. De mon entretien téléphonique pour intégrer le master au fait que tu m'aies désignée Hélène comme tutrice. Qui sait où je serai aujourd'hui sans tout cela donc MERCI !

Bien entendu je remercie également tous les autres membres de l'UPR3572 qui auront contribué à la si bonne ambiance locale qui a égayé ces quatre années !

Il n'y a pas que le labo dans la vie et je peux remercier mes amis extérieurs à l'UPR pour le soutien et les excellents moments passés ensemble.

Lucie et Kévin, de supers voisins et de supers amis ! J'espère qu'on aura encore d'autres soirées ensemble pour que Lucie puisse se taper une super chorégraphie sur Diam's ou sur de la tecktonik xD. Et Kévin je te donne RDV pour ta thèse ;).

Chérine, Selven, Thomas, Rolando et tous les « Orend », je vous ai connu plus tardivement mais j'ai passé de très bon moments en votre compagnie ☺.

Anthony, Jonathan et Thomas, vous faites partie des derniers rescapés du Collège/Lycée mais vous êtes toujours là malgré tout ce que vous avez pu voir de moi xD. Nos retrouvailles sont espacées mais précieuses et continuons à ne pas perdre le contact. Mention spéciale pour Anthony que je connais depuis la maternelle !

Outre les amis, il y a aussi la famille. J'ai pu compter sur le soutien de toute ma famille avant et durant cette thèse. Je voudrais donc remercier mes grands-parents, mes oncles et tantes, les cousin et cousines (on a pu en faire des bêtises quand on était jeunes !) et bien entendu mes parents et ma sœur ! Vous m'avez toujours soutenu et vous avez toujours cru en moi et si vous dites que vous êtes fiers de moi, moi je suis fier d'avoir des parents comme ça ! Anaïs tu es une petite sœur adorable (bon chiante parfois mais c'est la même pour moi) et sache que je suis fier de toi et que tu pourras toujours compter sur moi !

Enfin Alex. Tu es là depuis le début de la Fac et je ne sais pas où j'aurais atterri sans toi ! Tu es là tous les jours pour me supporter (dans les deux sens du terme) et je n'imagine pas la suite sans toi ! Je ne trouve pas de mots pour décrire à quel point tu comptes à mes yeux donc je finirai sobrement par cela : Je t'aime.

Abréviations

ACR : "American College of Rheumatology"	CTLA4 : "Costimulatory molecule cytotoxic T Tymphocyte associated Antigen 4"
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	CXCL : "C-X-C motif Ligand"
AID : "Activation-Induced cytidine Deaminase"	CXCR : "C-X-C motif Receptor"
AIM2 : "Absent in Melanoma 2"	DAI : "DNA-dependant Activator of Interferon regulatory factors"
AIRE : "Auto-Immune REgulator"	db : double brin
ANCA : "AntiNeutrophil Cytoplasmic Antibodies"	DC : Cellules Dendritiques
ARNm : Acide Ribonucléique messenger	DEAF1 : "Deformed Epidermal Autoregulatory Factor 1"
ATR : "Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein"	DN : Double-négatif/ive
BAFF : "B cells Activating Factor"	DNMT : "DNA Methyl-Transferases"
BAX : "BCL2-Associated X protein"	EBF1 : "Early B Cell Factor 1"
BCL6 : "B-Cell Lymphoma 6 protein"	EBNA1 : "Epstein-Barr virus nuclear antigen-1"
BEC : "Blood Endothelial Cell"	EBV : Virus d'Epstein Bar
BLA : Branche Large Ascendante	ERM : "Ezrin/Radixin/Moiesin"
BLIMP1 : "B Lymphocyte-Induced Maturation Protein-1"	FALC : "Fat-Associated Lymphoid Clusters"
BLK : "B Lymphocyte Kinase"	FALT : "Fat-Associated Lymphoid Tissue"
BTK : "Bruton's Tyrosine Kinase"	FDC : "Follicular Dendritic Cells"
BTLA : "B and T Lymphocyte Attenuator"	Foxp3 : "Forkhead box P3"
CCL : "C-C motif Ligand"	FRC : "Fibroblastic Reticular Cell"
CCR : "C-C motif Receptor"	GAP : "Goblet cell-associated Antigen Passages"
CD : Cluster de Différenciation	GC : "Germinal Center"
CLEC2 : "C-type LECTin-like receptor 2"	GWAS : "Genome-Wide Association Study"
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité	HEV : "High Endothelial Venules"
CMV : CytoMégaloVirus	HMGB1 : "High Mobility Group Box 1"
CR : "Complement Receptor"	
CRP : Protéine C Réactive	

HPK1 : "Hematopoietic Progenitor Kinase 1"
HUVEC : "Human Umbilical Vein Endothelial Cells"
iBALT : "inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue"
ICAM1 : "Intercellular Cell Adhesion Molecule 1"
ICOSL : "Inducible T cell COStimulator Ligand"
ID2 : "Inhibitor of DNA binding 2"
IFN : InterFéroN
Ig : Immunoglobuline
IL : InterLeukine
IPEX : "Immunodysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked"
IRE : "Interferon Response Element"
IRF : "Interferon Regulatory Factors"
ITAM : "Immunoreceptor Activation Tyrosine Motifs"
JAK : "Janus Activated Kinase"
LAP : "LC3 Associated Phagocytosis"
LB : Lymphocyte B
LC3 : "microtubule-associated protein 1A/1B-Light Chain 3"
LcK : "Lymphocyte Kinase"
LCMV : virus de la chorioméningite lymphocytaire chronique
LDG : "Low-Density Granulocytes"
LE : Lupus Erythémateux
LEC : "Lymphatic Endothelial Cell"
LED : Lupus Erythémateux Disséminé
LIGHT : "homologous to lymphotoxin, exhibits inducible expression and competes

with HSV glycoprotein D for binding to herpesvirus entry mediator, a receptor expressed on T lymphocytes"
LPS : LipoPolySaccharide
LT : Lymphocyte T
LTi : "Lymphoid Tissue inducers"
LTin : "Lymphoid Tissue initiators"
LTo : "Lymphoid Tissue organizers"
LT α 1 β 2/ LT β : Lymphotoxine beta
LT β R : "Lymphotoxine beta Receptor"
MadCAM : "Mucosal adressin Cell Adhesion Molecule"
MALT : "Mucosal-Associated Lymphoid Tissue"
MAPK : "Mitogen Activated Protein Kinase"
MARCO : "Macrophage Receptor with Collagenous structure"
MAVS : "Mitochondrial AntiViral Signaling"
MCP-1 : "Monocyte Chemoattractant Protein 1"
MDA5 : "Melanoma Differentiation-Associated protein 5"
miR : micro-ARN
MRC : "Marginal Reticular Cell"
NET : "Neutrophil Extracellular Traps"
NF- κ B : "Nuclear Factor- κ B"
NLRP3 : "NOD-Like Receptor family, Pyrin domain containing 3"
NMDA : "N-Methyl-D-aspartate Receptor"
NOD : "Non Obese Diabetic"
OLS : Organe Lymphoïde Secondaire

OLT : Organe Lymphoïde Tertiaire

PBMC : "Peripheral Blood Mononuclear Cells"

PC : PhosphorylCholine

PD1 : "Programmed cell Death 1"

pDC : Cellules Dendritiques plasmacytoïdes

PECAM1 : "Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1"

PKC : Protéine Kinase C

PNA : "PeaNut Agglutinin"

PNAd : "Peripheral lymph Node Addressin"

PR : Polyarthrite Rhumatoïde

PRR : "Pattern Recognition Receptors"

PS : PhosphatidylSérine

PTPN22 : "Protein Tyrosine Phosphatase, Non receptor type 22"

RAGE : "Receptor for Advanced Glycation Endproducts"

RANKL : "Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand"

RET : "REarranged during Transfection"

RFc : Récepteur au Fragment constant

RIG-I : "Retinoic acid Inducible Gene-I"

RLR : "RIG-I Like Receptors"

ROR γ t : "RAR-related orphan receptor gamma t"

S1P : Sphingosine-1-Phosphate

S1PR1 : récepteur à la sphingosine-1-phosphate

SD : "Slit Diaphragm"

SIGLEC1 : "Sialic-acid-bindin ImmunoGlobulin-like-LECTin 1"

SIGNR1 : "Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin-Related 1"

siRNA : "small interfering RNA"

SLAM : "Signaling Lymphocytic Activation Molecule"

SLEDAI : "Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index"

SLICC : "Systemic Lupus International Collaborating Clinics"

SNP : "Single Nucleotide Polymorphism"

snRNP : "small nuclear RNP"

STAT : "Signal Transducer and Activator of Transcription"

STING : "STimulator of INterferon Genes"

TBM : "Tingible Body Macrophages"

TCD : Tube Contourné Distal

TCP : Tube contourné Proximal

TCR : "T Cell Receptor"

TGF β : "Transforming Growth Factor beta"

Th : T helper

TIM4 : "T-cell Immunoglobulin- and Mucin-domain-containing molecule 4"

TLR : "Toll Like Receptor"

TNF α : "Tumor Necrosis Factor α "

Treg : LT régulateur

UV : Ultraviolets

VCAM1 : "Vascular Cell Adhesion Molecule 1"

ZAP70 : "Zeta Associated protein of 70 kDa"

ZC : Zone Claire

ZS : Zone Sombre

Liste des figures

Figure 1 : Cellules LE.	3
Figure 2 : Manifestations cliniques du LED.	4
Figure 3 : Critères de référence utilisés pour le diagnostic du LED	5
Figure 4 : La spirale lupique infernale	14
Figure 5 : Les gènes de susceptibilité et leur rôle dans le développement du lupus.....	15
Figure 6 : Les facteurs environnementaux et le lupus.....	22
Figure 7 : Dérégulation de la mort cellulaire au cours du lupus	27
Figure 8 : Reconnaissance des acides nucléiques par les TLR endosomaux	34
Figure 9 : Reconnaissance des acides nucléiques par les senseurs cytoplasmiques	37
Figure 10 : Contribution de l'axe pDC-IFN dans la physiopathologie du lupus	42
Figure 11 : Anomalies des populations lymphocytaires B au cours du lupus	50
Figure 12 : Dysfonction de la signalisation des LT dans le lupus	61
Figure 13 : Organisation du glomérule rénal	64
Figure 14 : Organisation du néphron	65
Figure 15 : Classification de la glomérulonéphrite lupique	68
Figure 16 : Lésions et contribution des cellules intraglomérulaires lors de la néphrite lupique	70
Figure 17 : Structure de la rate	83
Figure 18 : Structure des ganglions lymphatiques	88
Figure 19 : Les cellules stromales du ganglion lymphatique	89
Figure 20 : Structure des tissu lymphoïdes associés aux muqueuses.....	97
Figure 21 : Sélection dans le centre germinatif.....	103
Figure 22 : Modèle de développement des ganglions lymphatiques	109
Figure 23 : Nouveau modèle de développement des ganglions lymphatiques proposé par Onder <i>et al.</i> , (2018)	113
Figure 24 : Comparaison de la structure et des fonctions des ganglions et des OLT	117
Figure 25 : Expression d urécepteur CXCR3 à la surface des leucocytes rénaux	198
Figure 26 : Impact du blocage de CXCR3 sur l'infiltration des glandes salivaires	200
Figure 27 : Mise au point de la digestion des reins afin d'isoler les cellules stromales	203
Figure 28 : Mise en évidence de la présence des trois types de cellules stromales dans les OLT rénaux par cytométrie.....	204

Figure 29 : Les cellules stromales expriment des molécules d'adhésion dans les OLT rénaux	205
Figure 30 : Les cellules stromales expriment des molécules associées à la production de matrice extracellulaire dans les OLT rénaux.....	206
Figure 31 : Modification du compartiment stromal dans les reins de patients lupiques.....	207
Figure 32 : Implication du stroma lupique dans la mise en place des OLT	209
Figure 33 : Rôle du stroma dans la production des auto-anticorps	210
Figure 34 : Influence du stroma sur les dommages rénaux.....	211
Figure 35 : Le trafic des LT naïfs chez les jeunes souris NZB/W	213
Figure 36 : La cytokine BAFF est-elle impliquée dans les premières étapes de développement des OLT ?	215
Figure 37 : Production cytokinique dans les OLT	217
Figure 38 : Retrouve-t-on des L _{Ti} ou des cellules apparentées dans les OLT rénaux ?.....	219
Figure 39 : Expression de la lymphotoxine beta et mise en place du stroma dans les OLT .	221
Figure 40 : Quel est le « temps zéro » de formation des OLT ?	222
Figure 41 : Evolution de la population B dans les OLT au cours du développement de la maladie	224
Figure 42 : La chimiokine CXCL13 semble participer à l'attraction des LB au niveau des reins	225
Figure 43 : Le développement des FDC est synchrone avec l'expression de CXCL13	226
Figure 44 : Les FDC ne sont pas les seules cellules productrices de CXCL13 dans les OLT rénaux	227
Figure 45 : Co-localisation des marqueurs de cellules myéloïdes et de la chimiokine CXCL13	228
Figure 46 : Les cellules myéloïdes extraites des reins expriment CXCL13	229
Figure 47 : Comment expliquer l'afflux de cellules myéloïdes dans les reins ?.....	231
Figure 48 : Mécanisme proposé de mise en place des OLT dans les reins de souris lupiques NZB/W.....	246

Table des matières

Introduction.....	1
Partie 1 : Le lupus érythémateux disséminé.....	1
<u>I-Histoire du lupus.</u>	1
<u>A) Une pathologie cutanée.</u>	1
<u>B) De la pathologie cutanée à la maladie auto-immune systémique.</u>	2
<u>II-L'épidémiologie, les manifestations et les atteintes cliniques lupiques.</u>	3
<u>A) Epidémiologie.</u>	3
<u>B) Les atteintes cutanées et l'arthrite lupique.</u>	5
<u>C) La néphrite lupique.</u>	6
<u>D) Les manifestations neurologiques.</u>	6
<u>E) Les atteintes pulmonaires et cardiaques.</u>	7
<u>F) Anomalies vasculaires, hématologiques et sérologiques.</u>	7
<u>III-Les traitements du lupus.</u>	8
<u>A) Prévention et éducation du patient.</u>	9
<u>B) Les traitements classiques du lupus.</u>	9
<i>1. Traitement des formes mineures du lupus.</i>	9
<i>2. Traitement des formes de lupus présentant des atteintes viscérales.</i>	10
<u>C) Les biothérapies.</u>	11
<i>1. Thérapies ciblant les lymphocytes B.</i>	11
<i>2. Thérapies ciblant les cytokines.</i>	12
<i>3. Thérapies ciblant la co-stimulation et immunomodulatrices.</i>	12
<u>IV-Le lupus est une pathologie multifactorielle.</u>	13
<u>A) La génétique du lupus.</u>	13
<i>1. Mutations dans la voie de clairance des corps apoptotiques et des complexes immuns.</i>	15
<i>2. Mutations dans les voies de l'immunité innée.</i>	16
<i>3. Mutations affectant l'immunité adaptative.</i>	17
<u>B) Le rôle de l'épigénétique dans le développement du LED.</u>	18
<i>1. Les modifications de l'ADN au cours du lupus.</i>	18
<i>2. Les modifications des histones influencent l'expression de gènes au cours du LED.</i>	19

3. <i>Les microARN et le lupus</i>	20
<u>C) Les facteurs environnementaux impliqués dans le développement du LED</u>	21
1. <i>Les rayonnements ultraviolets</i>	21
2. <i>La cigarette et les polluants</i>	22
3. <i>Les agents pathogènes</i>	23
4. <i>Les médicaments et les hormones</i>	24
<u>V-La physiopathologie du lupus</u>	25
<u>A) Régulation anormale de l'apoptose et exposition de l'ADN</u>	25
1. <i>Apoptose excessive en conditions lupiques</i>	26
2. <i>Lupus : une mauvaise prise en charge des corps apoptotiques ?</i>	28
a) <i>Une mauvaise phagocytose des corps apoptotiques</i>	28
b) <i>Un problème d'opsonisation ?</i>	29
c) <i>Une plus faible dégradation des acides nucléiques en contexte lupique</i>	30
3. <i>Moins d'apoptose dans le lupus ?</i>	31
<u>B) Activation du système immunitaire inné</u>	32
1. <i>La reconnaissance des acides nucléiques par le système immunitaire inné</i>	32
a) <i>TLR et acides nucléiques</i>	33
b) <i>Les autres senseurs d'acides nucléiques</i>	36
2. <i>La signature interféron et les cellules dendritiques plasmacytoïdes</i>	38
a) <i>Pourquoi étudier les IFN de type I ?</i>	39
b) <i>Origine des IFN de type I dans le lupus</i>	39
c) <i>NET, pDC et IFN</i>	40
d) <i>Les effets des IFN sur le système immunitaire et leurs rôles dans le LED</i>	41
<u>C) De la rupture de tolérance à l'activation de l'immunité adaptative</u>	43
1. <i>Auto-anticorps et lymphocytes B</i>	44
a) <i>Les anticorps lupiques pathogènes</i>	44
b) <i>Evolution des populations lymphocytaires B au cours du lupus</i>	46
c) <i>Comment expliquer les anomalies B au cours du lupus ?</i>	49
2. <i>Les lymphocytes T et leurs rôles dans la pathologie lupique</i>	53
a) <i>Les principales populations de lymphocytes T impliquées dans le lupus</i>	53
b) <i>Dérégulation de la signalisation des LT au cours du lupus</i>	59
 Partie 2 : La néphrite lupique, une atteinte emblématique du lupus	63
<u>I-Structure et fonctions du rein</u>	63

<u>II-Description et classification de la néphrite lupique.</u>	66
<u>III-Contribution du système immunitaire et des cellules rénales dans la physiopathologie de la néphrite lupique.</u>	70
<u>A) Le dépôt des anticorps et leurs effets sur les cellules rénales.</u>	70
1. <i>Où et comment les anticorps se déposent-ils dans les reins ?</i>	71
2. <i>Conséquences du dépôt des anti-ADNdb dans les reins.</i>	72
<u>B) Rôle des cellules immunitaires dans la physiopathologie de la néphrite lupique.</u> ..	74
1. <i>Les macrophages et les cellules dendritiques lors de la néphrite lupique.</i>	74
2. <i>Les lymphocytes sont-ils impliqués dans le développement de la néphrite lupique ?</i>	76
<u>C) Participation des cellules rénales au développement de la néphrite lupique.</u>	78
1. <i>Les cellules mésangiales, premières cibles et acteurs de la néphrite lupique.</i> ..	78
2. <i>Cellules endothéliales et podocytes : spectateurs ou acteurs ?</i>	79
3. <i>Les cellules épithéliales pariétales : modulation de l'immunité et régénération du rein.</i>	81
Partie 3 : De l'ontogenèse à la néogenèse lymphoïde, organes lymphoïdes secondaires et tertiaires	82
<u>I-Structures et fonctions des organes lymphoïdes secondaires.</u>	82
<u>A) La rate, site de drainage des antigènes sanguins.</u>	82
<u>B) Les ganglions lymphatiques.</u>	86
1. <i>Généralités sur les ganglions lymphatiques.</i>	86
2. <i>Les cellules stromales des ganglions lymphatiques.</i>	88
a) <i>Les cellules réticulaires fibroblastiques.</i>	90
b) <i>Les cellules dendritiques folliculaires.</i>	92
c) <i>Les cellules réticulaires marginales.</i>	92
d) <i>Les cellules double-négative ou péricytes contractiles.</i>	93
e) <i>Les cellules endothéliales sanguines.</i>	93
f) <i>Les cellules endothéliales lymphatiques.</i>	94
<u>C) Les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses.</u>	96
<u>D) Le centre germinatif, clé de la réponse adaptative.</u>	99
1. <i>Les cellules et la structure dynamique du centre germinatif.</i>	100
2. <i>Sélection positive des clones dans le centre germinatif.</i>	102
3. <i>Devenir des lymphocytes B du centre germinatif.</i>	104

4. <i>Sélection négative au sein du centre germinatif</i>	105
<u>II-Ontogenèse des organes lymphoïdes secondaires : l'exemple du ganglion lymphatique.</u>	
.....	106
<u>A) Les LT_i et les LT_o gouvernent la formation des tissus lymphoïdes.</u>	107
<u>B) Le modèle bicellulaire de formation des ganglions lymphatiques.</u>	108
<u>C) Le nouveau modèle de développement des ganglions lymphatiques.</u>	111
<u>III-Les organes lymphoïdes tertiaires : définition et structure.</u>	114
<u>A) Généralités sur les organes lymphoïdes tertiaires.</u>	114
<u>B) Structure des organes lymphoïdes tertiaires.</u>	116
<u>IV-Les organes lymphoïdes tertiaires dans diverses pathologies et leurs rôles associés.</u>	
.....	119
<u>A) Les organes lymphoïdes tertiaires lors d'infections.</u>	119
1. <i>Les OLT permettent d'éliminer le pathogène.</i>	119
2. <i>Les infections chroniques et les OLT : un revers de la médaille.</i>	120
<u>B) Organes lymphoïdes tertiaires dans les cancers : amis ou ennemis ?</u>	121
1. <i>Les OLT favorisent une réponse anti-tumorale locale.</i>	122
2. <i>Quand la tumeur détourne les OLT à son avantage.</i>	123
<u>C) Implication des organes lymphoïdes tertiaires dans le devenir des greffons.</u>	124
1. <i>Les OLT et le rejet du greffon, une histoire commune.</i>	125
2. <i>Tolérance de greffe et OLT, un rôle insoupçonné.</i>	125
<u>D) Auto-immunité, inflammation et organes lymphoïdes tertiaires.</u>	126
1. <i>Dans quelles pathologies auto-immunes retrouve-t-on les OLT ?</i>	127
2. <i>Participation des OLT à la détérioration de l'organe/du tissu.</i>	128
<u>V-Lupus, organes lymphoïdes tertiaires et objectifs de l'étude.</u>	129
 Résultats.....	 133
 Chapitre 1 : Mise en évidence de la présence d'OLT fonctionnels dans les reins de souris lupiques NZB/W.....	 133
<u>I-Avant-propos.</u>	133
<u>II-Publication N°1.</u>	134
 Chapitre 2 : Etapes précoces de la néogenèse lymphoïde rénale au cours du lupus : implication des lymphocytes T exprimant CXCR3.....	 167

<u>I-Avant-propos.</u>	167
<u>II-Publication N°2.</u>	168
<u>III-Résultats complémentaires et discussion.</u>	195
Chapitre 3 : Néogenèse, composition et ciblage des OLT : résultats complémentaires.	201
<u>I-Avant-propos.</u>	201
<u>II-Caractérisation approfondie et rôle du stroma dans les OLT rénaux.</u>	202
<u>A) Caractérisation des cellules stromales dans les reins par cytométrie en flux.</u>	202
<u>B) Les cellules stromales expriment de nombreux facteurs pouvant participer à l'organisation des OLT.</u>	204
<u>C) Qu'en est-il du stroma chez l'homme au cours du lupus ?</u>	207
<u>D) Le rôle du stroma dans le développement des OLT et de la néphrite lupique.</u>	207
<i>1.Implication du stroma dans le développement des OLT.</i>	208
<i>2.Implication du stroma/des reins dans le développement des auto-anticorps et de la néphrite.</i>	209
<u>III-Une autre vision des étapes précoces de la néogenèse lymphoïde rénale.</u>	212
<u>A) Le trafic des LT naïfs dans les reins de souris lupiques.</u>	212
<u>B) Les cytokines potentiellement impliquées dans la néogenèse lymphoïde rénale.</u>	214
<u>C) Implications des molécules nécessaires aux premières étapes d'ontogenèse lymphoïde dans le contexte des OLT ?</u>	218
<u>D) Peut-on mettre en évidence le point de départ précis de la mise en place des OLT ?</u>	221
<u>IV-Migration rénale des LB et progression vers l'OLT fonctionnel.</u>	223
<u>A) Attraction et évolution des LB dans les reins au cours du lupus.</u>	223
<u>B) Les FDC sont-elles les principales productrices de la chimiokine CXCL13 ?</u>	225
<u>C) Le rôle des cellules myéloïdes dans l'attraction des LB et les causes de leur migration dans les reins.</u>	226
<u>V-Conclusion.</u>	232
Conclusion/Discussion	233
<u>I-Pourquoi étudier les OLT dans les reins de souris NZB/W ?</u>	233
<u>II-Etapes précoces de la formation des OLT.</u>	236

<u>III-Peut-on impliquer d'autres cellules/molécules que les LT/chimiokines inflammatoires dans la formation des OLT dans les reins ?</u>	238
<u>IV-Quels éléments impliqués dans la formation des OLT pourraient constituer des cibles thérapeutiques intéressantes dans le cas de la néphrite lupique ?</u>	240
<u>V-Le blocage de la voie CXCR3-CXCL9/10/11 au cours du lupus.</u>	243
Bibliographie	249

Introduction

Partie 1 : Le lupus érythémateux disséminé

I-Histoire du lupus.

A) Une pathologie cutanée.

Les premières manifestations du Lupus Erythémateux Disséminé (LED) à avoir été décrites furent les atteintes cutanées à l'époque médiévale. Le terme *lupus* (signifiant loup en latin) a été utilisé du fait de la forte ressemblance des lésions cutanées avec les dommages que pourrait causer une morsure de loup mais également à cause de l'agressivité des lésions cutanées et du fait que leur forme rappelait un masque de loup (**Rampuda et al., 2009**). Toutefois à cette époque, il arrivait très souvent que la distinction entre les différentes affections ne soit pas correctement établie, c'est pourquoi le terme de lupus englobait également d'autres pathologies cutanées mais également certains cancers. Ce n'est que plus tardivement qu'il fut considéré (à tort) que le lupus ne touchait que la peau contrairement à ce que l'on commençait à connaître du cancer et de plus, les vaisseaux autour des tumeurs ressemblaient fortement à des pinces de crabes (d'où le nom *cancer*, qui signifiait crabe en latin).

Le premier texte à avoir fait allusion au terme de lupus fut l'ancien testament dans lequel le terme "Shekhin", ou ulcère en hébreux, est mentionné. On apprendra plus tard que cette manifestation n'avait rien à voir avec le lupus mais était causée par la lèpre (**Cazenave et al., 2009**). On ne retrouve que peu d'écrits mentionnant le lupus avant le 18^{ème} siècle mais l'un d'entre eux, datant de 916 après J.C. parlait de la maladie dont souffrait l'évêque de Liège Eraclius (**Wallace et al., 1999**). C'est à la fin du 18^{ème} siècle que Robert Villan, aidé de son élève Thomas Bateman, publia un écrit "**Manual of skin diseases**", ouvrage qui classifiait les maladies cutanées en fonction de leur apparence. Le lupus était alors associé à des maladies destructrices et ulcérales du visage. Ce système de classification comportait celles que l'on nommera plus tard *lupus vulgaris* et *lupus erythematosus* (**Scofield et al., 2009**). Il aura fallu attendre Pierre Cazenave et Henri Schedel et leur ouvrage "**Abrégé pratique des maladies de la peau**" pour pouvoir distinguer trois types de lupus en fonction de la destruction visible : en surface, en profondeur ou avec hypertrophie. C'est en 1833 que Cazenave publia une seconde édition de ses travaux dans laquelle il référence une nouvelle description de la pathologie nommée *érythème centrifuge* et qui correspondra à ce que l'on nommera plus tard le lupus érythémateux (**Rampuda et al., 2009**).

En 1846, Ferdinand von Hebra fit la description de deux types de lésions lupiques : l'une consistant en des disques ronds tandis que l'autre type de lésion correspondait à de petites lésions confluentes. Von Hebra fut également le premier à évoquer le rash en forme d'aile de

papillon au niveau du visage qui est aujourd'hui caractéristique de la pathologie lupique (**Scofield et al., 2009**). Et ce fut enfin au cours de l'année 1851 que Cazenave étendit sa description des maladies cutanées, il décrivit ainsi le lupus comme une affection de la peau comportant une atrophie, des télangiectasies et un érythème fixe. Il précisa également que cette pathologie touchait essentiellement les jeunes femmes (**Wallace et al., 1999**). Il lui attribua alors l'adjectif "érythémateux", c'est à partir de cette époque que l'on parla de lupus érythémateux.

B) De la pathologie cutanée à la maladie auto-immune systémique.

Comme mentionné dans le paragraphe précédent, le lupus était au départ considéré comme une affection uniquement cutanée. Il aura fallu attendre l'année 1872 et les travaux de Moriz Kaposi pour commencer à redéfinir le lupus comme une pathologie systémique. Ce fut lui qui pour la première fois, décrivit les signes systémiques de la pathologie lupique. Ces manifestations comprenaient : la fièvre, l'anémie, une lymphadénopathie, la perte de poids et de l'arthrite (**Rampuda et al., 2009**).

Dans les années qui suivirent, d'autres manifestations furent associées au lupus : la photosensibilité, la pneumonie ou encore le syndrome de Raynaud. Mais c'est en 1902 que Sequiera et Balean décrivirent pour la première fois l'une des atteintes les plus emblématique du lupus : la néphropathie (**Mallavarapu et al., 2007**). Elle représente en effet aujourd'hui encore l'atteinte considérée comme la plus grave observée au cours du lupus. Mais ce furent les travaux de William Olsen, en 1904, qui établirent clairement le caractère disséminé de la pathologie (dont l'analogie était souvent faite, à tort, avec l'étendue des lésions cutanées) (**Scofield et al., 2009**). Ces travaux reposèrent sur de nombreuses études de cas au cours de sa carrière et il fut notamment le premier à affirmer que l'on pouvait présenter les atteintes systémiques de la maladie lupique sans présenter les atteintes cutanées.

Le lupus était alors considéré comme une pathologie systémique mais le concept d'auto-immunité commençait seulement à émerger et il fallut attendre un demi-siècle plus tard pour enfin caractériser le lupus comme une pathologie auto-immune. Tout d'abord, en 1948, la découverte des cellules LE (pour Lupus Erythémateux, **Figure 1**) par l'hématologue Malcolm Hargraves représenta l'un des premiers pas vers la classification du lupus en pathologie auto-immune et permit la mise en place de l'un des premiers tests de diagnostic du lupus (**Hepburn et al., 2001**). Ces cellules étaient retrouvées dans la moelle osseuse des patients lupiques et correspondaient à des neutrophiles ayant phagocyté de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) et l'on pouvait induire leur formation en exposant des cellules de moelle saine à du sérum de

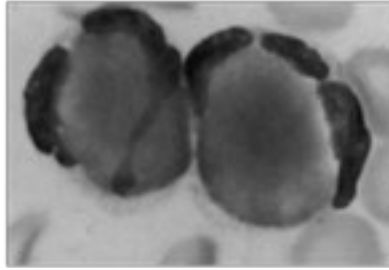


Figure 1 : Cellules LE.

Image montrant la présence de cellules LE dans la moelle osseuse d'un patient lupique. La zone en gris clair représente le noyau d'une autre cellule venant d'être ingéré.

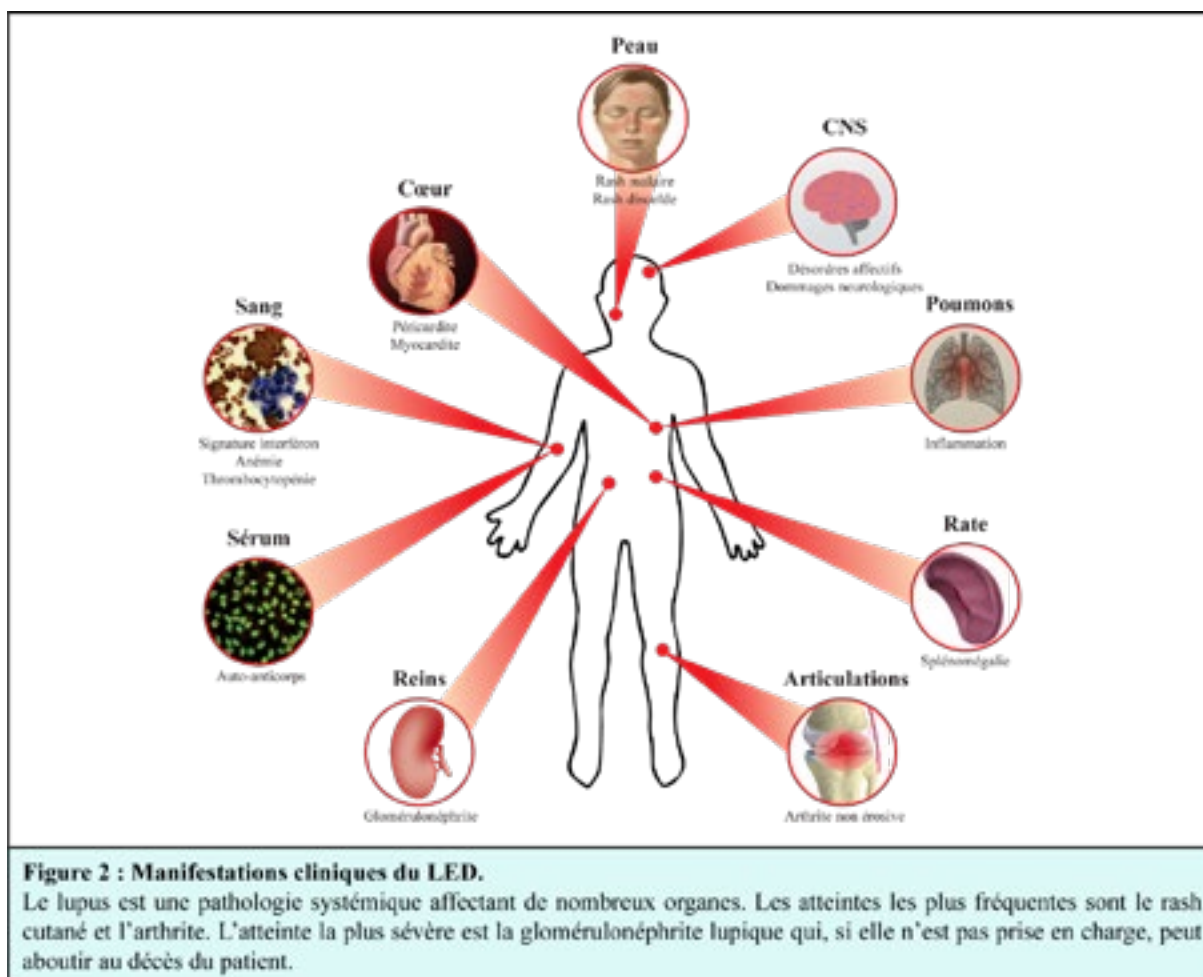
patient lupique. Même s'il n'est plus utilisé aujourd'hui, ce test a pendant longtemps été considéré comme le plus spécifique pour détecter la pathologie lupique. Quelques années plus tard, Miescher et Fauconnet se rendirent compte que l'on pouvait empêcher la formation des cellules LE en adsorbant le sérum lupique avec des noyaux. Ils en conclurent donc qu'un élément dans le sérum devait réagir avec/détruire les noyaux (**Miescher *et al.*, 1954**). Et ce fut alors en 1957, à la suite de travaux de George Friou que l'élément présent dans le sérum et réagissant avec les noyaux fut identifié comme étant une gammaglobuline et que cette dernière réagissait avec l'ADN complexé aux histones (**Hepburn *et al.*, 2002**).

II-L'épidémiologie, les manifestations et les atteintes cliniques lupiques.

A) Epidémiologie.

Le lupus est une pathologie touchant 9 femmes pour un homme. Elle se manifeste en particulier entre 15 et 40 ans, c'est-à-dire lorsque la femme est en âge de procréer. Il existe également des cas de lupus pédiatrique mais ceux-ci ne représentent que 5 à 10% des cas et restent difficiles à diagnostiquer. Le lupus est aujourd'hui encore considéré comme une maladie rare en France car il ne touche que 41 cas pour 100 000 individus et l'on dénombre 2500 nouveaux cas par an. C'est une maladie que l'on retrouve cependant à travers le monde mais qui affecte davantage certaines ethnies : les populations noires, antillaises et asiatiques sont plus fréquemment touchées par le lupus que les populations caucasiennes. L'incidence de cette pathologie diffère ainsi en fonction des pays/ethnies considérés. En effet, l'incidence de la maladie varie de 1 à 10 cas pour 100 000 habitants dans les populations caucasiennes tandis qu'elle est de 200 pour 100 000 chez les populations afro-américaines (**Borchers *et al.*, 2010**).

Le lupus est une pathologie très hétérogène qui se manifeste de diverses manières à l'état clinique (**Figure 2**). Nous nous attarderons sur les différentes manifestations cliniques dans les paragraphes suivants mais les principales manifestations d'un point de vue général sont de la fièvre, une asthénie et un amaigrissement. Même si certaines manifestations se retrouvent très



fréquemment chez les patients (l'atteinte cutanée affecte 80% des patients) le diagnostic de la pathologie n'en reste pas moins compliqué à établir. C'est dans le but de faciliter ce dernier que l'ACR ("American College of Rheumatology") a établi une liste en 1971, puis révisée en 1997, de critères de classification du lupus (**Hochberg et al., 1997**). Cependant, cette classification n'étant pas optimale, le groupe Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) a mis en place de nouveaux critères en 2012. Etant donné la complexité du diagnostic du lupus l'utilisation de deux classifications distinctes n'est pas envisageable, c'est pourquoi une nouvelle classification vient d'être mise en place récemment, elle n'est pas encore publiée mais fut présentée au congrès européen de Rhumatologie par le Dr. Johnson. Pour cette dernière, il faut obtenir un score minimum de 10 et le sérum doit présenter une positivité pour les anticorps antinucléaires à la dilution 1/80 (**Figure 3**).

En plus de se manifester de diverses manières au niveau clinique, le lupus est une pathologie évoluant selon différentes phases. On observe une alternance entre des phases de poussée où se manifestent les symptômes et des phases quiescentes demeurant asymptomatiques. Afin de pouvoir mesurer l'activité de la maladie, les médecins se réfèrent à un score dont le plus utilisé est le "Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index"

(SLEDAI, **Bombardier et al., 1992**). Il permet d'affecter à chaque symptôme un score selon son importance et est utilisé lors du diagnostic mais également lors du suivi d'essais cliniques.

Inflammation rénale/néphrite
Classe III/IV (néphrite sévère) 10
Classe II/V 8
Protéines à plus de 0,5g/jour 4
Anticorps anti-nucléaires
Anti-Sm 6
Anti-ADNdb 6
Sérites (péricardites/pleurésie)
Péricardite aiguë 6
Épanchement cardiaque/pulmonaire 5
Peau
Lupus cutané aigu 6
Lupus cutané subaigu/discoïde 4
Ulcère oral 2
Alopécie 2
Système nerveux central
Épilepsie 5
Psychose 3
Délires 2
Articulations
Arthrite 6
Sang
Hémolyse 4
Thrombocytopénie 4
Leucopénie 3
C3 et C4 bas 4
C3 ou C4 bas 3
Autres
Fièvre non expliquée 2
Anticorps anti-phospholipides 2

Figure 3 : Critères de référence utilisés pour le diagnostic du LED définis par l'ACR et révisés en 1997 puis, réactualisés en 2018. Les critères sont cliniques mais également immunologiques. Pour que le diagnostic de lupus soit établi, il faut présenter un score minimum de 10 et une positivité pour les anticorps antinucléaires.

B) Les atteintes cutanées et l'arthrite lupique.

Les atteintes cutanées au cours du lupus sont retrouvées chez 80% des patients et représentent l'une des manifestations les plus caractéristiques de la maladie lupique. On les observe notamment au niveau des zones photoexposées du fait de leur très forte photosensibilité. Elles se manifestent en particulier par l'apparition d'un rash en forme d'aile de papillon au niveau du visage (également appelé masque de loup) (**Cojocaru et al., 2011**). Ces lésions cutanées peuvent varier du simple érythème pouvant se résorber, à des lésions squameuses suivies d'atrophies cicatricielles.

Une autre manifestation lupique que l'on retrouve fréquemment est l'arthrite. Elle affecte en particulier les phalanges, les poignets, les genoux et les chevilles. Elle peut souvent être confondue avec un autre type d'arthrite et survient donc la majorité du temps avant l'établissement du diagnostic de lupus. Contrairement à ce que l'on peut observer dans le cas de la Polyarthrite Rhumatoïde (PR), cette arthrite peut être asymétrique, est non déformante et ne présente pas de destruction ostéocartilagineuse (**Toukap *et al.*, 2007**).

C) La néphrite lupique.

La néphrite lupique est observée chez 50 à 60% des patients suivant l'ethnie considérée. Nous approfondirons la physiopathologie de la néphrite lupique dans une partie qui lui sera consacrée (**Partie 2, page 62**). Elle représente l'atteinte la plus sévère observée au cours du lupus car elle peut être de pronostic fatal si elle n'est pas prise en charge. Elle est en partie causée par le dépôt d'auto-anticorps et de complexes immuns au niveau des glomérules rénaux et se traduit par la présence de protéines dans les urines et une diminution de la fonction rénale.

D) Les manifestations neurologiques.

Les atteintes neurologiques sont observées dans 30 à 60% des cas de lupus. Les atteintes sont notamment observées au niveau du système nerveux central mais les atteintes du système nerveux périphérique sont également observables. On peut en premier lieu citer les troubles cognitifs qui représentent l'une des principales manifestations du neurolupus (**Jeltsch-David *et al.*, 2014**). Cela peut aller des simples troubles de l'humeur à des tendances suicidaires voire mener à des accès psychotiques. Ces désordres ne sont pas clairement identifiés car ils peuvent être dus à la pathologie elle-même, mais également être causés par le traitement administré (comme les corticoïdes). L'une des explications repose sur la reconnaissance par certains anticorps des récepteurs NMDA ("N-Methyl-D-aspartate Receptor"). En revanche, la plupart des symptômes touchant le cerveau peuvent être expliqués par des atteintes vasculaires. Dans ce cas, il apparait clairement que les anticorps anti-phospholipides représentent des médiateurs importants car ils peuvent déclencher un accident vasculaire cérébral aboutissant à des déficits centraux moteurs ou sensitifs. Les manifestations observées au niveau périphérique se trouvent être majoritairement des neuropathies associées ou non à des démyélinisations. Même si la cause de ces démyélinisations n'est pas clairement établie, les hypothèses avancées mettent en cause les vasculopathies mais également la participation potentielle d'anticorps dirigés contre la myéline.

E) Les atteintes pulmonaires et cardiaques.

Au niveau pulmonaire, chaque compartiment peut être touché au cours de la pathologie lupique. Cependant ce sont les atteintes pleurales et vasculaires qui sont les plus fréquemment retrouvées (Mittoo *et al.*, 2014). La pleurésie représente l'un des critères de diagnostic du lupus établi par l'ACR et est survenue chez un patient sur trois lors du suivi de cohortes européennes et canadiennes. Les atteintes vasculaires et pleurales pulmonaires sont la majeure partie du temps associées à des défaillances cardiaques ou rénales mais n'engagent pas le pronostic vital car répondent bien aux traitements. Au contraire de la pleurésie, la pneumonie lupique, qui comprend fièvre, toux, douleur pleurale et dyspnée, peut être de pronostic fatal avec un taux de mortalité de plus de 50%. Elle reste cependant assez rare et se manifeste notamment chez les sujets âgés. Au niveau de la vasculature pulmonaire, il est possible d'observer différentes manifestations. Les événements thromboemboliques, notamment causés par la présence des anticorps anti-phospholipides, sont assez fréquents et nécessitent des traitements par anticoagulants. Il est également possible d'observer des vascularites principalement dues à un phénomène de Raynaud. La dernière atteinte vasculaire rencontrée est une hypertension artérielle pulmonaire qui peut être d'origine primaire, causée par une atteinte des vaisseaux des artérioles, ou secondaire et faisant suite à une atteinte cardiaque ou à un accident thromboembolique.

En plus des atteintes pulmonaires, des manifestations au niveau cardiaque sont fréquemment retrouvées au cours du LED (Tincani *et al.*, 2006). On dénombre trois grands types de manifestations cardiaques lupiques. Tout d'abord la péricardite qui représente l'atteinte cardiaque la plus étudiée et qui fait partie des critères de l'ACR. Elle se caractérise par des douleurs thoraciques, augmentées en position couchée. Elle serait plus fréquente au début de la maladie et durant les phases de rechute et est généralement d'évolution bénigne. En revanche, l'atteinte du myocarde, bien que beaucoup moins fréquente, est de plus sévère pronostic car, si elle n'est pas traitée à temps, elle peut aboutir au décès du patient. Cette myocardite peut en effet aboutir à une insuffisance cardiaque congestive ainsi qu'à des troubles du rythme et de la conduction. La dernière manifestation cardiaque que l'on peut attribuer au LED, est le risque augmenté d'insuffisance coronarienne et ce notamment en raison de la forte prévalence d'athérosclérose chez les patients lupiques.

E) Anomalies vasculaires, hématologiques et sérologiques.

Pour terminer, nous allons dans un premier temps aborder les anomalies vasculaires observables au cours de la pathologie lupique. Elles représentent une importante cause de

morbidity car peuvent être responsables d'un grand nombre d'atteintes lupiques citées précédemment. Le phénomène de Raynaud représente l'une des complications vasculaires lupiques et est observé chez un patient sur trois (**Cojocar** *et al.*, 2011). Ce phénomène peut affecter les doigts, les orteils, les oreilles et le nez. Il est dû à une mauvaise circulation mais n'est pas à lui seul représentatif du lupus. Comme citée précédemment, l'hypertension artérielle pulmonaire est également retrouvée au cours du lupus et est assez fréquente. En plus de ces deux atteintes, l'on peut noter que les patients lupiques sont plus prompts à développer une athérosclérose et peuvent présenter de nombreux accidents thrombotiques (ces derniers étant principalement causés par la présence d'anticorps anti-phospholipides).

Enfin, il est intéressant de noter que le lupus se caractérise par de nombreuses anomalies hématologiques. En premier lieu, les patients présentent de fortes cytopénies, incluant anémies (**Voulgarelis** *et al.*, 2000), thrombopénies et leucopénies (en particulier lymphopénies) (**Hepburn** *et al.*, 2010). Les taux circulants de complément sont également anormalement bas du fait de la consommation du complément (en particulier la fraction C3) lors de la pathologie (**Lloyd** *et al.*, 1981) ou de certaines déficiences primaires en complément dues à des anomalies génétiques (déficiency en C1q/C4). De plus, des taux élevés de cholestérol et de triglycérides sont retrouvés chez les patients et sont en partie responsables de l'athérosclérose. Pour terminer, la présence dans la circulation d'anticorps dirigés contre des éléments nucléaires est l'une des caractéristiques majeures du lupus (bien qu'elle n'en soit pas exclusive). Parmi ceux-ci, on retrouve des anticorps reconnaissant l'ADNdb (double brin), les histones ou les nucléosomes (assemblage d'histones et d'ADN) mais également des ribonucléoprotéines (RNP). On retrouve également des anticorps reconnaissant les globules rouges ou les plaquettes, responsables des anémies et thrombopénies. Enfin, et même s'ils ne sont pas spécifiques du lupus, il est possible de détecter des anticorps anti-phospholipides qui sont notamment responsables de nombreux événements thrombotiques.

III-Les traitements du lupus.

La grande hétérogénéité du lupus et le fait que cette maladie évolue sous forme de poussées/rémissions en font une pathologie compliquée à traiter. Les traitements peuvent ainsi varier selon si la maladie est active ou non, et en fonction des différentes atteintes observées chez le patient. La majorité des traitements ne ciblent pas directement les causes de la maladie mais agissent sur les symptômes et ont pour objectifs principaux de prévenir les phases de poussée, d'empêcher la détérioration et la perte de fonction de divers organes (suivant les atteintes considérées) et d'améliorer la qualité de vie des patients. Ces traitements reposent

principalement sur l'utilisation de molécules réduisant l'inflammation comme les corticoïdes ou les immunosuppresseurs. Cependant, ces thérapies sont peu spécifiques et présentent de nombreux effets secondaires (**Davis *et al.*, 2017**), c'est pourquoi il existe aujourd'hui de plus en plus d'études visant à développer des thérapies plus ciblées : les biothérapies.

A) Prévention et éducation du patient

La première chose à prendre en compte est l'éducation du patient. La survenue parfois précoce de la maladie et son évolution chronique par alternance de poussées/rémissions nécessite une bonne information du patient et de son entourage afin de bien garder ces notions à l'esprit. De plus, les personnes atteintes de lupus, en plus du traitement classique, doivent adapter leur mode de vie à la maladie. Par exemple, les lésions lupiques étant fortement photosensibles, il est conseillé d'éviter une exposition prolongée au soleil et penser aux protections comme les lunettes teintées et la crème solaire à indice maximal. Il faudra également arrêter tout tabagisme afin de limiter les risques d'athérosclérose, qui représente un facteur de mortalité important chez les patients. La contraception est également un facteur à prendre en considération. Le lupus étant une pathologie pouvant être modulée par les hormones et aggravée lors de la grossesse, chaque grossesse doit être programmée/planifiée chez les patientes lupiques. Ainsi, l'utilisation de contraceptifs efficaces doit être envisagée dès le début du diagnostic tout en évitant les contraceptifs à base d'œstrogènes.

B) Les traitements classiques du lupus.

Le traitement de fond du lupus repose sur l'utilisation d'antimalariques de synthèse pouvant être associés à des anti-inflammatoires non stéroïdiens et peut parfois être complété par une corticothérapie à faible dose. Dans le cas des formes plus sévères de lupus, les corticoïdes sont systématiquement utilisés et peuvent être combinés à des immunosuppresseurs.

1. Traitement des formes mineures du lupus.

Les formes mineures du lupus sont des formes ne présentant que peu d'atteintes et touchant principalement la peau et les articulations. Ces classes de lupus ne nécessitent pas de lourds traitements immunosuppresseurs et sont majoritairement traitées par antimalariques, anti-inflammatoires et parfois des corticoïdes. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens sont généralement utilisés uniquement dans ces formes peu sévères de lupus car ils impactent la fonction rénale et sont donc fortement déconseillés chez les patients présentant une néphrite. Les antimalariques, comme l'hydroxychloroquine, sont souvent utilisés comme traitement de fond du lupus. Cette molécule présente peu d'effets secondaires et de nombreux effets immunomodulateurs et anti-thrombotiques. L'hydroxychloroquine agit notamment sur les

atteintes cutanées, articulaires et retarde/empêche les phases de poussée (**Rainsford et al., 2015**). Elle s'accumule dans les lysosomes et les autophagosomes, diminue leur pH et module ainsi la présentation antigénique et la production de diverses cytokines inflammatoires, et contrôle l'activation de TLR9 ("Toll Like Receptor 9") dont nous allons parler plus loin dans ce chapitre (**Partie 1, paragraphe V, B, page 35**). De faibles doses de corticoïdes sont utilisées afin de traiter les atteintes articulaires et les formes cutanées résistantes aux antimalariques de synthèse.

2. Traitement des formes de lupus présentant des atteintes viscérales.

Ces formes de lupus ne peuvent être traitées avec ce que l'on nomme le traitement de base du lupus. L'atteinte de plusieurs organes comme les reins ou le cœur nécessite l'utilisation de traitements plus forts afin de rapidement contrôler la poussée lupique et d'éviter un maximum les dommages pouvant être engendrés au sein des organes.

Leur traitement est en premier lieu basé sur l'utilisation de corticoïdes dont le plus couramment utilisé est la prednisone. Ils agissent en réduisant l'activation du système immunitaire et la production de cytokines inflammatoires. Leur dose varie au cours du traitement, ils sont tout d'abord administrés à forte dose afin de rapidement réduire l'inflammation et limiter les dommages lors de la phase de poussée, puis ils sont progressivement réduits (voire arrêtés) durant la mise en place de la rémission (**Kasturi et al., 2016**). Ils présentent cependant divers effets secondaires comme les troubles digestifs, l'hypertension artérielle ou les risques augmentés d'infection et de diabète de type II. Ils doivent donc être associés à une modification des habitudes alimentaires et font l'objet d'un suivi rapproché.

Les formes les plus graves doivent associer les corticoïdes à des traitements immunosuppresseurs, c'est le cas, en particulier, des atteintes rénales et cérébrales. Les immunosuppresseurs présentent de nombreux effets secondaires nécessitant un suivi rigoureux des patients, ce qui explique leur utilisation restreinte aux formes les plus graves. Parmi ceux-ci, on retrouve le cyclophosphamide, un agent alkylant qui va bloquer la synthèse de l'ADN et ainsi la prolifération cellulaire (**Fassbinder et al., 2015**). Il présente des effets secondaires comme un risque d'infection, une leucopénie, une toxicité au niveau de la vessie et un risque augmenté de cancer (**Singh et al., 2016**). C'est pourquoi il est utilisé comme traitement d'induction et est remplacé par d'autres agents lors de thérapies longues. Le cyclophosphamide peut être remplacé par exemple par l'azathioprine, un analogue des purines qui va lui aussi jouer sur la prolifération cellulaire. L'azathioprine est utilisée chez les patients présentant une atteinte

rénale mais est également efficace dans le cas de certaines atteintes cutanées, pulmonaires ou encore lors d'anémies hémolytiques, et permet une diminution des doses de corticoïdes (**Callen et al., 1991**). Le cyclophosphamide peut également être remplacé par le mycophénolate mofétil. Ce composé inhibe la synthèse des purines et induit une diminution de la prolifération des lymphocytes ainsi qu'une baisse de la production d'oxyde nitrique par les macrophages (**Allison, 2005**). Il est utilisé pour traiter les formes rénales du lupus et semble moins toxique que le cyclophosphamide et plus efficace que l'azathioprine (**Houssiau et al., 2010**). Finalement, la cyclosporine A peut être utilisée dans les cas de lupus résistant aux corticoïdes et immunosuppresseurs classiques mais seulement en dernier recours du fait de sa toxicité pour les reins et de son fort métabolisme hépatique (**Ogawa et al., 2010**).

C) Les biothérapies.

Les traitements classiques du lupus présentant de nombreux effets secondaires, de nombreux efforts ont été fait ces dernières années afin de développer des thérapies ciblées jouant sur des facteurs impliqués dans le lupus (dont une grande partie sera détaillée par la suite dans le **paragraphe V, page 25**).

1. Thérapies ciblant les lymphocytes B.

Plus d'un dixième des thérapies ayant fait l'objet d'un essai clinique dans le cadre du lupus sont des thérapies ciblant les Lymphocytes B (LB). Elles sont soit directement dirigées contre les LB afin de les dépléter, soit dirigées contre des molécules importantes pour l'activation ou la survie de ces lymphocytes. L'une des plus connues est le rituximab. Il s'agit d'un anticorps chimérique constitué du domaine IgG1 humain et de la partie variable murine reconnaissant la molécule CD20. Cet anticorps induit une déplétion des LB et est déjà utilisé dans le cas de la PR. Cependant, dans le cas du lupus son efficacité se trouve être insuffisante car il ne permet pas une déplétion totale des LB du fait de la non expression de CD20 à la surface des progéniteurs de LB et des plasmocytes (**Ehrenstein et al., 2016**). D'autres études ont alors débuté afin de tenter une déplétion des LB via le ciblage d'autres marqueurs. CD19 est par exemple exprimé à la surface des progéniteurs B et des plasmablastes qui n'expriment pas CD20 et est, de plus, augmenté chez les patients lupiques (**Culton et al., 2007**), il représente donc une cible intéressante. Le MEDI551, un anticorps humanisé dirigé contre CD19, a été testé dans un modèle murin humanisé de lupus (**Gallagher et al., 2016**) et est actuellement en essai clinique pour d'autres pathologies auto-immunes comme la sclérodermie ou la sclérose en plaques (**Mei et al., 2012**). Il existe également un anticorps ciblant directement les LB mais induisant leur modulation plutôt que leur déplétion : il s'agit de l'epratuzumab, un anticorps

dirigé contre CD22 et qui fait actuellement l'objet d'études dans le cadre du lupus (**Dörner et al., 2015**). Enfin, il existe également une thérapie, qui est aujourd'hui la seule à avoir obtenu une autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis et en Europe : le belimumab. Cet anticorps cible la cytokine BAFF ("B cells Activating Factor"), empêche son interaction avec son récepteur et réduit ainsi la prolifération et la survie des LB (**Vilas-Boas et al., 2015**).

2. Thérapies ciblant les cytokines.

Comme dans le cas de BAFF, il est possible de cibler diverses cytokines lors du lupus, ces dernières étant souvent dérégulées et jouant un rôle important dans l'activation du système immunitaire. La pathologie lupique étant fortement médiée par les interférons de type I (**voir paragraphe V, B, 2, page 38**), il existe divers composés, actuellement en essai clinique, ciblant ces interférons. Parmi eux, on peut citer le sifalimumab (actuellement en phase III) et le rontalizumab (en phase II) qui sont deux anticorps humanisés dirigés contre l'interféron α . Le premier a montré des résultats prometteurs (**Khamashta et al., 2016**) tandis que le second n'est efficace que chez les patients ayant une faible signature interféron (**Kalunian et al., 2016**). Il existe également des thérapies ciblant le récepteur aux interférons de type I (au lieu de la cytokine elle-même). C'est le cas de l'anifrolumab dont les résultats de phase II sont prometteurs (**Furie et al., 2017**). On retrouve également des traitements ciblant d'autres cytokines impliquées dans le lupus. Ainsi, l'IL6 a été ciblée par des thérapies utilisant un anticorps humanisé dirigé contre son récepteur : le tocilizumab, ou plus récemment, un anticorps dirigé contre l'IL6 elle-même, le sirukumab. De la même manière, il existe des thérapies ciblant le TNF α ("Tumor Necrosis Factor α ") (etanercept ou infliximab). Ces divers traitements n'ont cependant pas toujours montré autant d'efficacité qu'attendu (**Davis et al., 2017**). En revanche, l'administration d'IL2 à des patients en vue de restaurer les fonctions des Lymphocytes T (LT) régulateurs est une voie très prometteuse (**He et al., 2016**).

3. Thérapies ciblant la co-stimulation et immunomodulatrices.

Enfin, il existe, outre les thérapies précédemment décrites, des traitements qui vont cibler les molécules de co-stimulation ou induire une modulation de l'activité des cellules immunitaires afin de réduire la réponse immunitaire adaptative pathogénique au cours du lupus. L'abatacept, par exemple, est une molécule de fusion entre une IgG1 et la molécule CTLA4 ("Costimulatory molecule cytotoxic T Tymphocyte associated Antigen 4"). Cette molécule co-inhibitrice se lie à CD80 et CD86 et induit des signaux inhibiteurs chez les LT. Elle a actuellement une autorisation de mise sur le marché dans le cas de la polyarthrite et semble également exercer des effets bénéfiques en cas de lupus (**Furie et al., 2014**). La voie

CD40/CD40L étant importante pour les interactions entre les LB et LT, en particulier au niveau du centre germinatif pour la génération des anticorps de forte affinité, elle a fait l'objet de divers ciblage dans le cas du lupus. Un anticorps ciblant CD40L a été testé mais rapidement stoppé du fait de la survenue d'événements thrombotiques (**Patel et al., 2008**). Une nouvelle version, dépourvue de partie constante, ne produit pas cet effet indésirable et est actuellement en phase I d'essai clinique (**Tocoian et al., 2015**). D'autres thérapies ciblant ICOSL ("Inducible T cell COStimulator Ligand") sont également en cours d'étude chez les patients lupiques (**Sullivan et al., 2016**). Enfin, notre laboratoire est à l'origine du lupuzor, un peptide de 21 acides aminés provenant de la ribonucléoprotéine U1-70K, phosphorylé à la position Ser140 (**Monneaux et al., 2003**). Il montre un effet thérapeutique intéressant sur le modèle murin MRLlpr/lpr et sur les PBMC ("Peripheral Blood Mononuclear Cells") de patients lupiques *ex vivo*, en exerçant un effet tolérogénique et immunomodulateur (**Zimmer et al., 2013**). L'essai clinique de phase III réalisé récemment a malheureusement généré des résultats décevants.

IV-Le lupus est une pathologie multifactorielle.

Aujourd'hui encore, les causes exactes de la pathologie lupique ne sont pas clairement établies. En revanche, de nombreuses études ont permis de mettre en lumière des facteurs prédisposant à la maladie. Comme pour de nombreuses pathologies, que ce soit d'autres maladies auto-immunes ou des cancers, il n'est pas possible de définir un seul facteur comme étant à l'origine du développement de la maladie. Ce sont diverses mutations/prédispositions génétiques qui, dans le contexte d'un environnement bien particulier, vont pouvoir s'exprimer pleinement et mener à la rupture de tolérance et à la suractivation du système immunitaire (inné comme adaptatif) aboutissant ainsi aux divers dommages tissulaires et d'organes que l'on retrouve lors de la pathologie lupique (**Figure 4**).

A) La génétique du lupus.

En premier lieu, ce sont les prédispositions génétiques qui entrent en ligne de compte. De nombreux modèles animaux ont permis de mettre en évidence que la mutation d'un gène ou d'un ensemble de gènes pouvait mener au développement de maladies de type lupus. Chez l'homme, des mutations d'un seul gène (cas plutôt rares de lupus monogéniques, mutation de gènes impliqués dans la voie du complément) ou d'un ensemble de gènes sont associées au développement du lupus. De plus, il est possible d'observer des formes familiales de la pathologie lupique avec de forts taux de concordances entre jumeaux monozygotes (**Alarcon-Segovia et al., 2005**). Des études de "Genome-Wide Association Study" (GWAS) ont permis d'associer la mutation dans de nombreux gènes avec le développement du LED (**Teruel et al.,**

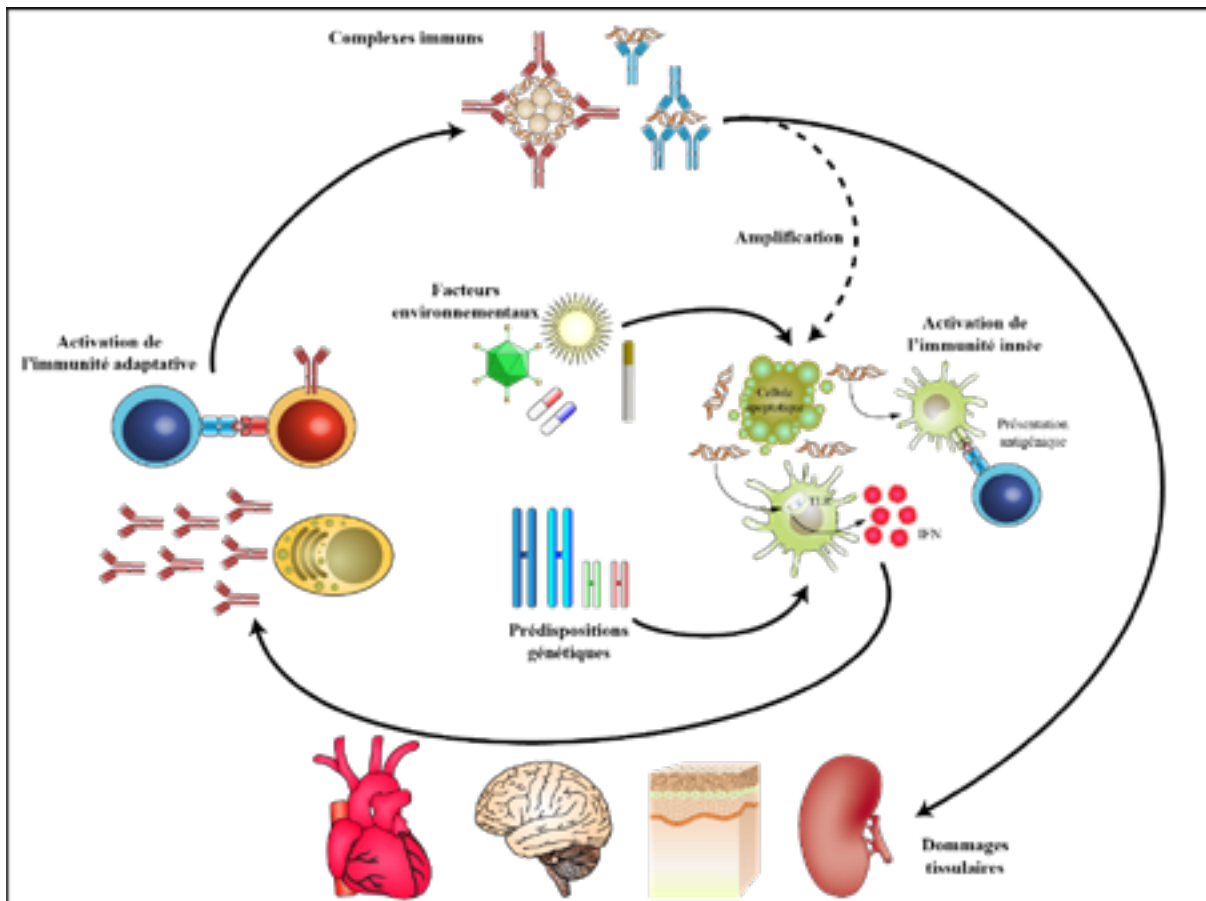


Figure 4 : La spirale lupique infernale.

Les individus avec un certain nombre de polymorphismes génétiques sont davantage susceptibles de développer un lupus. Toutefois, ces prédispositions génétiques doivent être combinées avec un certain nombre de facteurs environnementaux afin d'initier la survenue de la maladie. Ces divers facteurs engendrent un excès d'apoptose et l'activation du système immunitaire inné avec notamment la production d'interférons, le relargage de cytokines pro-inflammatoires et la présentation d'antigènes aux cellules de l'immunité adaptative. L'activation du système immunitaire adaptatif va mener à la production d'auto-anticorps antinucléaires pouvant former des complexes immuns capables d'activer le système immunitaire adaptatif (en particulier par la voie des TLR). Ces complexes immuns permettent non seulement de créer une boucle d'amplification menant à l'activation d'un nombre croissant de cellules autoréactives, mais vont également se déposer dans les organes/tissus (peau, rein, cœur, poumon...) et engendrer les diverses atteintes cliniques lupiques (d'après Liu *et al.*, 2012).

2016). Ces mutations correspondent au remplacement d'un nucléotide par un autre au niveau de la séquence du gène considéré, ou parle alors de "Single Nucleotide Polymorphism" ou SNP. De nombreux SNP ont été associés au lupus mais sont également retrouvés dans d'autres pathologies auto-immunes comme par exemple les mutations dans les gènes codant pour PTPN22 ("Protein Tyrosine Phosphatase, Non receptor type 22") et STAT4 ("Signal Transducer and Activator of Transcription 4") que l'on retrouve dans la PR et le diabète de type 1. Ces SNP, divers et variés, ne sont pas tous partagés équitablement entre les différentes ethnies touchées par le lupus mais l'on peut globalement les classer en trois grandes familles : les mutations affectant la clairance des complexes immuns et des corps apoptotiques, les mutations conduisant à une activation excessive du système immunitaire inné (TLR et voie des interférons (IFN)) et enfin les mutations causant des anomalies au niveau du système immunitaire adaptatif

(Figure 5). Ces diverses classes de mutations contribuent à la survenue et au développement du LED et participent aux différentes atteintes que l'on observe au cours de cette pathologie (Ceccarelli *et al.*, 2015).

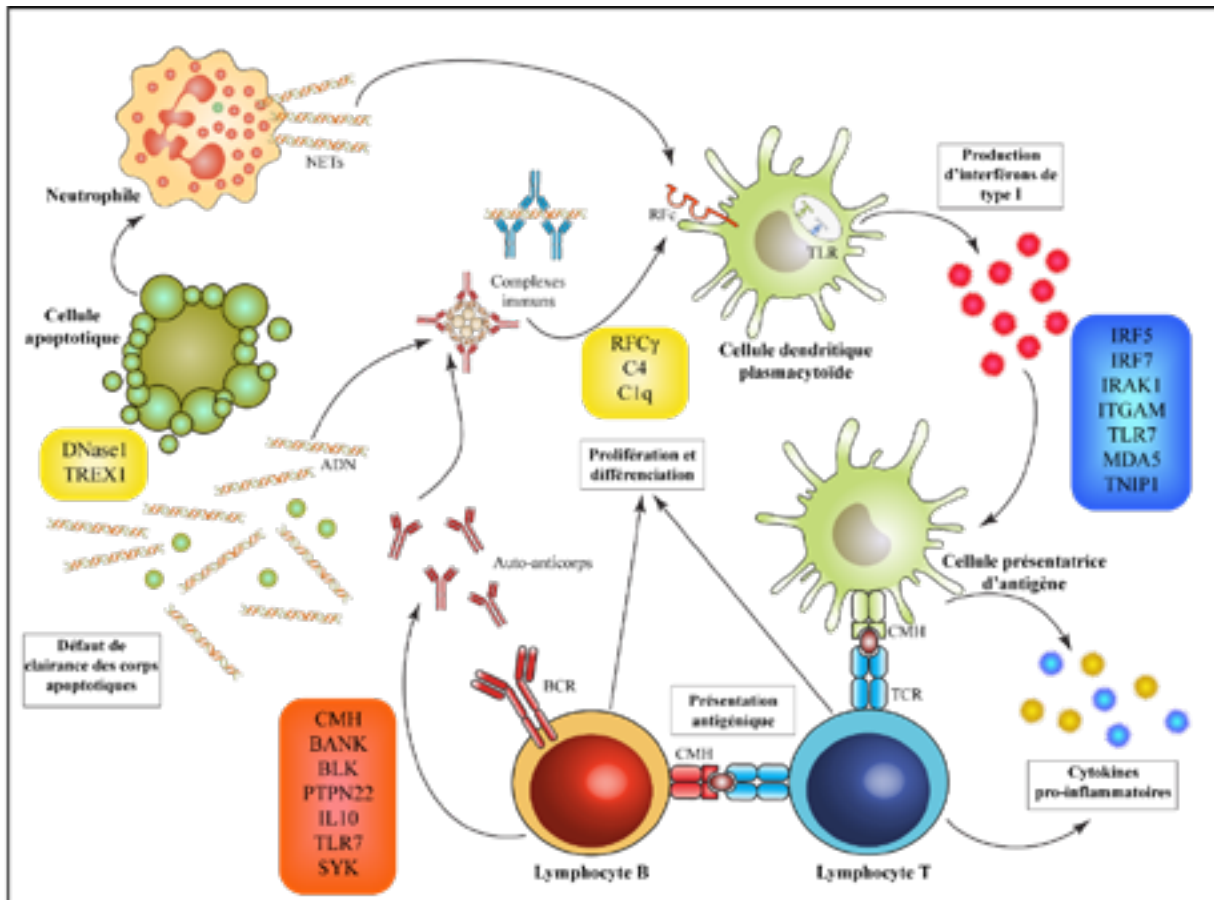


Figure 5 : Les gènes de susceptibilité et leur rôle dans le développement du lupus.
 Il existe de nombreux loci associés au développement du LED. On retrouve des mutations dans les gènes impliqués dans la clairance des corps apoptotiques et des complexes immuns (cadre jaune). La mauvaise élimination des corps apoptotiques entraîne une augmentation de l'ADN extra-cellulaire et permet une activation de l'immunité innée. Des gènes impliqués dans cette dernière sont également mutés au cours du lupus. On retrouve des mutations impliquées dans la voie des interférons, la phagocytose mais également dans l'activation globale des cellules de l'immunité innée et leur capacité à présenter l'antigène aux cellules du système immunitaire adaptatif (cadre bleu). Concernant l'immunité adaptative, il existe de nombreux polymorphismes dans le locus du CMH qui vont alors influencer la présentation aux LT. En plus de ces mutations, il en existe de nombreuses autres qui influent sur l'activation, la signalisation et la reconnaissance par les cellules du système immunitaire adaptatif (cadre rouge), aboutissant à une rupture de tolérance et à la production d'auto-anticorps. (D'après Liu *et al.*, 2012).

1. Mutations dans la voie de clairance des corps apoptotiques et des complexes immuns.

Si l'on s'intéresse à l'élimination des complexes immuns, la première famille de molécules à considérer sont les récepteurs reconnaissant la partie constante des immunoglobulines (Ig). Il existe des mutations dans les gènes codant pour les récepteurs liant la partie constante des anticorps de type IgG (RFcy). Ces derniers permettent de faire le lien entre les anticorps/complexes immuns et les cellules immunitaires les exprimant. Des mutations ont été retrouvées au niveau du gène codant pour le récepteur RFcyIIa, ces mutations diminuent

sa capacité à lier les IgG et donc la capacité des cellules les exprimant à éliminer les complexes immuns. Un autre récepteur, le RFC γ IIb, est le seul de cette famille à aboutir à un signal inhibiteur lorsqu'il se lie aux IgG et joue de ce fait un rôle fondamental dans l'inhibition/le contrôle de l'activation des lymphocytes B. Il apparaît donc clair que la mutation du gène codant pour ce récepteur peut induire une rupture de tolérance au niveau des LB. Cela a été démontré dans des modèles murins où l'absence totale de ce récepteur chez la souris C57BL/6 conduit à l'apparition d'une auto-immunité accompagnée de la production d'auto-anticorps et du développement d'une glomérulonéphrite (**Bolland *et al.*, 2000**). De plus, l'expression du-dit récepteur a été montrée comme étant diminuée chez des modèles murins de lupus (**Rahman *et al.*, 2007**).

Dans le cas de l'élimination des corps apoptotiques, l'on peut s'intéresser à l'exemple de la mutation de *Trex1*. Ce gène code pour la protéine TREX1, appelée également DNaseIII, qui correspond à une exonucléase impliquée dans le stress oxydant et l'apoptose. Des SNP ont été retrouvés au niveau de ce gène et montrés comme associés au LED (**Lee-Kirch *et al.*, 2007**). Ces mutations entraînent un défaut d'expression du gène et vont donc aboutir à une diminution de dégradation de l'ADN. Cet ADN non dégradé va permettre l'activation de l'immunité innée, des cellules auto-réactives et mener à la production d'auto-anticorps.

2. Mutations dans les voies de l'immunité innée.

On retrouve également dans le LED des SNP aux niveau de gènes impliqués dans l'immunité innée (**Figure 5**). Nous allons en voir deux exemples dans ce paragraphe.

Tout d'abord, l'une des voies de l'immunité innée qui est très fortement associée au lupus est la voie des IFN. En effet, plus de la moitié des variants associés au lupus se retrouvent impliqués dans la voie de l'interféron (**Bronson *et al.*, 2012**). Cette voie fait intervenir de nombreux facteurs de transcription dont les "Interferon Regulatory Factors" ou IRF. Ces derniers jouent un rôle non seulement dans la production des IFN mais également dans la réponse à ces derniers. Des mutations dans le gène *Irf5*, codant pour le facteur de transcription IRF5, ont été associées au LED (**Lazzari *et al.*, 2014**). Ces dernières entraînent une augmentation de la synthèse et de la stabilité de l'Acide RiboNucléique messenger (ARNm) d'*Irf5*, aboutissant alors à une prolongation de la réponse inflammatoire et à une rupture de tolérance. En plus de cela, IRF5 a été décrit comme impliqué dans la différenciation des macrophages, la commutation de classe en IgG et le processus d'apoptose. Ces autres fonctions peuvent également expliquer pourquoi la mutation de son gène peut jouer un rôle dans le développement de la pathologie lupique. Un second exemple de gène de l'immunité innée dont

la mutation favorise la survenue du lupus est *Itgam*. Il code pour la protéine "InTeGrin subunit alpha M" (ITGAM) qui est une sous-unité du récepteur au complément (CR, "Complement Receptor") 3 se trouvant exprimé par les polynucléaires neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques (DC). Ce récepteur joue un rôle dans la phagocytose, via l'opsonisation par les molécules du complément, et dans l'adhésion des leucocytes. Des SNP dans ce gène sont associés au développement du lupus, ils induisent une déstructuration du récepteur CR3 engendrant une perte d'affinité de ce dernier et une diminution de la phagocytose (**Roberts et al., 2014**).

3. Mutations affectant l'immunité adaptative.

Le lupus étant une pathologie fortement médiée par les auto-anticorps et les complexes immuns, il apparaît clairement que des mutations provoquant des dysfonctionnements au niveau de l'immunité adaptative peuvent jouer un rôle dans le développement de la pathologie (**Figure 5**).

Des mutations dans les gènes impliqués dans le développement et la signalisation des LB sont en grande partie responsables de la rupture de tolérance et de la production massive d'auto-anticorps caractéristiques du lupus. Le gène codant pour la protéine "B Lymphocyte Kinase" (BLK) en est un exemple. Cette protéine est impliquée dans la signalisation du BCR ("B cell Receptor") et le développement des LB. Divers SNP ont pu être associés à une diminution de BLK et au développement du lupus (**Hom et al., 2008**). Ces derniers réduisent l'activité du promoteur du gène codant pour BLK, diminuant ainsi son expression. Le lien entre cette diminution de BLK et le développement de la pathologie n'est pas totalement élucidé mais cela semblerait affecter le processus de tolérance des LB et serait responsable d'une accumulation de lymphocytes du type B1 accompagnée d'une augmentation des auto-anticorps et d'une infiltration des reins par ces LB (**Wu et al., 2015**).

Outre les LB, les lymphocytes T jouent également un rôle dans la mise en place de l'immunité adaptative et dans le développement du lupus. Ces derniers s'activent suite à la reconnaissance par le TCR ("T Cell Receptor"), exprimé à leur surface, du complexe peptide-Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) présent à la surface de toutes les cellules nucléées (CMH de classe I) ou des cellules présentatrices d'antigène professionnelles (CMH de classe II). Cette reconnaissance donne lieu, via la signalisation du TCR, à l'activation, la prolifération et la différenciation de ces LT. Des polymorphismes dans le locus du CMH vont donc influencer la présentation de peptides aux LT, moduler leur activation et influencer sur la réponse immunitaire. Il est donc évident que ces polymorphismes jouent un rôle primordial

dans la rupture de tolérance des LT au cours du lupus. C'est ce qui a été montré chez l'Homme : de nombreuses mutations ont été retrouvées au locus du CMH et ce dernier est celui qui montre la plus forte association avec la pathologie lupique, en particulier HLA-DR3 et HLA-DR5 (**Smolen et al., 1987**).

B) Le rôle de l'épigénétique dans le développement du LED.

Bien que le rôle des gènes de susceptibilité dans la survenue de la maladie lupique (comme dans d'autres pathologies auto-immunes) soit clairement établi, la génétique à elle seule ne peut pas expliquer la survenue du lupus et que d'autres facteurs tels que l'épigénétique entrent en jeu (**Bjorsson et al., 2002**). L'une des preuves de son importance vient du fait que la concordance n'est que de 60% au maximum entre jumeaux monozygotes concernant le LED alors que ces individus partagent strictement le même patrimoine génétique. Et c'est là que l'épigénétique prend tout son sens : elle consiste en effet en des modifications stables et héréditaires ne faisant intervenir aucune modification de la séquence d'ADN et qui peuvent varier au sein d'un même être vivant. L'épigénétique comprend les modifications de l'ADN (par méthylation), les modifications des histones et la modulation de l'expression génique par l'intervention de petits ARN régulateurs.

1. Les modifications de l'ADN au cours du lupus.

Les modifications épigénétiques touchant directement les brins d'ADN consistent en la méthylation et la déméthylation de l'ADN et font intervenir des enzymes nommées "DNA Methyl-Transferases" ou DNMT. Elles permettent le transfert de groupements méthyl sur les brins d'ADN, en particulier au niveau des îlots CpG, entraînant une répression de l'expression de la transcription. Dans le cadre du LED, il a été montré que des LT isolés du sang de patients lupiques présentaient une hypométhylation de l'ADN (**Richardson et al., 1990**). Toujours en faveur de cet argument, il a été démontré que des drogues agissant sur le niveau de méthylation de l'ADN, plus précisément en induisant une diminution du niveau de méthylation, pouvaient mener au développement d'une pathologie du type lupus-like. Concernant les LT de patients lupiques, des études ont montré que ce changement du statut de méthylation était associé à une augmentation d'expression de certains gènes. Par exemple, cette baisse de méthylation est associée à une augmentation d'expression du gène codant pour la perforine chez les LT CD (Cluster de Différenciation) 4⁺ et serait donc partiellement responsable de la destruction autologue des monocytes (**Kaplan et al., 2004**). Un autre exemple chez ces LT est l'augmentation d'expression du gène codant pour CD70 qui aboutit à une augmentation de la stimulation des LB (**Lu et al., 2005**). Pour terminer, il a été démontré qu'une déméthylation au

niveau du gène codant pour CD40L, situé sur le chromosome X inactif, permet sa réactivation dans les LT de patients atteints de lupus (**Lu et al., 2007**).

2. Les modifications des histones influencent l'expression de gènes au cours du LED.

Le second type de modification épigénétique ne se fait pas directement sur l'ADN mais au niveau de protéines qui lui sont étroitement associées : les histones. Ces dernières s'associent à l'ADN sous forme d'octamère pour former ce que l'on appelle des nucléosomes (ensemble ADN+octamère d'histones) qui constituent l'unité de base de la chromatine. Cette chromatine peut être sous forme condensée (hétérochromatine) ou relâchée (euchromatine). Le niveau de compactage de la chromatine influence l'expression des gènes : l'hétérochromatine est plutôt associée à des gènes peu/pas exprimés (ex : centromères et télomères au niveau des chromosomes) tandis que la forme euchromatine correspond à un état de transcription active. Cette modification d'état de la chromatine est influencée par la modification post-traductionnelle des histones. Ces modifications correspondent principalement à des méthylations, des acétylations et des phosphorylations, ces dernières vont changer la charge globale de l'histone (chargée positivement) et donc moduler son interaction avec l'ADN (chargé négativement). L'acétylation des lysines des histones est majoritairement associée à une transcription active. Dans le cas des méthylations des lysines et arginines, elles peuvent correspondre à la fois à une répression ou une activation de la transcription en fonction de l'histone et de l'acide aminé considéré. Concernant le lupus, de façon similaire à la méthylation de l'ADN, les LT CD4⁺ de patients présentent une hypoacétylation des histones H3 et H4 ainsi qu'une hypométhylation de la lysine 9 de l'histone H3 (**Hu et al., 2008**). Il est également possible d'observer, chez les patients lupiques, le développement d'auto-anticorps reconnaissant certaines modifications d'histones (comme l'acétylation de l'histone H2B) dont les taux corrélerent avec l'activité de la maladie (**Dieker et al., 2016**). Chez la souris, il a été montré que l'inhibition des histone désacétylases chez un modèle murin de lupus (la souris NZB/W) améliorait les symptômes lupiques dont la protéinurie et diminuait la proportion des lymphocytes Th17 ("T Helper 17") au profit de celle des LT régulateurs et d'une augmentation d'acétylation au niveau du locus codant pour Foxp3 ("Forkhead box P3", facteur de transcription spécifique des T régulateurs (Treg)) (**Regna et al., 2014**). Par ailleurs, des études de transcriptomique sur les LT de patients ont montré que le phénomène inverse pouvait également être impliqué dans la pathologie lupique. Ces études ont montré qu'une augmentation de l'acétylation de certaines histones était associée à une augmentation d'expression de divers gènes tels que l'interleukine 17 (IL17) et le "Tumor Necrosis Factor

alpha" (TNF α), que l'on connaît comme impliqués dans la physiopathologie du lupus (Apstolidis *et al.*, 2013). Un dernier exemple concerne cette fois-ci, une augmentation de méthylation des histones. Une augmentation de la tri-méthylation de la lysine 27 sur l'histone H3 va aboutir à une diminution de l'expression de *Hpk1*. Ce gène code pour la protéine Hematopoietic Progenitor Kinase 1 qui est une kinase activée suite à l'engagement du TCR, régule négativement l'activation des LT et permet de contrôler les réponses immunitaires T dépendantes. La diminution de l'expression de HPK1 aboutit donc à une hyperactivation des LT et à une augmentation de la stimulation des LB (Zhang *et al.*, 2011).

3. Les microARN et le lupus.

En plus des modifications directes de l'ADN ou des histones, l'expression des gènes peut être contrôlée par de petits ARN non codant régulateurs. Chez les mammifères, les principaux ARN régulateurs impliqués dans la régulation de l'expression génique sont les micro-ARN. Ces derniers sont de petits ARN longs de 21 à 25 nucléotides capables de moduler l'expression des gènes en affectant soit la stabilité de l'ARNm et en induisant sa dégradation, soit en empêchant la traduction de cet ARNm. Un nombre croissant de publications a démontré leur importance dans la régulation des réponses immunitaires et dans la survenue de maladies auto-immunes. Concernant le LED, des études ont montré que les PBMC provenant de patients lupiques présentent une diminution de l'expression du micro-ARN 146a (miR-146a). Ce dernier est induit par de nombreux stimuli inflammatoires et agit comme un rétrocontrôle négatif afin de diminuer l'inflammation et de stopper la réponse immunitaire. Etant capable de réguler des facteurs tels qu'IRF5 et STAT1, la diminution de ce micro-ARN en conditions lupiques mène à une activation accrue de la voie des IFN de type I dans les PBMC et contribue ainsi à la signature interféron que l'on observe au cours de la maladie (Tang *et al.*, 2009).

A l'inverse, d'autres micro-ARN sont augmentés au cours du LED. Le micro-ARN miR-21 a été impliqué dans de nombreux processus pathologiques dont le développement de tumeurs, et a été décrit comme augmenté dans les LT CD4⁺ circulants chez les patients lupiques. Cette hausse d'expression engendre une hyperprolifération des LT, une augmentation de l'expression de CD40L et de l'IL10, et aboutit à une plus forte capacité d'aide à la différenciation des LB en plasmocytes (Stagakis *et al.*, 2011). L'altération de l'expression de ce micro-ARN participe donc à l'apparition du phénotype activé des LT au cours du LED et au développement de réponses B aberrantes. Un autre micro-ARN, à savoir le miR-155, semble avoir la faculté de réguler négativement l'enzyme AID ("Activation-Induced cytidine Deaminase") (Zan *et al.*, 2013) ce qui suggérerait plutôt une diminution de ce dernier en

conditions lupiques étant donné la forte activité d'AID au cours de cette maladie. En réalité, contrairement à ce que l'on peut penser, le miR-155 se trouve être en fait, comme le miR-21, augmenté en cas de lupus. Ce dernier est augmenté dans les Treg chez la souris MRL/lpr ce qui expliquerait en partie leur faibles capacités suppressives (**Divekar et al., 2011**), de plus, sa suppression permet de diminuer la réponse pathogénique médiée par les auto-anticorps chez ce modèle murin (**Thai et al., 2013**). De plus, dans un modèle de glomérulonéphrite à croissant, ce micro-ARN semble médier la réponse Th17 pathologique (**Krebs et al., 2013**). Au vu de ces différents résultats, le miR-155 pourrait être impliqué dans la balance Th17/Treg qui se trouve être altérée au cours du lupus (point qui sera détaillé plus tard dans ce manuscrit)

Pour finir, les LB peuvent également présenter une dérégulation intrinsèque de certains micro-ARN. L'un d'entre eux, le miR-1246, a été démontré comme diminué dans les LB de patients présentant un lupus. La diminution de l'expression de ce micro-ARN engendre une baisse de la dégradation de l'ARNm du facteur EBF1 ("Early B Cell Factor 1") (**Luo et al., 2015**). Ce dernier étant impliqué dans le développement, l'activation et la prolifération des LB, son augmentation en condition lupique contribue à l'hyperactivation des LB qui est l'une des caractéristiques de la pathologie.

C) Les facteurs environnementaux impliqués dans le développement du LED.

Même si l'on connaît de nombreux gènes prédisposant au lupus et que le rôle de l'épigénétique n'est plus à démontrer, d'autres facteurs environnementaux peuvent favoriser la survenue du lupus en jouant sur l'expression des gènes ou les modifications épigénétiques ou en activant directement le système immunitaire de manière non contrôlée. Ces facteurs sont nombreux et comprennent divers agents physico-chimiques mais également des agents biologiques intrinsèques et extrinsèques comme les hormones et les pathogènes (**Figure 6**).

1. Les rayonnements ultraviolets.

Les ultraviolets (UV) peuvent jouer de nombreux rôles : bien qu'ils soient nécessaires pour la production de vitamine D, ils présentent de nombreux effets néfastes dont leur capacité à induire la mort cellulaire ou des mutations au niveau de l'ADN. Les patients lupiques présentent une photosensibilité non négligeable et sont en particulier sensibles aux UVA et UVB. Ces rayonnements participent au développement des atteintes cutanées et peuvent induire des poussées de la maladie (**Bijl et al., 2006**). Ils sont impliqués dans la physiopathologie du lupus par deux effets principaux. Premièrement, de par leur capacité à induire des cassures double-brin au niveau de l'ADN, ils présentent un effet mutagène non négligeable et peuvent donc être responsable de l'apparition de mutations prédisposant au lupus. Leur autre rôle dans

le développement du lupus est que les UV peuvent induire l'apoptose des kératinocytes (et d'autres cellules dans le derme) ce qui permet le relargage de nombreux auto-antigènes ainsi que de cytokines pro-inflammatoires dans la circulation (**Caricchio et al., 2003**). En effet, à faible dose ces rayons UV induisent une apoptose normale ne s'accompagnant pas de réponse inflammatoire, en revanche à plus forte dose il y a augmentation de la fragmentation de l'ADN, augmentation de la sécrétion d'IL1, le tout pouvant même aboutir à la nécrose.

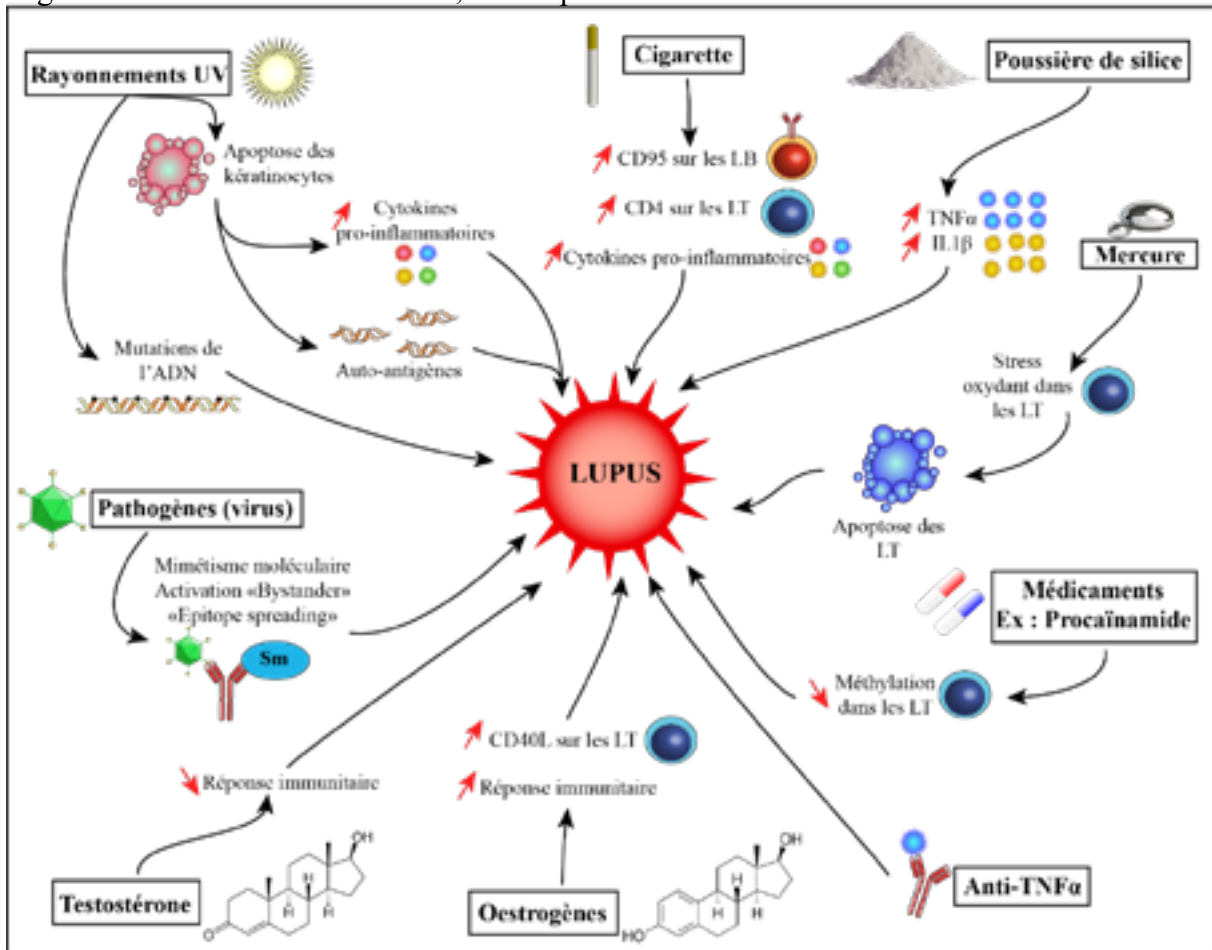


Figure 6 : Les facteurs environnementaux et le lupus.
 Il existe de très nombreux facteurs environnementaux qui peuvent influencer la survenue d'un lupus. Les rayons UV causent l'apoptose des kératinocytes et stimulent le relargage d'auto-antigènes mais également favorisent la survenue de mutations au niveau de l'ADN. Les pathogènes (en particulier les virus du type EBV et CMV) stimulent le système immunitaire et promeuvent la rupture de tolérance. Les hormones, quant à elles, modulent la réponse immunitaire en ayant des effets immunosuppresseurs ou immunostimulateurs. Enfin, de nombreux composés ou médicaments peuvent stimuler la réponse immunitaire ou engendrer un stress cellulaire favorisant l'activation de l'immunité et la rupture de tolérance.

2. La cigarette et les polluants.

De nombreux agents chimiques sont connus pour avoir des effets sur la susceptibilité à développer un lupus, tels que l'exposition à la fumée de cigarette ou divers polluants. Concernant la fumée de cigarette, même si les études ne sont pas totalement claires, il y aurait un lien entre le fait de fumer et le risque de développer un lupus (**Costenbader et al., 2005**). L'exposition à la fumée de cigarette semble induire une augmentation de l'expression de CD95

à la surface des LB, de CD4 à la surface des LT ainsi que des cytokines pro-inflammatoires, participant ainsi à la forte activation du système immunitaire observée lors du lupus (**Arnson et al., 2010**).

Outre la fumée, divers polluants peuvent favoriser la survenue d'un lupus. Les personnes travaillant dans le milieu rural peuvent être exposées aux cristaux/à la poussière de silice. Ces derniers sont connus comme agissant tels que des adjuvants et induisent la production d'IL1 et de TNF α , les personnes exposées ont alors plus de risques de développer un lupus que celles qui ne l'ont jamais été (**Finckh et al., 2006**). Un autre composé, le mercure, est capable d'induire un stress oxydant chez les LT et peut engendrer leur apoptose. Il n'est alors pas étonnant qu'il ait été montré comme capable d'induire la production d'auto-anticorps antinucléaires et le dépôt de complexes immuns au niveau du mésangium chez des souris génétiquement susceptibles (**Abedi-Valugherdi et al., 2000**). De manière intéressante, les mineurs d'or brésiliens qui ont été exposés au mercure, présentent des taux plus élevés d'auto-anticorps antinucléaires que le reste de la population (**Gardner et al., 2010**).

3. Les agents pathogènes.

En plus des agents physiques et chimiques, des agents biologiques peuvent également participer à la mise en place de la maladie lupique. Il a par exemple été montré que la séropositivité pour le virus d'Epstein Bar (EBV) était plus élevée chez les adultes ou les enfants atteints de lupus que dans le reste de la population (**James et al., 1997**). Ces pathogènes peuvent agir sur la survenue du lupus par trois mécanismes principaux. Le premier correspond au mimétisme moléculaire, cela se produit lorsqu'il y a une forte ressemblance (au niveau de la structure ou de la séquence) entre les antigènes du virus et certains antigènes du soi. Les anticorps dirigés contre le virus vont alors être capables de reconnaître des éléments du soi et induire une rupture de tolérance. Dans le cas de l'EBV, il y a des épitopes communs entre la protéine EBNA-1 ("Epstein-Barr virus nuclear antigen-1") du virus et les protéines Sm (Smith) et Ro (**Harley et al., 2006**), l'infection virale va donc potentialiser la production des auto-anticorps anti-Sm et anti-Ro. Il existe d'ailleurs une association entre les taux d'anticorps dirigés contre des composants du virus et les taux d'anticorps anti-ADNdb (**Chougule et al., 2018**). Le second mécanisme est nommé activation "bystander", cela se produit lorsque les cellules de l'immunité innée (telles que les cellules présentatrices d'antigène) sont activées par les pathogènes, elles vont alors relarguer des cytokines et créant un environnement inflammatoire qui va potentialiser l'activation des cellules auto-réactives. Un exemple de ce phénomène est qu'une infection bactérienne chronique est suffisante pour activer les cellules

auto-réactives qui, en présence de leur antigène, pourront entamer le processus de maturation d'affinité (**Jung et al., 2016**). Et enfin, le dernier mécanisme est appelé "epitope spreading", il correspond à la diversification de la spécificité des épitopes reconnus lors de la réponse immunitaire sans qu'il y ait besoin de mimétisme moléculaire. La réponse immunitaire initiale, qui est dirigée contre un nombre restreint d'épitopes, va engendrer une inflammation aigüe et des dommages tissulaires permettant alors le relargage et la présentation d'antigènes qui n'étaient pas initialement ciblés par la réponse immunitaire (en particulier des antigènes du soi). Un autre exemple de virus est celui du cytomégalo virus (CMV) qui induit une production d'anticorps antinucléaires par mimétisme moléculaire et "epitope spreading" (**Söderberg-Nauclér et al., 2012**). Ce virus est également capable d'induire une réponse inflammatoire dans les LT de patients lupiques (**Janahi et al., 2018**).

4. Les médicaments et les hormones.

Pour finir nous allons aborder le rôle de la médication et des hormones dans le développement du LED.

Pour commencer, il existe des lupus que l'on qualifie de médicamenteux. Ils correspondent à des lupus déclenchés par la prise médicamenteuse que ce soit dans le cadre d'un traitement pour une autre pathologie auto-immune ou non. Un premier exemple est celui du procainamide. Cette molécule est utilisée pour ses propriétés anti-arythmiques mais est également capable d'induire une baisse de méthylation dans les LT (**Scheinbart et al., 1991**) et de déclencher ainsi la survenue d'une pathologie de type lupique. Un autre exemple très connu est celui de l'utilisation des anticorps anti-TNF α (etanercept). Le blocage de cette cytokine pro-inflammatoire permet de diminuer la réponse inflammatoire aigüe et de rétablir une homéostasie normale, il est entre-autres utilisé dans le cadre du traitement de la PR. Cependant, l'utilisation de ces anti-TNF induit la production d'auto-anticorps et en particulier anti-ADN et anti-cardiolipine et peut être responsable de la survenue d'un lupus (**Zhu et al., 2010**).

Enfin, il est bien connu que la pathologie lupique touche préférentiellement les femmes, cela peut bien sûr être attribué à la génétique (réactivation/duplication de certains gènes sur le chromosome X) mais les hormones jouent également un rôle non négligeable dans ce dimorphisme sexuel. Un premier élément allant dans ce sens est que les femmes atteintes de lupus ne le déclarent qu'après la puberté et en général avant la ménopause. Ensuite, les hormones mâles présentent des fonctions en faveur de l'immunosuppression, d'où un potentiel effet protecteur. Pour finir, des études ont démontré le potentiel immunostimulateur des

hormones femelles et notamment des œstrogènes. Cela a été démontré chez des souris lupiques NZB/W n'exprimant pas le récepteur aux œstrogènes, ces dernières présentent une diminution des auto-anticorps anti-histones, anti-ADNdb, une néphrite atténuée ainsi qu'une survie accrue (**Bynoté *et al.*, 2008**). Il a également été montré que les œstrogènes étaient capables d'augmenter la calcineurine et ainsi d'augmenter l'expression de CD40L à la surface des LT de patients lupiques (**Rider *et al.*, 2001**).

V-La physiopathologie du lupus.

Les causes du lupus étant multiples, il est difficile d'établir un schéma clair concernant la mise en place de la pathologie. Il est clair que ce sont diverses prédispositions génétiques qui en se combinant à différents facteurs environnementaux influencent la survenue de la maladie lupique (**Figure 4**). En premier lieu, ces différents facteurs mènent à un excès d'apoptose qui, combiné à un défaut de clairance des corps apoptotiques et des complexes immuns, permet le relargage et l'exposition de nombreux signaux de danger et d'auto-antigènes (tel que l'ADN) et à la mise en place d'un environnement inflammatoire. Ces divers signaux vont permettre d'activer la première ligne de défense que représente l'immunité innée. La reconnaissance des signaux de danger, comme les acides nucléiques, par les cellules de l'immunité innée va mener à leur activation, amplifiant d'une part la réponse inflammatoire mais permettant également la présentation d'antigènes aux cellules de l'immunité adaptative. L'activation des LT et LB autoréactifs va permettre la génération d'une réponse dirigée contre les auto-antigènes désormais accessibles avec notamment la production d'auto-anticorps qui formeront des complexes immuns et qui vont non seulement participer aux nombreux dommages tissulaires mais également amplifier la réponse immunitaire.

A) Régulation anormale de l'apoptose et exposition de l'ADN.

En situation physiologique, l'apoptose est une mort cellulaire programmée qui permet de maintenir l'homéostasie tissulaire et empêche la survie de cellules qui auraient accumulé trop de dommages/mutations et deviendraient dangereuses pour l'organisme (**Elmore, 2007**). Le processus d'apoptose met en jeu une contraction des cellules, une condensation du noyau et une fragmentation de l'ADN, le tout menant à la formation de structures nommées corps apoptotiques, dans lesquels sont empaquetés les acides nucléiques et autres composants cellulaires et qui seront éliminés par phagocytose sans provoquer d'inflammation ou de réponse immunitaire (**Voll *et al.*, 1997**). Elle peut être induite par de nombreux signaux extra comme intracellulaires et fait intervenir les protéines de la famille des caspases qui vont alors cliver de diverses protéines impliquées dans divers processus dont la fragmentation de l'ADN. Bien

qu'étant un processus nécessaire, une dérégulation de l'apoptose peut avoir des conséquences néfastes pour l'organisme.

1. Apoptose excessive en conditions lupiques.

Lorsque les cellules apoptotiques sont en nombre restreint, les corps apoptotiques sont facilement éliminés par les macrophages au niveau du lysosome et cette élimination s'accompagne d'une sécrétion de cytokines anti-inflammatoires comme le TGF β ("Transforming Growth Factor beta") ou l'IL10. En revanche lorsque les cellules apoptotiques se retrouvent en excès, les corps apoptotiques ne peuvent pas être éliminés suffisamment rapidement et évoluent alors vers un stade de cellules nécrotiques secondaires qui sont quant à elles, caractérisées par une perte de l'intégrité de la membrane plasmique et qui vont donc permettre le relargage du contenu cellulaire et l'activation de l'inflammation et du système immunitaire (Wyllie *et al.*, 1980).

De nombreux facteurs peuvent contribuer à la survenue d'une apoptose excessive. En premier lieu, comme mentionné précédemment (**paragraphe IV-C-1, page 21**), une exposition à de fortes doses de rayonnements UV va induire une apoptose massive des kératinocytes qui ne pourra plus être suffisamment prise en charge et aboutira au relargage du contenu cellulaire et à une inflammation (Caricchio *et al.*, 2003). Les infections par divers pathogènes peuvent également contribuer à l'apoptose excessive en induisant directement l'apoptose par la production de composés pro-apoptotiques tels que des protéines formant des pores dans la membrane ou des enzymes actives dans le cytosol de la cellule hôte (Weinrauch *et al.*, 1999) ou indirectement par la reconnaissance et la lyse des cellules infectées par le système immunitaire. De plus, de nombreuses protéines impliquées dans le processus d'apoptose ont été démontrées comme surexprimées au cours du lupus telles que Fas, Bax ("BCL2-Associated X protein") ou encore la caspase 3 (Cui *et al.*, 2012). Un exemple en particulier est celui de la protéine p53, cette dernière est augmentée en réponse au stress et notamment aux dommages à l'ADN. Elle agit alors en arrêtant le cycle cellulaire le temps que les mécanismes de réparation de l'ADN puissent officier ou, si les dégâts sont trop importants, elle déclenche le processus d'apoptose. Une augmentation de cette protéine a été décrite au cours du LED et plus précisément, le locus codant pour cette dernière se trouve être hypométhylé dans les lymphocytes de patients lupiques menant donc à sa surexpression (Zhao *et al.*, 2014) et à une apoptose accrue de ces cellules.

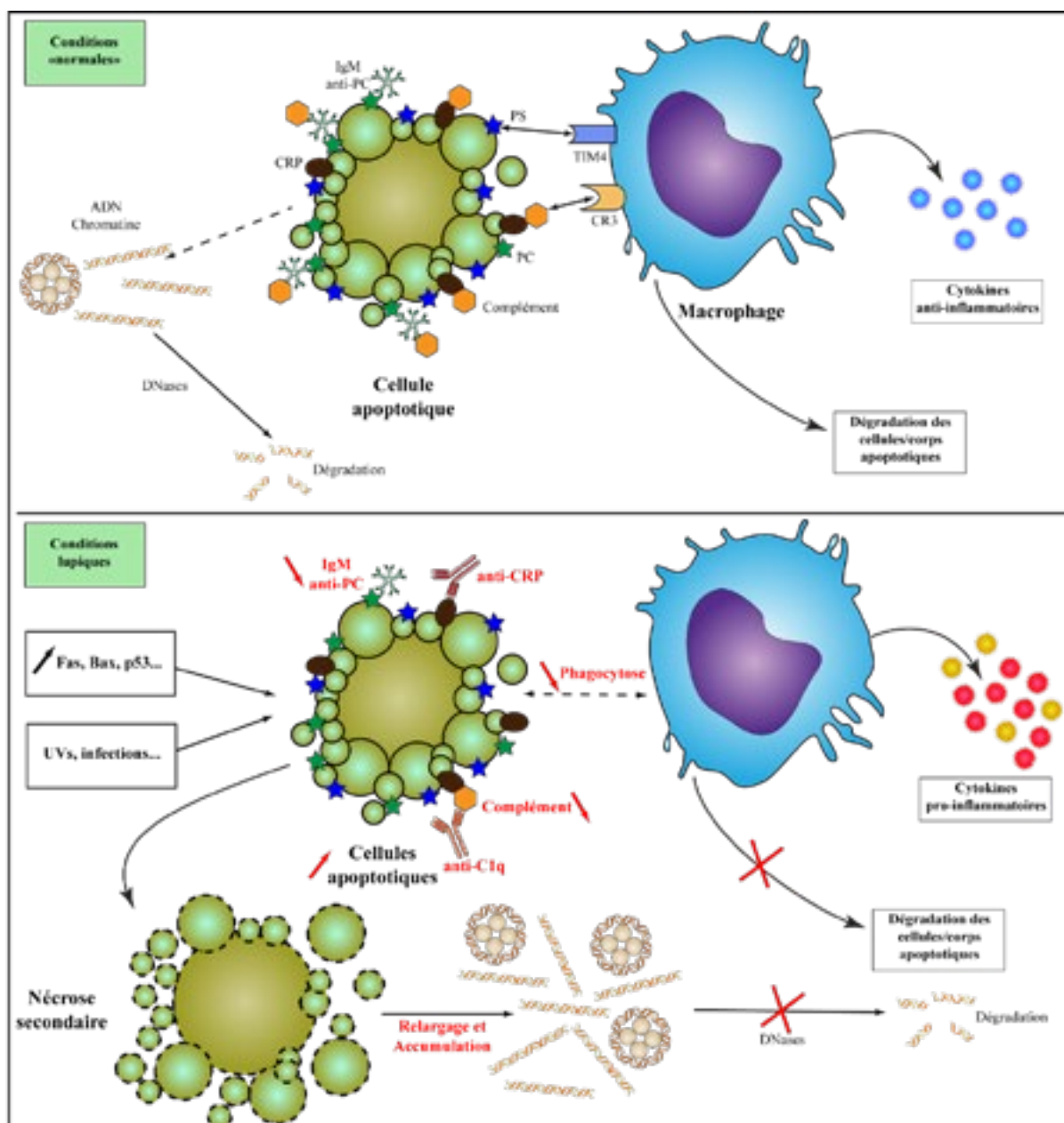


Figure 7 : Dérégulation de la mort cellulaire au cours du lupus.

En conditions «normales», les cellules apoptotiques présentent des signaux permettant leur reconnaissance par les phagocytes tels que les macrophages, comme par exemple l'exposition à la surface de leur membrane de phospholipides, telles que la phosphatidylsérine (PS) ou la phosphorylcholine (PC). Ces phospholipides exposés en surface vont également médier la fixation d'IgM naturelles, du complément ou encore d'autres molécules comme la CRP, qui favorisent la phagocytose de ces corps apoptotiques, leur dégradation et la production de cytokines anti-inflammatoires. De plus, les acides nucléiques présents dans le milieu extracellulaire ou intracellulaire sont alors dégradés par des DNases afin de prévenir l'activation du système immunitaire.

En conditions lupiques, on observe une apoptose excessive en raison de la dérégulation de nombreux gènes et de l'exposition à divers facteurs environnementaux comme les UV ou les infections. De plus, des déficiences en complément, en IgM naturelles ainsi que la présence d'anticorps ciblant le complément ou encore la CRP, vont s'associer à une capacité de phagocytose diminuée, engendrant ainsi une mauvaise prise en charge des corps apoptotiques et orienter les macrophages vers une production de cytokines pro-inflammatoires. Ces cellules apoptotiques non dégradées vont entrer en nécrose secondaire, stade propice au relargage du contenu cellulaire riche en acides nucléiques qui ne pourront être dégradés efficacement à cause de déficiences au niveau de gènes codant pour les DNases.

2.Lupus : une mauvaise prise en charge des corps apoptotiques ?

Outre l'excès d'apoptose, les mécanismes de prise en charge et d'élimination des corps apoptotiques se retrouvent également impactés au cours du LED (**Figure 7**). Lorsque les cellules entrent en apoptose, des modifications ont lieu au niveau de la membrane plasmique et notamment, la phosphatidylsérine (PS) va se retrouver exposée du côté extérieur de la membrane plasmique. Cette relocalisation de la PS est perçue comme un signal "eat me" et va permettre la reconnaissance des corps apoptotique par les macrophages, leur ingestion et leur dégradation.

a) Une mauvaise phagocytose des corps apoptotiques.

Concernant tout d'abord l'ingestion des cellules apoptotiques, il a été montré que l'activité phagocytaire des macrophages était diminuée chez les patients lupiques et qu'ils posséderaient une plus faible capacité à ingérer les débris apoptotiques (**Herrmann *et al.*, 1998**). Cette baisse d'activité semble provenir d'un défaut au niveau de la différenciation en cellule phagocytaire. Des études ont pu en effet démontrer que les cellules souches hématopoïétiques circulantes chez les patients lupiques, bien que ne présentant pas de défaut au niveau de la mort ou du cycle cellulaire, présentent un défaut au niveau de leur morphologie et de leurs adhésions cellulaires lorsque qu'elles se différencient en cellules adhérentes (**Muñoz *et al.*, 2010**). Ces défauts phénotypiques ont également été associés à une plus faible capacité à phagocyter des billes recouvertes d'IgG, expliquant alors en partie le défaut de phagocytose des corps/cellules apoptotiques au cours du LED. Un parfait exemple de l'impact de ce processus est le cas des macrophages à corps tingibles ("Tingible Body Macrophages" ou TBM). Ces TBM sont retrouvés au niveau du centre germinatif (GC pour "Germinal Center") et ont pour rôle la prise en charge et la dégradation des corps apoptotiques afin d'éviter leur accès au GC. Dans le cas du LED, ces macrophages se trouvent être plus petits et présentent une moindre activité de phagocytose. Les corps apoptotiques se retrouvent alors moins dégradés et peuvent pénétrer dans le GC où ils pourront promouvoir la rupture de tolérance et la génération de réponses spécifiques d'auto-antigènes (**Baumann *et al.*, 2002**). Un cas particulier de phagocytose impliquée dans la prise en charge et la dégradation du matériel cellulaire relargué suite à l'apoptose est la phagocytose associée à LC3 ("microtubule-associated protein 1A/1B-Light Chain 3") (ou LAP, "LC3 Associated Phagocytosis"). Ce mécanisme représente une forme non canonique d'autophagie (processus par lequel la cellule peut dégrader ses propres composants) et est induit suite à la reconnaissance des corps apoptotiques par les macrophages. La reconnaissance des PS exposées à la surface des cellules apoptotiques par la protéine TIM4

("T-cell Immunoglobulin- and Mucin-domain-containing molecule 4") va permettre la conjugaison de la protéine LC3 a la surface du phagosome et la formation d'une structure appelée le "LAPosome", ce dernier va alors fusionner avec le lysosome et permettre la dégradation du matériel phagocyté. L'importance de ce processus a été démontré chez la souris. Les animaux présentant une incapacité à recourir à la LAP présentent des anticorps anti-ADN, une glomérulonéphrite ainsi qu'une signature interféron (**Martinez *et al.*, 2016**). Chez ces souris, les macrophages sont toujours capables d'internaliser les cellules en apoptose mais ne peuvent pas les dégrader aboutissant à une inflammation, au contraire des macrophages "normaux" qui, suite à l'ingestion et à la dégradation des corps apoptotiques, vont sécréter des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL10.

b) Un problème d'opsonisation ?

Avant d'être ingérés par les phagocytes, les corps apoptotiques doivent présenter des signaux permettant le recrutement des macrophages et leur reconnaissance par ces derniers. Les IgM et le complément sont de très fortes opsonines et vont favoriser la phagocytose de nombreux composés dont les cellules apoptotiques. Il existe de nombreuses IgM produites naturellement dans l'organisme dont certaines sont impliquées dans l'élimination des débris apoptotiques, telles que les IgM anti-phosphorylcholine (PC). Ces IgM permettent un recrutement des molécules précoces de la voie du complément et des lectines liant le mannose, médiant la mise en place d'une synapse entre le phagocyte et le corps apoptotique et donc permettant une meilleure phagocytose. Dans le cadre du LED, ces IgM naturelles anti-PC sont diminuées dans le sérum de patients, conduisant alors à un nombre plus élevé de cellules mourantes/mortes dans la circulation (**Grönwall *et al.*, 2012**). De plus, les patients présentant de plus faibles taux de ces IgM développent des atteintes cardiovasculaires tandis que ceux présentant un taux élevé ont un SLEDAI plus faible, montrant ainsi l'implication de ces IgM naturelles dans la pathogénèse du lupus. Les molécules du complément interviennent également dans le processus d'opsonisation et en particulier la molécule C1q, qui représente l'une des plus fortes opsonines. C'est pourquoi la déficience en C1q est l'une des mutations capables de causer à elle seule un lupus (lupus monogénique). En plus d'une déficience, cette molécule peut également être neutralisée par les anticorps anti-C1q que l'on peut retrouver dans le sérum d'un grand nombre de patients lupiques chez qui leur taux corrèle avec le développement de la néphrite lupique (**Trendelenburg *et al.*, 2006**). Bien que le phénotype soit moins apparent que dans le cas de la molécule C1q, il est également possible de retrouver chez les patients des déficiences pour les molécules C4 et/ou C2 (**Meyer *et al.*, 1985**) mais qui ne peuvent à elles

seules déclencher la survenue du lupus. Chez la souris, en revanche, la déficience en molécule C4 va entraîner un délai de clairance des complexes immuns circulants et causer une pathologie de type lupus accompagnée d'une production d'auto-anticorps antinucléaires (**Chen *et al.*, 2000**). De plus, même si certains patients ne présentent pas de défauts génétiques concernant les molécules du complément, ces dernières se retrouvent consommées au cours de la pathologie ce qui se traduit par une baisse de leur taux au niveau sérique et renforce la mauvaise élimination des corps apoptotiques. Un autre exemple de molécule impliquée dans la reconnaissance et l'élimination des corps apoptotiques est celui de la protéine C réactive (CRP). Cette dernière est capable de se fixer sur les débris apoptotiques et augmente l'activité de la voie classique du complément. Au cours du LED, elle se retrouve à des taux plus faibles dans le sérum suite à la suite d'une phase de poussée (du fait de sa consommation suite à la forte inflammation) mais elle peut également être la cible d'anticorps anti-CRP que l'on peut retrouver chez certains patients lupiques. Ces anticorps ne se fixent que sur la version liée à la membrane de la CRP et lorsque les complexes corps apoptotiques-CRP-anti-CRP sont phagocytés par les macrophages, ils induisent cette fois une réponse pro-inflammatoire au contraire du processus naturel d'élimination de corps apoptotiques (**Janko *et al.*, 2011**).

c) Une plus faible dégradation des acides nucléiques en contexte lupique.

Enfin, que ce soit après leur phagocytose ou lorsqu'ils se retrouvent dans le milieu extracellulaire, les débris apoptotiques doivent être dégradés pour prévenir leur reconnaissance et l'activation du système immunitaire. Afin d'effectuer ce processus, ce sont notamment les DNases qui sont mises à contribution. Tout d'abord la DNase I est responsable de la dégradation de la chromatine extracellulaire et intervient de ce fait dans la dégradation des NET ("Neutrophil Extracellular Traps"), dont nous parlerons un peu plus loin, mais également dans la dégradation de la chromatine relarguée par les cellules en nécrose secondaire. Cette enzyme joue donc un rôle primordial pour empêcher l'activation de l'immunité lorsque les mécanismes d'élimination des corps apoptotiques se retrouvent saturés et incapable de les éliminer suffisamment rapidement. Au vu de son importance, il n'est pas surprenant que sa perte de fonction représente l'une des causes de lupus monogénique. De plus chez la souris lupique NZB/W, son expression a été démontrée comme diminuée spécifiquement au niveau des reins et jouerait un rôle prépondérant dans le développement de la néphrite lupique (**Seredkina *et al.*, 2011**). Il existe d'autres DNases impliquées dans la dégradation de l'ADN provenant de l'apoptose telle que la DNase II. Cette enzyme intracellulaire est retrouvée dans les macrophages au niveau des lysosomes et permet donc la dégradation de l'ADN après la

phagocytose. Elle prévient l'auto-toxicité due aux IFN en dégradant l'ADN présent dans les phagolysosomes et en empêchant alors sa reconnaissance par les récepteurs intracellulaires et la synthèse excessive d'IFN de type I. En revanche, bien que pouvant jouer un rôle, la mutation de cette enzyme semble plutôt mener à des interféronopathies ou à de la polyarthrite (**Rodero et al., 2017**). Pour finir, un exemple connu de DNase associée au LED est celui de la DNase III ou TREX1. Cette enzyme est une exonucléase impliquée dans la réponse au stress oxydatif et à l'apoptose et qui va dégrader l'ADN dans le cytosol à partir de son extrémité 3' et sa translocation nucléaire est induite suite à différents stimuli dont l'apoptose induite par le granzyme A. Diverses mutations dans le gène codant pour cette enzyme ont été identifiées, non seulement dans le lupus (**Lee-Kirch et al., 2007**) mais également dans d'autres pathologies auto-immunes tel que le syndrome de Sjögren (**Barizzone et al., 2013**) ; elles pourraient être responsables de sa plus faible activité et donc mener à une reconnaissance de l'ADN par le système immunitaire et ainsi à son activation.

3. Moins d'apoptose dans le lupus ?

Pour terminer, bien qu'un excès d'apoptose ou une mauvaise élimination des débris apoptotiques soit en cause dans la survenue et la progression du lupus, un défaut d'apoptose peut également participer à la physiopathologie de cette maladie. En effet, l'élimination des cellules auto-réactives au niveau central (lors du développement des LB et LT) ou en périphérie (lors de l'activation des lymphocytes et de la réaction du GC) repose sur la capacité de notre organisme à éliminer ces cellules qui représentent une menace et cela passe notamment par la mort des cellules auto-réactives par apoptose. Ainsi, une déficience en apoptose va permettre à des cellules auto-réactives d'échapper à leur élimination, ces dernières vont alors se retrouver en circulation ou dans les organes lymphoïdes secondaires et vont pouvoir s'activer suite à la reconnaissance d'auto-antigènes et participer à la rupture de tolérance et la mise en place de réponses auto-immunes. La nécessité de l'apoptose a été démontrée chez des modèles murins où la mutation de Fas (**Watanabe-Fukunage et al., 1992**) ou de son ligand FasL (**Takahashi et al., 1994**) cause un syndrome lymphoprolifératif associé à une rupture de tolérance. L'un des modèles classiques de lupus, la souris MRL lpr/lpr, associe un fond génétique prédisposant au lupus (fond MRL) avec la mutation homozygote de Fas (lpr faisant référence au syndrome lymphoprolifératif) et développe une forte lymphoprolifération associée à de nombreux auto-anticorps antinucléaires ainsi que des atteintes rénales et cutanées. De plus, outre les modèles murins, des mutations affectant négativement l'apoptose ont été retrouvées chez des patients lupiques. On retrouve des mutations affectant Fas ou son ligand (**Moudi et al., 2013**) mais

également des mutations dans d'autres protéines. Par exemple, la protéine BCL2 ("B-cell lymphoma 2", une protéine anti-apoptotique) est augmentée dans le sérum et dans les glomérules de patients lupiques (**Fathi et al., 2006**). Ces résultats semblent corroborer ceux précédemment obtenus chez la souris où, la surexpression de BCL2 dans les LB menait à une production d'auto-anticorps et au développement d'une atteinte rénale (**Strasser et al., 1991**).

Ces dérégulations de l'apoptose et de la prise en charge des corps apoptotiques (**Figure 7**) vont aboutir à l'activation de l'immunité innée via l'activation de divers récepteurs reconnaissant des signaux de danger et induire la production de nombreuses cytokines et la mise en place d'un environnement inflammatoire délétère.

B) Activation du système immunitaire inné.

Le système immunitaire inné représente la première ligne de défense de l'organisme et se base sur la reconnaissance de signaux de danger ou de motifs associés aux pathogènes permettant la mise en place d'une réponse afin d'éliminer rapidement l'agent infectieux ou endogène pouvant nuire à l'intégrité de l'organisme. Les récepteurs permettant la reconnaissance de ces motifs sont appelés "Pattern Recognition Receptors" ou PRR. Ils permettent la reconnaissance de nombreux signaux de danger (**Scharfer Liliana., 2014**), qu'ils proviennent du pathogène lui-même (ex : composants de la paroi des bactéries) ou des cellules/tissus lors d'un stress stérile, et sont exprimés aussi bien à la surface de membranes (plasmique ou endosomale) que dans le cytosol. Les conditions lupiques étant associées à diverses infections mais également à une mort cellulaire accrue et au relargage du contenu cellulaire faisant suite à la mauvaise prise en charge des cellules mourantes, il apparaît clair que les PRR vont jouer un rôle majeur dans l'activation du système immunitaire inné et les étapes précoces du développement de la maladie.

1. La reconnaissance des acides nucléiques par le système immunitaire inné.

Lorsque les cellules apoptotiques sont en nombre restreint, les corps apoptotiques sont facilement éliminés et le système immunitaire ne s'active pas. En revanche lorsque les cellules apoptotiques sont en trop grand nombre et que les acides nucléiques se retrouvent exposés, ils peuvent activer un grand nombre de récepteurs membranaires et cytosoliques (**Atianand et al., 2013**) et ainsi promouvoir l'activation du système immunitaire et la rupture de tolérance. Ces acides nucléiques peuvent avoir diverses origines dans le cas du lupus. Ils peuvent soit provenir du milieu extracellulaire lorsqu'ils sont relargués par des cellules endommagées/nécrotiques et activer les récepteurs membranaires ou provenir directement de l'intérieur même de la cellule et se lier aux senseurs cytosoliques de l'ADN/ARN. Dans le cas des acides nucléiques

intracellulaires, ils proviennent essentiellement de virus ARN ou ADN en cours de répllication dans la cellule ou de la réactivation de divers rétroéléments. Lorsque les acides nucléiques sont présents hors des cellules, il existe trois moyens leur permettant de pénétrer à l'intérieur des cellules. En premier lieu, ils peuvent être reconnus par le récepteur membranaire des LB autoréactifs et être ensuite internalisés et dirigés vers les endosomes. De la même manière, les complexes immuns contenant des acides nucléiques vont pouvoir être phagocytés via les récepteurs aux complément ou via les RfC exprimés à la surface de nombreux phagocytes. Pour finir, il est également possible dans le cas de l'ADN de pénétrer à l'intérieur des cellules sans pour autant être complexés avec des anticorps. En effet, les cellules nécrotiques relarguent une grande quantité de la molécule HMGB1 ("High Mobility Group Box 1"), cette dernière est capable de s'associer avec l'ADN et a été montré comme augmentée dans le sérum des patients lupiques et corrélée avec l'activité de la maladie et les taux d'anticorps anti-ADN (**Abdulahad et al., 2011**). Le complexe ADN-HMGB1 va être reconnu par le récepteur RAGE ("Receptor for Advanced Glycation Endproducts") exprimé à la surface des cellules de l'immunité innée, internalisé, dirigé vers les endosomes et va permettre l'activation de la cellule et la production d'IFN de type I (**Tian et al., 2007**).

a) TLR et acides nucléiques.

Le premier groupe de récepteurs capables de reconnaître les acides nucléiques sont les TLR endosomaux, à savoir TLR3, 7, 8 et 9 qui reconnaissent respectivement l'ARNdb, l'ARNsb (simple brin) (TLR7 et 8) et les séquences CpG non méthylées de l'ADN. La liaison des ligands de ces TLR va pouvoir induire à la fois la production d'IFN de type I via la phosphorylation du facteur IRF7 ou la production de cytokines pro-inflammatoires via la voie NF- κ B ("Nuclear Factor-kappa B") ou la voie des MAPK ("Mitogen Activated Protein Kinase") (**Figure 8**).

Tout d'abord TLR7, qui est spécialisé dans la reconnaissance des molécules d'ARN simple brin, a été montré comme clairement impliqué dans la pathologie lupique et ses différents variants identifiés comme des facteurs de risque (**Wang et al., 2014**). La première chose à savoir est que le gène codant pour TLR7 est un des nombreux gènes pouvant expliquer en partie le sex-ratio observé au cours du lupus. Ce dernier est en effet localisé sur le chromosome X et se retrouve transloqué sur le chromosome Y du modèle murin B6/Yaa (**Subramanian et al., 2006**). Cette translocation ne suffit pas à elle seule pour engendrer un lupus, mais lorsqu'elle est associée à autre locus de susceptibilité (Sle1 par exemple) on obtient un lupus fatal. Un modèle lupique nommé BXSB/Yaa a d'ailleurs été développé et est le seul

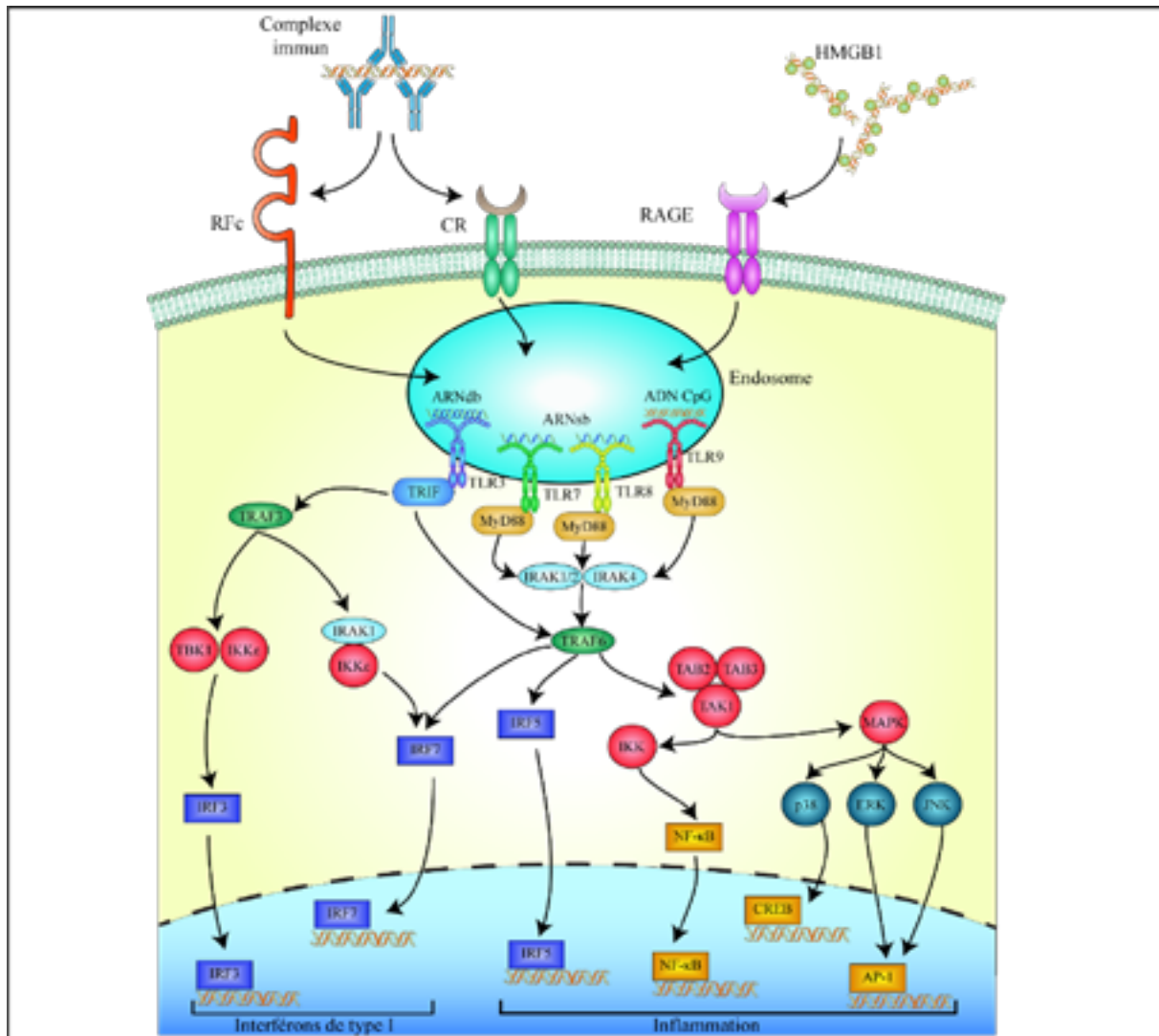


Figure 8 : Reconnaissance des acides nucléiques par les TLR endosomaux.
 Les acides nucléiques peuvent pénétrer à l'intérieur des cellules associés aux complexes immuns via les RFc ou les récepteurs au complément, ou complexés à la protéine HMGB1 via le récepteur RAGE. Ils sont alors adressés vers les endosomes où ils vont pouvoir se lier aux TLR endosomaux que sont TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9. TLR3 reconnaît l'ARN double brin tandis que TLR7 et 8 reconnaissent l'ARN simple brin. Quant à TLR9, il est capable de reconnaître les motifs CpG non méthylés que l'on retrouve notamment chez les bactéries. Ces différents TLR induisent des voies de signalisation via les protéines adaptatrices MyD88 (TLR7, 8 et 9) et TRIF (TLR3). Cette signalisation conduit à l'activation de la voie NF-κB et de la voie des MAP kinases (mais également d'autres voies passant par exemple par le facteur IRF5), aboutissant à la production de chimiokines, de cytokines pro-inflammatoires et à l'activation et la survie cellulaire. De plus, l'activation de ces TLR va permettre la production d'interférons de type I, en particulier l'interféron α, via le facteur de transcription IRF7. TLR3 est également capable d'activer le facteur de transcription IRF3 et de médier majoritairement la production d'interféron β.

où le sex ratio est cette fois en faveur des mâles, montrant l'importance de cette translocation et de TLR7. De plus, le gène *Tlr7* a été montré comme réactivé sur le chromosome X inactif chez les femmes et chez les individus mâles présentant un chromosome X surnuméraire, pouvant alors partiellement expliquer le sex-ratio observé au cours du lupus (Souyris *et al.*, 2018). Sa stimulation aggrave le lupus existant chez la souris MRL/lpr (Pawar *et al.*, 2006) et la simple application locale d'un agoniste de ce récepteur est capable d'induire un lupus chez des souris saines (Yokogawa *et al.*, 2014). Pour finir, son ARNm est augmenté dans les PBMC

de patients lupiques mais sans montrer de différences entre les différentes ethnies (**Lyn-cook et al., 2014**), montrant ainsi sa forte implication dans la maladie.

Un autre TLR endosomal qui a été fortement étudié dans le cadre du lupus est TLR9. Ce dernier reconnaît non pas l'ARN mais l'ADN, et plus particulièrement les motifs de type CpG non méthylés. Contrairement à TLR7, son rôle dans le développement du lupus reste controversé. Les premières études tendaient à montrer un rôle pathogène de TLR9 dans le lupus. Les patients présentant un lupus actif possèdent davantage de LB et de monocytes exprimant TLR9 et cela corrèle avec les taux d'anticorps anti-ADN (**Papadimitraki et al., 2006**). De plus, l'ARNm de TLR9 se trouve être globalement augmenté dans les PBMC de patients lupiques et en particulier chez ceux présentant des auto-anticorps anti-ADNdb ou une atteinte rénale (**Chauhan et al., 2013**). Toutefois, un modèle de souris lupique déficiente pour TLR9 montre une baisse des anticorps anti-ADN et anti-chromatine sans que cela n'affecte la néphrite (**Christensen et al., 2005**). Cette étude permit d'émettre un premier doute sur l'implication possible de TLR9 dans le lupus. Un peu plus tard un autre travail permit de renforcer cette idée en démontrant que les souris déficientes pour TLR9 présentaient un lupus exacerbé (**Fukui et al., 2011**). Cela s'expliquerait par le fait que TLR9 entre en compétition avec TLR7 pour l'accès aux endosomes et que son absence augmente/renforce la réponse médiée par TLR7. En revanche, si l'on supprime à la fois TLR9 et TLR7, le lupus est cette fois totalement abrogé. Pour finir, TLR9 est également impliqué dans les mécanismes de tolérance puisqu'un co-engagement du BCR avec TLR9 induit l'apoptose des LB autoréactifs. Une étude récente dans notre laboratoire suggère que les LB de patients lupiques présentent une déficience au niveau de la réponse à une stimulation de TLR9 *in vitro* et que cette déficience pourrait participer à la rupture de tolérance observée lors du lupus (**Gies et al., 2018**). Toutes ces données pointent donc un rôle plutôt protecteur de TLR9 au cours du lupus.

Bien que la plupart des études se soient focalisées sur les TLR7 et 9, les deux autres TLR endosomaux semblent également pouvoir jouer un rôle dans la physiopathologie du LED. TLR8, comme TLR7, reconnaît les molécules d'ARN simple brin et pourrait être responsable du biais sexuel observé au cours du lupus. De manière intéressante, son gène a été montré comme pouvant répondre à l'œstradiol et l'expression de ce dernier est augmentée dans les PBMC de patients lupiques. De plus, les cellules provenant de patientes montrent une plus forte expression de TLR8 en réponse à l'œstradiol (**Young et al., 2014**). Il serait alors logique de penser qu'il joue un rôle redondant avec TLR7 ; une autre étude chez un modèle de souris exprimant un BCR transgénique a d'ailleurs montré que la signalisation de ce TLR jouerait un rôle dans la rupture de tolérance et la signature interféron (**Umiker et al., 2014**). Cette étude

montrait également que seule la déficience combinée de TLR7 et TLR8 pouvait abolir la production d'auto-anticorps. Mais une autre étude semble rapprocher le rôle de TLR8 de celui de TLR9. En effet, la délétion de TLR8 chez une souris saine entraîne la survenue d'un syndrome lymphoprolifératif accompagné par la production d'auto-anticorps et le développement d'une glomérulonéphrite (**Demaria et al., 2010**). Ce phénotype n'est contrecarré que si l'on supprime également TLR7 et, de manière intéressante, les DC issues de souris n'exprimant pas TLR8 présentent une plus forte expression de TLR7, ressemblant fortement à ce qu'il est possible d'observer dans les LB dans le cas de TLR9. Pour finir, une étude plus récente (**Tran et al., 2015**) a montré que la délétion de TLR8 chez une souris de fond lupique accélère le développement de la pathologie et cause une mortalité accrue. Ces différentes études montrent alors un rôle plutôt régulateur de TLR8, comme cela semble être le cas pour TLR9. Concernant le dernier membre de la famille des TLR endosomaux reconnaissant les acides nucléiques il n'existe que très peu de données. TLR3 reconnaît l'ARN double brin et sa signalisation ne passe pas par MyD88 mais par la molécule TRIF et son activation induit une très forte production d'IFN de type I via IRF3. Son ARNm est, comme dans le cas des autres TLR endosomaux, augmenté dans les PBMC de patients lupiques (**Klonowska-Szymczyk et al., 2014**) et sa stimulation répétée accélère le lupus chez la souris MRL/lpr en jouant sur les cellules présentatrices d'antigène et également directement sur les cellules mésangiales à l'intérieur du glomérule (**Prashant et al., 2005**).

b) Les autres senseurs d'acides nucléiques.

Outre les TLR, qui sont des récepteurs liés à la membrane, il existe des récepteurs cytoplasmiques capables de détecter les molécules d'ARN et/ou d'ADN. Dans le cas des ARN, pouvant dériver de virus intracellulaires, ce sont les membres de la famille des RLR ("Retinoic acid Inducible Gene-I (RIG-I) Like Receptors") qui vont entrer en jeu. Ils vont permettre la production d'IFN de type I en passant par une protéine adaptatrice mitochondriale nommée MAVS ("Mitochondrial AntiViral Signaling") (**Figure 9**). Des polymorphismes dans le gène codant pour la protéine MDA5 ("Melanoma Differentiation-Associated protein 5"), un membre de la famille des RLR, sont associés au développement du lupus et l'un d'entre eux, la mutation A946T, est responsable d'une sensibilité accrue à l'interféron alpha et est associé à la présence d'anticorps anti-ADNdb (**Robinson et al., 2011**). De plus, des souris portant une mutation entraînant un gain de fonction au niveau de cette même protéine développent un lupus sans l'intervention de facteurs viraux exogènes (**Funabiki et al., 2014**). Pour terminer, des SNP ont également été détectés plus en aval dans la signalisation des RLR, au niveau de la protéine

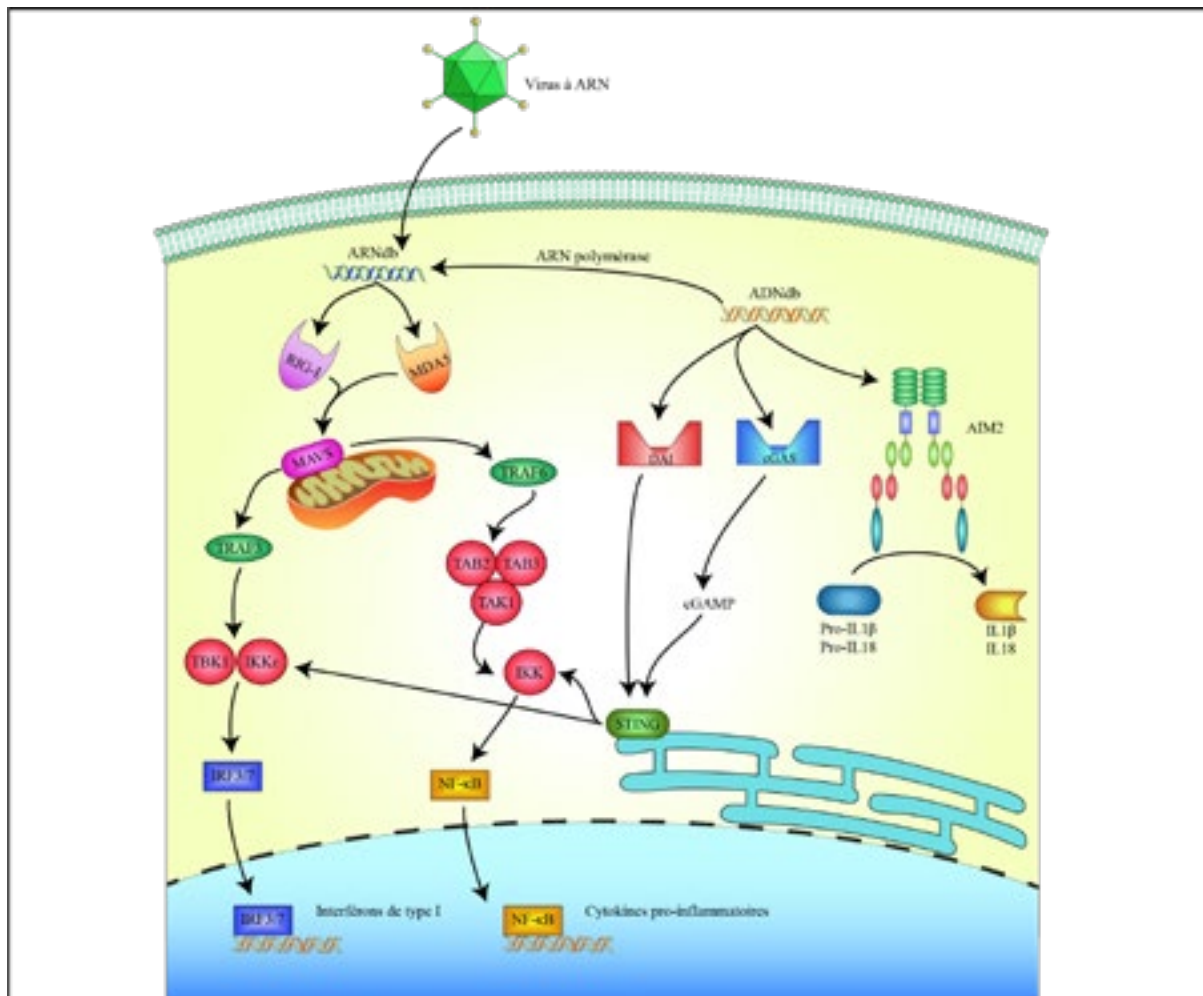


Figure 9 : Reconnaissance des acides nucléiques par les senseurs cytoplasmiques.

Les acides nucléiques contenus dans le cytosol peuvent être reconnus par de nombreux senseurs cytoplasmiques. Les hélicases de la famille des RLR (RIG-I Like Receptors), dont font partie RIG-I et MDA5, sont capables de reconnaître les ARNdb et permettent la synthèse d'interférons de type I et de cytokines pro-inflammatoires suite à une signalisation faisant intervenir la molécule adaptatrice MAVS qui se trouve au niveau de la membrane mitochondriale. Pour ce qui est de l'ADN double brin présent dans le cytoplasme, il peut être reconnu de diverses manières. En premier lieu, il peut être transcrit en ARN par des ARN polymérase et activer la voie des RLR. Ensuite, l'ADN peut se lier à des protéines de liaison à l'ADN, telle que DAI, ou à l'enzyme cGAS qui va, en réponse à cette liaison, produire du GAMP cyclique (cGAMP). Le cGAMP et DAI vont alors activer STING, une protéine associée au réticulum endoplasmique, et activer la production des interférons de type I et l'inflammation. Pour finir, l'ADN peut être reconnu par l'inflammasome AIM2 qui va ensuite promouvoir le clivage de la pro-IL1 β et de la pro-IL18 en leurs formes matures, l'IL1 β et l'IL18, participant alors à l'inflammation.

MAVS. Une étude a démontré qu'une mutation entraînant une perte de fonction de MAVS était associée à une sous-classe de lupus dans une cohorte américaine et africaine (**Pothlichet *et al.*, 2011**). Concernant l'ADN cytosolique, il existe différents senseurs capables de le détecter mais l'on peut citer la voie STING ("STimulator of INterferon Genes") et DAI ("DNA-dependant Activator of Interferon regulatory factors") et l'inflammasome AIM2 ("Absent in Melanoma 2"). STING va induire la production d'IFN de type I via IRF3 tandis qu'AIM2 va permettre la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL1 β et l'IL18 (**Figure 9**). Dans le cadre du lupus, la protéine DAI semble surexprimée chez les patients et le ciblage de son ARNm par des siARN ("small interfering RNA") dans des modèles murins de lupus allège les symptômes

de la maladie en agissant sur les macrophages (**Zhang et al., 2013**). Une étude s'est intéressée à une mutation familiale de STING et a montré que cette dernière engendre une activation de STING sans qu'il y ait besoin que son ligand endogène soit présent et cela aboutit au développement d'une pathologie de type lupus chez ces patients (**Jeremiah et al., 2014**). Cependant, une étude récente a montré que STING jouerait un rôle plutôt protecteur dans le lupus, son absence induisant une mort plus rapide des souris et une réponse accrue des macrophages après stimulation par les TLR (**Sharma et al., 2015**). La voie DAI/STING semble donc impliquée dans la pathologie lupique mais les études restent contradictoires. Pour ce qui est de l'inflammasome AIM2, des études ont montré une plus forte expression de ce dernier chez les patients lupiques et dans des modèles murins de lupus (**Zhang et al., 2013**). Son blocage inhibe le lupus en bloquant la réponse inflammatoire induite par les macrophages suite à la reconnaissance de l'ADN provenant des cellules apoptotiques. Cependant une étude a montré que la déficience pour le gène codant AIM2 entraîne une expression accrue du gène *Ifi202* qui a été montré comme représentant un locus de susceptibilité lupique (**Panchanathan et al., 2010**), cette augmentation a été corrélée avec une augmentation des IFN et une plus forte réponse des macrophages après stimulation par l'interféron. Comme pour STING, le rôle d'AIM2 semble double et les thérapies ciblant cet inflammasome doivent être considérées avec précaution.

Les différentes voies de reconnaissances des acides nucléiques sont donc fortement impliquées dans le développement et la physiopathologie du lupus. Elles peuvent jouer un rôle dans la rupture de tolérance (TLR9 et LB) et vont promouvoir l'activation de l'immunité innée en permettant la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, mais également d'IFN de type I, qui vont jouer un rôle clé dans le lupus.

2. La signature interféron et les cellules dendritiques plasmacytoïdes.

La reconnaissance des acides nucléiques se retrouvant plus accessibles en conditions lupiques vont activer des voies de signalisation permettant la synthèse de diverses cytokines dont les IFN. Cette famille de cytokines comprend plusieurs membres, on peut y retrouver les IFN de type I (IFN α , IFN β et IFN ω), de type II (IFN γ) et de type III (IFN λ). Le rôle des IFN de type III dans le lupus n'a que récemment été décrit (**Zahn et al., 2010**) tandis que celui des IFN de type I et II dans la physiopathologie du lupus est largement décrit et ce, depuis les premières observations datant de 1979 (**Hooks et al., 1979**). Par la suite, nous allons nous focaliser sur les IFN de type I, qui jouent un rôle majeur dans la pathologie lupique et qui sont

la conséquence directe des dérégulations de clairance et de reconnaissance des acides nucléiques.

a) Pourquoi étudier les IFN de type I ?

Si les IFN de type I sont fortement étudiés dans le cadre du lupus, c'est notamment parce qu'il est possible d'observer ce que l'on appelle une signature IFN chez la majorité des patients lupiques et dans quasiment tous les cas de lupus pédiatriques. Cette signature correspond au fait que l'on retrouve chez ces patients un grand nombre de gènes, que l'on sait induits par les IFN, fortement exprimés. Les premières observations chez les patients datent de 1979, cette étude a pu mettre en évidence une augmentation des IFN de type I dans le sérum des patients en se basant sur leur capacité à empêcher la mort cellulaire induite par un virus (**Hooks et al., 1979**). Et ce fut à partir des années 2000 que de nombreux laboratoires ont démontré que les PBMC de patients présentent une augmentation de nombreux transcrits induits par les IFN (**Baechler et al., 2003 ; Bennett et al., 2003 ; Crow et al., 2003**). En plus de ces observations, certaines études ont d'ores et déjà démontré l'implication potentielle de ces IFN dans la pathologie lupique. Il a en effet été démontré chez le modèle NZB/W, que l'induction de ces IFN chez de jeunes souris, par l'utilisation de poly(I :C) (un agoniste de TLR3), accélérât le développement du lupus (**Steinberg et al., 1969**). Cette étude montrait alors que la reconnaissance des acides nucléiques combinée à un fond lupique était suffisante pour accélérer la survenue du lupus. En plus de cela, des études réalisées chez l'Homme ont associé l'utilisation d'IFN α pour traiter l'hépatite C avec le développement de symptômes de type lupiques (**Gota et al., 2003**). De plus, les nombreux effets possibles des IFN sur les cellules immunitaires comme leur capacité à moduler la différenciation, la prolifération, la mort ou encore la survie des cellules (**McNab et al., 2015**) mettent en lumière leur potentiel à induire/favoriser le développement du lupus, c'est pourquoi de nombreuses équipes se sont alors penchées sur leur rôle au cours du lupus.

b) Origine des IFN de type I dans le lupus.

On peut alors se demander d'où proviennent ces IFN et pourquoi ils sont produits en si grande quantité lors du lupus. Les différentes prédispositions génétiques évoquées précédemment vont participer à la forte production d'IFN. Les diverses mutations affectant l'élimination des corps apoptotiques et des complexes immuns vont favoriser la production des IFN. Le fait est qu'en contexte lupique, on observe un nombre accru de complexes immuns dont une forte proportion contient des acides nucléiques. Ces derniers vont pouvoir pénétrer à l'intérieur des cellules via les RfC ou les récepteurs au complément et activer les TLR endosomaux menant alors à la production de ces IFN de type I. Bien que l'augmentation des

ligands des TLR endosomaux et autres senseurs d'aides nucléiques soit en cause, ce sont aussi les diverses mutations affectant directement ces senseurs ou leur signalisation qui vont jouer un rôle dans la surproduction d'IFN. On peut notamment citer l'augmentation d'expression de certains TLR ou encore les mutations entraînant un gain de fonction ou une activation constitutive comme dans le cas des protéines MDA5 ou STING (**voir paragraphe V, page 37**).

En ce qui concerne la source cellulaire de ces cytokines, toutes les cellules de l'organisme ont la capacité de produire des IFN de type I afin de se défendre face à une infection virale. Cependant, il existe deux type cellulaires présentant une capacité particulière à produire de larges quantités d'IFN α et d'IFN β : les monocytes et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) (**Figure 10**). Tandis que les monocytes ne répondent qu'à l'ARNdb, les pDC ont la capacité de produire des IFN suite à la reconnaissance de tous les types d'acides nucléiques et peuvent donc répondre à une infection par quasiment tous les virus (**Fitzgerald-Bocarsly et al., 2007**). Elles expriment une grande quantité de TLR7 et TLR9 et ont une forte expression basale du facteur de transcription IRF7, c'est pourquoi on les considère comme les principales productrices d'interféron de type I et notamment l'IFN α . Les complexes immuns contenant des acides nucléiques sont reconnus par le RFc γ IIa exprimé à la surface des pDC et vont être transportés vers les endosomes, où ils pourront être reconnus par TLR7 ou TLR9 (**Lövgren et al., 2006**). Ces cellules ont été associées au lupus dans diverses études. On peut notamment citer le fait que leur déplétion dans un modèle murin de lupus est suffisant pour diminuer les taux d'auto-anticorps, l'activation des lymphocytes et les dommages rénaux (**Rowland et al., 2014**). De plus, des études sur les biopsies de patients ont montré la présence de pDC qui se trouvaient à proximité de cellules présentant une forte signature interféron (**Farkas et al., 2001**), montrant alors qu'elles peuvent localement produire des IFN de type I au sein des tissus enflammés.

c) NET, pDC et IFN.

Outre les complexes-immuns, les NET produits par les neutrophiles sont capables d'induire une production d'IFN par les pDC (**Pinegin et al., 2015**). Ce processus, appelé NETose, est une mort cellulaire des neutrophiles où ces derniers vont relarguer dans le milieu extracellulaire leur contenu nucléaire, incluant la chromatine dont les histones ainsi que diverses protéines nucléaires et cytosoliques. Ces composant vont alors former un filet dense permettant de capturer et d'immobiliser les pathogènes (en particulier les bactéries). Dans le cadre du lupus, il est possible d'observer une population particulière de granulocytes que l'on nomme LDG pour "Low-Density Granulocytes". Ces derniers sont retrouvés dans le sang des

patients et du fait de leur faible densité, se retrouvent au niveau de la fraction mononucléaire lors de la séparation des composants du sang par densité (**Hacbarth et al., 1986**). Ces LDG ne sont pas qu'une simple anomalie de densité mais représentent une population hautement pathogène au cours du lupus. Ces derniers produisent davantage de cytokines pro-inflammatoires dont les IFN de type I et sont toxiques pour les cellules endothéliales (**Denny et al., 2010**). Ils présentent également une capacité accrue de production de NET au niveau basal (**Villanueva et al., 2011**) dont les capacités immunostimulatrices sont supérieures à celles des NET générés par des neutrophiles. De plus, nous avons vu précédemment que la dégradation des NET était diminuée au cours du lupus. Ces derniers représentent donc une forte source d'auto-antigènes qui vont alors pouvoir se lier aux auto-anticorps et activer les voies de reconnaissance des acides nucléiques et permettre la production d'IFN. Il a été montré que ces NET pouvaient activer la production d'IFN par les pDC de manière TLR9-dépendante (**Garcia-Romo et al., 2011**). Plus précisément, l'ADN contenu dans les NET et ayant la capacité d'activer TLR9 n'est pas simplement de l'ADN relargué à partir du noyau mais est en fait d'origine mitochondrial et sous forme oxydée (**Caielli et al., 2016**). Une équipe a d'ailleurs démontré que les espèces réactives de l'oxygène ("ROS") provenant des mitochondries étaient capables d'initier le processus de NETose et le relargage d'ADN mitochondrial oxydé permettant la production d'IFN α via TLR9 et la voie STING (**Lood et al., 2016**). En plus de leur action sur les pDC via les NET, les neutrophiles activés via TLR7/8 sont capables d'empêcher l'élimination des complexes immuns par les monocytes (**Lood et al., 2017**) et donc vont augmenter l'inflammation et la disponibilité des auto-antigènes, participant ainsi à cette boucle d'amplification que l'on observe au cours du lupus. Ils sont également capables d'infiltrer les tissus comme la peau ou les reins et vont localement générer des NET, ce qui a été corrélé avec la production d'auto-anticorps anti-ADNdb (**Villanueva et al., 2011**). Finalement, un travail récent a pu montrer que les NET permettent d'activer les LB autoréactifs par un processus impliquant TLR9 (**Gestermann et al., 2018**).

d) Les effets des IFN sur le système immunitaire et leurs rôles dans le LED.

Les IFN de type I ont de nombreux effets sur les cellules en général, ils peuvent par exemple médier la production de chimiokines permettant le recrutement des cellules immunitaires ou encore promouvoir l'apoptose des cellules endothéliales (**Thacker et al., 2012**). Cependant leurs nombreux effets sur les cellules immunitaires sont encore plus intéressants lorsque l'on se retrouve en contexte lupique (**Figure 10**). Chez un modèle murin d'infection par le virus de la chorioméningite lymphocytaire chronique (LCMV), le blocage des

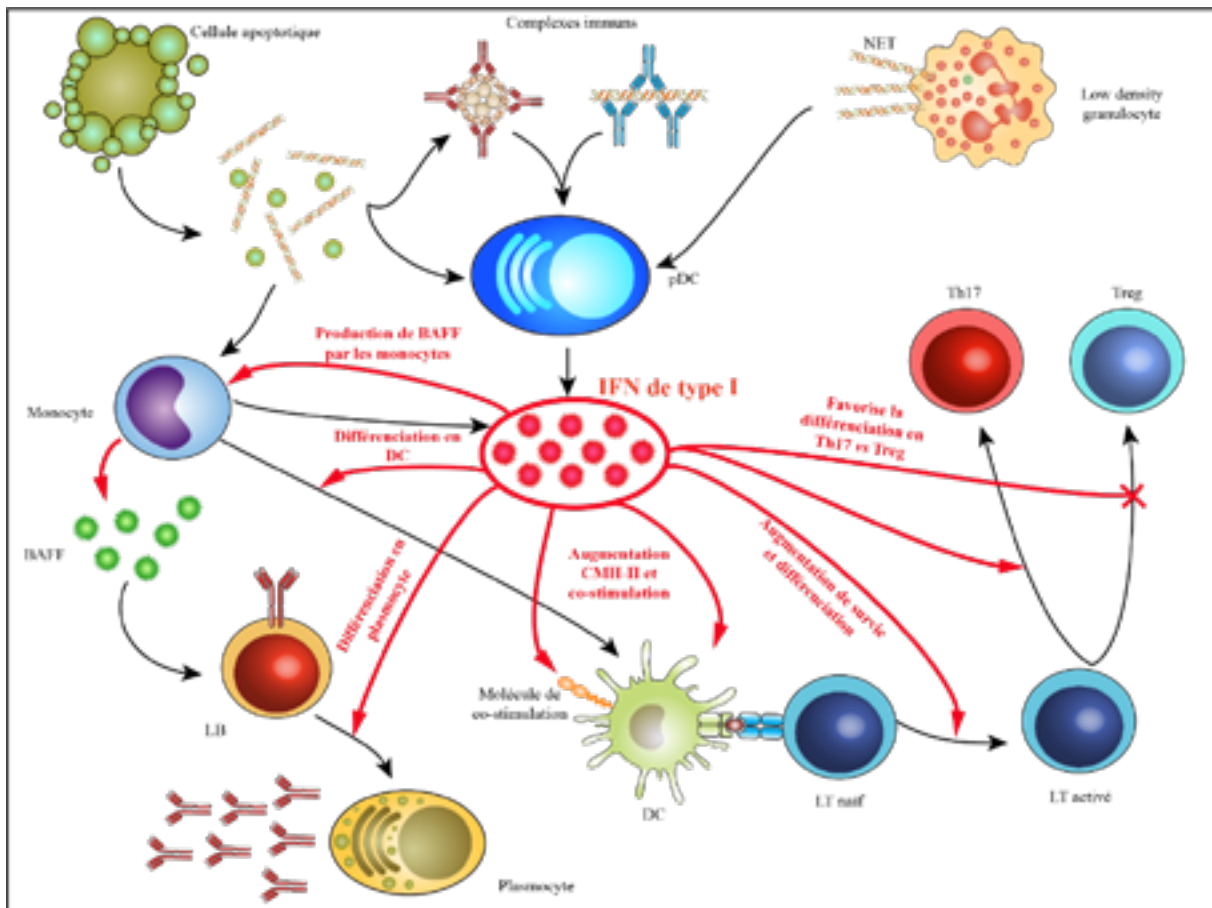


Figure 10 : Contribution de l'axe pDC-IFN dans la physiopathologie du lupus.

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) sont les principales cellules productrices d'interférons (IFN) de type I. Dans le cadre du lupus, le nombre accru de cellules apoptotiques, les complexes immuns contenant des acides nucléiques et la forte production de NET vont engendrer une surproduction d'IFN de type I par les pDCs et dans une moindre mesure par les monocytes. Ces IFN vont alors agir sur le système immunitaire en augmentant par exemple l'expression du CMH de classe II et donc la présentation antigénique, mais également l'expression de molécules de co-stimulation. Ils vont également médier la production de la cytokine BAFF, favorisant la survie des LB. Enfin, ils vont avoir un effet direct sur les lymphocytes en promouvant la différenciation des LB en plasmocytes et en modulant la différenciation des LT (balance Treg/Th17).

IFN de type I réduit l'activation immunitaire et réduit également les dommages tissulaires, montrant que ces cytokines peuvent diriger une réponse immunitaire pathologique (**Wilson *et al.*, 2013**). De plus, des données ont montré que l'IFN α avait la capacité d'accélérer la maladie lupique et contribuait à la survenue des dommages rénaux (**Liu *et al.*, 2011**). Plus précisément, les IFN de type I peuvent agir sur la lignée myéloïde et également sur la lignée lymphoïde, influençant alors à la fois l'immunité innée et l'immunité adaptative. Via leur récepteur (IFNAR1), qui est exprimé à la surface de tous les types cellulaires (**Schneider *et al.*, 2014**), ils vont induire une cascade de signalisation faisant intervenir les protéines JAK ("Janus Activated Kinase") et STAT, en particulier JAK1 et STAT1/2. Le complexe STAT1-STAT2 va se lier au facteur de transcription IRF9, transloquer dans le noyau et se lier aux gènes portant un motif IRE ("Interferon Response Element") pour induire leur expression (**Schneider *et al.*, 2014**). L'un des premiers effets de ces IFN de type I est qu'ils vont accroître l'expression des molécules

du CMH de classe I, augmentant alors la présentation antigénique aux LT cytotoxiques (**Grammatikos et al., 2012**). Comme dans le cas du CMH-I, l'IFN α influe positivement sur l'expression du CMH de classe II ainsi que de nombreuses molécules de co-stimulation, telles que CD40, CD80 et CD86 (**McNab et al., 2015**). Ces IFN ont également la capacité d'induire la production de cytokines qui vont favoriser la différenciation des monocytes en DC matures compétentes pour la présentation antigénique (**Blanco et al., 2001**), ces dernières sont alors capables d'activer les LT naïfs et de promouvoir l'activation et la différenciation des LB qui s'ensuit. Les IFN de type I vont donc promouvoir l'activation des DC, favoriser la présentation antigénique et l'activation de l'immunité adaptative. Ils peuvent également, en plus de la présentation antigénique, avoir des effets directs sur les cellules de l'immunité adaptative. Ils sont capables de prolonger la survie des LT activés et favoriser leur différenciation en LT mémoires (que ce soient des LT CD4⁺ ou CD8⁺). De plus, ils vont promouvoir la différenciation des T CD4 en Th17 et supprimer les fonctions des T régulateurs (Treg), contribuant ainsi à l'inflammation et au ratio Th17/Treg qui se trouve modifié au cours du lupus (**Alunno et al., 2012**). En ce qui concerne les LB, des études ont montré une augmentation de la production d'IFN lorsque les pDC sont cultivées en présence de LB (**Berggren et al., 2012**). Les IFN ont également été décrits comme capables d'augmenter la production de la cytokine BAFF, une cytokine favorisant la survie des LB, et dont l'implication dans le lupus a d'ores et déjà été démontrée (**Davidson., 2012**). Les résultats d'un essai clinique ont pu montrer que l'utilisation d'un anticorps monoclonal ciblant l'IFN α avait pour effet une diminution de BAFF (**Yao et al., 2009**). Ces IFN semblent en effet agir sur les monocytes sains et augmentent leur synthèse intracellulaire de BAFF, de plus cette expression de BAFF est supérieure lorsqu'il s'agit de monocytes issus de patients lupiques (**Lopez et al., 2014**). Ils ont également la capacité de diminuer le seuil d'activation du BCR, participant à l'hyperactivation des LB observée durant le LED (**Braun et al., 2002**). Pour finir, ils sont également capables de promouvoir la commutation de classe des immunoglobulines en IgG, la différenciation en plasmablastes et la sécrétion d'anticorps (**Kiefer et al., 2012**). De par leurs nombreux effets sur le système immunitaire inné et adaptatif mais également sur les cellules non immunitaires, les IFN de type I participent activement à la physiopathologie du lupus (**Figure 10**).

C) De la rupture de tolérance à l'activation de l'immunité adaptative.

Bien que les processus de mort cellulaire et d'activation du système immunitaire inné jouent un rôle important dans la pathologie lupique, les LB et LT, acteurs de l'immunité

adaptative, sont à prendre fortement en considération lorsque l'on s'intéresse aux étapes plus tardives du développement et au maintien de la maladie lupique.

1. Auto-anticorps et lymphocytes B.

L'une des caractéristiques du lupus est la présence d'auto-anticorps ciblant des composants nucléaires. Ces derniers vont participer aux nombreuses atteintes que l'on peut observer durant la pathologie mais vont également former des complexes immuns capables d'activer les cellules de l'immunité innée et permettre l'amplification de la réponse auto-immune et inflammatoire. Ces auto-anticorps sont produits par les plasmocytes provenant de la différenciation des LB auto-réactifs dont la survenue reflète à la fois une rupture de tolérance mais également une activation globale du système immunitaire. Ces cellules jouent donc un rôle majeur dans la physiopathologie du LED, ce pourquoi ils ont été fortement étudiés et ont servis de cibles à de nombreuses thérapies visant à traiter la maladie.

a) Les anticorps lupiques pathogènes.

Les anticorps observés au cours du LED sont divers et jouent de nombreux rôles dans la physiopathologie de cette maladie (**Fritzler *et al.*, 1996**). Parmi ces derniers, on retrouve un grand nombre d'anticorps ciblant des composants nucléaires tels que l'ADNdb, les histones ou encore les ribonucléoprotéines. Ils sont retrouvés chez la majorité des patients (plus de 90%) et ont la capacité de former des complexes immuns qui vont alors se déposer dans les tissus, participant aux différentes atteintes cliniques, mais également amplifier l'inflammation déjà présente. Les anti-ADNdb représentent l'un des critères de diagnostic du lupus, leur taux sérique corrèle avec l'activité de la maladie et ils peuvent être utilisés pour suivre les phases de la pathologie (phase active ou phase quiescente) (**Fritzler *et al.*, 1996**). L'importance de ces anticorps a pu être démontrée dans des modèles murins. Le transfert de ces derniers à partir du sérum d'une souris malade chez une souris saine est suffisant pour provoquer la survenue d'une néphrite (**Cheng *et al.*, 2013**). De plus, chez un modèle bien connu de lupus qu'est la souris MRL/lpr, le blocage de la sécrétion d'anticorps suffit à réduire la mortalité de moitié et à diminuer la sévérité de la maladie (**Chan *et al.*, 1999**). Ces études démontrent l'importance de ces auto-anticorps en tant qu'acteurs de la maladie et non pas seulement comme une simple anomalie sérologique.

Si l'on s'intéresse de plus près à ces auto-anticorps lupiques (**Sherer *et al.*, 2004**), on peut remarquer que les modes d'actions sont aussi divers que les cibles et qu'ils peuvent agir en se fixant directement sur leur épitope ou en reconnaissant de manière croisée ou non spécifiques des composants tissulaires. L'exemple le plus flagrant est celui des anti-ADNdb

(ADN natif). Ces auto-anticorps sont très fortement spécifiques du lupus, ils en représentent l'un des critères diagnostiques et leur taux est fortement corrélé à l'activité de la maladie (**Koffler et al., 1971**). Ils ont une forte implication dans la pathologie de la néphrite lupique, soit en se déposant sous forme de complexes immuns au niveau des glomérules, soit en reconnaissant des composants de la membrane glomérulaire, tels que la laminine, le collagène ou l'alpha-actinine. Ils peuvent alors permettre l'activation du complément et médier la lyse cellulaire et l'inflammation rénale. Outre les autoanticorps anti-ADN, on peut observer des anticorps dirigés contre les histones ou les nucléosomes (**Amoura et al., 2000**). Comme les anticorps anti-ADN, ces derniers jouent un rôle dans le développement de la néphrite lupique et apparaissent précocement dans le sérum. Ils vont se déposer dans les reins, soit par reconnaissance croisée (épitope conformationnel), soit par leur complexation avec les nucléosomes qui leur permettra d'interagir avec les charges négatives des héparanes sulfates au niveau du rein.

Outre les anticorps dirigés contre l'ADN ou les histones, le lupus se caractérise également par la production d'anticorps dirigés contre d'autres composants nucléaires comme les RNP. Parmi ceux-ci, on peut citer les anti-Ro (ou anti-SSA) que l'on retrouve chez 24 à 60% des patients et qui sont quant à eux plutôt associés à la photosensibilité et aux atteintes cutanées (**Mond et al., 1989**) et pulmonaires (**Boulware et al., 1989**). Les anti-La (anti-SSB) sont en revanche beaucoup moins représentés (6 à 35% des patients) et ne corrént pas avec l'activité de la maladie (**St Clair, 1992**). Ils ont eux aussi associés à des manifestations plutôt cutanées et sont plus fréquents dans les cas de lupus néonataux. Un autre type d'auto-anticorps sont les anti-snRNP ("small nuclear RNP") et les anti-Sm (un autre marqueur diagnostique du lupus) qui sont dirigés contre des composants du spliceosome et retrouvés chez environ 50% des patients. Ils sont plus fréquents dans les populations asiatiques et afro-américaines et sont plutôt associés à des atteintes du système nerveux central, une fibrose pulmonaire, des péricardites et des formes modérées de néphrite (**Yasuma et al., 1990**).

En dehors des anticorps dirigés contre des composants nucléaires, il est possible d'observer d'autres types d'auto-anticorps qui sont eux aussi impliqués dans diverses manifestations cliniques de la maladie. En premier lieu, les facteurs anticoagulant lupiques et les anti-phospholipides sont observés chez 20 à 40% des patients (**Love et al., 1990**). Bien qu'ils ne corrént pas à l'activité ou la durée de la maladie, ils sont responsables d'anémies hémolytiques, de thrombocytopénies et médient également la survenue de nombreux événements thrombotiques qui peuvent participer à la détérioration de divers organes. Toujours concernant les atteintes vasculaires, et bien qu'ils ne soient pas spécifiques du lupus, il est

possible d'observer une production d'anticorps dirigés contre des composants des neutrophiles (ANCA, "AntiNeutrophil Cytoplasmic Antibodies") (Schnabel *et al.*, 1995) qui sont retrouvés plus principalement dans les vascularites systémiques, et dont la corrélation avec les atteintes vasculaires ne fut pas établie, ou des anticorps ciblant différents composants des cellules endothéliales que l'on sait associés à l'hypertension pulmonaire, aux vascularites digitales et à des atteintes neuropsychiatriques (Song *et al.*, 2000).

D'autres types d'auto-anticorps peuvent également cibler des composants du système nerveux central comme les anti-NMDAR auxquels on attribue un rôle dans la rupture de la barrière hématoencéphalique. Enfin, il existe de nombreux anticorps ciblant des molécules du complément ou les protéines de la phase aigüe et qui jouent un rôle dans la survenue du lupus.

b) Evolution des populations lymphocytaires B au cours du lupus.

Les LB débutent leur développement dans la moelle osseuse où ils vont acquérir un BCR fonctionnel mais également être soumis à un processus de sélection négative afin d'empêcher l'accès en périphérie des LB exprimant un BCR autoréactif. Le stade final de différenciation dans la moelle osseuse correspond aux LB immatures ou pré-naïfs, ceux-ci vont alors quitter la moelle et rejoindre la circulation sanguine et les Organes Lymphoïdes Secondaires (OLS), on les qualifie alors de LB matures naïfs. Ils pourront alors être activés et se différencier en cellules mémoires ou en plasmocytes au sein des OLS.

Il existe de nombreuses anomalies concernant la population des LB durant le lupus (Figure 11). Pour commencer, il semblerait qu'il y ait des anomalies au niveau de la maturation des LB chez les patients lupiques. En effet, des études ont relevé des fréquences anormales de LB transitionnels, immatures et naïfs (Lee *et al.*, 2009). Les LB transitionnels et immatures se retrouvent augmentés dans le sang des patients et il y a également un plus grand nombre de LB naïfs autoréactifs en circulation (Yurasov *et al.*, 2006). Cela semble montrer des anomalies au niveau des étapes précoces de maturation des LB et de la tolérance centrale au niveau de la moelle. Cependant, les LB naïfs produisent essentiellement des IgM, or les anticorps pathologiques du lupus sont en majorité des IgG et il existe également de nombreuses IgM naturelles ayant plutôt un rôle protecteur vis-à-vis de la maladie. De plus, l'augmentation des LB naïfs ne semble pas corrélée avec l'activité de la maladie. Cela ne peut donc pas constituer la seule anomalie aboutissant à la production des auto-anticorps pathogènes.

La présence d'auto-anticorps de type IgG indique la présence de LB autoréactifs qui ont rencontré leur antigène et ont subi le processus de commutation de classe. Et en effet, dans le sang des patients lupiques, il a été observé une forte hausse des LB CD27⁺IgD⁻, cellules

correspondant à des LB mémoires ayant subi la commutation de classe et qui se trouvent de surcroît être moins sensibles aux immunosuppresseurs (**Odendahl et al., 2000**). Ces cellules mémoires semblent également persister durant les phases de quiescence de la maladie (**Korganow et al., 2010**). De plus elles possèdent un répertoire caractérisé par de très nombreux réarrangements causés par une hypermutation somatique exagérée (**Dorner et al., 1998**) et le blocage du processus d'hypermutation somatique chez la souris MRL/lpr est suffisant pour améliorer les symptômes lupiques (**Hao et al., 2018**). La présence de ces cellules en nombre accru peut être attribuée aussi bien à un défaut de sélection/tolérance périphérique qu'au résultat d'une plus forte activation des LB naïfs combinée à leur plus forte résistance aux immunosuppresseurs. Ces potentielles causes seront discutées dans le chapitre suivant.

Outre les cellules B mémoires classiques, il y a une population de cellules mémoires particulière qui se trouve être augmentée au cours du lupus. Ces cellules présentent un phénotype mémoire mais n'expriment pas le marqueur CD27, elles sont donc CD27⁻IgD⁻ et sont appelées cellules doubles négatives (DN) (**Wei et al., 2007**). Les cellules n'exprimant pas le marqueur CD27 ont pendant longtemps été considérées comme étant exclusivement des cellules naïves (**Klein et al., 1998**), toutefois cette population DN augmentée au cours du LED présente bien des caractéristiques de cellules mémoires et son augmentation corrèle à l'activité de la maladie, la production de divers auto-anticorps et une atteinte rénale déclarée (**Wei et al., 2007 ; Zhu et al., 2018**). Parmi cette population de cellules DN, un groupe de cellules en particulier caractérisé par à la fois la négativité pour ces deux marqueurs mais également l'expression du marqueur CD95 a pu être isolée (**Jacobi et al., 2008**). Il se trouve que ce serait cette population en particulier, au sein des DN, qui soit corrélée à l'activité de la maladie. Cette sous-population montre une expression accrue de divers marqueurs d'activation tels que le CMH de classe II, CD86, CD38, CD44 ainsi qu'un grand nombre de récepteurs aux chimiokines comme CXCR3 ("C-X-C motif Receptor 3"), CXCR5 et CXCR4. L'expression du marqueur CD95 suggère que ces cellules dériveraient de cellules récemment activées en provenance du GC, indiquant alors des anomalies de la régulation du GC et de l'accès à ce dernier.

Un autre type de LB a montré une implication non négligeable dans la physiopathologie du lupus durant la dernière décennie : les lymphocytes de type B1. Ces derniers sont principalement retrouvés dans la cavité péritonéale où ils participent à la production d'anticorps naturels et peuvent répondre en l'absence d'activation par les LT. Ils produisent principalement des IgM et le BCR exprimé à leur surface se trouve être de type polyréactif. On pourrait alors penser que ces derniers n'ont pas un rôle majeur dans la physiopathologie du lupus, pourtant, divers travaux ont pu montrer que leur trafic était affecté au cours du lupus et qu'ils participaient

à la production d'auto-anticorps pathologiques. Un travail datant de 2007 a démontré que chez les souris lupiques NZB/W, les cellules B1 ne se retrouvent que faiblement au niveau de la cavité péritonéale et migrent au niveau des reins du fait d'une forte expression du récepteur CXCR5 (**Ishikawa et al., 2007**). Ils présentent également une forte capacité à activer les LT naïfs et leur co-culture en présence de LT auxiliaires folliculaires (TFH, "T Follicular Helper cells") permet d'induire une production d'IgG par ces cellules. Chez les patients lupiques également, il semble que les lymphocytes B1 soient également augmentés et que, parmi ceux-ci, la population CD11b⁺ présente des capacités de stimulation des LT accrues (**Griffin et al., 2011**). Ces LB particuliers ont non-seulement une localisation et des capacités altérées au cours du lupus, mais ils semblent également être l'une des sources d'auto-anticorps pathologiques. En effet, Zhong et ses collaborateurs ont retrouvé une forte proportion de LB produisant des anticorps anti-ADNdb parmi les cellules B1 (**Zhong et al., 2009**). De plus, ces derniers présentent de fortes capacités de cellules présentatrices d'antigènes et orientent la différenciation des LT naïfs en Th17 (dont nous reparlerons dans les paragraphes suivants). Finalement, cette hausse du compartiment B1 semble en partie due à des dérégulations du niveau de la protéine BLK (**Wu et al., 2015**). L'absence de cette dernière étant associée à une hausse des lymphocytes B1 et de la production des auto-anticorps anti-ADNdb chez la souris, de plus, divers SNP dans le gène codant pour la protéine BLK corrélaient avec les taux d'auto-anticorps chez l'homme.

Il existe également une autre population lymphocytaire B qui a une importance capitale au cours du lupus. Elle correspond à l'autre stade de différenciation des LB et est responsable de la sécrétion des auto-anticorps : les plasmablastes/plasmocytes. Chez les patients en phase active, adultes comme enfants, on retrouve un nombre plus élevé de plasmocytes dans la circulation sanguine (**Medina et al., 2002**). Ces nombreux plasmocytes proviennent majoritairement d'une différenciation excessive des LB au sein des centres germinatifs puisque le blocage des interactions T-B par l'utilisation un anticorps anti-CD40L réduit leur nombre chez les patients lupiques (**Grammer et al., 2003**). Cela est également confirmé par le fait que ces plasmocytes sécrètent des anticorps possédant des régions variables fortement mutées, chez les patients actifs, et que ces réarrangements sont caractéristiques de ceux que l'on peut observer lors de la réaction du GC (**Jacobi et al., 2003**). Ils semblent être oligoclonaux, c'est-à-dire générés à partir d'un nombre restreint de clones de LB, et sécrètent les auto-anticorps tels que les anti-ADNdb. Pour terminer, ces plasmocytes ont également été observés dans les reins de patients atteints de néphrite lupique (**Chang et al., 2009 ; Espeli et al., 2011 ; Ma et al., 2018**) et notre laboratoire a pu montrer leur présence dans les reins d'un modèle murin de

lupus, la souris NZB/W (**Lacotte et al., 2010**). Ils vont alors promouvoir une production locale d'auto-anticorps et peuvent donc participer au développement de l'atteinte rénale ; ces cellules étant d'ailleurs le plus souvent observées au niveau des reins dans le cas des formes de néphrites les plus sévères.

Pour terminer, si l'on s'intéresse à la régulation des réponses B, il y a une population très intéressante à étudier : les cellules B régulatrices. Bien que leur rôle ne soit pas totalement établi chez l'Homme, elles sont considérées comme des cellules de type mémoire ayant rencontré leur antigène. Chez la souris, en revanche, elles sont identifiées par l'expression de différents marqueurs comme CD5 et CD1d et produisent de l'IL10. Elles seraient spécialisées dans le contrôle des réponses immunitaires T dépendantes (**Yanaba et al., 2008**). Ces cellules ont été décrites comme présentes en nombre équivalent dans le sang des patients lupiques mais présentent une diminution de leur capacité suppressive (**Blair et al., 2010**). Cette étude fut confirmée par d'autres observations plus récentes montrant diminution d'activité suppressive chez les B régulateurs induits après activation (**Gao et al., 2014**). Chez la souris, il a été montré dans deux modèles de lupus, que les B régulateurs étaient capables de supprimer les manifestations de la maladie et que leur transfert chez des souris lupiques améliorait les symptômes (**Matsushita et al., 2014**). Pour terminer, une étude a mis en lumière que la diminution des B régulateurs produisant de l'IL10, bien que ne corrélant pas à l'activité de la maladie, était plus forte chez les patients présentant une néphrite (**Heinemann et al., 2016**). Ces différents travaux identifient alors l'implication potentielle des LB régulateurs dans la physiopathologie du lupus.

c) Comment expliquer les anomalies B au cours du lupus ?

Les LB au cours du lupus présentent un phénotype de cellules activées, expriment des BCR autoréactifs et sont plus enclins à se différencier en plasmocytes. Cela suggère que des défauts au niveau des tolérances centrale et périphérique, mais également au niveau de la régulation du GC, sont à considérer (**Figure 11**).

En premier lieu, l'on peut s'interroger sur l'efficacité des mécanismes de tolérance centrale au cours du LED. Lors de leur développement dans la moelle osseuse, les LB vont subir des réarrangements géniques qui vont permettre l'expression d'un BCR spécifique d'un seul épitope pour chaque cellule B. Ces réarrangements étant aléatoires, la génération d'un BCR capable de reconnaître un antigène du soi est tout à fait possible, c'est pourquoi il existe des processus de sélection négative visant à éliminer ces cellules B qui représentent un danger pour

l'organisme (Goodnow *et al.*, 2005). Au cours du lupus, ces mécanismes semblent altérés et permettent l'émergence de LB autoréactifs dans la moelle osseuse qui vont alors rejoindre la

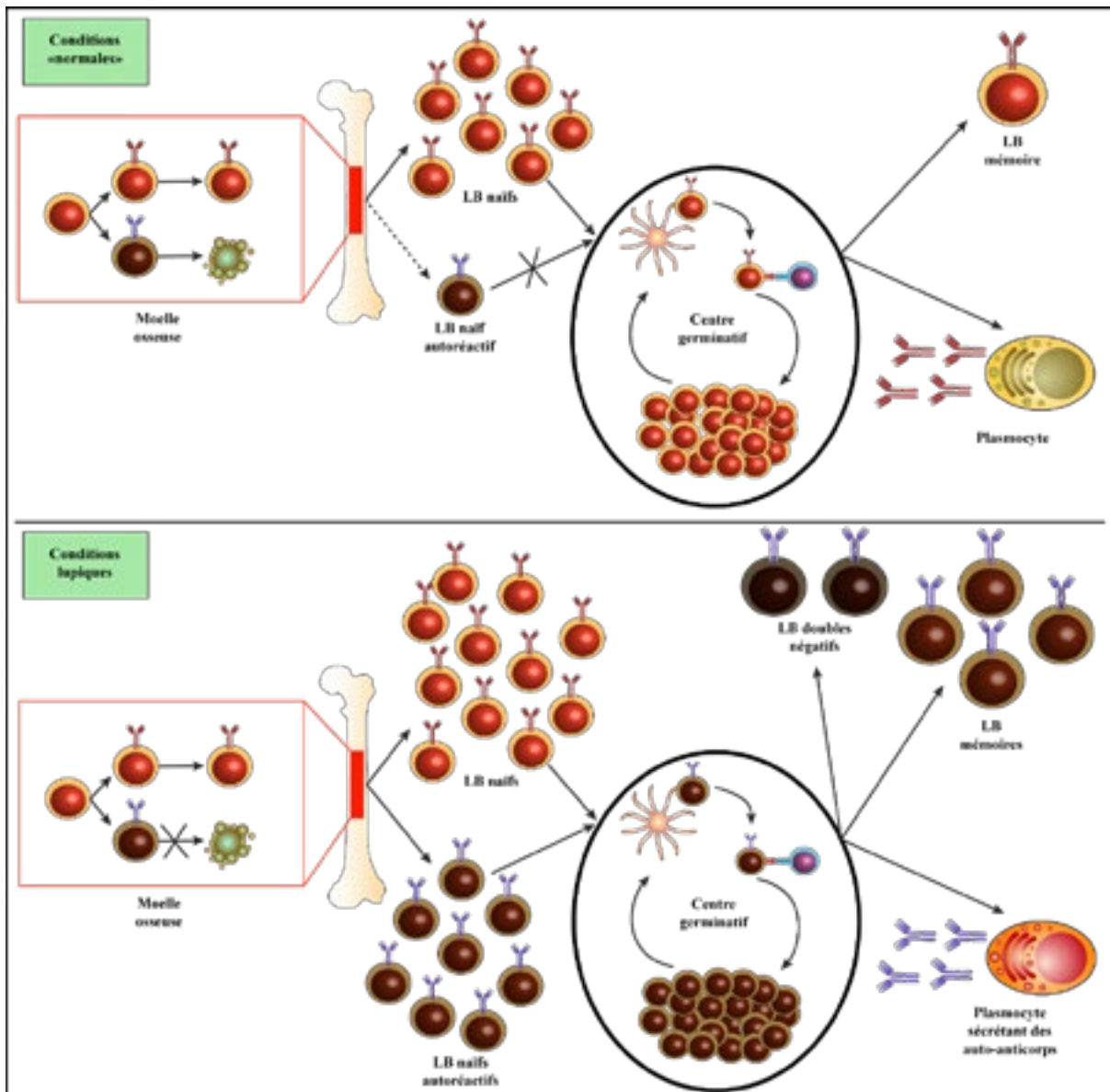


Figure 11 : Anomalies des populations lymphocytaires B au cours du lupus.
 En conditions «normales», les LB autoréactifs sont éliminés lors des étapes de maturation au niveau de la moelle osseuse, correspondant aux mécanismes de tolérance centrale. Les cellules autoréactives qui ont pu échapper à ce mécanisme vont être contenues par les mécanismes de tolérance périphérique et n'auront pas accès au centre germinatif. Dans le cas du lupus, il existe des défauts au niveau des mécanismes de tolérance centrale et périphérique. Cela va conduire en premier lieu à une augmentation du nombre de LB naïfs, et en particulier du nombre de LB autoréactifs. Du fait des défauts de tolérance périphérique mais également de la forte disponibilité des auto-antigènes en conditions lupiques, ces cellules autoréactives vont pouvoir subir la réaction du centre germinatif et se différencier en LB mémoires autoréactifs (dont les LB «double-négatifs») et en plasmocytes sécrétant des auto-anticorps.

circulation sanguine (Wardemann *et al.*, 2003). Un exemple est celui de la souris lupique MRL/lpr qui présente une plus faible capacité d'édition du BCR, aboutissant à une plus forte proportion de LB autoréactifs (Lamoureux *et al.*, 2007). Il faut toutefois se demander si ces mécanismes de tolérance centrale lorsqu'ils sont altérés, suffisent à générer les clones autoréactifs qui produiront les anticorps ou si d'autres anomalies sont requises.

En effet, il existe également des mécanismes de tolérance périphérique qui, dans le cas des LB, reposent sur la nécessité d'une aide fournie par les LT afin de permettre leur activation et leur différenciation. Il semblerait que, comme la tolérance centrale, la tolérance périphérique soit affectée au cours du LED et participe à la génération des cellules autoréactives. Les auto-anticorps pathogènes dérivent de clones exprimant des immunoglobulines fortement réarrangées et présentant des parties variables hautement mutées (**Winkler et al., 1992**), suggérant donc qu'ils ne proviennent pas de clones générés suite au simple réarrangement initial se produisant dans la moelle osseuse. De plus, lorsque l'on réverte ces modifications pour revenir à la séquence germinale, les auto-anticorps perdent leur capacité à reconnaître leur antigène (**Mietzner et al., 2008**). Ces données suggèrent alors que les clones produisant les auto-anticorps pathogènes ont subi des réarrangements suite à leur activation par l'antigène, probablement au niveau du GC, et que ces derniers n'ont pas été éliminés par la suite. Cela dénote alors de défauts au niveau de la tolérance périphérique et en particulier en ce concerne le contrôle des centres germinatifs. Cette possibilité est confortée par le fait que l'on observe au cours du lupus une fréquence augmentée d'hypermutation somatique de manière générale (**Mietzner et al., 2008**), processus qui se produit au cours de la réaction du GC, ainsi qu'une forte proportion de LB du GC dans la circulation sanguine des patients (**Odendahl et al., 2000**). On peut alors se demander si ce nombre augmenté de LB du GC est dû à un plus grand nombre de GC se formant, une plus forte activité au sein du GC, une moindre sélection des LB sortant du GC ou une combinaison de tous ces facteurs. Pour commencer, les facteurs participant à la mise en place du GC tels que l'IL21, les TFH ou les molécules de co-stimulation telles qu'ICOS ou CD40L, ont été impliqués dans la pathologie lupique, et leur augmentation pourrait expliquer la mise en place accrue de GC. Un exemple est celui de la souris *sanroque* ; cette dernière présente une mutation augmentant l'expression d'ICOS et développe un lupus sévère (**Vinueza et al., 2005**). L'interaction CD40-CD40L étant nécessaire pour la mise en place du GC, sa forte expression chez les patients lupiques peut alors participer à un plus fort développement de GC, d'autant que son blocage semble normaliser la réponse B excessive caractéristique du LED (**Grammer et al., 2003**). L'IL21 est également impliquée puisqu'elle est retrouvée augmentée dans de nombreux modèles de lupus (**Ettinger et al., 2008**) et notre laboratoire a pu montrer une augmentation de la production d'IL21 ainsi qu'une plus forte expression de son récepteur par les LB (**Le Coz et al., en préparation**). De plus, son absence ou celle de son récepteur permet de diminuer les symptômes lupiques (**Bubier et al., 2009**). Cela démontre que des défauts au niveau de la mise en place et/ou du maintien des GC sont impliqués dans la pathogénèse du lupus. Cependant un excès de réaction du GC ne peut pas à lui seul expliquer

la survenue des nombreux LB autoréactifs. En effet, il existe des processus limitant l'accès du GC aux cellules autoréactives ou leur génération au sein de ces derniers. Pour accéder au GC, les LB doivent être activés par leur antigène mais en conditions normales, les auto-antigènes ne sont présentés que lors des processus de sélection négative au sein de la moelle et du thymus et non au sein des OLS. Cependant, la mauvaise prise en charge des corps apoptotiques en conditions lupiques favorise la disponibilité et la présentation d'auto-antigènes et cela également à proximité des GC. La moindre efficacité des TBM en conditions lupiques par exemple, permet l'entrée de matériel apoptotique au sein des follicules B (**Baumann et al., 2002**), matériel que l'on a pu observer présenté à la surface des FDC ("Follicular Dendritic Cells") (**Gaipl et al., 2007**). Cette présentation de matériel apoptotique permet de sélectionner positivement les LB autoréactifs pour l'accès au GC mais également après la réaction du GC. Par ailleurs, les défauts d'apoptose qui pouvaient jouer un rôle dans la rupture de tolérance centrale se retrouvent également impliqués dans le cas du GC. En effet, les LB autoréactifs générés suite au processus d'hypermutation somatique prenant place au cours de la réaction du GC, devraient être éliminés par apoptose, faute de stimulation antigénique, cependant, les défauts d'apoptose vont permettre l'échappement de ces clones autoréactifs et potentialiser leur différenciation future en cellules mémoires ou en plasmocytes.

Enfin, outre les défauts de tolérance et de régulation du GC, il existe des défauts intrinsèques aux LB en conditions lupiques. Ces défauts facilitent l'activation des LB en jouant notamment sur le seuil d'activation suite à la reconnaissance de leur antigène via le BCR et influent non seulement sur la tolérance centrale mais également périphérique. Un premier exemple est celui de la protéine BLK. Cette kinase est exprimée au stade pré-B dans la moelle osseuse et intervient dans la signalisation du pré-BCR (**Geier et al., 2006**). Les SNP retrouvés dans le gène codant pour cette protéine et associés au lupus semblent diminuer le niveau de BLK et seraient responsables d'une mauvaise signalisation du pré-BCR et d'un défaut de sélection négative au niveau de la moelle osseuse (**Pamuk et al., 2016**). Confirmant son implication, des souris déficientes pour BLK développent un syndrome auto-immun caractérisé par la production d'auto-anticorps (anti-ADNdb) et le développement d'une glomérulonéphrite (**Wu et al., 2015**). Une autre enzyme, cette fois-ci une tyrosine phosphatase, PTPN22 est impliquée dans la régulation négative de la signalisation en aval du BCR et présente des versions alléliques associées au lupus. L'un de ces allèles est associé à une augmentation de la signalisation du BCR et à une survie des LB autoréactifs due à une mauvaise délétion au niveau central (**Arechiga et al., 2009**). De plus, en périphérie les LB portant cette version allélique ont une expression augmentée de nombreux autres gènes impliqués dans l'activation des LB

(Menard *et al.*, 2011). Enfin, la tyrosine kinase LYN semble également jouer un rôle dans le phénotype anormal des LB au cours du lupus. Les patients lupiques semblent présenter une plus faible expression de cette protéine (Liossis *et al.*, 2001) mais surtout, les souris déficientes pour *Lyn* développent une néphrite accompagnée de la production d'auto-anticorps anti-ADNdb (Lamagna *et al.*, 2014).

Pour résumer, les LB jouent un rôle clé dans le lupus. Ces derniers vont permettre la production d'auto-anticorps pathogènes impliqués dans diverses manifestations et dommages tissulaires. L'on dénote non seulement une augmentation des LB naïfs mais également des LB mémoires et les plasmocytes qui vont jouer un rôle clé dans la maladie lupique. Parmi ceux-ci, on peut retrouver un grand nombre de cellules autoréactives dont la survenue est due à une combinaison de défauts au niveau des tolérances centrale et périphérique mais également au niveau de la régulation du GC et de défauts intrinsèques aux LB.

2. Les lymphocytes T et leurs rôles dans la pathologie lupique.

Il est souvent cru, à tort, que la pathologie lupique est une maladie uniquement associée aux LB, du fait de la forte production d'auto-anticorps. Cependant, les LT jouent en fait un rôle central dans la pathologie lupique. Ils sont en effet nécessaires à la production des auto-anticorps pathogènes du lupus, ces derniers étant en majorité générés au cours de réponses T-dépendantes au sein du GC. D'autres arguments soutiennent l'évidence d'une forte contribution des LT au cours du lupus. Les LT sont activés suite à la reconnaissance, via leur TCR, du complexe peptide-CMH exprimé par les cellules présentatrices d'antigène, or, le locus du CMH est celui présentant la plus forte association avec le risque de développer un lupus (Harley *et al.*, 2008). De plus, l'utilisation d'un anticorps permettant la déplétion des LT chez un modèle murin de lupus améliore les symptômes et prolonge la survie des souris (Wofsy *et al.*, 1987) et diverses études ciblant la migration des LT dans les reins ont montré une amélioration de la néphrite lupique (Menke *et al.*, 2008 ; Steinmetz *et al.*, 2009 ; Bignon *et al.*, 2014). Ces différentes études pointent bien un rôle majeur des LT dans le lupus, c'est pourquoi de nombreux laboratoires se sont intéressés à ces derniers.

a) Les principales populations de lymphocytes T impliquées dans le lupus.

Les LT peuvent être divisés en différentes sous-populations. L'on distingue en premier lieu les LT CD8⁺ et les LT CD4⁺. Les premiers représentent une population de cellules cytotoxiques jouant un rôle dans la réponse antivirale et anti-tumorale. Les seconds, que l'on appelle LT auxiliaires (ou Th), apportent de l'aide aux LB et régulent la réponse immunitaire ; on retrouve parmi ceux-ci différents Th (Th1, Th2, Th17...) que l'on classe en fonction des

cytokines produites et des facteurs de transcription exprimés, et les lymphocytes Treg. Parmi ces différentes populations, certaines sont fortement impliquées dans la physiopathologie du lupus.

Les Th17 représentent une sous population de Th se caractérisant par leur production d'IL17 et l'expression du facteur de transcription ROR γ t ("RAR-related orphan receptor gamma t"). Cette population ne fut identifiée qu'à partir du milieu des années 2000 comme étant une population de LT produisant de l'IL17 mais distincte des Th1 et Th2 (**Harrington *et al.*, 2005**), pourtant, malgré leur découverte plus récente, les Th17 furent rapidement impliqués dans de nombreux processus pathologiques. On leur prête par exemple un rôle dans la sclérose en plaque expérimentale où ces derniers vont infiltrer le système nerveux central et promouvoir la production de cytokines pro-inflammatoires et l'inflammation locale (**Langrish *et al.*, 2005**). Bien qu'il n'existe pas de lien direct décrit entre l'IL17 et le lupus d'un point de vue génétique, son implication dans la pathologie lupique fut suggérée par diverses études. L'IL17 a été montrée comme augmentée dans le sérum des patients lupiques (**Zhao *et al.*, 2010**). Bien que certaines études aient pu mettre en évidence une corrélation entre l'activité de la maladie et le niveau sérique d'IL17 (**Chen *et al.*, 2010**), d'autres tendent à montrer que le niveau de cette cytokine ne varie pas entre les patients actifs et inactifs (**Zhao *et al.*, 2010**). Bien qu'il semble y avoir des contradictions quant aux niveaux d'IL17 en fonction de l'activité de la maladie, cette cytokine n'en reste pas moins potentiellement impliquée dans la physiopathologie de la maladie lupique. En effet, diverses études ont pu montrer une production locale d'IL17 au niveau de la peau (**Tanasescu *et al.*, 2010**) et des reins (**Crispin *et al.*, 2008**) chez les patients. Les Th17 pourraient donc jouer un rôle dans le développement de certaines atteintes lupiques ; par exemple l'IL17 semble augmentée chez les patients présentant une atteinte du système nerveux central (**Vincent *et al.*, 2013**), ce qui n'est pas surprenant compte tenu de l'implication des cellules Th17 dans une autre pathologie auto-immune affectant le SNC : la sclérose en plaque. L'implication de cette cytokine dans le lupus a également été en grande partie suggérée chez des modèles murins. En effet, des taux élevés d'IL17 ont été décrits chez la souris MRL/lpr (**Yang *et al.*, 2009**) et chez la souris C57BL/6-lpr/lpr (**Kyttaris *et al.*, 2010**). Comme chez l'Homme, l'infiltration de LT produisant de l'IL17 au niveau des reins (**Zhang *et al.*, 2009**) ou de la peau (**Kido *et al.*, 2011**) est retrouvée chez le modèle MRL/lpr. Une preuve plus directe du rôle de cette cytokine provient de modèles de souris ne produisant pas d'IL23, une cytokine connue pour induire la différenciation en Th17 et la production d'IL17. Chez ces souris, la production d'auto-anticorps est diminuée et est accompagnée de plus faibles dépôts de complément et d'anticorps au niveau des reins (**Kyttaris *et al.*, 2010**). L'IL17 semble donc

jouer un rôle dans la réponse humorale pathologique du lupus et, de manière plus précise, elle a été impliquée dans la formation des GC puisque l'injection d'un virus produisant de l'IL17 à des souris saines induit la formation de GC au niveau de la rate (**Hsu et al., 2008**). Pour finir, parallèlement à son implication dans la réponse humorale, l'IL17 pourrait jouer un rôle en induisant la production de chimiokines permettant le recrutement des monocytes et neutrophiles au niveau rénal, mais également en favorisant la production de NET par ces derniers (**Pisitkun et al., 2012**). Toutes ces données suggèrent donc que l'IL17 jouerait un rôle clé dans la pathologie lupique, et plus particulièrement dans le développement de certaines atteintes (cutanées, rénales...).

Il existe également, au cours du lupus, une population de LT particulière, ces derniers n'expriment ni le marqueur CD4, ni le marqueur CD8, et sont encore aujourd'hui nommés LT doubles négatifs (DN). Il existe diverses hypothèses concernant l'origine de ces cellules. Premièrement, elles pourraient provenir du thymus et correspondraient alors à des cellules ayant échappé à la sélection négative et rejoindraient ensuite la circulation (**Priatel et al., 2001**). Une autre hypothèse consiste à envisager que ces cellules soient générées en périphérie. Cette seconde hypothèse est appuyée par le fait que ces cellules peuvent être générées chez des souris irradiées ne présentant pas de thymus (**Ford et al., 2006**). De plus, les souris présentant la mutation *lpr* ont une forte accumulation de lymphocytes DN dans les OLS et divers organes (**Shirai et al., 1990 ; Watanabe et al., 1995**). La stimulation antigénique chez ces souris provoque une forte prolifération des LT DN que l'on ne retrouve pas chez les souris sauvages possédant Fas (**Mehal et al., 1998**) suggérant alors un défaut au niveau périphérique. Les patients lupiques présentant une mutation dans le gène codant la protéine Fas montrent également une accumulation dans le sang de cette population de LT DN (**Fleisher, 2008 ; Arnold et al., 2007**). Ces LT DN présentent un phénotype pro-inflammatoire, démontré *in vitro* par leur forte capacité à produire de l'IFN γ , du TNF α (**Zlotnik et al., 1992**). Dans le cadre du lupus, ces LT sont augmentés dans la circulation sanguine et infiltrent également les reins chez ces patients (**Crispin et al., 2008**). De plus, ils produiraient en grande quantité de l'IL17, cytokine connue pour jouer un rôle clé dans la pathologie lupique (**Crispin et al., 2008**). Ces résultats ont également été démontrés chez la souris. En effet, les LT DN chez la souris MRL/*lpr* présentent également une forte capacité de production d'IL17 (**Zhang et al., 2009 ; Kyttaris et al., 2010**). De plus, la stimulation *in vitro* de LT provenant de cette souris avec de l'IL23 induit la génération de LT DN capables de causer une néphrite si transférés à des souris immunodéficientes (**Zhang et al., 2009 ; Kyttaris et al., 2010**). Ces LT DN jouent donc un rôle

dans le lupus et plus particulièrement, semblent en partie médier la survenue de la néphrite lupique.

Si l'on s'intéresse à la réponse T au cours du lupus, il faut s'interroger sur les mécanismes de régulation de cette dernière. Or les Treg semblent également être impactés lors de la pathologie lupique et ne joueraient pas leur rôle de régulateurs négatifs, ou en tout cas pas suffisamment. La preuve de l'importance des Treg vient du fait que la mutation du facteur de transcription spécifique des Treg, FOXP3, cause un syndrome auto-immun nommé IPEX ("Immunodysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked"). En ce qui concerne le lupus, il existe des études allant dans le sens d'un défaut au niveau de ces cellules, mais également des études contradictoires montrant qu'il n'y aurait aucun changement au niveau de ces lymphocytes. Si l'on s'intéresse d'abord aux modèles murins de lupus, les diverses études semblent aller dans le sens d'un défaut au niveau des Treg. En effet, chez la souris NZB/W jeune, il y aurait une fréquence diminuée des Treg dans les OLS en comparaison à une souris saine de même âge (**Wu et al., 2004**), cette observation fut également retrouvée dans le cas de souris âgées. Une autre étude a montré, quant à elle, une augmentation de la proportion de Treg dans les ganglions drainant les reins mais une diminution dans la rate chez les souris NZB/W, accompagnée en revanche d'une augmentation de leur nombre total dans les deux localisations (**Scalapino et al., 2006**). Une dernière étude a montré une diminution progressive du nombre de Treg dans les ganglions et le sang des souris lors du développement de la maladie (**Humrich et al., 2010**), cette diminution était accompagnée d'une plus faible prolifération des Treg en comparaison aux autres LT CD4⁺. Concernant l'autre modèle bien connu de lupus, la souris MRL/lpr, les proportions de Treg semblent chuter dans les OLS avec le développement de la pathologie (**Yang et al., 2008**). D'un point de vue fonctionnel, les Treg semblent conserver leurs capacités suppressives dans le cas des deux modèles murins (**Scalapino et al., 2006 ; Yang et al., 2008**) bien qu'une autre étude a quant à elle montré une plus faible capacité à inhiber la prolifération chez la MRL/lpr (**Divekar et al., 2011 ; Parietti et al., 2008**). Ces différentes études tendent vers un plus faible nombre de Treg plutôt qu'une diminution de leur capacité et que ce nombre réduit serait en fait insuffisant pour contrôler l'inflammation chez ces modèles de souris. En revanche les résultats des études menées chez l'Homme sont plus disparates et ont montré des nombres ou capacités réduites (**Lyssuk et al., 2007 ; Valencia et al., 2007 ; Bonelli et al., 2008 ; Miyara et al., 2005**) tandis que d'autres ne montraient aucun changement (**Alvarado-Sánchez et al., 2006 ; Vargas-Rojas et al., 2008**). D'autres encore ont montré une augmentation des Treg par rapport aux individus sains (**Lin et al., 2007**) ou que le problème venait d'une résistance des autres LT à la suppression induite par les Treg (**Chowdary**

Venigalla et al., 2008). Cette hétérogénéité concernant les Treg au cours du lupus chez l'Homme vient notamment du fait que les marqueurs utilisés dans les études ne sont pas les mêmes et ne garantissent pas toujours de la pureté de la population cellulaire étudiée. Ainsi, Miyara et ses collaborateurs ont montré que l'on peut classer les Treg en trois groupes en utilisant le marqueur CD45RA : le groupe I correspond aux cellules CD45RA⁺Foxp3^{lo}, le groupe II contient les cellules CD45RA⁻Foxp3^{hi} et le groupe III se constitue de cellules CD45RA⁻Foxp3^{lo} (**Miyara et al., 2009**). Les deux premiers groupes correspondent à de vrais Treg avec des capacités suppressives tandis que le troisième ne présente pas d'activité suppressive et produit même des cytokines caractéristiques des LT effecteurs. Concernant le lupus, il semble que les groupes I et III soient augmentés tandis que le groupe II serait diminué dans le sang périphérique (**Miyara et al., 2009**). Une autre étude a également montré une augmentation des groupes I et III, la première corrélant avec l'activité de la maladie (**Pan et al., 2012**). Un autre marqueur récemment utilisé pour identifier les Treg ne produisant pas de cytokines, le facteur de transcription Hélios, a permis de confirmer ces observations. Dans ces études, les auteurs ont pu remarquer une augmentation du pourcentage de Treg FOXP3⁺Hélios⁺ dans la circulation et une corrélation avec l'activité de la maladie (**Golding et al., 2013 ; Alexander et al., 2013**), ces derniers conserveraient également leurs capacités suppressives. Ces études démontrent alors que le nombre et l'activité des Treg ne seraient pas altérés chez l'Homme au cours du lupus mais ils resteraient tout de même insuffisants pour contrecarrer l'inflammation.

Finalement, une autre sous-population de LT semble jouer un rôle clé dans la pathologie lupique, les lymphocytes TFH. En effet, cette maladie étant grandement médiée par les anticorps et ces derniers semblant provenir de LB ayant subi la réaction du GC, il est légitime de penser que des dérégulations au niveau des TFH vont également être impliquées dans la maladie lupique. Un des premiers exemples allant dans le sens d'une implication des TFH vient de la souris *sanroque*, cette dernière présente une augmentation d'ICOS concomitante avec un nombre accru de TFH, une augmentation de l'IL21 et un plus grand nombre de GC (**Vinueza et al., 2005**). ICOS étant l'un des marqueurs fortement exprimés par les TFH, les études pointant ICOS au cours du lupus suggèrent une dérégulation des TFH. Or, l'expression d'ICOS a été montrée comme augmentée dans les LT CD4⁺ de patients lupiques (**Yang et al., 2005**), de plus, cette expression était d'autant plus forte que les patients présentaient une atteinte rénale déclarée (**Li et al., 2012**). Des LT ICOS⁺ ont pu être détectés dans les reins de patients à proximité des LB (**Hutloff et al., 2004**), montrant une potentielle implication des TFH, non seulement dans la réponse systémique, mais également dans le développement de l'atteinte

rénale caractéristique de la maladie. D'autres molécules que l'on sait impliquées dans l'interaction T-B ou encore dans la différenciation des TFH ont été associées à la maladie lupique. CD40L a en effet été montrée comme constitutivement augmentée à la surface des LT chez les patients (**Desai-Mehta et al., 1996 ; Katsiari et al., 2002**) or cette molécule joue un rôle dans les premières phases de différenciation des TFH mais également lors de leur interaction avec les LB dans le GC. De la même manière, l'interaction entre OX40 et OX40L est essentielle dans les premières étapes de différenciation des TFH et, chose intéressante, l'expression d'OX40 est augmentée chez les patients lupiques et corrèle avec l'activité de la maladie (**Patschan et al., 2006**). De plus, OX40 se trouve fortement exprimé dans les reins de patients atteints de néphrite lupique (**Aten et al., 2000**). Finalement OX40L, chez les patients lupiques, est exprimé par les cellules présentatrices d'antigène dont la fréquence corrèle avec l'activité de la maladie et le signal ainsi fourni par ces cellules permet la différenciation des LT naïfs en TFH (**Jacquemin et al., 2015**). A l'instar de ces divers marqueurs, les cytokines produites par les TFH sont elles aussi impliquées dans le lupus. La cytokine BAFF est par exemple fortement augmentée au cours du lupus et ses niveaux sériques corrèlent avec les titres d'anticorps anti-ADNdb (**Zhang et al., 2001**) et le blocage de la signalisation en aval de cette dernière suffit à améliorer les lésions rénales dans un modèle murin de lupus (**Arkatkar et al., 2018**). L'IL21, quant à elle, est fortement augmentée dans le sérum des patients lupiques, en particulier ceux présentant une néphrite, et corrèle avec l'activité de la maladie (**Wang et al., 2007**). On retrouve également un plus fort pourcentage de LT produisant de l'IL21 chez les patients lupiques (**Dolff et al., 2011**) ainsi que de nombreux polymorphismes dans les gènes de l'IL21 et de son récepteur (**Webb et al., 2009 ; Lan et al., 2014**). Ces diverses études ont également été confirmées chez la souris puisque, outre la souris *sanroque*, le modèle BXSB/yaa présente une forte augmentation de l'ARNm du gène de l'IL21 mais également des taux sériques de cette cytokine (**Ozaki et al., 2004**). La souris MRL/lpr présente quant à elle des LT produisant 10 fois plus d'IL21 que les souris contrôles (**Herber et al., 2007**) et l'absence du récepteur de l'IL21 réduit le nombre de TFH chez ces souris (**Rankin et al., 2012**). Enfin, notre laboratoire a pu montrer que la souris NZB/W présentait un nombre accru de TFH et que ces derniers produisaient plus d'IL21 (**Le Coz et al., en préparation**). Plus récemment, l'inhibition du métabolisme du chez divers modèles murins de lupus est suffisant afin de cibler les TFH autoréactifs, sans affecter les réponses face à un pathogène, probablement du fait d'un métabolisme différent dans les cellules auto-réactives (**Choi et al., 2018**). Finalement, quelques études ont directement montré une dérégulation des TFH chez les patients lupiques. En se basant sur l'expression de CXCR5, PD1 ("Programmed cell Death 1") et ICOS, diverses

équipes ont pu montrer une augmentation des TFH circulants chez les patients lupiques (**Simpson et al., 2010 ; Choi et al., 2015 ; Xu et al., 2015**). De plus, en se basant sur les travaux de Morita et de ses collaborateurs (**Morita et al., 2011**), décrivant diverses sous-populations de TFH (TFH1, TFH2 et TFH17), notre laboratoire a pu mettre en évidence une dérégulation de la balance entre ces diverses populations chez les patients lupiques (**Le Coz et al., 2013**). Les patients présentent en effet une diminution des TFH1 dans la circulation associée à une augmentation de la proportion de TFH2 et donc un accroissement des TFH les plus prompts à fournir une aide à la différenciation des LB (à savoir TFH2 et TFH17).

b) Dérégulation de la signalisation des LT au cours du lupus.

Les LT jouant un rôle majeur au cours du lupus, de nombreuses équipes ont voulu comprendre d'où provenait le phénotype aberrant de ces cellules et ont pu mettre à jour de nombreux défauts intrinsèques aux LT, en particulier au niveau de la signalisation en aval du TCR et des molécules de co-stimulation (**Figure 12**).

En premier lieu, il existe des défauts directement au niveau du TCR dans les LT lupiques. Le TCR reconnaît des peptides présentés par les molécules du CMH et le signal est transmis au niveau intracellulaire par le complexe de différentes sous-unités (δ , ϵ , γ et ζ) formant le CD3. Au moment de l'activation, la kinase Lck ("Lymphocyte Kinase") va phosphoryler des motifs ITAMs ("Immunoreceptor Activation Tyrosine Motifs") au niveau de la chaîne ζ du CD3 et permettre le recrutement de la protéine ZAP70 ("Zeta Associated protein of 70 kDa"), également phosphorylée par Lck, et induire les voies de signalisation en aval. Dans les LT de patients lupiques, l'activation par le TCR va mener à une phosphorylation anormalement plus rapide et à des flux de calcium plus élevés menant à une réactivité accrue des LT (**Liossis et al., 1998**). Cela est notamment démontré par une phosphorylation des protéines de signalisation en aval plus forte et plus rapide. Cette signalisation plus rapide est en grande majorité due à des remaniements au niveau du complexe CD3-TCR. En effet, l'expression de la chaîne ζ est diminuée dans les LT des patients et est remplacée par son homologue : la chaîne γ du RFc (**Liossis et al., 1998**). Alors que la chaîne ζ possède 3 motifs ITAM, la chaîne γ du RFc n'en possède qu'un seul, ce qui permet une phosphorylation plus rapide et une mise en place plus rapide de la signalisation en aval (**Figure 12**). De plus, au lieu de recruter ZAP70, la chaîne γ du RFc va permettre le recrutement de la kinase Syk ("Spleen tyrosine Kinase") or, l'interaction de Syk avec la chaîne γ est 100 fois plus forte que l'interaction entre ZAP70 et la chaîne ζ , augmentant encore l'intensité de la signalisation qui va en découler (**Nambiar et al., 2003**). Le fait de réintroduire *in vitro* la chaîne ζ dans les LT de patients lupiques permet de normaliser le

flux calcique et restaure la production d'IL2 (**Nambiar *et al.*, 2003**) montrant bien l'importance de cette chaîne dans la signalisation anormale des LT au cours du lupus.

Il y a également un autre défaut dans les LT lupiques qui explique la plus forte signalisation du TCR. En temps normal, les complexes TCR-CD3 sont exclus des structures nommées radeaux lipidiques et sont distribués sur toute la surface des LT. Lors d'une stimulation du TCR, il va y avoir un regroupement des complexes TCR-CD3 à la surface des LT et leur association avec les radeaux contenant diverses molécules de signalisation, pour former avec les CPA ce que l'on nomme la synapse immunologique. Cependant, les LT isolés de patients présentent des clusters de TCR déjà préformés et associés aux radeaux lipidiques ce qui les prépare/sensibilise déjà à l'activation (**Kabouridis *et al.*, 2008**). Ces radeaux lipidiques présentent des modifications de leur composition puisque l'on y retrouve une expression augmentée de la chaîne γ du RFc, de Syk ou encore de la Phospholipase C γ (PLC γ). De plus, des molécules co-inhibitrices telles que CTLA4 ou BTLA ("B and T Lymphocyte Attenuator") semblent être exclues des radeaux lipidiques (**Figure 12**) (**Jury *et al.*, 2010 ; Sawaf *et al.*, 2018**) ce qui va empêcher/diminuer leurs fonctions inhibitrices et participer au phénotype hyperactif des LT dans le lupus.

On retrouve également des anomalies au niveau des molécules de co-stimulation et d'adhésion dans les LT au cours du lupus. La molécule CD44, qui correspond au récepteur à l'acide hyaluronique, est exprimée à la surface des LT et permet leur migration dans les tissus périphériques. Cette molécule est faiblement exprimée par les LT naïfs et présente de nombreuses isoformes dues à un épissage alternatif de son exon variable. Dans les LT de patients, on peut retrouver une plus forte expression des isoformes v3 et v6 (formes retrouvées dans les LT) et leur expression corrèle avec l'activité de la maladie (**Crispín *et al.*, 2010**). De plus, lorsque l'on s'intéresse aux reins des patients, on peut observer un grand nombre de LT exprimant CD44 ainsi qu'une phosphorylation de ERM ("Ezrin/Radixin/Moesin") qui se trouve dans la signalisation en aval de CD44 (**Cohen *et al.*, 2008**), suggérant l'implication de la molécule CD44 dans la migration anormale des LT dans les reins au cours du lupus. La famille des SLAM ("Signaling Lymphocytic Activation Molecule"), qui appartient à la superfamille des Ig, comprend 9 membres et servent de molécules de co-stimulation à la surface des LT. Des études de GWAS ont identifié des variants dans les gènes codant pour les protéines de famille des SLAM (**Detre *et al.*, 2010**).

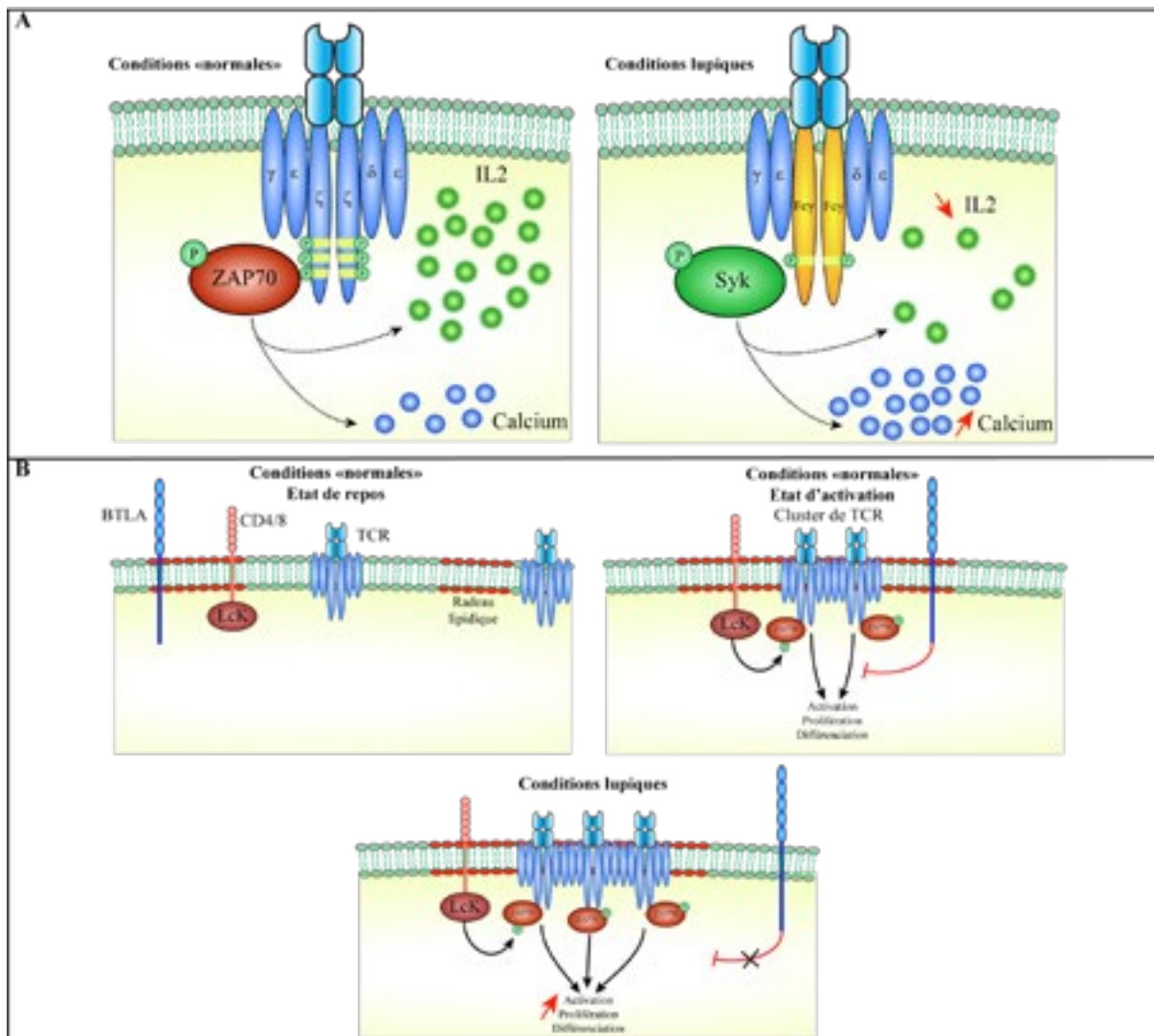


Figure 12 : Dysfonction de la signalisation des LT dans le lupus.

A. Dans les conditions «normales» le «signaling» du TCR passe par le complexe CD3 dont les diverses chaînes permettent de relayer le signal au niveau intracellulaire. La chaîne ζ en particulier, possède trois domaines ITAM qui sont phosphorylés suite à l'engagement du TCR, ce qui permet le recrutement de la protéine ZAP70 et la mise en place de la signalisation en aval. Dans le cas du lupus, la chaîne ζ est remplacée par la chaîne γ du RFc. Cette chaîne ne possède qu'un seul motif ITAM, la rendant ainsi plus facilement phosphorylable. De plus, elle recrute la protéine Syk, au lieu de ZAP70, dont l'interaction avec la chaîne γ est 100 fois plus forte que celle de ZAP70 avec la chaîne ζ. Cela va aboutir à une signalisation plus forte et plus rapide en aval du TCR avec, par exemple, des niveaux de calcium intracellulaire plus élevés ainsi que des niveaux d'IL2 plus faibles.

B. A l'état de repos, les LT présentent un TCR dispersé tout au long de la membrane plasmique et exclu des radeaux lipidiques qui contiennent un certain nombre de molécules nécessaires à la mise en place des signaux en aval de ce récepteur (ex : le co-récepteur CD4 et la protéine Lck lui étant associée), ou permettant de réguler l'activation des LT (ex : BTLA). Lors de l'activation des LT, les TCR se regroupent en cluster au niveau des radeaux lipidiques pour former une structure nommée la synapse immunologique. L'inclusion dans les radeaux va permettre, d'une part le rapprochement avec la molécule CD4, permettant la phosphorylation de ZAP70 par Lck, mais également la possible régulation négative par des molécules co-inhibitrices telle que BTLA. En revanche, dans les LT lupiques, le TCR est «pré-clusturisé» et associé aux radeaux lipidiques, ce qui facilite leur activation. De plus, diverses molécules co-inhibitrices, dont fait partie BTLA sont exclues des radeaux lipidiques et ne vont donc pas pouvoir assurer leur rôle de régulateur négatif de la signalisation du TCR.

De plus, une étude a pu mettre en évidence un défaut au niveau de SLAMF6 dans les LT de patients lupiques puisque son engagement ne permet pas d'induire une production normale

d'IL2 (**Chatterjee et al., 2011**). Une autre molécule de co-stimulation, CD40L est impactée lors du lupus. CD40L est normalement exprimé par les LT activés et permet de fournir de l'aide aux LB qui expriment quant à eux CD40. Dans le cas du LED, les LT présentent une expression accrue et prolongée après activation mais également une expression basale augmentée de la molécule CD40L qui corrèle avec l'activité de la maladie (**Koshy et al., 1996 ; Desai-Mehta et al., 1996**). Enfin, des études ont montré l'implication d'une autre molécule de co-stimulation : ICOS. Cette dernière est surexprimée chez la souris *sanroque*, qui montre des symptômes de type lupique (**Vinueza et al., 2005**). En plus de cela, cette dernière est impliquée dans le contrôle des fonctions effectrices des LT dans les reins de souris MRL/lpr (**Odegard et al., 2009**) et dans la sécrétion de l'IL21, la production d'IgG et la différenciation en plasmocytes chez la souris lupique (**Odegard et al., 2008**).

Nous avons ainsi pu voir dans ce chapitre que le lupus est une maladie complexe. Cette pathologie systémique est causée par un ensemble de prédispositions génétiques qui vont se combiner à différents facteurs environnementaux et aboutir à la rupture de tolérance menant à la production d'auto-anticorps. On retrouve principalement des défauts au niveau de la gestion des débris apoptotiques mais également des anomalies du système immunitaire, que ce soit du point de vue de la réponse innée ou adaptative. Les auto-anticorps produits (principalement contre des composants nucléaires) mais également les cellules immunitaires anormalement activées vont engendrer les diverses atteintes observées lors du lupus. L'une d'entre-elles, la néphrite lupique, constitue une des atteintes les plus graves que l'on peut observer durant la maladie. Le chapitre suivant sera donc consacré à la néphrite lupique en réalisant d'abord un rappel de base de la physiologie rénale avant d'aborder les différentes classes de néphrite ainsi que les rôles du système immunitaire et des cellules rénales dans la physiopathologie de cette atteinte.

Partie 2 : La néphrite lupique, une atteinte emblématique du lupus

I-Structure et fonctions du rein.

Avant de pouvoir aborder la néphropathie lupique, il est important de rappeler quelles sont les fonctions primaires du rein et comment ce dernier est organisé.

Les reins sont responsables de plusieurs fonctions. Tout d'abord, ils assurent l'élimination de toxines et de divers déchets du métabolisme comme par exemple l'urée. Ils régulent également le volume, l'osmolarité et l'acidité des compartiments sanguin et extracellulaire en modulant la réabsorption de l'eau et de divers ions et peuvent, de plus, influencer le métabolisme phosphocalcique. Enfin, les reins sont responsables de la production de nombreuses hormones et participent par exemple au processus d'érythropoïèse, via la synthèse d'érythropoïétine, ou à la synthèse de la vitamine D (**Silbernagl *et al.*, 2008**).

L'on distingue deux grandes zones au niveau des reins : le cortex et la médulla. Le cortex est la partie la plus extérieure du rein qui est en contact avec la capsule et contient les glomérules. La médullaire représente la partie la plus interne et est constituée des pyramides de Malpighi, connectées aux calices qui recueillent l'urine provenant des canaux collecteurs. Les calices vont se rejoindre au niveau de la structure que l'on appelle le bassinnet et qui se déverse dans l'urètre.

La vascularisation rénale comporte un système artériel et un système veineux satellite de ce dernier. Au niveau artériel, l'artère rénale prend naissance au niveau de l'aorte avant de se diviser en plus petites artères à l'intérieur du rein. Ces diverses ramifications aboutiront aux artéριοles afférentes que l'on retrouve au niveau du glomérule et qui vont permettre la filtration primaire du sang. Le sang va alors repartir par les artéριοles efférentes vers la médullaire pour donner naissance à un réseau de capillaires nommé *vasa recta* permettant l'échange entre l'urine et le sang au niveau des tubules avant de déboucher dans le système veineux rénal, relié à la veine cave inférieure.

Les glomérules présents dans le cortex font partie intégrante des unités fonctionnelles du rein que l'on nomme les néphrons et dont nous allons parler juste après. Les glomérules vont permettre de filtrer le sang provenant des artéριοles afin de générer l'urine primaire. Ils entourent les boucles capillaires et sont délimités par la capsule de Bowman. On retrouve différents types cellulaires au sein des glomérules : les cellules endothéliales, les cellules mésangiales, les podocytes et les cellules épithéliales pariétales (**Figure 13**) (**Scott *et al.*, 2015**). Les cellules endothéliales entourent les capillaires au sein du glomérule et sont séparées par des

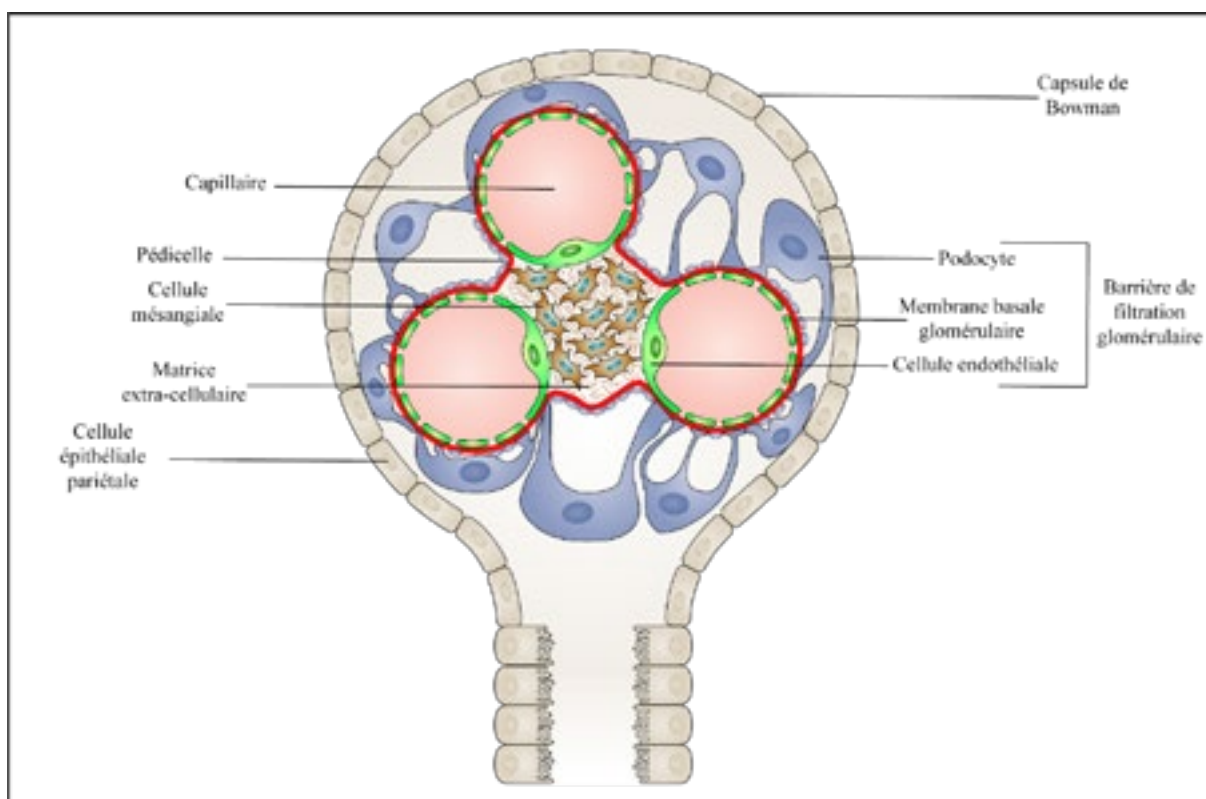


Figure 13 : Organisation du glomérule rénal.

Le glomérule est composé de quatre types cellulaires principaux. Les cellules endothéliales entourent les capillaires au sein du glomérule. Elles sont entourées par la membrane basale glomérulaire sur laquelle reposent les podocytes ; leurs prolongements cytoplasmiques (les pédicelles) vont totalement recouvrir cette membrane basale. L'ensemble de ces trois éléments forme la barrière de filtration. On retrouve également les cellules mésangiales qui sécrètent de la matrice extra-cellulaire et permettent le maintien des boucles capillaires. Enfin, le glomérule est encapsulé par les cellules épithéliales pariétales qui forment la capsule de Bowman.

pores de 50 à 100nm permettant le passage de fluides, de solutés du plasma et de protéines ; en revanche ils empêchent le passage des globules rouges, des leucocytes et des plaquettes. Autour de ces cellules endothéliales, on retrouve la membrane basale glomérulaire qui sert à la fois de filtre intermédiaire entre les cellules endothéliales et les podocytes, mais qui permet également de stabiliser l'ensemble cellules endothéliales-membrane basale-podocyte : ce triple ensemble définit ce que l'on nomme la barrière de filtration glomérulaire. Concernant les derniers membres de cet ensemble, les podocytes (ou parfois appelés cellules épithéliales viscérales), ce sont des cellules de type épithélial possédant des extensions cytoplasmiques, les pédicelles, qui vont leur permettre de s'enrouler autour des capillaires. Les podocytes adjacents sont reliés par des jonctions SD ("Slit Diaphragm") permettant de filtrer l'urine primaire et la rétention des composants de haut poids moléculaire contenu dans le plasma. Le troisième type cellulaire que l'on retrouve à l'intérieur du glomérule correspond aux cellules mésangiales qui vont former le mésangium (Schlondorff *et al.*, 2009). Elles sécrètent de la matrice extracellulaire et vont permettre le développement et le renforcement des boucles capillaires dans le glomérule. Ces cellules possèdent des fonctions contractiles qui leur permettent de réguler le flux capillaire du

fait de leur contact direct avec les cellules endothéliales (à l'instar de péricytes contractiles). Il existe également chez ces cellules, des fonctions phagocytaires leur permettant d'éliminer les macromolécules s'accumulant dans l'espace sous-endothélial et l'espace mésangial. Le dernier type cellulaire composant le glomérule est représenté par les cellules épithéliales pariétales. Ces cellules forment la partie interne de la capsule de Bowman qui collecte l'urine primaire. Cependant des études récentes semblent montrer que ces cellules constitueraient également un réservoir de cellules progénitrices permettant de régénérer les podocytes lorsque de forts dommages surviennent à ce niveau (**Romagnani, 2011**).

Si l'on en revient au néphron (**Figure 14**), il est organisé de façon à filtrer puis réabsorber successivement divers composés afin de constituer ce que l'on appelle d'abord l'urine primitive qui va se transformer en urine de plus en plus concentrée au fur et à mesure des étapes de modification le long du néphron (**Grünfeld, 2017 ; Silbernagl et al., 2008**).

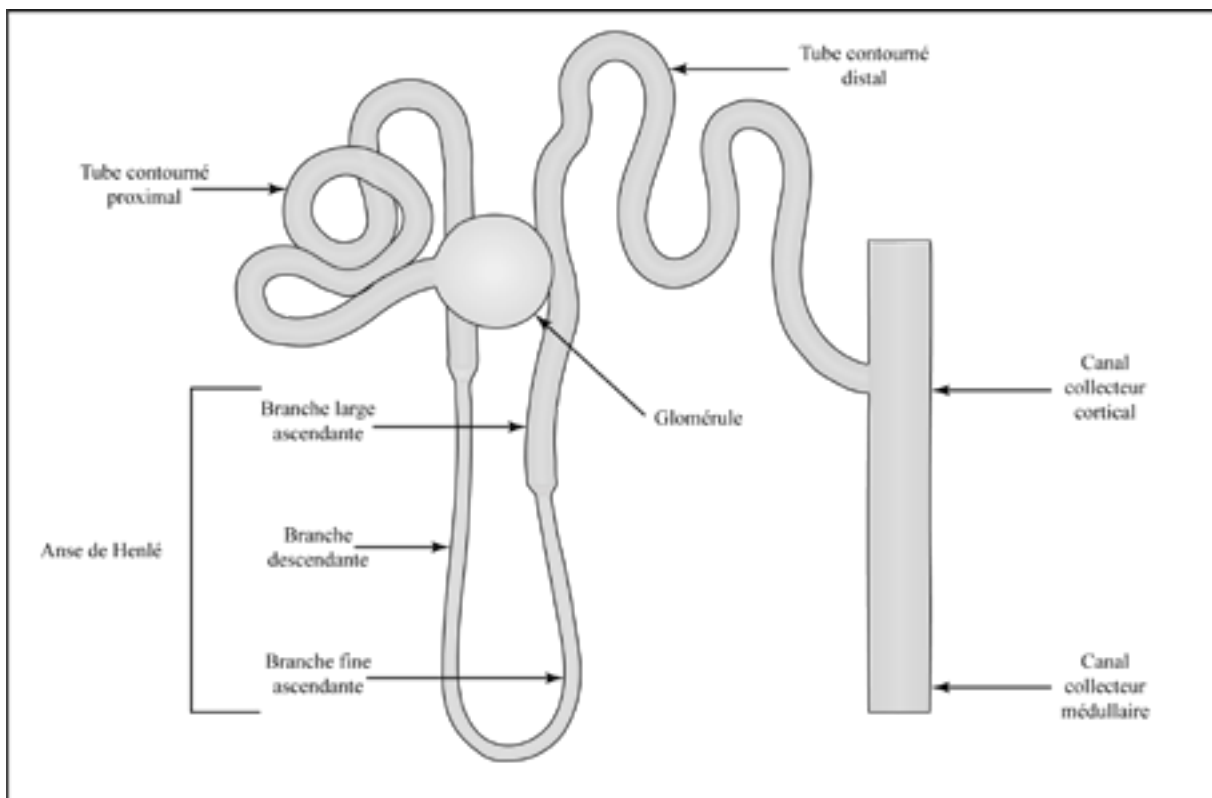


Figure 14 : Organisation du néphron.
 Représentation schématique de l'organisation du néphron. L'urine primitive est filtrée au niveau du glomérule puis rejoint le tube contourné proximal où a lieu la majorité de la réabsorption de l'eau, du sodium et du chlore. L'urine primitive poursuit son chemin vers l'anse de Henlé où il va y avoir réabsorption d'eau dans la partie descendante et du sodium dans la partie ascendante. L'urine rejoint ensuite le tube contourné distal où il y aura réabsorption de sodium mais pas d'eau, permettant à l'urine d'atteindre sa dilution maximale. Enfin, le canal collecteur va permettre la réabsorption des quantités restantes d'eau et de sodium mais ce, de façon régulée par les hormones et selon les besoins de l'organisme.

Le sang est tout d'abord filtré au niveau de la barrière de filtration glomérulaire où les macromolécules vont être retenues afin de ne laisser passer que les petits solutés. Cette urine primaire va alors se retrouver dans la capsule de Bowman avant de pouvoir pénétrer dans le

tube contourné proximal (TCP). C'est au niveau du TCP que l'urine va subir ses premières modifications. Dans le TCP, 80% du bicarbonate sera réabsorbé ainsi que 65% du sodium dont la réabsorption permet celle du calcium, du chlore et de l'eau. Faisant suite au TCP, on trouve l'anse de Henlé qui est divisée en quatre parties : la branche descendante, la branche fine ascendante, la branche large ascendante (BLA) médullaire et la BLA corticale. Elle joue un rôle dans la réabsorption du sodium et la différence de potentiel ainsi générée permet une réabsorption de calcium et de magnésium. La réabsorption de l'eau sera en grande partie finalisée au niveau de l'anse de Henlé en suivant le principe d'échange par contre-courant. Une fois que l'urine a subi les modifications nécessaires dans l'anse de Henlé, elle rejoint le tube contourné distal (TCD). Il y a alors réabsorption de sodium et de chlore mais l'eau n'est pas réabsorbée, l'urine est alors à sa dilution maximale. Ayant traversé le TCD, l'urine va pouvoir se jeter dans le canal collecteur, on distingue le canal collecteur cortical et le canal collecteur médullaire. C'est au niveau de ce canal que l'osmolarité et l'acidité de l'urine sont modulées en fonction des besoins de l'organisme (les quantités réabsorbées dans les parties antérieures du néphron représentent 95% du sodium et de l'eau et restent constantes). On retrouve deux types principaux de cellules : les cellules principales et les cellules intercalaires. Les cellules principales vont réabsorber l'eau et le sodium sous le contrôle de l'aldostérone et de la vasopressine (ou hormone antidiurétique) tandis que les cellules intercalaires sécrètent des protons. L'urine terminale est alors excrétée au niveau des calices et rejoint l'urètre.

II-Description et classification de la néphrite lupique.

La néphrite lupique constitue l'une des atteintes les plus graves que l'on peut observer au cours de la maladie lupique. Bien qu'elle ne touche que 40 à 60% des patients suivant leurs ethnies et sexe, on considère qu'il y a une atteinte rénale chez 90% des patients mais que seuls ces 40-60% développent des signes cliniques de néphrite. De plus, malgré les différents critères mis en place afin d'évaluer et de suivre la sévérité de la néphrite, 10 à 20% des patients souffrant d'une atteinte rénale évolueront vers une insuffisance rénale de stade terminal dans les 5 années suivant le diagnostic.

Au niveau clinique, la néphrite se caractérise par des périodes de poussée et de rémission et si elle n'est pas prise en charge/contrôlée, elle peut aboutir à une glomérulosclérose, une fibrose interstitielle, une atrophie tubulaire et une défaillance rénale progressive pouvant mener à une insuffisance rénale terminale nécessitant une greffe. L'atteinte rénale peut se traduire par la présence d'une hématurie, de protéinurie ou encore la diminution de la fonction rénale. Lorsque la protéinurie dépasse 500mg/jour ou que le débit de filtration rénale est inférieur à

60ml/min/1,73m², une biopsie sera requise pour établir le diagnostic définitif et permettre de déterminer l'étendue des dommages rénaux et la classe de néphrite dont le patient est atteint.

Lors de la néphrite lupique, c'est principalement le compartiment glomérulaire qui est atteint, on parle alors de glomérulonéphrite lupique. Toutefois, il est également possible d'observer une inflammation du compartiment tubulo-interstitiel qui n'est cependant pas prise en compte à l'heure actuelle dans la classification des classes de néphrites lupiques bien qu'elle soit souvent associée aux formes sévères de glomérulonéphrite. Cette inflammation se caractérise notamment par le dépôt de complexes immuns au niveau de la membrane basale tubulaire et l'infiltration de cellules immunitaires dans ce compartiment, conduisant à une fibrose interstitielle et une atrophie tubulaire. La manière d'évaluer l'inflammation du compartiment interstitiel est le plus souvent qualitative et s'appuie uniquement sur l'étendu de l'aire rénale infiltrée par les leucocytes. En revanche, l'inflammation glomérulaire peut être évaluée par divers critères et les diverses lésions vont permettre de déterminer la classe de glomérulonéphrite dont souffre le patient mais aussi de déterminer un index d'activité et de chronicité (**Figure 15**) (**Yu et al., 2017**).

Ce distinguo entre les sous-classe de glomérulonéphrite joue un rôle clé au niveau diagnostique puisque certaines (III et IV) sont connues comme étant plus agressives et de moins bon pronostic. Cette classification a d'abord été mise en place par l'organisation mondiale de la santé puis par la société internationale de néphrologie et la société de pathologie rénale en 2003 qui décrit six classes différentes (**Grünfeld, 2017**).

La classe I (ou glomérulonéphrite lupique mésangiale minime) correspond au dépôt de complexes immuns au niveau du mésangium mais que l'on ne peut détecter que par fluorescence ou microscopie électronique. La classe II correspond à la glomérulonéphrite lupique mésangiale proliférative, comme son nom l'indique elle est définie par une prolifération mésangiale (au moins trois cellules par aire mésangiale) et/ou une expansion de la matrice mésangiale accompagnée de dépôts mésangiaux (toujours non visibles en microscopie optique). Elle peut être accompagnée de dépôts au niveau capillaire, visibles en fluorescence (**Figure 15**). Les classes I et II résultent donc du dépôt de complexes immuns au niveau mésangial et de l'expansion de la matrice mésangiale, cependant ils ne causent pas de sclérose irréversible et ce probablement dû au fait que les capacités de régénération du mésangium suffisent à compenser ces effets.

La glomérulonéphrite lupique focale ou de classe III implique que les lésions extramésangiales actives et/ou chroniques vont affecter moins de 50% des glomérules. Les lésions actives comprennent des dépôts endocapillaires et de la prolifération endo- ou

extracapillaire (**Figure 15**). Les lésions chroniques correspondent aux cicatrices laissées par la fibrose engendrée par les lésions actives.

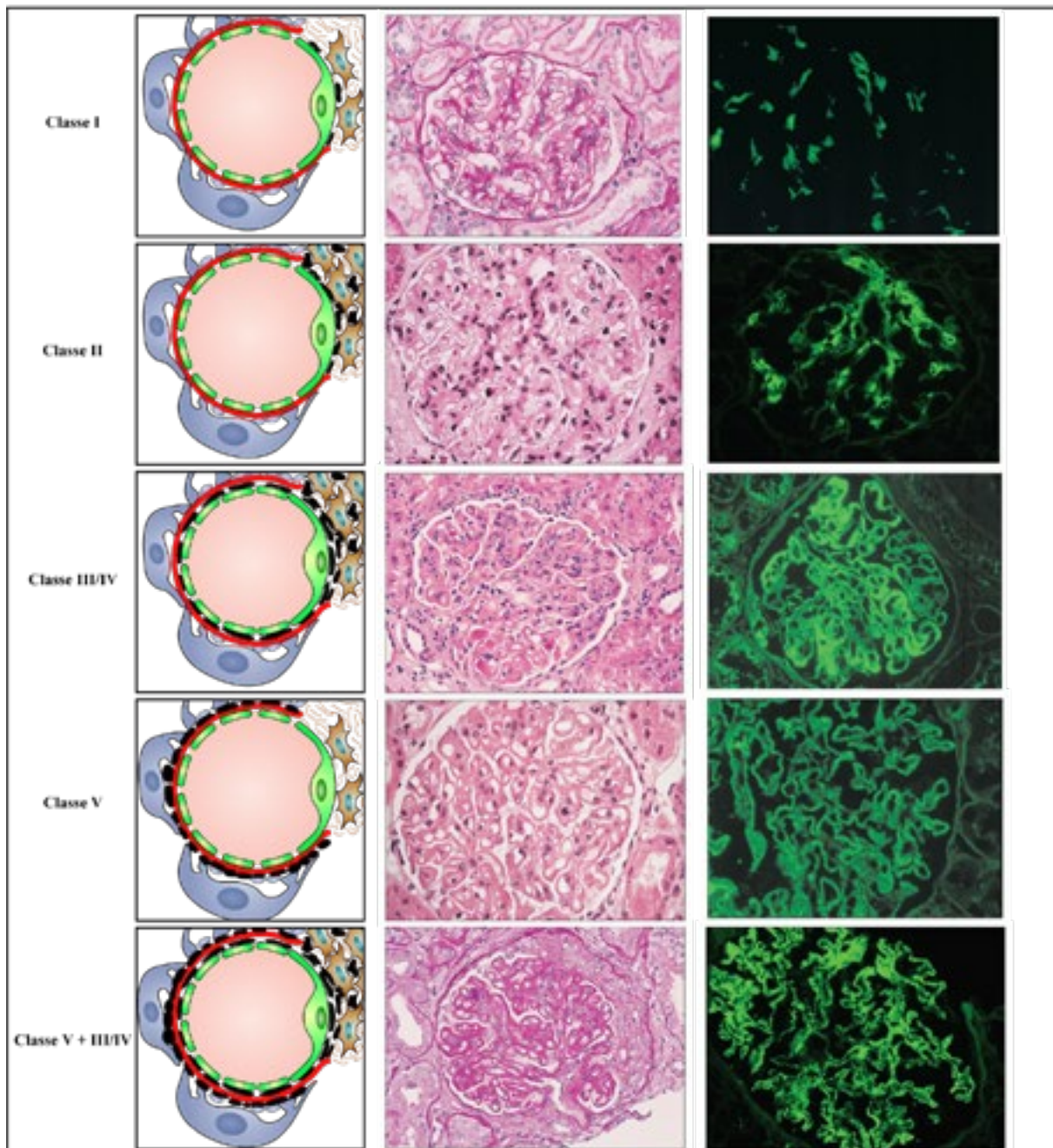


Figure 15 : Classification de la glomérulonéphrite lupique.

La glomérulonéphrite de classe I est caractérisée par de très petits dépôts mésangiaux uniquement visibles en microscopie électronique ou à fluorescence, et une cellularité normale en microscopie optique (MO). La classe II correspond à des dépôts d'IgG visibles en fluorescence et confinés au mésangium et s'accompagne d'une hypercellularité mésangiale avec des boucles capillaires fines en MO. Lors des classes III et IV, on peut constater un rétrécissement des capillaires dû aux fortes proliférations mésangiale et endocapillaire parfois accompagnée de dépôt hyalins au niveau des boucles capillaires en MO. En fluorescence, on constate des dépôts mésangiaux et au niveau de la paroi des capillaires. La classe V dite «pure» est exempte de prolifération mésangiale mais l'on constate un épaississement des boucles capillaires dû à des dépôts sous-épithéliaux visibles en fluorescence. La classe V peut être combinée à une classe III ou IV, on peut alors observer à la fois un épaississement des boucles capillaires et une prolifération endocapillaire, le tout associé à des dépôts mésangiaux, capillaires et sous-épithéliaux. La classe VI quant à elle correspond au stade final des classes III et IV et correspond à une sclérose des glomérules.

Les images de coloration et fluorescence proviennent du site «abdominalkey.com» <https://abdominalkey.com/renal-disease-in-systemic-lupus-erythematosus-mixed-connective-tissue-disease-sjogren-syndrome-and-rheumatoid-arthritis/>

La classe IV (glomérulonéphrite lupique diffuse) correspond à une classe III touchant plus de 50% des glomérules, elle peut être segmentaire ou globale. Les lésions ici sont les mêmes que celles décrites pour la classe III et peuvent toucher moins (segmentaire) ou plus de la moitié (globale) du glomérule. Ces deux classes sont donc le résultat de dépôts au niveau de l'espace sous-endothélial activant alors les cellules endothéliales.

La classe V est une glomérulonéphrite lupique extramembraneuse qui se définit par la présence de dépôts immuns extramembraneux (ou sous-épithéliaux) (**Figure 15**). Cette classe peut être pure ou associée à une classe III ou IV. Le dépôt de complexes immuns au niveau sous-épithélial engendre une activation locale du complément et des lésions au niveau des podocytes et cause un épaississement de la paroi des capillaires et de la membrane basale glomérulaire. Enfin, la classe VI ou sclérose glomérulaire avancée correspond à une sclérose de plus de 90% des glomérules et correspond à l'évolution finale des classes III et IV (voire V si non prise en charge). Plus précisément, elle est due à une incapacité des mécanismes de régénération cellulaire à compenser les lésions engendrées par le dépôt de complexes immuns et à une perte des cellules épithéliales menant à une sclérose irréversible du glomérule et une perte des fonctions du néphron.

En ce qui concerne le pronostic de ces différentes classes, les classes I et II ont un excellent pronostic au contraire de la classe VI qui est le reflet d'une néphropathie déjà très avancée et qui risque fortement de conduire à une insuffisance rénale terminale ne répondant que peu aux traitements. En ce qui concerne les classes V pures (non associées à des classes III ou IV), elles sont en général de bon pronostic sur le moyen terme mais beaucoup moins rassurantes à long terme puisque jusqu'à 50% des patients seraient sous dialyse après 20 ans. Enfin, ce sont les formes prolifératives (III et IV) qui sont de moins bon pronostic à moyen terme et ce, d'autant plus si elles sont associées à une prolifération extracapillaire.

En ce qui concerne leur prise en charge, les classes I et II ne nécessitent pas de traitements lourds puisque les immunosuppresseurs ne seront administrés que si la protéinurie dépasse 3g/jour (**Grünfeld, 2017**). En revanche, les classes III et IV nécessitent des thérapies plus lourdes suivant un schéma de phases d'induction et de phases de maintien. Les phases d'induction combinent des hautes doses de corticoïdes avec soit du cyclophosphamide soit de l'acide mycophénolique tandis que les phases de maintien utilisent de l'azathioprine ou de l'acide mycophénolique et de faibles doses de corticoïdes. Les patients présentant une néphrite de classe V sont le plus souvent traités avec des antiprotéinuriques et des antihypertenseurs (inhibiteurs de la voie rénine-angiotensine) mais ils peuvent parfois recevoir des corticoïdes et des immunosuppresseurs si la protéinurie persiste dans le temps. Enfin, les patients présentant

une classe VI seront traités avec des inhibiteurs de la voie rénine-angiotensine mais des corticoïdes et immunosuppresseurs peuvent être prescrits en fonction des autres manifestations lupiques extrarénales.

III-Contribution du système immunitaire et des cellules rénales dans la physiopathologie de la néphrite lupique.

Il apparait évident que lors de la néphrite lupique, les dépôts de complexes immuns vont jouer un rôle clé dans la physiopathologie de la néphrite lupique. Cependant, les cellules immunitaires en tant que telles jouent également un rôle dans le développement et l'aggravation de l'atteinte rénale de la même manière que les cellules intrinsèques au rein lui-même (**Figure 16**).

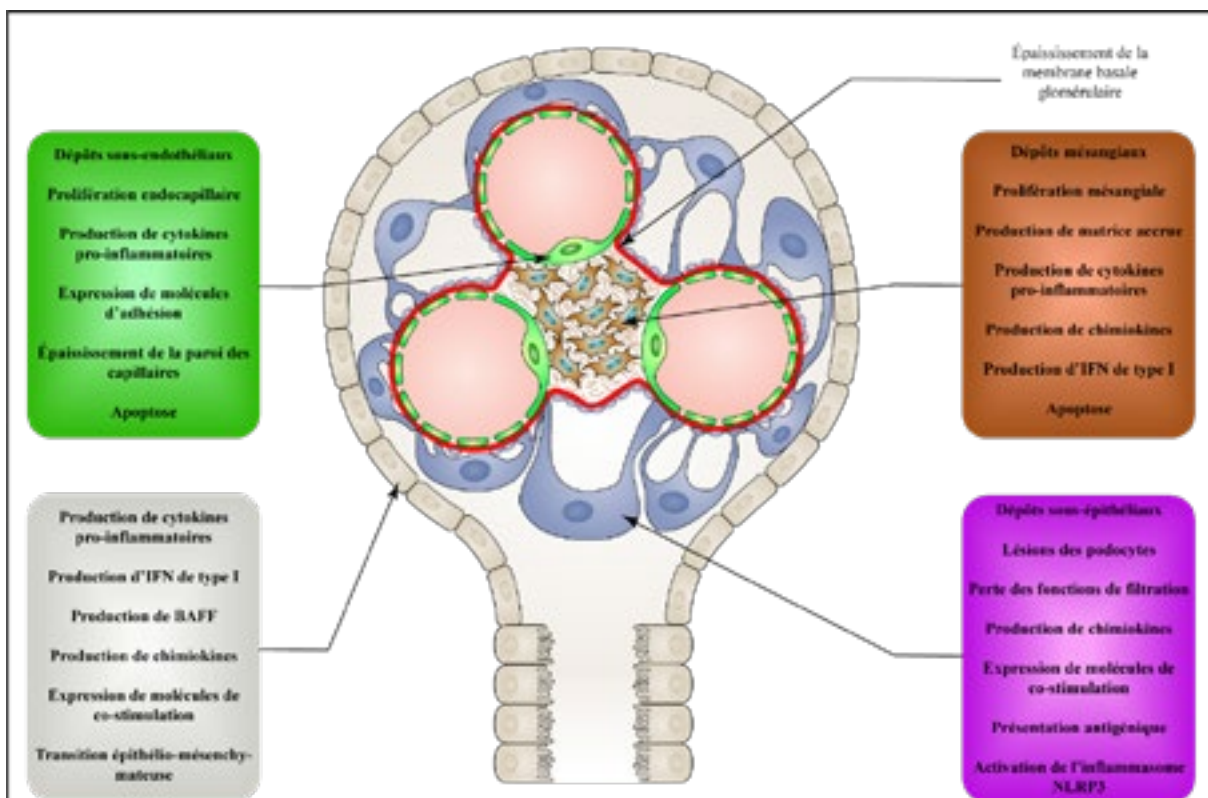


Figure 16 : Lésions et contribution des cellules intraglomérulaires lors de la néphrite lupique.
 Les divers compartiments du glomérule sont affectés lors de la glomérulonéphrite lupique. Les auto-anticorps vont pouvoir se déposer dans le mésangium, au niveau sous-endothélial et sous-épithélial. Cela s'accompagne d'une prolifération mésangiale et endocapillaire, d'un épaississement de la paroi des capillaires et de la membrane basale glomérulaire ainsi que de lésions des podocytes. La plupart des cellules du glomérule (cellules mésangiales (encadré brun), cellules endothéliales (encadré vert), podocytes (encadré magenta) et cellules épithéliales pariétales (encadré gris)) vont pouvoir activement participer à ce processus en produisant des cytokines et chimiokines inflammatoires, en exprimant des molécules d'adhésion ou encore en promouvant la fibrose du tissu rénal.

A) Le dépôt des anticorps et leurs effets sur les cellules rénales.

Les complexes immuns se déposant dans les reins ont une forte implication dans le développement de la néphrite lupique de par leurs capacités à activer le complément, l'inflammation et la prolifération cellulaire. Ces complexes immuns se déposent

majoritairement dans les glomérules mais l'on peut tout de même retrouver des dépôts au niveau de la membrane basale tubulaire chez environ 70% des patients et leur présence corrèle avec les lésions glomérulaires (**Magil et al., 1984**). Le dépôt seul de complexes immuns n'est pas suffisant pour déclencher une néphrite, il requiert en effet l'activation du complément, la sécrétion d'enzyme protéolytiques, de cytokines et chimiokines inflammatoires et le recrutement de cellules immunitaires (**Hahn, 2013**). Les complexes immuns contenant des acides nucléiques vont alors pouvoir activer l'immunité via les récepteurs au complément et les TLR mais également les cellules rénales. Nous allons ici prendre principalement l'exemple des anticorps anti-ADNdb et détailler leur mode de dépôt au niveau des reins et les effets qu'ils engendrent.

1. Où et comment les anticorps se déposent-ils dans les reins ?

Il existe deux mécanismes par lesquels ces anticorps peuvent se déposer en dans les reins. Premièrement, ils peuvent reconnaître des antigènes présents à la surface des cellules rénales par réaction croisée, les antigènes reconnus comprennent l'actinine α , le collagène de type IV, la laminine, l'annexine II, la fibronectine ou encore les héparanes sulfates (**Deocharan et al., 2002 ; Suzuki et al., 1993 ; Yung et al., 2010 ; Yung et al., 2012**). La seconde manière de se déposer repose sur le relargage de matériel apoptotique (en particulier la chromatine) qui va pouvoir se déposer au niveau de la membrane basale glomérulaire et servir de plateforme de fixation aux auto-anticorps. Cela a pu être démontré *in vitro* puisque les anticorps anti-ADNdb sont capables de se lier aux cellules mésangiales et endothéliales, aux podocytes et aux les cellules épithéliales pariétales en culture, induisant leur prolifération, l'apoptose et médiant la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires et pro-fibrotiques (**Yung, 2005 ; Yung et al., 2010 ; Yung et al., 2012**). En premier lieu, le dépôt de ces anticorps au niveau du mésangium a été montré comme l'un des évènements précoces de la néphrite lupique chez la souris NZB/W (**Fenton et al., 2009**). La fixation sur les cellules mésangiales en culture peut se faire, comme décrit ci-dessus, indirectement via la chromatine (**Chan et al., 1992**) mais également directement via l'actinine α , l'annexine II ou encore la protéine P ribosomale (**Sun et al., 1996**). Il a par exemple été montré que les cellules mésangiales dérivées de souris MRL/lpr présentent une expression accrue d'actinine α comparativement à des cellules issues de souris saines BALB/c et que cela potentialise leur capacité à lier les anticorps anti-ADNdb (**Deocharan et al., 2002**). Lorsque l'on progresse vers des classes de néphrite plus avancées, il y a également dépôt de complexes immuns dans la partie sous-endothéliale menant à l'activation et la lésion des cellules endothéliales qui, en réponse, voient l'expression de diverses molécules d'adhésion

augmenter, permettant la migration des leucocytes dans l'espace sous-endothélial et mésangial (Weening, 2004). Les anticorps dirigés contre les cellules endothéliales existent chez 50 à 80% des patients et en particulier chez ceux présentant une maladie en phase d'activité et des lésions endothéliales (Chan *et al.*, 1996). Un exemple de l'importance de ces anticorps est celui de l'hybridome 17H8a, qui si injecté à des souris immunodéficientes, induit le développement d'une néphrite avec lésions glomérulaires et en particulier des dépôts sous-endothéliaux et un épaississement de la paroi des capillaires (Fujii *et al.*, 2003). En revanche, certains anticorps monoclonaux murins reconnaissant l'ADNdb sont capables de se lier à une protéine de 46kDa à la surface des cellules endothéliales en culture, les HUVEC ("Human Umbilical Vein Endothelial Cells"), via l'intervention de l'ADN extracellulaire (Chan *et al.*, 1992 ; Chan *et al.*, 1993). Toutefois, ils pourraient également reconnaître des protéines à la surface des cellules endothéliales par réaction croisée, mais ces protéines restent à identifier (Chan *et al.*, 1997). Pour finir, les complexes immuns se déposant également dans la partie épithéliale du glomérule, des études ont mis en lumière la capacité des anticorps anti-ADNdb à se fixer aux cellules épithéliales pariétales. Les anticorps anti-ADNdb murins et humains ont en effet la capacité de reconnaître les protéines snRNP U1A et SmD des cellules épithéliales du tube proximal chez le porc (Koren *et al.*, 1995). Une autre étude a pu également montrer que l'anticorps monoclonal murin 3E10, reconnaissant l'ADNdb, était capable de se fixer aux tubules rénaux dans le tissu rénal humain sain (Zack *et al.*, 1996).

2. Conséquences du dépôt des anti-ADNdb dans les reins.

Concernant les effets de la fixation des anticorps anti-ADNdb au niveau du rein, ils sont divers et vont influencer sur de nombreux processus. Des études ont d'ores et déjà montré la capacité des anticorps anti-ADNdb à induire la prolifération des cellules mésangiales et épithéliales pariétales *in vitro* (Yung, 2005). De plus, ces anticorps ont la capacité d'augmenter la production d'IL1 β et d'IL6 dans les cellules rénales, expliquant en partie leur capacités pro-prolifératives (Yung *et al.*, 2006 ; Yung *et al.*, 2010 ; Yung *et al.*, 2015). Concernant l'apoptose, les anticorps anti-ADNdb peuvent induire l'apoptose des cellules mésangiales de rat via un mécanisme indépendant de p53 (Yu *et al.*, 1998). Une étude récente a pu montrer que les anticorps anti-ADNdb induisaient un stress du réticulum endoplasmique dans les cellules mésangiales et que cela s'accompagnait de la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires et pourrait contribuer à l'apoptose de ces dernières (Zhang *et al.*, 2015). Pour finir, ces anticorps sont capables d'augmenter l'apoptose des cellules endothéliales ainsi montré par l'augmentation du nombre d'HUVEC montrant une fragmentation de l'ADN (Lai *et al.*, 1997).

Par ailleurs, les anticorps anti-ADNdb peuvent également participer plus globalement à l'inflammation du parenchyme rénal. Outre leur capacité à activer le complément, ils vont permettre le relargage de nombreux composés inflammatoires par les cellules rénales et médier le recrutement des leucocytes. Dans les cellules mésangiales, les anticorps anti-ADNdb humains sont capables d'induire la synthèse d'annexine II qui est en mesure d'amplifier l'inflammation et la fibrose par la voie des PKC (Protéines Kinases C) (Yung *et al.*, 2010). On peut citer par exemple la production d'IL1 β , d'IL6 ou encore de TNF α (Qing *et al.*, 2006). En plus des médiateurs inflammatoires et pro-fibrotiques classiques, les cellules mésangiales sont également capables de produire des chimiokines permettant le recrutement des cellules immunitaires au niveau du rein. Ces chimiokines jouent un rôle important dans la physiopathologie de la néphrite lupique puisqu'il a été démontré que leur expression est antérieure au recrutement des leucocytes, à la protéinurie et aux dommages rénaux (De Lema *et al.*, 2001). Plus précisément, c'est à nouveau via la voie des PKC que les anticorps anti-ADNdb vont promouvoir la production de MCP-1 ("Monocyte Chemoattractant Protein 1"), CXCL1 ("C-X-C motif Ligand 1") et CX3CL par les cellules mésangiales (Qing *et al.*, 2006 ; Rovin *et al.*, 1994). Les cellules endothéliales, ici montré avec des HUVEC, vont également produire des médiateurs inflammatoires (IL1 β , IL6 et IL8) mais également exprimer des molécules d'adhésion telles qu'ICAM-1 ("Intercellular Cell Adhesion Molecule 1"), VCAM-1 ("Vascular Cell Adhesion Molecule 1") ou encore la E-sélectine, facilitant ainsi le recrutement des cellules immunitaires et l'inflammation qui en découle (Chan *et al.*, 1995 ; Neng Lai *et al.*, 1996). Finalement, les cellules épithéliales pariétales répondront à la fixation des anti-ADNdb par la production de médiateurs inflammatoires (IL6, IL8 et TNF α) et de chimiokines (MCP-1), favorisant donc l'infiltration des cellules immunitaires dans l'espace tubulo-interstitiel (Yung *et al.*, 2015). Pour terminer, les anti-ADNdb sont également capables de promouvoir la fibrose rénale qui si elle n'est pas contrôlée, aboutira à la sclérose du rein. La fibronectine a été montrée comme augmentée dans les reins de patients présentant une néphropathie lupique et chez la souris lupique (Nakapoulou *et al.*, 1993 ; Yung *et al.*, 2015). De manière intéressante, la fibronectine semblait localisée aux sites de dépôts des IgG, suggérant que les anticorps, en se déposant, seraient capables d'induire une plus forte production de fibronectine et donc de matrice extracellulaire (Yung *et al.*, 2009). Une étude a d'ailleurs d'ores et déjà montré que les anti-ADNdb pouvaient induire la production de médiateurs pro-fibrotiques dans les cellules mésangiales (Zhang *et al.*, 2012). Enfin, les anticorps anti-ADNdb seraient capables de médier la transformation des cellules épithéliales pariétales en cellules mésenchymateuses (processus que l'on nomme transition épithélio-mésenchymateuse) (Yung, 2005). Cette transition induit

chez les cellules épithéliales pariétales un arrêt du cycle cellulaire, qui va de pair avec une diminution de leur capacité de régénération du tissu rénal (Lovisa *et al.*, 2015). De plus, ces auto-anticorps sont capables d'induire la production de fibronectine dans ces cellules épithéliales via la voie des PKC et des MAPK (Yung *et al.*, 2015). Les anti-ADNdb contribuent à la surproduction de molécules de la matrice extracellulaire/fibreuses mais sont également responsables de la diminution des capacités de régénération des cellules rénales, favorisant ainsi la sclérose irréversible des glomérules/reins.

B) Rôle des cellules immunitaires dans la physiopathologie de la néphrite lupique.

Bien que la glomérulonéphrite lupique soit en grande partie médiée par le dépôt des complexes immuns, les leucocytes eux-mêmes jouent un rôle clé dans le développement de cette atteinte.

1. Les macrophages et les cellules dendritiques lors de la néphrite lupique.

En premier lieu, intéressons-nous aux macrophages et aux DC. Ces derniers représentent la majorité des leucocytes résidents des reins et ne seront pas seulement spectateurs mais acteurs de la néphrite. Tout d'abord, les reins de souris saines contiennent trois populations de DC incluant les DC myéloïdes, les DC CD103⁺ et les pDC, ainsi que deux populations de macrophages, l'une (majoritaire) est faite de macrophages résidents F4/80^{hi} tandis que l'autre est composée de cellules ressemblant à des monocytes (Kawakami *et al.*, 2013). Les macrophages résidents sont ceux présentant la plus grande capacité de phagocytose tandis que les DC CD103⁺ sont les plus efficaces pour ce qui est de la présentation antigénique. Enfin, les DC résidentes sont renouvelées assez régulièrement avec un turn-over de trois à cinq jours tandis que les macrophages présentent une demi-vie de plus de trente jours (Bethunaickan *et al.*, 2011 ; Ramanujam *et al.*, 2010). Chez l'Homme, il n'y a que peu d'études concernant les populations résidentes mais elles seraient similaires à ce que l'on peut retrouver chez la souris. Les premiers travaux, utilisant des modèles de néphrite induite au sérum néphrotoxique ou d'ischémie-reperfusion, ont montré qu'initialement il y aurait un afflux de monocytes et que ces derniers vont pouvoir se différencier localement en mono-DC ("monocyte-derived DC") et macrophages de type inflammatoires, exprimant de hauts niveaux de CCR2 et produisant des cytokines inflammatoires (au contraire de ceux résidant dans les reins) (Menezes *et al.*, 2016). En plus des monocytes/macrophages migrant dans les reins, les macrophages résidents peuvent également être localement activés et contribuer à l'inflammation locale. En effet, les macrophages distribués le long des tubules sont en contact direct avec les complexes immuns car il n'y a aucune membrane basale qui les sépare des cellules endothéliales formant les

vaisseaux péritubulaires. Ils vont donc pouvoir directement phagocyter les complexes immuns, s'activer et produire des cytokines pro-inflammatoires. Si l'on en revient à la néphrite lupique, diverses études ont pu montrer une accumulation de phagocytes CD68⁺ dans la zone tubulo-interstitielle, accumulation associée à un mauvais pronostic chez l'Homme (**Dias et al., 2017**). Chez la souris, il a été montré que le nombre de macrophages résidents était fortement augmenté et que leur morphologie ainsi que leurs fonctions se trouvaient modifiées (**Bethunaickan et al., 2011 ; Sahu et al., 2014**). Une partie de ces macrophages semble provenir de monocytes circulant Gr1^{lo}, une population montrée comme anormalement augmentée dans le sang chez la souris lupique (**Sahu et al., 2014**) comme cela a déjà été montré dans la PR (**Misharin et al., 2014**). Concernant leurs fonctions, ils semblent avoir une forte activité de phagocytose et acquérir des activités cathepsine et métalloprotéinases, ils pourraient donc activement participer au remodelage et à la fibrose du tissu rénal (**Bethunaickan et al., 2011**). D'un point de vue phénotypique, ils contiennent à la fois des macrophages de type M1/inflammatoires, M2/anti-inflammatoires et de macrophages spécialisés dans la réparation tissulaire (**Berthier et al., 2012 ; Bethunaickan et al., 2011**). Dans un modèle induit de lupus, le transfert de macrophages de type M1 conduit à une aggravation de la maladie tandis que le transfert de macrophages du type M2 semble légèrement améliorer l'état rénal (**Li et al., 2015**). Des travaux ont mis en évidence le fait que les reins étaient infiltrés par des monocytes Ly6C^{hi} et que ces derniers pouvaient se différencier en différents types de macrophages, dont ceux promouvant la fibrose rénale puisque leur délétion semble prévenir ce processus (**Lin et al., 2009**). De plus, la délétion des macrophages se trouve être suffisante pour empêcher la néphrite médiée par le dépôt de complexes immuns (**Chalmers et al., 2015**). Pour finir sur les macrophages, une étude du même laboratoire a pu montrer que l'inhibition de la kinase BTK ("Bruton's Tyrosine Kinase") améliorait la néphrite lupique et que cet effet serait dû au fait que le blocage de ladite kinase impacte à la fois le recrutement des macrophages dans les reins mais également leurs fonctions (**Chalmers et al., 2016 ; Chalmers et al., 2018**). Concernant maintenant les DC, elles infiltreront également les reins lors de la néphrite lupique et participent à la génération de réponses adaptatives locales et délétères. Une augmentation du nombre de DC CD103⁺ a été mise en évidence chez la souris NZB/W (**Sahu et al., 2014**), tout comme leur homologue humain tel qu'observé dans des biopsies de reins de patients présentant une glomérulonéphrite (**Kassianos et al., 2013**). Ces DC semblent, comme indiqué précédemment, dériver de monocytes circulants (**Celhar et al., 2015**) et présentent une expression augmentée du CMH-II et de CD86, indiquant un phénotype de cellules activées. Ces cellules, en plus de permettre une présentation

antigénique locale et donc une activation de l'immunité adaptative, semblent être une source de TGF- β et pourraient participer au processus de fibrose rénale (**Kassianos et al., 2013**).

2. Les lymphocytes sont-ils impliqués dans le développement de la néphrite lupique ?

Bien que les macrophages et les DC semblent importants dans le développement de la néphrite, il ne faut pas oublier de prendre en compte le rôle des lymphocytes puisqu'ils infiltrent également les reins et que les thérapies ciblant ces cellules ont prouvé leur efficacité. L'implication des LT CD4⁺ a d'ores et déjà été démontrée puisque leur délétion ou le blocage des signaux de co-stimulation permet de retarder le développement de la néphrite, réduit la protéinurie et les dommages rénaux (**Daikh et al., 1997 ; Jevnikar et al., 1994**). Les études concernant les LT CD8⁺ semblent moins claires puisque la délétion de la beta-2 microglobuline améliore l'atteinte rénale chez la souris MRL/lpr tandis qu'elle aggrave la néphrite chez la souris NZB/W (**Christianson et al., 1996 ; Mozes et al., 2005**). Cela pourrait être dû au fait que cette délétion cible non seulement les LT CD8⁺ mais aussi les cellules NKT. En revanche, les LT CD8 régulateurs pourraient jouer un rôle protecteur, ainsi montré dans un modèle de néphrite induite au LPS (LipoPolySaccharide) (**Liu et al., 2018**), mais cela reste à déterminer dans le cas du lupus. En plus de promouvoir la réponse pathogénique médiée par les anticorps, les LT CD4⁺ produisent localement des cytokines pro-inflammatoires. Ces cytokines influent sur l'inflammation rénale en permettant le recrutement d'autres cellules, l'augmentation du CMH-II et des molécules d'adhésion et en favorisant la fibrose rénale et la production par les cellules rénales de cytokines inflammatoires (**Wada et al., 2001**). Les LT DN sont par exemple capables d'induire l'expression des molécules du CMH-II et ICAM-1 par les cellules rénales (**Kelley et al., 1993**). Les cytokines produites par les cellules Th1 et Th2 ont fait l'objet de nombreuses études du fait des propriétés anti-inflammatoires de l'IL10 et l'IL4 au contraire du TNF α , de l'IL12 et de l'IFN γ . Cependant, elles semblent toutes avoir des effets néfastes sur le développement de la néphrite. Les études se sont en premier lieu concentrées sur les Th1 puisque les LT produisant de l'IFN γ semblent majoritaires et corréler avec la protéinurie (**Enghard et al., 2006**). L'importance de ce sous-type de Th a pu être montré chez la souris MRL/lpr chez laquelle l'absence de l'IL12 (**Kikawada et al., 2003**) ou de l'IFN γ (**Carvalho-Pinto et al., 2002**) induit une amélioration de l'atteinte rénale. De la même manière, les IFN de type I étant connus pour induire une immunité de type Th1, sont capables d'accélérer le développement de l'atteinte rénale tandis que l'absence de leur récepteur a un effet protecteur (**Liu et al., 2011 ; Agrawal et al., 2009**). Il en va de même pour l'IL18 qui se trouve être augmentée dans les cellules mésangiales de souris NZB/W (**Shui et al., 2007**) et dont le blocage

protège contre la néphrite lupique (**Bossu et al., 2003**). Enfin, l'administration d'un anticorps anti-IFN γ chez la souris NZB/W améliore les symptômes de la néphrite lupique (**Schmidt et al., 2015**). Chez l'Homme, l'infiltration de LT produisant de l'IFN γ dans les reins a été montrée et de plus, le ratio Th1/Th2 en périphérie semble corrélérer avec le score d'activité de la maladie (**Masutani et al., 2001**). L'expression de l'IL18 dans les glomérules de patients présentant une néphrite lupique a elle aussi pu être observée (**Tucci et al., 2008**). Concernant les cellules Th2, certains groupes ont pu également montrer qu'elles joueraient un rôle dans la physiopathologie de la néphrite lupique. En effet, les basophiles produisant de l'IL6 et de l'IL4, ainsi que les IgE, pourraient favoriser le développement de la néphrite (**Charles et al., 2010**). Les souris MRL/lpr déficientes pour le récepteur de l'IL27 présentent une glomérulonéphrite extramembraneuse associée à l'environnement Th2 prédominant (**Shimizu et al., 2005**). De façon similaire, les patients présentant une néphrite de classe V ont un ratio IFN γ /IL4 en périphérie faible au contraire de ceux présentant une néphrite proliférative de classe IV (**Akahoshi et al., 1999**). Cette prédominance Th2 a aussi pu être observée dans des biopsies de patients présentant une glomérulonéphrite extramembraneuse (**Uhm, 2003**). Les cellules Th2 semblent donc jouer un rôle dans la néphrite lupique mais seraient associées à une forme de glomérulonéphrite extramembraneuse tandis que les cellules Th1 seraient plutôt associées à une forme agressive de glomérulonéphrite proliférative avec lésions capillaires. Bien que décrites plus tardivement, les cellules Th17 semblent également pouvoir contribuer à la néphrite lupique. Des études ont d'ores et déjà montré une production locale d'IL17 au niveau des reins de patients lupiques (**Crispin et al., 2008**) et de souris MRL/lpr (**Zhang et al., 2009**). De la même manière, chez la souris B6/lpr, l'absence du gène codant le récepteur de l'IL23 (induisant des Th17) améliore l'atteinte rénale (**Kyttaris et al., 2010**) et la suppression du gène codant le récepteur à l'IL17 exerce un effet protecteur contre la néphrite induite par le poly I:C (**Ramani et al., 2016**). En revanche, une autre étude avait pu montrer que la déficience pour l'IL17 chez la MRL/lpr ou le blocage de l'IL17 avec un anticorps chez la souris NZB/W ne permettait aucune amélioration et ne protégeait pas contre le développement de la néphrite (**Schmidt et al., 2015**). Ces résultats contradictoires peuvent probablement s'expliquer par les différences génétiques entre les modèles utilisés et il ne peut donc être exclu que les Th17 participent au développement de la néphrite lupique. En ce qui concerne les LB, leur principale implication concerne leur capacité à se différencier en plasmocytes et à sécréter les autoanticorps pathogéniques se déposant dans les reins, sujet d'ores et déjà détaillé précédemment. Cependant, ils peuvent également participer à la mise en place de la néphrite lupique via d'autres fonctions. Les LB sont d'excellentes cellules présentatrices d'antigène puisqu'ils peuvent lier et endocyter l'antigène

via leur BCR et ensuite le présenter via les CMH de classe I ou II. Les LB peuvent également se différencier en B régulateurs qui vont pouvoir moduler les réponses T via la production d'IL10 et de TGF β (Yanaba *et al.*, 2008). Ces autres fonctions semblent importantes puisque des souris MRL/lpr possédant des LB incapables de sécréter des anticorps (car présentant des IgM dont le motif permettant la sécrétion est absent) sont toujours atteintes d'une glomérulonéphrite et meurent prématurément (Chan *et al.*, 1999). Les LB pourraient donc eux aussi contribuer au développement de la néphrite via d'autres mécanismes que la production d'anticorps, bien que ce dernier reste historiquement majoritaire.

C) Participation des cellules rénales au développement de la néphrite lupique.

Pour finir, en ce qui concerne les cellules du rein, elles vont non seulement subir diverses lésions dues aux anticorps et leucocytes mais elles vont également pouvoir, soit en réponse à ces lésions soit à l'état basal, produire divers médiateurs ou changer de phénotype, ce qui va directement participer au développement de la néphrite lupique (Figure 16).

1. Les cellules mésangiales, premières cibles et acteurs de la néphrite lupique.

Intéressons-nous d'abord aux cellules mésangiales. Le mésangium est en effet la première zone du glomérule où se déposent les complexes immuns puisque les cellules le composant sont impliquées dans l'élimination de ces derniers. Ces cellules vont pouvoir réagir au dépôt des anticorps en produisant des cytokines pro-inflammatoires mais également en augmentant la production de matrice extracellulaire. Les cellules mésangiales expriment TLR3 et sont donc capables de répondre directement à une stimulation par les acides nucléiques contenus dans les débris apoptotiques ou les complexes immuns. Elles vont suite à l'engagement du TLR3, produire des interférons de type I (Imaizumi *et al.*, 2017), connus pour jouer un rôle dans le lupus et capables d'aggraver/accélérer le développement de la néphrite. De plus, le micro-ARN régulant la production des IFN de type I dans les cellules mésangiales, le miR-130b semble diminué chez l'Homme et la souris en cas de néphrite lupique (Han *et al.*, 2016). Par ailleurs, parmi les cytokines pro-inflammatoires pouvant être produites par les cellules mésangiales, on retrouve l'IL6. Cette cytokine est capable d'accélérer le développement d'une glomérulonéphrite chez la souris NZB/W, bien que son blocage ne dénote pas d'un effet thérapeutique (Ryffel *et al.*, 1994). Il est cependant de noter que des travaux ont mis en évidence une augmentation du microARN let-7a impliqué dans la progression tumorale et la régulation de la production cytokinique) dans les cellules mésangiales de souris NZB/W et que cela les rendait plus promptes à produire de l'IL6 après stimulation *in vitro* (Chafin *et al.*, 2013). Outre des cytokines, les cellules mésangiales peuvent synthétiser diverses

chimiokines inflammatoires (telle CXCL10 en réponse à l'IFN β) et donc de permettre le recrutement des leucocytes dans les reins. En effet, les cellules mésangiales de souris lupiques expriment des taux plus élevés de l'ARNm codant pour MCP-1 à l'état basal et que la protéine était produite en plus forte quantité après stimulation par le LPS (Ka *et al.*, 2007). Comme pour l'IL6, cette étude pointe des changements intrinsèques aux cellules mésangiales au cours du lupus, faisant d'elles de potentiels acteurs à part entière et non de simple spectateurs du dépôt d'auto-anticorps. Il faut aussi noter que les cellules mésangiales expriment des récepteurs aux chimiokines comme CXCR3 ou CCR7 et la liaison du/des ligands de ces récepteurs est capable de moduler la prolifération et l'apoptose de ces cellules (Wörnle *et al.*, 2004). L'apoptose des cellules mésangiales peut donc être induite par les auto-anticorps mais également par les chimiokines produites directement dans le glomérule, l'apoptose de ces dernières va engendrer une plus grande disponibilité de matériel nucléaire mais va également aboutir à des dommages au niveau des capillaires, ces derniers perdant alors leur soutien et une source de facteurs de croissance. La prolifération du mésangium est l'un des critères de la glomérulonéphrite lupique et va s'accompagner d'une augmentation de synthèse de matrice pouvant conduire à la fibrose rénale, de plus ces cellules peuvent envahir la zone endothéliale et provoquer une rupture de la membrane basale. Mais en plus de proliférer, les cellules du mésangium peuvent produire des enzymes de type metalloprotéinase et causer des dommages au niveau de la membrane basale glomérulaire (Kuroda *et al.*, 2004).

2. Cellules endothéliales et podocytes : spectateurs ou acteurs ?

Viennent ensuite les cellules endothéliales. Ces dernières peuvent également répondre aux diverses lésions en produisant des cytokines pro-inflammatoires mais également en exprimant des molécules d'adhésion qui vont faciliter le recrutement des cellules immunitaires dans les reins. Suite au dépôt de complexes immuns et aux lésions qui en découlent, les cellules endothéliales vont se mettre à proliférer et à sécréter de la matrice. Si cette prolifération sert avant tout à compenser la perte des cellules endothéliales, elle va également s'accompagner d'un épaississement de la paroi des capillaires et de la membrane basale glomérulaire, affectant les fonctions de filtration du rein. Le troisième composant de la barrière de filtration, à savoir les podocytes, a longtemps été considéré comme passif mais des études montrent aujourd'hui que ces cellules jouent un rôle beaucoup plus important qu'il n'y paraît. En effet, les lésions au niveau des podocytes, que ce soit suite au dépôt de complexes immuns ou à la production de médiateurs inflammatoires, sont responsables d'une perte de fonction de la barrière de filtration. Lors des lésions, les podocytes vont se détacher de la membrane basale et perdre peu à peu leur

extensions cytoplasmiques qui permettaient alors d'assurer leur rôle de filtre terminal au niveau du glomérule. Cette perte de capacité à filtrer va causer la protéinurie, l'albumine par exemple ne sera plus retenue, mais va également permettre le passage d'autres molécules et de débris apoptotiques qui vont alors pouvoir activer les cellules épithéliales tubulaires et les cellules immunitaires résidentes (**Kurts et al., 2013**). En plus de leur fonction première de filtration, les podocytes sont, comme beaucoup d'autres cellules rénales, capables de produire des chimiokines via la voie alternative de NF- κ B (**Valiño-Rivas et al., 2016**). Les podocytes produisent par exemple la chimiokine CCL21, qui agit sur les cellules mésangiales qui expriment le récepteur correspondant CCR7 (**Banas et al., 2002**). En plus de cela, diverses études tendent à montrer que les podocytes pourraient présenter des fonctions immunitaires. Ils expriment par exemple la molécule de co-stimulation CD80 et peuvent donc interagir avec les LT, une étude a d'ailleurs montré que les souris déficientes pour CD80 étaient protégées contre la néphrite induite au LPS (**Reiser et al., 2004**). Ils expriment également le CMH de classe II et présentent des fonctions de cellules présentatrices d'antigène et la délétion spécifique du CMH-II dans les podocytes permet de protéger les souris contre la néphrite induite par les anticorps anti-membrane basale glomérulaire (**Goldwich et al., 2013**). En plus du CMH et de CD80, les podocytes expriment DC-SIGN ("Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin"). L'expression de DC-SIGN augmente avec le développement de la néphrite et son blocage par l'utilisation d'un anticorps spécifique induit une diminution des fonctions immunitaires des podocytes (expression de CMH, CD80 et stimulation de la prolifération des LT) et permet de réduire la protéinurie (**Cai et al., 2016**). Les podocytes expriment également un certain nombre de TLR et sont capables de produire de l'IL23 qui participe à l'inflammation rénale (**Goto et al., 2016**). Plus récemment, une étude a montré que l'inflammasome NLRP3 ("NOD-Like Receptor family, Pyrin domain containing 3") est activé dans les podocytes de souris lupiques NZM2328 ainsi que chez les patients et que son blocage permet de sauvegarder les fonctions des podocytes et de prévenir le développement de la néphrite lupique (**Fu et al., 2017**). Finalement, il existe également des mécanismes mis en place par les podocytes afin de contrecarrer les effets des anticorps pathogènes, ils peuvent en effet, en réponse au dépôt d'auto-anticorps ou à l'IFN α , activer la machinerie de l'autophagie qui va leur permettre de mieux supporter les lésions (**Qi et al., 2018**).

3. Les cellules épithéliales pariétales : modulation de l'immunité et régénération du rein.

Finalement, les cellules épithéliales pariétales vont, comme les autres, pouvoir participer activement à la mise en place de la néphrite. Elles peuvent produire des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL6 ou l'IL8, en réponse à la liaison des anticorps anti-ADNdb (Yung *et al.*, 2015). Elles ont également été décrites comme capables de produire des interférons de type I (Castellano *et al.*, 2015) ainsi qu'une cytokine clé dans la pathologie lupique, BAFF (Schwartz *et al.*, 2018). Elles exprimeraient également des molécules de co-stimulation comme B7-H4 suggérant une interaction possible avec les LT. Cette dernière semble d'ailleurs plus fortement exprimée lorsque les lésions tubulaires sont importantes, indiquant une potentielle implication dans la néphrite (Chen *et al.*, 2006). Les cellules épithéliales rénales sont également capables de produire diverses chimiokines attirant les LT et en particulier les cellules Th1 (Demmers *et al.*, 2013). Elles peuvent de plus, contribuer à la production de la chimiokine CCL21 et donc participer à l'induction de prolifération chez les cellules mésangiales (Sanz *et al.*, 2010). Finalement, le processus le plus intéressant fait référence à la capacité de ces cellules à permettre le renouvellement des cellules rénales en cas de lésions. Au cours du lupus, ces cellules vont subir le processus de transition épithélio-mésenchymateuse. Lors de ce changement de phénotype, elles vont perdre leur capacité proliférative et donc de régénération du tissu rénal (Lovisa *et al.*, 2015). De plus, une fois transformées en cellules de type fibroblastes, elles synthétisent une grande quantité de matrice, participant à la forte fibrose du tissu rénal avec pour finalité la sclérose du tissu.

La néphrite lupique est donc une atteinte complexe se présentant sous différentes formes. Elle est majoritairement médiée par le dépôt de complexes immuns dans les reins mais fait également intervenir directement les cellules immunitaires qui vont infiltrer le parenchyme rénal. Finalement, les cellules composant le rein elles-mêmes vont représenter des acteurs cruciaux dans le développement de la pathologie rénale non seulement en promouvant l'inflammation locale et en interagissant avec les leucocytes, mais également via leurs divers changements de phénotype au cours du développement de la néphrite.

Partie 3 : De l'ontogenèse à la néogenèse lymphoïde, organes lymphoïdes secondaires et tertiaires

Avant d'aborder les Organes Lymphoïdes Tertiaires (OLT), il est important de revenir sur les Organes Lymphoïdes Secondaires (OLS) tant du point de vue de leurs fonctions que de celui de leur mise en place.

I-Structures et fonctions des organes lymphoïdes secondaires.

Les OLS sont le siège de la mise en place de la réponse immunitaire adaptative, ils incluent la rate, les ganglions lymphatiques et les divers tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT, "Mucosal-Associated Lymphoid Tissue"). Si la fonction des organes lymphoïdes primaires est de générer et sélectionner les lymphocytes, les OLS vont représenter des niches pour les lymphocytes naïfs qui vont attendre la rencontre avec leur antigène. Une fois la réponse immunitaire adaptative enclenchée, suite à la présentation antigénique, des structures spécialisées, nommées centres germinatifs (GC), se mettent en place. C'est au niveau de ces structures que les LB subissent les processus de commutation de classe et de maturation d'affinité, permettant la génération d'anticorps plus spécifiques, permettant ainsi une réponse immunitaire plus efficace. Avant d'aborder le sujet du GC, nous allons tout d'abord détailler les structures et fonctions globales des principaux OLS.

A) La rate, site de drainage des antigènes sanguins.

Située sous le diaphragme, la rate représente l'organe filtrant le sang ayant le volume le plus imposant. Elle s'organise autour de diverses branches artérielles provenant de l'artère splénique qui prend naissance au niveau du tronc cœliaque. Elle est entourée d'une capsule de tissu conjonctif d'où vont émerger des trabécules qui seront le support de la vasculature splénique. Le fait que cet organe soit positionné sur le trajet du système circulatoire combiné à son anatomie en font un OLS bien à part. Cette localisation anatomique particulière, la présence de macrophages spécialisés ainsi que de zone propres à la rate comme la zone marginale, en font un organe lymphoïde jouant un rôle crucial dans la réponse précoce contre les bactéries encapsulées (**Kraal, 1992**).

La rate peut être divisée en deux zones principales : la pulpe rouge et la pulpe blanche (**Figure 17**). La pulpe rouge correspond à une zone riche en globules rouges mais contient également quelques cellules immunitaires et joue principalement un rôle dans le recyclage des

globules rouges et du fer. La pulpe blanche, quant à elle, contient la majeure partie des lymphocytes organisés en différentes zones, mais également des macrophages et DC.

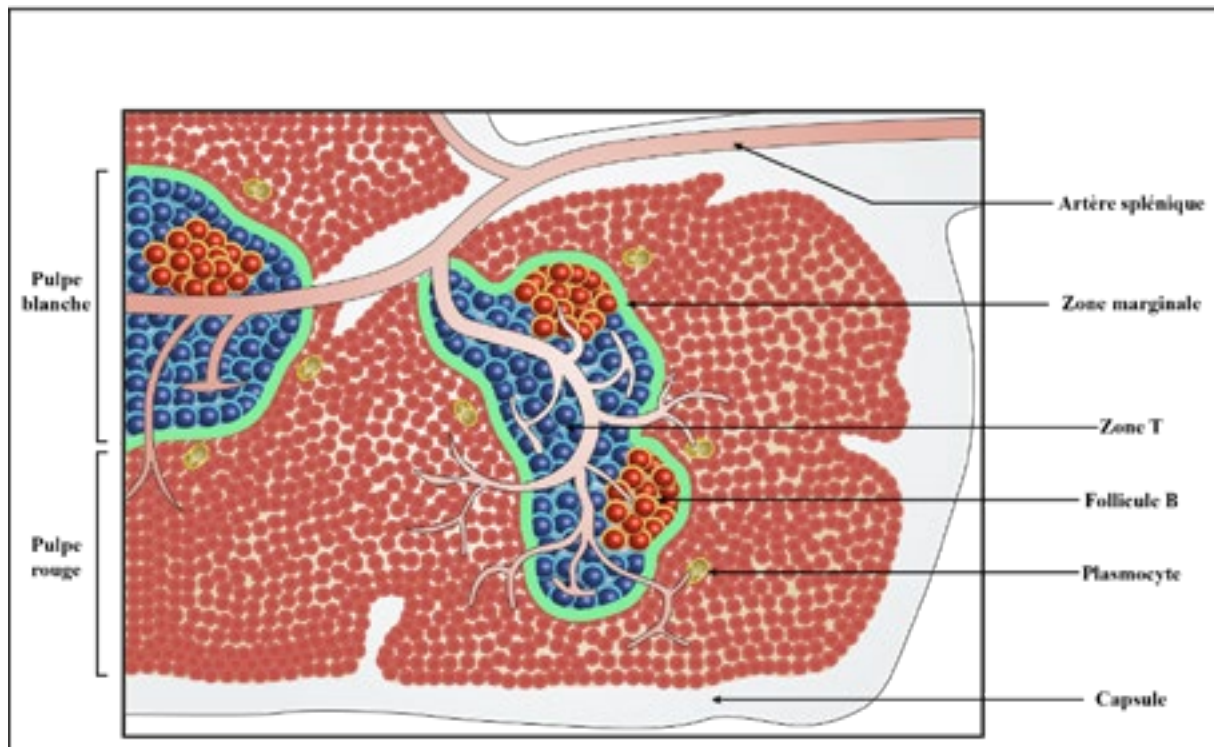


Figure 17 : Structure de la rate.

La rate est un organe lymphoïde encapsulé irrigué par l'artère splénique. Elle peut être divisée en deux zones principales, la pulpe rouge et la pulpe blanche.

La pulpe rouge contient des érythrocytes mais également quelques macrophages et plasmocytes. Elle est impliquée dans le recyclage des globules rouges usagés.

La pulpe blanche correspond à la partie plus immunitaire de la rate et contient des follicules B entourés d'un manteau de lymphocytes T. Autour de la pulpe blanche, on peut retrouver ce que l'on appelle la zone marginale, cette zone correspond à un point de transit pour les cellules/antigènes entrant dans le follicule lymphoïde et contient des LB et macrophages spécifiques nommés LB de la zone marginale et macrophages de la zone marginale.

La pulpe rouge permet de filtrer le sang et de recycler les globules rouges usagés. Le sang provenant des artères arrive au niveau de la pulpe rouge dans des structures composées de fibroblastes et de fibres réticulaires qui vont former un espace ouvert car dépourvu d'endothélium le délimitant (**Groom et al., 1991**). A partir de ces structures, le sang va pouvoir rejoindre le système veineux de la rate composé de sinus veineux rejoignant la veine efférente nommé *veina lienalis*. Ces sinus présentent une structure particulière qui leur permet d'éliminer les globules rouges usagés. Ils sont entourés par un endothélium discontinu contenant des fibres de stress qui se prolongent tout le long de la cellule suivant l'axe des cellules endothéliales (**Drenckhahn et al., 1986**). Ces fibres de stress permettent de relier les cellules endothéliales à la matrice extracellulaire et sont composées de filaments de type actine et myosine, elles contrôlent l'espace entre les cellules endothéliales. Il y a alors formation de diaphragmes entre les cellules endothéliales, les globules rouges âgés présentant une déformation de leur membrane plasmique (**Bratosin et al., 1998**) ne seront pas capables de passer à travers ces

diaphragmes et ne pourront pas rejoindre la circulation sanguine. Ils seront alors phagocytés par les macrophages situés dans la pulpe rouge. La contractibilité des fibres de stress permet également de retenir les globules rouges au niveau de la rate et de permettre une meilleure fluidité du sang lorsque l'organisme est à l'état de repos (**Stewart et al., 2002**). En plus de son rôle dans le recyclage des globules rouges, la pulpe rouge de la rate est un acteur majeur du recyclage du fer par l'action des macrophages, à l'instar des macrophages au niveau du foie (**Knutson et al., 2003**). En effet, les globules rouges sont hydrolysés dans le phagolysosome, ce qui permet le relargage de l'hème après lyse de l'hémoglobine. L'hème est alors décomposé en biliverdine, monoxyde de carbone ainsi qu'en ion ferreux (Fe^{2+}) qui sera stocké dans la cellule ou relargué (**Maines, 1997**). Les érythrocytes peuvent également être dégradés au sein même des vaisseaux sanguins à travers le corps entier. Cela permet le relargage de l'hémoglobine qui est ensuite captée par les macrophages via le récepteur CD163 et ramenée vers la rate. Enfin, la pulpe rouge joue également un rôle plus immunitaire dans le sens où elle représente une niche pour les plasmablastes et les plasmocytes. En effet, une fois générés au niveau des follicules, les plasmablastes migrent dans la pulpe rouge, à proximité de la zone marginale (**Sze et al., 2000**). Ce positionnement permet une entrée rapide des anticorps dans la circulation sanguine. Des études ont montré que cette migration vers la pulpe rouge reposerait sur une augmentation de l'expression du récepteur CXCR4, récepteur liant la chimiokine CXCL12 qui se trouve être produite au niveau de la pulpe rouge (**Hargreaves et al., 2001**).

En ce qui concerne la pulpe blanche, elle est organisée autour d'une artériole centrale et contient des follicules B entourés de LT et le tout est bordé par ce que l'on nomme la zone marginale (**Figure 17**). Cette organisation est maintenue par la production de chimiokines homéostatiques : CCL19 et CCL21 sont impliqués dans le maintien de la position des LT qui expriment le récepteur CCR7 tandis que le positionnement des LB au sein du follicule est dû principalement à la chimiokine CXCL13 et à son récepteur CXCR5 (**Ngo et al., 1999**). Dans la zone T, les LT interagissent avec les DC et les LB traversant cette zone, tandis que dans la zone B, la réaction du GC va pouvoir se mettre en place. La zone marginale qui se trouve juste autour de la zone T représente une zone de transition pour les cellules immunitaires qui vont quitter la circulation sanguine avant de rejoindre la pulpe blanche à proprement parlé. En plus de servir de zone de transition, la zone marginale contient également des populations de cellules immunitaires spécialisées qui lui sont propres. On peut notamment y retrouver deux populations de macrophages : les macrophages de la zone marginale et les macrophages métallophiliques. Les macrophages de la zone marginale forment un anneau externe et expriment la lectine SIGNR1 ("Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin-Related 1") et le récepteur MARCO

("Macrophage Receptor with Collagenous structure") (**Geijtenbeek et al., 2002**). Les macrophages métallophiliques sont, quant à eux, localisés du côté plus proche de la pulpe blanche et expriment la molécule d'adhésion SIGLEC1 ("Sialic-acid-bindin ImmunoGlobulin-like-LECTin 1") (**Munday et al., 1999**). Entre ces deux couches de macrophages, on peut retrouver les DC et LB de la zone marginale (**Martin et al., 2002**).

D'un point de vue plus fonctionnel, on peut retrouver des réponses immunitaires à la fois innées et adaptatives au niveau de la rate. Le flux sanguin traversant la zone marginale avant de rejoindre la pulpe blanche facilite le contrôle de la présence de pathogènes dans la circulation sanguine par les cellules spléniques. Alors que la pulpe blanche est essentiellement impliquée dans les réponses adaptatives, la zone marginale permet de mettre en place à la fois des réponses innées, via les macrophages de la zone marginale, mais également des réponses adaptatives de par les LB de la zone marginale. La réponse innée qui est engendrée dans la zone marginale est principalement due à la capacité des cellules y résidant à capturer les pathogènes provenant directement de la circulation sanguine via divers récepteurs dont certains sont spécifiques de cette zone comme SIGNR1 et MARCO, mentionnés ci-dessus. SIGNR1 par exemple fixe les antigènes de type polysaccharide tels que les lipoarabinomannanes mannosylés présents à la surface de *Mycobacterium tuberculosis*, permettant l'internalisation et la dégradation de ce pathogène, (**Koppel et al., 2004**) et a aussi été identifié comme important pour l'élimination de *Streptococcus pneumoniae* (**Lanoue et al., 2004**). Non seulement les bactéries, mais aussi les virus peuvent être capturés via ce récepteur puisque de nombreux virus semblent capables de s'y lier (**Marzi et al., 2004**). Concernant les macrophages métallophiliques, l'expression à leur surface du récepteur SIGLEC1 leur permet de lier les motifs de type acide sialique à la surface des pathogènes avec par exemple le cas de la phagocytose du LPS dérivé de *Neisseria meningitidis* (**Jones et al., 2003**). Ce qui suit l'étape de phagocytose par les macrophages présents dans cette zone varie selon les deux types cellulaires. Les macrophages métallophiliques produiront des IFN de type I en plus grande quantité que les macrophages de la zone marginale suite à la reconnaissance de virus (**Eloranta et al., 1999**). Ces derniers sont dépourvus de CMH de classe II mais pourraient activer les LB de la zone marginale en relargant des fragments issus de la dégradation des pathogènes qui se lient alors aux molécules du complément (**van Rooijen, 1990**). Les LB de la zone marginale sont, pour leur part, spécialisés dans la détection de pathogènes provenant de la circulation sanguine et, à la suite de cette reconnaissance, se différencient en plasmocytes sécrétant des IgM ou acquièrent des fonctions de cellules présentatrices d'antigènes (**Lopes-Carvalho et al., 2004**). Dans le cas où il ne se différencie pas, ils migrent vers la pulpe blanche afin d'activer

les LT CD4⁺ naïfs (Attanavanich *et al.*, 2004). Un cas similaire se produit pour les DC provenant de la circulation sanguine ou se trouvant dans la zone marginale qui, via leur expression du récepteur CCR7, migrent dans la pulpe blanche au niveau de la zone T comme montré lors d'une infection par *Leishmania donovani* (Ato *et al.*, 2002). L'entrée des LB ou DC au niveau de la pulpe blanche permet d'enclencher la mise en place de la réponse immunitaire adaptative. Suite à l'entrée des cellules présentatrices d'antigène dans la zone T, les LT s'activent alors et commencent à exprimer le récepteur CXCR5, cela leur permet de migrer à l'interface avec le follicule B (Ansel *et al.*, 1999). De la même manière, l'engagement du BCR permet une augmentation de CCR7 à la surface des LB, leur conférant la capacité de migrer vers la bordure du follicule et d'interagir avec les LT (Reif *et al.*, 2002). Nous reparlerons de la réaction du GC qui se met alors en place dans les paragraphes suivants.

B) Les ganglions lymphatiques.

1. Généralités sur les ganglions lymphatiques.

Si la rate est spécialisée dans l'immunité contre les pathogènes provenant de la circulation sanguine, les ganglions lymphatiques quant à eux drainent les cellules et antigènes se trouvant dans la lymphe et provenant donc du compartiment interstitiel. Les ganglions lymphatiques forment des structures en forme de haricots qui sont encapsulées et contiennent des LT et LB mais également, dans une plus faible proportion, des DC et des macrophages (Figure 18). L'on peut y retrouver également un réseau spécialisé de cellules de type réticulaires et de fibres (principalement de collagène). De plus, contrairement à la rate, les ganglions possèdent des vaisseaux qui leur sont propres : des vaisseaux sanguins dont les cellules endothéliales ont une forme cuboïdale, nommés HEV ("High Endothelial Venules"), et des vaisseaux lymphatiques. Ces cellules fibroblastiques et endothéliales appartiennent à une famille de cellules nommées cellules stromales et dont allons parler un peu plus loin dans ce paragraphe. Au niveau structurel, on retrouve trois zones : le cortex, le para-cortex et la médulla (Figure 18). Le cortex contient les follicules primaires, qui sont constitués de LB ainsi que de FDC. Après activation, les LB se mettent à proliférer et former le follicule secondaire, aussi nommé GC. On retrouve ensuite le para-cortex constitué principalement de LT et de DC et enfin la partie la plus interne, la médulla, où l'on retrouve du tissu lymphatique composant les cordons médullaires qui se rejoignent pour former le vaisseau lymphatique efférent du ganglion. L'organisation et la structure des ganglions font d'eux un site optimal pour la rencontre entre les lymphocytes naïfs et leur antigène ou les cellules présentant cet antigène. Dans le ganglion, il existe deux modes principaux de présentation. La présentation classique réalisée par les DC

via leur expression du CMH-I et CMH-II et permettant d'activer les LT naïfs exprimant le TCR correspondant au peptide présenté et la présentation par les FDC dont nous parlerons plus loin dans ce paragraphe. Dans ce cas, ce sont des fragments peptidiques provenant de la dégradation d'un antigène qui vont être présentés. Ce priming des LT se fait en trois étapes : d'abord des interactions courtes et répétées entre les LT et les DC, suivies d'un contact prolongé entre le LT et la DC, permettant une signalisation du TCR suffisante, et enfin dissociation de la synapse entre LT et DC permettant au LT de se mouvoir à nouveau et de proliférer (**Mempel et al., 2004**). L'interaction entre les T et les DC est permise par la bonne orientation des deux types cellulaires qui suivront le gradient de chimiokines liant CCR7 mais aussi qui se déplaceront sur le réseau de fibres créé par les cellules stromales, favorisant leur rencontre. En plus de mettre en place les réponses immunitaires adaptatives, les DC au niveau du ganglion participent à l'établissement de la tolérance périphérique. En effet, les DC qui acquièrent et dégradent des antigènes du soi en périphérie peuvent migrer vers les ganglions afin d'induire la tolérance des LT (**Audiger et al., 2017 ; Scheinecker et al., 2002**). Comme la majeure partie d'entre elles ne sont pas pleinement matures, elles présentent une faible expression de molécules de co-stimulation et vont alors induire l'anergie des LT autoréactifs ou leur délétion clonale, ou encore promouvoir la prolifération et l'expansion des LT régulateurs.

Les lymphocytes entrent dans les ganglions via les HEV tandis que les DC et les antigènes solubles pénètrent dans le ganglion par les vaisseaux lymphatiques afférents arrivant au niveau de la capsule (**Randolph et al., 2005**). Comme dans le cas de la rate, le positionnement des lymphocytes et des DC est contrôlé par diverses chimiokines homéostatiques (**Cyster, 2003**). Tout d'abord, les chimiokines CCL19 et CCL21 permettent le bon positionnement des LT (naïfs et centraux-mémoires) et des DC via le récepteur CCR7 (**Luther et al., 2000**). La chimiokine CXCL13 participe quant à elle au bon positionnement des LB mais également des TFH dans le follicule. Elle semble également jouer un rôle dans l'entrée des LB via les HEV au niveau des ganglions lymphatiques mésentériques (**Kanemitsu et al., 2005**). La plupart de ces chimiokines sont produites par les cellules stromales, mentionnées ci-dessus, et qui représentent le versant non hématopoïétique des OLS. Bien que certaines soient partagées entre différents OLS tandis que d'autres ne sont retrouvées que de manière plus spécifique, nous allons uniquement aborder ici le cas des cellules stromales dans le ganglion lymphatique et leurs fonctions, ce qui nous permettra d'aborder le fonctionnement de cet organe lymphoïde.

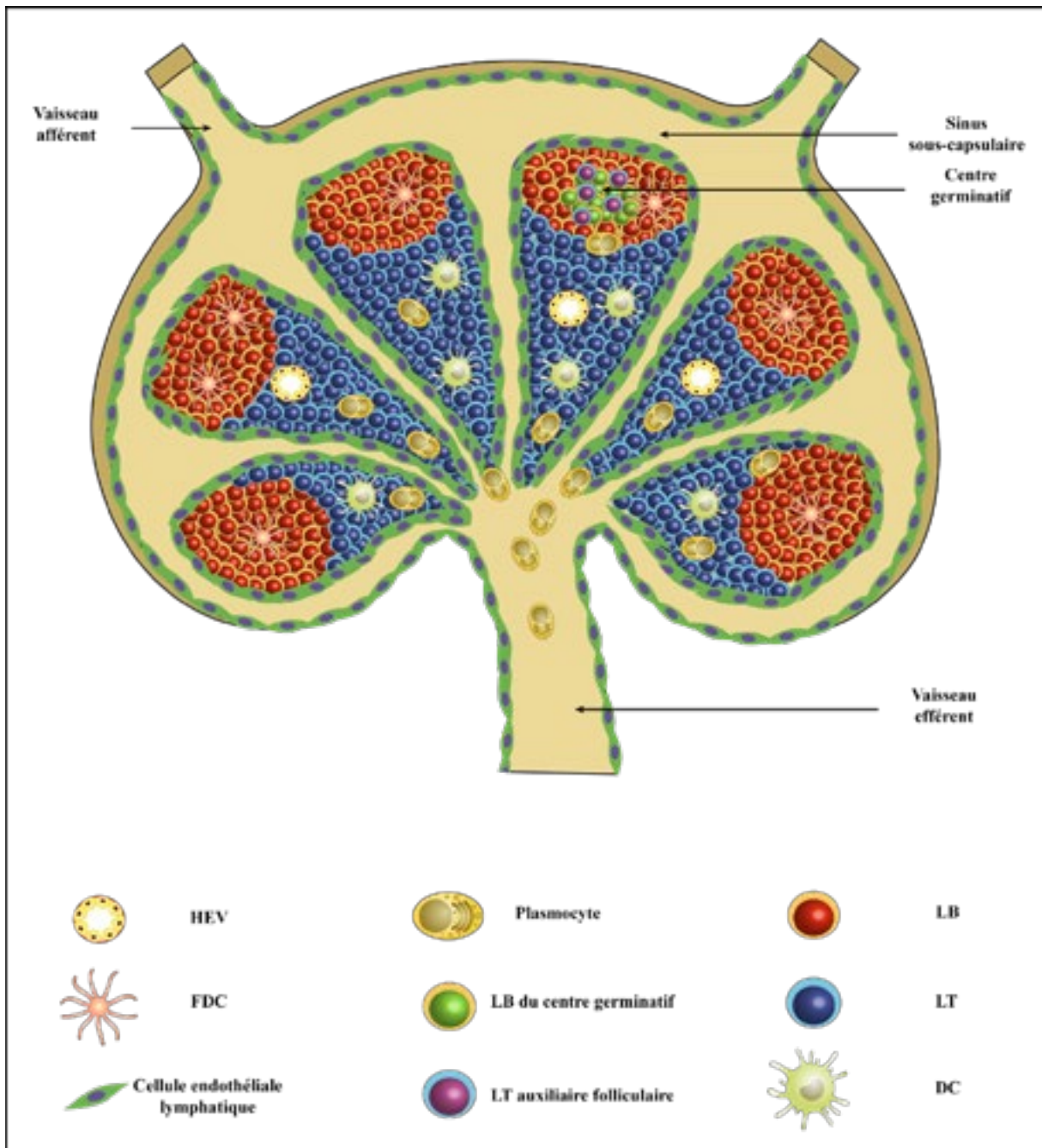


Figure 18 : Structure du ganglion lymphatique.

La ganglion lymphatique est entouré d'une capsule conjonctive. Il reçoit la lymphe contenant les antigènes et/ou cellules provenant des tissus périphériques par les vaisseaux lymphatiques afférents. Le contenu de la lymphe va transiter par le sinus sous-capsulaire avant de rejoindre le follicule B ou la zone T. Le ganglion est organisé en trois zones : le cortex, le para-cortex et la médulla. Le cortex contient les follicules B dont l'organisation est médiée par les FDC (ou cellules dendritiques folliculaires). Lors de la réponse immunitaire, les lymphocytes B (LB) vont s'activer et proliférer dans des structures appelées centres germinatifs ou follicules secondaires. Les lymphocytes T (LT) et les cellules dendritiques (DC) sont retrouvés dans le para-cortex. Cette zone contient également des veinules à endothélium épais (HEV) qui vont permettre l'entrée des LT et LB naïfs. Finalement, les cellules activées et les plasmocytes générés sur place (que l'on retrouve principalement dans le para-cortex) vont pouvoir quitter le ganglion par le vaisseau lymphatique efférent qui prend naissance au niveau de la médulla, zone où les vaisseaux traversant le ganglion vont fusionner.

2. Les cellules stromales des ganglions lymphatiques.

En premier lieu, leur nom provient du fait que leur fonction première est d'ériger et de maintenir la structure des ganglions, cependant au fil des années, on leur a attribué bien d'autres

rôles et l'on sait aujourd'hui qu'elles présentent des fonctions régulatrices et constituent des acteurs à part entière de la réponse immunitaire. On distingue deux grands types de cellules stromales : les cellules de type fibroblastique et les cellules de type endothélial (**Figure 19**),

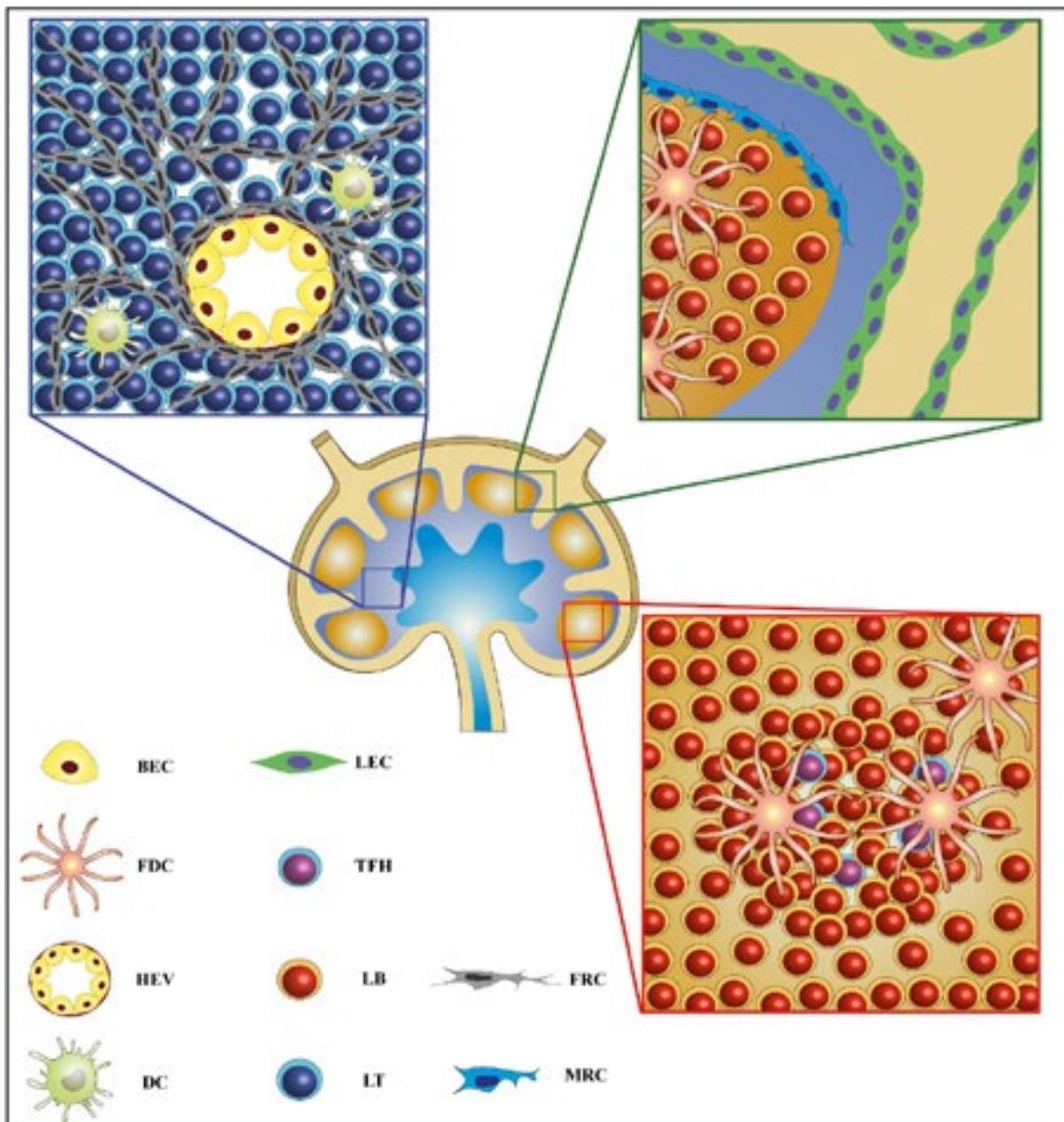


Figure 19 : Les cellules stromales du ganglion lymphatique.

L'on distingue deux grands types de cellules stromales : les cellules de type fibroblastique et les cellules de type endothélial. Parmi les cellules du type fibroblastique, on retrouve les cellules réticulaires fibroblastiques, ou FRC, les cellules dendritiques folliculaires, ou FDC, et les cellules réticulaires marginales, ou MRC. Concernant les cellules endothéliales, on trouve les cellules endothéliales sanguines, ou BEC, et les cellules endothéliales lymphatiques, ou LEC. Les FRC sont localisées principalement au niveau de la zone T et forment un réseau dense parcourant le ganglion et permettant la migration des leucocytes. Les FDC sont retrouvées au niveau du follicule B et jouent un rôle dans l'organisation de ce dernier et dans la sélection des LB. Les MRC se localisent dans la partie supérieure du follicule B juste en dessous du sinus sous-capsulaire et vont participer à l'organisation du follicule et au transport d'antigènes vers le follicule. Les BEC forment les vaisseaux sanguins irrigant le ganglion et une partie d'entre elles présentent un phénotype particulier : elles forment des structures nommées HEV qui sont spécialisées dans le recrutement des lymphocytes naïfs. Les LEC, quant à elles, forment les vaisseaux lymphatiques afférents et efférents qui vont permettre la recirculation des lymphocytes entre les ganglions ou les tissus, mais également la migration des DC activées en périphérie.

toutes ces populations peuvent être distinguées en se basant sur l'expression de la podoplanine et de la molécule CD31 ou PECAM1 ("Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1"). Parmi les cellules de type fibroblastique, on retrouve les cellules réticulaires fibroblastiques ou FRC, les FDC, les cellules réticulaires marginales ou MRC (exprimant toutes la podoplanine mais pas le marqueur CD31), et les cellules que l'on nomme « doubles-négatives » et qui contiennent une population de péricytes contractiles. Concernant les cellules endothéliales (exprimant CD31), elles contiennent les cellules endothéliales sanguines ou BEC et les cellules endothéliales lymphatiques ou LEC (exprimant également la podoplanine). Les FRC sont localisées principalement au niveau de la zone T et forment un réseau dense parcourant le ganglion et permettant la migration des leucocytes. Les FDC se trouvent dans le follicule B et jouent un rôle dans l'organisation de ce dernier ainsi que dans le processus de sélection au niveau du GC (décrit plus loin dans le **paragraphe I, D, page 99**). Les MRC, décrites plus tardivement que les autres, sont situées dans la partie supérieure du follicule B juste en dessous du sinus sous-capsulaire et participent à l'organisation du follicule et au transport d'antigènes vers ce dernier. Les BEC forment les vaisseaux sanguins irrigant le ganglion. Une partie d'entre elles présentent un phénotype particulier et forment des structures nommées HEV qui sont spécialisées dans le recrutement des lymphocytes naïfs (comme mentionné précédemment). Les LEC, quant à elles, forment les vaisseaux lymphatiques afférents et efférents qui sont impliqués dans la recirculation des lymphocytes entre les ganglions ou les tissus, mais également dans la migration des DC activées en périphérie. Concernant les cellules DN, il n'y a que peu de données mais elles semblent proches des FRC. Nous allons ici aborder chaque type de cellule stromale et décrire leurs principales fonctions, que ce soit au niveau de l'architecture basique du ganglion ou au niveau de la régulation de l'immunité.

a) Les cellules réticulaires fibroblastiques.

Les FRC représentent des cellules de type myofibroblaste qui ont évolué afin d'acquérir des fonctions immunologiques et qui sont d'origine mésenchymateuse. Elles constituent de 20 à 50% des cellules non hématopoïétiques dans le ganglion et forment un réseau 3D permettant la migration des leucocytes (**Gentek et al., 2017**). Elles peuvent sécréter de nombreux composants de la matrice extracellulaire, incluant par exemple le collagène ou la laminine (**Malhotra et al., 2012**) et forment de petits conduits qui faciliteront la diffusion des antigènes solubles dans le ganglion (**Gretz et al., 2000**). Ces conduits vont permettre aux antigènes de faible poids moléculaire de diffuser directement depuis les vaisseaux lymphatiques afin d'arriver rapidement au niveau de la zone T et d'accéder aux DC résidentes du ganglion (**Sixt**

et al., 2005). Enfin, elles jouent un rôle dans le maintien de la barrière entre la circulation sanguine et lymphatique en entourant les HEV et en permettant de resserrer les jonctions en réponse à la liaison de CLEC-2 ("C-type LECTin-like receptor 2") (provenant des plaquettes) sur la podoplanine (**Herzog *et al.*, 2013**).

En ce qui concerne la migration et l'homéostasie des lymphocytes, les FRC sécrètent les chimiokines CCL19 et CCL21, permettant le maintien des LT naïfs et des DC au niveau de la zone T ainsi que leur migration le long du réseau qu'elles forment (**Malhotra *et al.*, 2013**). Ces chimiokines pourront également être transportées vers les HEV et les vaisseaux lymphatiques via les conduits formés par les FRC et faciliter le recrutement des lymphocytes (**Baekkevold *et al.*, 2001 ; Sixt *et al.*, 2005**). Elles sont aussi capables de produire de l'IL7 qui est une cytokine cruciale pour la survie des LT naïfs, cela a d'ailleurs été montré par le fait que l'absence de FRC diminue drastiquement le nombre de LT naïfs dans le ganglion et impacte leur recrutement (**Denton *et al.*, 2014**). En plus des LT, les FRC semblent également participer à la survie des LB : leur co-culture avec des LB tumoraux permet de prolonger la survie de ces derniers (**Amé-Thomas *et al.*, 2007**). Elles peuvent en effet produire la cytokine BAFF et la chimiokine CXCL13, deux facteurs importants pour la survie et la migration des LB dans le ganglion (**Mionnet *et al.*, 2013**). Comme dans le cas des lymphocytes, les DC, résidentes comme en migration, sont affectées par l'absence de FRC tel que montré par la forte diminution de leur nombre dans ces conditions (**Denton *et al.*, 2014**). En effet, les DC sont capables de migrer le long du réseau de FRC via l'expression du récepteur CLEC-2 qui se lie à la podoplanine exprimée par les FRC, l'interaction de CLEC-2 et de la podoplanine va alors mener à la formation de protrusions au niveau de la membrane, permettant de réguler la mobilité des DC (**Acton *et al.*, 2012**).

Pour finir, en plus d'attirer et de maintenir le pool de lymphocytes naïfs, les FRC exercent des rôles dans les mécanismes de tolérance périphérique. En effet, il a été démontré qu'elles ont la capacité de supprimer la prolifération des LT CD8⁺ après activation. Ce processus fonctionne de la manière suivante : juste après activation, les LT produisent de l'IFN γ et du TNF α , ces deux cytokines stimulent les FRC qui, en réponse, synthétisent de l'oxyde nitrique responsable de la suppression de la prolifération des LT (**Siegert *et al.*, 2011**). De plus, les FRC peuvent induire directement une délétion des CD8⁺ autoréactifs via une présentation par le CMH-I. Cela a été observé en premier lieu dans un modèle où les LT exprimant un TCR reconnaissant l'ovalbumine étaient "tolérisés" lorsque mis en contact avec des cellules stromales exprimant l'ovalbumine (**Lee *et al.*, 2007**). Plus tard, il a été montré que les FRC étaient capables d'exprimer des antigènes des tissus périphériques (**Fletcher *et al.*, 2010**) et que

ce processus, au contraire des cellules stromales thymiques, ne reposait pas sur l'expression du facteur de transcription AIRE ("Auto-Immune REgulator") mais sur l'expression d'un facteur équivalent nommé DEAF-1 ("Deformed Epidermal Autoregulatory Factor 1") (**Yip et al., 2009**). En plus des LT CD8⁺, les LT CD4⁺ semblent également être régulés par les FRC. Il a été décrit que ces dernières ont la capacité d'acquérir les complexes CMH-II-peptides portés par les DC pour ensuite les présenter aux LT CD4⁺ et diminuer leur survie et leur prolifération (**Dubrot et al., 2014**). Enfin, elles sont capables d'exprimer directement des molécules du CMH-II et d'induire la génération de Treg afin de supprimer indirectement les réponses inappropriées (**Baptista et al., 2014**).

b) Les cellules dendritiques folliculaires.

Les FDC sont présentes dans le follicule B et nous en reparlerons plus en détail de leurs fonctions dans le paragraphe consacré au GC. Elles sont capables de capturer l'antigène quand celui-ci est sous forme de complexe immun, et de le conserver pour ensuite le présenter aux LB ; elles produisent également les cytokines IL6 et BAFF qui sont des facteurs importants pour les LB (**Heesters et al., 2014 ; Wu et al., 2009**). Leur capacité à retenir l'antigène sous forme intacte se trouve être cruciale pour la sélection des LB dans le GC. En effet, cela permet de sélectionner les clones les plus affins suite aux mécanismes d'hypermutation somatique, et l'absence de FDC élimine complètement les GC (**Wang et al., 2011**). Les FDC constituent également la source majeure de la chimiokine CXCL13 (**Legler et al., 1998**) qui permet l'organisation du follicule B, du GC et la migration des TFH vers le GC (**Ansel et al., 2000**).

c) Les cellules réticulaires marginales.

Les MRC sont localisées dans la partie supérieure du follicule B, en dessous du sinus sous-capsulaire. Elles expriment MadCAM ("Mucosal adressin Cell Adhesion Molecule"), RANKL ("Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand"), CXCL13 mais ne produisent pas CCL21 et n'expriment pas CD35, indiquant que ce sont bien des cellules formant une population distincte des FRC et FDC (**Katakai et al., 2008**). Elles semblent produire une forte quantité de la chimiokine CXCL13 puisqu'il est toujours possible de détecter cette dernière dans les MRC à l'état basal tandis que les niveaux chez les FDC restent faiblement détectables. De par leur caractère fibroblastique, elles sont capables de servir de support au sinus sous-capsulaire mais elles peuvent également construire, comme les FRC, des conduits afin de faciliter la diffusion des antigènes. Il a en effet été montré que les antigènes solubles sont transportés via les conduits formés par les MRC vers les LB et FDC présents dans le follicule (**Bajénoff et al., 2009**). Au niveau du sinus, on trouve une population particulière de

macrophages nommés macrophages du sinus sous-capsulaire, et qui capturent les antigènes présents dans le flux lymphatique (**Phan et al., 2009**). Un rôle des MRC a été suggéré, dans la localisation et les fonctions de ces macrophages spécialisés. Enfin, via leur expression de CXCL13 mais aussi d'ICAM1 et VCAM1, les MRC participent à la migration des LB à l'intérieur du follicule et contrôlent la distribution directe des antigènes aux LB par les macrophages sous-capsulaires.

d) Les cellules double-négative ou péricytes contractiles.

Les cellules doubles négatives, n'exprimant ni la podoplanine ni CD31, représentent 10 à 20% des cellules stromales du ganglion. En utilisant une approche transcriptomique, Malhotra et ses collaborateurs ont pu démontrer que les cellules DN avaient un transcriptome se rapprochant de celui des FRC (**Malhotra et al., 2012**). Elles produiraient des chimiokines et cytokines similaires à celles produites par les FRC, comme par exemple CCL19 et CCL21 bien que de manière moins intense. Parmi ces différences majeures, il est à noter qu'elles ne produisent pas d'IL7 et que l'expression de gènes impliqués dans les processus de contraction est plus élevée que chez les FRC, on retrouve parmi ceux-ci divers sous-type d'actine et de myosine. Environ la moitié de ces cellules DN sont principalement localisées autour de vaisseaux sanguins dans le cortex et la médulla. Cette localisation ainsi que leur expression de l'intégrine $\alpha 7$ leur a valu leur nom de « péricytes intégrine $\alpha 7^+$ ». Leurs fonctions ne sont pas encore bien décrites et les 50% restants des DN ne sont pas encore identifiés.

e) Les cellules endothéliales sanguines.

Les BEC bordent les vaisseaux sanguins dans les ganglions et représentent de 20 à 30% des cellules stromales. Certains de ces vaisseaux présentent un endothélium de morphologie particulière et sont nommés « HEV », ce sont des veinules post-capillaires. Leur nom vient de la forme non conventionnelle des cellules endothéliales les constituant, ces dernières présentent en effet un aspect bombé en direction de la lumière de la veinule. Concernant leur localisation, une étude a permis de classer la vascularisation du ganglion comme une hiérarchie de branches allant de l'ordre I à V ce qui correspond aux larges veinules collectrices (I) et aux veinules post-capillaires (V) (**von Andrian, 1996**). Les HEV se trouvent parmi les vaisseaux allant de l'ordre III à l'ordre V et permettent l'entrée des lymphocytes naïfs au niveau du ganglion. L'interaction entre les LT et LB naïfs et les HEV se fait par l'intermédiaire de la molécule CD62L qui permet « l'attachement » des lymphocytes le long de la paroi des HEV (**von Andrian et al., 2003**). La L-sélectine (CD62L) se lie à des glycoprotéines de type mucines présentant diverses modifications post-traductionnelles comme des sulfatations, des fucosylations ou encore des

sialylations (**Girard et al., 1995**), ces modifications sont référées sous le terme de PNAd ("Peripheral lymph Node Addressin") qui constitue un marqueur spécifique des HEV. L'entrée des lymphocytes naïfs (ou centraux mémoire) par les HEV est un processus se faisant en plusieurs étapes successives : adhésion des leucocytes, roulement le long de la paroi endothéliale, arrêt et enfin transmigration à travers la paroi endothéliale (**Girard et al., 2012**). La première étape de l'entrée par les HEV correspond à l'activation des intégrines à la surface des lymphocytes par les chimiokines, ce qui permet l'arrêt des lymphocytes. Ce phénomène fait intervenir les chimiokines homéostatiques CCL21, CCL19, CXCL12 et CXCL13 et l'expression par les LT naïfs des récepteurs CCR7 et CXCR4 avec, dans le cas des LB naïfs, une expression également du récepteur CXCR5 (**Miyasaka et al., 2004**). CCL21 est fortement exprimée par les HEV (chez la souris) tandis que CCL19, CXCL13 et CXCL12 sont produites par les cellules stromales avoisinantes et transportées à la surface des HEV par un phénomène de transcytose (**Baekkevold et al., 2001**). La liaison de ces chimiokines et leur rétention à la surface des HEV, notamment CCL21, est dépendante des héparanes sulfates (**Bao et al., 2010**). Ces chimiokines permettent alors aux lymphocytes d'exprimer l'intégrine LFA1 qui se lie à ICAM1 et ICAM2 à la surface des cellules endothéliales (**Shamri et al., 2005**). Vient ensuite l'étape de migration transendothéliale. Dans le cas particulier des HEV, les lymphocytes ne traversent pas directement la couches de cellules endothéliales mais sont stockés dans de petites poches se trouvant dans la partie basale des cellules endothéliales (**Mionnet et al., 2011**). Ce sont ces poches remplies de lymphocytes qui donnent leur aspect bombé aux cellules endothéliales des HEV et qui permettent de réguler le flux de lymphocytes entrant. En effet, l'entrée des lymphocytes est régulée par des contraintes physiques, lorsqu'il n'y a pas assez de place pour accueillir de nouvelles cellules, les lymphocytes restent stockés dans les petites poches, une fois que des lymphocytes quittent le ganglion par voie lymphatique, cela libère de la place au niveau du parenchyme et permet alors aux cellules naïves d'entrer dans le ganglion. Cela connecte ainsi les processus d'entrée et de sortie des lymphocytes et de maintenir une cellularité constante du ganglion en conditions homéostatiques. En plus des cellules naïves, les LT régulateurs sont eux aussi capables de pénétrer à l'intérieur des ganglions via les HEV (**Ueha et al., 2007**) et il en est de même pour les précurseurs de DC et les pDC (**Liu et al., 2009 ; Seth et al., 2011**).

f) Les cellules endothéliales lymphatiques.

Les LEC représentent la quatrième grande population de cellules stromales et constituent 10 à 20% de ces dernières. Elles bordent la surface des vaisseaux lymphatiques

afférents et efférents et permettent la distribution des DC et antigènes au niveau du sinus sous-capsulaire, ainsi que la sortie des lymphocytes au niveau médullaire (**Förster et al., 2012**). Les antigènes délivrés par la lymphe ont la possibilité de suivre deux voies différentes. S'ils sont de petite taille, ils pourront diffuser directement à partir du sinus vers les compartiments T et B par l'intermédiaire des conduits formés par les FRC et MRC (**Gretz et al., 2000**). Les antigènes de plus haut poids moléculaire devront, quant à eux, être pris en charge par les macrophages du sinus sous-capsulaire. L'entrée des DC via les vaisseaux lymphatiques a d'ores et déjà été bien étudiée mais il apparaît évident aujourd'hui que les lymphocytes T naïfs sont, comme les cellules mémoires, capables de pénétrer dans les ganglions via les vaisseaux lymphatiques (**Braun et al., 2011**). Les LEC, comme les BEC, sont capables de produire la chimiokine CCL21 qui va se retrouver immobilisée à leur surface, permettant aux DC exprimant CCR7 de détecter et suivre le gradient ainsi formé et de migrer via les vaisseaux lymphatiques (**Tal et al., 2011**). Toutefois, CCL21 n'est produite que dans les vaisseaux lymphatiques terminaux, il faut donc un autre signal afin d'initier la migration des DC CCR7⁺. Contrairement à CCL21, CCL19 n'est pas exprimée par les LEC mais peut être produite par d'autres cellules stromales ainsi que par les DC elles-mêmes. Comme elle n'est pas fixée à la surface des LEC, la chimiokine CCL19 produite par les DC dans les tissus périphériques va diffuser et suivre le flux lymphatique ce qui va permettre aux DC de pénétrer dans les vaisseaux lymphatiques en suivant le flux chimiotactique qu'elles auront produit de façon autologue (**Randolph et al., 2005**). Contrairement aux HEV, l'entrée via les vaisseaux lymphatiques ne requiert pas d'étape d'adhésion. Cela s'expliquerait notamment par le fait que les forces de cisaillement sont moins fortes au niveau du sinus sous-capsulaire en comparaison avec les forces existant au niveau des veinules HEV. Une fois entrées dans le vaisseau, les DC se laisseront guider par le flux lymphatique de façon passive et pénétreront via le sinus sous-capsulaire. Concernant les LT, il a longtemps été considéré que les LT naïfs n'entraient que via les HEV or, une équipe a pu démontrer que lorsque l'on injecte des LT naïfs au niveau du vaisseau afférent, ces derniers se localisent non seulement dans la zone T de ce ganglion mais se retrouvent également dans la zone T du ganglion situé en aval de ce dernier en suivant le sens du flux lymphatique (**Braun et al., 2011**). Cela indique donc que les LT naïfs peuvent emprunter la voie lymphatique lorsqu'il s'agit de migrer d'un ganglion vers un autre.

En ce qui concerne la sortie des lymphocytes par les vaisseaux efférents, ce phénomène débute au niveau des vaisseaux corticaux dans la zone T qui se jettent ensuite dans le sinus médullaire et le vaisseau efférent (**Grigorova et al., 2010**). D'un point de vue moléculaire, le processus repose sur l'expression, par les lymphocytes, du récepteur à la sphingosine-1-

phosphate (S1PR1) et sur une différence de concentration de sphingosine-1-phosphate (S1P) entre la lymphe et le tissu lymphoïde (**Pham et al., 2008**). La S1P est fortement produite dans la lymphe et les vaisseaux sanguins par les cellules hématopoïétiques et les LEC (**Pham et al., 2010**). S1PR1 est exprimé à la surface des leucocytes et est rapidement internalisé suite à la liaison de son ligand, cela permet aux cellules naïves entrant via les HEV ou les vaisseaux de rester dans le ganglion jusqu'à la réexpression à la surface du récepteur (**Lo et al., 2005**). Une fois le récepteur ré-exprimé, les lymphocytes commencent à rejoindre le sinus médullaire et à quitter le ganglion. Ce mécanisme n'est pourtant pas le seul en jeu puisque la réexpression du récepteur se fait en environ 20 à 60 minutes alors que certaines cellules peuvent rester dans le ganglion de 6 à 24 heures (**Grigorova et al., 2010**). Cela s'explique par le fait qu'en plus de ré-exprimer S1PR1, les lymphocytes doivent également perdre leur expression de CCR7 afin de pouvoir quitter le ganglion, ce qui semble être confirmé par le fait que la sortie des lymphocytes se produit plus rapidement en absence de CCR7 (**Pham et al., 2010**).

Pour terminer, les LEC sont, comme les FRC, capables de réguler la survie et l'activation des LT. En effet, elles produisent la cytokine IL7 qui favorise la survie des LT (**Miller et al., 2013**), elles ont la capacité de supprimer la prolifération des LT CD8⁺ via une production d'oxyde nitrique (**Lukacs-Kornek et al., 2011**). Elles peuvent également jouer indirectement sur la prolifération des LT en influant sur la maturation des DC et en affectant négativement leur expression de CD86, diminuant ainsi leur capacité à activer les LT (**Podgrabinska et al., 2009**). Concernant les T CD4⁺, les LEC présentent une augmentation des molécules du CMH-II suite à une stimulation par l'IFN γ et induisent l'apoptose des LT CD4⁺ (**Dubrot et al., 2014**). Pour finir, comme les FRC, elles sont capables d'exprimer des antigènes des tissus périphériques par l'intermédiaire du facteur DEAF1 (**Rouhani et al., 2014 ; Yip et al., 2009**). Elles pourront alors éliminer les T CD8⁺ directement par présentation antigénique et expression de PDL1 (**Cohen et al., 2010**) ou les T CD4⁺ mais cette fois-ci indirectement en induisant leur anergie via la présentation aux DC (**Rouhani et al., 2015**).

C) Les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses.

Le troisième grand type d'OLS est constitué des tissus lymphoïdes drainant les muqueuses. Parmi ces derniers, l'on retrouve des ganglions classiques encapsulés (décrits dans le paragraphe précédent) qui vont drainer les muqueuses, mais également les MALT, les tissus lymphoïdes associés au tissu adipeux ou FALT ("Fat-Associated Lymphoid Tissue") (**Figure 20**).

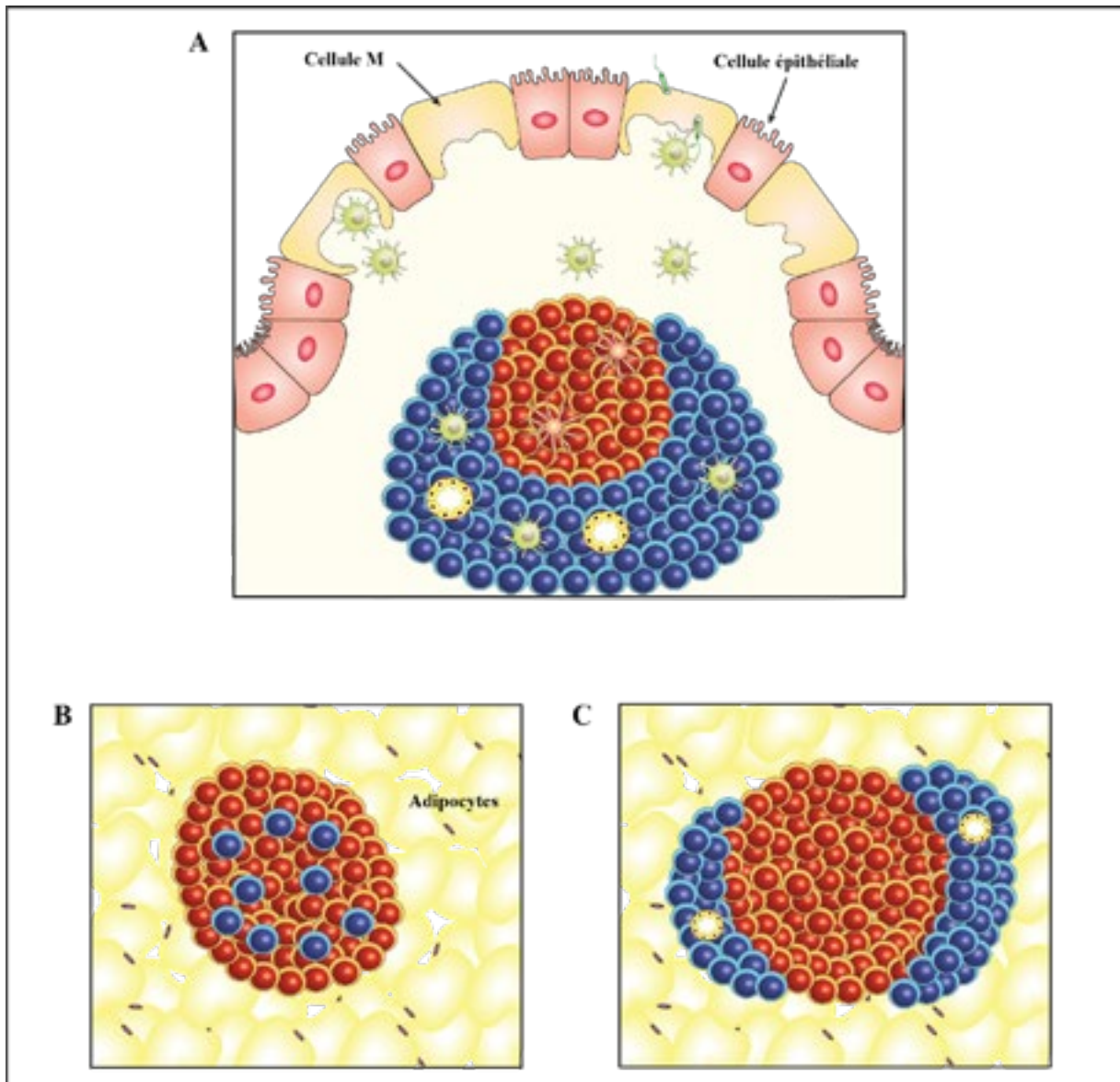


Figure 20 : Structure des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses.

Contrairement aux ganglions classiques qui sont encapsulés, les MALT ("Mucosal-Associated Lymphoid Tissues") sont non encapsulés et directement inclus dans/sous la muqueuse de l'organe où ils sont localisés (A). Ils sont également dépourvus de vaisseaux lymphatiques afférents et vont collecter les antigènes directement au niveau des muqueuses par le biais d'un épithélium spécialisé. Cet épithélium contient des cellules spécialisées que l'on nomme cellules M. Juste en dessous de l'épithélium et des cellules M, on retrouve des DC dont certaines sont incluses dans des poches situées du côté basal des cellules M. On va également retrouver des follicules B qui se situent juste en dessous du dôme épithélial avec la zone T entourant le follicule ou entre deux follicules ; cette zone T contient également des HEV.

Les FALT ("Fat-Associated Lymphoid Tissues") quant à eux ne sont ni encapsulés, ni directement en contact avec l'épithélium d'une muqueuse. Ces derniers comprennent les FALC ("Fat-Associated Lymphoid Clusters") au niveau du mésentère (B) et des structures lymphoïdes nommés taches laiteuses au niveau de l'omentum (C), ils sont tous directement inclus dans du tissu adipeux. Les taches laiteuses contiennent une zone B prédominante mais cette dernière est dépourvue de FDC. Dans les taches laiteuses, la zone T entoure la zone B et est peu représentée mais contient des HEV. Les FALC quant à eux sont à un degré d'organisation encore inférieur aux taches laiteuses et contiennent majoritairement des LB de type B1.

La légende des cellules est la même qu'en Figure 19.

Contrairement aux ganglions classiques, présentant une capsule, les MALT et apparentés tels que les plaques de Peyer au niveau de l'intestin grêle, les plaques coloniques ou encore les follicules lymphoïdes isolés, sont non encapsulés et directement inclus dans/sous la muqueuse de l'organe/du tissu où ils sont localisés (Figure 20). Ils sont également dépourvus

de vaisseaux lymphatiques afférents et collecteront les antigènes non pas via la lymphe mais directement au niveau des muqueuses par le biais d'un épithélium spécialisé. Ce dernier contient des cellules spécialisées que l'on nomme cellules M et qui sont dépourvues de villosités mais présentent de petits repliements à leur surface permettant le transport des antigènes par transcytose (**Mabbott *et al.*, 2013**). En dessous de l'épithélium et des cellules M, on retrouve des DC dont une partie sont incluses dans des poches situées du côté basal des cellules M, cela leur permet de recevoir directement les antigènes transportés par les cellules M depuis la surface de la muqueuse. Ces tissus contiennent également des follicules B qui se localisent la plupart du temps juste en dessous du dôme épithélial avec une zone T entourant le follicule ou située entre deux follicules. De plus, à l'instar des ganglions « classiques », les MALT vont contenir des HEV situées au niveau de la zone T, qui exprimeront dans ce cas, non seulement l'adressine PNAd, mais également MadCAM. Finalement, bien qu'ils ne présentent pas de vaisseaux afférents, des vaisseaux lymphatiques efférents permettront la sortie des cellules activées et leur migration.

Les FALT, quant à eux, se distinguent à la fois des ganglions encapsulés et des MALT dans le sens où ils ne sont ni encapsulés, ni directement en contact avec l'épithélium d'une muqueuse. Parmi eux, on distingue les FALC ("Fat-Associated Lymphoid Clusters") au niveau du mésentère et les taches laiteuses au niveau de l'omentum ; ces structures lymphoïdes sont toutes directement incluses dans le tissu adipeux (**Figure 20**) (**Beelen *et al.*, 2005 ; Moro *et al.*, 2010**). Les FALC reçoivent non seulement les antigènes transportés par le réseau lymphatique de l'intestin, mais également des antigènes provenant de la cavité péritonéale grâce à des fenestrations présentes au niveau du mésentère. Dans le cas des taches laiteuses, ces dernières collectent uniquement des antigènes provenant de la cavité péritonéale et représentent le site majeur de drainage du fluide péritonéal (**Beelen *et al.*, 2005**). Les taches laiteuses contiennent une zone B prédominante mais cette dernière se trouvant dépourvue de FDC ne peut être considérée comme un vrai follicule B à proprement parler. Au sein de ces structures, la zone T entoure la zone B mais se trouve peu représentée, de plus, les HEV qui y sont retrouvées n'expriment pas MadCAM. Les FALC quant à eux démontrent un degré d'organisation encore inférieur aux taches laiteuses et contiennent majoritairement des LB de type B1.

D'un point de vue fonctionnel, la plupart de ces tissus sont impliqués dans la réponse aux antigènes présents au niveau des muqueuses et dans la tolérance vis-à-vis de la flore commensale. Ils produisent en particulier des réponses associées à une production d'IgA. En ce qui concerne les ganglions « classiques », ils reçoivent, via les vaisseaux afférents, la lymphe drainant les tissus environnants et qui contient les antigènes et les cellules présentant l'antigène

activées par des pathogènes ou par des organismes de la flore commensale. Cependant, ils ont également accès aux antigènes présents dans la lumière en conditions non inflammatoires (c'est le cas de la flore commensale), ce qui requiert divers mécanismes de transport à travers la muqueuse. Le premier consiste en le passage des antigènes à travers l'épithélium, afin d'atteindre les DC localisées juste en aval, via les GAP ("Goblet cell-associated Antigen Passages") (**McDole et al., 2012**). Ces antigènes vont être délivrés majoritairement aux DC CD103⁺ dont le rôle principalement tolérogène serait alors crucial dans le cas des antigènes présents dans l'alimentation. Le second mécanisme se fait par une détection directe par les DC. En effet, les DC CX3CR1⁺, par exemple, sont capables de créer des prolongements cytoplasmiques passant à travers l'épithélium et leur permettant d'acquérir les antigènes directement au niveau de la lumière intestinale (**Hapfelmeier et al., 2008**). Enfin les cellules M (décrites précédemment), que l'on retrouve dans les tissus lymphoïdes présentant un dôme épithélial mais également dans les villosités classiques de l'intestin grêle et au niveau de l'épithélium pulmonaire, vont médier le transport des antigènes par un mécanisme de transcytose (**Mabbott et al., 2013**). Cela leur permet de transporter des antigènes particuliers ainsi que des pathogènes vers des poches contenant des DC mais également des LB. Concernant les FALCs et les taches laiteuses, ils reçoivent les antigènes relargués lorsque les pathogènes, les commensales ou des dérivés de ces derniers vont s'échapper du tractus gastro-intestinal suite à des lésions ou une inflammation et se retrouver dans le fluide/la cavité péritonéale (**Beelen et al., 2005**). Bien qu'il y existe de nombreuses différences dans l'acquisition de l'antigène au niveau de ces tissus, ils ont en commun d'induire préférentiellement une réponse de type IgA. En effet, si l'on prend l'exemple des plaques de Peyer, les LB exprimant une IgA sont majoritaires dans les GC et les transcrits circulaires provenant de la commutation vers les IgA sont exprimés par les LB dans les plaques de Peyer (**Shikina et al., 2004**). Finalement, en ce qui concerne les FALC et les taches laiteuses, on y retrouve une production d'IgA principalement médiée par les cellules B1 et qui correspondant alors à une production d'IgA naturelles (ne dépendant pas des LT).

D) Le centre germinatif, clé de la réponse adaptative.

L'une des particularités de la réponse immunitaire adaptative est sa capacité à répondre de manière plus efficace lors d'une seconde rencontre avec l'antigène. Cette réponse plus adaptée repose d'une part sur la génération de cellules mémoires, qui répondent plus rapidement et efficacement que leurs consœurs naïves, mais également sur le fait que le répertoire d'anticorps va évoluer au cours de la réponse, correspondant à une production d'anticorps de

meilleure affinité. La génération de cellules B mémoires ainsi que les mécanismes d'hypermutation somatique et de commutation de classe, qui permettent l'amélioration du répertoire d'anticorps, se produisent au niveau des GC situés dans le follicule B des OLS. Ces structures jouent donc un rôle clé dans la mise en place de réponses adaptatives efficaces et nous allons détailler brièvement leur structure et leur fonctionnement.

1. Les cellules et la structure dynamique du centre germinatif.

Le GC contient divers types cellulaires qui sont arrangés spatialement de manière à générer une réponse optimale.

En premier lieu, on peut retrouver les LB du GC. Ces derniers représentent l'un des types cellulaires les plus rapides en ce qui concerne le processus de mitose, allant de 6 à 12h seulement pour compléter un cycle cellulaire (**Zhang *et al.*, 1988**), une particularité essentielle afin de permettre une bonne maturation d'affinité (ce que nous allons voir dans les paragraphes suivants). Ils peuvent être identifiés via divers marqueurs tel que l'acide n-glycolyneuraminique, reconnu par l'anticorps dérivé du clone GL-7, l'expression accrue de Fas à leur surface ou encore leur capacité à lier l'agglutinine de cacahuète (PNA, "PeaNut Agglutinin") (**Rose *et al.*, 1980**). Ils expriment également le facteur de transcription BCL-6 ("B-Cell Lymphoma 6 protein") qui est un régulateur crucial des B du GC, mais également des TFH (**Basso *et al.*, 2010**). Ce dernier joue un rôle clé dans le GC, tel que démontré par le fait que son invalidation chez la souris génère une incapacité à former des GC et des anticorps de haute affinité (**Dent *et al.*, 1997**), en permettant de diminuer l'expression de BCL-2 et en rendant donc les B du GC sensibles à l'apoptose (**Ci *et al.*, 2009**). De plus, il réprime les facteurs de transcription p53 et ATR ("Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein"), ce qui permet aux cellules de supporter les dommages induits au niveau de l'ADN par l'enzyme AID responsable de l'hypermutation somatique (**Phan *et al.*, 2004**). Finalement, BCL-6 permet également de maintenir les cellules à un stade indifférencié en réprimant BLIMP-1 ("B Lymphocyte-Induced Maturation Protein-1"), qui est le facteur de transcription associé à la différenciation plasmocytaire. Il existe des différences entre les B du GC selon si ceux-ci sont localisés au niveau de la zone claire (ZC) ou de la zone sombre (ZS), nous allons détailler cet aspect plus loin dans ce chapitre.

Outre des LB, on retrouve le réseau de FDC (mentionné dans les paragraphes précédents), dont les cellules sont localisées au niveau de la zone claire et permettent d'identifier cette dernière par des marquages immunohistologiques. Elles expriment de nombreux récepteurs leur permettant de capter les antigènes/complexes immuns sous forme

intacte et vont jouer un rôle clé dans l'activation et la sélection des LB du GC en permettant de tester les nouveaux clones générés suite aux modifications dans le GC (**Heesters *et al.*, 2014**). Elles produisent également la chimiokine CXCL13 qui va jouer un rôle dans l'attraction des LB et des TFH au niveau du follicule B (**Cyster *et al.*, 2000**) et qui pourrait également jouer un rôle dans la polarisation du GC (**Allen *et al.*, 2004**). Pour finir, elles produisent un grand nombre de facteurs importants pour la survie et la prolifération des LB telle que l'IL6 et BAFF (**Kosco-Vilbois *et al.*, 1995 ; Wu *et al.*, 2009**).

Le dernier type de cellules présentes au niveau des GC sont les TFH. Le premier marqueur ayant été utilisé pour distinguer cette population de LT CD4⁺ a été le récepteur CXCR5. L'expression de ce dernier permet aux TFH de migrer vers le follicule B et de jouer ainsi leur rôle dans la sélection au sein du GC (**Haynes *et al.*, 2007**). Ils expriment également des molécules de co-stimulation de la famille de CD28 comme ICOS ou encore PD1 et produisent la cytokine IL21 (**Chtanova *et al.*, 2004**). Comme les FDC, ils interviennent dans la sélection des LB au niveau du GC et favorisent leur différenciation en plasmocytes ou en LB mémoires.

D'un point de vue structure, il est possible de diviser le GC en deux zones distinctes : la ZC et la ZS (**Figure 21**). La ZS correspond celle que l'on retrouve le plus à proximité de la zone T et est quasiment dépourvue de FDC tandis que la ZC se trouve proche de la capsule et contient un grand nombre de FDC. Leur nom provient de leur apparence en histologie de routine, en effet, lorsque l'on marque les noyaux par une coloration classique, la ZC apparaît plus claire car les noyaux des LB sont plus dispersés du fait de la présence des cellules stromales dans cette zone (**Allen *et al.*, 2007**). La ZS, quant à elle, présente des cellules fortement rapprochées et dont le rapport noyau/cytoplasme est plus élevé, d'où un aspect plus sombre. La ZS contient des LB en intense prolifération que l'on nomme centroblastes et expriment le récepteur CXCR4 (**Allen *et al.*, 2004**). Bien que cette zone soit quasiment dépourvue de FDC, il est possible d'observer un réseau de cellules stromales exprimant la chimiokine CXCL12 (ligand de CXCR4), permettant de maintenir les centroblastes dans la ZS (**Rodda *et al.*, 2015**). Les LB de la ZS expriment de haut niveaux de l'enzyme AID et de l'ADN polymérase η , qui va permettre la génération de mutations suite aux modifications induites par AID (**Victora *et al.*, 2012**). C'est donc au niveau de la zone sombre que de nouveaux clones de LB sont générés, clones qui pourront ensuite être sélectionnés dans la ZC. Les LB de la ZC sont nommés centrocytes et se trouvent à proximité de FDC, de LB naïfs, ainsi que de TFH. Les centrocytes ont un phénotype de LB activés tel qu'indiqué par leur expression de CD86 et CD83 (**Victora *et al.*, 2012**) et présentent également des signatures associées à un engagement du BCR et à la

co-stimulation apportée par les LT (**Victora et al., 2010**). La ZC représentant le site de sélection des LB ayant subi des modifications dans la ZS via l'hypermutation somatique, il est nécessaire que les LB du GC puissent transiter entre ces deux zones. Les premiers modèles mathématiques mis au point ont montré que plusieurs cycles de mutation dans la ZS puis sélection dans la ZC étaient nécessaires afin de générer un degré de maturation d'affinité comparable à ce que l'on peut retrouver *in vivo* (**Oprea et al., 1997**). Des études plus récentes ont pu confirmer que des LB sélectionnés dans la ZC étaient capables de ré-entrer dans la ZS pour subir un nouveau cycle de modifications (**Gitlin et al., 2014 ; Schwickert et al., 2007 ; Victora et al., 2010**).

2.Sélection positive des clones dans le centre germinatif.

Le processus de maturation d'affinité consiste en la capacité à sélectionner les clones de LB présentant la plus forte affinité pour l'antigène suite aux modifications induites par l'hypermutation somatique (**Figure 21**). De premières études ont montré que bien que la ZC soit constamment renouvelée par des LB provenant de la ZS, une certaine proportion retournait vers la ZS dans les 6 heures. Plus récemment, il put être estimé qu'en réalité, de 10 à 30% des LB sélectionnés dans la ZC, retournaient dans la ZS afin de subir un nouveau cycle de modifications (**Meyer-Hermann et al., 2012**). Cependant, il faut alors se demander par quel(s) mécanisme(s) le GC sélectionne les LB avec la plus haute affinité avant de les renvoyer dans la ZS ou de leur permettre de quitter le GC. Il existe deux signaux que l'on pense être impliqués dans la sélection des LB. Le premier correspondrait à l'intensité du signal provenant du BCR lorsque l'antigène est présenté à la surface des FDC. Le second signal proviendrait des TFH lorsque ces derniers interagissent avec les LB via les complexes CMH-II/TCR. Bien que ces deux signaux aient été jusqu'à lors inclus dans deux modèles différents constamment remis en causes (l'un basé uniquement sur la sélection par compétition pour l'antigène au niveau des FDC, le second où le facteur limitant serait les TFH), on pense aujourd'hui que ces deux facteurs sont importants pour la sélection dans le GC. Un point commun à ces deux modèles, est que la sélection des LB nécessite une forte expression de Fas couplé à une diminution de molécules anti-apoptotiques, ce qui les rend fortement sensibles à l'apoptose ; leur survie ne sera possible qu'en cas de forts signaux provenant du BCR et de l'interaction avec les TFH.

Le premier niveau de sélection se fait alors par compétition directe pour l'antigène au niveau des FDC. Dans ce cas, les LB de haute affinité empêchent l'accès à l'antigène par encombrement spatial mais consomment également l'antigène disponible en endocytant le complexe antigène-BCR (**Liu et al., 1989**). Dans les deux cas, les signaux induits via le BCR par l'antigène restant accessible aux LB de plus faible affinité sont insuffisants pour permettre

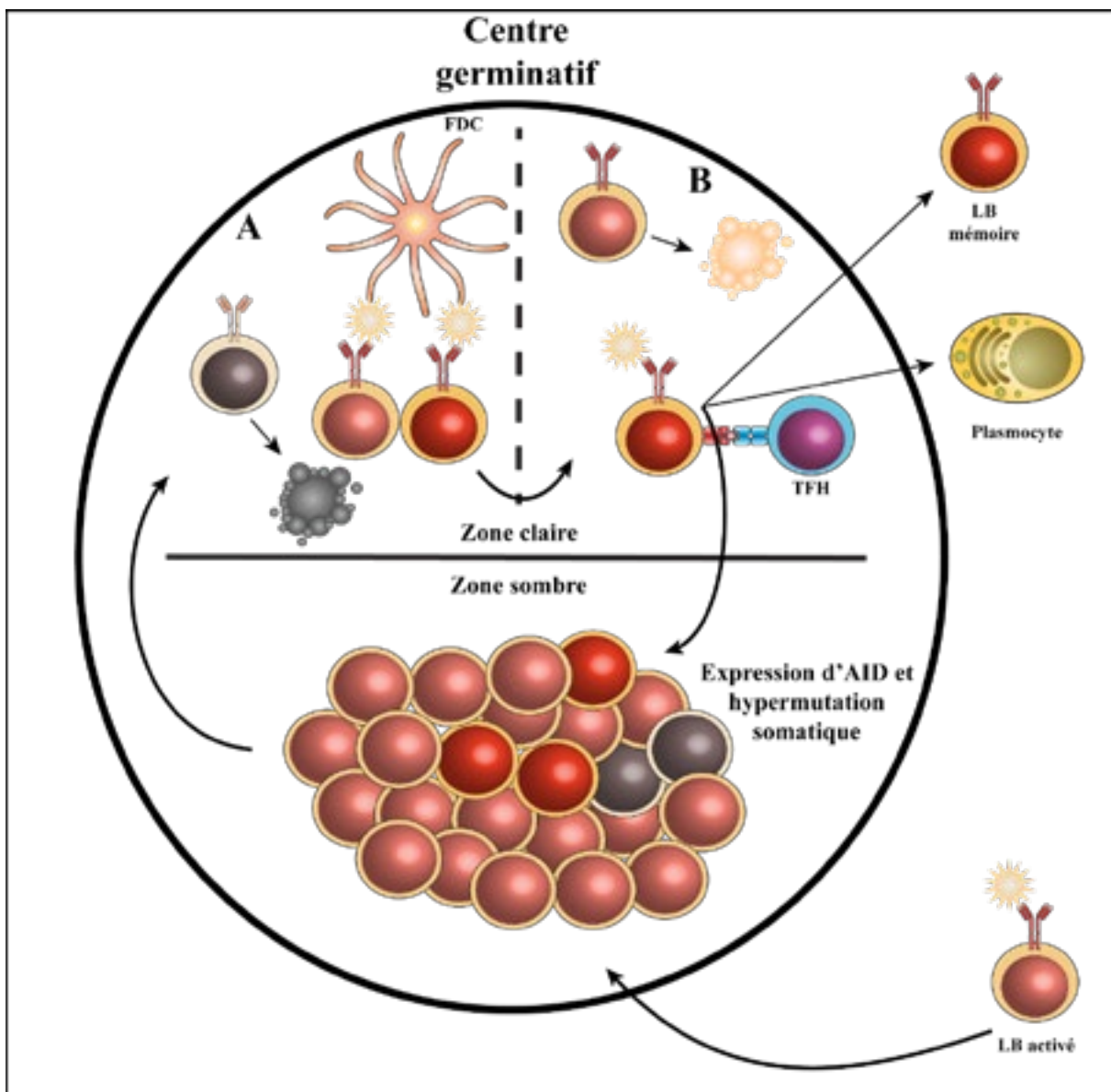


Figure 21 : Sélection dans le centre germinatif.

Une fois activés, les LB vont pouvoir entrer dans le centre germinatif. Dans la zone sombre, ils subissent de nombreux cycles de prolifération et de mutations (induites par AID durant le processus d'hypermutation somatique). Ils vont ensuite migrer vers la zone claire où ils seront sélectionnés suivant leur affinité pour l'antigène. Les LB de plus faible affinité ne pourront pas accéder à l'antigène présenté par les FDC et vont mourir par apoptose, faute de signaux au niveau de leur BCR (A). Les LB qui ont réussi à acquérir l'antigène et à l'internaliser, pourront le présenter aux TFH (B). Les LB vont entrer en compétition pour les TFH et seuls ceux présentant une forte affinité vont recevoir suffisamment de signaux de la part des TFH et pourront survivre. Ces LB vont alors soit retourner dans la zone sombre pour subir de nouvelles modifications, soit se différencier en plasmocytes ou LB mémoires. Les LB de plus forte affinité se différencieront en plasmocytes tandis que les LB de moindre affinité se différencieront en cellules mémoires.

leur survie et ils entrent en apoptose. L'importance de ce premier niveau de sélection vient en premier lieu du fait que l'affinité des anticorps, produits suite à la réaction du GC, augmente lorsque l'antigène se trouve à faible dose (Goldl *et al.*, 1968). D'autres équipes ont pu montrer en utilisant des souris hypomorphes pour CD19, que le signal provenant du BCR est important pour la maturation d'affinité (Carter *et al.*, 2008). Cependant, lorsque la signalisation du BCR se trouve altérée mais que ses capacités d'endocytose ne varient pas, on n'observe aucune différence au niveau de la maturation d'affinité (Huntington *et al.*, 2006). Cela montre donc

l'importance du second mécanisme de sélection faisant intervenir la présentation antigénique et les TFH.

Lors du second niveau de sélection, les LB qui ont réussi à capturer l'antigène via leur BCR de plus forte affinité peuvent le dégrader et le présenter via le CMH-II dont la densité sera dépendante de la quantité d'antigène capturé et reflètera alors l'affinité du BCR (**Batista *et al.*, 2001**). Ainsi seuls les LB de forte affinité survivent et acquièrent l'antigène, mais uniquement les LB de très forte affinité pourront interagir suffisamment longtemps avec les TFH présents en nombre limité, afin de recevoir les signaux nécessaires à leur survie/différenciation (**Meyer-Hermann *et al.*, 2006**). En plus de sélectionner les clones, l'intensité de l'interaction LB-TFH semble également dicter le nombre de divisions que subiront les LB après être retournés dans la ZS (**Gitlin *et al.*, 2015**). Les mécanismes par lesquels les TFH permettent de sélectionner les LB de haute affinité sont divers. Tout d'abord, il existerait une boucle d'amplification qui favorise le contact entre les deux types cellulaires. Les LB du GC expriment ICOSL, menant à une augmentation de CD40L à la surface des TFH par le biais de leur expression d'ICOS, augmentation qui va à son tour permettre d'augmenter l'expression d'ICOSL sur les LB et ainsi de suite, aboutissant à une large surface de contact entre les LB et les TFH (**Liu *et al.*, 2015**). De plus, plus le contact durera, plus les TFH produiront de l'IL4 et de l'IL21, deux cytokines aidant les LB (**Shulman *et al.*, 2014**). Outre ces deux cytokines, les TFH produisent également la cytokine BAFF, qui favorise la survie des LB présentant une forte affinité (**Goenka *et al.*, 2014**). La conclusion est donc que les LB présentant une forte affinité pourront acquérir l'antigène au niveau des FDC de façon compétitive et qu'ils seront alors capables de présenter ce dernier aux TFH, fournissant une aide plus ou moins élevée aux LB en fonction de l'intensité de leur interaction (qui sera directement dépendante de l'affinité du BCR pour l'antigène). Les LB présentant la plus forte affinité seront alors sélectionnés pour retourner dans la ZS ou pour quitter le GC après s'être différenciés en LB mémoires ou en plasmocytes (**Figure 21**).

3. Devenir des lymphocytes B du centre germinatif.

Afin d'exercer au mieux leurs fonctions effectrices, les LB se différencient en plasmocytes ou en LB mémoires. L'orientation vers l'une ou l'autre de ces voies peut se faire à deux moments différents lors de la réponse au sein du follicule B : soit à la bordure T-B où les LB qui ont reconnu leur antigène vont directement se différencier en cellules mémoires ou en plasmocytes sans entamer de réaction du GC, soit après maturation d'affinité dans le GC où ils stopperont les cycles d'entrée et sortie entre les ZC et ZS et suivront l'une des deux voies de différenciation. Cependant, comment les LB choisissent entre l'une ou l'autre voie de

différenciation ? L'une des réponses semble être à nouveau une question d'affinité. De nombreuses études ont montré que l'acquisition du phénotype correspondant au stade de plasmocyte est facilitée par une plus haute affinité du BCR, que ce soit en cas de différenciation au niveau de la zone T-B ou après réaction du GC (**Paus et al., 2006 ; Phan et al., 2006**). Plus récemment, Shinnakasu et ses collaborateurs ont confirmé cela en démontrant que les LB de faible affinité sont préférentiellement orientés vers une différenciation en cellules mémoires (**Shinnakasu et al., 2016**). Cependant, cette capacité à s'engager dans l'une ou l'autre des voies de différenciation semble également varier au cours de la réponse adaptative. En effet, les cellules mémoires seraient préférentiellement générées avant ou durant les étapes précoces de la réaction du GC, tandis que les plasmocytes deviennent de plus en plus abondants lors des étapes tardives (**Weisel et al., 2016**). Ces faits semblent corroborer l'idée d'une sélection par l'affinité puisque cette dernière va augmenter au cours de la réaction du GC et au fil des nombreux cycles de prolifération et sélection. Ce choix entre les deux destinées possibles pour les LB fait également intervenir un mécanisme que l'on nomme division asymétrique. Lors de cette division, les deux cellules filles présentent des phénotypes différents et le contenu cellulaire n'est pas réparti de manière équitable. Dans le cas présent, l'une des cellules fille retiendrait une plus grande quantité de l'antigène endocyté et des complexes CMH-II (**Thaunat et al., 2012**), ou encore une plus grande quantité du récepteur à l'IL21 ou de la molécule BCL-6 (**Barnett et al., 2012**). Les cellules qui auraient alors conservé une grande partie du CMH et de l'antigène se dirigeraient vers la voie de différenciation en plasmocytes, tandis que des cellules présentant encore une forte quantité de BCL-6 retourneraient dans le GC. Un dernier mécanisme qui semble influencer sur le devenir du LB serait la commutation de classe. Une étude a pu mettre en évidence que les LB exprimant une IgE dans les étapes précoces de la réponse immunitaire se différencient préférentiellement en plasmocytes (**Erazo et al., 2007**). Plus récemment, l'équipe de Michel Nussenzweig a pu noter que la commutation vers l'IgG1 favorisait la différenciation en plasmocytes au détriment de celle en LB mémoires (**Gitlin et al., 2016**).

4.Sélection négative au sein du centre germinatif.

La fonction première du GC étant de produire des anticorps de plus en plus affins et donc de meilleure qualité, il serait alors délétère qu'un LB autoréactif puisse entamer ce processus. Bien que cela puisse se produire en conditions pathologiques, il existe divers points de contrôles afin d'éviter un tel évènement. En temps normal, la plupart des LB autoréactifs sont éliminés dans la moelle osseuse, cependant, une petite fraction arrive à échapper au

processus de sélection et se retrouve dans la circulation. Toutefois, la majeure partie de ces cellules ne devraient pas pouvoir accéder au GC du fait de l'indisponibilité locale de leur antigène, et ne pourraient donc pas entamer le processus de maturation d'affinité. En revanche, l'hypermutation étant un processus aléatoire, la génération de cellules autoréactives au sein même du GC est un risque à ne pas négliger (Tiller *et al.*, 2010). Dans le but d'étudier les mécanismes mis en place au sein du GC afin d'éviter la génération de cellules autoréactives de forte affinité, Chan et ses collaborateurs ont mis au point un modèle de transfert de LB exprimant un BCR reconnaissant le lysozyme d'œuf de poule (nommé HEL) chez des souris immunisées avec un triple mutant de ce composé (HEL3X) (Chan *et al.*, 2012). A la suite du processus de maturation d'affinité, il était possible d'observer des anticorps avec une haute affinité pour HEL3X mais également pour un quadruple mutant (HEL4X). Lorsque cette expérience était renouvelée chez des souris où HEL4X était exprimé en tant qu'antigène du soi, il y avait diminution des anticorps reconnaissant ce variant, montrant ainsi l'existence de point de contrôles au sein du GC. L'hypermutation somatique peut certes générer des cellules autoréactives mais peut également représenter une manière d'éliminer une autoréactivité déjà présente. Une preuve de cela vient d'un anticorps ayant une réactivité contre les globules rouges infectés par plasmodium mais portant une insertion lui permettant de lier le collagène. Ces anticorps suivront alors le processus de maturation d'affinité et il a été remarqué que ces derniers portent alors des mutations diminuant leur capacité de liaison au collagène, montrant ainsi une sélection en faveur de la perte d'autoréactivité au sein du GC (Tan *et al.*, 2016). Il existerait donc divers processus au niveau du GC afin d'éviter la génération de LB autoréactifs de forte affinité.

II-Ontogenèse des organes lymphoïdes secondaires : l'exemple du ganglion lymphatique.

Nous venons de voir dans les paragraphes précédents que les OLS jouent un rôle important dans la mise en place de la réponse adaptative. Ils présentent une structure parfaitement organisée et sont positionnés à des sites stratégiques, jonctions vasculaires et lymphatiques, permettant alors une réponse optimale. Leur développement et leur localisation sont finement contrôlés lors du développement embryonnaire et ne prennent place que durant cette phase de la vie. La réactivation du processus d'ontogenèse lymphoïde durant la vie post-embryonnaire aboutit au développement de structures lymphoïdes ectopiques nommées OLT, on parle alors de néogenèse lymphoïde. Avant de pouvoir aborder le sujet des OLT, il est important de faire un point sur les mécanismes permettant la formation des tissus lymphoïdes

en conditions normales. Nous allons ici aborder les mécanismes qui permettent et contrôlent la formation des OLS et en particulier des ganglions lymphatiques.

A) Les LTi et les LTo gouvernent la formation des tissus lymphoïdes.

La mise en place des tissus lymphoïdes durant la vie embryonnaire repose sur l'interaction entre deux types cellulaires principaux que sont les Lymphoid Tissue inducers (LTi) et les Lymphoid Tissue organizers (LTo). Brièvement, la formation des OLS repose sur la formation de clusters de LTi en des localisations précises, puis leur interaction avec des cellules résidentes, les LTo, via la voie de la lymphotoxine $\alpha 1\beta 2$ (LT $\alpha 1\beta 2$) et de son récepteur LT β R ("LymphoToxin beta Receptor"). Cette interaction déclenche l'expression par les LTo de diverses chimiokines et molécules d'adhésion permettant le recrutement de davantage de LTi ainsi que des LT et LB qui pourront peu à peu coloniser l'ébauche du ganglion.

Les LTi sont des cellules d'origine hématopoïétique qui colonisent l'OLS en cours de développement. Ce sont des cellules de phénotype CD4⁺CD3⁻IL7R α ⁺c-Kit⁺ dont le rôle dans la formation des OLS n'est plus à démontrer (**Mebius *et al.*, 1997**). Ils proviennent du foie fœtal et coloniseraient l'ébauche du ganglion entre les jours embryonnaires 9,5 et 16,5 (E9,5 et E16,5) chez la souris. Ils sont également connus pour exprimer le facteur de transcription ROR γ t ainsi que la LT $\alpha 1\beta 2$, et leur développement au niveau du foie fœtal se fait à partir d'un progéniteur lymphoïde commun et nécessite l'expression du facteur de transcription ID2 ("Inhibitor of DNA binding 2") (**Boos *et al.*, 2007**). Ces LTi sont aussi présents chez l'homme à la différence qu'ils n'expriment pas le marqueur CD4 (**Cupedo *et al.*, 2009**). Leur rôle essentiel dans la formation des OLS a été montré par l'utilisation de souris déficientes pour ID2 ou ROR γ t qui présentent une absence totale de LTi et qui ne développent aucun ganglion ni plaque de Peyer (**Sun *et al.*, 2000**). Il est également possible d'observer dans certains cas des cellules similaires aux LTi et que l'on nomme Lymphoid Tissue initiators (LTin). Ces LTin sont CD4⁺CD3⁻IL7R α ⁺c-Kit⁺CD11c⁺ et ont été décrits pour la première fois au niveau intestinal (**Veiga-Fernandes *et al.*, 2007**). Leur absence impacte grandement le développement des plaques de Peyer et ils semblent se substituer aux LTi dans le cas de cet organe puisque la déficience du récepteur RET ("REarranged during Transfection", qui est exprimé par les LTin) abolit la formation des plaques de Peyer bien que les LTi soient présents (**Veiga-Fernandes *et al.*, 2007**). On peut de plus observer des équivalents des LTi chez l'adulte dans les OLS et la lamina propria (**Scandella *et al.*, 2008 ; Tsuji *et al.*, 2008**). Au niveau de la lamina propria, ces LTi-like expriment eux aussi ROR γ t et sont retrouvés proches de clusters de cellules stromales exprimant VCAM1 et qui forment les cryptes intestinales (**Eberl *et al.*, 2004**). Ces LTi-like

produisent de l'IL22 qui cible l'épithélium intestinal et régule la production de peptides antimicrobiens ainsi que l'homéostasie de cet épithélium (Ouyang *et al.*, 2008). Ces cellules ont aussi été retrouvées dans la rate où leur production d'IL17 semble permettre de rétablir l'architecture de l'organe après infection virale (Scandella *et al.*, 2008). Il semble donc de façon similaire à leurs équivalents embryonnaires, elles soient impliquées dans le maintien et l'homéostasie des tissus lymphoïdes.

Les LTo ont pour leur part une origine mésenchymateuse et forment la structure de soutien des OLS en développement (Mebius, 2003). Ces cellules représentent une population hétérogène et expriment de nombreuses cytokines, chimiokines et molécules d'adhésion (Bénézech *et al.*, 2012). Durant la formation des OLS, elles expriment ICAM1 et VCAM1 (Vondenhoff *et al.*, 2007) ce qui permet de les subdiviser en différents groupes suivant qu'elles expriment fortement ou à un niveau intermédiaire ces molécules ; de plus, ces sous-groupes sont présents en différentes proportions suivant le site considéré (ex : ganglion mésentérique VS ganglion périphérique drainant la peau) (Cupedo *et al.*, 2004). On peut également retrouver d'autres différences entre les LTo suivant leur localisation comme par exemple, l'absence d'expression de RANKL au niveau des plaques de Peyer (Okuda *et al.*, 2007). Ces différences suggèrent des mécanismes différents en ce qui concerne la formation des différents OLS (nous en parlerons brièvement dans le paragraphe suivant). Chez l'adulte, elles donneront naissance aux différentes populations de cellules stromales que sont les FRC, FDC, MRC etc...

B) Le modèle bicellulaire de formation des ganglions lymphatiques.

Nous allons ici détailler le modèle qui a longtemps été universellement reconnu pour expliquer la formation des ganglions (Figure 22). Cependant, nous verrons dans le paragraphe suivant que des études récentes nous amènent à le reconsidérer.

L'interaction entre les LTi et les LTo via l'interaction $LT\alpha 1\beta 2/LT\beta R$ est cruciale pour la mise en place des ganglions, ainsi montré par l'impact de la déficience en $LT\alpha$, $LT1\beta$ ou $LT\beta R$ sur le développement des OLS (Banks *et al.*, 1995 ; Fütterer *et al.*, 1998 ; Koni *et al.*, 1997). Toutefois, avant de pouvoir interagir avec les LTo, les LTi doivent être recrutés au point de développement du ganglion. Les ganglions sont toujours localisés en des points de branchement de vaisseaux sanguins. C'est pourquoi il a été suggéré que ces points de branchements doivent fournir des signaux particuliers qui permettent d'initier la formation de l'ébauche du ganglion. Le développement de la vasculature est coordonné avec celui de l'innervation durant le développement embryonnaire et des études récentes suggèrent que les

fibres nerveuses délivreraient des signaux qui pourraient être impliqués dans la formation des ganglions (van de Pavert *et al.*, 2009).

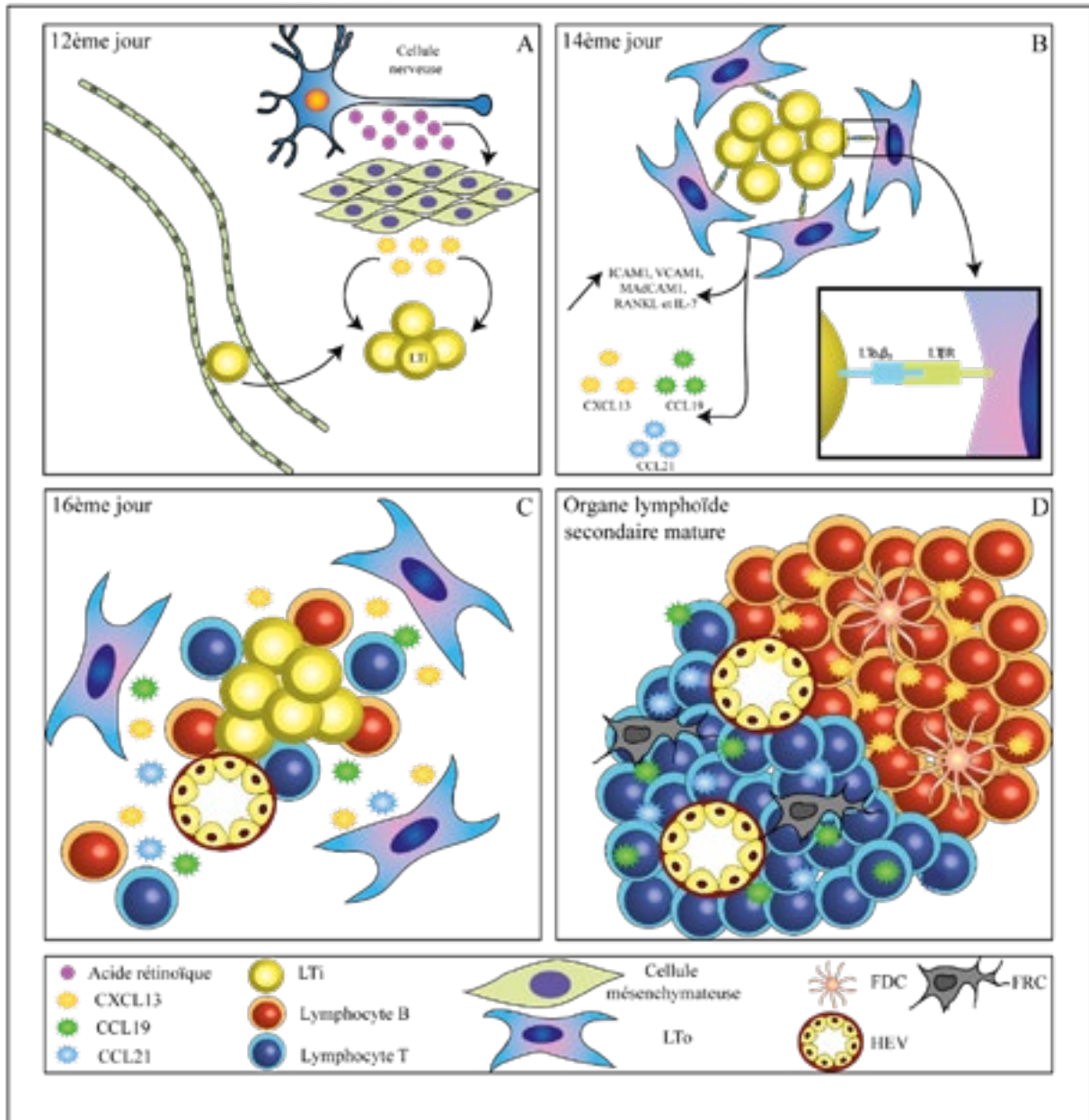


Figure 22 : Modèle de développement des ganglions lymphatiques.

L'organogenèse des OLS nécessite un contact étroit entre les LTi et les LTo. Les LTi sont recrutés via la production de CXCL13 par les cellules mésenchymateuses en réponse à un signal nerveux (A). Par contact homologue (interaction RANK-RANKL), ces cellules vont exprimer à leur surface la LTα1β2. L'interaction de la LTα1β2 avec son récepteur LTβR (présent à la surface des cellules mésenchymateuses) déclenche leur maturation en LTo et la production de molécules d'adhésion, de facteurs impliqués dans le recrutement des lymphocytes B et T (CXCL13, CCL19 et CCL21), ainsi que d'éléments nécessaires à l'entretien de ce mécanisme (IL-7, RANKL) (B). Les lymphocytes, exprimant la LTα1β2, vont peu à peu remplacer les LTi tandis que les LTo vont se différencier pour donner naissance aux différentes cellules stromales présentes au niveau des OLS matures: les cellules dendritiques folliculaires (FDC) et les cellules réticulaires fibroblastiques (FRC) (D). Le développement des « High Endothelial Venules » (HEV) a lieu entre l'étape de migration cellulaire et la maturation structurelle de l'OLS (C).

La localisation du site de formation des ganglions serait donc dictée par les ébauches des systèmes sanguin et nerveux.

Les L_{Ti} provenant du foie fœtal, requièrent un signal chimiotactique afin de pouvoir migrer vers la bonne destination. Connaissant les rôles des chimiokines homéostatiques dans l'organisation des OLS chez l'adulte, de nombreuses équipes ont voulu déterminer si ces dernières étaient impliquées dans la formation des ganglions durant la période embryonnaire. Chez la souris, la plupart des ganglions ne peuvent pas se développer en l'absence de CXCL13 ou de son récepteur CXCR5 (**Luther *et al.*, 2003**). Cette chimiokine pourrait médier le recrutement des L_{Ti}. Cela semble tout à fait plausible puisque son expression semble précéder celle de la lymphotoxine, démontré par le fait qu'une déficience en lymphotoxine n'impacte pas l'expression de CXCL13 (**van de Pavert *et al.*, 2009**). La chimiokine CCL21 participerait elle aussi à ce processus de recrutement, puisqu'en l'absence de CXCL13, certains ganglions peuvent tout de même se développer (**Luther *et al.*, 2003**) alors que l'absence combinée de CXCR5 et CCR7 impacte la formation de tous les ganglions (**Ohl *et al.*, 2003**). CXCL13 semble donc être la chimiokine principale gouvernant le recrutement initial des L_{Ti}. Cette production de CXCL13 a été montrée comme ayant pour origine les cellules mésenchymateuses présentes au site d'initiation de formation des ganglions et qui donneront naissance aux L_{To} (**van de Pavert *et al.*, 2009**). La synthèse de CXCL13 par les cellules mésenchymateuses dépend de l'acide rétinoïque dont la synthèse est sous le contrôle d'une enzyme nommée RALDH2 ("RetinAldehyde DeHydrogenase 2"). Et si l'on en revient aux types cellulaires présents à proximité de la zone où va se former le ganglion, les fibres nerveuses expriment justement cette enzyme et peuvent ainsi induire la synthèse de CXCL13 grâce à l'acide rétinoïque qu'elles produisent (**van de Pavert *et al.*, 2009**).

Une fois recrutés, les L_{Ti} vont interagir avec les cellules mésenchymateuses qui se différencieront en L_{To} à la suite de ce contact. Cependant afin de pouvoir entrer en contact avec les cellules mésenchymateuses, les L_{Ti} ont besoin d'exprimer la lymphotoxine. Elle peut être induite par deux signaux chez ces cellules : l'IL7 ou l'engagement de la voie RANK/RANKL (**Yoshida *et al.*, 2002**). Les L_{Ti} exprimant à la fois RANK et RANKL, il a été proposé que lorsqu'elles se regroupent en clusters au niveau de l'ébauche ganglionnaire, elles pourraient interagir les unes avec les autres, induisant ainsi l'expression de la lymphotoxine à leur surface (**Kim *et al.*, 2000**). Une fois la lymphotoxine exprimée, les L_{Ti} peuvent mettre en place des contacts avec les cellules mésenchymateuses présentes et induire leur différenciation en L_{To}. Ces L_{To} se mettront alors à produire les chimiokines homéostatiques CXCL13, CCL19 et CCL21, mais également à exprimer des molécules d'adhésion comme ICAM1, VCAM1 et MadCAM, permettant le recrutement d'un plus grand nombre de L_{Ti} ainsi que leur rétention (**Figure 22**). Les L_{To}, comme mentionné dans le paragraphe précédent, peuvent synthétiser de

l'IL7 et exprimer RANKL, permettant ainsi la survie et l'activation des LTi arrivant au site de formation à la manière d'une boucle d'amplification positive (Yoshida *et al.*, 2002). Petit à petit, les LTi seront remplacés par des LT et LB en nombre de plus en plus élevé et les LTo se différencieront en cellules stromales ganglionnaires (suite à la stimulation continue par la lymphotoxine) afin de constituer les ganglions tels que l'on peut les observer chez l'adulte.

C) Le nouveau modèle de développement des ganglions lymphatiques.

Bien que le modèle précédemment décrit ait été longtemps admis, il existait certaines incohérences et des études récentes suggèrent de reconsidérer la manière dont les ganglions se mettent en place, en particulier au niveau des étapes précoces (Figure 23).

En premier lieu, si l'on se fie au modèle précédemment décrit, l'absence de la signalisation via la lymphotoxine chez les LTo devrait totalement abolir la formation des ganglions, or lorsque le récepteur est spécifiquement supprimé dans les cellules exprimant CCL19 et donc dans les LTo (Chai *et al.*, 2013), cela n'empêche pas la formation de l'ébauche du ganglion. Cependant, l'expression de cette chimiokine étant secondaire à la première interaction LTi-cellule mésenchymateuse il n'était pas possible de conclure clairement quant à l'implication de la lymphotoxine dans les étapes précoces. Lorsque la même stratégie fut appliquée en ciblant les cellules exprimant CXCL13 (donc les cellules mésenchymateuses précurseurs des LTo), aucun impact n'a non plus été observé sur la formation du ganglion, remettant alors en cause la nécessité de l'interaction initiale entre LTi et cellule mésenchymateuse (Onder *et al.*, 2017). Au contraire, lorsque la signalisation de la lymphotoxine est abolie dans les cellules endothéliales sanguines et lymphatiques, le développement du ganglion est fortement contrecarré (Onder *et al.*, 2013). En effet, les souris déficientes pour le LT β R dans les cellules endothéliales montrent une absence de quasiment la moitié de leurs ganglions, et les ganglions restants présentent des HEV incomplètement différenciées. Cela confirme que la lymphotoxine et son récepteur jouent bien un rôle crucial dans le développement des ganglions, cependant l'interaction LTi-cellule mésenchymateuse ne serait pas la seule impliquée et les cellules de type endothéliales semblent contribuer davantage que ce qui était imaginé jusqu'à lors. De plus, si l'on se fie au modèle de base, les LTi quitteraient le foie fœtal et se retrouveraient dans la circulation sanguine avant de rejoindre l'ébauche du ganglion (van de Pavert *et al.*, 2009). Toutefois, dans le cas des progéniteurs hématopoïétiques, ces derniers rejoignent la circulation sanguine avant de migrer dans les tissus puis de repartir dans la circulation via les vaisseaux lymphatiques (Massberg *et al.*, 2007). Il pourrait donc en être de même pour les LTi. Et justement, l'étude récente de Lucas Onder et de

ses collaborateurs a montré que les L_{Ti} rejoignent la circulation lymphatique et sont retenus au site de formation des ganglions de manière dépendante de la chimiokine CCL21 (**Onder *et al.*, 2017**). Une autre équipe a confirmé ce résultat et a montré que cette rétention est dépendante d'un signal passant par le récepteur LT β R (**Wang *et al.*, 2018**) expliquant pourquoi les souris dont la signalisation par le récepteur LT β R est spécifiquement abolie dans les cellules endothéliales perdent la moitié de leurs ganglions. Ces différentes publications suggèrent donc que contrairement à ce que l'on croyait, l'initiation de la formation des ganglions ne serait pas induite par une production locale de CXCL13 médiée par l'acide rétinoïque provenant des neurones mais par un recrutement des L_{Ti} via les vaisseaux lymphatiques et leur interaction avec des cellules endothéliales. De plus, l'étude menée par Lucas Onder a pu montrer que le premier contact entre les LEC et les L_{Ti} est dépendant de l'interaction RANK-RANKL et qu'après ce premier recrutement, les L_{Ti} peuvent également interagir avec les cellules endothéliales sanguines via la lymphotoxine et induire un remodelage de la vasculature environnante. Toutefois, les cellules mésenchymateuses exprimant CXCL13 sont bel et bien retrouvées au niveau de l'ébauche du ganglion en zone périvasculaire (**Bénézech *et al.*, 2012**) et sont simplement activées par les L_{Ti} en seconde lieu, lorsque suffisamment de L_{Ti} ont été retenus par les LEC (**Onder *et al.*, 2017**).

Le nouveau modèle proposé serait alors le suivant avec l'exemple du ganglion inguinal (les étapes seront les mêmes pour les autres mais avec un timing plus ou moins précoce) (**Figure 23**). Au jour embryonnaire 10 (E10), les progéniteurs des LEC commencent à former les premiers vaisseaux lymphatiques dans la partie supérieure de l'embryon. Entre E12 et E13 les réseaux lymphatique et sanguin ont évolué, commencent à s'infiltrer dans divers organes et les L_{Ti} débutent leur sortie à partir du foie fœtal. A E14 l'ébauche du ganglion est formée et les L_{Ti} commencent à s'accumuler grâce au gradient de CCL21 induit par les LEC et sont retenus grâce à leur interaction avec les LEC via RANK-RANKL et LT α 1 β 2-LT β R. Une fois que suffisamment de L_{Ti} se sont accumulés, ils interagiront non seulement avec les LEC mais également avec les BEC et les cellules mésenchymateuses par l'intermédiaire du LT β R. Cette interaction induit alors l'expression de chimiokines et de molécules d'adhésion par ces différents types cellulaires, ce qui permet le recrutement d'un plus grand nombre de L_{Ti} mais induit également un remaniement des vasculatures sanguine et lymphatique autour de l'ébauche. Finalement les LEC pourront former le sinus sous-capsulaire du ganglion, les BEC composeront les HEV et permettront le recrutement des premiers lymphocytes, tandis que les L_{Ti} entameront leur différenciation en différentes cellules stromales fibroblastiques que l'on retrouve dans le ganglion.

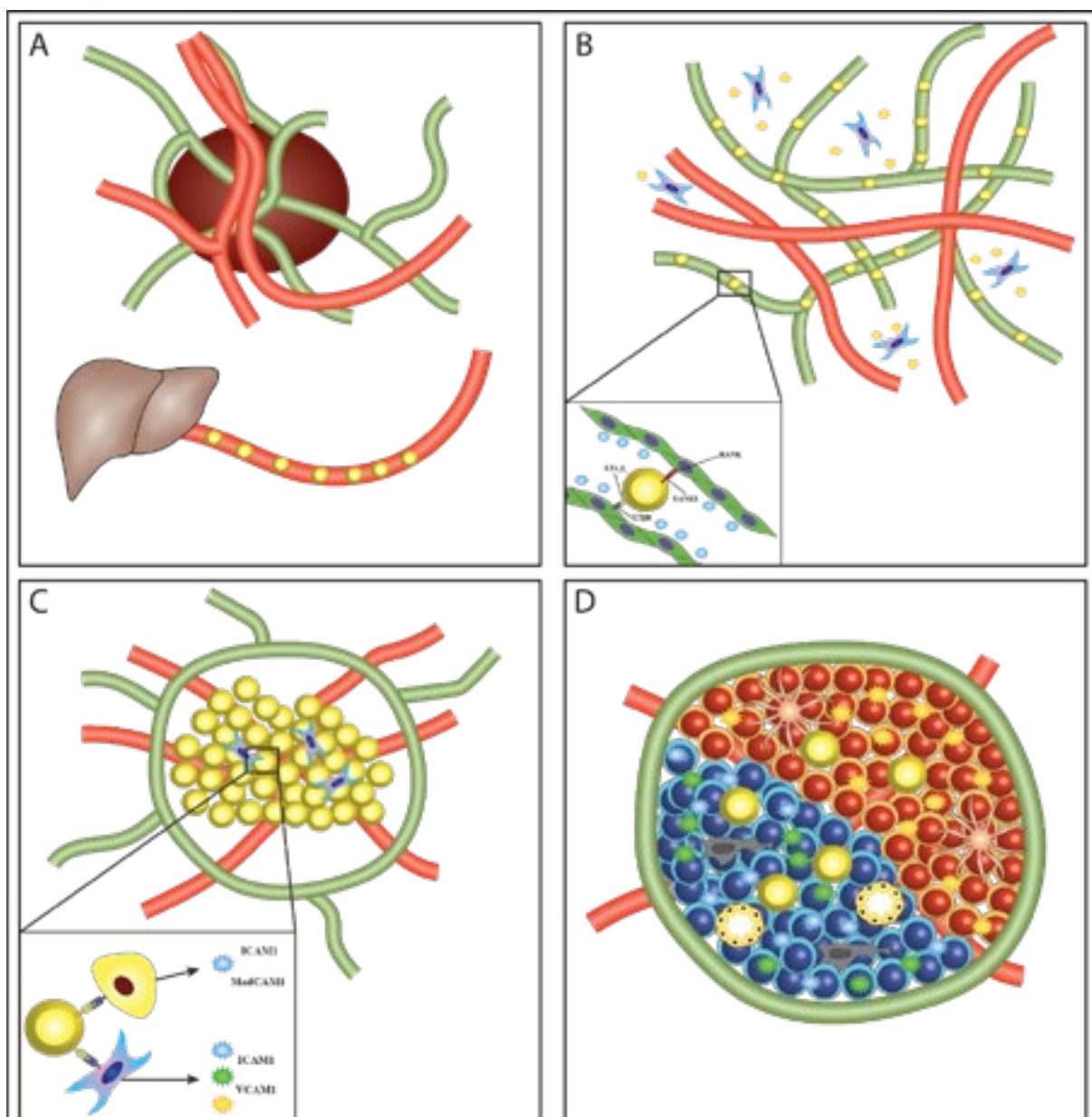


Figure 23 : Nouveau modèle de développement des ganglions lymphatiques proposé par Onder *et al.*, (2018).

(A) Au départ les réseaux lymphatique et sanguin commencent à s'infiltrer dans divers organes et les LTI débutent leur sortie à partir du foie fœtal. (B) Une fois l'ébauche du ganglion formée, les LTI commencent à s'accumuler grâce au gradient de CCL21 induit par les cellules lymphatiques (LEC), et sont retenus du fait de leur interaction avec les LEC via RANK-RANKL et $LT\alpha 1\beta 2-LT\beta R$. (C) Une fois que suffisamment de LTI se sont accumulés, ces derniers vont interagir non seulement avec les LEC, mais également avec les BEC et les cellules mésenchymateuses par l'intermédiaire du $LT\beta R$. Cette interaction va induire l'expression de chimiokines et de molécules d'adhésion par ces différents types cellulaires ce qui va mener au recrutement d'un plus grand nombre de LTI mais également causer un remaniement des vasculatures sanguine et lymphatique autour de l'ébauche. (D) Finalement les LEC vont former le sinus sous-capsulaire du ganglion, les BEC vont se différencier en HEV et permettre le recrutement des premiers lymphocytes tandis que les LTI vont se différencier pour donner naissance aux différentes cellules stromales que l'on retrouve dans le ganglion.

Les vaisseaux en vert représentent des vaisseaux lymphatiques et ceux en rouge, des vaisseaux sanguins. Concernant les types cellulaires et chimiokines, la légende est la même qu'en figure N°22.

*Adapté de Onder *et al.*, 2018.*

III-Les organes lymphoïdes tertiaires : définition et structure.

A) Généralités sur les organes lymphoïdes tertiaires.

Alors que le développement des OLS est un processus finement contrôlé et ne prenant place que lors de la vie embryonnaire, il est possible d'observer des infiltrats de cellules immunitaires au sein de tissus non lymphoïdes présentant une structure organisée. Ces infiltrats organisés présentent de nombreuses similitudes avec les OLS précédemment décrits, mais du fait de leur formation post-embryonnaire et ectopique, ils ont été nommés Organes Lymphoïdes Tertiaires (OLT). Ces structures présentent un niveau d'organisation qui les distingue des infiltrats inflammatoires classiques que l'on peut observer à de nombreux sites d'inflammation, comme par exemple, la compartimentation des LT et LB en deux zones distinctes. Ils sont générés lorsque l'inflammation locale au sein d'un tissu ou d'un organe se prolonge dans le temps du fait de la stimulation continue du système immunitaire, on parle alors d'inflammation chronique. Ce type d'inflammation et la formation d'OLT qui lui est associée peut survenir dans de nombreux contextes pathologiques comme les infections, le cancer, le rejet de greffe ou les maladies inflammatoires et auto-immunes (Yin *et al.*, 2017). Les cellules qui forment ces OLT peuvent répondre localement à la stimulation continue par l'antigène, présent en grande quantité dans le tissu cible de l'inflammation. L'inflammation et le degré d'infiltration cellulaire pouvant grandement varier d'un tissu à un autre ou suivant la pathologie considérée, il est parfois difficile de déterminer si l'on est en présence d'un véritable OLT ou simplement d'un infiltrat inflammatoire faiblement organisé. Il existe ainsi de nombreux marqueurs utilisés pour définir la présence d'un OLT. Certains se basent sur le caractère fonctionnel ou non de ses structures, à savoir si elles sont capables de promouvoir localement une réponse immunitaire, qu'elle soit humorale ou cellulaire. Cependant, les études chez l'Homme ne permettent pas toujours de pouvoir vérifier le caractère fonctionnel ou non des OLT, c'est pourquoi de nombreuses équipes se basent désormais sur la présence de populations de cellules stromales similaires à celles que l'on retrouve au niveau des OLS (FRC, FDC...) et qui permettent de distinguer les vrais OLT des infiltrats inflammatoires « basiques » contenant des LT et LB.

La raison pour laquelle ces structures se mettent en place n'est pas totalement définie et peut être largement dépendante du contexte et de l'organe considéré. Cependant, il apparaît clairement que ces structures se forment à cause d'une inflammation résolue non suffisamment rapidement et il existe deux hypothèses quant à ce qui peut induire la formation des OLT lors de l'inflammation chronique. La première vient du fait que dans la grande partie de ces situations pathologiques, il y a présence d'un antigène ou d'un auto-antigène qui est reconnu

comme étranger à l'organisme et ce serait cette disponibilité locale et soutenue d'antigène qui dirigerait la formation des OLT. Toutefois, il existe divers contextes où des OLT ont été détectés sans pour autant que l'on puisse identifier un antigène sous-jacent à l'inflammation ou la maladie en cause (**Mohanta et al., 2014**). La seconde hypothèse suggère donc que les OLT pourraient être générés suite à une inflammation causée par une lésion tissulaire lors d'une réponse non spécifique à un antigène en particulier, et ce serait cette inflammation qui aboutirait à la révélation d'épitopes cryptiques et à une réponse dirigée contre un antigène du tissu en question.

En ce qui concerne les rôles potentiels que peuvent jouer les OLT dans ces divers contextes, il existe plusieurs cas de figures qui seront encore une fois dépendants du cas considéré. Différentes pathologies dans lesquels l'on retrouve des OLT seront détaillés dans le chapitre suivant mais nous allons en discuter ici de manière globale. Pour commencer, les OLT peuvent jouer un rôle délétère en amplifiant localement les réponses auto-immunes pathologiques au sein de l'organe cible. Ils ont pu être observés dans le tissu synovial de patients atteint de PR (**Schröder et al., 1996**), les glandes salivaires de patients présentant un syndrome de Sjögren (**Barone et al., 2005**) ou encore au niveau du système nerveux central des patients atteints de sclérose en plaque (**Serafini et al., 2004**). Ces organes étant des cibles majoritaires lors des diverses pathologies évoquées, il n'est pas surprenant que l'existence d'une réponse se localisant à l'intérieur même de l'organe présente des conséquences délétères. Et pour cause, la présence de ces OLT a pu être associée à une sévérité accrue de la maladie (**Rotondo Dottore et al., 2018**). Cela peut en partie s'expliquer par le fait que dans de nombreux cas, les LT et LB présents dans ces OLT sont capables de répondre aux antigènes produits localement (**Armengol et al., 2001**). Ce type de réponse pathologique peut également se produire lors de rejets de greffe chroniques où le greffon va représenter une source incommensurable d'antigènes. En dépit de leurs implications dans des réponses pathologiques, les OLT peuvent dans d'autres cas promouvoir une réponse immunitaire présentant un bénéfice non négligeable pour l'hôte. En cas d'infection par un pathogène, la réponse induite localement par les OLT permet une meilleure élimination du dit pathogène et donc présente un avantage certain. Il est par exemple possible d'observer le développement d'OLT au sein du tissu pulmonaire lors d'une infection par certains virus ou bactéries comme *M.tuberculosis* (**Kahnert et al., 2007**). Dans le cas de cette bactérie, les OLT permettent d'empêcher la dissémination du pathogène, en formant des granulomes afin de maintenir le pathogène confiné, et en recrutant des macrophages qui procéderont à son élimination. Enfin, les OLT sont également impliqués dans la régulation des réponses immunitaires. Par exemple, des OLT ont été décrits au niveau de la paroi artérielle

chez un modèle murin d'athérosclérose (Hu *et al.*, 2015). Dans ce cas, les OLT permettraient de réduire l'inflammation en favorisant la différenciation de Treg ; de plus, si l'on supprime spécifiquement ces OLT, les souris développent de plus grandes plaques d'athérosclérose en en plus grand nombre (Hu *et al.*, 2015).

B) Structure des organes lymphoïdes tertiaires.

Même si leur développement est ectopique, les OLT partagent de nombreuses similarités avec les OLS (en particulier les ganglions lymphatiques) et ce, notamment du point de vue de leur structure (Figure 24). Comme décrit dans le **paragraphe I, B, page 85**, les ganglions sont des structures organisées entourées d'une capsule conjonctive. Les LT et les DC sont retrouvés dans la partie para-corticale du ganglion tandis que les LB sont confinés au sein de follicules. Ils présentent également un réseau de cellules stromales fibroblastiques, principalement FRC en zone T et FDC dans le follicule B, qui permettent l'organisation du ganglion. Ils possèdent de plus des vaisseaux sanguins spécialisés permettant l'entrée des lymphocytes naïfs ainsi que des vaisseaux lymphatiques principalement impliqués dans l'entrée des DC activées.

Comme les ganglions, les OLT présentent une architecture organisée avec une séparation des LT et LB (Figure 24), ce qui représente l'un des premiers critères indiquant la présence d'un OLT. Les OLT ne sont pas toujours aussi bien organisés et peuvent évoluer au cours de la maladie. Chez la souris NOD ("Non Obese Diabetic") par exemple, les OLT sont au départ peu organisés, présentent des HEV en développement, et les îlots pancréatiques ne sont que peu impactés, tandis que plus tard, avec l'évolution de la maladie, on observe une destruction des îlots et la survenue d'un diabète ainsi que la présence d'OLT structurés (André *et al.*, 1996). La différence majeure entre les OLT et les ganglions est que les OLT ne sont pas encapsulés (Figure 24) et sont donc en contact direct avec le tissu dans lequel ils se sont formés, ce qui va leur permettre d'interagir plus facilement avec les cellules environnantes. Si l'on exclut cette différence, il apparaît évident que l'organisation des LT et LB au sein des OLT dépend probablement de chimiokines et de cellules stromales similaires à celles que l'on peut retrouver dans les ganglions. Des études ont en effet pu montrer que l'expression ectopique de diverses chimiokines était suffisante pour induire la formation d'OLT (Luther *et al.*, 2002). La présence de ces chimiokines dans divers cas d'OLT suggère que l'on peut également retrouver des populations de cellules stromales puisque ce sont ces dernières qui sont, dans le cas du ganglion, responsables de la production de chimiokines et de l'organisation spatiale du tissu. La première population de cellules stromales qui a été depuis longtemps observée dans les OLT

sont les FDC. Comme dans le cas des ganglions, elles sont retrouvées au sein de la zone contenant les LB (Drayton *et al.*, 2003).

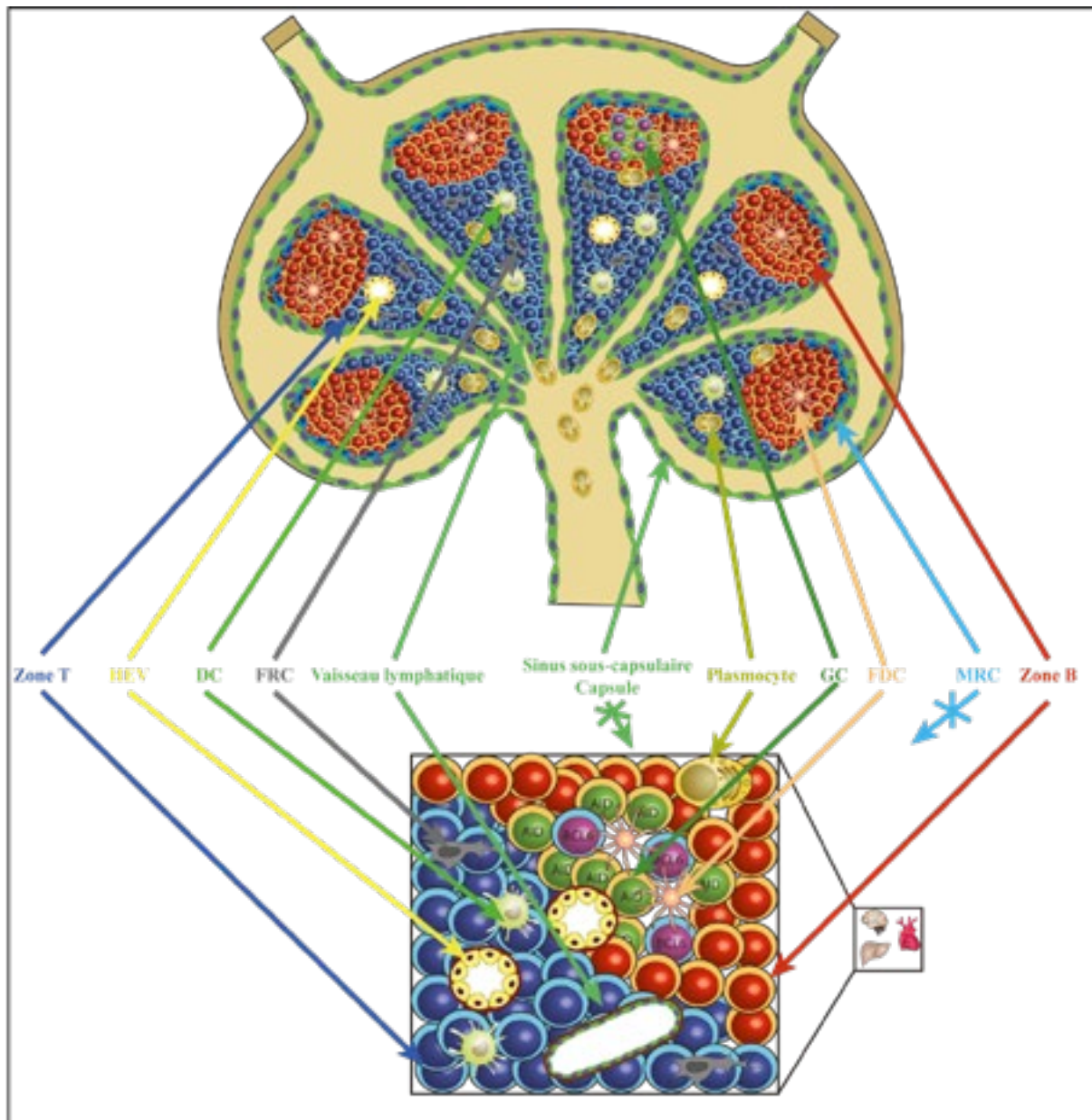


Figure 24 : Comparaison de la structure et des fonctions des ganglions et des OLT.

Bien que leur développement prenne place après la vie embryonnaire et qu'ils soient localisés en divers tissus et organes non lymphoïdes, les OLT partagent de nombreuses similarités avec les ganglions lymphatiques. On peut en premier lieu observer une répartition des LB et LT en des zones distinctes. Dans les ganglions, les DC sont majoritairement localisées au niveau de la zone des LT, on peut les retrouver également au niveau des OLT où comme dans le cas du ganglion, elles vont pouvoir activer les LT et initier une réponse adaptative. Concernant cette fonctionnalité, les OLT peuvent contenir des GC et des plasmocytes et participer à la génération de réponses immunitaires locales. Dans les OLT, comme les ganglions, l'organisation spatiale va reposer sur la production de chimiokines et l'expression de molécules d'adhésion par les cellules stromales. L'on retrouve alors des cellules stromales comme les FDC et les FRC, respectivement en zone B et zone T, au sein des OLT. En revanche, il n'a pas encore été observé une présence de cellules similaires aux MRC dans les OLT. De la même manière, bien que présentant des vaisseaux lymphatiques, les OLT sont dépourvus de capsule et de sinus sous-capsulaire et sont en contact direct avec les tissus environnants. Enfin, il est possible d'observer la présence de HEV dans les OLT qui vont, de façon similaire au ganglion, permettre l'attraction des LT naïfs.

Elles seraient donc capables de médier l'organisation de la zone B de l'OLT et ce, en produisant la chimiokine CXCL13, connue pour attirer les LB. CXCL13 a été observée dans de

nombreux modèles présentant des OLT et a été localisée au même endroit que les LB dans le cas d'un modèle murin inductible de Sjögren (**Bombardieri et al., 2012**). Les OLT présentent donc une compartimentation des LT et LB, la chimiokine CXCL13 ainsi qu'un réseau de FDC. Cependant, leurs similitudes structurelles avec les OLS ne s'arrêtent pas là. Les FRC, qui forment le réseau stromal de la zone T du ganglion et produisent diverses chimiokines permettant d'attirer les LT semblent être elles aussi présentes dans les OLT. Dans le pancréas de souris NOD, ou exprimant la lymphotoxine ou CXCL13 sous le contrôle du promoteur de l'insuline, Link et ses collaborateurs ont observé un réseau stromal ressemblant à celui formé par les FRC au niveau du ganglion (**Link et al., 2011**). Ce réseau semblait d'ailleurs plus intense dans la zone où les LT étaient retrouvés et exprimait diverses molécules d'adhésion ainsi que la chimiokine CCL21. Ce type de cellules stromales a également été observé au niveau de l'artère pulmonaire chez des patients souffrant d'hypertension pulmonaire idiopathique (**Perros et al., 2012**). Seulement, il n'est pas encore clairement établi, si en l'absence de capsule et donc de sinus sous-capsulaire, ce réseau stromal peut, au niveau des OLT, jouer également un rôle dans le transport antigénique. Enfin, en dehors des cellules stromales de type fibroblastique, il est possible de retrouver des cellules de type endothélial dans les OLT. Des vaisseaux lymphatiques ont été mis en évidence dans les OLT formés suite à une infection pulmonaire par *Mycoplasma pulmonis* (**Mounzer et al., 2010**) ou dans le pancréas de souris NOD (**Link et al., 2011**). Ces vaisseaux pourraient alors permettre la migration des DC au sein de l'OLT, comme dans le cas des ganglions, et permettre d'amplifier la réponse locale par présentation antigénique qu'elle soit favorable ou délétère. Cependant, ces vaisseaux pourraient tout aussi bien permettre la sortie des lymphocytes activés au niveau de l'OLT et permettre de disséminer la réponse à travers l'organisme, leur rôle précis dans le fonctionnement des OLT reste donc à élucider. En plus des vaisseaux lymphatiques, on retrouve les veinules spécialisées que sont les HEV dans de nombreux cas d'OLT (**Drayton et al., 2006**). Elles sont, comme dans les ganglions, capables de produire la chimiokine CCL21, comme montré chez les patients atteints du syndrome de Sjögren (**Barone et al., 2005**), de plus, elles semblent médier le recrutement de cellules naïves au niveau de l'OLT qui sera suivie par leur activation locale. L'afflux de plus en plus de cellules naïves serait favorable dans le cas où il faut rapidement éliminer le pathogène ou la tumeur. C'est probablement pourquoi dans le cas de cancer du sein, la présence de HEV est associée à un meilleur pronostic et à une survie accrue (**Martinet et al., 2011**), en permettant le recrutement de LT CD8⁺ naïfs qui seront alors activés au contact des antigènes tumoraux. Pour conclure, bien que les différents éléments décrits ci-dessus ne sont pas tous systématiquement retrouvés au sein d'une même étude, il est possible de retrouver de

nombreuses similarités entre les OLT et les ganglions lymphatiques. Les OLT, bien dépourvus de capsule, présentent une organisation T/B, la présence de cellules stromales capables de produire des chimiokines et la présence de vaisseaux spécialisés comme les HEV ou les vaisseaux lymphatiques (**Figure 24**).

IV-Les organes lymphoïdes tertiaires dans diverses pathologies et leurs rôles associés.

Les OLT peuvent être observés dans de nombreuses pathologies allant de l'infection au rejet de greffe. Selon les pathologies considérées, ils auront un rôle positif en permettant d'éliminer plus rapidement le pathogène ou la tumeur causant l'inflammation, ou délétère en exacerbant les réponses pathologiques localement. Nous allons dans ce chapitre détailler plusieurs cas de figure permettant d'observer les diverses situations où des OLT sont détectables mais également les rôles que pourront jouer ces derniers (positifs comme négatifs).

A) Les organes lymphoïdes tertiaires lors d'infections.

Le premier cas que nous pouvons aborder est celui des infections virales et bactériennes. Dans ce contexte, la réponse immunitaire qui se met en place a pour but d'éliminer le plus rapidement possible le pathogène de l'organisme ou à défaut de limiter sa prolifération/dissémination. Les OLT sont retrouvés dans de nombreux cas d'infection. Lors d'une infection par le virus *influenza*, un tissu lymphoïde inductible se met en place au niveau des poumons, ce dernier est alors nommé iBALT ("inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue") et présente de fortes similitudes avec les MALT dont la présence de cellules M et d'un dôme épithélial (**Rangel-Moreno et al., 2011**). On peut également observer ces mêmes structures dans le cas d'une infection par le virus de la vaccine (**Halle et al., 2009**). Le tissu pulmonaire n'est cependant pas le seul pouvant présenter une formation d'OLT en réponse à une infection, en effet la plupart des zones de l'organisme présentant une muqueuse sont sujettes au développement d'OLT. Il est donc possible de retrouver ces structures au niveau de la muqueuse gastrique après infection par *Heicobacter pylori* (**Mazzucchelli et al., 1999**) ou de la muqueuse intestinale suite à la stimulation par le microbiote intestinal (**Lochner et al., 2011**). On observe également ces OLT au niveau du foie suite à une infection par le virus de l'hépatite C (**Sansonno et al., 2008**) et même dans le tissu synovial lors de la maladie de Lyme (**Ghosh et al., 2005**).

1. Les OLT permettent d'éliminer le pathogène.

Dans une majorité de cas, la présence de ces OLT permet une meilleure élimination du pathogène et évite la mise en place d'une inflammation de trop longue durée. Il existe un exemple intéressant qui est celui de l'infection par le virus de la grippe. L'infection par ce virus

engendre la formation d'iBALT caractérisés par la présence de LT et LB et la production de diverses chimiokines (**Moyron-Quiroz et al., 2004**). Dans cette étude, les auteurs ont pu élégamment montrer que ces structures étaient capables de se développer en l'absence d'OLS chez la souris et qu'à elles seules, elles étaient suffisantes pour permettre la survie des animaux et l'élimination du virus. Ces OLT contiennent en effet des GC et des lymphocytes en prolifération, montrant qu'ils sont capables de médier la mise en place de réponses locales optimales contre le pathogène, et plus particulièrement d'activer les LT CD8 et de générer localement des plasmocytes spécifiques d'antigènes grippaux. Il est également très intéressant de noter que ces structures sont maintenues après l'élimination du pathogène et ce de manière dépendante des DC (**GeurtsvanKessel et al., 2009**). Ces iBALT semblent ainsi pouvoir permettre la mise en place d'une réponse secondaire/mémoire efficace, puisque les titres d'anticorps spécifiques du virus se trouvent diminués lorsque les DC sont déplétées et que les iBALT se retrouvent éliminés sans affecter les autres OLS. Un autre cas où les OLT jouent un rôle favorable lors d'une infection est celui de *Mycobacterium tuberculosis* (**Kahnert et al., 2007 ; Khader et al., 2009 ; Slight et al., 2013**). Dans ce contexte précis, les granulomes contenant la bactérie sont organisés en OLT et permettent de maintenir la bactérie confinée. L'expression de chimiokines homéostatiques est ici cruciale car elle permet la formation de ces OLT, et donc le confinement du pathogène, mais aussi le recrutement de LT exprimant CXCR5. Ce n'est qu'en présence de ces LT que les follicules sont totalement formés et que les macrophages sont recrutés et activés, permettant l'élimination de la bactérie.

2. Les infections chroniques et les OLT : un revers de la médaille.

Bien que ces exemples montrent un caractère protecteur des OLT lors d'infections, il existe des cas où si le pathogène n'est pas éliminé, la réponse qui perdurera dans le temps peut devenir délétère pour l'organisme. Cela se trouve être le cas des infections chroniques par une bactérie ou un virus. Lors d'une infection chronique par *Helicobacter pylori*, des structures lymphoïdes tertiaires se développent au niveau de la muqueuse gastrique et se trouvent être de mauvais pronostic quant à la survenue d'un lymphome du MALT. La formation de ces structures nécessite également l'implication de chimiokines homéostatique telle que CXCL13. L'absence de CXCR5 dans ce contexte empêche la formation des OLT sans pour autant affecter la colonisation de la muqueuse par la bactérie. Cette absence d'OLT diminue, certes, la réponse anticorps dirigée contre la bactérie, mais également l'inflammation de la muqueuse gastrique (**Winter et al., 2010**). Cela démontre que dans ce cas, la présence des OLT n'est pas associée à un bon pronostic mais favorise au contraire une réponse locale délétère bien qu'initialement

dirigée contre le pathogène. De la même manière, l'infection chronique par le virus de l'hépatite C mène à un changement de répertoire progressif des LB au niveau du foie et déclenche la survenue d'une réponse auto-immune (**Sansonno et al., 1998**). Enfin, on retrouve une formation d'OLT chez les patients souffrant de bronchectasie et de mucoviscidose, deux pathologies que l'on sait caractérisées par de nombreuses infections pulmonaires chroniques. Or lorsque des souris sont exposées chroniquement à des billes recouvertes par *Pseudomonas aeruginosa* ou *Staphylococcus aureus*, elles développent des OLT pulmonaires, montrant bien la capacité des pathogènes à induire ces structures, structures qui cependant n'aboutissent pas forcément à une amélioration de l'état de l'hôte (**Frija-Masson et al., 2017**).

B) Organes lymphoïdes tertiaires dans les cancers : amis ou ennemis ?

Les OLT ont été observés dans différents cas de cancer que ce soit chez l'Homme ou dans des modèles murins. L'une des premières descriptions concerne les cancers pulmonaires à petites cellules chez l'Homme. Dans ce type de cancer, la présence de follicules lymphoïdes organisés comprenant une zone T contenant des DC et une zone B incluant des FDC et même des GC, a pu être notée (**Dieu-Nosjean et al., 2008**). Des observations ultérieures ont permis de mettre en évidence la présence de chimiokines homéostatiques et de récepteurs permettant le recrutement des LT naïfs au sein de la tumeur (**de Chaisemartin et al., 2011**). Chez la souris également, la présence d'OLT a été de nombreuses fois décrite et est associée à une migration de LT vers le tissu tumoral (**Peske et al., 2015**). Diverses études ont pu par la suite démontrer la présence de ce type de structure dans de nombreux autres cas de cancer, bien que les marqueurs utilisés afin d'identifier les OLT différaient suivant le cas considéré. Un problème rencontré dans le cadre de l'étude des OLT au cours du cancer est que les chercheurs ne se sont parfois contentés que d'un ou deux marqueurs afin d'identifier la présence d'OLT, cela a donc pu mener à la prise en compte de structures qui n'auraient pas dû l'être. Parmi ces éléments, on retrouve bien sûr la présence de HEV (**Lee et al., 2016**) ou encore de TFH (**Gu-Trantien et al., 2013**). Cela se révèle d'autant plus compliqué que des différences peuvent exister dans le cas du même cancer ou de la même localisation. Par exemple, les métastases pulmonaires lors d'un cancer de la prostate sont associées à des OLT tandis que des métastases provenant cette fois de carcinomes rénaux ne présentent pas d'OLT (**Remark et al., 2013**). L'autre cas est celui du mélanome, où les OLT sont retrouvés au niveau des métastases mais sont souvent absents de la tumeur originelle, probablement à cause d'un microenvironnement différent (**Cipponi et al., 2012**). Un dernier exemple, chez la souris, les tumeurs injectées intrapéritonéalement induisent la formation d'OLT, alors que cela n'est pas observé lorsque la tumeur est inoculée par voie

sous-cutanée (Peske *et al.*, 2015 ; Rodriguez *et al.*, 2018). Un dernier point important est que ces OLT peuvent présenter différentes localisations au niveau du tissu tumoral. La majeure partie des travaux ont pu localiser des OLT à l'extérieur de la tumeur, c'est le cas par exemple du cancer colorectal ou encore du cancer du sein (Bento *et al.*, 2015 ; Coronella *et al.*, 2002). En revanche, il existe certains contextes où l'OLT va se former directement au sein de la tumeur, comme par exemple dans les mélanomes (Messina *et al.*, 2012) ou les carcinomes du pancréas (Hiraoka *et al.*, 2015). On pourrait alors penser que ces localisations différentes pourraient avoir un impact sur le fonctionnement de l'OLT et sur l'effet produit au niveau de la tumeur et ainsi influencer sur le pronostic, cependant, il ne semble pas y avoir de corrélation entre la localisation et les effets engendrés par la présence d'OLT.

1. Les OLT favorisent une réponse anti-tumorale locale.

Dans le cas des infections, précédemment décrit, les OLT ont plutôt un rôle bénéfique dans le sens où ils vont permettre l'élimination du pathogène. Dans le cas de tumeurs, il apparaît évident que la présence d'une réponse immunitaire locale qui serait dirigée contre la tumeur pourrait être de bon pronostic. L'élimination des tumeurs fait majoritairement appel à une réponse cytotoxique, la migration de LT à proximité de la tumeur est donc un prérequis pour une meilleure élimination de cette dernière. L'une des caractéristiques des OLT est la présence de HEV, permettant le recrutement de LT naïfs au sein de ces structures. Ces vaisseaux pourraient alors favoriser la migration de LT vers la tumeur, qui pourraient alors être activés localement au contact des antigènes tumoraux et donc favoriser l'élimination des cellules tumorales. Cela semble effectivement être le cas puisque lors d'une étude portant sur le mélanome, les auteurs ont pu montrer d'intéressantes corrélations quant au nombre et types d'HEV présentes (Avram *et al.*, 2013). Sans distinction entre les types de HEV, leur densité corrélait avec l'infiltration des lymphocytes et la régression tumorale, confirmant que les HEV et les OLT peuvent donc jouer un rôle bénéfique dans le cas de cancer. Il était intéressant de noter que ce sont les HEV cuboïdes qui étaient corrélées le plus fortement avec l'infiltration lymphocytaire, alors que les HEV de type « plates » corrélaient quant à elles plus fortement avec la régression tumorale. Or, la forme cuboïde de ces vaisseaux particuliers est dû au stockage de lymphocytes au niveau de petites poches, cela explique alors les différences observées : les HEV cuboïdes sont en train de médier le recrutement de lymphocytes afin d'éliminer la tumeur tandis que dans le cas des HEV « plates » la tumeur étant en régression, le besoin local en lymphocyte est fortement diminué et donc l'on ne retrouve quasiment plus de lymphocytes en transit dans les HEV, expliquant leur forme non bombée. Cette hypothèse de

migration via les HEV a pu être démontrée par la migration de cellules fluorescentes au niveau des OLT formés dans la muqueuse du colon lors des étapes précoces du cancer colorectal (**Di Caro et al., 2014**). Une preuve plus directe de l'importance de ces structures est issue d'une étude de 2014 dans laquelle les patients présentant une forte infiltration de LT CD8⁺ concomitante avec la présence d'OLT, démontraient une meilleure survie en comparaison à ceux ayant une forte infiltration de CD8⁺ mais pas d'OLT (**Goc et al., 2014**). Une explication pourrait être que la présence de DC dans les OLT permettrait de mettre en place une réponse locale plus efficace. Et de manière intéressante, Weinstein et ses collaborateurs ont pu récemment démontrer que l'injection de DC était capable d'induire la formation d'OLT et ce, même en l'absence d'OLS, et que le développement de ces OLT s'accompagnait d'une régression tumorale *in vivo* (**Weinstein et al., 2017**). De façon similaire, une autre équipe a, via une construction utilisant la protéine LIGHT ("homologous to lymphotoxin, exhibits inducible expression and competes with HSV glycoprotein D for binding to herpesvirus entry mediator, a receptor expressed on T lymphocytes"), pu induire la formation d'OLT qui lorsque combinée à des thérapies anti-CTLA4 et anti-PD1, permettait d'induire la migration de LT et une réponse anti-tumorale efficace dans le cas de tumeurs qui se trouvaient résistantes à ces thérapies (**Johansson-Percival et al., 2017**). Outre la réponse cellulaire, il existe également des situations où les OLT contribueraient via une réponse humorale à l'élimination de la tumeur. Dans le cas du carcinome du sein, il a été décrit que les OLT contenaient des GC et le séquençage des LB extraits du tissu tumoral a confirmé la mise en place d'une maturation d'affinité locale (**Coronella et al., 2002**). Une étude s'intéressant cette fois au cancer du poumon a pu mettre en évidence une réponse humorale corrélée à la présence de GC au sein des OLT (**Germain et al., 2014**), tandis qu'une autre a corrélié les marqueurs de GC au sein de l'OLT avec la survie des patients dans le cas du cancer du sein (**Gu-Trantien et al., 2013**). Enfin, un travail récent a montré l'importance des OLT dans le cas du carcinome squameux pulmonaire. La présence d'OLT corréle avec un meilleur pronostic mais lorsque des traitements par chimiothérapie (associés ou non avec des corticostéroïdes) induisent une diminution des GC dans les OLT, cela se traduit par une diminution des pronostics favorables (**Siliņa et al., 2018**). Cette étude montre bien l'importance dans certains cancers de la présence des OLT et que la prise en compte de ces derniers semble devenir incontournable.

2. Quand la tumeur détourne les OLT à son avantage.

Toutefois, il a été rapporté certains cas où la formation d'OLT ne permet pas une élimination de la tumeur, mais au contraire permet de la protéger d'une élimination par le

système immunitaire. Une équipe a pu récemment noter que la présence d'OLT et l'expression d'ICAM1 étaient associées à des formes de tumeurs plus agressives dans le cas de cancers du sein (**Figenschau *et al.*, 2018**). Cependant il n'est pas possible dans ce contexte de déterminer si les OLT sont simplement une conséquence du caractère plus agressif de la tumeur ou si ce caractère découle de la présence d'OLT. Il existe en revanche des cas reportés d'OLT qui, au lieu d'induire une réponse anti-tumorale robuste, génèrent un environnement tolérogène qui va promouvoir la croissance et le maintien de la tumeur. Les cellules tumorales sont dans certains cas, capables d'exprimer des molécules co-inhibitrices ou de produire du TGF β , conduisant à la génération de Treg. Il ne serait donc pas surprenant que les OLT favorisant la croissance des tumeurs exercent leurs fonctions en amplifiant localement une réponse médiée par les Treg. En effet, un grand nombre de Treg au niveau de l'infiltrat entourant les cellules tumorales d'un cancer du sein, est associé à des risques accrus de rechute, voire de décès (**Gobert *et al.*, 2009**). En analysant plus précisément, Gobert et ses collaborateurs se sont rendus compte que la présence de Treg dans la tumeur n'influe pas sur l'évolution de la tumeur tandis que les Treg présents dans les OLT associés au tissu tumoral présentaient un phénotype indiquant leur activation locale en réponse aux antigènes tumoraux (**Gobert *et al.*, 2009**). Afin de détailler plus concrètement ce phénomène de protection de la tumeur, prenons l'exemple du mélanome chez la souris (**Shields *et al.*, 2010**). Dans cette étude, la tumeur sécrète la chimiokine CCL21 et induit la formation d'un compartiment stromal ressemblant à celui des ganglions. On peut ainsi y retrouver un réseau de cellules fibroblastiques ainsi que des vaisseaux lymphatiques. L'encapsulation de la tumeur dans cet environnement la protège d'une reconnaissance par le système immunitaire et permet également l'induction de Treg. Lorsque les tumeurs sont manipulées pour ne produire qu'une faible quantité de CCL21, elles peuvent alors être reconnues et éliminées par le système immunitaire. Enfin, un travail jouant directement sur l'OLT a pu montrer que dans le cas d'un adénocarcinome pulmonaire chez la souris, la délétion des Treg spécifiquement au sein des OLT était suffisante pour induire l'activation des DC, la prolifération des LT et la réponse anti-tumorale (**Joshi *et al.*, 2015**). Les OLT dans le cancer sont donc des structures fonctionnelles qui peuvent influencer sur le devenir de la tumeur en favorisant dans la majorité des cas son élimination, même s'il est parfois possible de trouver des contextes où les OLT participent indirectement à la survie des cellules tumorales.

C) Implication des organes lymphoïdes tertiaires dans le devenir des greffons.

Il existe également des cas de figure où les OLT ont majoritairement un rôle néfaste, c'est ce qui se produit lors du rejet de greffe. Le rejet d'un tissu ou d'un organe greffé peut se

produire de différentes manières. Le rejet hyper-aigu se produit dans les heures qui suivent le rétablissement de la circulation au niveau de la greffe et se traduit par un infarctus du tissu greffé. En général, il nécessite la pré-existence d'anticorps capables de reconnaître le greffon. Vient ensuite le rejet aigu, qui se manifeste quant à lui dans les jours qui suivent la transplantation et est associé à divers signes généraux suivant l'organe greffé. Enfin, le rejet chronique quant à lui, correspond à une diminution progressive des fonctions du greffon associé majoritairement à des vasculopathies au sein de l'organe greffé. Il correspond à une réponse inflammatoire qui va s'intensifier avec le temps au sein du greffon et dont le seul traitement possible est une nouvelle greffe.

1. Les OLT et le rejet du greffon, une histoire commune.

Le rejet chronique est donc un cas de choix pour la formation d'OLT du fait de l'inflammation maintenue au cours du temps. Comme dans le cas d'une tumeur, la génération d'une réponse locale facilitera la détérioration du greffon et son rejet. Différents groupes ont ainsi pu noter la présence de HEV (positivement marquées par l'anticorps MECA79) dans le cas du rejet chronique de greffons rénaux ou cardiaques (**Kirveskari *et al.*, 2000 ; Toppila *et al.*, 1999**), avec une corrélation entre l'intensité du marquage pour les HEV et la sévérité du rejet du tissu greffé. Toujours dans le cas de ces deux types de tissus greffés, récupérés après rejet, des études ont pu montrer dans un premier temps la présence de GC au sein du greffon (**Thaumat *et al.*, 2005**) mais également que les anticorps générés localement se trouvaient être différents des anticorps retrouvés en périphérie (**Thaumat *et al.*, 2010**) indiquant la génération locale d'une réponse spécifiquement dirigée contre le greffon. De la même manière, Huibers et ses collaborateurs ont pu retrouver des OLT à proximité des lésions vasculaires responsables du rejet de l'organe dans le contexte de greffes cardiaques (**Huibers *et al.*, 2015**). D'un point de vue plus fonctionnel et convainquant, chez la souris, des greffes cutanées contenant des OLT (en raison de l'expression de lymphotoxine), sont rejetées alors que les transplants ne contenant pas d'OLT sont acceptés ; de plus, ce rejet survient même en l'absence d'OLS, montrant à nouveau un rôle non négligeable des OLT dans ce processus (**Nasr *et al.*, 2007**).

2. Tolérance de greffe et OLT, un rôle insoupçonné.

Il faut mentionner qu'un certain biais existe dans ces études, puisque la plupart ont été effectuées sur des organes collectés suite à leur rejet chez l'hôte. Il a pourtant été rapporté que parfois les OLT pourraient, comme dans le cas de certaines tumeurs, favoriser un environnement tolérogène, qui dans le cas des greffons, se trouverait bénéfique. Certains ont pu noter que la présence d'iBALT dans le tissu pulmonaire de patients ayant subi une greffe du

poumon était associé à une réponse n'ayant quasiment aucune conséquence clinique, si ce n'est une très faible réponse aiguë et qu'il n'y avait aucun signe de rejet chronique (**Hasegawa et al., 1999**). Ils en ont alors conclu que la présence de ce tissu lymphoïde était au contraire le reflet d'une bonne acceptation du greffon. La réciproque se trouve également vraie puisque dans certains cas, le rejet de tissu pulmonaire greffé est associé à une diminution du tissu lymphoïde pulmonaire (**Hruban et al., 1988**). Chez la souris, l'utilisation de traitements immunosuppresseurs afin de favoriser la tolérance du greffon est associée au développement d'iBALT lorsque les greffons sont tolérés sur le long terme (**Li et al., 2012**). Il est de plus intéressant de noter que ces structures lymphoïdes sont alors enrichies en lymphocytes Treg ce qui, comme dans le cas de certains cancers, expliquerait pourquoi ces OLT favoriseraient la tolérance du greffon. Pour aller plus loin dans le mécanisme mis en cause, Brown et ses collaborateurs ont montré que dans le cas d'une transplantation rénale chez la souris, il y avait formation d'OLT contenant des LT, LB, DC et des Treg et que, plus important encore, les DC étaient capables de présenter des peptides antigéniques dérivés du donneur permettant d'induire une tolérance vis-à-vis du tissu greffé (**Brown et al., 2011**). Enfin, toujours dans un modèle de greffe rénale, la déplétion des Treg a pour effet une dissociation des OLT et mène à une forte infiltration de LT dans les reins et à un rejet aigu du greffon (**Miyajima et al., 2011**). Il semble donc que comme dans les deux contextes pathologiques abordés précédemment, les OLT jouent un rôle actif lors d'une greffe de tissu/d'organe mais que contrairement aux infections ou cancers, il n'y ait pas un rôle majoritairement bénéfique ou délétère. Ce que l'on peut en revanche conclure de façon claire c'est que peu importe le type de réponse engendrée, les OLT vont permettre d'amplifier localement cette dernière et donc favoriser le rejet ou la tolérance du greffon selon le cas considéré. Il sera donc intéressant de comprendre pourquoi et comment ces structures favorisent un scénario ou l'autre, et s'il pourrait exister une manière de favoriser la tolérance plutôt que le rejet.

D) Auto-immunité, inflammation et organes lymphoïdes tertiaires.

Le dernier contexte à aborder est celui des maladies auto-immunes et inflammatoires. Que ce soit dans le cas de maladies spécifiques d'organes (diabète de type I) ou de pathologies systémiques mais ciblant particulièrement certains organes (syndrome de Sjögren), des OLT peuvent se former. La présence de ces structures a pu être largement décrite que ce soit dans des modèles murins ou chez les patients souffrant de l'une ou l'autre de ces pathologies. Il est tout de même important de souligner que la présence des OLT est fortement variable selon la pathologie considérée, on peut les retrouver chez quasiment la totalité des patients souffrant de

thyroïdites auto-immunes tandis qu'ils sont rarement observés chez les patients atteints de myosite (**Salajegheh et al., 2010**). A noter que le cas du lupus ne sera pas abordé ici puisque discuté dans le chapitre suivant.

1. Dans quelles pathologies auto-immunes retrouve-t-on les OLT ?

Des OLT ont été retrouvés dans le cas de la PR, première pathologie auto-immune où des OLT ont pu être décrits (**Schröder et al., 1996**), depuis lors, ces observations ont pu être confirmées de nombreuses fois. Chez les patients atteints de PR, ils se forment majoritairement au niveau du tissu synovial et participent à la détérioration du cartilage et des os, mais ils sont également observables dans les poumons ou encore la moelle osseuse (**Bugatti et al., 2005 ; Rangel-Moreno et al., 2006**). Ils sont localisés principalement autour des vaisseaux sanguins et contiennent des LT et LB, et selon le nombre de ces infiltrats, un score allant de 1 à 3 pourra être établi en fonction des couches cellulaires agrégées autour du vaisseau (**Yanni et al., 1992**). Ces OLT sont retrouvés chez environ 40% des patients souffrant de PR et peuvent parfois être associés à une plus forte concentration d'anticorps anti-peptides citrullinés, de cytokines inflammatoires et à une plus forte érosion (**Xu et al., 2009**). Une autre pathologie auto-immune dans laquelle les OLT ont été étudiés est le syndrome de Sjögren. Ils sont retrouvés dans les glandes salivaires de 30 à 40% des patients et se forment majoritairement autour des canaux excréteurs formés par l'épithélium salivaire (**Barone et al., 2005**). Ils présentent une ségrégation des LT et LB, contiennent des FDC ainsi que des GC et des plasmocytes. Ils sont associés à des taux élevés d'auto-anticorps circulants caractéristiques de la pathologie et à diverses manifestations systémiques (**Risselada et al., 2013 ; Salomonsson et al., 2003**). De plus, de manière intéressante, la présence d'OLT semble être un facteur hautement prédictif de la survenue d'un lymphome et leur présence est associée à un risque 16 fois plus élevé de développer cette pathologie (**Theander et al., 2011**). En revanche, dans le cas de myosites, bien que retrouvé chez environ 20% des patients jeunes (**López De Padilla et al., 2009**), on ne les retrouve que chez une minorité de patients adultes (**Salajegheh et al., 2010**). Cependant dans le cas de cette pathologie, les OLT retrouvés ne semblent pas présenter une organisation en follicule B/GC bien que présentant des signes d'activité caractéristique du GC (**Salajegheh et al., 2010**). On peut également retrouver des OLT dans des cas de thyroïdites auto-immunes, notamment la maladie d'Hashimoto au cours de laquelle 100% des patients présentent des OLT au sein du tissu thyroïdien (**Armengol et al., 2001**). Pour terminer les exemples de maladies auto-immunes, des OLT ont été détectés également dans des cas de sclérose en plaque (**Serafini et al., 2004**), chez les patients atteints de la maladie de Takayasu à un stade sévère (**Clement et**

al., 2016) et dans le cas d'une inflammation de l'orbite lors de la maladie de Grave où l'infiltration corrèle avec l'activité de la maladie (**Rotondo Dottore et al.**, 2018). Non seulement les maladies auto-immunes, mais également certaines maladies inflammatoires présentent une formation d'OLT. On peut ainsi les observer dans le cas de l'athérosclérose où l'on pense qu'ils participent à la génération d'une réponse humorale locale (**Houtkamp et al.**, 2001), dans la colite ulcéreuse où ils vont médier le recrutement de LT naïfs via CCL21 (**Weninger et al.**, 2003), et plus récemment dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin avec des HEV permettant le recrutement des LT (**Horjus Talabur Horje et al.**, 2017) ainsi que dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose (**Regard et al.**, 2018).

2.Participation des OLT à la détérioration de l'organe/du tissu.

Une grande majorité de ces maladies sont médiées par les anticorps et les OLT contenant des GC pourraient alors promouvoir localement la génération d'auto-anticorps de forte affinité qui seront à proximité de leur cible. Les LB ou les tissus provenant de biopsies de patients présentant une PR ou un syndrome de Sjögren ont permis de mettre en évidence l'existence de mécanismes d'hypermutation somatique, indiquant que le processus de maturation d'affinité a pu se mettre en place localement (**Scheel et al.**, 2011 ; **Stott et al.**, 1998). Il est d'ailleurs intéressant de noter que les biopsies synoviales de patients présentant des OLT sont enrichies en anticorps reconnaissant des peptides citrullinés (**Rosengren et al.**, 2008). De plus, la greffe de ces OLT chez des souris humanisées aboutit à la présence d'anticorps anti peptides citrullinés dans la circulation ayant de surcroît subi le processus de commutation de classe (**Humby et al.**, 2009). De plus, les synoviocytes de patients arthritiques produisent des quantités importantes de la cytokine BAFF dont il a été montré qu'elle favorise la survie des plasmocytes générés au niveau des OLT synoviaux (**Humby et al.**, 2009). Concernant le diabète de type I, l'analyse des OLT présents dans le pancréas de souris NOD a permis de mettre en évidence une expression de l'enzyme AID et la présence de plasmocytes sécrétant des anticorps reconnaissant l'insuline, pouvant donc participer à la détérioration du tissu pancréatique (**Astorri et al.**, 2010). L'étude des OLT dans la thyroïde a pu montrer quant à elle une fixation de la thyroperoxydase et de la thyroglobuline dans les OLT ; de plus une analyse plus poussée de ces structures a montré l'existence d'une ZC et d'une ZS, de cellules en prolifération et en apoptose et l'expression d'enzymes impliquées dans le réarrangement des gènes codant pour les immunoglobulines. Il y aurait donc ici aussi, une réponse locale dirigée contre des auto-antigènes (**Armengol et al.**, 2001). En ce qui concerne le syndrome de Sjögren, la présence de l'enzyme AID a été mise en évidence spécifiquement dans les tissus salivaires présentant des OLT (**Bombardieri et al.**,

2007). Il semble d'ailleurs que les GC présents dans les OLT chez les patients atteints de ce syndrome contiennent des cellules autoréactives, indiquant peut-être une incapacité de ces structures à les exclure (**Le Pottier et al., 2009**). De plus, l'utilisation d'une protéine de fusion (fusion du récepteur LT β R avec une immunoglobuline) permettant de bloquer la lymphotoxine est capable de supprimer les OLT au niveau des glandes lacrymales, conduisant à une amélioration du flux lacrymal (**Fava et al., 2011**). Enfin, la formation d'OLT chez une souris saine est suffisante pour induire un dysfonctionnement de l'organe, tel que cela a été décrit par l'induction d'OLT dans les glandes salivaires et leur impact sur le flux salivaire (**Bombardieri et al., 2012**). Dans le cas de la sclérose en plaques, la suppression des OLT chez un modèle murin réduit les symptômes de la maladie (**Columba-Cabezas et al., 2006**). Enfin, un résultat fort intéressant vient de l'étude de patients présentant une mucoviscidose. Ces derniers sont souvent traités avec du rituximab, cependant certains LB ne sont pas déplétés par le traitement et se trouvent tous être localisés dans les OLT pulmonaires (**Regard et al., 2018**). Il apparaît donc important de tenir compte de la présence possible d'OLT lors de thérapies de ce type, puisqu'ils semblent pouvoir servir de niche et permettre à des cellules de survivre au traitement.

Pour conclure, les OLT sont observés dans de nombreuses situations pathologiques incluant infections, cancer, greffe ou maladies auto-immunes. Ils sont capables d'exercer de nombreux rôles suivant la pathologie et la localisation concernée mais vont, dans tous les cas, permettre une amplification de la réponse locale, que cette dernière soit bénéfique ou délétère pour l'hôte.

V-Lupus, organes lymphoïdes tertiaires et objectifs de l'étude.

Le lupus, précédemment décrit dans cette introduction est une maladie auto-immune systémique affectant de nombreux organes. L'une des atteintes emblématiques de cette maladie est la néphrite lupique dont la physiopathologie a été depuis longtemps étudiée.

On sait aujourd'hui que la glomérulonéphrite lupique est causée par le dépôt d'auto-anticorps ou de complexes immuns, et l'infiltration de cellules immunitaires. L'infiltrat de leucocytes n'est cependant pas exclusif au compartiment glomérulaire ; il existe également au niveau de la zone tubulo-interstitielle et représente le principal critère afin d'évaluer l'inflammation de ce compartiment. De nombreux travaux ont porté sur le blocage de cette infiltration cellulaire afin de tenter de prévenir la néphrite lupique ou de la traiter (**Anders et al., 2006 ; Liao et al., 2016 ; Teramoto et al., 2008 ; Vielhauer et al., 2002 ; Zoja et al., 1997**). Dans ce cadre, l'utilisation de composés capables de bloquer des chimiokines impliquées dans le recrutement des cellules immunitaires (ou leur récepteur) a été envisagée et démontre

une efficacité dans le cadre de la pathologie rénale lupique (**Bignon *et al.*, 2014 ; Devarapu *et al.*, 2016**).

L'inflammation se produisant au niveau du rein au cours du lupus étant chronique, on peut envisager que les infiltrats immunitaires retrouvés dans les reins s'organisent en OLT comme c'est le cas dans d'autres pathologies auto-immunes systémiques telles que le syndrome de Sjögren ou la PR (**Bombardieri *et al.*, 2007 ; Humby *et al.*, 2009**). De plus, la génération de GC et/ou de plasmocytes directement au niveau du rein pourrait faciliter le dépôt d'auto-anticorps pathogènes dans les glomérules et activement participer au développement de la néphrite lupique. La présence d'OLT dans le cadre du lupus a été décrite chez un modèle murin induit par l'injection intrapéritonéale de pristane (**Nacionales *et al.*, 2009**). Il se forme dans le péritoine de ces animaux, des granulomes adoptant une morphologie d'OLT et présentant une expression de l'enzyme AID et des signes de commutation de classe. Les anticorps ainsi générés localement sont capables de lier des auto-antigènes tels que les RNP, suggérant un rôle actif de ces OLT dans la pathologie. Cependant, cette étude a été réalisée sur un modèle induit de lupus et ne s'est intéressée qu'au péritoine des souris. Au niveau du rein, des travaux réalisés chez l'Homme ont permis de montrer la présence d'OLT d'une part, et de TFH en interaction avec des LB d'autre part (**Chang *et al.*, 2011 ; Liarski *et al.*, 2014**). La première étude a montré que des agrégats de LT et LB étaient présents chez la moitié des patients atteints de néphrite lupique mais que seule une faible proportion (6% des patients) présentait des OLT hautement organisés (**Chang *et al.*, 2011**). En revanche, ces structures étaient retrouvées chez les patients présentant une atteinte rénale plus sévère, et chacune d'entre elles présentait des signes de commutation de classe et d'hypermutation somatique, indiquant la présence de GC fonctionnels. Le travail plus récent de Liarski et ses collaborateurs a pu mettre en évidence par des techniques avancées d'imagerie, des TFH à proximité de LB dans le tissu rénal de patients lupiques, suggérant une interaction locale entre ces cellules potentiellement révélatrice de la présence d'un GC (**Liarski *et al.*, 2014**). De plus, des OLT ont été observés chez les patients atteints de néphrite à IgA (**Pei *et al.*, 2014**). Toutes ces études indiquent donc l'implication potentielle du processus de néogenèse lymphoïde dans le développement de la néphrite lupique.

Au sein de notre laboratoire (**Lacotte *et al.*, 2010**), il a été montré pour la première fois, que des plasmocytes sécrétant des auto-anticorps sont présents dans les reins des souris NZB/W, un modèle spontané de lupus. Ce résultat a été confirmé par Espeli et ses collaborateurs (**Espeli *et al.*, 2011**). La localisation rénale de ces cellules peut s'expliquer par leur migration dans le tissu enflammé ou par leur différenciation au sein d'OLT. La première hypothèse a tout d'abord été envisagée et nous avons pu montrer que la présence de certains de ces plasmocytes pouvait

être due à l'expression du récepteur CXCR3 à leur surface et à l'expression rénale des trois ligands correspondants, CXCL9, 10 et 11 (Lacotte *et al.*, 2013). Toutefois, la première hypothèse n'était pas exclusive de la seconde, très alléchante. C'est pourquoi nous avons entrepris de déterminer si des OLT étaient présents dans les reins des souris lupiques NZB/W et d'en réaliser une analyse phénotypique et fonctionnelle poussée.

Dans ce contexte, les objectifs de mon travail de thèse ont été les suivants :

- 1) Poursuivre la caractérisation des OLT rénaux chez les souris lupiques NZB/W (travail initié en collaboration avec Carole LE COZ précédemment en thèse au laboratoire) (Chapitres 1 et 3)**
- 2) Comprendre les mécanismes responsables de la formation de ces OLT afin de concevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant ces structures (Chapitres 2 et 3).**

Résultats

Chapitre 1 : Mise en évidence de la présence d'OLT fonctionnels dans les reins de souris lupiques NZB/W

L-Avant-propos.

Le lupus est une maladie auto-immune systémique affectant de nombreux organes et se caractérisant notamment par la production d'auto-anticorps réagissant contre des composants nucléaires tels que l'ADNdb, les RNP ou encore la chromatine. Parmi les différentes atteintes observables au cours de cette maladie, la néphrite lupique représente l'atteinte la plus grave car pouvant mener à la nécessité d'une greffe rénale voire au décès des patients en cas d'échec thérapeutique. Elle se caractérise par une atteinte des compartiments glomérulaires et tubulo-interstitiels au sein desquels il est possible d'observer à la fois un dépôt d'auto-anticorps/de complexes immuns et une infiltration leucocytaire.

Les auto-anticorps générés lors de la maladie lupique sont le fruit de diverses prédispositions génétiques et facteurs environnementaux intervenant au niveau de la clairance des corps apoptotiques, de la reconnaissance des acides nucléiques par l'immunité innée et de l'activation du système immunitaire adaptatif. La combinaison de ces défauts va engendrer des déficiences de tolérance centrale ainsi que périphérique et permettra non seulement la génération de lymphocytes autoréactifs mais également leur accès aux GC, menant à la production d'auto-anticorps pathogènes de forte affinité.

Dans le cas de certaines maladies auto-immunes systémiques (PR, syndrome de Sjögren...) ainsi que spécifiques d'organes (diabète de type I, thyroïdite d'Hashimoto...), il est possible d'observer la formation d'infiltrats immunitaires contenant des GC et localisés au sein même des organes cibles de la pathologie considérée. On parle alors d'OLT du fait de la forte ressemblance avec les OLS mais du caractère ectopique de ces structures. Elles ont d'ores et déjà été décrites comme capables de participer à la génération locale d'auto-anticorps et à la mise en place de réponses délétères pour l'organe/le tissu considéré comme par exemple dans le cadre de la PR (**Humby *et al.*, 2009**).

Concernant le lupus, notre équipe a mis en évidence la présence de plasmocytes sécrétant des auto-anticorps dans les reins d'un modèle murin spontané de lupus : la souris NZB/W (**Lacotte *et al.*, 2010**). La présence de ces cellules pouvait alors s'expliquer par leur migration au sein des reins enflammés ou leur génération locale au sein d'OLT. Certains plasmocytes expriment effectivement le récepteur CXCR3, ce qui leur permet de migrer dans les reins en réponse aux chimiokines inflammatoires CXCL9, CXCL10 et CXCL11 (**Lacotte *et al.*, 2013**). Cependant, une partie des plasmocytes n'exprime pas le dit récepteur, nous amenant

ainsi à considérer l'hypothèse d'une génération locale. Le but de la présente étude a donc été de déterminer si des OLT étaient présents dans les reins de souris NZB/W malades et si ces structures étaient fonctionnelles.

II-Publication N°1.

Characterization of inflammatory infiltrates in lupus nephritic kidneys reveals functional stroma- and germinal center-containing tertiary lymphoid structures.

Carole Le Coz[§], Romain Veber[§], Sophia Lecomte, Marion Studer, Jean-Daniel Fauny, Fanny Monneaux, Hélène Dumortier*

[§] CLC and RV contributed equally to this work.

CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, UPR3572 Immunologie, Immunopathologie et Chimie Thérapeutique, Strasbourg, France.

Characterization of inflammatory infiltrates in lupus nephritic kidneys reveals functional stroma- and germinal center-containing tertiary lymphoid structures.

Carole Le Coz[§], Romain Veber[§], Sophia Lecomte, Marion Studer, Jean-Daniel Fauny, Fanny Monneaux, H el ene Dumortier*

[§] CLC and RV contributed equally to this work.

CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, UPR3572 Immunologie, Immunopathologie et Chimie Thérapeutique, Strasbourg, France.

Correspondence:

Dr H el ene Dumortier

h.dumortier@ibmc-cnrs.unistra.fr

Keywords: Systemic lupus erythematosus, kidneys, tertiary lymphoid structures, germinal centers, stroma

INTRODUCTION

Kidney failure may be induced by immune disorders, including systemic autoimmune diseases (Kurts *et al.*, 2013). Systemic lupus erythematosus (SLE) is one of these diseases in which the immune system initiates and maintains renal injury mainly through an antibody-mediated mechanism. Indeed, production of high-affinity class-switched (mainly anti-nuclear) autoantibodies is a hallmark of SLE (Detanico *et al.*, 2013; Muller *et al.*, 2008). Autoantibodies have been shown to deposit in the kidneys either through recognition of their cognate autoantigen (such as apoptotic chromatin fragments present in the glomeruli; Kalaaji *et al.*, 2007) or through cross-recognition of constitutive glomerular components (e.g. α -actinin or annexin II recognized by anti-DNA autoantibodies (Deocharan *et al.*, 2002; Yung *et al.*, 2010). It has also been proposed that already formed circulating immune complexes bind to components of the glomerular basement membrane (Licht *et al.*, 2001). Recently, we and others have described a complementary pathway based on the local production of autoantibodies by autoreactive plasma cells present in the kidneys of lupus mice (Lacotte *et al.*, 2010; Starke *et al.*, 2011). We have proposed that these plasma cells originate from secondary lymphoid organs and may have migrated toward inflamed kidneys through a CXCR3-mediated mechanism (Lacotte *et al.*, 2013). However, another exciting non-exclusive possibility would be that they have been generated locally within productive ectopic lymphoid infiltrates called tertiary lymphoid structures (TLS).

TLS originate from what is called "lymphoid neogenesis". They are defined as organized aggregates of lymphoid cells in non-lymphoid tissues and histologically resemble the follicular compartments of secondary lymphoid organs. Fundamental characteristics of such structures include compartmentalized B and T cell areas, presence of follicular dendritic (FDC) networks and formation of high endothelial venules (HEV) (Carragher *et al.*, 2008; Pitzalis *et al.*, 2014). They have been observed in chronic inflammatory situations of autoimmune, infectious, cancer and transplant rejection origin. During infection, they participate to anti-pathogen protective immunity and are preferentially localized at permissive mucosal sites such as in the lungs where iBALT (inducible Bronchus Associated Lymphoid Tissue) form upon Influenza virus or Mycobacterium Tuberculosis infection (Moyron-Quinoz *et al.*, 2004; GeurtsvanKessel *et al.*, 2009; Ulrichs *et al.*, 2004 Khader *et al.*, 2009; Slight *et al.*, 2013). Their contribution to cancer diseases has been shown to vary considerably but they have been described in many tumors such as colon and breast cancers, where tumor-associated TLS contribute to anti-tumor immune responses and their presence correlates with a better prognosis (Coppola *et al.*, 2011; Gu-Trantien *et al.*, 2013; Siliņa *et al.*, 2018; Weinstein *et al.*, 2017; Dieu-

Nosjean *et al.*, 2016). Although in those conditions, TLS mainly exert protective functions, their role in transplantation and autoimmunity is most often considered harmful. Indeed, excessive immune responses that occur in TLS participate to allograft rejection and such structures have been evidenced in almost all types of rejected human grafts among which kidneys (Thaumat *et al.*, 2010). In autoimmunity, it has been suggested that patients who harbor TLS in inflamed tissues poorly respond to standard therapy, due to the role that TLS play in the amplification and perpetuation of inflammatory and autoimmune mechanisms (Pipi *et al.*, 2018; Cañete *et al.*, 2009). TLS have been described in several target tissues depending on the considered disease, e.g, the pancreas in diabetes (Astorri *et al.*, 2010), the synovial tissue in rheumatoid arthritis (Humby *et al.*, 2009), or the salivary glands in Sjögren's Syndrome (Bombardieri *et al.*, 2007). The existence of TLS in SLE has been rather scarcely studied. Reeves's group has developed a mouse model, which develops peritoneal lipogranulomas (corresponding to TLS) and some lupus-like symptoms upon pristane injection (Nacionales *et al.*, 2006). Although artificially induced, these TLS are morphologically similar to secondary lymphoid tissues and display characteristics of germinal center reactions (e.g. cell proliferation, activation-induced deaminase (AID) expression, class-switch and local B cell affinity maturation) (Nacionales *et al.*, 2009). Their capacity to serve as reservoir of autoreactive plasma cells has also been suggested (Weinstein *et al.*, 2013). In humans, Clark and collaborators have described three patterns of tubulointerstitial infiltrates in the kidneys of SLE patients with tubulointerstitial inflammation, going from diffuse scattered lymphocytic infiltration, through T/B aggregates, to germinal centers (characterized by the spatial cellular organisation and FDC) (Chang *et al.*, 2011). The same group further developed confocal microscopy-associated computational tools that allowed to perform accurate cell distance mapping and to demonstrate that functional follicular helper T cells (T_{FH}) can engage in cognate interactions with B cells in inflamed human renal tissue (among which patients with lupus nephritis) (Liarski *et al.*, 2014). Recently, mesenchymal stem cells and BAFF have been proposed as two elements being involved in TLS formation in a spontaneous and in an autoantibody-induced nephritis model respectively (Dorrajji *et al.*, 2018; Kang *et al.*, 2017).

Although, based on these studies, the existence of TLS in inflamed lupus kidneys is classically admitted, till now no thorough characterization was provided. Here, we unambiguously demonstrate that leukocytes infiltrate kidneys along with disease progression and that these infiltrates become fully organized lymphoid organs containing all the stromal and immune partners that allow them to generate productive (auto)immune responses.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Female BALB/c and (NZBxNZW)F1 mice (referred as NZB/W) were purchased from Harlan (Gannat, France) and maintained in our animal facilities (approved by French Veterinary Services, #G67-482-2). Proteinuria was evaluated in fresh urine using a colorimetric assay for albumin (Albustix, Bayer Diagnostics, Basingstoke, U.K.). All experiments were carried out in conformity with the 2010/63/UE European animal bioethics legislation (French decree #2013-118 - 1st February 2013) and were approved by the Regional Ethics Committee of Strasbourg (CREMEAS) and by the French Ministry of Higher Education and Research.

Leukocyte isolation from kidneys, spleen and lymph nodes

Previously described methods for leukocyte isolation from murine kidneys were used (Ascon *et al.*, 2008). In brief, kidneys were finely cut and digested for 30min at 37°C with 0.5mg/mL collagenase D (Roche, Mannheim, Germany) and 0.05 mg/mL DNase I (Roche) in complete RPMI 1640 medium supplemented with 10% (v/v) FCS (Dutscher, Brumath, France), 10µg/mL gentamycin (Lonza, Basel, Switzerland), 10mM HEPES (Lonza), and 0.05mM β-mercaptoethanol (Life Technologies, Carlsbad, USA). Tissue homogenates were sequentially filtered through 100-, 70- and 40-µm nylon meshes and washed with complete RPMI medium. Leucocytes were then isolated using a 72/36% discontinuous Percoll gradient (Sigma-Aldrich, St-Louis, USA) and centrifugation (30min, 400g). The leukocyte-enriched cell suspension was harvested from the Percoll interface; in some experiments, leucocytes were further purified using a mouse CD45 MicroBeads Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). In the case of spleen and lymph nodes, cell suspensions were obtained using standard procedures and erythrocytes were lysed using a hypotonic ammonium chloride solution. Cell viability was assessed by Trypan blue staining (Lonza) before flow cytometry analysis was performed.

Flow cytometry

Cells isolated from various tissues (spleen, lymph nodes and kidneys) were surface-stained with fluorescently-labeled monoclonal antibodies as summarized in Table 1. Regarding BCL6, STAT3, Ki67 and Foxp3 intracellular staining, cells were fixed and successively permeabilized with BD Cytofix/Cytoperm™ and BD Cytoperm Permeabilization Buffer Plus™ according to recommended instructions (BD Biosciences, San Jose, USA). All cells were incubated first with rat anti-mouse CD16/CD32 monoclonal antibody (2.4G2, BD Biosciences) to block Fcγ receptors. Data were collected using a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter, Fullerton,

USA) and were analyzed using the FlowJo software (Tree Star, Ashland, USA). Scatter gates were set to include the viable lymphocyte population and 100,000-1,000,000 events were collected for each sample.

B cell isolation from kidneys, plasma cell differentiation and auto-antibody secretion

Total leucocytes were isolated from kidneys as described above. Cells were labelled with anti-CD45 and anti-CD19 antibodies prior to cell sorting (FACS Aria Fusion, BD Biosciences). Isolated B cells were cultured for 3 days with RPMI medium or with RPMI containing anti-CD40 (clone HM40-3, 1µg/mL) and recombinant mouse IL21 (10ng/mL). Cells were then stained and analyzed by flow cytometry to assess plasma cell differentiation, and culture supernatants were tested by ELISA for anti-chromatin IgG as previously described (Lacotte *et al.*, 2010).

Fluorescence microscopy and quantification of kidney infiltrates

Kidneys were frozen in Tissue-Tek® O.C.T™ Compound (Sakura, Alphen aan den Rijn, Netherlands) and 7µm-sections were prepared. They were then mounted on SuperFrost™ Plus glass slides (Thermo Scientific, Waltham, USA), fixed in cold acetone for 20 min, air dried, and washed in Tris Buffered Saline (TBS). Endogenous biotins were neutralized using an "Endogenous Biotin-Blocking Kit" according to recommended instructions (Life Technologies) and non-specific antibody binding was avoided using Blocking Reagent™ (Perkin Elmer, Waltham, USA). Sections were then incubated overnight with specific antibodies at 4°C, and when necessary, with secondary detection antibodies for 2h at room temperature (see Table 1). After fixation with paraformaldehyde 4% (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA) for 20 min, slides were then stained with DAPI (100ng/ml, Sigma) for 10 min at room temperature and mounted with fluorescent mounting medium (DAKO, Glostrup, Denmark). All stainings were performed according to standard procedures except for the anti-CD35 staining for which an amplification method was used ("TSA kit", Tyramide Signal Amplification Fluorescent System, Perkin Elmer). Mosaic images were acquired with a 20x objective on a Zeiss LSM 780 Axio Observer confocal microscope driven by the ZEN software. All quantitative analyses were performed on at least 3 sections and 10 infiltrates. Stitching of images and quantification of infiltrate area was performed using the ImageJ software and the Stitching plugin (Preibisch *et al.*, 2009).

Immunohistochemistry

Acetone-fixed frozen sections were treated with blocking solution (BLOXALL Endogenous Peroxidase and Alkaline Phosphatase Blocking Solution, Vector laboratories, Burlingame, USA) to neutralize endogen phosphatases, and were further processed as described above for fluorescence microscopy except that alkaline phosphatase-coupled antibodies were used. Detection was performed using ImmPACT Vector Red Alkaline Phosphatase (AP) Substrate (Vector) and counterstained with Methyl green (Vector) before mounting the slides with a hydrophobic mounting medium (Eukitt®, Sigma-Aldrich).

RNA isolation and reverse transcription

Total RNA was prepared from frozen-crushed kidney powder using RLT Reagent (Qiagen, Germantown, MD) and purified using RNeasyH Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized by extension of oligo(dT) with ImProm-IITM reverse transcriptase (Promega, Fitchburg, WI).

qPCR

The relative amount of each transcript was normalized against the mean expression of two housekeeping genes, namely glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and β -actin. Primer sequences (forward/reverse) for β -actin, GAPDH, CCL19, and CXCL13 were designed with the Primer-BLAST software: forward 5'-CACTGTCGAGTCGCGTCCA-3' and reverse 5'-CATCCATGGCGAACTGGTGG-3' for actin; forward 5'-CCCTTAAGAGGGATGCTGCC-3' and reverse 5'-TACGGCCAAATCCGTTTACACA-3' for GAPDH; forward 5'-CTGCCTCAGATTATCTGCCAT-3' and reverse 5'-TCATTAGCACCCCCCAGAGT-3' for CCL19; forward 5'-GTATTCTGGAAGCCATTACAC-3' and reverse 5'-CATTTGGCACGAGGATTCACAC-3' for CXCL13. All amplification reactions were performed in a total volume of 25 μ l using a StepOnePlus™ thermocycler (Applied Biosystems, Carlsbad, California) with RT² SYBR Green ROX qPCR Mastermix (Qiagen). Data were analyzed using the software tool REST and the $\Delta\Delta$ CT method was used to calculate fold changes.

Statistical analysis

Data are shown as mean \pm SEM. Statistical significance was assessed using a Mann-Whitney U test (Prism version 5.0; GraphPad Software). Statistical significance is indicated as follows in the figures: *** p <0.001; ** p <0.005; * p < 0.05; and ns, not significant (p >0.05).

RESULTS

Numerous leukocyte infiltrates develop in the kidneys of NZB/W mice along with age and disease progression.

Frozen kidney sections from NZB/W mice of various ages were stained for CD45.2 in order to visualize leukocyte infiltrates and to determine their location, number and size by confocal microscopy. As shown in Figure 1A, some leukocyte infiltrates are present in NZB/W kidneys and harbor a tubulointerstitial localization (green, Figure 1A and 1B), as evidenced by the tissue architecture as well as C3 staining of immune complex deposits in glomeruli (Figure 1B). These infiltrates are organized around the interlobar and arcuate arteries and veins. In sections that cross the kidney hilum, central infiltrates are also visible, surrounding the papilla. In contrast, no CD45.2⁺ infiltrates (or one per section maximum) are present in the kidneys of healthy control BALB/c mice, whatever their age (Figure 1A). Average numbers of cortical infiltrates per tissue section statistically increase as the NZB/W mice get older and develop the lupus disease. The mean number of infiltrates were < 1 in mice younger than 20 weeks vs n = 2.5 in 24-27 week-old mice vs n = 7.5 in 30 or more week-old mice (Figure 1C). Not only the number but also the size of the infiltrates increases with age and disease progression as shown by the representative picture of one infiltrate per age group (Figure 1D). Together, the observed increased number and individual size leads to a larger kidney section surface occupied by leukocyte infiltrates in diseased compared to young NZB/W mice (Figure 1E).

Leukocyte composition and organization of kidney infiltrates.

In order to define which immune cell subsets are present within the infiltrates, leukocytes were isolated from kidneys and analyzed by FACS. Figure 2A shows that their distribution resembles, both qualitatively and quantitatively, what is observed in lymph nodes, with a majority of T cells (around 60%, mainly CD4⁺ T cells) and approximately 15% of B lymphocytes and 25% of cells from the myeloid lineage (CD11b⁺). According to confocal microscopy images, the latter seem to be randomly dispersed within the infiltrate, contrarily to B220⁺ B and CD4⁺ T lymphocytes, which are localized in specific areas (Figure 2B and 2C). As in secondary lymphoid organs, T and B cells segregate and the percentage of infiltrates harboring T/B segregation gets higher with age and disease development (60% in diseased ≥30week-old vs 20% in 24-27 week-old vs 0% in NZB/W mice younger than 20 weeks), indicating progression in the organization degree of the infiltrates (Figure 2C).

Kidney infiltrates contain a functional stromal compartment.

Next to leukocytes, the architecture and function of secondary lymphoid organs rely on the presence of fibroblastic and endothelial stromal cells. We analyzed the NZB/W kidney infiltrates for the presence of the main stromal cell subsets, i.e. follicular dendritic cells (FDC), follicular reticular cells (FRC), and blood and lymphatic endothelial cells (BEC and LEC). Islets of CD35⁺ FDC were detected in the infiltrates from lupus mice from the age of 25 weeks on average and the number of FDC-containing infiltrates (at least one islet present) increases with age and disease progression (Figure 3A). Other members of the stromal compartment were detected thanks to immunoenzymatic and immunofluorescence stainings performed on kidney sections from diseased NZB/W mice (≥ 30 wk-old and proteinuria-positive). Podoplanin staining highlights a very-well defined network of FRC as well as lymphatic vessel-forming lymphatic cells. The latter also stain for Lyve1 (Figure 3B and 3E). Very interestingly, tubulointerstitial infiltrates organize around a CD31⁺ blood vessel (Figure 3D), whereas high endothelial venules (CD31⁺PNAd⁺) are observed almost exclusively in the central infiltrate (Figure 3C). These specialized venules most often localize at the border of the infiltrate (Figure 3B and 3C) and likely allow the extravasation and entry of naïve lymphocytes similarly to lymph nodes HEV. In summary, a complete stromal compartment is detected in the inflamed kidney infiltrates, which are thus structured, irrigated, and likely involved in immune reactions through the recruitment of immune cells (vessels) and GC reactions (FDC). Stromal cells are indeed deeply involved in the organization of lymphoid organs through the secretion of homeostatic chemokines that attract and position immune cells. As such, the three key chemokines CCL19 and CXCL13 are produced by FRC and FDC and allow CCR7⁺ T cell and CXCR5⁺ follicular B (and T) migration and positioning, respectively. We could detect increased levels of both transcripts in the kidneys of diseased compared to young non diseased NZB/W mice (mean fold change CCL19 = 106.4 vs 17.5, mean fold change CXCL13 = 57.8 vs 3.6, when compared to control BALB/c mice, Figure 4A). CCL19 and CXCL13 production was confirmed within the infiltrates thanks to immunoenzymatic and immunofluorescence stainings on kidney sections (Figure 4B and 4C). CCL21, a chemokine produced by LEC and attracting CCR7⁺ cells, is also detected although no expression variation was evidenced by qPCR (data not shown). Confocal microscopy and co-localization even allowed to evidence CCL19-producing podoplanin⁺ FRC CXCL13-producing CD35⁺ FDC, and CCL21-producing Lyve1⁺ LEC in the infiltrates (Figure 4C). This unambiguously demonstrates the functional capacity of

the stromal compartment and strongly suggests its involvement in the recruitment of lymphocytes and in the structural organization of the renal immune infiltrates during lupus.

Evidence of germinal center B cells.

Undoubtedly, one parameter reflecting the activity of a lymphoid organ is the presence of germinal centers. GL7 is a classical marker of GC B cells and GL7⁺ cells are detected in defined areas of both tubulointerstitial and central kidney infiltrates; they are surrounded by naïve IgD⁺ B cells (similar to the secondary lymphoid organ architectural organization). The average number of infiltrates containing GL7⁺ cells increase with age and disease progression (0 / 13 / 29 per section in kidneys of < 20 / 24-27 / ≥ 30 week-old mice respectively) (Figure 5A). This result was confirmed by flow cytometry. Indeed, part of the diseased NZB/W kidney-derived B cells (6-7% of isolated leukocytes, on average) could be labeled with peanut agglutinin (PNA, known to specifically stain GC B cells) or were GL7⁺CD95⁺ (the classical GC B cell phenotype). This percentage is similar to what is observed in the spleen of the same animals but is approximately two-fold lower than in the lymph nodes where GC activity is stronger (Figure 5B). Complementary evidence of the presence of GC B cells was nicely brought by the observation of the master GC transcription factor "B cell lymphoma 6" (BCL6) expression in some B220⁺ B cells that constitute the kidney infiltrates (Figure 5C). Moreover, activated B cells proliferate, especially in the GC dark zone. Analysis of B cell proliferation using the Ki67 nuclear proliferation marker, both in situ and by FACS, indicates that B220⁺ cells actively proliferate within renal inflammatory infiltrates in diseased lupus mice (Figure 5D and 5E, mean % of Ki67⁺ cells = 4.1 vs 6.2 in NZB/W kidneys vs spleen respectively, vs 1.8 in spleen from healthy BALB/c control mice). Final demonstration of active GC relies on the expression of the AID enzyme. AID is expressed in B cells undergoing class switch recombination (CSR) and somatic hypermutation (SHM), two processes that depend on cognate interactions with T_{FH} cells within GC. Figure 5F shows that AID transcripts are highly expressed in nephritic NZB/W kidneys, indicating that the mechanisms that are essential to generate high-affinity antibodies and memory B cell responses can occur in ectopic germinal centers in lupus kidneys.

Kidney T cells are mostly activated and contain T_{FH} and T_{FR}

T cells represent approximately 60% of the leukocytes infiltrating nephritic lupus kidneys, among which two thirds are CD4⁺ T cells (Figure 2A). We analyzed further their phenotype and observed that, as in secondary lymphoid organs such as spleen, both naïve CD62L⁺CD44^{low} (10-20%) and effector/memory CD62L⁻CD44^{high} (70-80%) T cells are present (Figure 6A).

Having highlighted some GC B cells (see above), we wondered whether their main GC partner, i.e. T_{FH} cells, could also be detected. As shown in Figure 6B, CXCR5⁺ PD1^{high} T_{FH} cells are indeed identified among CD4⁺ T cells in the kidneys of diseased NZB/W mice, in similar proportion to what is observed in the spleen and lymph nodes of cognate animals. These cells are also visualized as BCL6⁺CD4⁺ cells in infiltrates on kidney sections (Figure 6D). Finally, we performed a detailed FACS analysis of the CXCR5⁺ PD1^{high}CD4⁺ T cell population (as compared to CXCR5⁻PD1^{low}CD4⁺T cells) and we could show that in addition to CXCR5 and PD1, they also specifically express all other classical T_{FH} markers, i.e. the BCL6 and STAT3 transcription factors, the IL-21 receptor, as well as the co-stimulatory/co-inhibitory molecules ICOS and BTLA (Figure 6C). Altogether, the observed phenotype unambiguously corresponds to T_{FH} cells. Their capacity to produce cytokines was also analyzed (Figure 6E). Quite surprisingly, only about 5% of these cells produce the characteristic T_{FH} cytokine, i.e. IL-21, but half of them produce the pro-inflammatory cytokine IFN γ . A small percentage of these cells are IL-17 producers. This IFN γ -oriented profile is similar to what is observed in the spleen and also among non-T_{FH} cells in both kidneys and spleen of diseased mice (data not shown). Moreover, very interestingly, we demonstrate that some of the kidney T_{FH} cells express the Foxp3 transcription factor (Figure 6F, one fourth of the CXCR5⁺CD4⁺ T cells), which strongly suggests that T_{FR} cells may allow to control the GC reaction in lymphoid ectopic structures as they do in secondary lymphoid organs.

Autoreactive B cells are present in kidney infiltrates and can differentiate in autoantibody-secreting cells.

Lupus is usually considered as an autoantibody-mediated disease. We previously demonstrated the presence of IgG-producing plasma cells in the kidneys of diseased NZB/W mice, some of them secreting autoantibodies (2REF). Here we extend these data by FACS, showing that approximately 2% (1.5, +/- 0.2) of the leukocytes present in the kidneys of diseased NZB/W mice are CD138⁺B220^{low} plasma cells (vs 4.7, +/- 0.5 in the spleen) (Figure 7A). Moreover, CD138⁺ cells localize within the leukocyte infiltrates, and more precisely close to GL7-labeled areas, suggesting that they may have arisen from ectopic germinal centers (Figure 7B). Finally, we sorted CD19⁺ B cells from the perfused kidneys of diseased animals and stimulated them with CD40 and IL-21 in order to induce their differentiation into plasma cells. Figure 7C shows that anti-CD40/IL-21-activated B cells differentiate in CD138⁺B220^{low} cells *in vitro* and more importantly, they seem to produce anti-chromatin IgG, which demonstrates that some

autoreactive B cells are present in the kidney lymphoid infiltrates and are able to differentiate in autoantibody-secreting cells upon T_(FH)-derived signals.

CONCLUSION – PRELIMINARY DISCUSSION

Although some elements were strongly suggesting their existence (Nacionales *et al.*, 2009; Liarski *et al.*, 2014), the development of fully functional TLS has not been previously thoroughly described in lupus. In the present study, we demonstrate that, as they develop in the kidneys of lupus-prone NZB/W mice, inflammatory infiltrates progressively acquire all required features to make them fully organized TLS that we can even call tertiary lymphoid organs (TLO).

The first main TLO feature consists in the segregation between B and T cells in distinct zones, which is linked, as in lymph nodes, to the production of homeostatic chemokines. Indeed, we show that CCL19, CCL21 and CXCL13 are produced within the infiltrates. In particular, CCL19 is detected in the areas where T cells are present (data not shown). In lymph nodes, these chemokines are produced by the stromal compartment and, interestingly, we were able to evidence the three main lymph node-associated stromal subsets in the kidney infiltrates, i.e. FRC, LEC and BEC. These cells are not only structural organizers, they also intimately participate to immune responses as they facilitate cell entry and antigen delivery into the lymphoid structure thanks to the formation of a conduit network (FRC) and of lymphatic and blood vessels (Malhotra *et al.*, 2013). We could observe all of these structures in the renal TLO in diseased NZB/W mice. Importantly, confocal images allowed us to identify FRC-associated CCL19 and LEC-associated CCL21, highlighting the functional capacity of the stromal compartment in TLO. Moreover, we were able to detect some specialized venules allowing naïve lymphocyte entry, called HEV, which is another TLO characteristics, and which correlates with the naïve CD62L⁺ T cells and IgD⁺ B cells we evidenced within the infiltrates. Intriguingly, HEV were present in the central medullary infiltrate but almost absent from the cortical tubulointerstitial ones, suggesting that mechanisms of TLO neogenesis are different. Another key stromal element of TLO identity consists in the presence of FDC. These cells retain immune complexes at their surface and present intact antigens for extended periods to B cells, as such they are crucial for the GC response and the development of high affinity antibody responses. As we show here in TLO, they also produce the homeostatic chemokine CXCL13 that attracts B cells. It has been suggested that lymph node FDC networks arise from the clonal expansion and differentiation of marginal reticular cells (MRC), a population of lymphoid stromal cells lining the lymph node subcapsular sinus (Jarjour *et al.*, 2014). However, contrary to lymph nodes, TLO are non-encapsulated and up to now, no MRC have been identified in ectopic lymphoid structures. PDGFRβ⁺ perivascular precursors have also been proposed as the cellular origin of lymph node FDC (Krautler *et al.*, 2012). It would therefore be of particular

interest to understand what is the source of FDC and of other stromal cells that form TLO. Adipose tissue-derived cells might be a hypothesis to explore (Gil-Ortega *et al.*, 2013). The presence of FDC networks in TLO in lupus kidneys strongly suggests that GC responses develop locally. Indeed, we identified GC B cells accompanied with active B cell proliferation. The AID enzyme is also clearly expressed in the kidneys of diseased NZB/W animals, which indicates that affinity maturation mechanisms take place. Somatic hypermutation and class-switch recombination are the sign of ongoing GC reactions, they have been described in TLO-like lipogranulomas induced by pristane (Nacionales *et al.*, 2009) and in other pathological situations where TLO develop within inflamed tissues such as salivary glands from Sjögren's syndrome patients (Le Pottier *et al.*, 2009). Very interestingly and in accordance with these B cell-related elements, we also proved that leukocyte infiltrates contain T_{FH} cells, the third partner of the light zone GC reaction that is mandatory for B cell selection. Thanks to cell distance mapping, Liarski *et al.* (2014) previously highlighted direct interactions between B and T_{FH} cells in inflamed human tissues among which kidney biopsies from lupus patients, suggesting the existence of ectopic GC. Surprisingly, only few of these T_{FH} cells secrete IL21 but the majority are IFN γ producers as previously described in iBALT following *Mycobacterium tuberculosis* infection (Slight *et al.*, 2013). Where TLO-associated T_{FH} cells originate from is unclear. They might differentiate locally but it is also particularly interesting to correlate this information with our previous observation that circulating T_{FH1} cells are decreased in active lupus patients (Le Coz *et al.*, 2013), suggesting they may have migrated into the target organ. We were also able to highlight the presence of the recently described T_{FR} subset in the kidneys of diseased lupus mice (Lintermann *et al.*, 2011). These follicular regulatory T cells are known to control T_{FH} and resulting antibody responses, which suggests that GC regulation does occur in TLO, at least to a certain extent. However, it cannot be excluded that T_{FR} function and or numbers may be altered in TLO as it has been suggested for circulating cells in lupus patients (Xu *et al.*, 2017).

The final evidence of functional TLO was brought by the generation of autoantibody-secreting cells from B cells isolated from kidney infiltrates. We had previously shown that autoreactive plasma cells are present in the kidneys of NZB/W mice, however some of them migrate from secondary lymphoid organs to the kidneys, likely through the CXCR3 inflammatory pathway (Lacotte *et al.*, 2010 & 2013). Here, we confirm that plasma cells are present in the kidneys within infiltrates around GC. More importantly, T_{FH}-like signals (anti-CD40, IL21) are able to induce the *ex vivo* differentiation of kidney B cells into plasma cells, some of them secreting anti-chromatin autoantibodies that may, *in vivo*, participate to lupus nephritis. This is a

supplementary clue for the involvement of TLO into the pathogenesis. Altogether, our results give the first full and thorough description of functional TLO in kidneys during lupus disease. Understanding their neogenesis and maintenance may bring new therapeutic avenues for lupus.

Acknowledgments

This work was supported by the French “Centre National de la Recherche Scientifique” (CNRS), the Fondation Arthritis Courtin (PhD fellowship to CLC) and by ANR, program "Investissements d'Avenir" (ANR-11-EQPX-022). We wish to thank Dr Kristin Fenton (Tromsø University, Norway) for scientific discussions, the IGBMC flow cytometry platform for cell sorting, the IBMC animal facility, and Monique Duval and Delphine Lamon (CNRS UPR3572) for helping with mouse experiments.

References

- Ascon, D.B., Ascon, M., Satpute, S., Lopez-Briones, S., Racusen, L., Colvin, R.B., Soloski, M.J., and Rabb, H. (2008). Normal mouse kidneys contain activated and CD3+CD4-CD8-double-negative T lymphocytes with a distinct TCR repertoire. *Journal of Leukocyte Biology* 84, 1400–1409.
- Astorri, E., Bombardieri, M., Gabba, S., Peakman, M., Pozzilli, P., and Pitzalis, C. (2010). Evolution of Ectopic Lymphoid Neogenesis and In Situ Autoantibody Production in Autoimmune Nonobese Diabetic Mice: Cellular and Molecular Characterization of Tertiary Lymphoid Structures in Pancreatic Islets. *The Journal of Immunology* 185, 3359–3368.
- Bombardieri, M., Barone, F., Humby, F., Kelly, S., McGurk, M., Morgan, P., Challacombe, S., De Vita, S., Valesini, G., Spencer, J., et al. (2007). Activation-induced cytidine deaminase expression in follicular dendritic cell networks and interfollicular large B cells supports functionality of ectopic lymphoid neogenesis in autoimmune sialoadenitis and MALT lymphoma in Sjögren's syndrome. *J. Immunol.* 179, 4929–4938.
- Cañete, J.D., Celis, R., Noordenbos, T., Moll, C., Gómez-Puerta, J.A., Pizcueta, P., Palacin, A., Tak, P.P., Sanmartí, R., and Baeten, D. (2009). Distinct synovial immunopathology in Behçet disease and psoriatic arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 11, R17.
- Carragher, D.M., Rangel-Moreno, J., and Randall, T.D. (2008). Ectopic lymphoid tissues and local immunity. *Semin. Immunol.* 20, 26–42.
- Chang, A., Henderson, S.G., Brandt, D., Liu, N., Guttikonda, R., Hsieh, C., Kaverina, N., Utset, T.O., Meehan, S.M., Quigg, R.J., et al. (2011). In Situ B Cell-Mediated Immune Responses and Tubulointerstitial Inflammation in Human Lupus Nephritis. *The Journal of Immunology* 186, 1849–1860.
- Coppola, D., Nebozhyn, M., Khalil, F., Dai, H., Yeatman, T., Loboda, A., and Mulé, J.J. (2011). Unique ectopic lymph node-like structures present in human primary colorectal carcinoma are identified by immune gene array profiling. *Am. J. Pathol.* 179, 37–45.
- Deocharan, B., Qing, X., Lichauco, J., and Putterman, C. (2002). α -Actinin Is a Cross-Reactive Renal Target for Pathogenic Anti-DNA Antibodies. *The Journal of Immunology* 168, 3072–3078.
- Detanico, T., St Clair, J.B., Aviszus, K., Kirchenbaum, G., Guo, W., and Wsocki, L.J. (2013). Somatic mutagenesis in autoimmunity. *Autoimmunity* 46, 102–114.
- Dieu-Nosjean, M.-C., Giraldo, N.A., Kaplon, H., Germain, C., Fridman, W.H., and Sautès-Fridman, C. (2016). Tertiary lymphoid structures, drivers of the anti-tumor responses in human cancers. *Immunol. Rev.* 271, 260–275.
- Dorraj, S.E., Hovd, A.-M.K., Kanapathipillai, P., Bakland, G., Eilertsen, G.Ø., Figenschau, S.L., and Fenton, K.A. (2018). Mesenchymal stem cells and T cells in the formation of Tertiary Lymphoid Structures in Lupus Nephritis. *Scientific Reports* 8, 7861.
- GeurtsvanKessel, C.H., Willart, M.A.M., Bergen, I.M., Rijt, L.S. van, Muskens, F., Elewaut, D., Osterhaus, A.D.M.E., Hendriks, R., Rimmelzwaan, G.F., and Lambrecht, B.N. (2009). Dendritic cells are crucial for maintenance of tertiary lymphoid structures in the lung of influenza virus-infected mice. *J Exp Med* 206, 2339–2349.
- Gil-Ortega, M., Garidou, L., Barreau, C., Maumus, M., Breasson, L., Tavernier, G., García-Prieto, C.F., Bouloumié, A., Casteilla, L., and Sengenès, C. (2013). Native adipose stromal cells

egress from adipose tissue in vivo: evidence during lymph node activation. *Stem Cells* 31, 1309–1320.

Gu-Trantien, C., Loi, S., Garaud, S., Equeter, C., Libin, M., de Wind, A., Ravoet, M., Le Buanec, H., Sibille, C., Manfouo-Foutsop, G., et al. (2013). CD4⁺ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J. Clin. Invest.* 123, 2873–2892.

Humby, F., Bombardieri, M., Manzo, A., Kelly, S., Blades, M.C., Kirkham, B., Spencer, J., and Pitzalis, C. (2009). Ectopic Lymphoid Structures Support Ongoing Production of Class-Switched Autoantibodies in Rheumatoid Synovium. *PLoS Medicine* 6, e1.

Jarjour, M., Jorquera, A., Mondor, I., Wienert, S., Narang, P., Coles, M.C., Klauschen, F., and Bajenoff, M. (2014). Fate mapping reveals origin and dynamics of lymph node follicular dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* 211, 1109–1122.

Kalaaji, M., Fenton, K.A., Mortensen, E.S., Olsen, R., Sturfelt, G., Alm, P., and Rekvig, O.P. (2007). Glomerular apoptotic nucleosomes are central target structures for nephritogenic antibodies in human SLE nephritis. *Kidney Int.* 71, 664–672.

Kang, S., Fedoriw, Y., Brenneman, E.K., Truong, Y.K., Kikly, K., and Vilen, B.J. (2017). BAFF Induces Tertiary Lymphoid Structures and Positions T Cells within the Glomeruli during Lupus Nephritis. *The Journal of Immunology* 1600281.

Khader, S.A., Guglani, L., Rangel-Moreno, J., Gopal, R., Fallert Junecko, B.A., Fountain, J.J., Martino, C., Pearl, J.E., Tighe, M., Lin, Y., et al. (2011). IL-23 is required for long-term control of *Mycobacterium tuberculosis* and B cell follicle formation in the infected lung. *J Immunol* 187, 5402–5407.

Krautler, N.J., Kana, V., Kranich, J., Tian, Y., Perera, D., Lemm, D., Schwarz, P., Armulik, A., Browning, J.L., Tallquist, M., et al. (2012). Follicular dendritic cells emerge from ubiquitous perivascular precursors. *Cell* 150, 194–206.

Kurts, C., Panzer, U., Anders, H.-J., and Rees, A.J. (2013). The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nature Reviews Immunology* 13, 738–753.

Lacotte, S., Dumortier, H., Decossas, M., Briand, J.-P., and Muller, S. (2010). Identification of New Pathogenic Players in Lupus: Autoantibody-Secreting Cells Are Present in Nephritic Kidneys of (NZBxNZW)F1 Mice. *The Journal of Immunology* 184, 3937–3945.

Lacotte, S., Decossas, M., Le Coz, C., Brun, S., Muller, S., and Dumortier, H. (2013). Early Differentiated CD138^{high}MHCII⁺IgG⁺ Plasma Cells Express CXCR3 and Localize into Inflamed Kidneys of Lupus Mice. *PLoS ONE* 8, e58140.

Le Coz, C., Joublin, A., Pasquali, J.-L., Korganow, A.-S., Dumortier, H., and Monneaux, F. (2013). Circulating TFH Subset Distribution Is Strongly Affected in Lupus Patients with an Active Disease. *PLoS ONE* 8, e75319.

Le Pottier, L., Devauchelle, V., Fautrel, A., Daridon, C., Saraux, A., Youinou, P., and Pers, J.-O. (2009). Ectopic Germinal Centers Are Rare in Sjogren's Syndrome Salivary Glands and Do Not Exclude Autoreactive B Cells. *The Journal of Immunology* 182, 3540–3547.

Liarski, V.M., Kaverina, N., Chang, A., Brandt, D., Yanez, D., Talasnik, L., Carlesso, G., Herbst, R., Utset, T.O., Labno, C., et al. (2014). Cell Distance Mapping Identifies Functional T Follicular Helper Cells in Inflamed Human Renal Tissue. *Science Translational Medicine* 6, 230ra46–230ra46.

Licht, R., van Bruggen, M.C., Oppers-Walgreen, B., Rijke, T.P., and Berden, J.H. (2001). Plasma levels of nucleosomes and nucleosome-autoantibody complexes in murine lupus:

effects of disease progression and lipopolysaccharide administration. *Arthritis Rheum.* *44*, 1320–1330.

Linterman, M.A., Pierson, W., Lee, S.K., Kallies, A., Kawamoto, S., Rayner, T.F., Srivastava, M., Divekar, D.P., Beaton, L., Hogan, J.J., et al. (2011). Foxp3⁺ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nature Medicine* *17*, 975–982.

Malhotra, D., Fletcher, A.L., and Turley, S.J. (2013). Stromal and hematopoietic cells in secondary lymphoid organs: partners in immunity. *Immunological Reviews* *251*, 160–176.

Moyron-Quiroz, J.E., Rangel-Moreno, J., Kusser, K., Hartson, L., Sprague, F., Goodrich, S., Woodland, D.L., Lund, F.E., and Randall, T.D. (2004). Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity. *Nature Medicine* *10*, 927–934.

Muller, S., Dieker, J., Tincani, A., and Meroni, P.L. (2008). Pathogenic anti-nucleosome antibodies. *Lupus* *17*, 431–436.

Nacionales, D.C., Kelly, K.M., Lee, P.Y., Zhuang, H., Li, Y., Weinstein, J.S., Sobel, E., Kuroda, Y., Akaogi, J., Satoh, M., et al. (2006). Type I Interferon Production by Tertiary Lymphoid Tissue Developing in Response to 2,6,10,14-Tetramethyl-Pentadecane (Pristane). *The American Journal of Pathology* *168*, 1227–1240.

Nacionales, D.C., Weinstein, J.S., Yan, X.-J., Albesiano, E., Lee, P.Y., Kelly-Scumpia, K.M., Lyons, R., Satoh, M., Chiorazzi, N., and Reeves, W.H. (2009). B Cell Proliferation, Somatic Hypermutation, Class Switch Recombination, and Autoantibody Production in Ectopic Lymphoid Tissue in Murine Lupus. *The Journal of Immunology* *182*, 4226–4236.

Pipi, E., Nayar, S., Gardner, D.H., Colafrancesco, S., Smith, C., and Barone, F. (2018). Tertiary Lymphoid Structures: Autoimmunity Goes Local. *Front Immunol* *9*, 1952.

Pitzalis, C., Jones, G.W., Bombardieri, M., and Jones, S.A. (2014). Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity. *Nature Reviews Immunology* *14*, 447–462.

Preibisch, S., Saalfeld, S., and Tomancak, P. (2009). Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics* *25*, 1463–1465.

Siliņa, K., Soltermann, A., Attar, F.M., Casanova, R., Uckeley, Z.M., Thut, H., Wandres, M., Isajevs, S., Cheng, P., Curioni-Fontecedro, A., et al. (2018). Germinal Centers Determine the Prognostic Relevance of Tertiary Lymphoid Structures and Are Impaired by Corticosteroids in Lung Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Research* *78*, 1308–1320.

Slight, S.R., Rangel-Moreno, J., Gopal, R., Lin, Y., Fallert Junecko, B.A., Mehra, S., Selman, M., Becerril-Villanueva, E., Baquera-Heredia, J., Pavon, L., et al. (2013). CXCR5⁺ T helper cells mediate protective immunity against tuberculosis. *Journal of Clinical Investigation*.

Starke, C., Frey, S., Wellmann, U., Urbonaviciute, V., Herrmann, M., Amann, K., Schett, G., Winkler, T., and Voll, R.E. (2011). High frequency of autoantibody-secreting cells and long-lived plasma cells within inflamed kidneys of NZB/W F1 lupus mice. *Eur. J. Immunol.* *41*, 2107–2112.

Thaunat, O., Graff-Dubois, S., Brouard, S., Gautreau, C., Varthaman, A., Fabien, N., Field, A.-C., Louedec, L., Dai, J., Joly, E., et al. (2010). Immune Responses Elicited in Tertiary Lymphoid Tissues Display Distinctive Features. *PLOS ONE* *5*, e11398.

Ulrichs, T., Kosmiadi, G.A., Trusov, V., Jörg, S., Pradl, L., Titukhina, M., Mishenko, V., Gushina, N., and Kaufmann, S.H.E. (2004). Human tuberculous granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defence in the lung. *J. Pathol.* *204*, 217–228.

Weinstein, J.S., Delano, M.J., Xu, Y., Kelly-Scumpia, K.M., Nacionales, D.C., Li, Y., Lee, P.Y., Scumpia, P.O., Yang, L., Sobel, E., et al. (2013). Maintenance of anti-Sm/RNP autoantibody production by plasma cells residing in ectopic lymphoid tissue and bone marrow memory B cells. *J. Immunol.* *190*, 3916–3927.

Wing, J.B., Tekgüç, M., and Sakaguchi, S. (2018). Control of Germinal Center Responses by T-Follicular Regulatory Cells. *Front Immunol* *9*, 1910.

Xu, B., Wang, S., Zhou, M., Huang, Y., Fu, R., Guo, C., Chen, J., Zhao, J., Gaskin, F., Fu, S.M., et al. (2017). The ratio of circulating follicular T helper cell to follicular T regulatory cell is correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol.* *183*, 46–53.

Yung, S., Cheung, K.F., Zhang, Q., and Chan, T.M. (2010). Anti-dsDNA Antibodies Bind to Mesangial Annexin II in Lupus Nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology* *21*, 1912–1927.

Figure legends

Figure 1. Leukocytes infiltrate kidneys of NZB/W mice during lupus development. Frozen kidney sections from lupus NZB/W (<20wk, n = 6; 24-27wk, n = 6; ≥30wk-old, n = 7) and healthy BALB/c (>30wk-old, n = 4) mice were labeled with CD45.2-specific (green) antibodies **(A)** and combined with C3-specific (red) antibodies staining glomerular antibody deposits **(B)**. Nuclei were stained with DAPI (blue). Entire sections were reconstituted from images using ImageJ software and the Stitching plugin and images of one section from one mouse of each group are shown. **(C)** Numbers of infiltrates per section were evaluated (3 kidney sections per mouse were analyzed). Each dot represents one mouse and bars correspond to the mean number value in each group ± SEM. **(D)** Representative images of one infiltrate for one NZB/W mouse of each age-group are shown for comparison. The total area corresponding to CD45.2 infiltrated cells was quantified. Each dot in the graph represents one mouse and horizontal bars correspond to the mean percentage value ± SEM in each group (n = 6 mice per group except for NZB/W ≥30wk, n = 5; 3 sections per mouse were analyzed). ns: not significant, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, Mann-Whitney test. Scale bars: 500 and 50µm.

Figure 2. Composition of kidney-infiltrating CD45.2⁺ cells. **(A)** Leucocytes were isolated from the kidneys of diseased (≥30wk-old, proteinuria-positive) NZB/W mice (n = 7) and analyzed by FACS compared to spleen and lymph node-derived cells. The gating strategy (dot-plots) is shown for one representative experiment. Mean percentages ± SEM of B220⁺ B cells, CD4⁺ and CD8⁺ T cells and CD11b⁺ myeloid cells were assessed among CD45.2⁺ cells. **(B)** Frozen kidney sections from diseased NZB/W mice were stained with DAPI (blue) and anti-CD4 (green) or anti-CD8 (purple) or anti-B220 (red) or anti-CD11b (cyan) antibodies. Representative images of one infiltrate is shown. **(C)** T and B cell segregation occurs in the infiltrates upon disease development as shown in representative images. Percentages of infiltrates displaying distinct B and T cell zones are shown in the graph. Each dot represents one mouse and bars correspond to the mean percentage value ± SEM in each group (n = 6-8 mice/group). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, Mann-Whitney test. Scale bars: 50µm.

Figure 3. Renal immune infiltrates harbor a stromal compartment. **(A)** Follicular dendritic cell networks were evidenced by CD35 staining (yellow) on kidney sections. One representative infiltrate from one NZB/W mouse of each group is shown. Nuclei were stained with DAPI (blue). Mean percentages ± SEM of infiltrates harboring CD35⁺ networks are shown in the

graph (6-20 infiltrates/2-5 sections analyzed per mouse per group). Each dot represents one mouse (n = 3-8 mice/group) and bars correspond to the mean number value in each group \pm SEM. **(B)** Immunohistochemistry detection (magenta) of a PDPN⁺ network and PNA⁺ and Lyve1⁺ vessels in immune infiltrates. Representative images of CD31⁺PNA⁺ HEV **(C)**, CD31⁺ blood vessels **(D)** and Lyve1⁺PDPN⁺ lymphatic vessels **(D)** in immune cell infiltrates in the kidney of a diseased (≥ 30 wk-old, proteinuria-positive) NZB/W mouse. ns: not significant, ** p < 0.01, *** p < 0.001, Mann-Whitney test. Scale bars: 50 μ m. LV, lymphatic vessel; BV blood vessel.

Figure 4. Homeostatic chemokines structure immune infiltrates in lupus kidneys. **(A)** CCL19 and CXCL13 expression was analyzed by RT-qPCR in the kidneys of BALB/c (<20wk, n=3) and NZB/W mice (<20wk, n = 14, 24-27wk, n=6 and ≥ 30 wk-old, n = 7). Expression levels for each gene were normalized against the expression level of β -actin and GAPDH. Each dot represents one mouse and bars correspond to the mean fold change value \pm SEM in each group normalized to BALB/c mice. Detection of CCL19, CXCL13 and CCL21 proteins in an immune infiltrate **(B)** by immunohistochemistry (magenta) and **(C)** by immunofluorescence (green) combined with podoplanin (PDPN, FRC), CD35⁺ (FDC) or Lyve1 (LEC) (all in red). Nuclei were stained with DAPI (blue). All images are representative of immunostainings performed on kidney sections from n = 10 diseased (≥ 30 wk-old, proteinuria-positive) mice. ns: not significant, ** p < 0.01, *** p < 0.001, Mann-Whitney test. Scale bars: 50 μ m.

Figure 5. Multiple evidences of germinal center B cells in kidney infiltrates of lupus NZB/W mice. **(A)** GL7⁺ (green) GC B cells are surrounded by naïve IgD⁺ (red) B cells in the kidneys of NZB/W mice. A representative infiltrate from one diseased NZB/W mouse is shown. Percentages of infiltrates, which contain GL7⁺ cells, in the kidneys of young (n = 6), middle-aged (n = 8) and old diseased (n = 7) NZB/W mice, are shown in the graph. Each dot represents one mouse and bars correspond to the mean percentage \pm SEM in each group (n = 10 infiltrates analyzed per mouse per group). **(B)** FACS analysis of PNA⁺B220⁺ and GL7⁺CD95⁺B220⁺ GC B cells in spleen, kidney-draining lymph nodes and kidneys from diseased (≥ 30 wk-old, proteinuria-positive) NZB/W mice. Mean percentages \pm SEM are shown in the graphs (n = 4-8 mice). **(C)** GC B cells were also detected in renal infiltrates from diseased NZB/W mice thanks to staining with anti-BCL6 antibodies (purple, nuclear localization) combined with anti-B220 (green) antibodies. As shown in representative images, nuclear expression of the GC-associated transcription factor BCL6 is specifically detected (no staining with the IgG1 isotype control,

left image). **(D-E)** Proliferation of B220⁺ B cells was evidenced in the kidneys of diseased (≥ 30 wk-old, proteinuria-positive) NZB/W mice by FACS **(D)** (compared to spleen from BALB/c and NZB/W mice; results from one representative mouse out of 3 are shown, mean percentages are indicated in the plots) and by section immunostainings **(E)**, using the Ki67 marker. **(F)** AID expression was analyzed by RT-PCR in the kidneys from control BALB/c mice ($n = 3$) and lupus NZB/W mice (< 20 wk, $n = 3$ and ≥ 30 wk-old, $n = 4$). β -actin was used as the housekeeping gene and representative cDNA gel pictures are shown. ns: not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ Mann-Whitney test. Scale bars: 50 μ m.

Figure 6. T_{FH} cells are present in kidney infiltrates of diseased lupus NZB/W mice. **(A)** FACS analysis of the CD4⁺ and CD8⁺ T cell phenotype in the spleen and kidneys of diseased (≥ 30 wk-old, proteinuria-positive) NZB/W mice. Naïve CD44^{low}CD62L^{high} and activated/memory CD44^{high}CD62L^{low} cells were identified. Representative FACS dot-plots from 7-10 mice. **(B)** T_{FH} cells were identified among CD4⁺ T cells as CXCR5⁺PD1^{high} cells in the spleen, kidney-draining lymph nodes and kidneys of diseased NZB/W mice. Mean percentages \pm SEM are shown in the graph ($n = 4$ mice; each dot represents one mouse). Further analysis of the T_{FH} phenotype was performed as compared to non-T_{FH} CD4⁺ cells **(C)** and overlaid FACS histograms show data representative for 3 NZB/W mice. **(D)** Representative section images of T_{FH} cells stained with CD4-specific (green) and BCL6-specific (purple) antibodies in a kidney infiltrate from a diseased NZB/W mouse. **(E)** Cytokine profile of T_{FH} cells present in the kidneys from diseased NZB/W mice. Representative secreting T_{FH} percentages are indicated in the plots (gated on CXCR5⁺PD1^{high} cells, representative of data obtained in 6 mice). **(F)** Identification of FoxP3 regulatory T cells among T_{FH} cells in the spleen and kidneys of diseased NZB/W mice. Mean percentages ($n = 3$ mice) are indicated in the representative plots shown. ns: not significant, Mann-Whitney test. Scale bars: 50 μ m.

Figure 7. Autoantibody-secreting cells are generated from tertiary lymphoid structures in the kidneys of NZB/W mice. **(A)** Fine localization of CD138⁺ plasma cells within infiltrates was evidenced by CD138 (red) staining on kidney sections from diseased NZB/W mice ($n = 3$, representative images of one infiltrate). Germinal centers were identified thanks to anti-GL7 (green) antibodies and nuclei were stained with DAPI (blue). **(B)** Identification of CD138⁺B220^{low} plasma cells in the spleen and kidneys from diseased (≥ 30 wk-old, proteinuria-positive) NZB/W mice ($n = 4-8$). Representative FACS dot-plots are shown and average percentages \pm SEM are represented in the bar graph (one dot/mouse). **(C)** CD45⁺CD19⁺ B cells

were isolated by FACS from the kidneys of diseased NZB/W mice (n = 3 mice) and cultured for three days with medium alone or with agonist anti-CD40 antibodies and IL21. Identification of differentiated CD138⁺B220^{low} plasma cells was then performed by FACS and the secretion of anti-chromatin IgG autoantibodies was evaluated by ELISA. Average optical densities at 450nm \pm SEM of one representative experiment out of 2 are represented in the graph *** p < 0.001, Mann-Whitney test. Scale bars: 50 μ m.

Table 1. Antibodies and reagents used for flow cytometry (FC), immunofluorescence (IF) microscopy or immunohistochemistry

Clone	Specificity	Host	FC-IF	Source
Primary reagents				
RA3-6B2	B220	rat	FC-IF	BD Biosciences
K112-91	BCL6	mouse	FC-IF	BD Biosciences
polyclonal	BTLA	goat	FC	R&D Systems
polyclonal	CCL19	goat	IF-IHC	R&D Systems
polyclonal	CCL21	goat	IF-IHC	R&D Systems
M1/70	CD11b	rat	FC-IF	BD Biosciences
281.2	CD138	rat	FC-IF	BD Biosciences
polyclonal	CD3	rabbit	IF	DAKO
MEC 13.3	CD31	rat	IF	Biolegend
8C12	CD35	rat	IF	BD Biosciences
RM4-5	CD4	rat	FC-IF	BD Biosciences
IM7	CD44	rat	FC	BD Biosciences
30-F11	CD45	rat	FC	BD Biosciences
Ly-5.2	CD45.2	mouse	IF	BD Biosciences
MEL-14	CD62L	rat	FC	BD Biosciences
53-6.7	CD8	rat	FC-IF	BD Biosciences

JO2	CD95	hamster	FC	BD Biosciences
Polyclonal	CXCL13	goat	IF-IHC	R1D Systems
2G8	CXCR5	rat	FC-IF	BD Biosciences
FJK-16s	Foxp3	rat	FC	eBiosciences
GL7	GL7	rat	FC-IF	BD Biosciences
7E.17G9	ICOS	rat	FC	BD Bioscience
11-26c.2a	IgD	rat	IF	BD Biosciences
XMG1.2	IFN γ	rat	FC	BD Biosciences
TC11-18H10	IL-17A	rat	FC	BD Biosciences
mhalx21	IL-21	rat	FC	BD Biosciences
4A9	IL-21R	rat	FC	BD Biosciences
ALY7	Lyve1	rat	IF-IHC	eBioscience
29F.1A12	PD-1	rat	FC	Biolegend
8.1.1	PDPN	hamster	IF-IHC	Biolegend
/	PNA	/	FC	Vector
MECA-79	PNAd	rat	IF-IHC	Biolegend
79D7	STAT3	rabbit	FC	Cell Signaling
B56	Ki67	mouse	FC-IF	BD Biosciences
Polyclonal	C3	goat	IF	Cappel

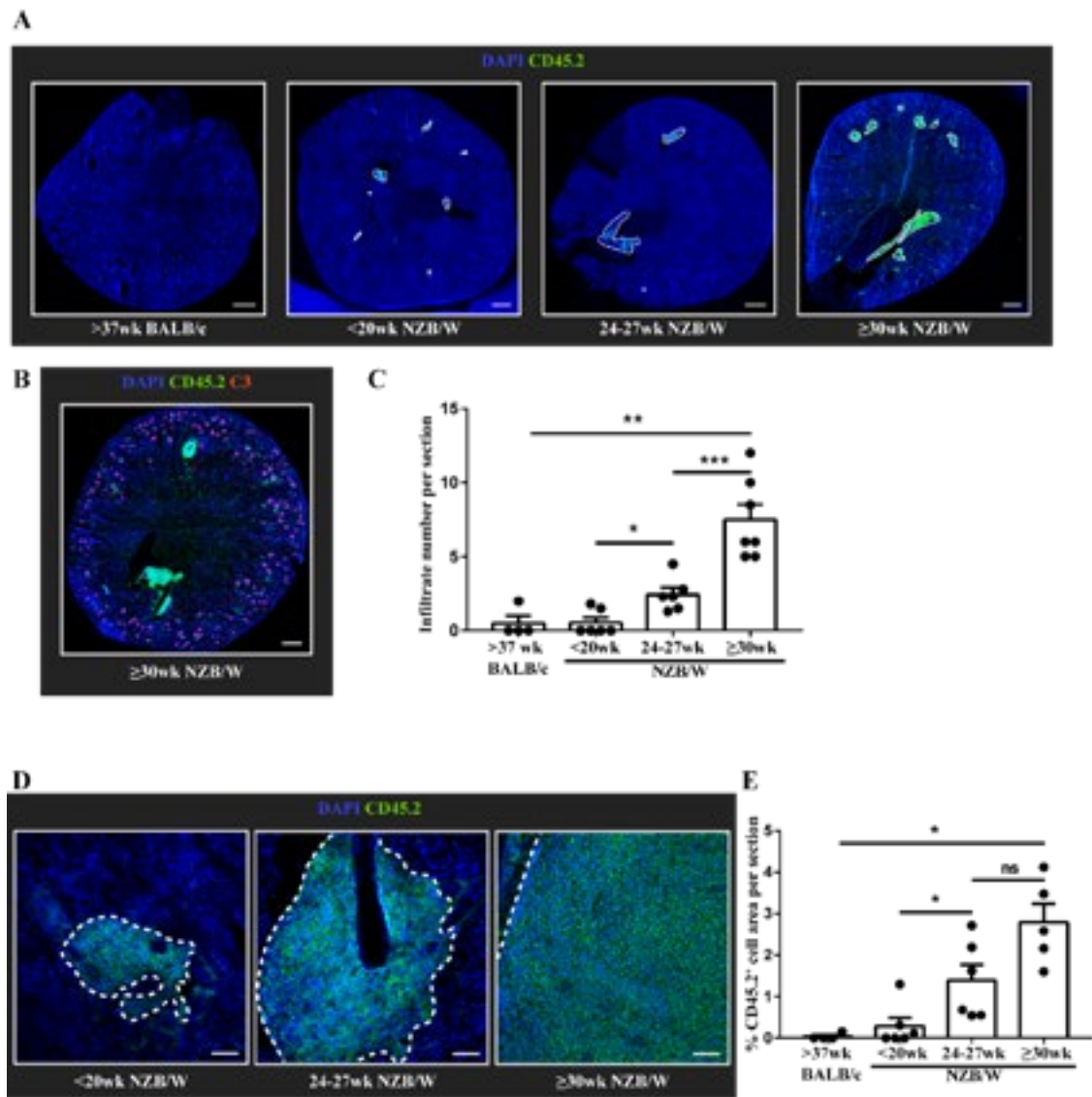


Figure 1

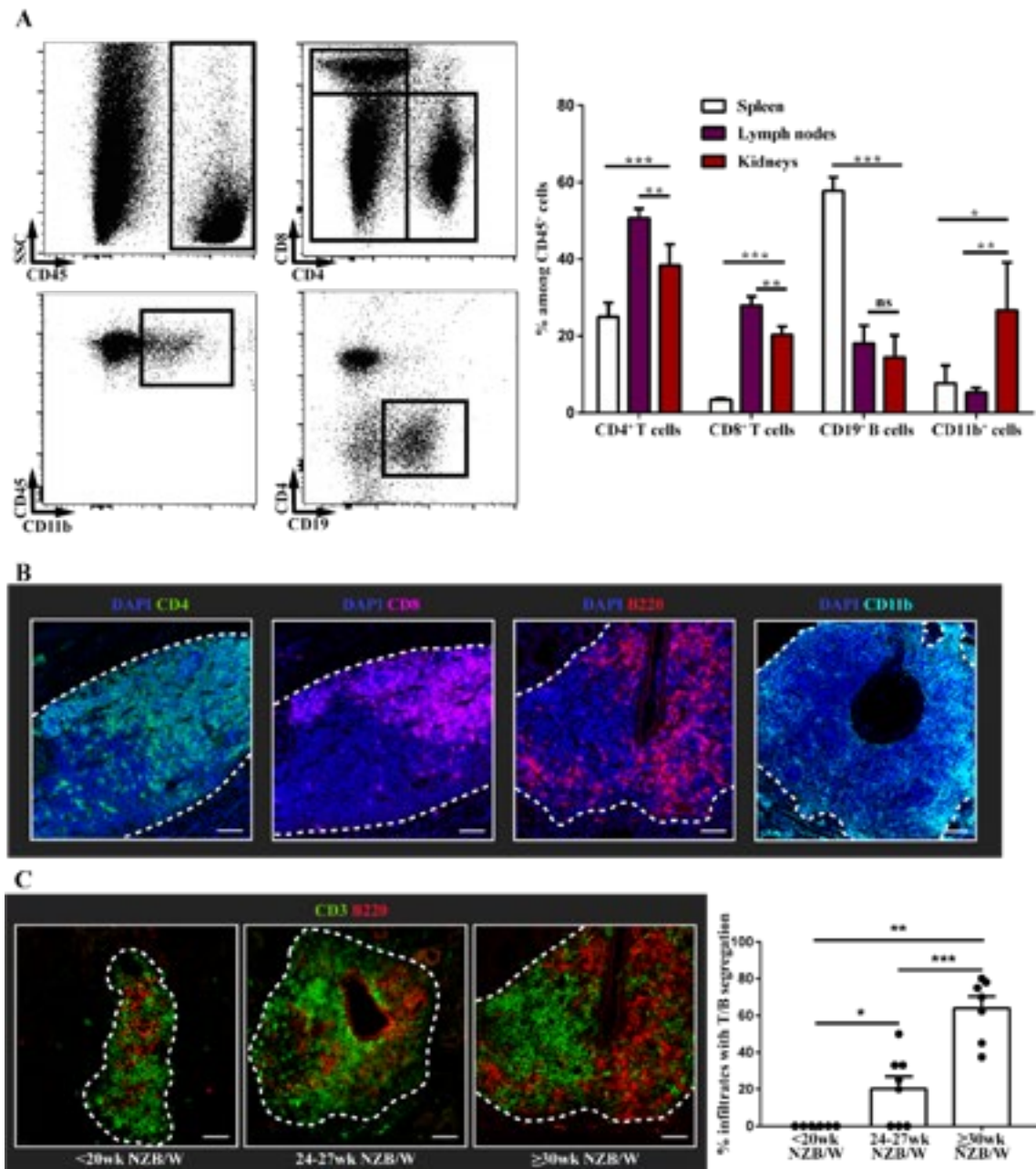


Figure 2

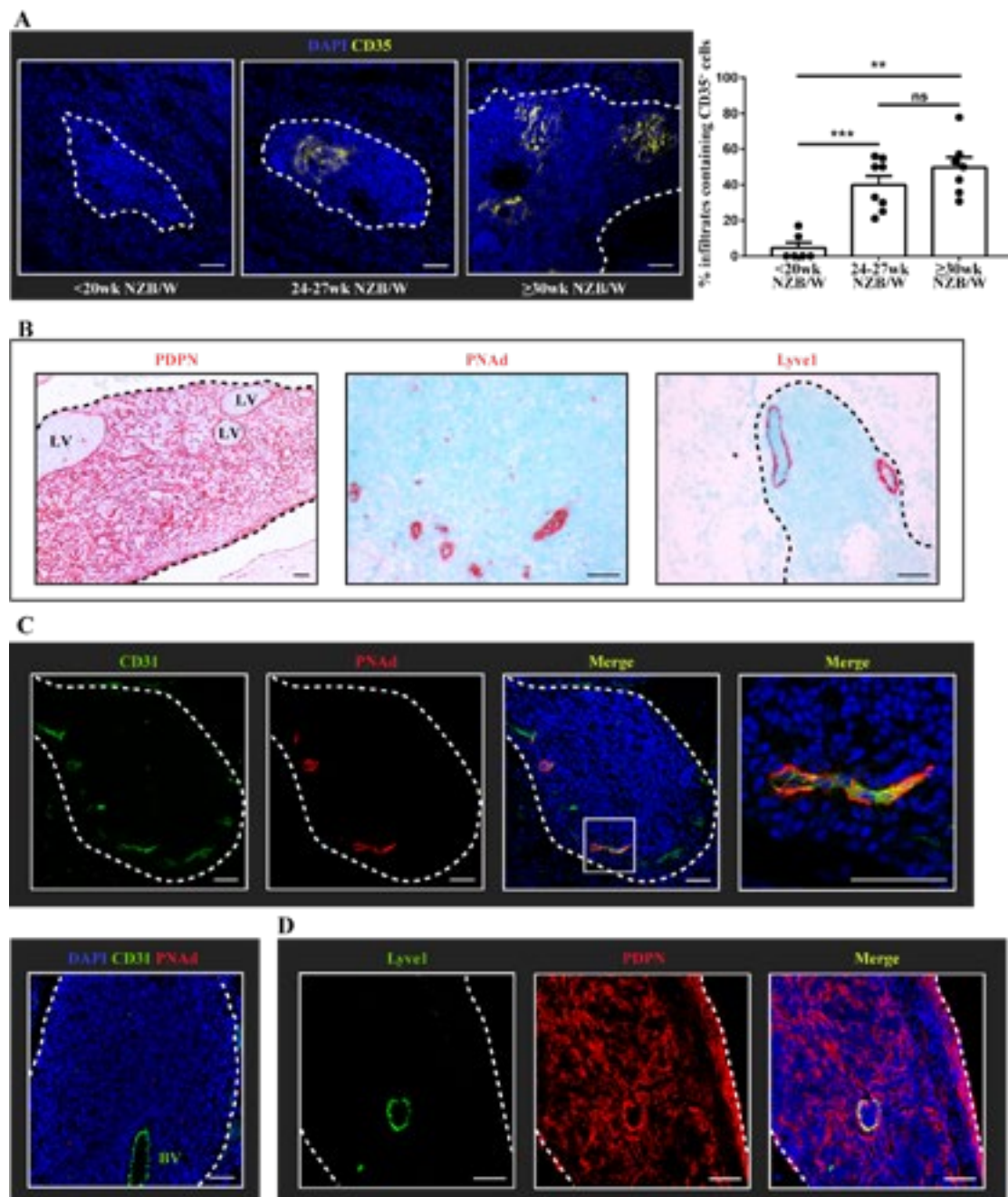


Figure 3

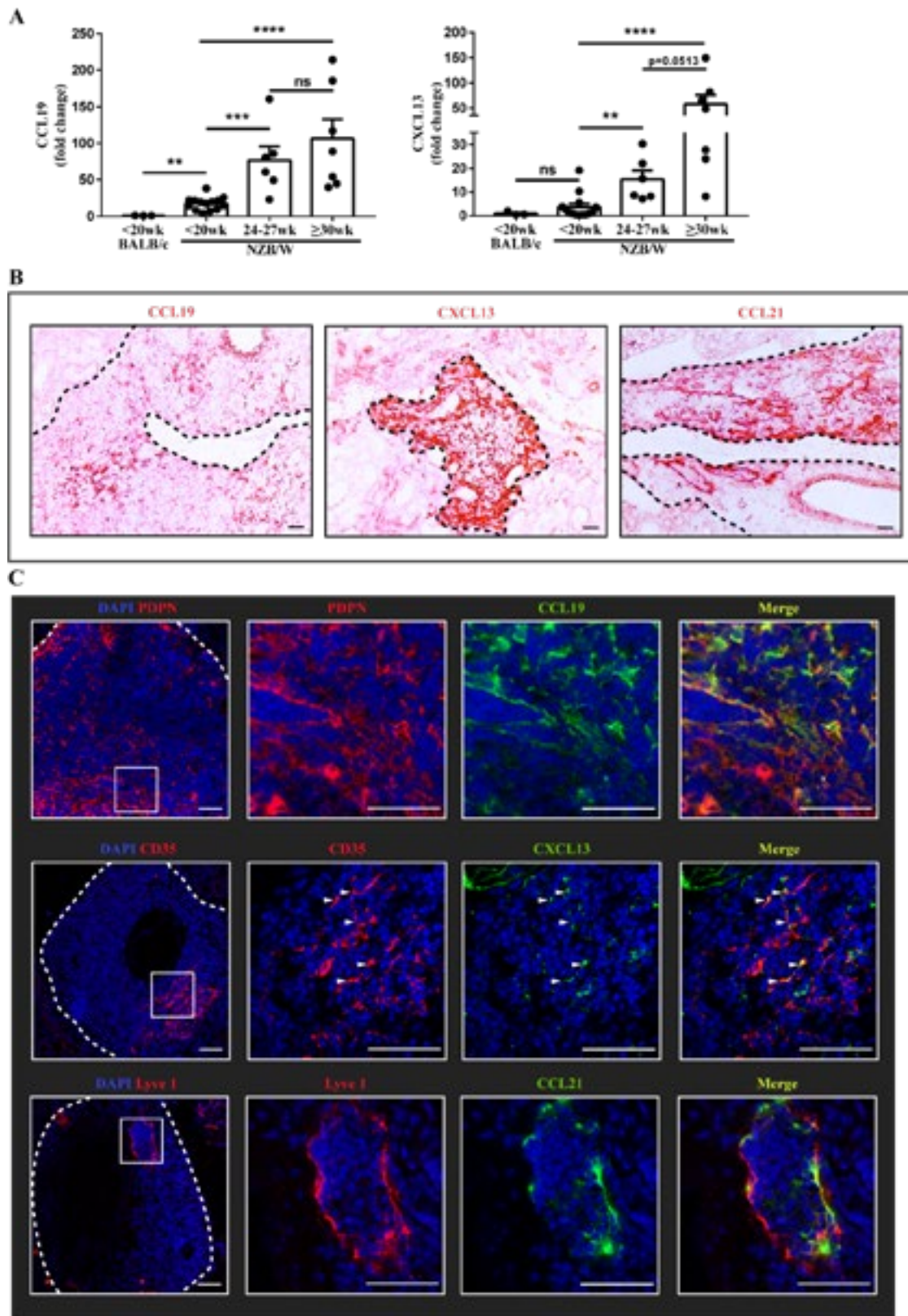


Figure 4

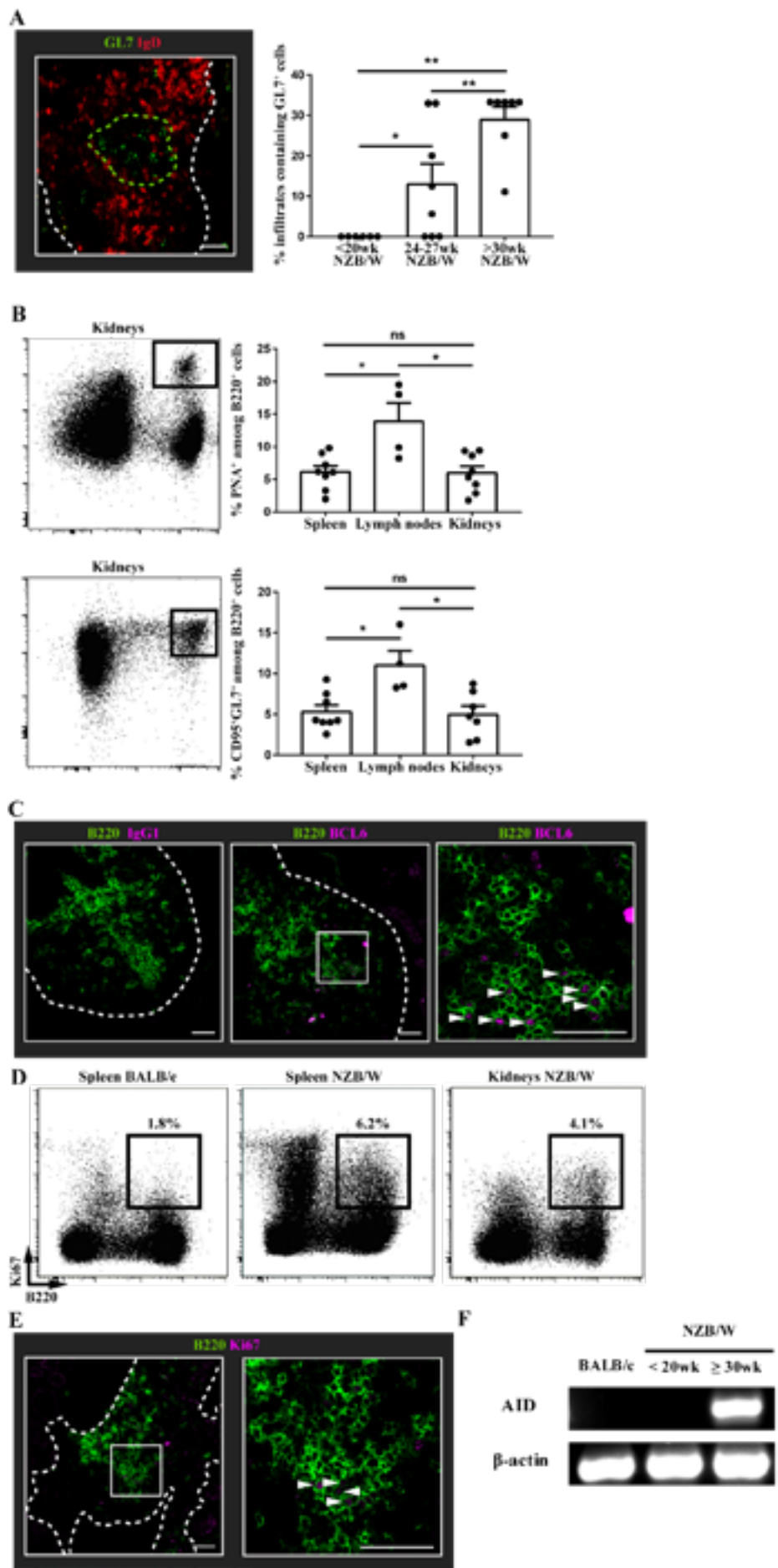


Figure 5

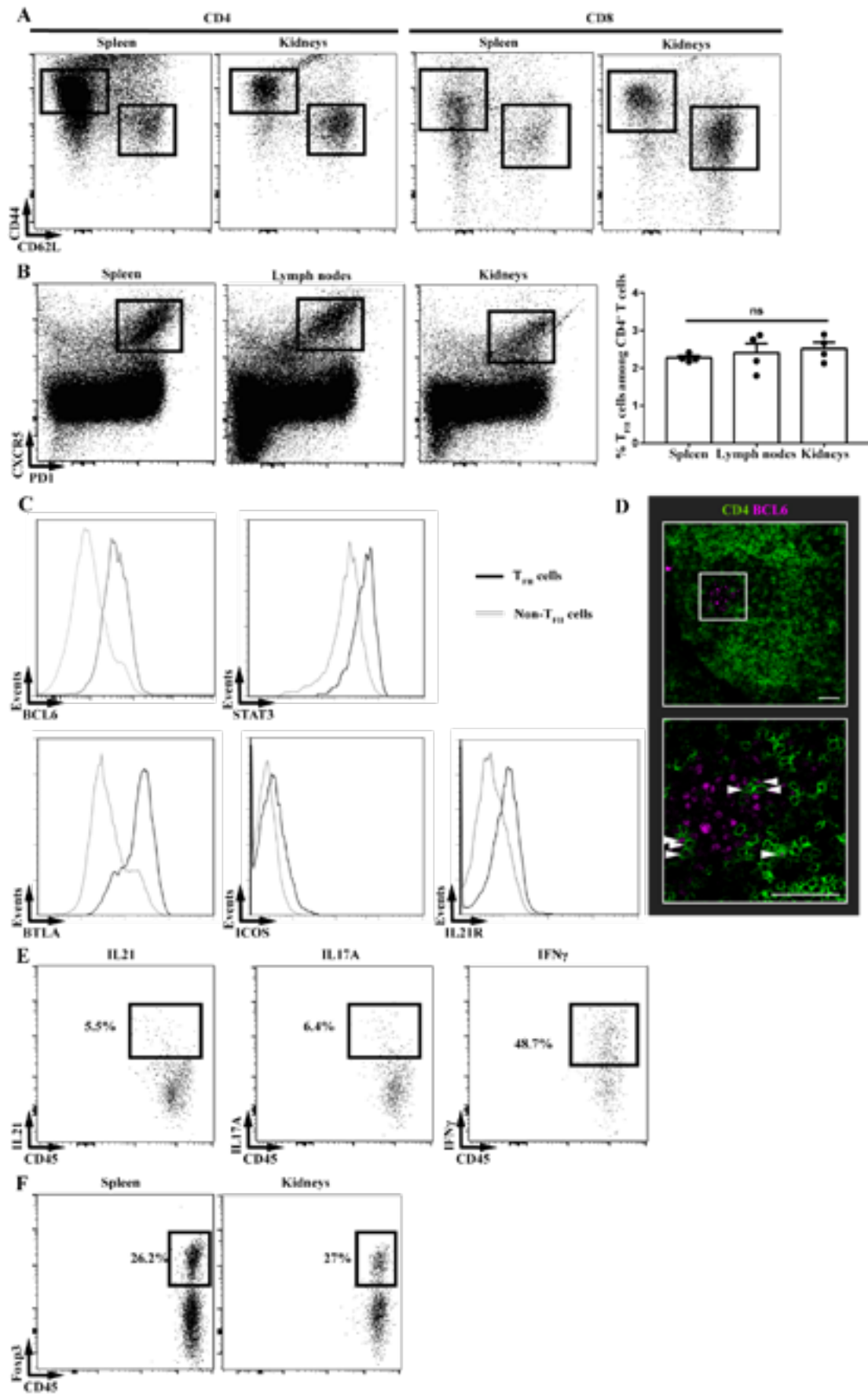


Figure 6

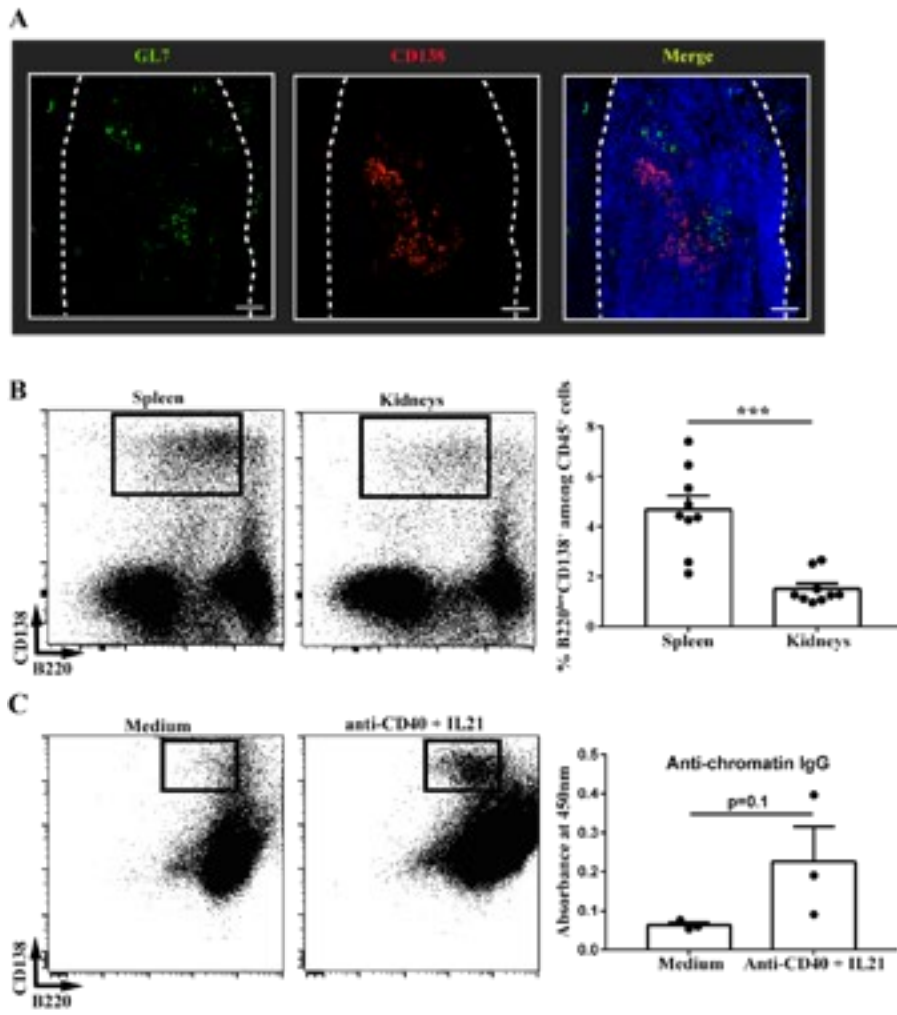


Figure 7

Chapitre 2 : Etapes précoces de la néogenèse lymphoïde rénale au cours du lupus : implication des lymphocytes T exprimant CXCR3

L'Avant-propos.

Comme mentionné précédemment, la néphrite lupique se caractérise par un dépôt d'auto-anticorps et une infiltration de cellules immunitaires. Cette infiltration immunitaire au sein de l'organe cible d'une pathologie auto-immune a été observée également lors du diabète de type I, de la sclérose en plaques ou de la polyarthrite rhumatoïde par exemple. Dans ces diverses maladies, ces infiltrats s'organisent en structures nommées OLT et nous avons pu démontrer que des OLT fonctionnels sont présents dans les reins d'un modèle murin spontané de lupus : la souris NZB/W (**Chapitre 1**). A un stade avancé de la maladie lupique, ces OLT présentent un fort degré d'organisation avec une compartimentation des LT et LB en zones distinctes et la présence de diverses populations de cellules stromales. De plus, ils contiennent des GC fonctionnels qui peuvent être à l'origine de la production d'auto-anticorps. Au vu de leur implication potentielle dans physiopathologie de la néphrite lupique, il est donc important de comprendre comment se forment ces structures dans les reins au cours du lupus

La formation des OLS est un processus finement contrôlé faisant intervenir diverses populations cellulaires (LTi, LTo...) et de nombreuses molécules et chimiokines (LT β , CXCL13, RANKL...). Étant donné leur forte ressemblance avec les OLS, les processus impliqués dans la formation des OLT pourraient être similaires à ceux gouvernant la mise en place des OLS. En effet, divers travaux ont montré que l'expression ectopique de diverses chimiokines était suffisante pour déclencher la formation d'OLT (**Chen *et al.*, 2002 ; Luther *et al.*, 2002**). D'autres ont décrit l'implication de la lymphotoxine dans le processus de néogenèse lymphoïde, son blocage aboutissant à une disparition des OLT et une amélioration des symptômes (**Columba-Cabezas *et al.*, 2006**). Concernant les populations cellulaires permettant le développement des OLT, il semble que de nombreux candidats soient impliqués. Certaines équipes ont pu mettre en évidence la présence et l'implication de cellules LTi-like tandis que d'autres ont pu prouver, dans leur modèle, une indépendance vis-à-vis de ces cellules. Pour certains, les LT sont les premières cellules arrivant sur place (**Marinkovic *et al.*, 2006**) tandis que pour d'autres, ce sont les LB qui vont exprimer la lymphotoxine et être les principaux acteurs de la formation des OLT (**McDonald *et al.*, 2005**). Dans d'autres modèles, ce serait

cette fois les DC qui, de par leur interaction avec les LT, permettraient la mise en place et le maintien des OLT (**Ludewig *et al.*, 1998**).

Dans cette étude, nous avons cherché à déterminer les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la mise en place des OLT dans les reins au cours du lupus. Afin de mener à bien ce travail, nous avons étudié les premières étapes de la néogenèse lymphoïde rénale chez des souris NZB/W très jeunes, bien avant l'apparition des signes cliniques et biologiques. Nos résultats nous ont conduit à nous intéresser à nouveau au récepteur CXCR3 dont nous avons déjà montré l'implication chez des souris NZB/W malades (**Lacotte *et al.*, 2013**). Les résultats sont présentés, ci-après, sous forme d'un papier en cours de préparation.

II-Publication N°2.

CXCR3 blockade impairs TLO neogenesis and maintenance, and improves kidney disease in lupus.

Romain Veber *et al.*

En préparation

CXCR3 blockade impairs TLO neogenesis and maintenance, and improves kidney disease in lupus.

Romain Veber *et al.*

En préparation

Materials and methods

Mice

Female BALB/c and (NZBxNZW)F1 mice (referred as NZB/W) were purchased from Envigo (Gannat, France) and maintained in our animal facility (approved by French Veterinary Services, #G67-482-2). Proteinuria was evaluated in fresh urine using a colorimetric assay for albumin (Albustix, Bayer Diagnostics, Basingstoke, U.K.) and was semi-quantitatively estimated according to the scale recommended by the manufacturer. Control healthy BALB/c (12-14 week-old), young NZB/W (11-13 week-old, no proteinuria) and old diseased NZB/W mice (≥ 30 week-old, high proteinuria score ≥ 4 in two consecutive urine samples) were used in this study. All experiments were carried out in conformity with the 2010/63/UE European animal bioethics legislation (French decree #2013-118 - 1st February 2013) and were approved by the Regional Ethics Committee of Strasbourg (CREMEAS) and by the French Ministry of Higher Education and Research.

Leukocyte isolation from kidneys, spleen and lymph nodes

Previously described methods for leukocyte isolation from murine kidneys were used (**Ascon *et al.*, 2008**). In brief, kidneys were finely cut and digested for 30min at 37°C with 0.5mg/mL collagenase D (Roche, Mannheim, Germany) and 0.05 mg/mL DNase I (Roche) in complete RPMI 1640 medium supplemented with 10% (v/v) FCS (Dutscher, Brumath, France), 10 μ g/mL gentamycin (Lonza, Basel, Switzerland), 10mM HEPES (Lonza), and 0.05mM β -mercaptoethanol (Life Technologies, Carlsbad, USA). Tissue homogenates were sequentially filtered through 100-, 70- and 40- μ m nylon meshes and washed with complete RPMI medium. Leucocytes were then isolated using a 72/36% discontinuous Percoll gradient (Sigma-Aldrich, St-Louis, USA) and centrifugation (30min, 400g). The leukocyte-enriched cell suspension was harvested from the Percoll interface. In the case of spleen and lymph nodes, cell suspensions were obtained using standard procedures and erythrocytes were lysed using a hypotonic ammonium chloride solution. Cell viability was assessed by Trypan blue staining (Lonza) before flow cytometry analysis was performed.

Flow cytometry

Cells isolated from various tissues (spleen, lymph nodes and kidneys) were surface-stained with fluorescently-labeled monoclonal antibodies as summarized in Table 1. All cells were incubated

first with rat anti-mouse CD16/CD32 monoclonal antibody (2.4G2, BD Biosciences) to block Fc γ receptors. Data were collected using a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, USA) and were analyzed using the FlowJo software (Tree Star, Ashland, USA). Scatter gates were set to include the viable lymphocyte population and 100,000-1,000,000 events were collected for each sample.

Histology

For routine histology, kidneys were fixed overnight at 4°C in paraformaldehyde 4% (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA) and embedded in paraffin (Leica, Wetzlar, Germany). Sections of 5 μ m were dewaxed, rehydrated and stained with hematoxylin and eosin (H&E) or Periodic Acid Schiff (PAS), dehydrated and permanently mounted. Pathological changes in the kidney were assessed by evaluating glomerular activity (i.e., increased glomerular size, mesangial proliferation, hyaline deposits, glomerular lesions) and tubulointerstitial activity (i.e., interstitial inflammation, tubule dilatation/atrophy, interstitial fibrosis). Sections were scored using a 0–4 scale for glomerular or tubular activity, as follows: 0 = no lesion, 1 = lesions in <25% of glomeruli/tubules, 2 = lesions in 25-50% of glomeruli/tubules, 3 = lesions in 51-75% of glomeruli/tubules and 4 = lesions in >75% of glomeruli/tubules.

For immunofluorescence, kidneys were frozen in Tissue-Tek® O.C.T™ Compound (Sakura, Alphen aan den Rijn, Netherlands) and 7 μ m-sections were prepared. They were then mounted on SuperFrost™ Plus glass slides (Thermo Scientific, Waltham, USA), fixed in cold acetone for 20 min, air dried, and washed in Tris Buffered Saline (TBS). Endogenous biotins were neutralized using an "Endogenous Biotin-Blocking Kit" according to recommended instructions (Life Technologies) and non-specific antibody binding was avoided using Blocking Reagent™ (Perkin Elmer, Waltham, USA). Sections were then incubated overnight with specific antibodies at 4°C, and when necessary, with secondary detection antibodies for 2h at room temperature (see Table 1). After fixation with paraformaldehyde 4% for 20 min, slides were then stained with DAPI (100ng/ml, Sigma) for 10 min at room temperature and mounted with fluorescent mounting medium (DAKO, Glostrup, Denmark). All stainings were performed according to standard procedures except for the anti-CD35 and anti-GL7 stainings for which an amplification method was used ("TSA kit", Tyramide Signal Amplification Fluorescent System, Perkin Elmer). Mosaic images were acquired with a 20x objective on a Zeiss LSM 780 Axio Observer confocal microscope driven by the ZEN software. All quantitative analyses were performed on at least 3 sections and 10 infiltrates. Stitching of images and quantification of the infiltrated area was performed using the ImageJ software and the Stitching plugin (**Preibisch**

et al., 2009). For quantification of IgG, C3, CXCL10 and PDPN, the integrated density of the fluorescence of each glomerulus was measured using Image J software and normalized values (raw integrated density value/area measured) were graphed.

RNA isolation and reverse transcription

Total RNA was prepared from frozen-crushed kidney powder using RLT Reagent (Qiagen, Germantown, MD) and purified using RNeasyH Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized by extension of oligo(dT) with ImProm-II™ reverse transcriptase (Promega, Fitchburg, WI).

qPCR

The relative amount of each transcript was normalized against the mean expression of two housekeeping genes, namely glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and β -actin. Primer sequences (forward/reverse) for β -actin, GAPDH, CCL3, CCL5 and IFN γ were designed with the Primer-BLAST software: forward 5'-CACTGTCGAGTCGCGTCCA-3' and reverse 5'-CATCCATGGCGAACTGGTGG-3' for actin ; forward 5'-CCCTTAAGAGGGATGCTGCC-3' and reverse 5'-TACGGCCAAATCCGTTTACA-3' for GAPDH ; forward 5'-CCATATGGAGCTGACACCCC-3' and reverse 5'-TCAGGAAAATGACACCTGGCT-3' for CCL3 ; forward 5'-TGCTGCTTTGCCTACCTCTC-3' and reverse 5'-TCCTTCGAGTGACAAACACGA-3' for CCL5 ; forward 5'-CGGCACAGTCATTGAAAGCC-3' and reverse 5'-TGTCACCATCCTTTTGCCAGT-3' for IFN γ . All amplification reactions were performed in a total volume of 25 μ l using a StepOnePlus™ thermocycler (Applied Biosystems, Carlsbad, California) with RT² SYBR Green ROX qPCR Mastermix (Qiagen). Data were analyzed using the software tool REST and the $\Delta\Delta$ CT method used to calculate fold changes.

AGM487 preparation and administration

The CXCR3 antagonist AMG487 was kindly provided by Amgen, South San Francisco. Briefly, a 50% hydroxypropyl- β -cyclodextrin (Sigma) solution was prepared and used as a vehicle for injection (20%). AMG487 was added to the 50% solution and incubated in a sonicating water bath for 2 hours with occasional vortexing. Distilled water was added to reach the appropriate final concentration of AMG487 in 20% of hydroxypropyl- β -cyclodextrin. Diseased NZB/W mice (\geq 30 wk-old and severe proteinuria) were injected s.c. twice daily for ten days with 5mg/kg AMG487 or vehicle alone. For long term treatment, 12 wk-old mice were

injected s.c. three times per week till the age of 11 weeks with 10mg/kg of AMG487 or vehicle alone. At the end of the treatment, mice were sacrificed and analyzed for autoantibody production, renal leukocyte infiltration and kidney histopathological features.

Cell labeling and syngeneic adoptive transfer

Splenic leukocytes were isolated from non-nephritic 11-13 week-old NZB/W donor mice as described and then incubated for 10 min at 37°C with 10 µM of Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (Molecular Probes, Grand Island, NY). CFSE-labeled cells (1.10⁷ cells/100µL) were injected i.v. into recipient non-nephritic 11-13 week-old NZB/W mice. Recipient mice were pretreated with either AMG487 (5mg/kg) or vehicle, twice per day, the day before and the day of syngeneic cell transfer. Kidneys were collected from recipient mice 18 h after injection of the labeled cells, and leukocytes isolated from spleen and kidneys were analyzed by flow cytometry.

ELISA

Polystyrene plates (MaxiSorb, Nunc, Rochester, NY) were coated overnight at 37°C with dsDNA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; 100 ng/ml in 25 mM citrate buffer, pH 5.4) or mouse chromatin (1 µg/ml expressed as dsDNA concentration in Phosphate Buffered Saline (PBS), prepared as described (**Lacotte *et al.*, 2010**)). Mouse sera (1:500 in PBS-T containing Bovine Serum Albumin) were added for 2 h, followed by goat anti-mouse IgG (1:20,000 in PBS; Jackson ImmunoResearch) supplemented with goat anti-mouse IgG3 (1:7500; Nordic Immunology, Tilburg, The Netherlands) conjugated to HRP for 30min. Absorbance of the substrate (3,3',5,5'-tetramethyl benzidine, Sigma-Aldrich) was measured at 450nm.

Statistical analysis

Data are shown as mean ± SEM. Statistical significance was assessed using a Mann-Whitney U test (Prism version 5.0; GraphPad Software). Statistical significance is indicated as follows in the figures: ****p <0.0001; ***p<0.001; **p<0.005; *p< 0.05; and ns, not significant (p>0.05).

Results

TLO development takes place before autoantibody deposition in NZB/W kidneys.

We previously showed that functional TLO do exist in the kidneys of diseased NZB/W mice and that a few poorly organized infiltrates can be detected in mice younger than 20 weeks of age (Le Coz, Veber, *et al.*). In order to understand why and how TLO develop, we first tried to determine the initial time point of this lymphoid neogenesis. For this purpose, NZB/W mice of different ages (very young non-diseased 11-13 week (wk)-old and diseased proteinuria-positive ≥ 30 wk-old) and healthy BALB/c mice (as control) were used. As shown in Figure 1A, some CD45⁺ cells are present in the perfused kidneys of 11-14wk-old BALB/c mice. They are dispersed throughout the kidney section, both in the medullary and in the cortical zones. Similar observations can be made in the kidneys of 11-13wk-old NZB/W mice, however, contrary to healthy mice, a cluster of CD45⁺ cells that may be the initial starting point of kidney infiltration, is also consistently detected in the medullary area close to the afferent artery. It very likely develops further into the big central medullary infiltrate found in the kidneys of ≥ 30 wk-old NZB/W mice (Figure 1A and Le Coz, Veber *et al.*). This observation was confirmed by the quantification of the percentages and absolute numbers of renal CD45⁺ cells (Figure 1B). Both are increased in the kidneys of young NZB/W mice compared to age-matched healthy BALB/c controls (3.3% \pm 0.6 / $0.7 \times 10^5 \pm 0.1$ vs 0.7% \pm 0.1 / $0.1 \times 10^5 \pm 0.01$, respectively), suggesting that leukocyte infiltration starts very early during the course of the disease in lupus mice. Because glomerular autoantibody deposition is known to play a crucial role in lupus nephritis (Lindquist *et al.*, 2016; Yung *et al.*, 2015), we then wondered whether this early leukocyte infiltration was a consequence of the autoantibody-induced inflammation. In contrast to old NZB/W mice, complement (C3) or IgG are not detectable in the glomeruli of 11-13wk-old animals (Figure 1C), nor are circulating anti-chromatin and anti-dsDNA autoantibodies (Figure 1D). H&E and PAS staining of kidney sections also confirm that there is no histological difference between young BALB/c and NZB/W mice, in contrast to what is observed in old proteinuria-positive NZB/W mice, which harbor tubulo-interstitial inflammation, mesangial proliferation and glomerular damages (Figure 1E). Altogether, these data highlight that renal leukocyte infiltration occurs at a very early stage of the lupus disease. Importantly and contrary to what was expected, our results strongly suggest that this infiltration is not a consequence of the lupus-associated autoantibody-induced inflammation.

T cells are the first colonizing leukocytes in NZB/W kidneys.

We further characterized the small early leukocyte infiltrates in the perfused kidneys of 11-13wk-old NZB/W mice by flow cytometry (see Figure 2A for gating strategy). The renal CD45⁺ population is mainly composed of T cells (mostly CD4⁺ T cells, 33.5%±1.9 vs 9.1% ±0.4 CD8⁺T cells) but also includes B cells (9.7±1.8%) and some cells of the myeloid lineage (CD11c⁺ dendritic cells 12.9% and CD11c⁻CD11b⁺ monocytes/macrophages (Mo/Mac) 14.4%) (Figure 2A). The latter probably are resident kidney cells as suggested by the two main following arguments: i) absolute numbers of DC and Mo/Mac are comparable in the kidneys of young NZB/W vs BALB/c mice but the proportion among CD45⁺ cells is lower in lupus-prone animals likely due to infiltration of other cells (i.e. T cells) (Mo/Mac percentage is even lower in diseased animals despite increased numbers, Figure 2B), ii) MHCII-expressing cells (among which DC and Mo/Mac) are not clustered in the medullary area but scattered throughout the kidney tissue. They also concentrate in TLO in diseased animals (Figure 2C). In contrast, both T cell percentages and absolute numbers are significantly increased in the kidneys of 11-13wk-old NZB/W mice compared to age-matched BALB/c (Figure 2D). As mentioned above, the CD4⁺ subset is the one that is mostly present among T cells, not only at the early (33.5% vs 9.1% CD8⁺T cells) but also at the late stage of the disease (36.6% vs 13% CD8⁺ T cells in ≥ 30wk-old mice). CD4⁺ T cells do not only display high percentages and numbers in young NZB/W mice (33.5%±1.9 / 2.1*10⁴±0.3 vs 8.4%±1.3 / 0.1*10⁴±0.02 in age-matched BALB/c), they also harbor different localizations in the tissue as shown in Figure 2E: the very few T cells present in BALB/c mice are detected between tubules, whereas they form clusters in the medullary area of young NZB/W kidneys (although much smaller than in diseased animals). Therefore, our data suggest that T cells, especially CD4⁺ T cells, may participate to the initial steps of TLO neogenesis.

Most of the early infiltrating kidney T cells harbor an activated/memory phenotype and express CXCR3.

The phenotype of the early kidney-infiltrating CD4⁺ T cells was analyzed by FACS. Naïve CD44^{low}CD62L⁺ (11.5% ±1.6) CD4⁺ T cells are present in the kidneys of young lupus-prone mice but the effector/memory CD44^{high}CD62L⁻ subset is the majority (80% ±2). Very interestingly, most of the CD44^{high} cells (but not the CD44^{low}) express the inflammatory chemokine receptor CXCR3 (Figure 3A) and both the percentage and absolute number of CXCR3⁺ cells among CD4⁺ T cells are significantly higher in 11-13wk-old NZB/W than in age-matched BALB/c mice (77.3% ±2.9 vs 41.1%±4.6; 1.4*10⁴±0.2 vs 0.04*10⁴±0.01).

Similar results were obtained when analyzing CXCR3⁺ among CD44⁺CD4⁺ T cells and for CD8⁺ T cells (data not shown). Moreover, CD3⁺CXCR3⁺ cells could be visualized in the early medullary infiltrate in kidney sections of young lupus-prone animals (Figure 3B). Although absolute numbers drastically increase with age and disease progression, the distribution of naïve/inflammatory CD4⁺ T cells remains similar (Figure 3A and data not shown). Finally, the high expression level of CXCR3 is specific to the kidney-infiltrating CD4⁺ T cells (and CD8⁺ T cells, data not shown) as their circulating and spleen counterparts do not harbor this phenotype (19.3% +/-1.2 in blood vs 17.9% +/-1.2 in spleen vs 77.3% +/-2.9 in kidneys) (Figure 3C). Therefore, CXCR3 seems to be involved in the early trafficking of T cells in the kidneys, which underlies that the renal inflammatory process starts at a very early stage of the disease course.

CXCR3 ligands are specifically upregulated in the kidneys of young NZB/W mice.

Expression of the three CXCR3 ligands, namely CXCL9, CXCL10 and CXCL11, was quantified by qPCR in total kidney mRNA. As shown in Figure 4A, the three of them are highly expressed in the kidneys of diseased NZB/W mice. Interestingly, CXCL10 and CXCL11 were already statistically upregulated in the kidneys of 11-13wk-old NZB/W compared to age-matched BALB/c mice (fold changes 1.9+/- 0.3 and 2.5+/-0.7, respectively). CXCL9 results show the same tendency. IFN γ , a strong inducer of these chemokines, is also expressed from an early disease stage (fold change 3.5+/-1.2 compared to BALB/c). In comparison, other chemokines previously identified as playing a role in lupus nephritis, i.e. CCL3 and CCL5 (**Bignon *et al.*, 2014**), do not display an increased expression in young lupus-prone mice compared to healthy controls (Figure 4B). This finding strengthens the specificity of our results regarding the early upregulation of CXCR3 ligands during lupus. We then intended to identify the cellular source of these chemokines in the kidneys, focusing on CXCL10. Immunofluorescence stainings on kidney sections from young NZB/W mice allowed us to identify podocytes (expressing podoplanin) as being CXCL10 producers (Figure 4C). In contrast, glomerular CXCL10 was scarcely observed in BALB/c kidneys, and quantified mean fluorescence intensity shows a statistically significant increase of CXCL10 expression in 11-13wk-old NZB/W mice (Figure 4D). Therefore, the inflammatory CXCL9/10/11-CXCR3 pathway may be central to the initial steps of TLO formation.

The CXCR3 pathway mediates the early migration of T cells into the kidneys during lupus.

In order to confirm our hypothesis that the local early expression of inflammatory chemokines allows the migration of CXCR3⁺ T cells into the kidneys, we transferred CFSE-labeled spleen cells from young NZB/W mice (containing CXCR3⁺ T cells, see Figure 3C) to strain and age-matched recipients that were treated or not with a CXCR3 antagonist (AMG487, 5 mg/kg, 2 times/day, for 2 days; kind gift from Amgen). Figure 5A shows that there is no impact of CXCR3 blockade on cell migration to the spleen (Figure 5A), whereas the homing of CFSE⁺ cells into the kidneys is affected by the CXCR3 antagonist (Figure 5B; 0.018 % +/-0.001 / 383+/-70 with AMG487 vs 0.027% +/-0.006 / 1207+/-169 with the vehicle). Similar results are obtained when absolute numbers of kidney CD4⁺CFSE⁺ cells are analyzed. These results bring proof of CXCR3 involvement in the early renal migration of T cells (especially CD4⁺ T cells) in response to its cognate chemokines produced in the kidneys of young lupus-prone mice.

Early CXCR3 blockade impairs TLO formation and delays nephritis development.

Considering the role of CXCR3 in the early migration of T cells in kidneys, we hypothesized that early CXCR3 blockade in the course of the disease may prevent TLO formation and lupus progression. NZB/W mice were treated with AMG487 (10mg/kg, three injections per week), starting from the age of 11 weeks until the age of 26 weeks, and biological and clinical parameters were analyzed. First, a significant decrease of the total leukocyte number was observed in the kidneys of AMG487-treated mice ($0.08 \times 10^6 \pm 0.02$ vs $0.22 \times 10^6 \pm 0.04$ when the vehicle was administrated) but not in the secondary lymphoid organs (spleen and kidney-draining lymph nodes) (Figure 6A). This decrease is mainly due to a diminished number of lymphocytes (Figure 6B). Accordingly, the size of the renal infiltrates is much lower than in the vehicle-treated animals, as shown by the smaller CD45⁺-labeled area in kidney sections (Figure 6C). Moreover, these infiltrates are weakly organized as reflected by the absence of T-B segregation and of HEV in most of them (Figure 6D). Thus, TLO formation is severely impaired in the AMG487-treated group. This is further confirmed by the absence of GC B cells in the kidneys of these animals (Figure 6E). Interestingly, no impact of the treatment was observed on GC B cells in the spleen and kLN, indicating that CXCR3 blockade specifically alters the tertiary but not the secondary lymphoid organs. Similar observations were made regarding the number of plasma cells, although both inhibition of TLO function and of (SLO-generated) plasma cell migration could be responsible for their decrease in the kidneys (**Lacotte**

et al., 2013). As a clear specific impairment of TLO development resulted from AMG487 administration to NZB/W lupus mice, we wondered whether some clinical improvement ensued as well. We indeed noticed lower proteinuria (although not abolished) consistent with weaker tubular and glomerular damages compared to vehicle-treated mice (Figure 6F). Surprisingly, circulating anti-chromatin and anti-dsDNA autoantibody levels were similar in the two groups (data not shown). Overall, our data indicate that early CXCR3 blockade prevents the formation of structured and functional TLO in the kidneys, in association with weakened symptoms of the lupus-associated kidney disease.

CXCR3 blockade allows to revert installed TLO, kidney inflammation and damages.

Having demonstrated a prophylactic effect of the AMG487 CXCR3 antagonist, we then wondered whether it could also exert a therapeutic effect in NZB/W diseased mice. To this aim, we treated 30wk-old proteinuria-positive mice for 10 days and we assessed subsequent biological and histological modifications in secondary lymphoid organs and in kidneys. First, contrary to the prophylactic treatment schedule, a clear impact of CXCR3 blockade was measured on splenomegaly and lymphadenopathy (Figure 7A) and on the number of leukocytes that infiltrate kidneys (Figure 7B). All subsets display reduced numbers although their distribution is not affected (Figure 7C). Consequently, the kidney infiltrated area is drastically reduced in AMG487-treated animals (Figure 7D). Moreover, the small infiltrates left cannot be considered as functional TLO anymore, as they show almost no lymphatic vessels and HEV, nor T/B segregation, nor germinal centers (identified with GL7⁺ B cells and FDC), nor plasma cells, contrary to what is observed in the kidneys of vehicle-treated lupus mice (Figure 7E). Interestingly, although the total leukocyte number is much lower in the secondary lymphoid organs (see Figure 7A), the percentage of GC B cells and plasma cells are not affected (data not shown). As we previously showed that CXCR3⁺ T cells are present in large amounts in the kidneys of NZB/W mice and that the CXCR3 pathway is involved in TLO formation (see Figures 3, 4 and 5), we analyzed the consequences of AMG487 administration on these parameters. The absolute numbers of CXCR3⁺ T cells (and relative percentages for CD4⁺ T cells) are indeed diminished (Figure 8A). Interestingly, the naïve versus effector/memory T cell repartition seems to be modified, which highlights the specific impact of CXCR3 blockade on the latter (Figure 8B). Moreover, the expression of all CXCR3 ligands (and of their inducer IFN γ) show a tendency to be reduced upon AMG487 treatment, and, importantly, other inflammatory chemokines (CCL3, CCL5) are strongly affected as well, indicating a global impact of CXCR3 blockade on kidney inflammation (Figure 8C). Finally, we assessed the

classical histological parameters that are associated with lupus nephritis. Glomerular C3 and IgG deposits, as well as podocyte loss (visualized by podoplanin staining) are significantly lower (Figure 9A). H&E and PAS stainings confirmed that there is a reduction of glomerular size and cellularity, mesangial expansion and deposits, and glomerular and tubular damages (Figure 9B), all taken into consideration in the histological score that shows great improvement upon AMG487 injection.

Figure legends

Figure 1: TLO development takes place early in the course of the disease.

(A) Kidney sections from young 11-14wk-old BALB/c, young 11-13wk-old NZB/W and diseased ≥ 30 wk-old proteinuria-positive NZB/W mice were stained with anti-CD45 antibodies (yellow) and DAPI (blue). Scale bars: 50 μ m; original magnification: x200. (B) Percentage and absolute number of CD45⁺ leukocytes in the kidneys of BALB/c and NZB/W mice were determined by flow cytometry. (C) Kidney sections were stained with anti-C3 (upper panel, red) and anti-IgG (lower panel, red) antibodies, and DAPI (blue). The intensity of C3 and IgG staining was measured in all glomeruli from three kidney sections from each mouse. Normalized values over area are shown. Each dot corresponds to one glomerulus. Scale bars: 50 μ m; original magnification: x200. (D) Detection of anti-chromatin and anti-dsDNA autoantibodies in the sera of BALB/c and NZB/W mice by ELISA. (E) Kidney paraffin sections were stained with H&E (upper panel) or PAS (lower panel). Scale bars: 25 μ m; original magnification: x200.

Results are expressed as mean \pm SEM of 6-8 (A-C and E) or 12-30 (D) mice per group and are representative of three independent experiments. ns: not significant; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001 (Mann-Whitney test).

Figure 2: T lymphocytes are the first cells infiltrating kidneys of young NZB/W mice.

(A) Representative FACS figures and quantification showing the percentages of leukocyte subsets in the kidneys of young 11-13wk-old NZB/W mice: CD4 T cells (CD45⁺CD4⁺CD8⁻), CD8 T cells (CD45⁺CD4⁻CD8⁺), B cells (CD45⁺CD19⁺), monocytes/macrophages (Mo/Mac, CD45⁺CD4⁻CD8⁻CD11b⁺CD11c⁻) and dendritic cells (DC, CD45⁺CD4⁻CD8⁻CD11c⁺). (B) Percentages and absolute numbers of Mo/Mac and DC in the kidneys of young BALB/c (blue dots), young (pink dots) and old (red dots) NZB/W mice were determined by flow cytometry. (C) Kidney sections were stained with anti-MHC class II (red) and DAPI (blue). Scale bars: 50 μ m; original magnification: x200. (D) Percentages and absolute numbers of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the kidneys of young BALB/c (blue dots), young (pink dots) and old (red dots) NZB/W mice were determined by flow cytometry. (E) Kidney sections were stained with anti-CD4 (upper panel, green) and anti-CD8 (lower panel, green) antibodies and DAPI (blue). Scale bars: 50 μ m; original magnification: x200.

Results are expressed as mean \pm SEM of 6-8 mice per group and are representative of three independent experiments. ns: not significant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Mann-Whitney test).

Figure 3: Specific accumulation of T cells expressing CXCR3 in the kidneys of young lupus mice.

(A) Representative FACS plots showing naïve (N) $CD44^{low}CD62L^{+}$ and effector-memory (EM) $CD44^{high}CD62L^{-}CD4^{+}$ T cells, as well as CXCR3-expressing $CD4^{+}$ T cells in the kidneys of young 11-13wk-old NZB/W mice. Percentages and absolute numbers of CXCR3⁺ among $CD4^{+}$ T cells are shown. (B) Kidney sections from 11-13wk-old NZB/W mice were stained with anti-CD3 (red) and anti-CXCR3 (green) antibodies. Scale bars: 50 μ m; original magnifications: x200 (CD3, left) and x630 (CD3 and CXCR3, right). (C) Distribution of CXCR3-expressing $CD4^{+}$ T cells in blood, spleen and kidneys of young 11-13wk-old NZB/W mice.

Results are expressed as mean \pm SEM of 6-8 mice per group and are representative of three independent experiments. ns: not significant; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ (Mann-Whitney test).

Figure 4: Expression of the three CXCR3 ligands in the kidneys of young NZB/W mice.

(A-B) Levels of *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11* and *Ifng* (A) and *Ccl3* and *Ccl5* (B) transcripts were assessed by Real-time PCR in the kidneys of young BALB/c (blue dots), young NZB/W (pink dots) and diseased NZB/W (red dots) mice. Each sample was run in triplicate. Results are expressed as fold change compared to young BALB/c mice. (C) Kidney sections from young 11-13wk-old NZB/W mice were stained with anti-podoplanin (PDPN, red) and anti-CXCL10 (green) antibodies. Scale bars: 50 μ m; original magnifications: x200 (PDPN and CXCL10) and x630 (merge). (D) Kidney sections from young BALB/c and NZB/W mice were stained with anti-CXCL10 antibodies. Scale bars: 50 μ m; original magnification: x200. The intensity of CXCL10 staining was measured in all glomeruli from 7-11 kidney sections for each mouse. Normalized values over area are shown. Each dot corresponds to one glomerulus.

Results are expressed as mean \pm SEM of 6-8 mice per group and are representative of three independent experiments. ns: not significant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ (Mann-Whitney test).

Figure 5: Blockade of early T cell migration in the kidneys of young NZB/W mice by AMG487.

Young 11-13wk-old NZB/W mice were injected intravenously with CFSE-labelled splenocytes from age-matched donor NZB/W mice at day 0. Recipient mice were treated with AMG487 (5mg/kg) or vehicle alone at day-1 and at day 0. Eighteen hours later, kidneys were collected and the infiltrated leukocytes were analyzed by flow cytometry. Representative dot-plots and quantification (percentages and absolute numbers) of total CFSE⁺ or CD4⁺CFSE⁺ cells in spleen (A) and kidneys (B).

Results are expressed as mean \pm SEM of 3-4 mice per group and are representative of two independent experiments. ns: not significant; *p<0.05 (Mann-Whitney test).

Figure 6: Early AMG487 treatment impairs TLO formation and delays lupus nephritis.

Young 11wk-old NZB/W mice were treated with AMG487 (10mg/kg) or vehicle three times per week till the age of 26 weeks. Spleen, kidney-draining lymph nodes (kLN) and kidneys were then processed for flow cytometry and immunohistology. (A) Absolute numbers of leukocytes. (B) Absolute numbers of the different leukocyte subsets. (C) Kidney sections from AMG487 or vehicle-treated NZB/W mice were stained with anti-CD45 antibodies (green) and the total infiltrated area per kidney section was quantified. Scale bars: 50 μ m; original magnification: x200. (D) Kidney sections from AMG487 or vehicle-treated animals were stained with anti-CD3 (green) and anti-B220 (red) antibodies or with anti-CD31 (green) and anti-PNAd (red) antibodies. Percentage of infiltrates displaying T and B cells segregation as well as the number of HEV per section were quantified. Scale bars: 50 μ m; original magnification: x200. (E) Absolute numbers of GC B cells and plasma cells in spleen, kidney lymph nodes and kidneys of AMG487 or vehicle-treated NZB/W mice. (F) Proteinuria was assessed during the course of the treatment and the area under curve was calculated for vehicle- and AMG487-treated groups. Paraffin-embedded kidney sections from AMG487 or vehicle-treated NZB/W mice were stained with PAS. Glomerular and tubular damages and related scores were established in a blind manner and the mean histological score was calculated for each mouse. Scale bars: 50 μ m; original magnification: x200.

Results are expressed as mean \pm SEM of four mice per group. ns: not significant; *p<0.05 (Mann-Whitney test).

Figure 7: AMG487 treatment impairs TLO formation in diseased NZB/W mice.

Diseased 30wk-old proteinuria-positive NZB/W mice were treated with AMG487 (5mg/kg) or vehicle two time per day for 10 days. Spleen, kidney-draining lymph nodes (kLN) and kidneys were then processed for flow cytometry, immunohistology and qPCR analyses. **(A)** Absolute numbers of leukocytes in spleen and kLN. **(B)** Percentage and absolute numbers of leukocytes in kidneys. **(C)** Percentage and absolute numbers of the different leukocyte subsets. **(D)** Kidney sections from AMG487 or vehicle-treated animals were stained with anti-CD45 antibodies (yellow). Entire sections were reconstituted from images using ImageJ software and the Stitching plugin and each infiltrate area was quantified. Scale bars: 200 μ m; original magnification: x100. **(E)** Kidney sections were stained with anti-CD3 (green) and anti-B220 (red), anti-CD31 (green) and anti-PNAd (red), anti-CD35 (red), anti-Lyve1 (green), anti-GL7 (cyan) or anti-CD138 (green) antibodies. Scale bars: 50 μ m; original magnification: x200. Results are expressed as mean \pm SEM of 4-5 mice per group and are representative of two independent experiments. ns: not significant; * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; (Mann-Whitney test).

Figure 8: AMG487 treatment reduces inflammation and T cell accumulation in the kidneys of diseased NZB/W mice.

Diseased 30wk-old proteinuria-positive NZB/W mice were treated with AMG487 (5mg/kg) or vehicle two time per day for 10 days. Spleen, kidney-draining lymph nodes (kLN) and kidneys were then processed for flow cytometry and qPCR analyses. Representative FACS dot-plots and quantification showing **(A)** the percentages and absolute numbers of CXCR3-expressing CD4⁺ and CD8⁺ T cells, and **(B)** the percentages of naïve and effector-memory CD4⁺ T cells, in kidneys of AMG487 and vehicle-treated NZB/W mice. **(C)** Levels of *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Ifng*, *Ccl3* and *Ccl5* transcripts were assessed by Real-time PCR in the kidneys of AMG487 or vehicle-treated NZB/W mice. Each sample was run in triplicate. Results are expressed as fold change compared to vehicle-treated mice.

Results are expressed as mean \pm SEM of 4-5 mice per group and are representative of two independent experiments. ns: not significant; * p <0.05; ** p <0.01 (Mann-Whitney test).

Figure 9: AMG487 treatment improves kidney disease in NZB/W lupus mice.

Diseased 30wk-old proteinuria-positive NZB/W mice were treated with AMG487 (5mg/kg) or vehicle two time per day for 10 days. **(A)** Kidney sections were stained with anti-C3 (red) or anti-IgG (red) or anti-PDPN (red) antibodies. The intensity of C3, IgG and PDPN stainings was

measured in all glomeruli from three kidney sections from each mouse. Normalized values over area are shown. Each dot corresponds to one glomerulus. Scale bars: 50 μ m; original magnification: x200. **(B)** Paraffin-embedded sections from AMG487 or vehicle-treated NZB/W mice were stained with H&E (upper panel) and PAS (lower panel). Scale bars: 50 μ m; original magnification: x200. Glomerular and tubular damages and related scores were established in a blind manner and the mean histological score was calculated for each mouse. Results are expressed as mean \pm SEM of 4-5 mice per group and are representative of two independent experiments. **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001 (Mann-Whitney test).

Table 1.

Target	Species	Clone	Application
CD45	Rat, IgG2b	30-F11	FC/IF
C3	Goat, IgG Fab'	Polyclonal	IF
IgG	Goat, IgG	Polyclonal	IF
IA-IE	Rat, IgG2b	M5/114.15.2	IF
CD4	Rat, IgG2a	RM4-5	FC/IF
CD8	Rat, IgG2a	53-6.7	FC/IF
CD3	Rabbit, IgG	Polyclonal	IF
CD19	Rat, IgG2a	1D3	FC
CD45R/B220	Rat, IgG2a	RA3-6B2	IF
CD11c	Hamster, IgG	HL3	FC
CD11b	Rat, IgG2a	M1/70	FC
CD62L	Rat, IgG2a	MEL-14	FC
CD44	Rat, IgG2b	IM7	FC
CD31	Rat, IgG2a	390	IF
PNA _d	Rat, IgM	MECA-79	IF
CXCR3	Rat, IgG2a	220803	FC/IF
PDPN/gp38	Hamster, IgG	8.1.1	IF
CXCL10	Goat, IgG	Polyclonal	IF
CD35	Rat, IgG2a	8C12	IF
CD138	Rat, IgG2a	281-2	FC/IF
GL7	Rat, IgM	GL7	FC/IF
CD95	Hamster, IgG2	JO2	FC
Lyve 1	Rat, IgG2a	ALY7	IF

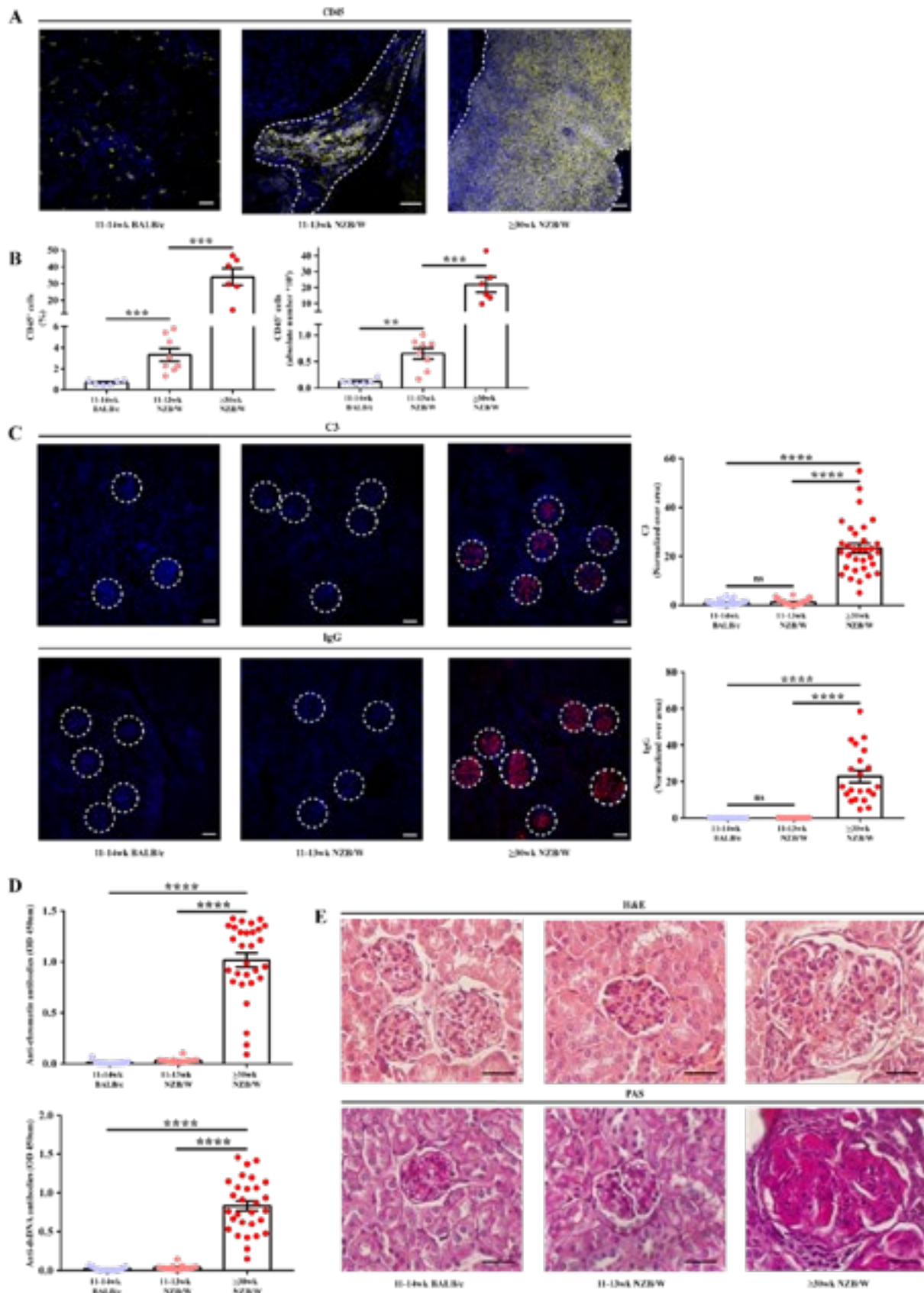


Figure 1

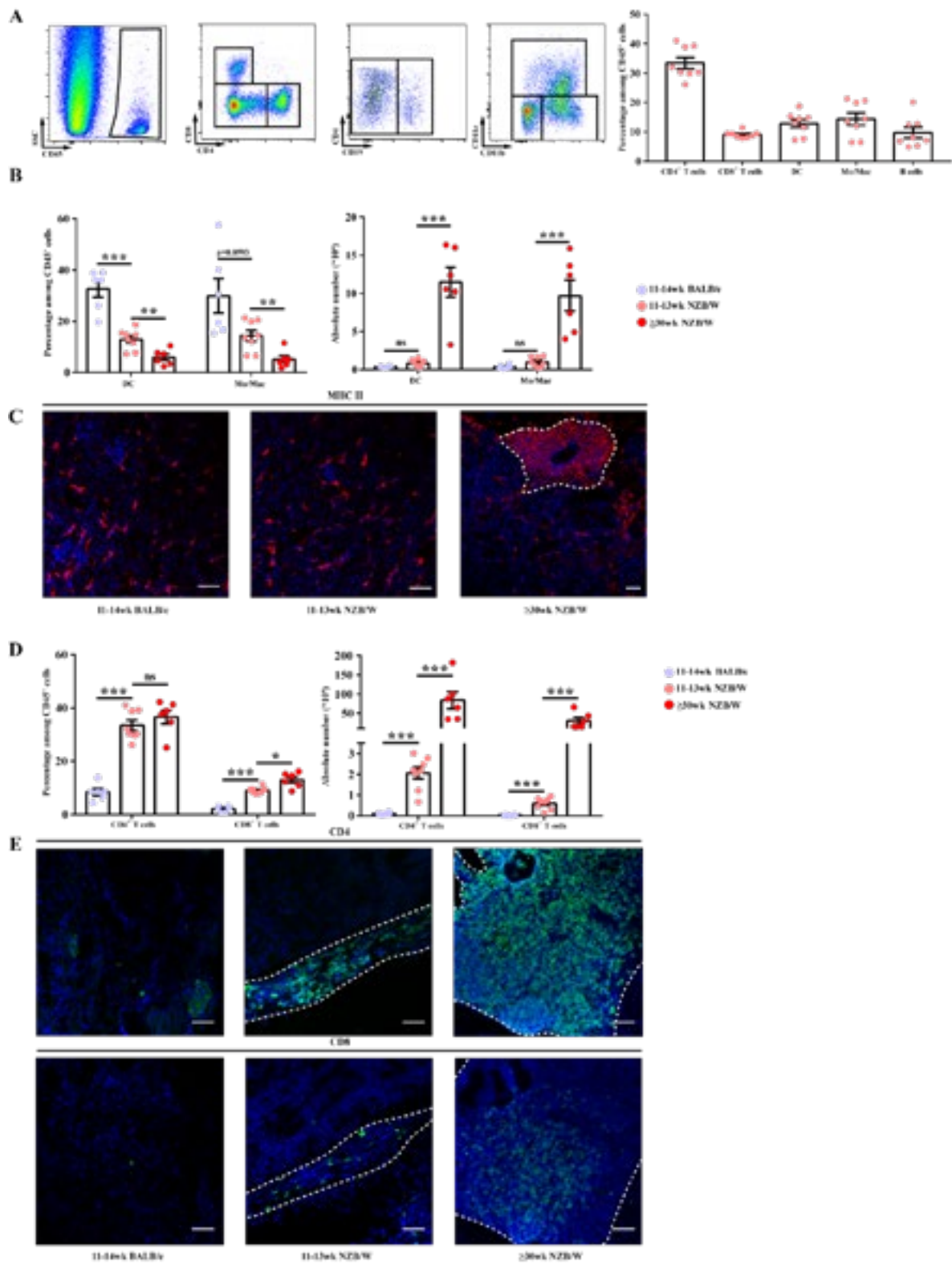


Figure 2

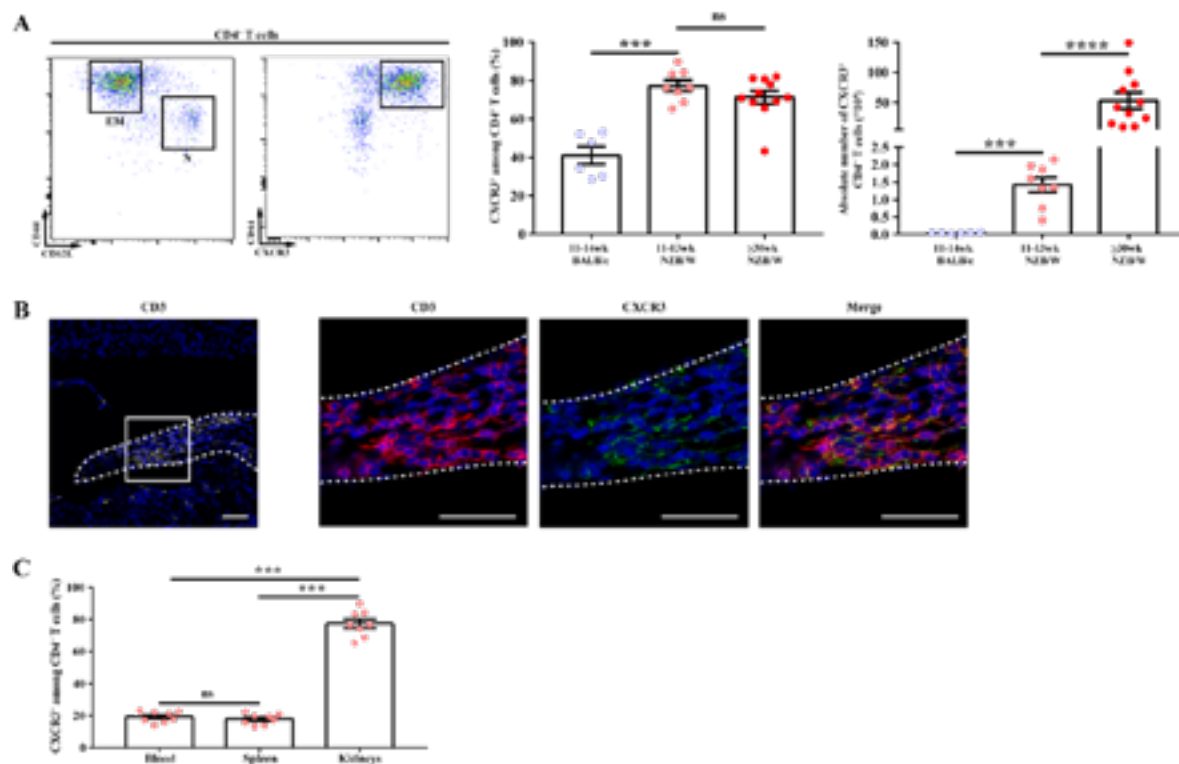


Figure 3

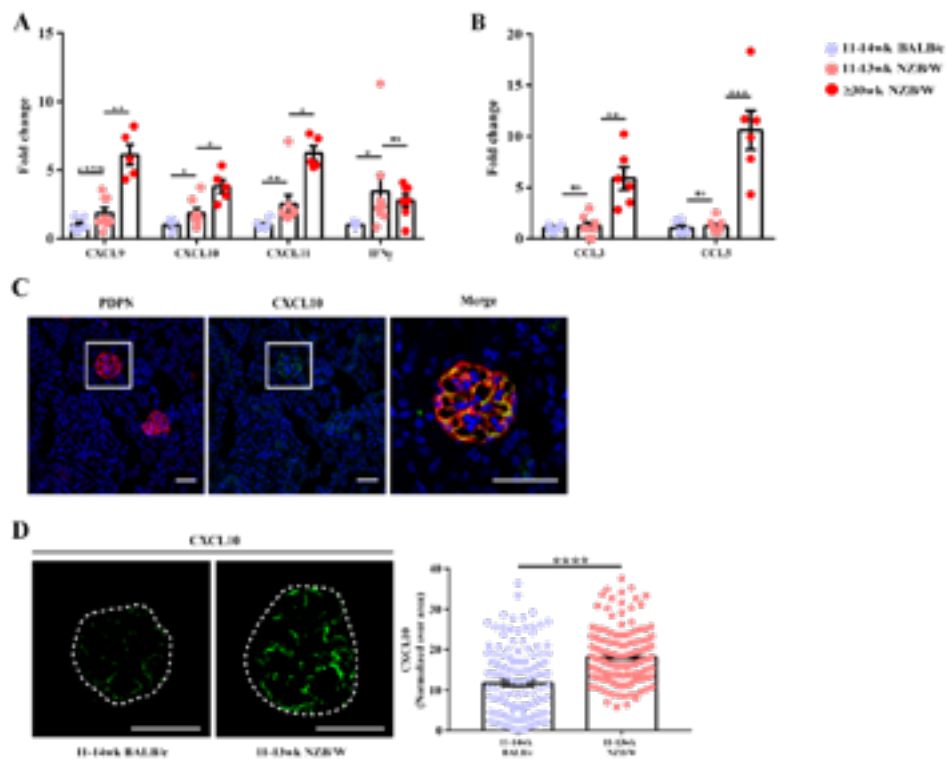


Figure 4

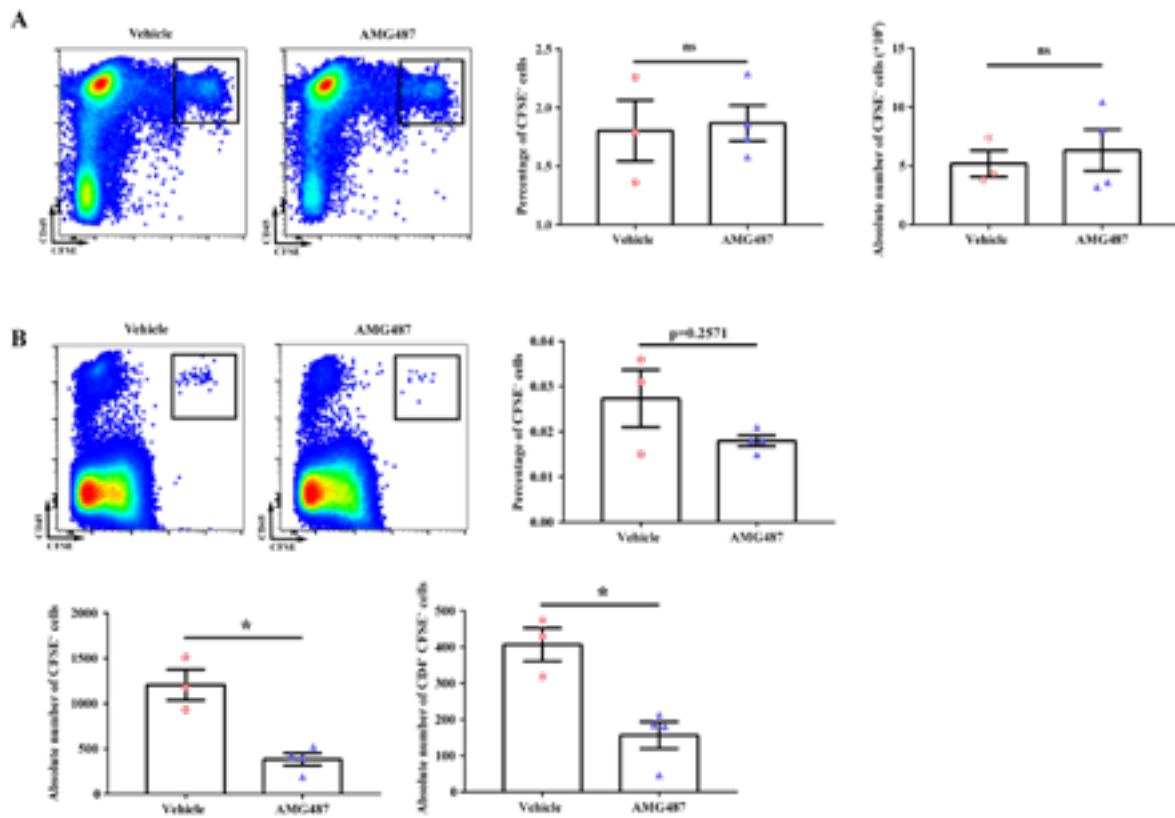


Figure 5

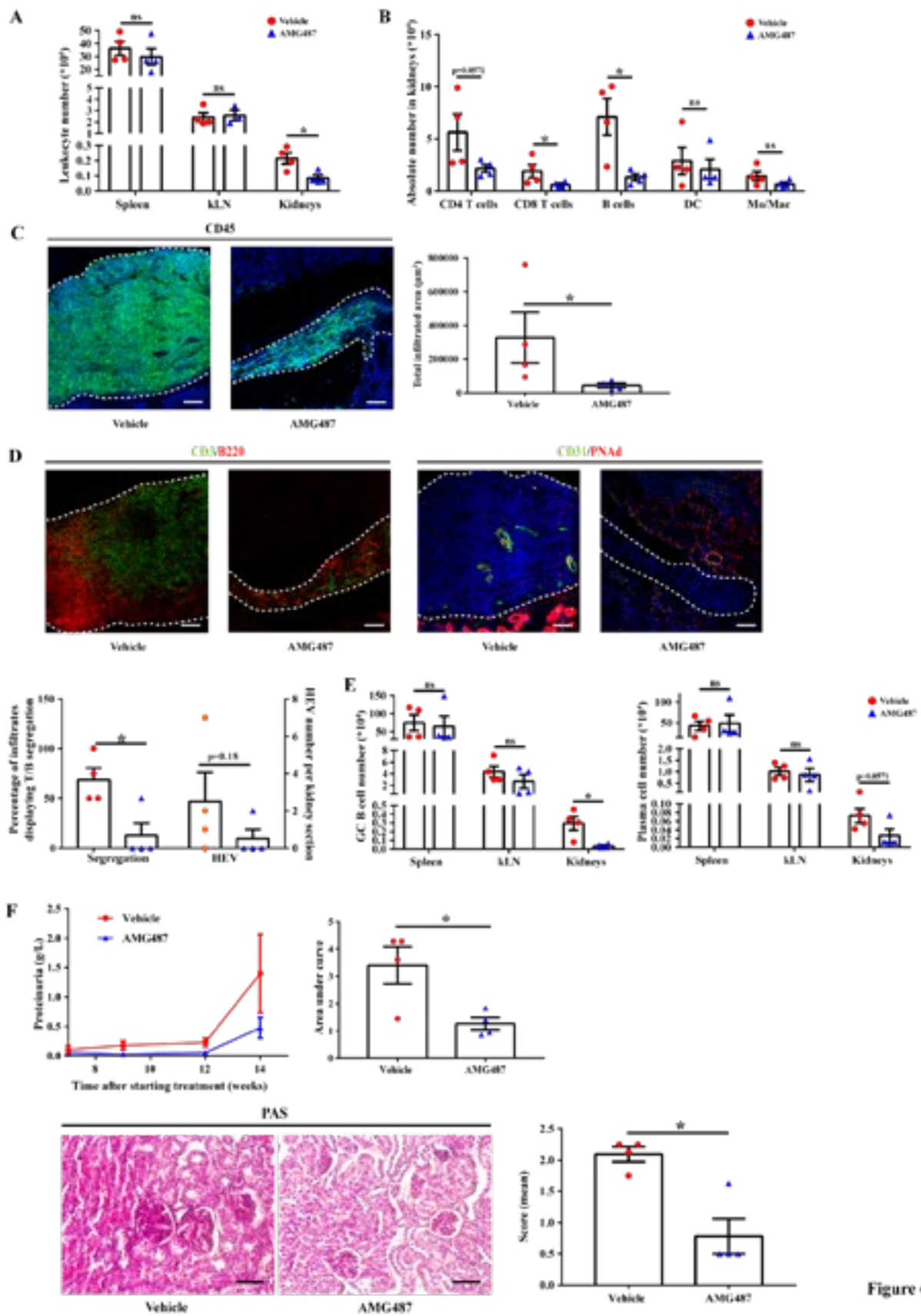


Figure 6

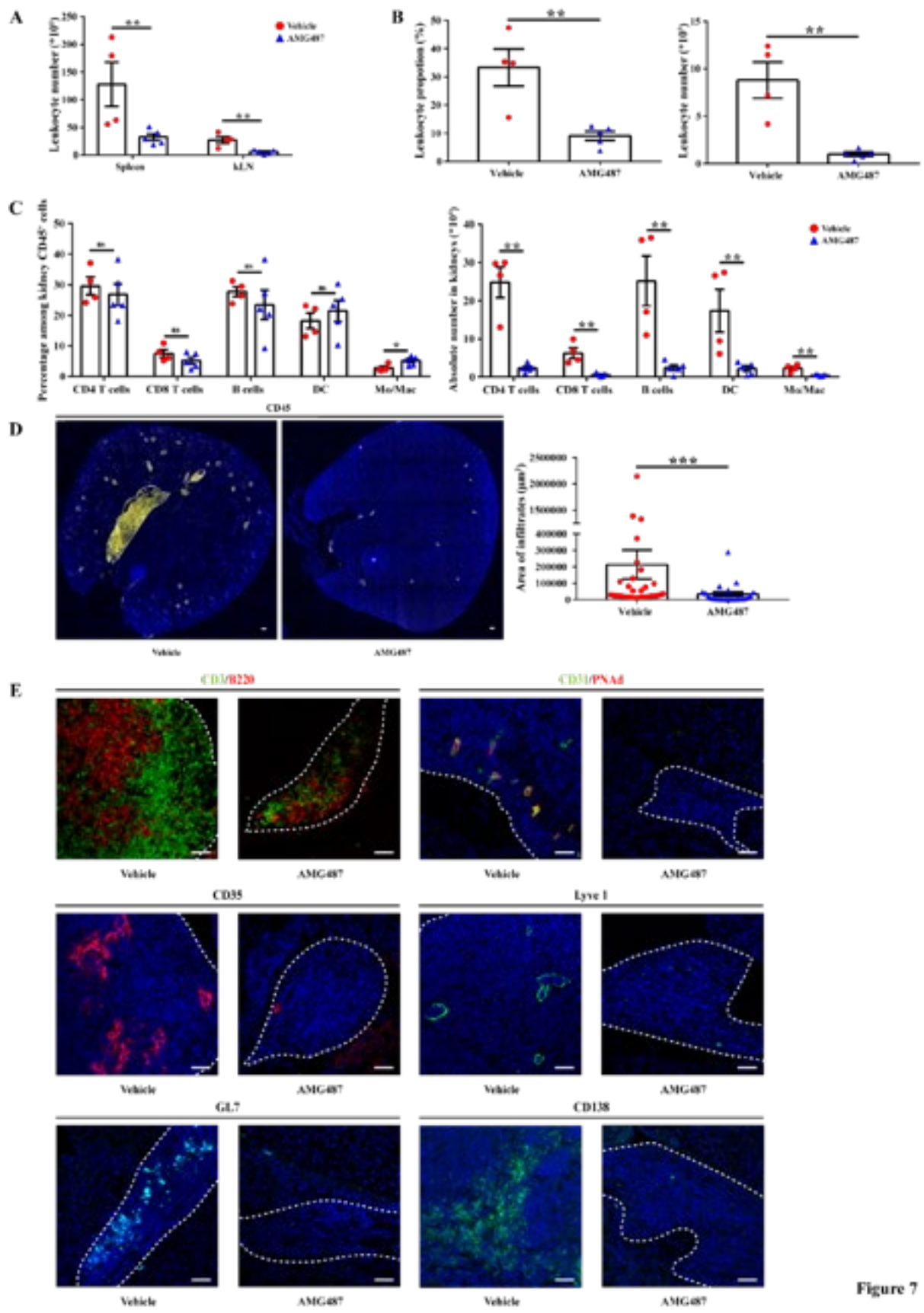


Figure 7

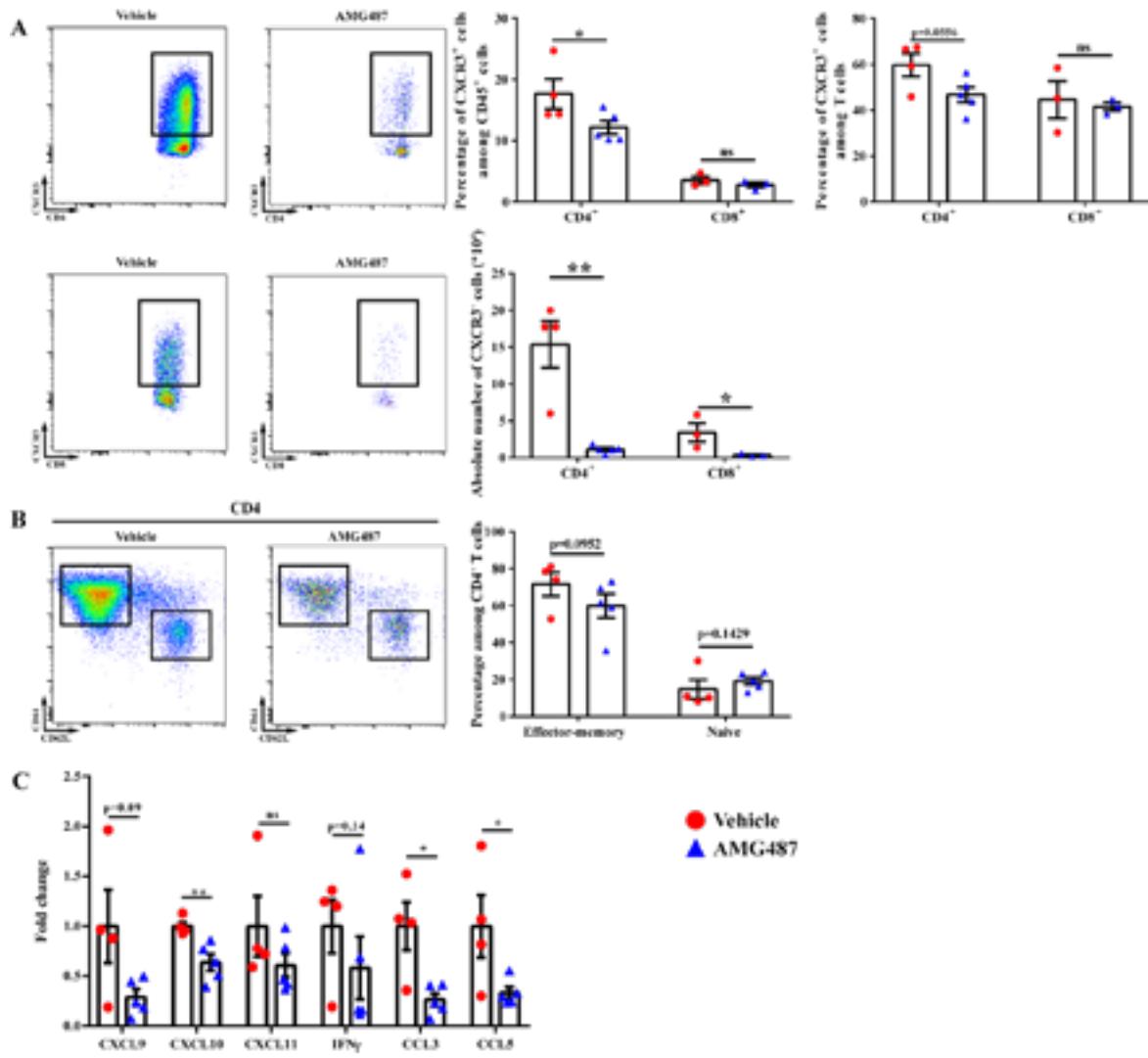


Figure 8

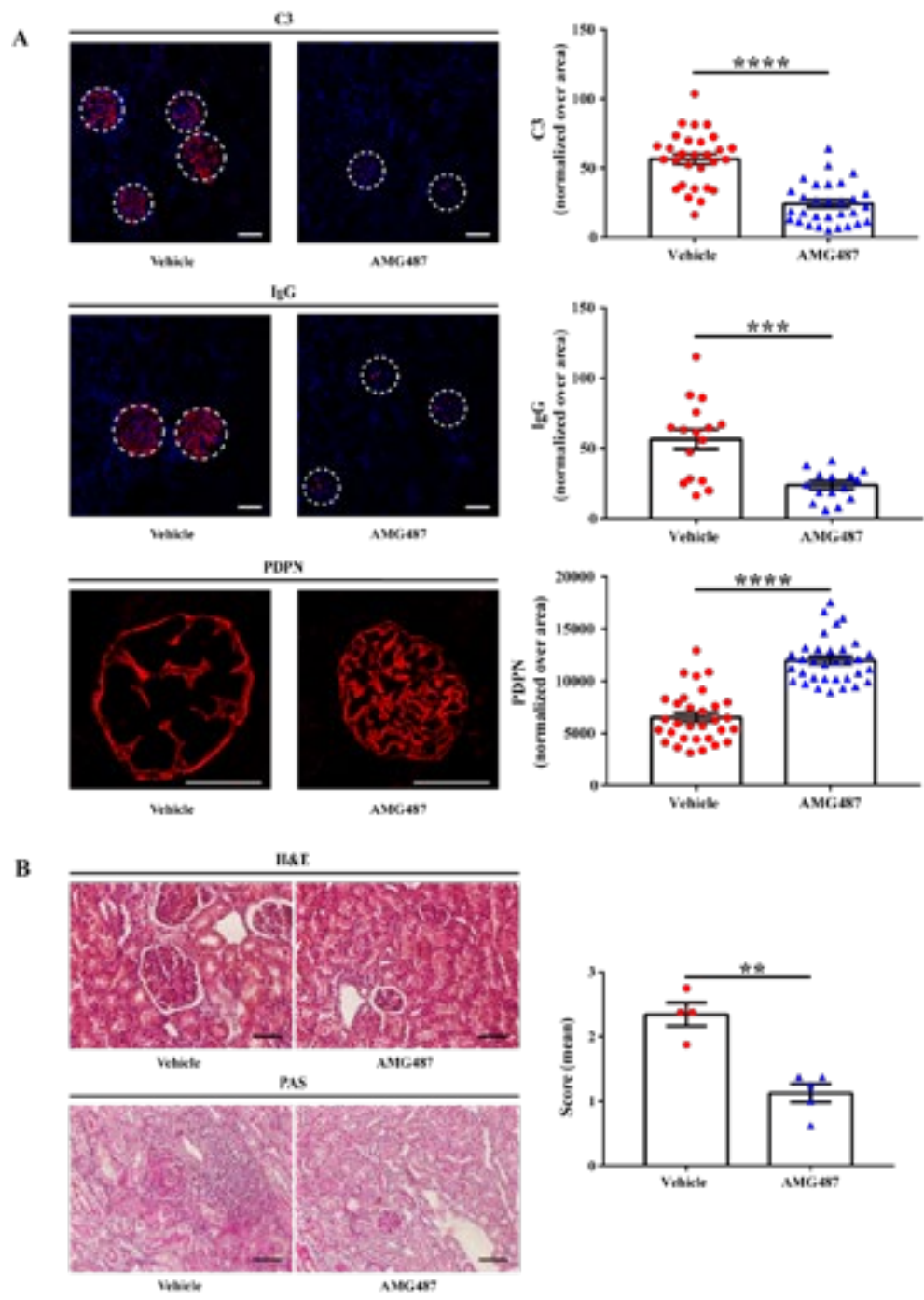


Figure 9

III-Résultats complémentaires et discussion.

Les objectifs de cette étude étaient d'identifier les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents à la formation des OLT dans les reins de souris NZB/W.

Nous avons tout d'abord pu remarquer que l'infiltration des reins par les leucocytes démarre très tôt au cours du développement de la maladie, chez des souris NZB/W âgées de 11 à 13 semaines. Cette infiltration précoce se produit en l'absence de dépôts rénaux ou de taux sériques détectables d'auto-anticorps. Ce résultat est fort intéressant mais assez surprenant car il classiquement admis que le dépôt des anticorps dans les reins est l'évènement initiateur de l'inflammation rénale.

La caractérisation des petits infiltrats immunitaires rénaux précoces nous a permis de montrer qu'ils sont majoritairement composés de LT activés exprimant le récepteur aux chimiokines inflammatoires CXCR3. Ces LT s'accumulent spécifiquement dans les reins en réponse très probablement à l'augmentation rénale des trois ligands de CXCR3 (CXCL9, CXCL10 et CXCL11) que nous avons observée. Bien que cette augmentation soit relativement faible, nous pensons qu'elle est suffisante pour attirer les premières cellules dans les reins. Nous n'avons, pour l'heure, pas encore déterminé pourquoi ces chimiokines étaient augmentées dans les reins de jeunes souris NZB/W mais nous pensons que des dérégulations au niveau de certains micro-ARN et de la prise en charge des acides nucléiques pourraient être impliquées (ce point sera discuté dans la partie **conclusion/discussion**).

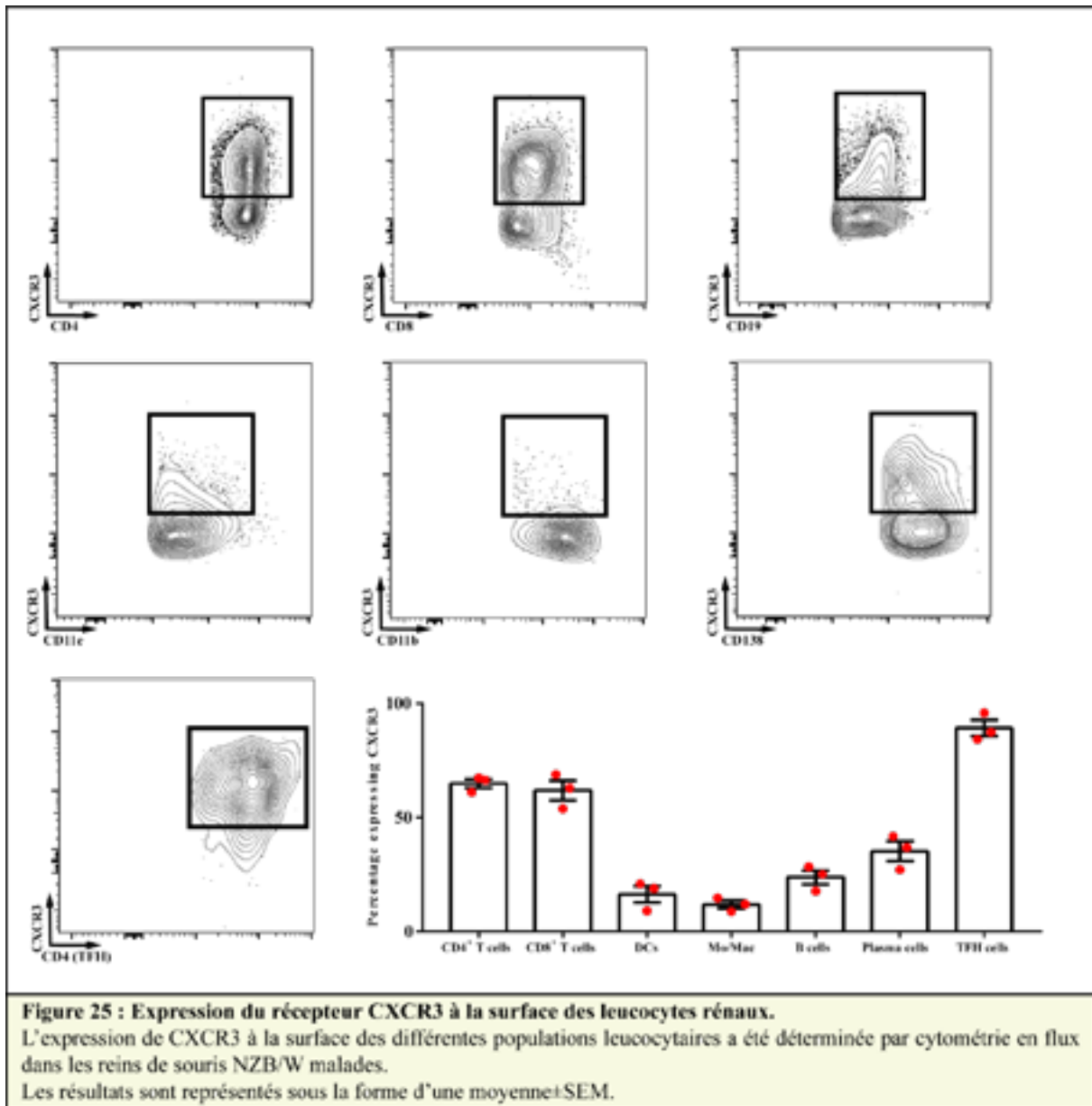
Afin de prouver l'implication de CXCR3 dans la migration leucocytaire précoce, nous avons réalisé un transfert adoptif de splénocytes marqués au CFSE à des souris lupiques ayant reçu ou non un antagoniste du récepteur CXCR3 : la molécule AMG487. Ce composé, développé par la compagnie AMGEN, est un dérivé de quinazolones se comportant comme un inhibiteur non compétitif de CXCR3. Cette molécule permet d'inhiber la formation de métastases pulmonaires lors du cancer du sein (**Walser et al., 2006**) et de réduire la sévérité de la maladie du greffon contre l'hôte chez la souris (**Miao et al., 2018**). Nous avons alors pu montrer que le blocage de CXCR3 permettait de diminuer la migration des cellules marquées dans les reins sans affecter leur migration au niveau de la rate, impliquant ainsi CXCR3 spécifiquement dans la migration rénale précoce des leucocytes. Nous avons ensuite décidé d'administrer l'antagoniste AMG487 à des souris NZB/W jeunes et ce, jusqu'au développement de la protéinurie classiquement observé vers l'âge de 25 semaines. Nous pensions qu'empêcher la migration des LT dans les reins pourrait inhiber la formation des OLT et ainsi prévenir le développement de la néphrite lupique. La première chose que nous avons pu remarquer est une diminution du nombre de leucocytes spécifiquement dans les reins. Les

plus fortes différences ont alors été observées au niveau des lymphocytes. La baisse du recrutement des LT était attendue, ces derniers présentant une forte expression du récepteur CXCR3. En ce qui concerne les LB, nous pensons que la migration réduite des LT a impacté la formation des OLT et ainsi, la production locale de chimiokines permettant le recrutement des LB dans les reins. Nous avons pu remarquer une baisse des plasmocytes et des LB du GC dans les reins sans observer de différences au niveau des OLS, tant au niveau du GC que de la cellularité globale de ces organes. De plus, il ne semble pas y avoir de différences quant à la production des auto-anticorps. Cela se trouve être intéressant car nous aurions alors un effet spécifiquement au niveau des reins et ciblant donc les OLT mais pas les OLS. Il faut toutefois nuancer ce résultat car nous avons arrêté l'expérience lorsque les souris ont atteint l'âge de 24-25 semaines (du fait du développement d'une protéinurie chez certains de nos animaux). A cet âge, les souris NZB/W présentent des symptômes assez hétérogènes et nous ne pouvons pas exclure le fait que certaines souris auraient pu développer ultérieurement une atteinte rénale ou une réponse systémique plus intense. Il faudrait poursuivre l'administration de l'AMG487 sur un temps plus long afin de déterminer si ce traitement peut avoir un impact ou non sur la réponse auto-immune systémique. Un dernier point intéressant concernant le blocage de CXCR3 sur le long terme est le dépôt d'auto-anticorps. Nous avons pu en effet remarquer une diminution des dépôts rénaux d'anticorps et de complexes immuns chez les souris traitées avec l'AMG487 et ce, en dépit de taux similaires d'auto-anticorps dans le sérum. Plusieurs explications s'offrent alors à nous. Tout d'abord, nous avons analysé les IgG totales, ce qui ne nous permet peut-être pas de détecter un effet sur une seule sous-classe d'IgG. Ainsi, Moser et ses collaborateurs ont montré que CXCR3 est requis pour la production des IgG1 (**Moser et al., 2012**). La seconde explication serait que CXCR3 étant impliqué dans la prolifération des cellules mésangiales (**Wörnle et al., 2004**), son blocage va réduire la prolifération du mésangium et la production de la matrice qui lui est associée, diminuant le potentiel de liaison des auto-anticorps.

Enfin, nous avons voulu déterminer si le blocage de CXCR3 pouvait présenter un potentiel thérapeutique chez des souris présentant déjà une atteinte rénale au moment de l'administration de l'AMG487, ce qui impliquera également CXCR3 dans le processus de maintien des OLT et pas seulement dans leur néogenèse. Nous avons observé une diminution des leucocytes dans les reins mais également une baisse de la cellularité des ganglions lymphatiques drainant les reins et de la rate. Cet effet sur les OLS était assez surprenant au vu de nos résultats présentés ci-dessus, mais il faut certainement prendre en compte plusieurs éléments. Premièrement, la réduction de la cellularité et de la taille des OLS en question les ramène à un niveau semblable à ce que l'on peut observer chez des souris n'ayant pas encore

développé la pathologie lupique. Il semble donc que cela se rapproche davantage d'une normalisation des splénomégalie et lymphadénopathie typiques du lupus. Deuxièmement, il est possible que CXCR3 soit également impliqué dans une migration des leucocytes vers les OLS lorsque la maladie est à un stade avancé, en réponse à une augmentation des ligands de CXCR3 dans la rate et les ganglions des souris lupiques malades. Nous n'avons pour le moment pas pu vérifier cette hypothèse mais elle semble plausible au vu de 1) l'augmentation des ligands de CCR1 dans la rate des souris NZB/W malades (**Bignon *et al.*, 2014**) et 2) la capacité des HEV, par exemple, à présenter des chimiokines inflammatoires (telle que CXCL9) afin de recruter les cellules provenant des tissus (**Janatpour *et al.*, 2001**). Si l'on en revient aux reins, nous nous attendions à observer un effet particulièrement sur les LT, ces derniers étant fortement représentés dans les reins et exprimant de forts taux membranaires de CXCR3. Bien que les LT (CD4⁺ et CD8⁺) se trouvent effectivement être les plus affectés, nous avons pu également observer une diminution des LB, DC et cellules de type monocytes/macrophages. Deux hypothèses peuvent expliquer ces résultats. La première est que l'impact du blocage de CXCR3 sur les LT aboutit à une réduction de l'inflammation rénale et à une déstructuration des OLT, cette déstructuration se traduisant par une diminution de diverses chimiokines dans les reins et à une baisse de migration des autres cellules immunitaires. Cette hypothèse est tout à fait plausible puisque nous avons pu observer une tendance à la diminution de l'expression de CCL19, CXCL13, CCL3 et CCL5 à la suite du traitement (**Résultat non montré** dans le cas de CCL19 et CXCL13). La seconde hypothèse serait quant à elle que, comme les LT, les autres leucocytes présents dans les reins exprimeraient le récepteur CXCR3. Nous avons décidé d'explorer cette seconde hypothèse en étudiant l'expression de CXCR3 à la surface des différentes populations de leucocytes, par cytométrie en flux, dans les reins de souris NZB/W malades. Nous avons alors bel et bien retrouvé une forte expression de CXCR3 à la surface des LT et des plasmocytes tel que décrit par notre équipe (**Lacotte *et al.*, 2013**) mais nous avons également remarqué que des LB, des DC et des monocytes/macrophages exprimaient également CXCR3 (**Figure 25**). Cela pouvait alors expliquer nos observations suite au traitement par l'AMG487, d'autant plus que les monocytes/macrophages sont les cellules exprimant le moins CXCR3 et se trouvent justement être ceux qui paraissent le moins affectés par son blocage (**Figure 25** et **Publication N°2**). Enfin, nous avons pu noter, de manière intéressante, que la quasi-totalité des TFH présents dans les reins expriment CXCR3 (**Figure 25**). Ce résultat est cohérent avec leur forte production d'IFN γ (**Publication N°1**). Ce résultat appuie ainsi l'hypothèse que la diminution des TFH1 circulants chez les patients lupiques (**Le Coz *et al.*, 2013**) pourrait être due à leur migration dans les organes enflammés dont les reins. Au vu d'une

part, de la courte durée du traitement et, d'autre part, d'un nombre relativement faible de cellules exprimant CXCR3, il est difficile de privilégier une hypothèse par rapport à une autre, la réalité se situe probablement à l'interface des deux : un blocage de la migration des cellules exprimant CXCR3 combinée à une baisse de diverses chimiokines permettant d'attirer les cellules exprimant d'autres récepteurs aux chimiokines comme CXCR5, CCR1 ou CCR5.



Enfin, l'intérêt de notre étude était également de pouvoir mettre en lumière une éventuelle cible thérapeutique permettant un traitement plus spécifique que ceux actuellement utilisés dans le cadre de la néphrite lupique. Le blocage de la voie CXCR3, plutôt que le ciblage de molécules/chimiokines impliquées dans la formation des OLT mais jouant également un rôle au niveau des OLS (par exemple CCL19), semblait donc une alternative prometteuse. Nous avons, en plus de la diminution de l'infiltration rénale par les leucocytes, pu observer une

désorganisation quasi-totale des OLT suite à l'injection de la molécule AMG487 à des souris malades. Les infiltrats résiduels ne contiennent quasiment plus de cellules stromales. Ces changements s'accompagnent également d'une diminution de CCL19 et CXCL13 dans les reins. Fait encore plus intéressant, il semble que le ciblage de la voie CXCR3 affecte la mise en place des GC dans les reins, ce qui concorde avec la perte des OLT, mais n'influe pas sur la proportion de plasmocytes ou de LB du GC dans la rate et les ganglions. Cela indiquerait donc que notre stratégie thérapeutique exerce un effet ciblé n'ayant que peu d'impact sur la réponse immunitaire en dehors des reins. Bien évidemment, il faudra confirmer ces résultats en déterminant si les taux d'auto-anticorps circulants sont affectés ou non par notre traitement, en réalisant une analyse poussée des OLS (par immunofluorescence par exemple) et vérifier que les souris traitées sont capables de monter une réponse immunitaire normale en dépit du blocage de CXCR3. De plus, si le traitement ne s'accompagne d'aucun effet fonctionnel majeur sur les OLS nous pourrions alors détenir une potentielle preuve de la participation des OLT à la mise en place de l'atteinte rénale et donc à la mise en place d'une réponse auto-immune locale. Pour finir, il faut toutefois se demander si l'utilisation de la molécule AMG487 peut affecter d'autres organes que le rein, comme les glandes salivaires. Il a en effet été montré que chez la souris NOD, l'utilisation d'un anticorps neutralisant CXCR3 permet de réduire le nombre de LT CD8⁺CXCR3⁺ dans le tissu glandulaire et se traduit par une amélioration de l'état de l'organe (**Zhou et al., 2018**). La souris lupique NZB/W étant reconnue comme un modèle de lupus mais également de syndrome de Sjögren secondaire (**Jonsson et al., 1987**), nous avons voulu déterminer si le blocage de CXCR3 pouvait affecter l'infiltration des glandes salivaires. De manière surprenante, blocage de CXCR3 chez des souris NZB/W malades ne semble pas affecter le contenu en leucocytes des glandes salivaires contrairement à ce que l'on peut observer dans les reins (**Figure 26A**). Concernant les différentes populations de leucocytes il semble y avoir une légère tendance à la diminution du nombre de LT CD4⁺ et de LB (**Figure 26B**) et il est également possible de retrouver une tendance à la diminution de la proportion de LT CD4⁺CXCR3⁺ mais pas des LT CD8⁺CXCR3⁺, contrairement à ce qu'il était possible d'observer chez la souris NOD. Il faut toutefois prendre en compte le fait que les pourcentages de LT CXCR3⁺ sont inférieurs dans les glandes salivaires en comparaison aux reins (8,5% de LT CD4⁺CXCR3⁺ dans les glandes salivaires contre 17,7% dans les reins). Cela indiquerait alors une moindre implication de la voie CXCR3 dans l'infiltration des glandes salivaires, expliquant ainsi pourquoi l'injection de la molécule AMG487 n'a que peu d'effets sur l'infiltration des glandes salivaires. Ainsi, la voie CXCR3 serait majoritairement impliquée

dans la migration des leucocytes dans les reins et son blocage représente alors une thérapie ciblée et prometteuse.

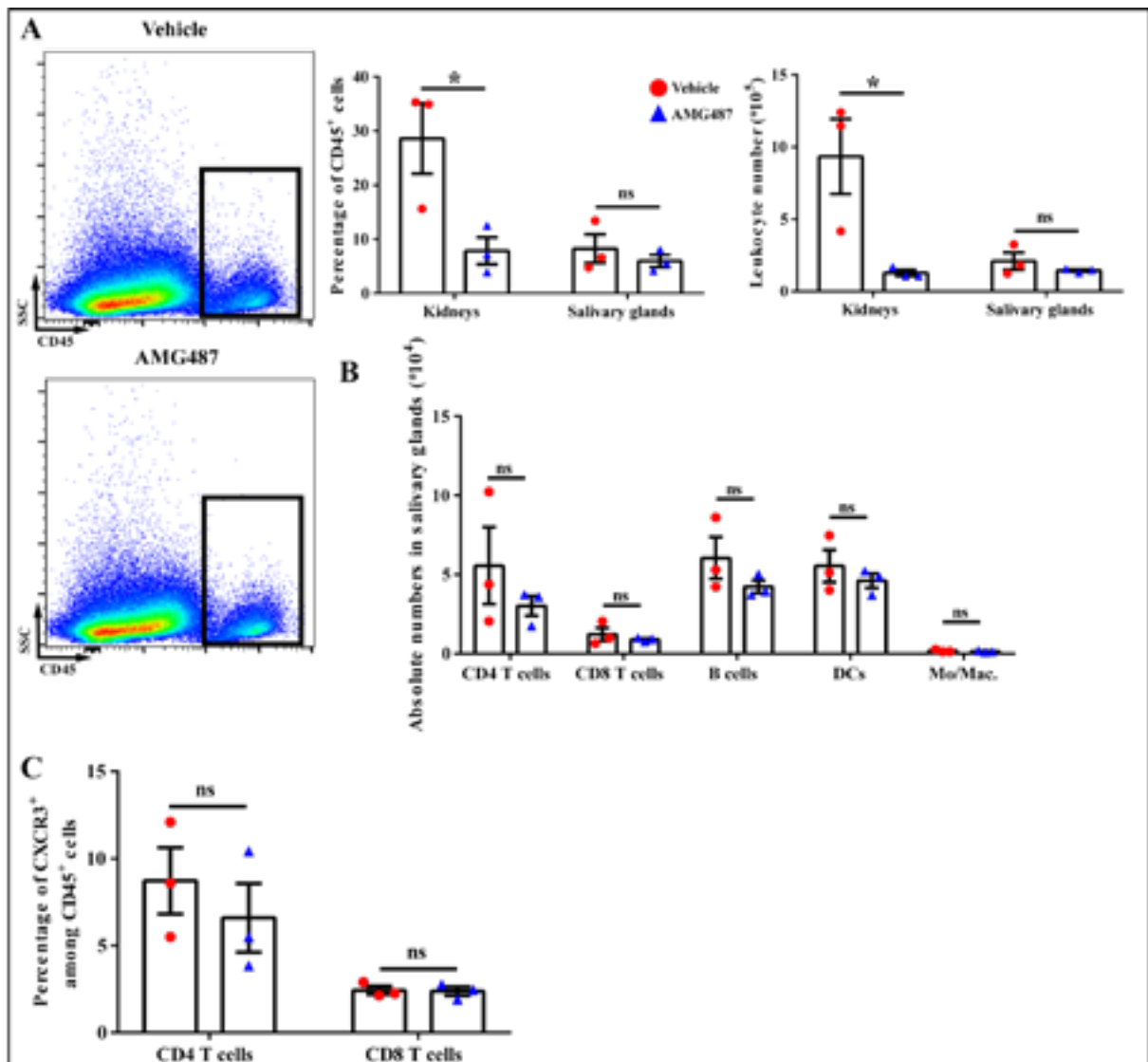


Figure 26 : Impact du blocage de CXCR3 sur l'infiltration des glandes salivaires.

Le pourcentage et le nombre absolu de leucocytes (A), le nombre absolu des différentes sous-populations leucocytaires (B) et le pourcentage de LT CD4 ou CD8 exprimant CXCR3 parmi les leucocytes (C) dans les reins (A) et les glandes salivaires (A-C) de souris NZB/W malades traitées ou non avec l'antagoniste de CXCR3 (AMG487) ont été déterminés par cytométrie en flux.

Les résultats sont représentés sous la forme d'une moyenne±SEM. ns : non significatif ; *p<0,05 (Mann-Whitney)

Chapitre 3 : Néogenèse, composition et ciblage des OLT : résultats complémentaires.

L-Avant-propos.

Lors des deux études précédemment décrites, nous avons pu mettre en évidence la présence d'OLT fonctionnels dans les reins de souris lupiques NZB/W et nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents à la formation de ces structures. La **Publication N°1** décrit la présence d'OLT fonctionnels dans les reins des souris NZB/W présentant une atteinte rénale. Ces OLT sont caractérisés par un haut degré d'organisation et contiennent des cellules stromales dont la production locale de diverses chimiokines permet la structuration de l'OLT. En plus d'une organisation similaire aux OLS, les OLT rénaux sont fonctionnels. Ils contiennent des LB en prolifération, et plus particulièrement des LB du GC ainsi que des TFH. L'enzyme AID est exprimée dans les reins de nos souris et les TFH présents produisent diverses cytokines (dont l'IL21). L'ensemble de ces facteurs indique que ces structures permettent la différenciation des LB et la production locale d'auto-anticorps. Nous avons alors entrepris lors de l'étude donnant lieu à la **Publication N°2**, de déterminer les mécanismes induisant la formation des OLT dans notre modèle murin de lupus, avec pour objectif futur de développer une éventuelle nouvelle approche pour le traitement de la néphrite lupique. Ce travail montre que le développement des OLT est un processus démarrant très tôt au cours de la maladie et que l'infiltration des reins par les cellules immunitaires se fait avant même le dépôt rénal d'auto-anticorps/de complexes immuns. Les infiltrats immunitaires rénaux précoces sont majoritairement composés de LT activés exprimant le récepteur CXCR3. Ces LT sont attirés en réponse à une augmentation de l'expression des trois ligands CXCL9, 10 et 11 et le blocage de CXCR3 permet de réduire la migration précoce des LT. Finalement, le blocage de CXCR3, avant ou après la survenue de l'atteinte rénale, permet d'empêcher la formation ou de rompre les OLT formés et cela se reflète par une amélioration de l'atteinte rénale.

Dans ce chapitre de résultats complémentaires, nous nous proposons, dans un premier temps, de revenir plus en détails sur la caractérisation des OLT, en particulier sur la description et le rôle des cellules stromales au sein des OLT. De plus, nous allons aborder la formation des OLT, tant au niveau des étapes précoces et de la potentielle implication de divers facteurs décrit comme impliqués dans la formation des OLS et/ou des OLT, qu'au niveau des étapes un peu plus tardives avec une emphase sur la migration rénale des LB.

II-Caractérisation approfondie et rôle du stroma dans les OLT rénaux.

A) Caractérisation des cellules stromales dans les reins par cytométrie en flux.

La présence de cellules stromales dans le contexte des OLT a d'ores et déjà été étudié dans d'autres pathologies. La grande majorité de ces études se sont basées, comme c'est le cas dans notre **Publication N°1**, sur des marquages sur coupes de tissus, comme par exemple dans l'étude menée par Link et ses collaborateurs (**Link et al., 2011**). Cependant, l'isolement de cellules stromales permettrait d'obtenir un aspect plus quantitatif ainsi que de suivre plus aisément leur mise en place au cours de la maladie.

Ainsi, parallèlement à la mise en évidence de la présence de cellules stromales par immunofluorescence sur coupes de reins, nous avons donc procédé à la mise au point d'un protocole afin d'isoler les cellules stromales à partir des reins. Dans un premier temps, nous avons procédé à la même digestion que celle utilisée afin d'isoler les leucocytes rénaux en augmentant simplement la quantité de collagénase D mais cette approche ne nous permit pas d'obtenir des résultats satisfaisants (**Figure 27A**). Nous avons alors décidé d'utiliser également de la dispase II et de procéder à la digestion sous forte agitation, avant de réaliser un gradient de Percoll biphasique. Cette nouvelle digestion ne se révéla pas plus efficace par rapport à la précédente et, de plus, elle semblait impacter la viabilité des cellules qui se trouvaient plus difficilement séparables via le gradient de Percoll (**Figure 27B**). Nous avons donc décidé de revenir à une digestion douce mais de modifier le gradient de Percoll. En effet, après de nombreuses recherches, nous avons pu remarquer que certaines équipes avaient réussi à séparer leucocytes et cellules stromales de la manière suivante : les lymphocytes et cellules mononuclées ainsi que les cellules endothéliales se localisent à l'interphase 75-40%, tandis que les cellules épithéliales et les fibroblastes se retrouvent entre les phases 40 et 30%. Nous avons également voulu ajouter une étape d'enrichissement en éliminant les cellules immunitaires et les globules rouges. Ce protocole nous a alors permis de visualiser une population de cellules PDPN⁺ et une population de cellules CD31⁺. Cependant, nous n'avons pas réussi à clairement mettre en évidence la présence de cellules du type LEC par cette méthode (**Figure 27C**). Cela nous a conduit à finalement utiliser le protocole retrouvé dans les études du Dr Francesca BARONE (**Figure 27D**) qui s'intéresse au stroma dans les glandes salivaires.

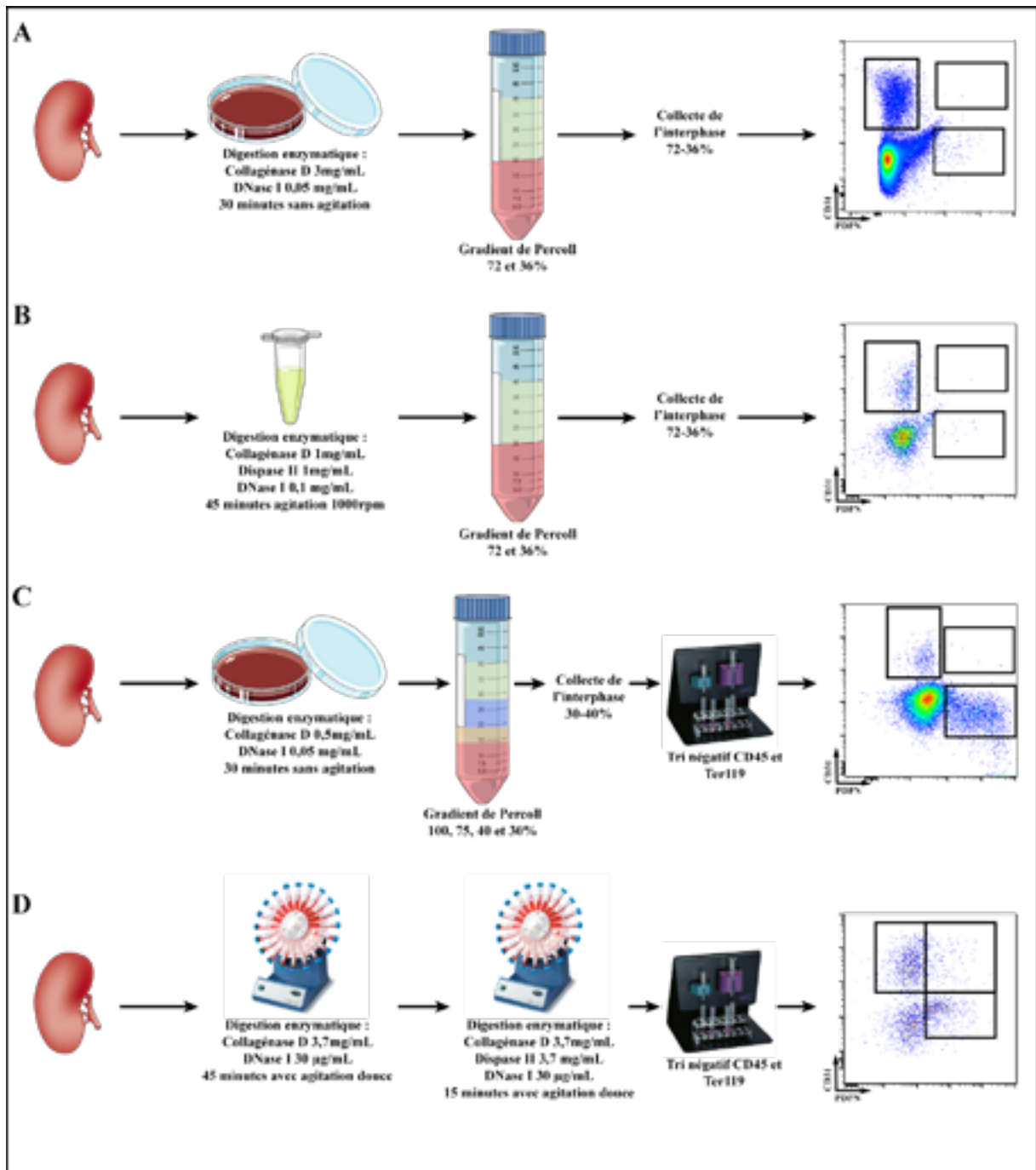


Figure 27 : Mise au point de la digestion des reins afin d'isoler les cellules stromales.

A) Digestion des reins 30 minutes avec de la collagénase D et de la DNase I avant dépôt sur gradient de percoll. L'interface entre les phases 72 et 36% est collectée puis analysée par cytométrie en flux.

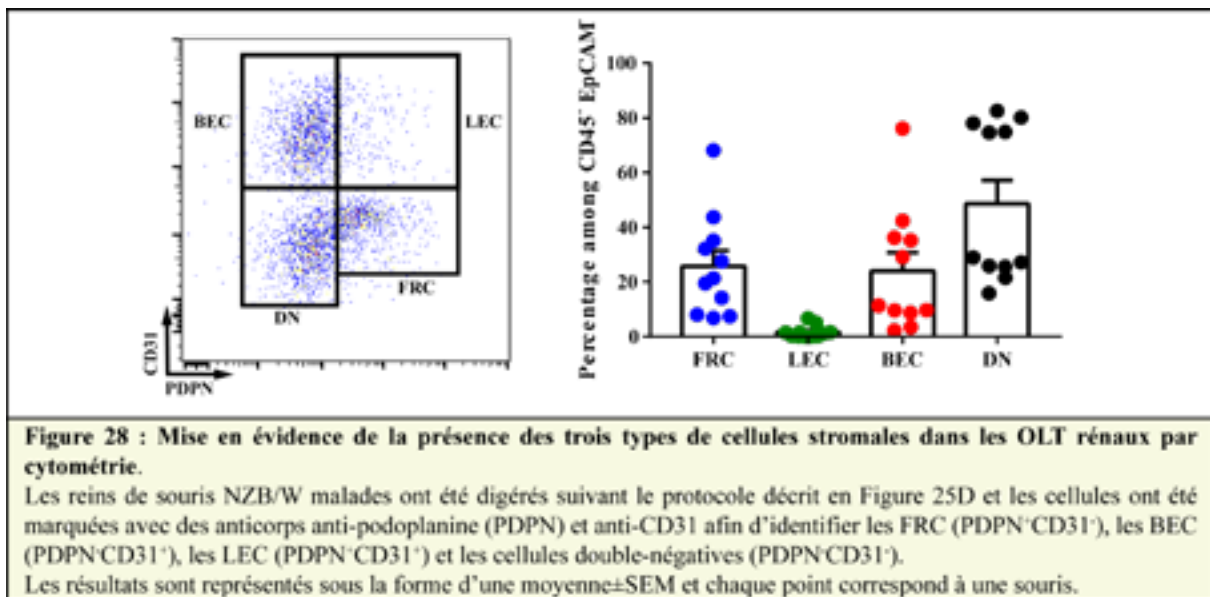
B) Digestion des reins 45 minutes sous agitation avec de la collagénase D, de la dispase II et de la DNase I avant dépôt sur gradient de percoll. L'interface entre les phases 72 et 36% est collectée puis analysée cytométrie en flux.

C) Digestion des reins 30 minutes avec de la collagénase D et de la DNase I avant dépôt sur gradient de percoll. L'interface entre les phases 40 et 30% est collectée, enrichie en cellules stromales par tri négatif éliminant les leucocytes et les globules rouges avant analyse en cytométrie en flux.

D) Digestion des reins 45 minutes sous agitation douce avec de la collagénase D et de la DNase I puis digestion des fragments restants avec collagénase D, dispase II et DNase I. Enrichissement en cellules stromales par tri négatif éliminant les leucocytes et les globules rouges avant analyse par cytométrie en flux.

Ainsi, nous avons pu retrouver, après digestion, les diverses populations stromales déjà mises en évidence dans la **Publication N°1** sur coupes, à savoir : les FRC, les BEC et les LEC. De plus, parmi les cellules CD45⁻EpCAM⁻, nous avons pu retrouver des proportions de cellules

stromales se rapprochant de celles des ganglions lymphatiques avec une majorité de cellules de type FRC et BEC et une plus faible proportion de LEC (**Figure 28**). Il est toutefois important de mentionner que les podocytes expriment également la podoplanine et que rien ne nous permet d'affirmer que les cellules PDPN⁺ que nous observons correspondent bien à des FRC. Il faudra donc compléter cette analyse avec divers marqueurs de fibroblastes ou de podocytes afin d'exclure la présence éventuelle de ces derniers. Néanmoins, ces résultats sont prometteurs puisque qu'ils pourraient nous permettre de définir et de suivre précisément l'état de maturation des cellules stromales durant le développement de la maladie lupique, comme cela a déjà été précédemment fait dans le contexte du développement des ganglions (**Chai *et al.*, 2013**).



B) Les cellules stromales expriment de nombreux facteurs pouvant participer à l'organisation des OLT.

Comme je l'ai mentionné lors de l'introduction, les cellules stromales jouent de nombreux rôles dans les ganglions lymphatiques. Elles produisent notamment diverses chimiokines permettant le recrutement des lymphocytes et DC, ainsi que l'organisation du follicule B et de la zone T. Nous avons pu montrer dans la **Publication N°1** que trois des principales chimiokines sont présentes dans les OLT rénaux et que leur production est en partie médiée par les cellules stromales : les FRC produisent CCL19, les FDC synthétisent CXCL13 tandis que CCL21 est associée aux vaisseaux lymphatiques formés par les LEC.

Il faut toutefois ne pas oublier que les chimiokines seules ne permettent pas l'entrée des lymphocytes, que ce soit au sein des ganglions ou lors d'une inflammation. En effet, les cellules immunitaires doivent interagir avec les cellules endothéliales, contact crucial permettant l'arrêt des leucocytes et faisant interagir des molécules d'adhésion telles qu'ICAM1 ou VCAM1

(Shamri *et al.*, 2005). De plus, lors de la mise en place des OLS, les cellules mésenchymateuses se différencient en LTo et se mettent à exprimer ICAM1 et VCAM1, permettant le recrutement des LTi et des lymphocytes. Nous avons alors émis l’hypothèse que les cellules stromales présentes dans les reins des souris lupiques expriment, elles aussi, ce type de molécules. Et effectivement, nous avons pu mettre en évidence, sur coupes et par cytométrie, une expression d’ICAM1 par les FRC et les LEC présentes dans les OLT (Figures 29 A et B). Les cellules

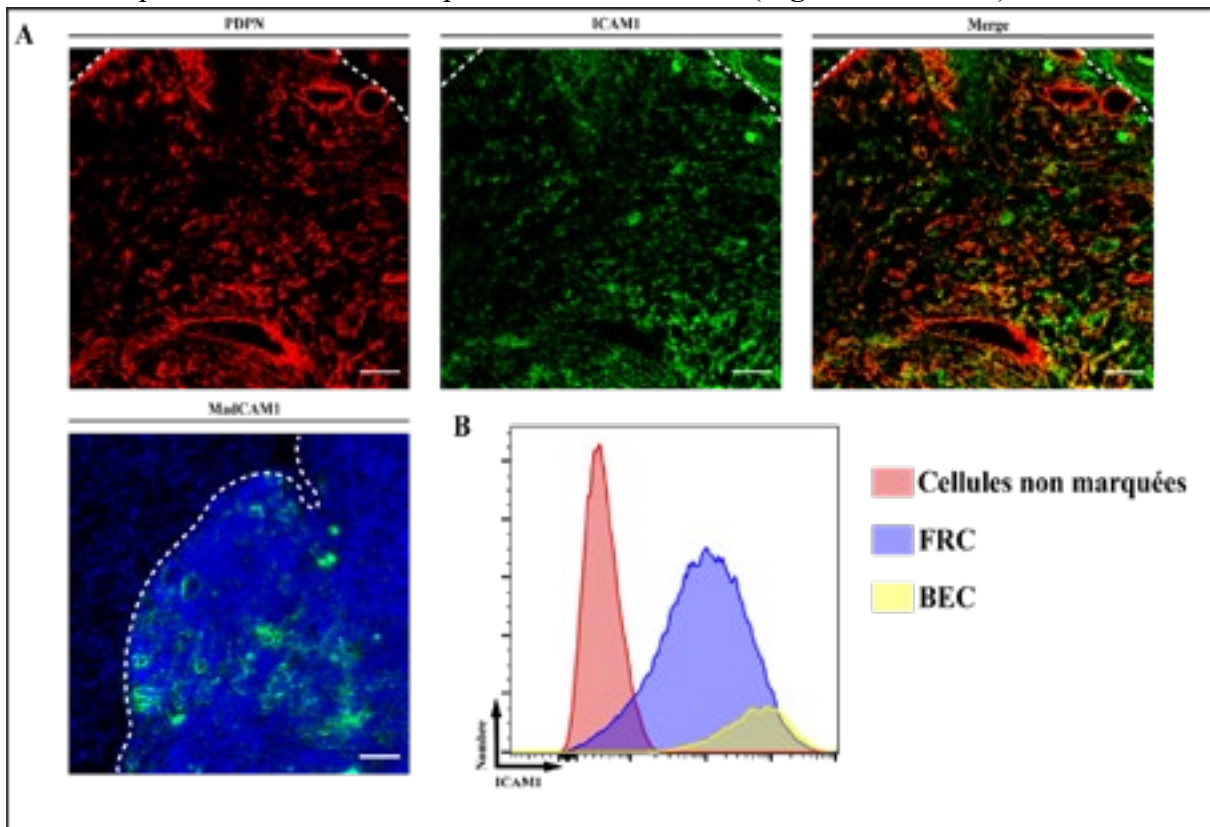


Figure 29 : Les cellules stromales expriment des molécules d’adhésion dans les OLT rénaux.
A) Des coupes de reins de souris NZB/W malades ont été marquées avec des anticorps anti-PDPN et anti-ICAM1 ou anti-MadCAM1. La barre d’échelle représente 50µm et le grossissement était de 200x.
B) Expression d’ICAM1 par les cellules stromales des OLT rénaux déterminée par cytométrie en flux.

stromales, de par l’expression de cette molécule d’adhésion, pourraient participer à la rétention des leucocytes dans les OLT rénaux chez les souris lupiques après avoir permis leur attraction via la production de chimiokines. En revanche, il fut surprenant de noter que la molécule MadCAM1 se trouvait également exprimée par les cellules stromales présentes dans les infiltrats rénaux (Figure 29A). Cette dernière est normalement exprimée par les HEV présentes dans des ganglions drainant des sites muqueux ou au niveau du sinus sous-capsulaire. La localisation des OLT étudiés ici, ainsi que l’absence de sinus, nous invite alors à nous interroger sur l’éventuelle implication de cette molécule dans ce contexte.

Le rôle des cellules stromales ne se limite cependant pas à l’expression de chimiokines et de molécules d’adhésion. Les FRC présentes dans les ganglions lymphatiques produisent du collagène qui permet la formation de conduits facilitant la diffusion des antigènes

solubles à partir de la lymphe (Gretz *et al.*, 2000). Les FRC présentes dans les OLT rénaux semblent produire également du collagène de type IV (Figure 30A), et bien que cela ne prouve en rien la présence de conduits, cela conforte la proximité phénotypique des FRC des OLT avec leur équivalent ganglionnaire. La fibronectine et la laminine sont également présentes dans les OLT chez la souris NZB/W et seraient exprimées par les FRC et les LEC respectivement (Figures 30 B et C). Ces molécules de la matrice extracellulaire interviennent dans les étapes faisant suite à la transmigration des leucocytes, elles pourraient alors intervenir dans la migration et le positionnement des leucocytes dans les OLT.

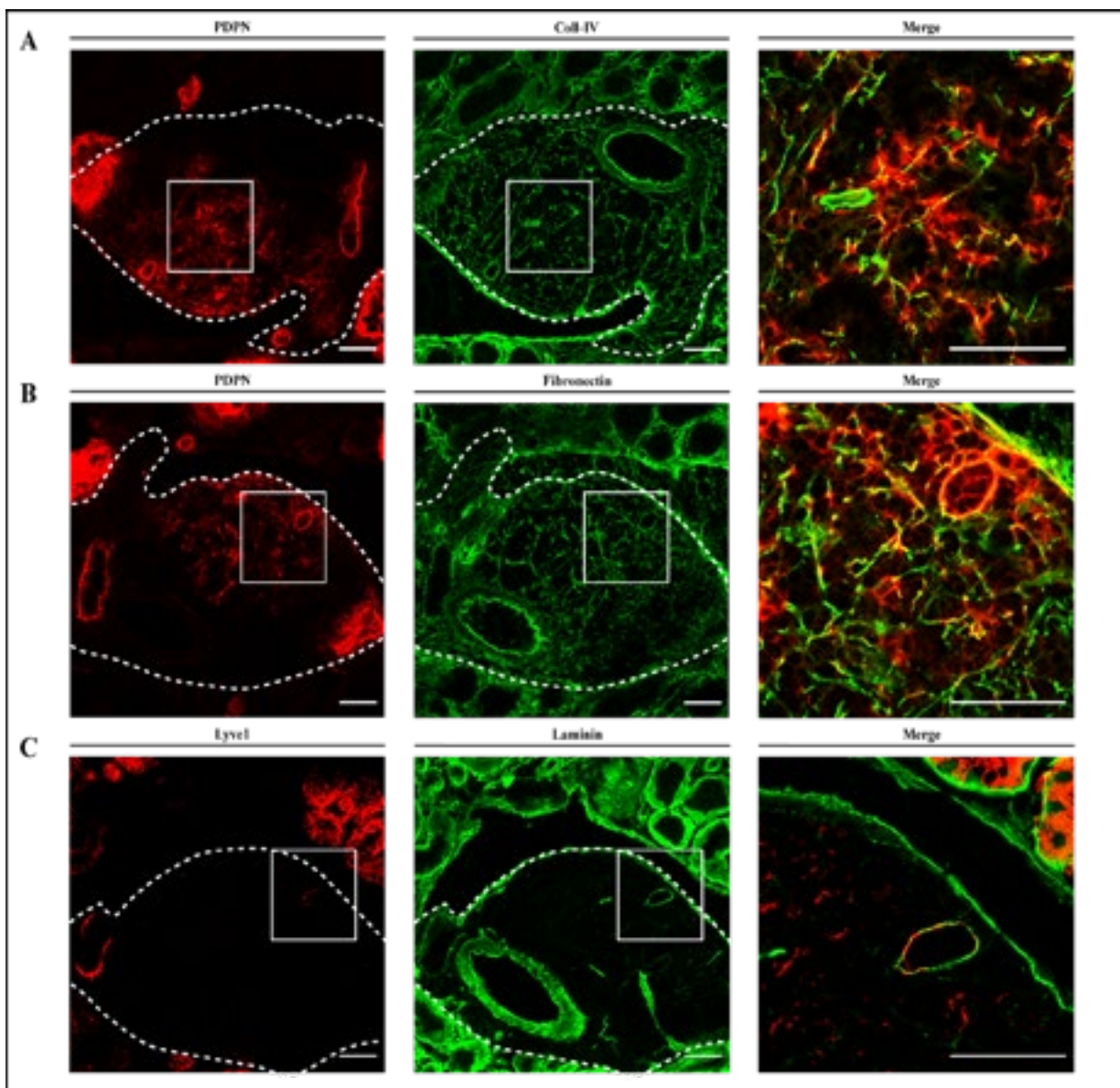


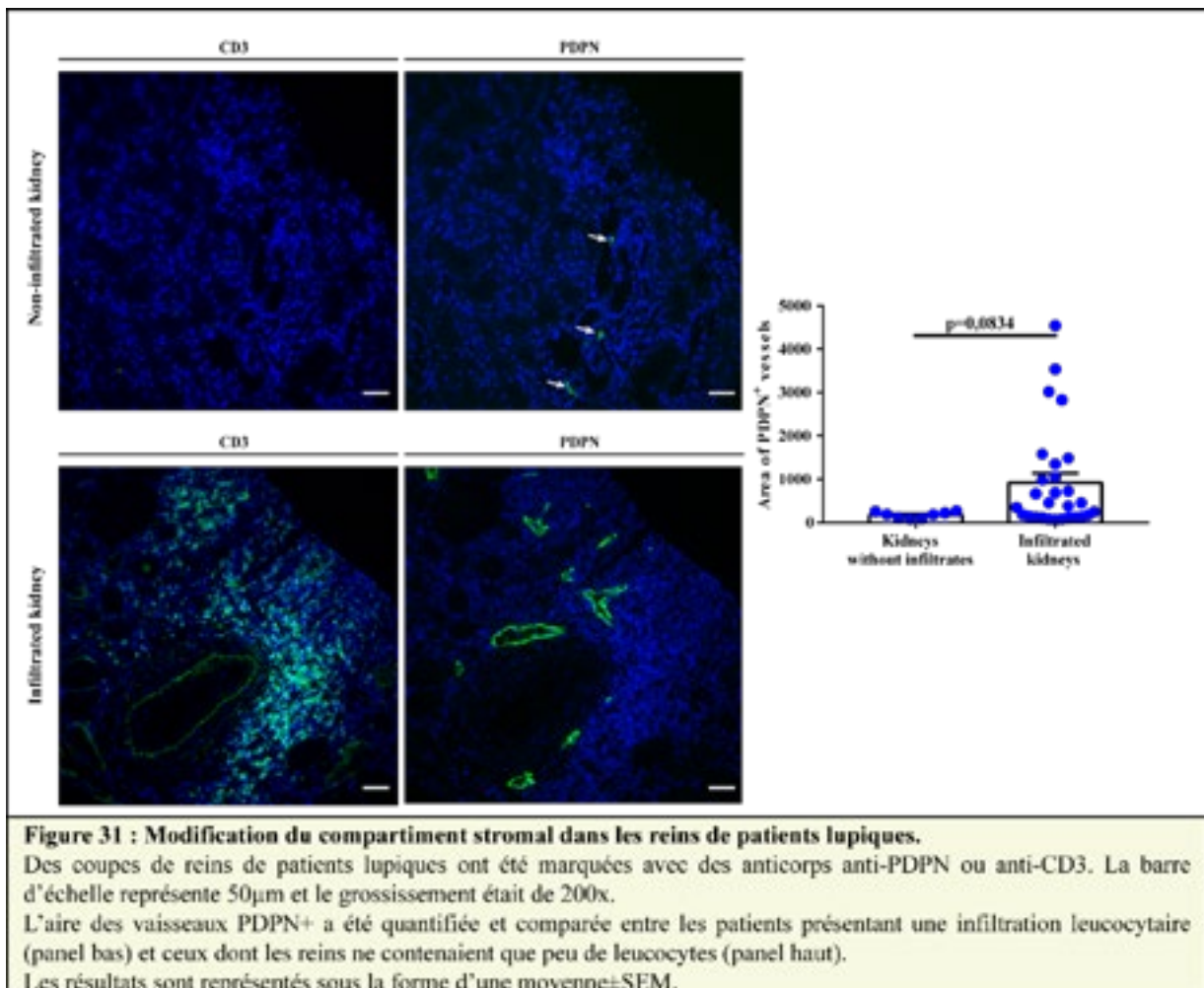
Figure 30 : Les cellules stromales expriment des molécules associées à la production de matrice extracellulaire dans les OLT rénaux.

Des coupes de reins de souris NZB/W malades ont été marquées avec des anticorps anti-PDPN et anti-collagène IV (A), anti-PDPN et anti-fibronectine (B) et anti-Lyve1 et anti-laminine. La barre d'échelle représente 50µm et les grossissements étaient de 200x et 630x (merge).

Bien que ces résultats soient préliminaires, ils nous permettent d’imaginer de manière plus précise comment les cellules stromales participent à la structuration des OLT et ils semblent également nous indiquer que les cellules que nous observons dans les OLT présentent un certain nombre de caractéristiques proches de leurs comparses présentes dans les ganglions.

C) Qu’en est-il du stroma chez l’homme au cours du lupus ?

La présence d’OLT rénaux a également été décrite chez les patients lupiques (**Chang *et al.*, 2011 ; Liarski *et al.*, 2014**). Ces études ne sont pas attardées sur les cellules stromales à l’exception des FDC. Cependant, les résultats présentés ici nous invitent fortement à nous intéresser au stroma rénal chez l’Homme. Bien que très préliminaires, mes résultats montrent une augmentation de la taille des vaisseaux PDPN⁺ dans les reins des patients présentant une forte infiltration lymphocytaire (**Figure 31**). Il est donc possible que, chez l’Homme également, il y ait une modification du compartiment stromal dans les reins.



D) Le rôle du stroma dans le développement des OLT et de la néphrite lupique.

Au vu des divers rôles potentiels du stroma en contexte lupique décrits précédemment, nous pensons qu’il peut jouer un rôle important dans la formation des OLT et le développement

de la néphrite lupique. Nous avons alors voulu déterminer les implications respectives du stroma et des leucocytes lupiques dans le développement des OLT et de la néphrite. Pour répondre à cette question, sachant que les cellules stromales sont radiorésistantes, nous avons procédé à une expérience préliminaire de transfert de moelle osseuse entre des souris lupiques NZB/W (BW) et des souris contrôles de même haplotype issues du croisement BALB/c*NZW (BC/W).

Nous avons procédé comme suit, en utilisant des souris jeunes (11 à 12 semaines) :

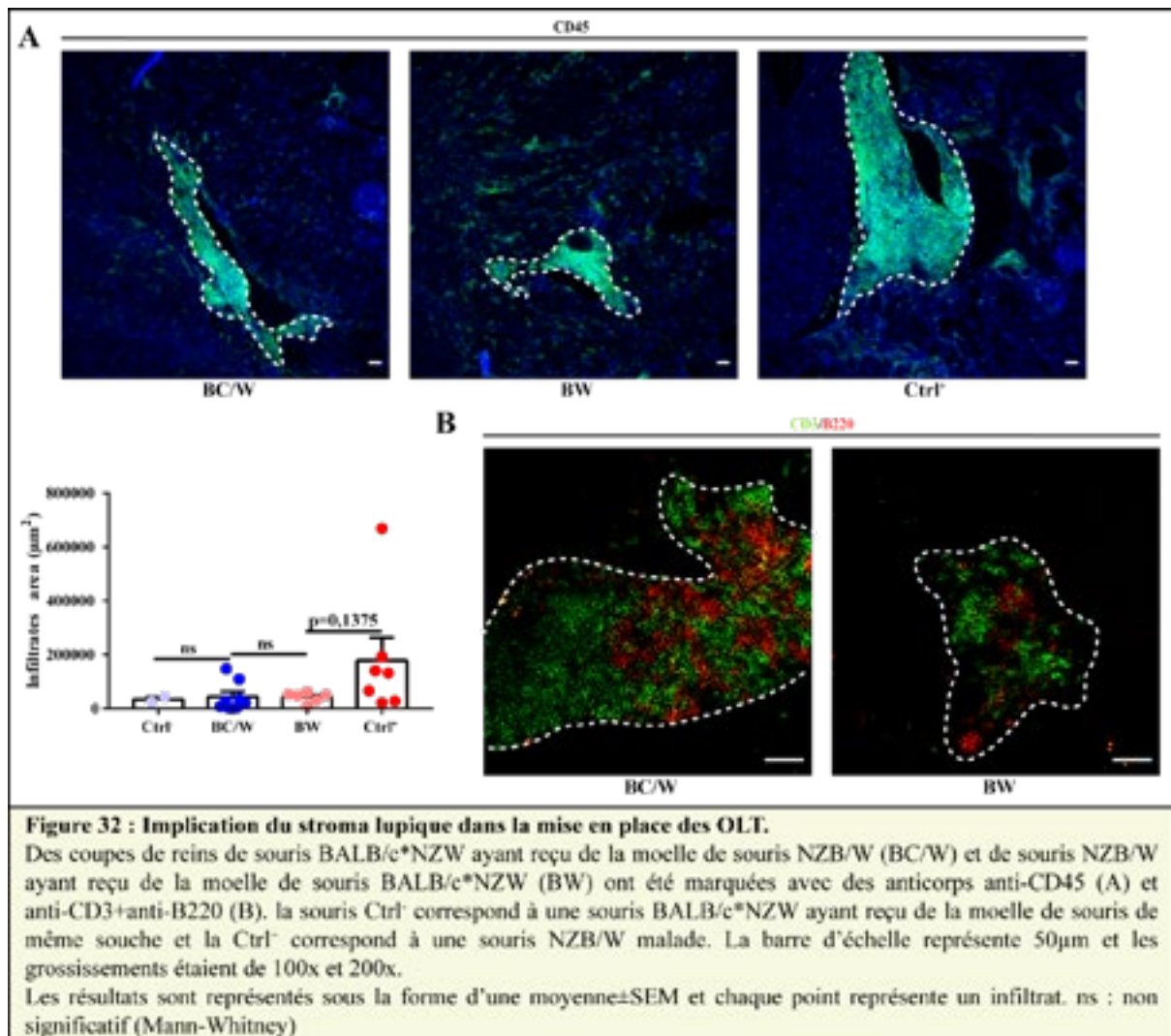
- ➔ De la moelle de souris lupiques BW a été injectée à des souris BC/W irradiées (présentant un stroma non lupique) : groupe BC/W
- ➔ De la moelle de souris BC/W a été injectée à des souris NZB/W (présentant un stroma lupique) : groupe BW
- ➔ De la moelle de souris BC/W a été injectée à une souris BC/W : groupe Ctrl⁻
- ➔ De la moelle de souris NZB/W a été injectée à une souris NZB/W : groupe Ctrl⁺

Il est toutefois important de noter ici que la souris servant de contrôle positif est décédée avant le sacrifice final à la fin de la manipulation, en présentant de forts taux d'auto-anticorps qui précèdent le développement d'une atteinte rénale et d'une mort rapide. Nous avons donc, pour la suite des expériences (ELISA et marquages sur coupes), utilisé une souris NZB/W malade afin de pouvoir avoir un comparatif positif vis-à-vis de nos autres souris.

1. Implication du stroma dans le développement des OLT.

Au vu des nombreux rôles que peuvent jouer les cellules stromales dans les OLT, nous avons tout d'abord voulu déterminer l'impact de notre protocole expérimental sur la formation des OLT rénaux. Dans un premier temps, nous avons remarqué que la souris Ctrl⁻ ne présentait que de petits infiltrats similaires à ce que l'on a déjà pu observer chez certaines souris BC/W, bien loin de la forte infiltration de cellules immunitaires existant chez les souris NZB/W malades. Cependant, nous avons observé de façon surprenante, que ni le groupe BC/W ni le groupe BW ne présentaient d'infiltrats importants comparables à ceux retrouvés chez une souris lupique (**Figure 32A**). Ces infiltrats se trouvent être de taille intermédiaire et majoritairement localisés au niveau médullaire et, de plus, ils ne présentent aucun des signes caractéristiques des OLT, comme par exemple la ségrégation T/B (**Figure 32B**). Cela suggère alors que le stroma lupique seul n'est pas suffisant pour générer des OLT, mais qu'il semble requis afin d'induire un processus de néogenèse lymphoïde optimal. Cela confirme des résultats obtenus précédemment par Adalid-Peralta et ses collaborateurs qui ont montré que des facteurs

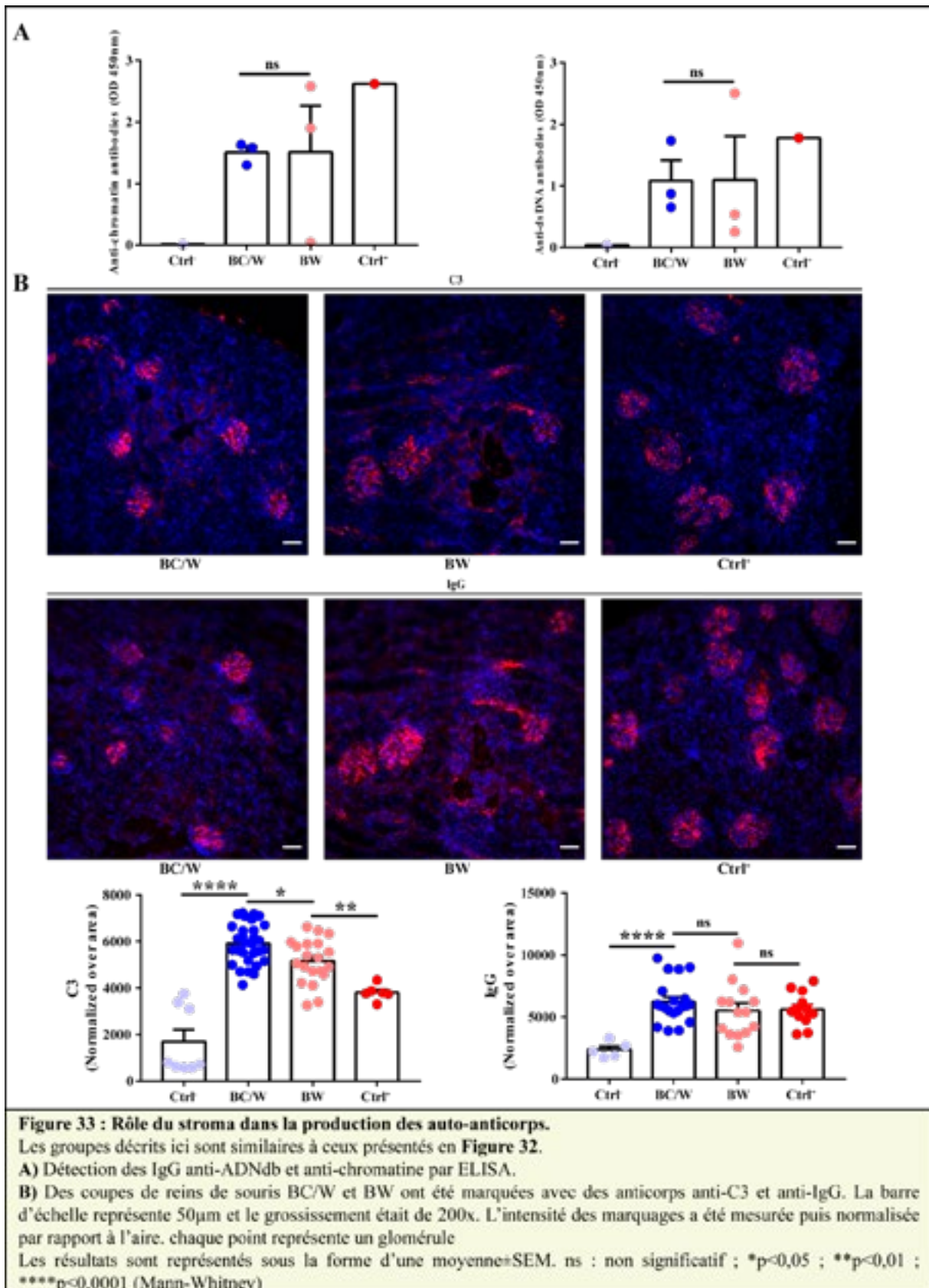
intrinsèques aux leucocytes et aux reins chez la souris NZB/W étaient nécessaires pour le développement de la néphrite lupique (Adalid-Peralta *et al.*, 2008).



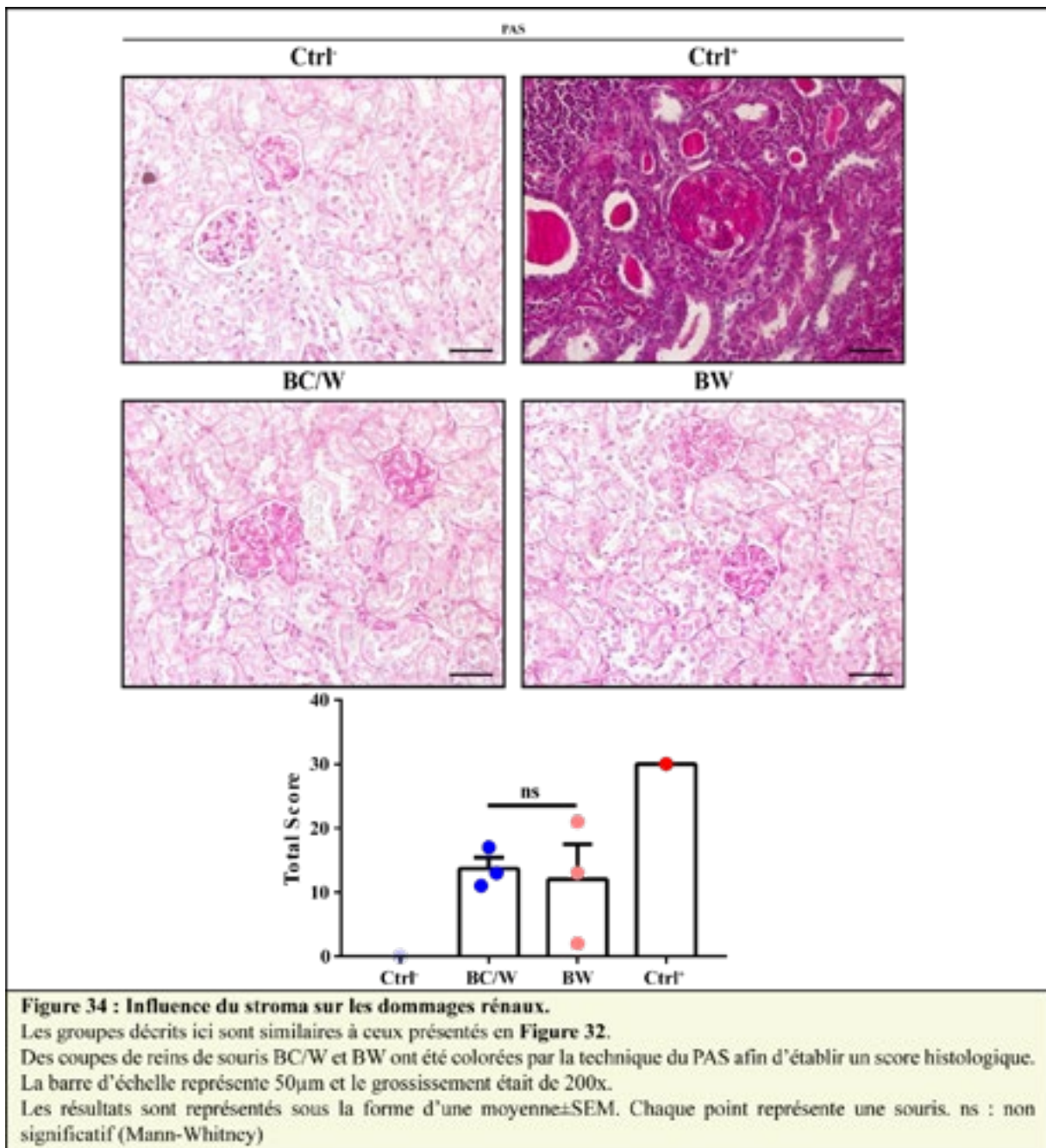
2.Implication du stroma/des reins dans le développement des auto-anticorps et de la néphrite.

Nous venons de voir que le stroma et les leucocytes sont importants pour la génération d'OLT au cours du lupus. Mais qu'en est-il de la réponse auto-immune globale ? En effet, les modifications du compartiment stromal ganglionnaire au cours de la maladie lupique (mentionné dans les paragraphes précédents) suggèrent une implication du stroma dans la rupture de tolérance et la production d'auto-anticorps. Ainsi, nous avons étudié, dans un premier temps, la présence des IgG anti-chromatine et anti-ADNdb dans le sérum de nos souris. Nous avons pu noter qu'il n'y avait pas de différence entre les deux groupes en ce qui concerne la production globale des auto-anticorps (**Figure 33A**). Cette similitude se retrouve également au niveau des dépôts rénaux d'IgG et/ ou de complexes immuns (**Figure 33B**). Ce dernier résultat est fort intéressant car malgré des dépôts similaires, il y a une différence d'infiltration rénale,

ce qui suggère que le dépôt de complexes immuns n'est pas le seul facteur responsable de l'attraction des cellules immunitaires, renforçant ainsi les résultats que nous avons obtenu chez les souris NZB/W jeunes dans la **Publication N°2**.



Cette expérience, bien que préliminaire, nous apporte également une occasion de déterminer si le stroma et/ou les OLT participent au développement de la néphrite lupique. La coloration des coupes de reins avec de l'acide périodique et du réactif de Schiff nous a permis d'observer l'étendue des dommages rénaux de manière semi-quantitative. Comme attendu, la souris utilisée en tant que Ctrl⁺ présente des lésions glomérulaires et tubulaires couplées à une infiltration immunitaire tandis que la souris Ctrl⁻ ne présente aucun dommage rénal (**Figure 34**). En revanche, les deux groupes de souris BC/W et BW sont similaires et présentent à nouveau un phénotype intermédiaire, comme décrit ci-dessus pour l'infiltration des cellules immunitaires, et ne diffèrent pas.



En conclusion, bien qu'il soit difficile de conclure en raison du faible nombre d'animaux, il semble que des défauts intrinsèques aux leucocytes mais également au stroma (aux reins eux-mêmes ?) soient requis pour une forte infiltration immunitaire et le développement d'OLT dans les reins. De plus, en dépit d'une production systémique d'auto-anticorps « normale » et de dépôts rénaux similaires, les dommages rénaux sont moins sévères dans le cas où nous n'avons pas pu observer d'OLT, suggérant leur implication dans la physiopathologie de la néphrite lupique et appuyant l'importance des résultats obtenus dans les **Publications N°1 et N°2**.

III-Une autre vision des étapes précoces de la néogenèse lymphoïde rénale.

A) Le trafic des LT naïfs dans les reins de souris lupiques.

Nous nous sommes précédemment essentiellement focalisés sur les LT activés-mémoires exprimant CXCR3. Cependant, la présence de HEV et le recrutement des LT naïfs est une caractéristique importante des OLT. Nous avons précédemment pu noter que les reins de souris NZB/W jeunes et malades contenaient des LT naïfs (**Publications N°1 et N°2**), résultat que nous avons également confirmé par immunofluorescence sur coupes (**Figure 35A**). Étant donné leur faible nombre il ne semble pas essentiel au premier abord de pousser plus loin l'analyse de ces cellules. Toutefois, comme indiqué ci-dessus, les LT naïfs jouent un rôle important dans divers contextes de néogenèse lymphoïde et ils pourraient, dans le cas des reins, être recrutés localement dans les OLT avant de s'activer et de pouvoir jouer des actions délétères au niveau rénal ; cela renforcerait également l'idée que nos infiltrats représentent des structures lymphoïdes et non de simples infiltrats inflammatoires. Nous avons donc voulu déterminer, comme dans le cas des LT activés, les mécanismes sous-jacents à la migration rénale des LT naïfs. Dans les ganglions lymphatiques, ces derniers entrent par le biais des HEV dont l'expression de PNAd permet l'interaction avec les lymphocytes naïfs exprimant CD62L (**von Andrian et al., 2003**). Nous avons mis en évidence présence de ce type de vaisseaux dans les reins de souris NZB/W malades (**Publication N°1**). Ces HEV sont également présentes dans les reins de jeunes souris NZB/W (**Figure 35B**), suggérant que comme dans les ganglions (et chez les souris malades), la migration des LT naïfs pourrait se faire par l'intermédiaire de ces vaisseaux particuliers. Toutefois, lors de leur migration dans les ganglions les lymphocytes naïfs ont également besoin de signaux chimiotactiques afin de les guider vers les HEV et d'induire l'expression de molécules d'adhésion permettant leur arrêt. Pour ce faire, les HEV produisent la chimiokine CCL21 et acquièrent à leur surface la chimiokine CCL19 (**Baekkevold et al., 2001**). La présence de ces deux chimiokines est l'une des caractéristiques

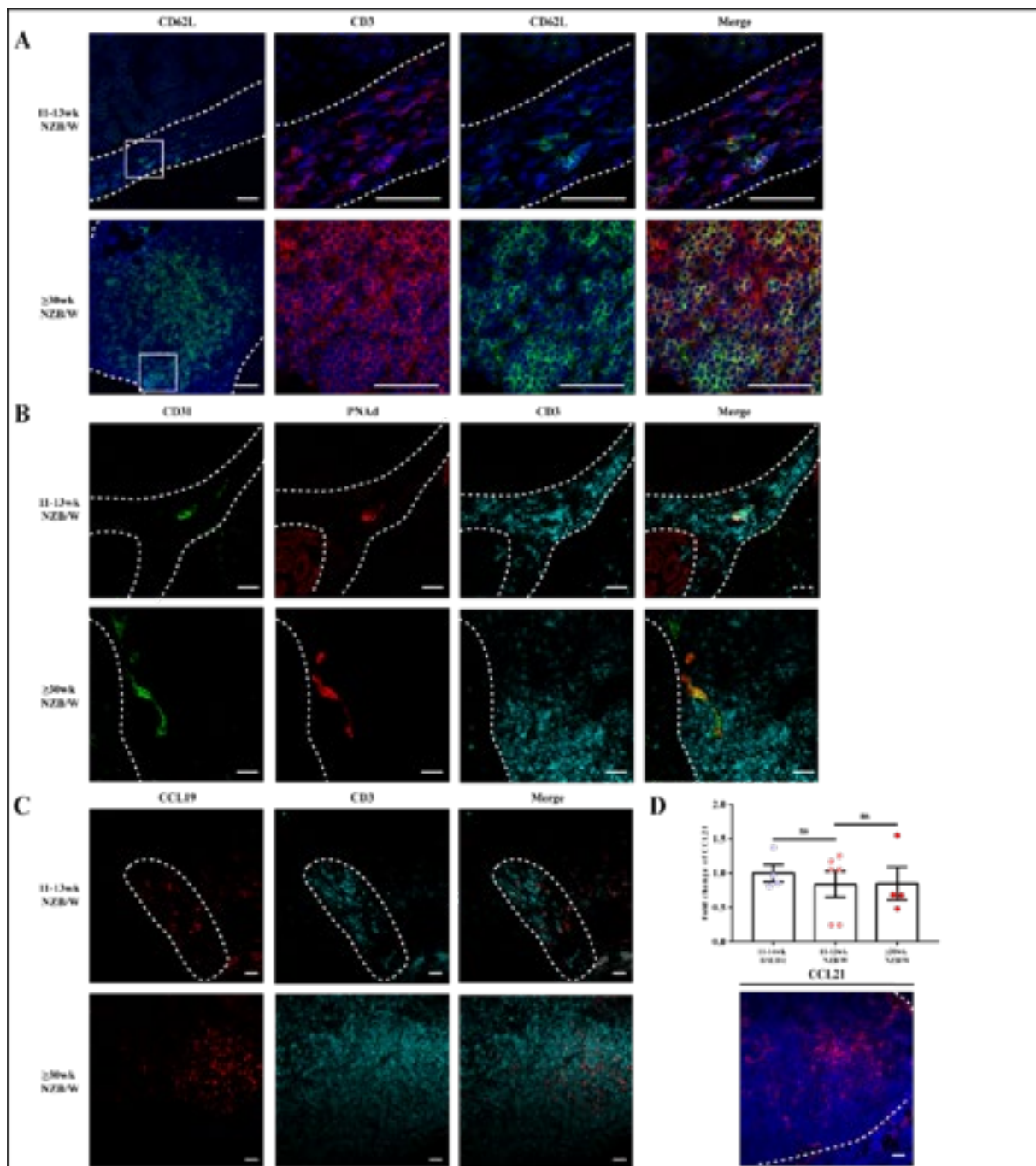


Figure 35 : Le trafic des LT naïfs chez les jeunes souris NZB/W. Des coupes de reins de souris NZB/W jeunes et malades ont été marquées avec des anticorps anti-CD3+anti-CD62L (A) ou anti-CD31+anti-PNAid+anti-CD3 (B) ou anti-CCL19+anti-CD3 (C) ou antiCCL21 (D). La barre d'échelle représente 50µm et les grossissements étaient de 200x et 630x (zoom(A)). L'expression de CCL21 a été mesurée par qPCR (D) dans les reins de souris BALB/c et NZB/W de différents âges. Les résultats sont représentés sous la forme d'une moyenne±SEM représentant un facteur d'induction par rapport aux BALB/c, ns : non significatif (Mann-Whitney)

des OLT rénaux chez les souris malades (**Publication N°1**). Nous avons pu remarquer par qPCR que l'expression de CCL19 semblait commencer dès l'âge de 12 semaines chez les souris NZB/W et nous avons confirmé la présence de cette dernière sur coupes en immunofluorescence (**Figure 35C**). En revanche, dans le cas du second ligand de CCR7, à savoir CCL21, nous n'avons pas détecté de différence d'expression de l'ARNm entre les reins

de souris saines BALB/c et de souris lupiques NZB/W (peu importe leur âge). Ce résultat est surprenant sachant que nous avons mis en évidence la protéine CCL21 dans les OLT, entre autre associée aux vaisseaux lymphatiques (**Publication N°1 et Figure 35D**). Plusieurs hypothèses s'offrent à nous pour expliquer cette discordance. La première pourrait être que la régulation se fait à un niveau post-transcriptionnel comme cela se trouve être le cas pour de nombreuses chimiokines (**Fan et al., 2005**). La seconde vient du fait qu'il existe trois variants de CCL21 : CCL21a, CCL21b et CCL21c (**Lo et al., 2003**). Le premier est exprimé de façon constitutive au niveau des OLS tandis que les deux suivants sont inductibles au niveau des tissus périphériques (comme les poumons) et leur expression ne dépend pas de la voie de la lymphotoxine. Les primers que nous avons utilisés permettent d'identifier les trois formes et il est alors possible que nous n'observions pas de différences si seule l'une des trois formes est augmentée dans les reins. La troisième hypothèse repose sur le fait que les podocytes sont capables de produire la chimiokine CCL21 or, la perte de ces cellules est l'une des caractéristiques de la néphrite lupique. Il est alors envisageable que la hausse de CCL21 induite par les cellules présentes dans les infiltrats soit compensée par une diminution au niveau du compartiment glomérulaire. Cette dernière hypothèse pourrait être vérifiée en réalisant une micro-dissection laser des infiltrats présents dans les reins de souris lupiques NZB/W. Nous avons tenté de réaliser ce type d'expérience, en collaboration avec une équipe travaillant sur la neurobiologie des rythmes, mais nos essais se sont révélés infructueux.

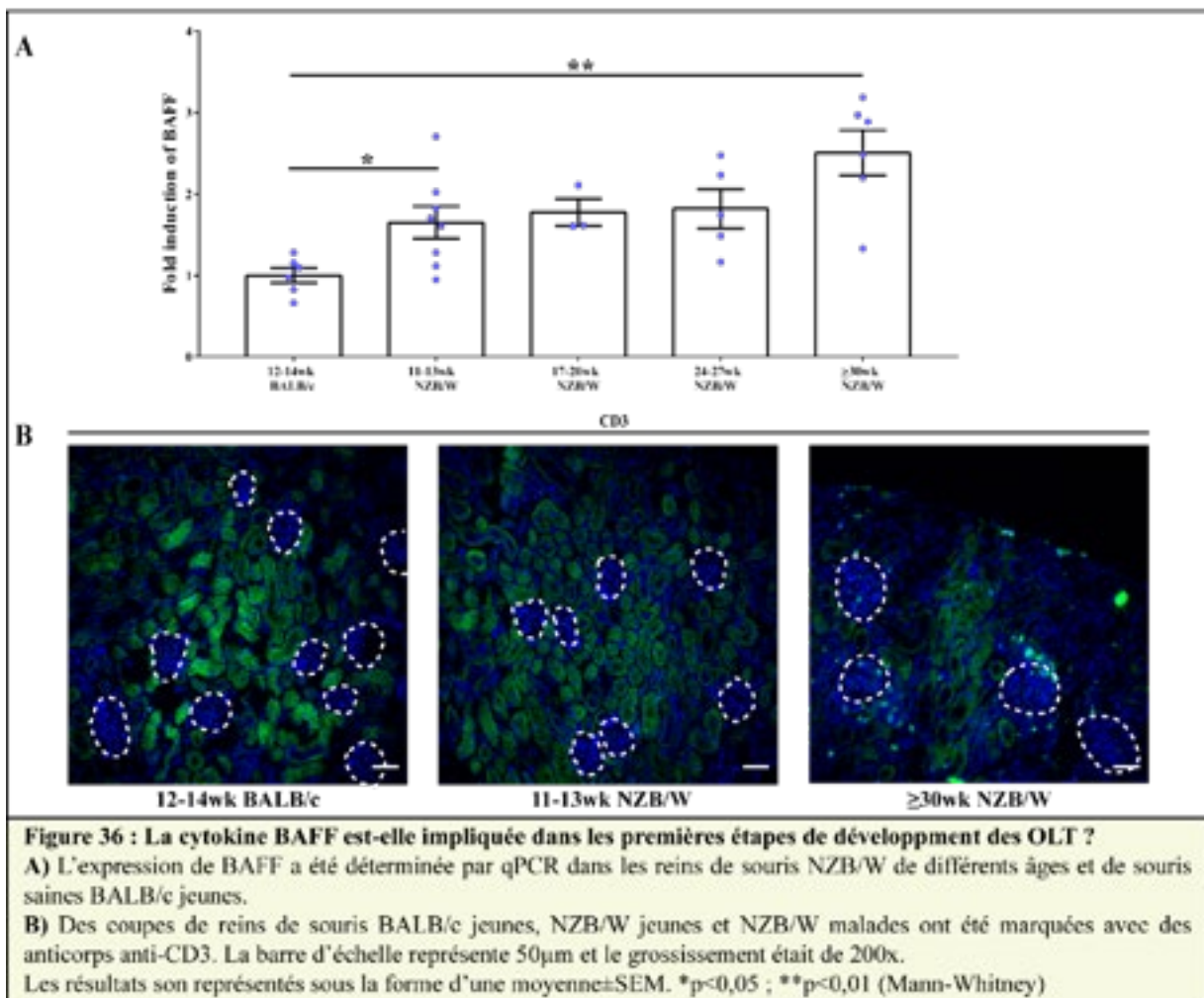
En conclusion de ce paragraphe, nous avons montré la présence de LT naïfs dans les reins de souris lupiques jeunes et malades. La migration de ces cellules se ferait, comme dans les OLS, à travers les vaisseaux HEV et ce, suite à une attraction par les chimiokines CCL19 et CCL21.

B) Les cytokines potentiellement impliquées dans la néogenèse lymphoïde rénale.

Nous avons pu mettre en évidence l'implication du récepteur CXCR3 et de ses trois ligands et suggéré celle de CCL19 et CCL21, dans la migration précoce des LT effecteur-mémoires et naïfs au niveau des reins et donc dans la formation des OLT. Cependant, on peut envisager que d'autres chimiokines ou cytokines jouent un rôle dans l'attraction des leucocytes et dans la mise en place de ces structures ectopiques.

La cytokine BAFF exerce des fonctions multiples au niveau des GC ainsi que dans la survie et la différenciation des LB. C'est pourquoi de nombreuses équipes se sont intéressées à son rôle au cours du lupus, Zhang et ses collaborateurs ayant, par exemple, corrélé le taux de BAFF avec celui des anticorps anti-ADN db (**Zhang et al., 2001**). En ce qui concerne le rein,

une expression accrue de BAFF dans les reins, associée à une augmentation de signalisation en aval, a été montrée chez les patients lupiques (Ge *et al.*, 2017). De plus, l'induction d'une néphrite par injection d'IgG anti-nucléosomes chez des souris lupiques déficientes pour l'enzyme AID s'accompagne d'une production rénale de BAFF et de la formation d'OLT (Kang *et al.*, 2017). Dans cette seconde étude, BAFF se trouve être nécessaire pour induire la formation des OLT et pour positionner les LT dans les glomérules, elle pourrait alors jouer un rôle dans notre contexte. Nous avons donc recherché l'expression de BAFF par qPCR dans les reins de souris lupiques de différents âges et de souris saines jeunes. Bien que faible, une augmentation significative de l'ARNm de BAFF dans les reins de jeunes souris NZB/W par rapport aux reins de souris contrôles BALB/c est observable (Figure 36A).



L'expression de BAFF semble également augmenter avec la progression de la maladie. Cette cytokine pourrait donc être impliquée dans le processus de néogenèse lymphoïde dans notre modèle. Cependant, dans le cas des étapes précoces, les premiers infiltrats sont localisés au niveau du hile, en partie médullaire, et l'étude précédemment citée fait référence au fait que l'absence de BAFF n'affecte pas la migration des leucocytes dans les reins mais uniquement

leur localisation glomérulaire. Nous avons alors examiné les glomérules de souris saines et lupiques jeunes ainsi que de souris lupiques malades. Comme il est possible d'observer en **Figure 36B**, des LT sont bien présents dans les glomérules de souris malades mais totalement absents des glomérules de souris jeunes âgées d'environ 12 semaines (lupiques comme saines). De plus, le modèle utilisé lors de cette étude est induit et repose sur une inflammation médiée par les auto-anticorps, ce qui diffère de notre modèle spontané chez qui les premières étapes semblent indépendantes des anticorps. Nous pensons donc que, bien qu'exprimée tôt dans les reins, BAFF ne serait pas impliquée dans les premières étapes de migration des LT et interviendrait plus tard lors du développement de la maladie.

D'autres cytokines telle que l'IL17A ou l'IL22 ont été impliquées dans la formation des OLT dans d'autres situations physiopathologiques. L'IL17A a par exemple été décrite comme jouant un rôle dans la formation des iBALT suite à une infection par *P. aeruginosa* (**Fleige et al., 2014**) tandis que l'IL22 est requise pour la formation des OLT inductibles au niveau des glandes salivaires suite à l'injection d'un adénovirus neutralisé (**Barone et al., 2015**). Dans les deux cas, ces cytokines permettent la synthèse de chimiokines homéostatiques (respectivement CXCL12 et CXCL13) qui vont alors participer à l'organisation des OLT. Nous appuyant sur ces données et ayant également décrit la présence de chimiokines homéostatiques (CCL19, CCL21 et CXCL13) dans les OLT rénaux au cours du lupus, nous avons analysé la production des cytokines IFN γ , IL17A et IL22 par les leucocytes dans les reins de souris NZB/W malades par cytométrie en flux. Nous avons retrouvé une forte production d'IFN γ dans les reins de souris NZB/W (**Figure 37A**), ce qui pourrait correspondre à une accumulation de Th1 dans les reins. Cela semble en accord avec le fait que la majorité des cellules produisant cette cytokine au niveau rénal sont des LT (**Figure 37B**) et avec la forte proportion de LT exprimant CXCR3 dans les reins. Cela semble confirmer une précédente hypothèse formulée dans notre équipe, à savoir que la diminution des TFH1 en circulation chez les patients (**Le Coz et al., 2013**) pourrait être due à leur migration vers les tissus (dont les reins). Une faible quantité d'IL17A a été également retrouvée dans les reins de souris NZB/W et sa production semble majoritairement assurée par les LT (**Figures 37A et 37B**). Cela semble être en accord avec la littérature puisque chez la souris NZB/W comme MRL/lpr, une faible production rénale d'IL17A a précédemment été décrite (**Schmidt et al., 2015 ; Steinmetz et al., 2009**). Il faut toutefois noter que son implication dans la néphrite lupique est sujet à controverse puisque diverses études semblent indiquer un rôle de cette dernière ainsi que des Th17 dans cette pathologie (**Voir introduction, partie 2, paragraphe III**), tandis que le travail de Schmidt et de ses collaborateurs a démontré que l'IL17A, contrairement à l'IFN γ , n'était pas impliquée dans la physiopathologie de la

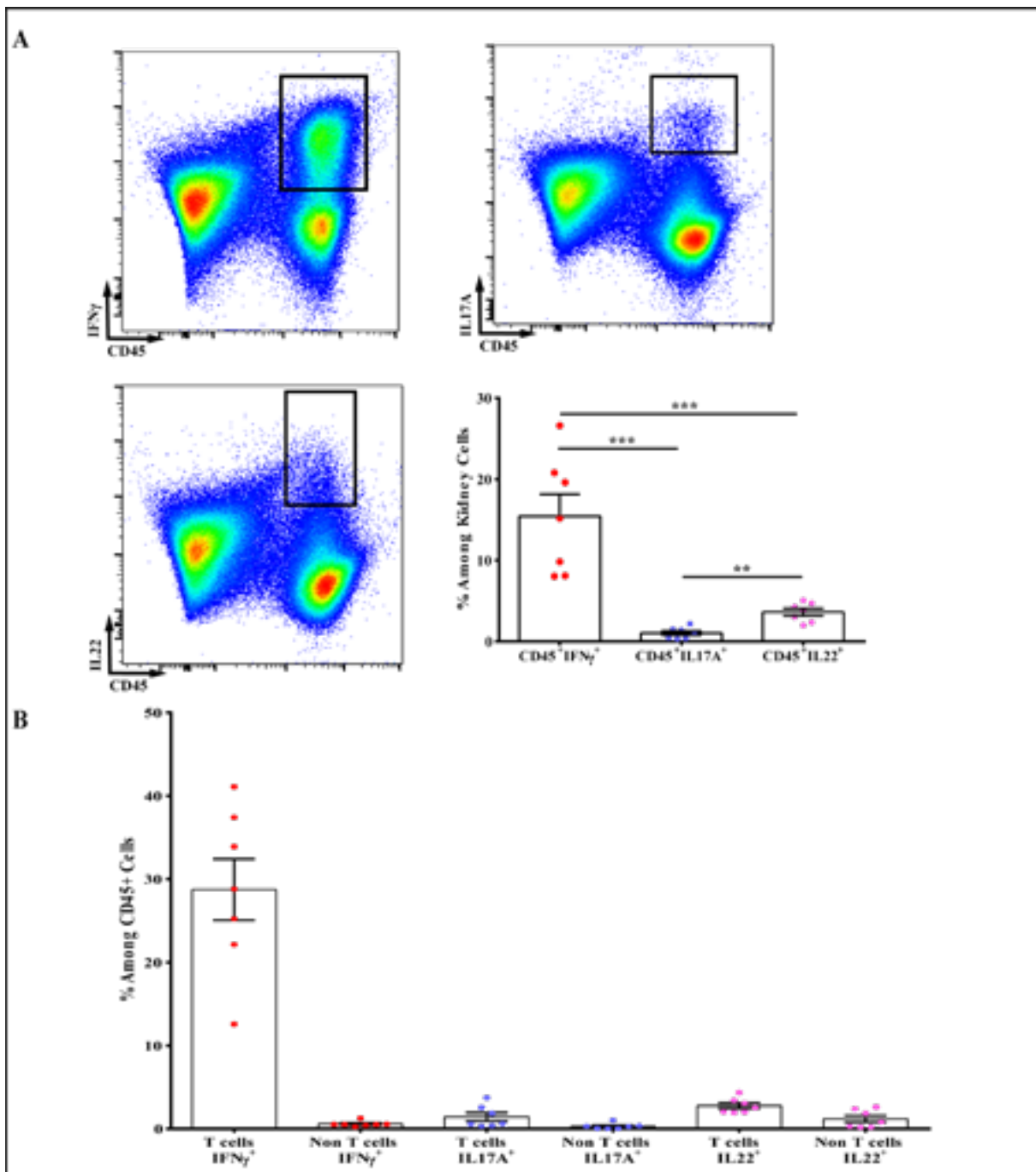


Figure 37 : Production cytokinique dans les OLT.

A) Le pourcentage de leucocytes produisant de l'IFN γ , de l'IL17A ou de l'IL22 dans les reins de souris NZB/W malades ont été déterminés par cytométrie en flux.

B) Pourcentages de LT et de leucocytes «non T» produisant de l'IFN γ , de l'IL17A ou de l'IL22 parmi les leucocytes rénaux de souris NZB/W malades.

Les résultats sont représentés sous la forme d'une moyenne \pm SEM. **p < 0,01 ; ***p < 0,001 (Mann-Whitney)

néphrite lupique (son absence/blocage ne protégeant ni les souris MRL/lpr ni les souris NZB/W quant à la survenue d'une néphrite) (Schmidt *et al.*, 2015). De plus, dans l'éventualité où l'IL17A/les Th17 seraient impliqués, dans la formation des OLT rénaux/la survenue de la néphrite lupique, il est intéressant de mentionner qu'une étude a montré que leur recrutement dépendait, de manière similaire aux cellules Th1, du récepteur CXCR3 (Steinmetz *et al.*, 2009). Une thérapie ciblant CXCR3, telle que nous l'avons mise en œuvre, pourrait alors jouer

également sur les Th17 et nous ne pouvons exclure leur implication dans notre contexte. Finalement, nous avons remarqué qu'il y avait également une faible quantité d'IL22 produite par les leucocytes dans les reins de nos souris NZB/W malades (**Figure 37A**). Il nous est cependant impossible pour le moment de déterminer si elle est ou non impliquée dans la formation des OLT. Nous pouvons seulement mentionner que les LT ne sont pas les seuls à produire cette cytokine parmi les leucocytes rénaux (**Figure 37B**) et que la proportion de cellules produisant cette dernière se trouve supérieure à celle décrite dans l'étude de Barone et ses collaborateurs chez qui les LT étaient les principales cellules productrices.

C) Implications des molécules nécessaires aux premières étapes d'ontogénèse lymphoïde dans le contexte des OLT ?

Au cours du développement embryonnaire, les LT_i colonisent l'ébauche du ganglion lymphatique et interagissent ensuite avec les cellules présentes (LEC et cellules mésenchymateuses) afin d'initier le recrutement de davantage de cellules et la différenciation des cellules mésenchymateuses en LT_o puis en cellules stromales. Chez l'adulte, il subsiste des cellules similaires aux LT_i qui, dans le cas de la néogenèse lymphoïde, pourraient jouer le même rôle que les LT_i au stade embryonnaire. Il a déjà été montré que ces « LT_i-like » sont impliqués dans le développement d'OLT en utilisant des modèles favorisant leur survie (**Meier et al., 2007**) ou dans lesquels ils sont absents (**Link et al., 2011**). L'implication de ces cellules lors de la mise en place des OLT rénaux au cours du lupus reste cependant à déterminer. En utilisant le marqueur CD4 avec une combinaison permettant d'exclure les LB, LT et cellules myéloïdes, nous avons pu mettre en évidence dans la rate et dans les reins, la présence d'une faible proportion de cellules pouvant correspondre à des « LT_i-like » (**Figure 38A**). Il est toutefois impossible avec le peu de marqueurs utilisés, de déterminer s'il s'agit réellement de LT_i-like. De plus, nous ne sommes pas non plus en mesure de déterminer pour l'instant s'ils jouent ou non un rôle dans le développement du stroma/des OLT. Il existe cependant des études où l'absence de LT_i n'empêche pas la formation des OLT. C'est le cas par exemple des OLT se formant dans la thyroïde suite à l'expression ectopique de CCL21 (**Marinkovic, 2006**). Dans ce cas, l'absence du facteur de transcription Id2 n'impacte pas la formation des OLT car dans ce contexte, ce sont des LT CD4⁺ qui remplacent les LT_i et qui initient la formation des OLT en interagissant avec des DC. Il est donc fortement envisageable que dans le contexte lupique, les LT jouent le rôle des LT_i, d'autant plus que nous avons montré que certains expriment RANKL, une molécule exprimée par les LT_i et impliquée dans le développement des OLS. Comme il est possible d'observer en **Figure 38B**, les LT de la rate ainsi que les LT des OLT,

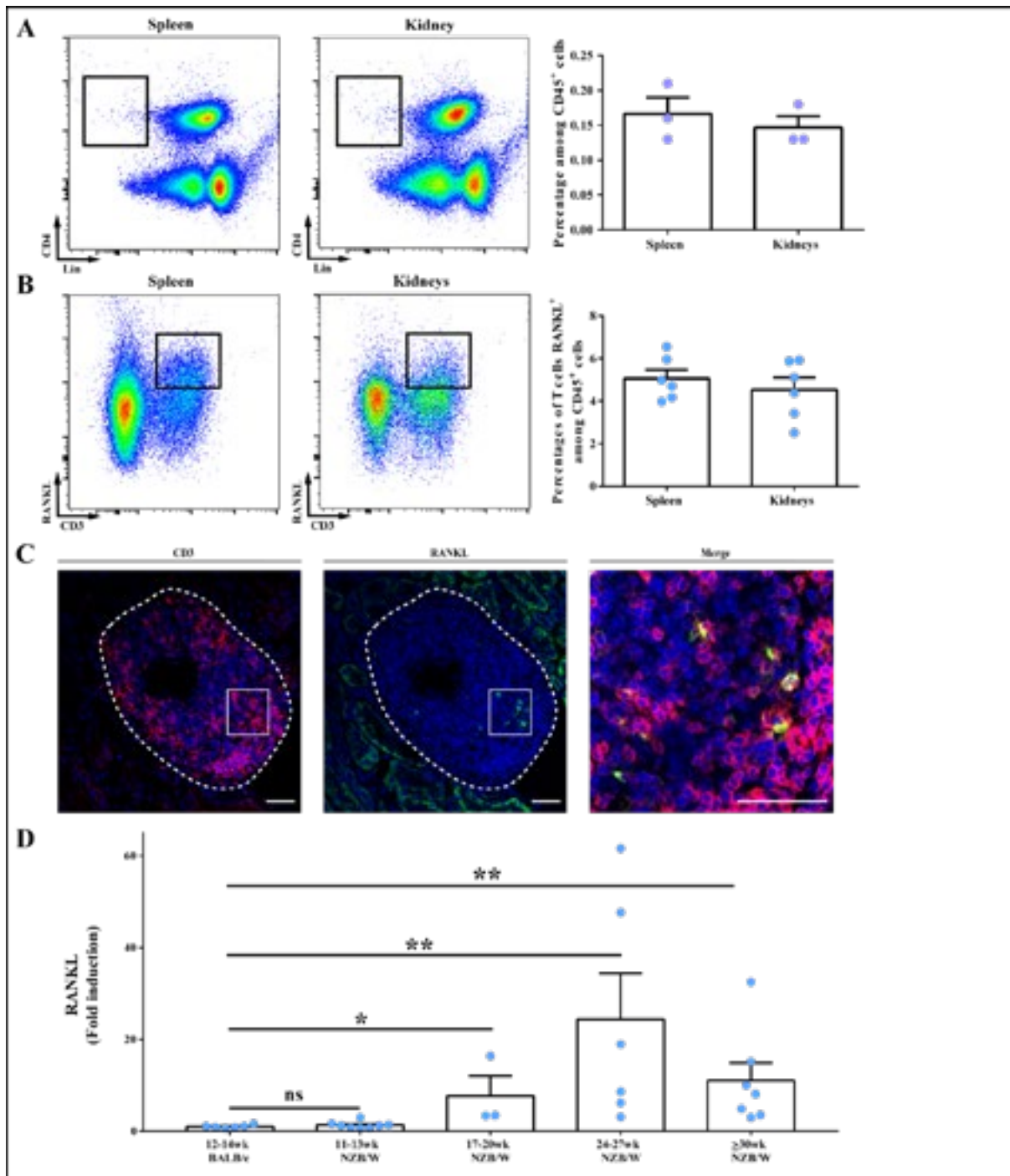


Figure 38 : Retrouve-t-on des LTi ou des cellules apparentées dans les OLT rénaux ?

A) Identification des Lymphoid Tissue inducers par cytométrie en flux dans les reins et la rate de souris NZB/W malades. Les LTi sont identifiés parmi les cellules CD45⁺ par leur expression de CD4 et en l'absence de la combinaison des marqueurs suivants (Lin) : CD3, CD19, CD11c, CD11b et B220.

B) Pourcentage de LT RANKL⁺ dans la rate et les reins de souris NZB/W malades déterminée par cytométrie en flux.

C) Des coupes de reins de souris NZB/W malades ont été marquées avec des anticorps anti-CD3 et anti-RANKL. La barre d'échelle représente 50µm et les grossissements étaient de 200x et 630x (merge).

D) L'expression de RANKL a été déterminée par qPCR, dans les reins de jeunes BALB/c saines et de NZB/W de différents âges. Les résultats sont exprimés sous forme de facteur d'induction par rapport aux souris BALB/c.

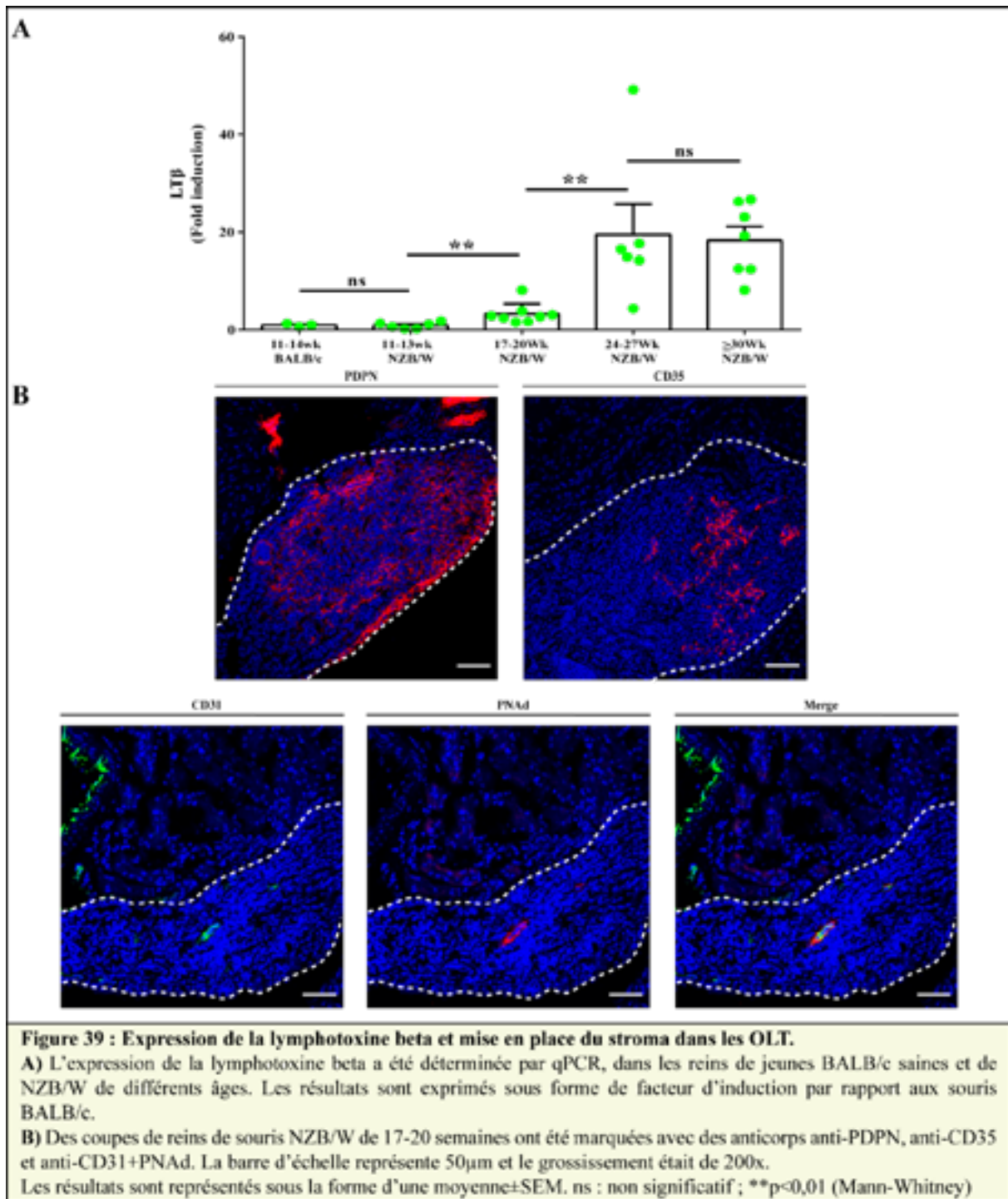
Les résultats sont représentés sous la forme d'une moyenne±SEM. *p<0,05 ; **p<0,01 (Mann-Whitney)

expériment RANKL et cela dans des proportions similaires. Nous avons également pu détecter des LT exprimant RANKL par immunofluorescence directement dans les infiltrats rénaux chez la souris NZB/W (**Figure 38C**). Finalement, nous avons mesuré l'expression de RANKL dans

les reins par qPCR : Une augmentation de l'expression de RANKL est détectée dès l'âge de 17-20 semaines chez les souris lupiques (**Figure 38D**). Ces résultats suggèrent que les LT exprimant RANKL pourraient jouer le rôle de LT_i-like dans les OLT rénaux et participer à leur formation. Cependant, l'expression de RANKL étant plus tardive que l'infiltration immunitaire rénale, les LT RANKL⁺ ne seraient pas impliqués dans les étapes les plus précoces de la néogenèse lymphoïde.

Outre RANKL, la seconde molécule importante lors de la formation des OLS est la LT β . Les LT_i, via leur expression de lymphotoxine, sont capables d'interagir avec les LEC, les BEC et les cellules mésenchymateuses, induisant le remodelage des structures lymphatiques et sanguines tout en permettant la différenciation des cellules mésenchymateuses. Il est donc fort possible que dans le contexte des OLT rénaux, la LT β joue un rôle dans la différenciation locale en cellules stromales (telle que la différenciation en HEV (**Onder *et al.*, 2013**)) et dans la mise en place des OLT. L'expression de la LT β démarre, comme celle de RANKL, chez les souris du groupe 17-20 semaines et augmente avec la progression de la maladie (**Figure 39A**). Elle semble donc également pouvoir être impliquée dans la mise en place des OLT sachant que, comme RANKL, elle peut être exprimée par les LT activés.

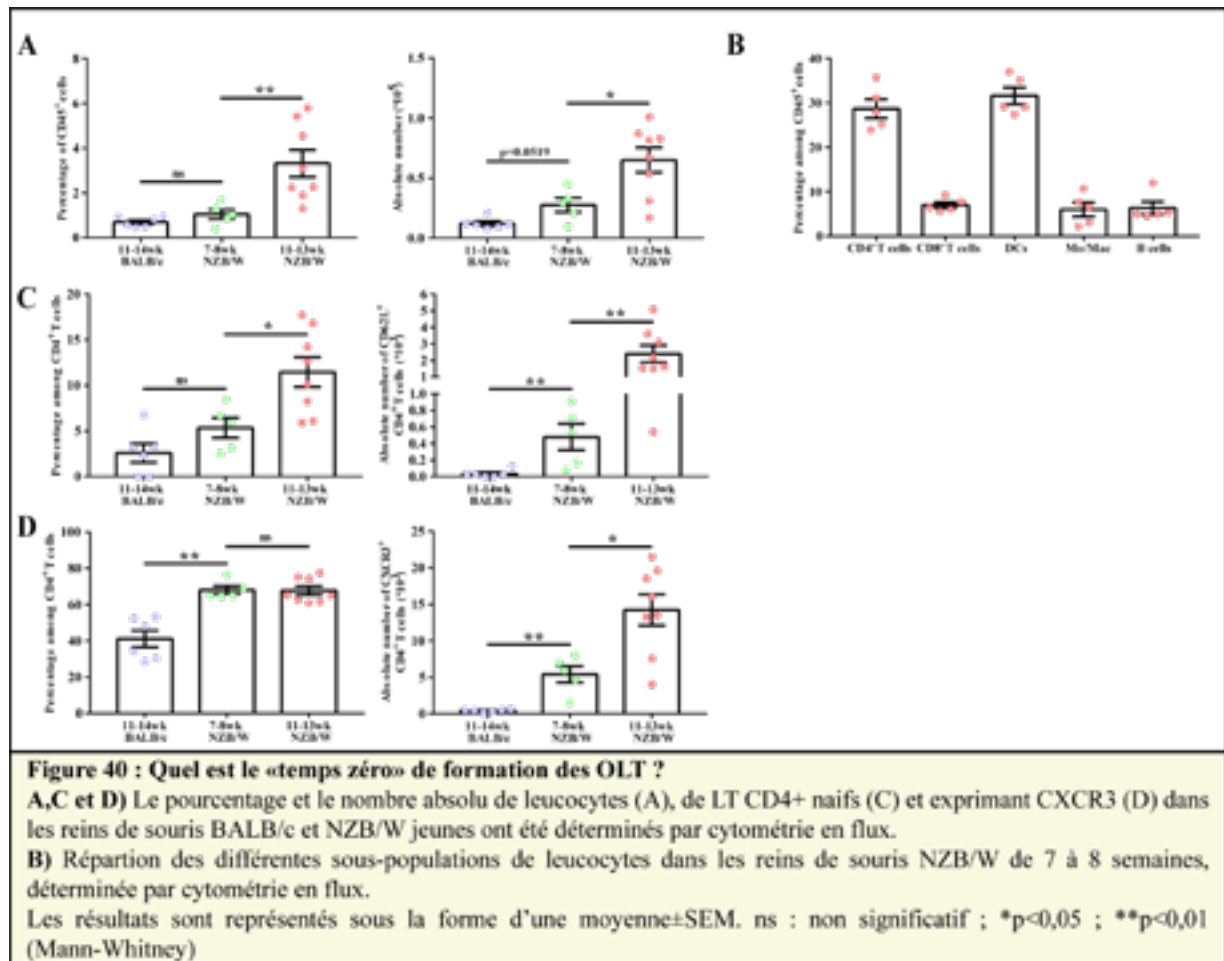
Finalement, ayant pu remarquer que l'expression de RANKL et de la LT β commençaient à l'âge de 17 à 20 semaines chez les souris NZB/W, nous avons recherché la présence de cellules stromales dans les reins des souris de cette tranche d'âge. Les infiltrats rénaux observés chez les souris de 17-20 semaines contenaient des cellules stromales représentaient les premiers dans lesquels nous avons pu retrouver ce type de cellules (**Figure 39B**). Cela suggère fortement que ces deux molécules sont impliquées dans le développement rénal des cellules stromales présentes dans les OLT, d'autant que l'expression du récepteur de la LT β a été mise en évidence lors de l'inflammation rénale (**Seleznik *et al.*, 2015**).



D) Peut-on mettre en évidence le point de départ précis de la mise en place des OLT ?

Durant notre étude, nous avons analysé les reins de souris NZB/W de 11 à 13 semaines en comparaison à des reins de souris saines BALB/c de 12 à 14 semaines. Cela nous a permis de montrer que la formation des OLT est un processus précoce et que les premières cellules infiltrant les reins sont principalement des LT. On peut toutefois se demander si chez les souris NZB/W, cet âge correspond vraiment au point de départ de mise en place des OLT. Si tel est le

cas, nous devrions retrouver une composition leucocytaire rénale similaire à celle des BALB/c chez les souris NZB/W plus jeunes. Il semblait donc intéressant d'analyser les reins de souris NZB/W de 7 à 8 semaines, âge à partir duquel le système immunitaire est mature. Nous n'avons pas observé de différence entre les proportions de leucocytes isolés à partir des reins de souris saines et lupiques de 7-8 semaines, mais avons noté une tendance à une augmentation du nombre total de leucocytes rénaux (mais restant inférieur aux souris NZB/W de 11 à 13 semaines) (**Figure 40A**). Ceci suggère que l'infiltration immunitaire des reins débute déjà chez des



souris NZB/W de 7 à 8 semaines. Si l'on s'intéresse à la répartition des différentes populations leucocytaires, nous pouvons voir en **Figure 40B** que les reins de souris NZB/W âgées de 7 à 8 semaines contiennent une plus grande proportion de LT, une proportion équivalente de DC et une proportion inférieure de cellules CD11b⁺ en comparaison à des souris BALB/c (**Publication N°2 et résultat non montré**). En revanche elles présentent une proportion supérieure de DC et légèrement inférieure de LT si on les compare aux souris NZB/W de 11 à 13 semaines (**Publication N°2 et résultat non montré**). Ces souris NZB/W de 7 à 8 semaines représenteraient un stade encore plus précoce d'infiltration rénale et donc une « étape intermédiaire » entre le statu sain et ce que l'on peut observer chez les souris NZB/W de 12

semaines. Des observations similaires au niveau du phénotype des LT rénaux, naïfs (**Figure 40C**) et exprimant CXCR3 (**Figure 40D**) confirment donc que nous sommes en présence d'un infiltrat très précoce. Ce résultat est fort intéressant car il nous indique que dès l'instant où le système immunitaire est mature, des LT infiltrèrent les reins des souris lupiques. Bien évidemment, il faudrait compléter ces résultats par des marquages immunofluorescents sur coupes de reins de souris NZB/W âgées de 7 à 8 semaines, comparer à des souris saines du même âge et évaluer l'expression de chimiokines au niveau des reins. Il faut toutefois noter que cette infiltration encore plus précoce que ce que nous avons imaginé n'est pas impossible puisqu'une étude a pu démontrer que les cellules mésangiales provenant de souris NZB/W du même âge (7-8 semaines), présentaient une production accrue de CCL2/MCP-1 en réponse à une stimulation au LPS par rapport aux mêmes cellules issues de souris saines (**Ka et al., 2007**).

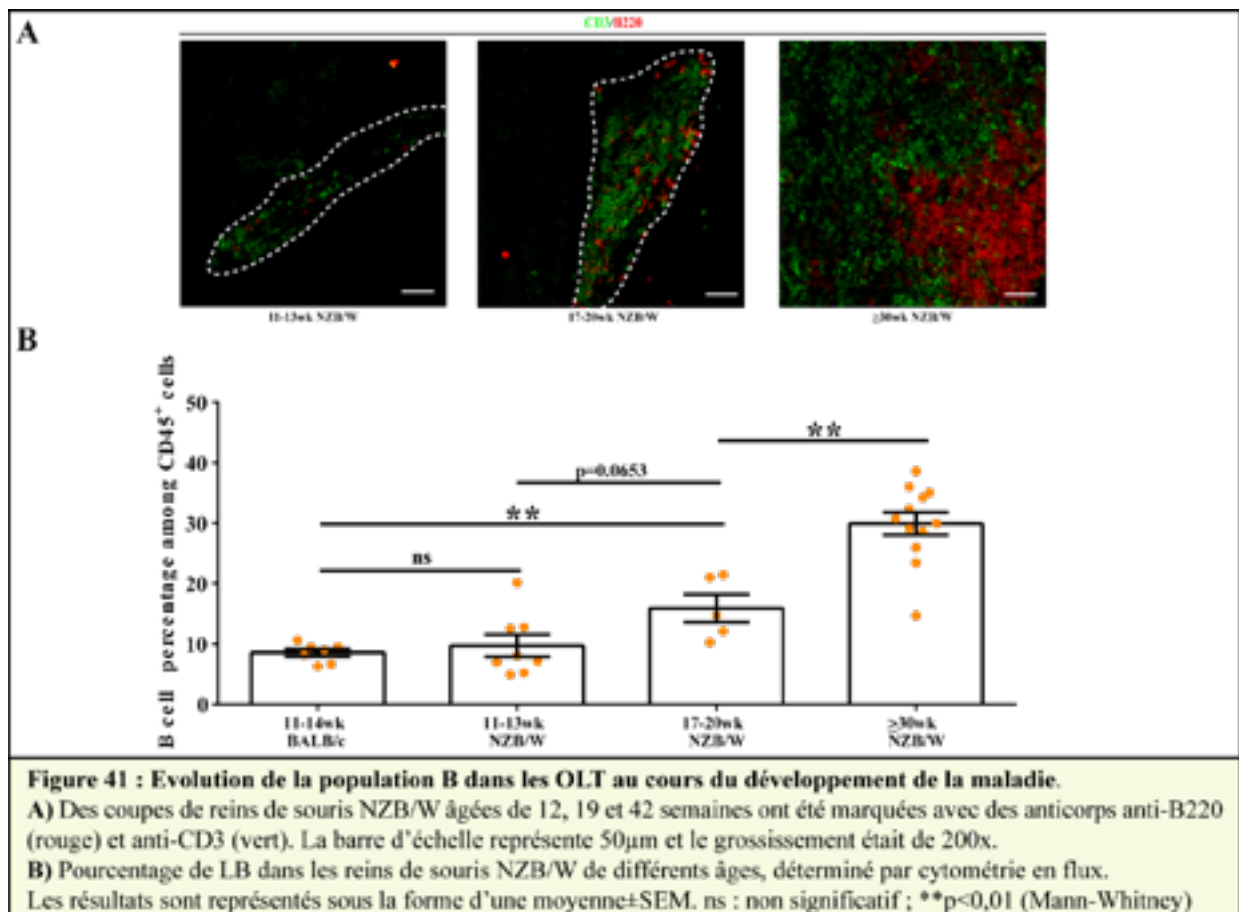
IV-Migration rénale des LB et progression vers l'OLT fonctionnel.

A) Attraction et évolution des LB dans les reins au cours du lupus.

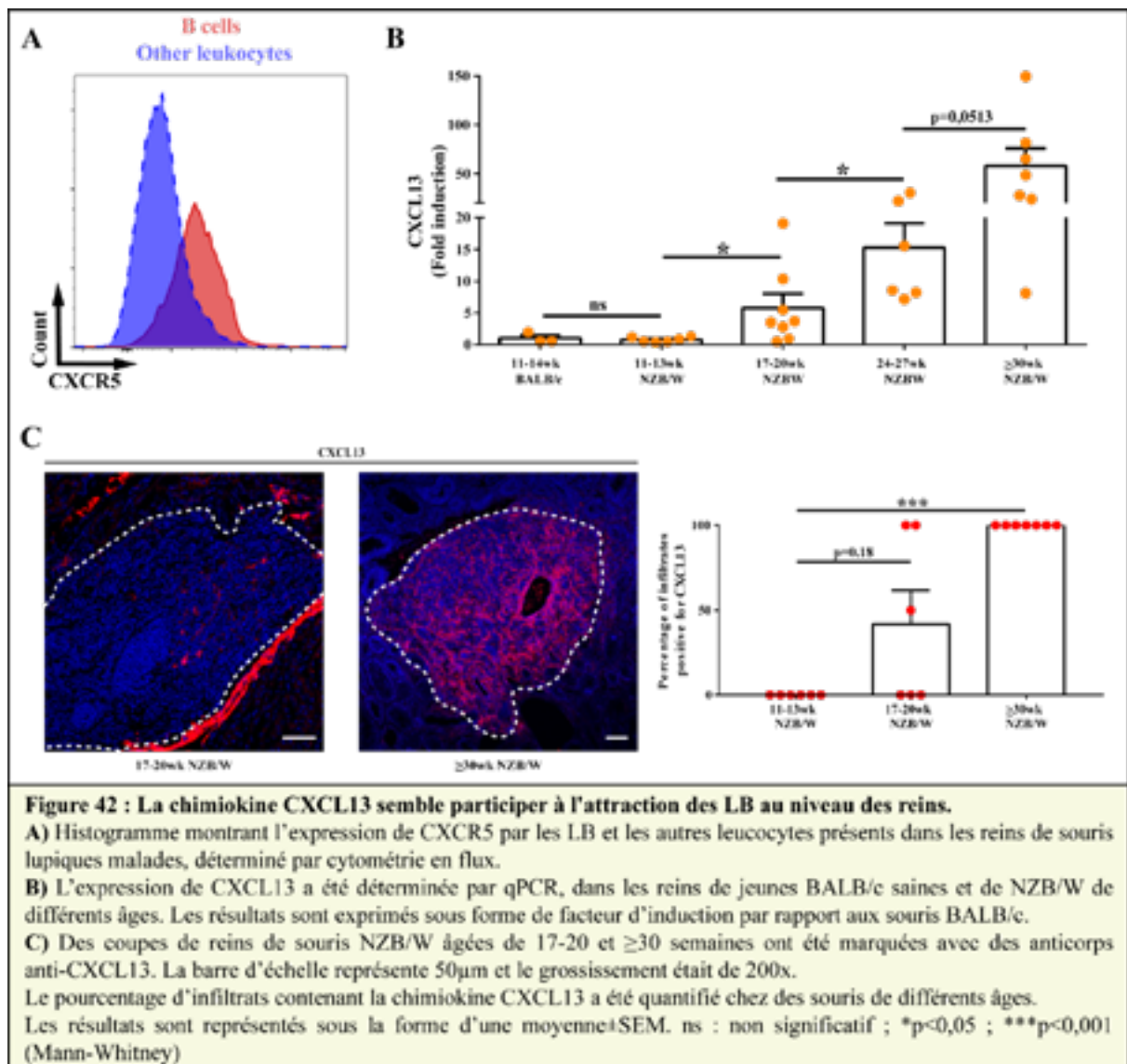
Dans le chapitre 2, nous avons pu voir que les OLT se développent avant même que les auto-anticorps sériques et les dépôts glomérulaires ne soient détectables (**Publication N°2**). Ces premiers infiltrats sont majoritairement composés de LT, cependant, des LB sont présents dans les OLT matures chez les souris malades (**Publication N°1**). C'est pourquoi nous avons entrepris de déterminer la cinétique et les mécanismes impliqués dans la migration des LB dans les reins au cours du lupus.

Il est possible d'observer en **Figure 41A** que les petits infiltrats présents chez les souris NZB/W de 11 à 13 semaines ne contiennent quasiment aucun LB (comme décrit dans la **Publication N°2**) au contraire des animaux de 17 à 20 semaines. Ces infiltrats sont de taille supérieure à ceux présents chez les souris plus jeunes mais ne présentent pas encore d'organisation en zone T et zone B distinctes et restent bien modestes en comparaison à ce que l'on peut observer chez des souris présentant une atteinte rénale. Ces premiers résultats suggèrent que la migration des LB dans les reins de souris lupiques débute vers l'âge de 17 à 20 semaines. Des résultats obtenus par cytométrie en flux confirment cette première observation sur coupes (**Figure 41B**).

Pour comprendre les mécanismes sous-jacents à la migration des LB dans les reins, il faut se référer à ce qui se passe en conditions physiologiques. Dans les OLS, les LB sont attirés par la chimiokine CXCL13 grâce à l'expression du récepteur CXCR5 à leur surface (**Legler et al., 1998**). Il se pourrait donc que, comme dans le cas des ganglions lymphatiques, les LB infiltrèrent les reins en réponse à une production locale de CXCL13. Il est à noter cependant que



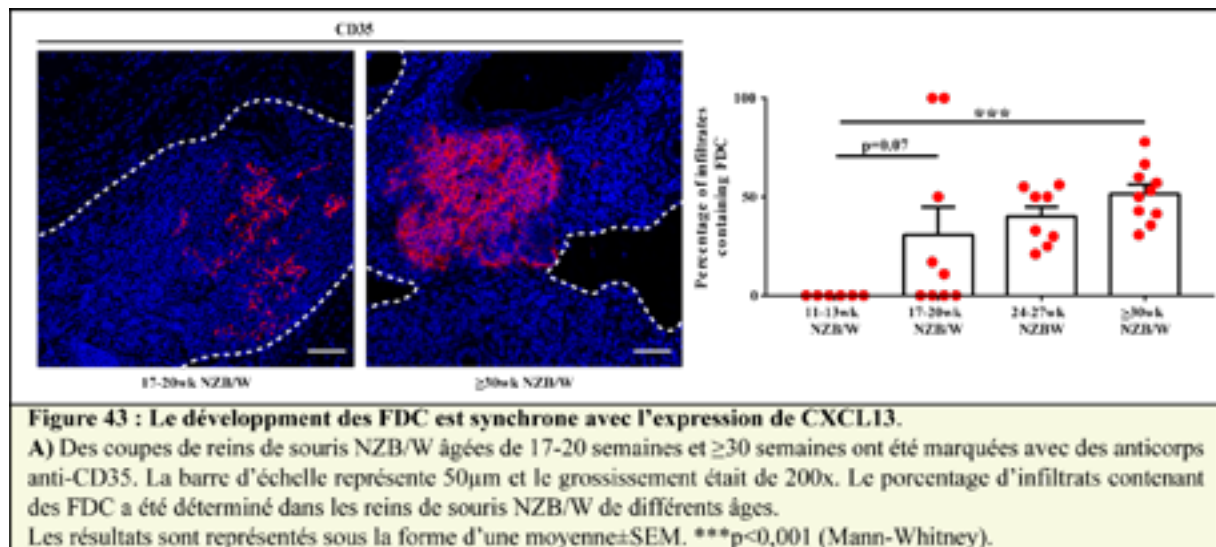
des études ont décrit une diminution de CXCR5 à la surface des LB dans le cas du lupus et de la polyarthrite rhumatoïde (Henneken *et al.*, 2005). Nous avons cependant pu montrer par cytométrie en flux que les LB présents dans les reins de souris NZB/W malades exprimaient bien le récepteur CXCR5 à un plus fort niveau que les autres cellules immunitaires présentes dans les reins (Figure 42A). L'expression de CXCL13 dans les reins de souris NZB/W a été mise en évidence dans la Publication N°1 à partir de l'âge de 24-27 semaines mais pas chez les souris du groupe <20 semaines. Cependant, si l'on regarde plus en détails ce dernier groupe, l'expression de l'ARNm de CXCL13 n'est pas augmentée dans les reins de souris NZB/W âgées de 11-13 semaines (ce qui expliquerait la quasi absence de LB dans les infiltrats rénaux chez les souris de cet âge) mais commence à augmenter chez les souris lupiques de 17-20 au fur et à mesure du développement de la pathologie rénale parallèlement à l'infiltration des LB (Figures 42B et 41 B). Cette chimiokine peut également être détectée par immunofluorescence dans les petits infiltrats immunitaires présents dans les reins de souris du groupe 17-20 semaines (Figure 42C). Nos résultats supportent l'hypothèse selon laquelle CXCL13 pourrait être impliquée dans la migration des LB dans les reins au cours du lupus.



B) Les FDC sont-elles les principales productrices de la chimiokine CXCL13 ?

Dans les ganglions lymphatiques, ce sont les FDC et les MRC qui représentent les principales sources de la chimiokine CXCL13 et qui jouent un rôle dans l'organisation spatiale du follicule B (Ansel *et al.*, 2000). Les OLT sont dépourvus de capsules et au jour d'aujourd'hui, aucune étude n'a pu mettre en évidence la présence de MRC dans les OLT, nous sommes donc intéressés aux FDC. Nous avons d'ores et déjà montré la présence de FDC dans les OLT rénaux chez les souris NZB/W malades dans le **chapitre 1** mais pas dans le cas des petits infiltrats présents dans les reins de souris âgées de 11 à 13 semaines (**Publication N°2**). En revanche, il est possible de détecter des FDC dans les infiltrats rénaux chez les souris du groupe 17-20 semaines (**Figure 43**). Les FDC sont donc de bonnes candidates quant à la production rénale de CXCL13 au vu des cinétiques concordantes de l'infiltration des LB, de l'expression de CXCL13 et de leur détection. Nous avons d'ailleurs mis en évidence dans les

OLT chez des souris NZB/W malades, des cellules exprimant à la fois CD35 et CXCL13 (**Chapitre 1**). Ces résultats nous indiquent alors que dans le contexte des OLT rénaux, les FDC semblent capables de produire CXCL13 et seraient donc impliquées dans le recrutement rénal des LB au cours du développement de la maladie, comme cela est le cas dans les ganglions lymphatiques.



Il faut toutefois noter que, la chimiokine CXCL13 est détectée dans la totalité de l'infiltrat alors que les FDC restent localisées en des zones bien précises. Une hypothèse consiste à envisager que la chimiokine serait produite localement par les FDC et diffuserait ensuite dans l'infiltrat. Par ailleurs, si l'on en revient à la quantification de la proportion d'infiltrats présentant un réseau de FDC, seulement la moitié d'entre eux contiennent des FDC, au maximum, alors que 100% des infiltrats sont positifs pour CXCL13 (**Figures 43 et 44**). Le **Figure 44** montre un infiltrat dans lequel on détecte CXCL13 mais ne contenant pas de FDC. Ces dernières ne peuvent donc pas constituer la seule source de CXCL13 dans les OLT rénaux.

C) Le rôle des cellules myéloïdes dans l'attraction des LB et les causes de leur migration dans les reins.

Dans le contexte de la néogenèse lymphoïde, d'autres cellules ont été montrées comme capables de produire CXCL13 (**Carlsen, 2004 ; GeurtsvanKessel et al., 2009 ; Kobayashi et al., 2013**). On retrouve parmi celles-ci, les cellules de la lignée myéloïde comme les monocytes, les macrophages ou les DC. Chez les patients atteints de polyarthrite, les monocytes et les macrophages ont la capacité de produire la chimiokine CXCL13 et dans le cas des iBALT, les DC sont une source majeure de CXCL13 (ainsi que d'autres chimiokines) et permettent le maintien de la structure des iBALT.

Nous avons pu observer dans un premier temps que les cellules de la lignée myéloïdes (dans notre cas, observées en utilisant les marqueurs CD11b et CD11c) sont présentes dans 100% des infiltrats chez les souris NZB/W malades de façon similaire à CXCL13 (**Figure 44**). Cette similitude ne s'arrête pas là puisque ces cellules sont, comme CXCL13, réparties dans l'ensemble de l'infiltrat et il existe une forte « ressemblance » entre les deux marquages (**Figure 44**). De plus, nous avons pu noter que ces cellules sont retrouvées dans les infiltrats à partir de

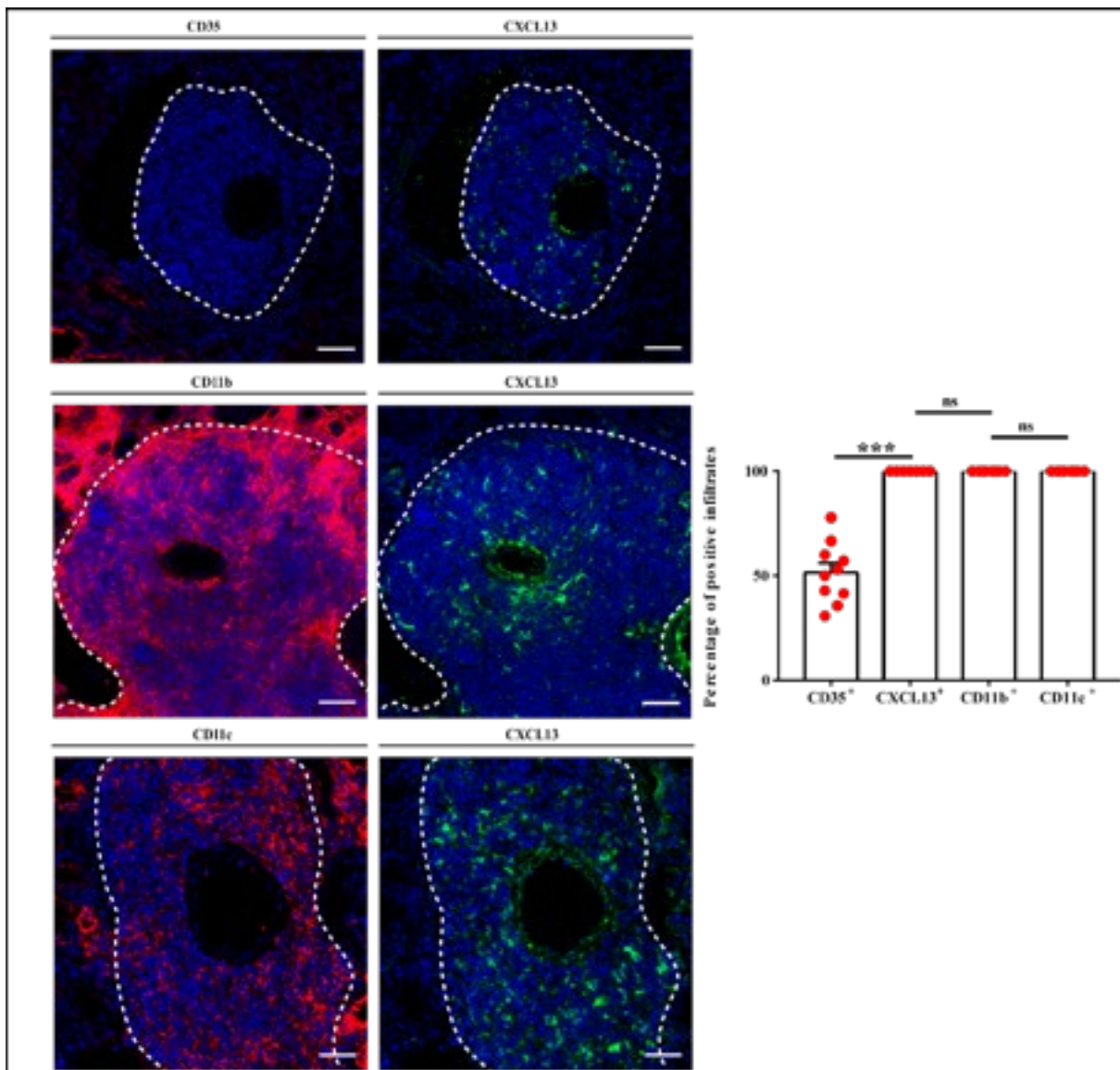
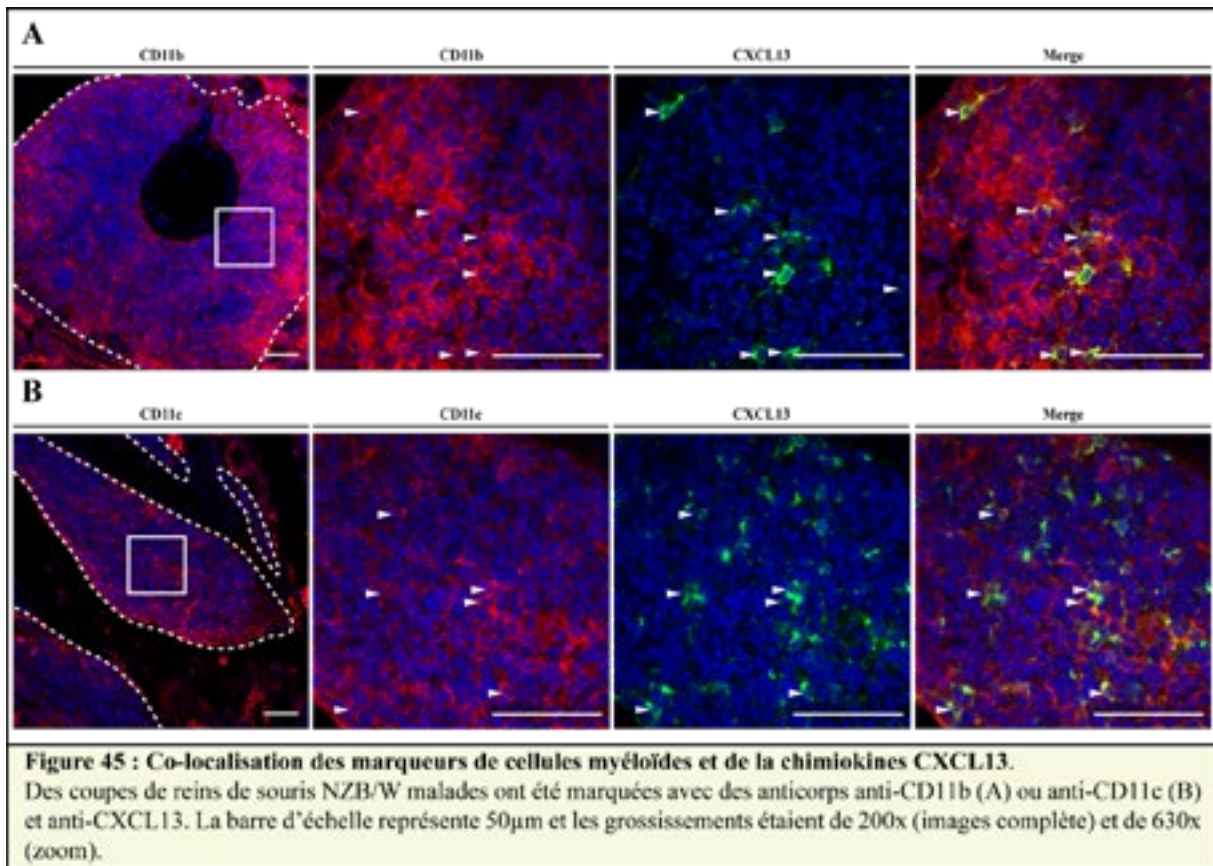


Figure 44 : Les FDC ne sont pas les seules cellules productrices de CXCL13 dans les OLT rénaux.
 Des coupes de reins de souris NZB/W malades ont été marquées avec des anticorps anti-CD35 ou anti-CD11b ou anti-CD11c et anti-CXCL13. La barre d'échelle représente 50µm et les grossissements étaient de 200x.
 Les pourcentages d'infiltrats contenant des FDC, des cellules de la lignée myéloïde (CD11b⁺ ou CD11c⁺) ou positifs pour CXCL13 dans les reins de souris NZB/W malades ont été comparés.
 Les résultats sont représentés sous la forme d'une moyenne ± SEM. ns : non significatif ; ***p<0,001 (Mann-Whitney)

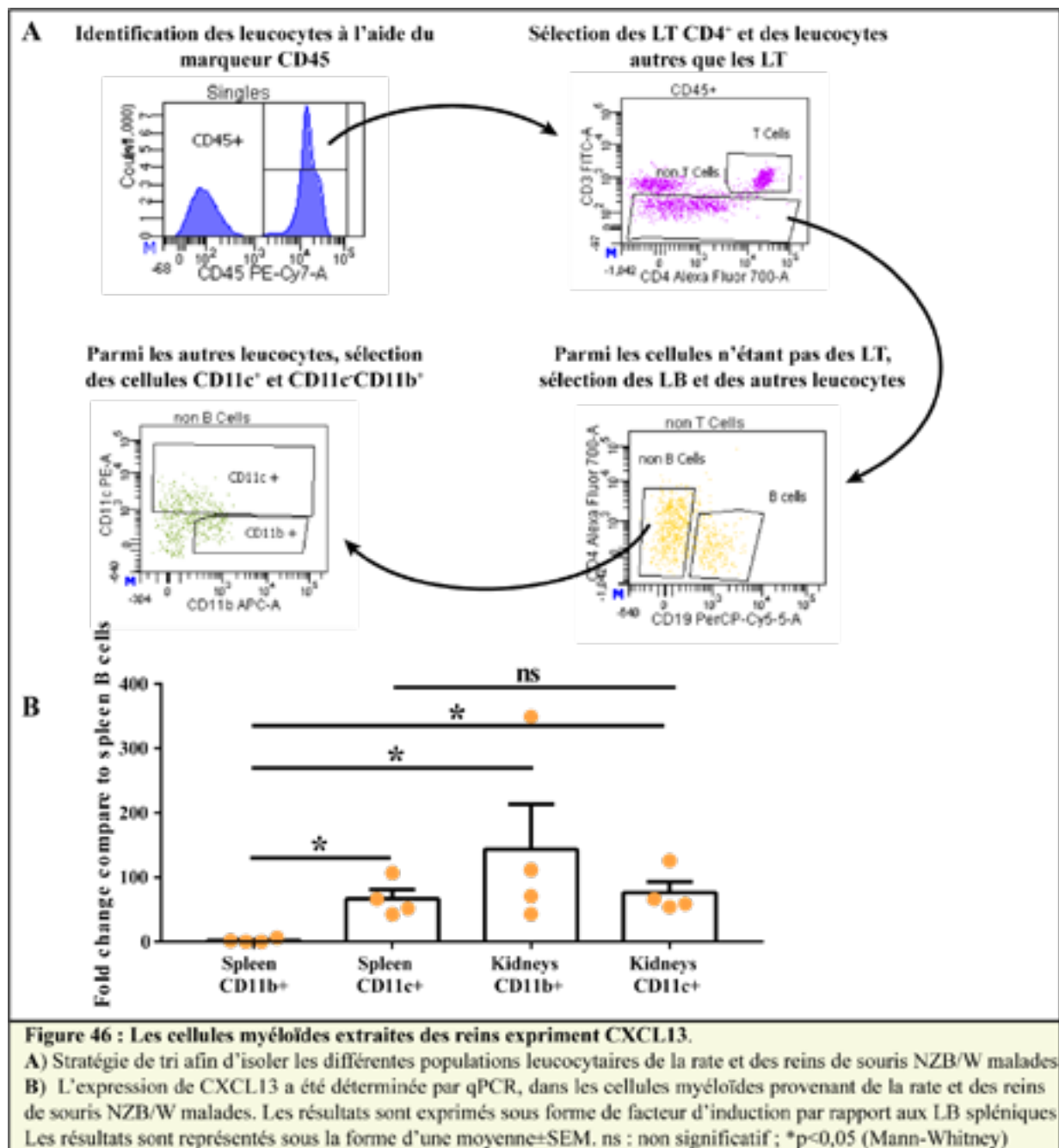
l'âge de 17-20 semaines, ce qui corrèle avec l'expression de CXCL13 et l'infiltration des LB (**Résultats non montrés**). Nous avons ainsi, comme ce fut le cas pour CD35, réalisé des co-marquages entre CXCL13 et les marqueurs CD11b ou CD11c. Comme il est possible de le voir

en **Figure 45**, les cellules CXCL13 positives exprimant pour une grande majorité, les marqueurs de cellules myéloïdes. Afin de renforcer nos observations sur coupes de reins, nous



avons décidé d'isoler les cellules myéloïdes à partir des reins et des rates de souris NZB/W malades afin d'examiner l'expression de CXCL13 par qPCR. Cette stratégie n'a pas été appliquée pour l'instant dans le cas des FDC car leur isolation à partir de tissus lymphoïdes est un procédé relativement difficile à mettre en œuvre (Usui *et al.*, 2012). Nous avons procédé de la manière décrite en **Figure 46A** et avons ainsi pu étudier l'expression de CXCL13 dans les cellules myéloïdes provenant de la rate et des reins de souris NZB/W malades et nous avons comparé cette expression à celle dans les LB spléniques de ces souris. Au niveau de la rate, on peut observer que seules les cellules CD11c⁺ expriment CXCL13 ce qui semble cohérent au vu des résultats similaires obtenus par Ishikawa et ses collaborateurs. Les cellules CD11c⁺ rénales expriment-elles aussi CXCL13 et ce, à un niveau similaire aux cellules spléniques (**Figure 46B**). Ce qui intéressant en revanche, c'est qu'au niveau des reins, les cellules CD11b⁺ expriment également CXCL13 et cette expression semble même supérieure à celle des autres types cellulaires. Bien que des études approfondies soient nécessaires, ces résultats nous indiquent que les cellules myéloïdes participeraient à la production de CXCL13 au sein des OLT rénaux chez la souris NZB/W. Il faut toutefois noter que chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, il existe au niveau du liquide synovial des LT capables de produire

CXCL13. Ces derniers ne produisant pas les cytokines caractéristiques des Th classiques et étant négatifs pour différents marqueurs de TFH ont été nommés iTh13 et sont capables de médier le recrutement des B au niveau des articulations (Kobayashi *et al.*, 2013). Cette hypothèse n'a pas encore été étudiée et nous ne pouvons exclure une potentielle participation de ces cellules dans la production de CXCL13 au niveau des reins.



Enfin, il est intéressant de comprendre quels sont les facteurs induisant le recrutement des cellules myéloïdes dans les reins des souris NZB/W. Ces cellules jouent non seulement un rôle dans la physiopathologie de la néphrite lupique (Voir introduction, partie 2) mais également, selon nos résultats, dans l'attraction des LB dans les reins. Dans la Publication N°2,

nous avons pu voir que les premières cellules infiltrant les reins sont les LT et que ce phénomène prend place avant le dépôt rénal d'IgG. La production d'auto-anticorps chez la souris lupique NZB/W vers l'âge de 15 à 20 semaines (**Lacotte et al., 2010**) or, dans notre étude, les souris du groupe 17-20 semaines commencent à présenter une infiltration rénale par les cellules de type myéloïde. Nous avons alors pensé que le dépôt d'auto-anticorps au niveau des reins pourrait représenter l'un des premiers signaux permettant l'attraction des cellules myéloïdes au niveau rénal. Il est en effet possible d'observer en **Figure 47A** que les souris de 17-20 semaines présentent un début de dépôt de complexes immuns/anticorps, visualisés ici grâce aux marquages C3 et IgG. Ces dépôts d'anticorps étant capables d'induire la sécrétion de chimiokines permettant le recrutement des leucocytes dans les reins (**Qing et al., 2006**), nous avons pensé que d'autres chimiokines inflammatoires, outre les ligands de CXCR3, pourraient être produites et médier le recrutement des cellules myéloïdes. Les chimiokines CCL2, CCL3 et CCL5 ont été impliquées dans la pathologie lupique (**Bignon et al., 2014 ; Devarapu et al., 2016**) et les récepteurs leur correspondant (CCR2, CCR1 et CCR5) sont fortement exprimés par les cellules myéloïdes. Comme mentionné dans le chapitre 2, l'expression de ces trois chimiokines n'est augmentée dans les reins des très jeunes souris NZB/W. En revanche, leur expression rénale tend vers une augmentation chez les souris du groupe 17-20 semaines (**Figure 47B**). De plus, cette expression augmente au fur et à mesure que la pathologie se développe, que les anticorps se déposent dans les reins et que les cellules myéloïdes infiltrer les reins.

Pour résumer, bien que des expériences complémentaires soient nécessaires afin de confirmer nos observations, nous proposons le modèle suivant. Chez les souris de 11 à 13 semaines, les LT infiltrer les reins en réponse à une augmentation des ligands de CXCR3 et de manière indépendante du dépôt des auto-anticorps. Chez des souris de 17-20 semaines, le développement des auto-anticorps débute et ces derniers vont commencer à se déposer dans les reins. Ce dépôt va participer à la potentielle production des chimiokines CCL2, 3 et 5 et permettre le recrutement de cellules myéloïdes dans les reins. Chez les mêmes souris, les premiers réseaux de FDC commencent à se mettre en place dans les infiltrats rénaux. Les cellules myéloïdes et les FDC produiront la chimiokine CXCL13 et ainsi permettront le recrutement des LB au niveau des reins, débutant la progression vers des OLT organisés.

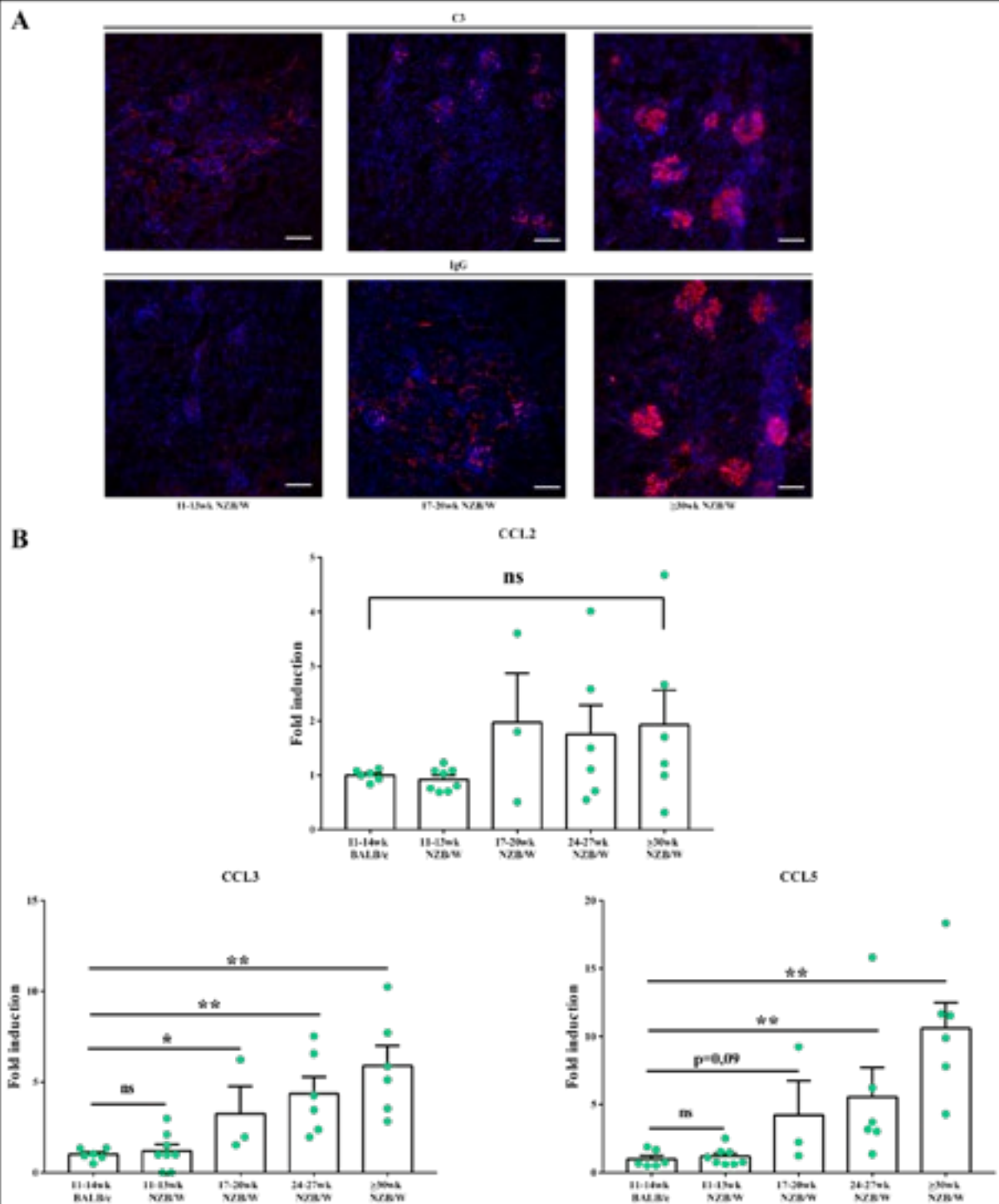


Figure 47 : Comment expliquer l'afflux de cellules myéloïdes dans les reins ?

A) Des coupes de reins de souris NZB/W âgées de 12, 19 et 43 semaines ont été marquées avec des anticorps anti-C3 et anti-IgG. La barre d'échelle représente 50µm et le grossissement était de 200x.

B) L'expression de CCL2, CCL3 et CCL5 ont été déterminées par qPCR, dans les reins de jeunes BALB/c saines et de NZB/W de différents âges. Les résultats sont exprimés sous forme de facteur d'induction par rapport aux souris BALB/c.

Les résultats sont représentés sous la forme d'une moyenne±SEM. ns : non significatif ; *p<0,05 ; **p<0,01 (Mann-Whitney)

V-Conclusion.

En conclusion, nous avons pu caractériser plus précisément le phénotype des cellules stromales présentes dans les OLT rénaux. Ces dernières sont fortement similaires à celles retrouvées dans les ganglions lymphatiques et peuvent jouer de nombreux rôles dans la structuration des OLT de par leur expression de diverses molécules d'adhésion/de la matrice extracellulaire et de chimiokines. Nous avons également pu remarquer un remaniement du stromal rénal en conditions lupiques, chez l'homme comme chez la souris. Enfin nos résultats suggèrent que le stroma ainsi que les OLT jouent un rôle dans le développement de la néphrite lupique.

Nous nous sommes également intéressé à la migration des LT naïfs dans les reins et pensons que, comme dans le cas des ganglions, celle-ci repose sur la production des chimiokines CCL19 et CCL21 et sur la présence de HEV. Nous avons également mis en lumière ou réfuté la potentielle implication de diverses cytokines dans la formation des OLT rénaux. Cette mise en place d'OLT semble faire intervenir des molécules connues pour jouer un rôle dans l'ontogenèse des ganglions lymphatiques, comme RANKL ou la lymphotoxine, mais ces dernières seraient plutôt impliquées dans le développement du stroma que dans les étapes précoces de néogenèse lymphoïde. Ce processus de développement de tissus lymphoïdes ectopique pourrait débiter plus précocement que ce que nous avons pu montrer dans les chapitres précédents mais il ne nous est pas possible pour l'instant tirer une conclusion ferme et définitive.

Finalement, nous avons pu étudier la migration des LB dans les reins en montrant que ces derniers migrent plus tardivement dans les reins par rapport aux LT. Ils seraient attirés par une production locale de CXCL13 médiée par les FDC et les cellules myéloïdes. Ces dernières pourraient migrer dans les reins en réponse à la production de diverses chimiokines inflammatoires dont l'induction pourrait reposer, en partie, sur le dépôt rénal de complexes immuns.

Conclusion

Et

Discussion

Conclusion/Discussion

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé au processus de néogenèse lymphoïde dans le cadre d'une maladie auto-immune : le lupus. Cette maladie présente de nombreuses atteintes plus ou moins sévères et se caractérise par une rupture de tolérance aboutissant, entre autres, à la production d'auto-anticorps dirigés contre des composants nucléaires. L'une des atteintes emblématiques du lupus est la néphrite lupique qui, si elle n'est pas prise en charge, va conduire à une défaillance rénale terminale pouvant mener au décès des patients. Cette néphropathie se caractérise par le dépôt de complexes immuns et d'auto-anticorps ainsi que par l'infiltration inflammatoire de cellules immunitaires dans le rein, aboutissant à une inflammation chronique. Dans des cas similaires d'inflammation chronique d'un tissu ou d'un organe, il est fréquent d'observer un phénomène nommé néogenèse lymphoïde. Ce processus correspond à la formation de structures lymphoïdes ectopiques (appelées organes lymphoïdes tertiaires ou OLT) dans le tissu cible de l'inflammation. Ces derniers présentent de nombreuses similarités structurelles et fonctionnelles avec les organes lymphoïdes secondaires (OLS), tels que les ganglions lymphatiques, et participent à la génération d'une réponse locale au sein de l'organe enflammé. Le rein étant le site d'une inflammation chronique et d'une infiltration immunitaire au cours du lupus, nous nous sommes attachés à la caractérisation de ces structures lymphoïdes et aux mécanismes de leur mise en place chez un modèle murin spontané de lupus : la souris NZB/W.

Le Pourquoi étudier les OLT dans les reins de souris NZB/W ?

Dans la publication N°1, nous avons pu mettre en évidence la présence d'OLT fonctionnels dans les reins de souris lupiques NZB/W ayant développé une atteinte rénale (protéinurie). La présence de ces OLT est-elle un reflet de ce qui se passe chez l'Homme et donc, nos résultats présentent-ils un intérêt allant au-delà de l'aspect fondamental ?

Est-il judicieux de rechercher des OLT dans notre modèle murin ? Premièrement, comme je l'ai mentionné ci-dessus, le rein est le siège d'une inflammation chronique au cours du lupus. Or, il avait été précédemment montré que dans de nombreux autres cas de maladies auto-immunes, cette inflammation engendre la formation d'OLT participant à la mise en place d'une réponse auto-immune locale pouvant participer à la détérioration de l'organe. C'est le cas, par exemple, des OLT présents dans le pancréas des souris NOD, où l'on retrouve des cellules reconnaissant l'insuline (*Astorri et al., 2010*). La génération locale d'auto-anticorps dans les reins pourrait faciliter leur dépôt glomérulaire ; nous avons d'ailleurs montré lors de la **Publication N°1** que les LB provenant des reins pouvaient se différencier en cellules sécrétrices

d'auto-anticorps. De plus, dans le cadre du lupus, des OLT se formant dans la cavité péritonéale d'un modèle murin induit au pristane ont été mis en évidence (**Nacionales *et al.*, 2009**). Chez l'Homme, Chang et ses collaborateurs ont été les premiers à décrire la présence d'OLT dans les reins de patients lupiques (**Chang *et al.*, 2011**). Ces OLT présentent une organisation similaire à ce que l'on peut observer dans les OLS et semblent également participer à la génération d'une réponse auto-immune locale, tel que suggéré par la présence de signes de commutation de classe et de sélection clonale. Plus tard au cours de notre étude, d'autres travaux sont venus renforcer l'hypothèse de l'existence d'OLT dans les reins au cours du lupus, OLT participant au développement de la néphrite. L'équipe de Liarski et ses collaborateurs ont mis en évidence une interaction entre LB et TFH directement dans les tissus provenant de biopsies rénales de patients lupiques (**Liarski *et al.*, 2014**). Cette interaction suggère la mise en place d'un GC et donc la présence d'OLT fonctionnels dans les reins. Une autre étude, bien que ne concernant pas le lupus mais la néphropathie à IgA, a décrit la présence d'OLT dans les reins des patients présentant des formes plus sévères de la maladie (**Pei *et al.*, 2014**). Chez la souris également, dans des cas de néphrites, la présence d'OLT fut rapportée comme lors de la génération de lésions rénales aiguës chez des souris âgées (**Sato *et al.*, 2016**). On retrouve également des OLT dans les reins de souris MRL/lpr n'exprimant pas l'enzyme AID et chez lesquelles la néphropathie est induite par l'injection d'anticorps anti-nucléosome (**Kang *et al.*, 2017**).

Les OLT que nous avons détectés chez la souris NZB/W peuvent-ils être un reflet de ce qui se passe chez les patients ? Nous avons pu remarquer que 100% des souris NZB/W âgées malades développaient des OLT. En revanche, les études réalisées chez l'Homme semblent discordantes. Seulement 37,5% des patients atteints de néphrite à IgA et 6% des patients souffrant de néphrite lupique présentent des OLT (**Chang *et al.*, 2011 ; Pei *et al.*, 2014**). Cette différence souris-Homme peut s'expliquer par le fait que les biopsies rénales sont réalisées à la surface de l'organe. Les infiltrats observés chez les patients lupiques ne correspondent probablement qu'à ceux retrouvés en zone corticale du rein. Or, j'ai pu observer chez la souris NZB/W, des infiltrats à la fois dans le cortex, et dans la médulla du rein. L'infiltrat médullaire/central est le premier à se former dans notre modèle et se trouve être de taille plus conséquente que les infiltrats corticaux. De plus, les HEV sont quasiment absentes des infiltrats corticaux et ces derniers présentent moins souvent certains critères identifiant des OLT tels que la présence de FDC ou de LB du GC. Nous pensons donc que la faible proportion de patients présentant des OLT peut s'expliquer par le fait que les biopsies ne permettent pas de mettre en évidence la présence de ces infiltrats médullaires qui sont plus précoces et souvent mieux organisés. Un autre biais est le fait que les biopsies ne sont réalisées que si cela s'avère

nécessaire, or nous avons pu remarquer que même chez des souris ne présentant pas encore de protéinurie déclarée, il est possible de retrouver des OLT. Il est donc possible que chez certains patients, des OLT rénaux soient présents mais non répertoriés du fait de l'absence de biopsie.

En plus de nous permettre de mieux comprendre ce qui se passe au cours du lupus, nos études pourraient permettre d'apporter un argument supplémentaire en faveur de l'implication des OLT dans la mise en place de réponses locales (favorables ou non). Les résultats présents dans la littérature se trouvent en effet ne pas être aussi clairs que ce que l'on pourrait penser. La majeure partie des études bloquant une molécule considérée comme impliquée dans la mise en place des OLT ne se sont pas intéressées aux conséquences que cela pourrait engendrer sur les OLS. Le blocage de la lymphotoxine par exemple, pourrait non seulement affecter les OLT mais présenter de nombreux effets sur les ganglions lymphatiques étant donné son implication dans l'ontogenèse lymphoïde et le développement des cellules stromales. Ainsi, comment peut-on être sûr que l'effet observé n'est pas dû à une diminution de la réponse auto-immune systémique ? A notre connaissance, seules quatre études ont pu précisément montrer l'implication véritable des OLT. Elles concernent : le maintien de la réponse antivirale par les iBALT (**Moyron-Quiroz *et al.*, 2004**), la déplétion spécifique des Treg dans les OLT, présents dans le cancer du poumon, restaurant une réponse anti-tumorale (**Joshi *et al.*, 2015**), la greffe d'OLT induits chez des souris immunodéficientes permettant la mise en place d'une réponse suite à une immunisation (**Kobayashi *et al.*, 2016**) et la greffe d'OLT à des souris humanisées menant à la production d'auto-anticorps (**Humby *et al.*, 2009**). Nous espérons donc que nos résultats permettraient de montrer une participation à la mise en place d'une réponse auto-immune rénale et compléterait les études précédemment citées. Nous avons effectivement mis en évidence dans la **Publication N°1**, la capacité des LB, présents dans les OLT rénaux, à se différencier en plasmocytes sécrétant des auto-anticorps, montrant alors l'implication des OLT dans la génération d'une réponse auto-immune localisée dans les reins.

Finalement, y-a-t-il un intérêt autre que fondamental dans l'étude de ces OLT et de leur formation au cours du lupus ? Les traitements proposés pour cette maladie reposent majoritairement sur l'utilisation de thérapies peu ciblées et présentant de nombreux effets secondaires. Les traitements classiques se basent sur l'utilisation de corticoïdes combinés ou non avec des immunosuppresseurs. Le but est dans ce cas de réduire rapidement l'inflammation afin de limiter au maximum les dommages des organes/tissus. L'aspécificité de ces traitements va cependant engendrer de nombreux effets secondaires comme l'augmentation accrue du risque d'infections ou de cancers. Cela indique pourquoi, aujourd'hui, de nombreux efforts ont été mis en place afin de développer des thérapies ciblées se basant sur les découvertes

impliquant différents facteurs dans la physiopathologie du lupus. La plus connue est le rituximab, cet anticorps a été développé afin de permettre une déplétion des LB mais se trouve insuffisamment efficace au cours du lupus (**Ehrenstein *et al.*, 2016**). Au contraire, l'anticorps ciblant la cytokine BAFF, le belimumab, est aujourd'hui le seul traitement de cette catégorie ayant obtenu une autorisation de mise sur le marché. La compréhension des mécanismes permettant la mise en place des OLT au cours du lupus permettrait d'ouvrir la voie vers le développement de nouvelles biothérapies. Le ciblage de ces derniers a, d'ailleurs, déjà fait ses preuves dans des modèles murins. La suppression des OLT en cas d'auto-immunité, par l'utilisation de la molécule de fusion LT β R-Ig, a permis une amélioration des symptômes dans des modèles murins de sclérose en plaque, de diabète de type 1 et de syndrome de Sjögren. De plus, un anticorps ciblant la lymphotoxine alpha est en cours d'essai clinique dans le cadre de la PR et semble montrer des résultats prometteurs (**Emu *et al.*, 2012**). Cette efficacité thérapeutique est aussi retrouvée dans des modèles de rejet de greffe comme lors de transplantations cardiaques, où la disparition des OLT s'accompagne d'une diminution de la réponse humorale et d'une meilleure tolérance des greffons (**Motallebzadeh *et al.*, 2012**). Nous pensons donc que la compréhension du développement des OLT peut ouvrir la voie vers de nouvelles thérapies dans le cadre du lupus, mais également que les mécanismes que nous aurons mis en évidence pourraient permettre le développement de thérapies faisant preuve d'efficacité dans d'autres maladies où des OLT sont présents.

II-Etapes précoces de la formation des OLT.

Lors de l'étude ayant mené à la **Publication N°2**, nous avons étudié les mécanismes cellulaires et moléculaires aboutissant à la formation d'OLT dans les reins au cours du lupus. Nous avons pu montrer, dans un premier temps, que l'infiltration immunitaire des reins se met en place très tôt au cours de la maladie et est indépendante de la production des auto-anticorps et de leur dépôt rénal. Ce résultat est assez surprenant étant donné que le dépôt de complexes immuns est classiquement admis comme ayant un rôle dominant dans l'induction de l'inflammation et dans la physiopathologie de la néphrite lupique. Le recrutement des cellules immunitaires est permis par la production locale de chimiokines inflammatoires et les cellules rénales sont capables de produire ces dernières en réponse au dépôt d'anticorps (voir **introduction, partie 2, paragraphe III**). Le concept admis jusqu'à présent était que le dépôt d'anticorps dans les reins induisait la production de chimiokines et permettait le recrutement des leucocytes. Nos résultats suggèrent un mécanisme antérieur au dépôt des anticorps et faisant intervenir une production déjà accrue des chimiokines inflammatoires CXCL9, 10 et 11. Peut-

on alors trouver des arguments étayant cette théorie, qui, ne se base pour le moment que sur la présence ou absence des auto-anticorps au moment de l'observation ? Un premier argument vient de notre expérience préliminaire portant sur les transferts de moelle. Nous avons pu observer une différence d'infiltration immunitaire dans les reins entre nos souris NZB/W ayant reçu de la moelle de souris saines et notre souris NZB/W Ctrl⁺, en dépit d'une production similaire d'auto-anticorps et des dépôts rénaux équivalents. Cela suggère qu'il existe d'autres facteurs influant sur la migration des cellules immunitaires dans les reins et que ces derniers ne dépendent pas directement du dépôt rénal des anticorps. Une étude comparant la migration des leucocytes dans les reins de souris NZB/W « classiques » ou de souris NZB/W chez qui la maladie est accélérée par traitement à l'IFN α , nous apporte une première réponse (**Adalid-Peralta *et al.*, 2008**). Il semble en effet, que des facteurs intrinsèques aux reins soient requis pour une bonne migration des cellules immunitaires, en particulier la production de chimiokines. Bien que ce travail soit réalisé dans le cas de souris malades, au contraire de notre étude sur les étapes précoces, il met en lumière l'importance de la production de chimiokines dans les reins et le fait que cette dernière peut varier selon le contexte et ainsi jouer sur la migration des leucocytes. Des défauts d'ordre génétique ou épigénétique pourraient influencer cette production de chimiokines et permettre l'attraction des cellules immunitaires avant l'intervention de facteurs extérieurs tel que le dépôt d'auto-anticorps. Cette production précoce de chimiokines a été d'ores et déjà été décrite chez le modèle MRL/lpr. Dans les reins de ces souris, en effet, des chimiokines inflammatoires sont exprimées de façon très précoce et cette expression précède l'infiltration par les leucocytes et le dépôt d'auto-anticorps (**Perèz De Lema *et al.*, 2001**).

Si ce ne sont pas les auto-anticorps qui induisent la production de chimiokines chez les souris NZB/W jeunes, quels mécanismes permettraient d'expliquer cette production précoce ? Dans notre modèle, nous avons retrouvé une expression de CXCL10 dans les glomérules. Selon les études, les chimiokines inflammatoires sont retrouvées dans les glomérules ou au niveau des cellules de l'épithélium tubulaire. La comparaison des profils d'expression entre des glomérules de souris MRL/lpr et de souris saines contrôles a permis d'observer une augmentation d'expression de nombreux gènes parmi lesquels CXCL9, 10 et 11 (**Teramoto *et al.*, 2008**). Ces résultats confirment la possibilité d'une production glomérulaire des ligands de CXCR3. Chez la souris NZB/W, la production très précoce de cytokines ou de chimiokines dans les glomérules avait été suggérée par Ka et ses collaborateurs. Les cellules mésangiales de souris NZB/W âgées de seulement 8 semaines produisent la chimiokine CCL2 en réponse à une stimulation au LPS (**Ka *et al.*, 2007**). Pour expliquer cette production précoce dans notre

contexte, nous avons deux hypothèses. La première serait qu'une dérégulation de micro-ARN serait à l'origine de la production accrue des chimiokines ligands de CXCR3. En effet, l'expression du miR-let-7a est augmentée dans les cellules mésangiales de souris NZB/W âgées de 8 semaines, ce qui conduirait à une augmentation d'expression de l'IL6 (Chafin *et al.*, 2013). Un mécanisme similaire pourrait être impliqué dans la production excessive de chimiokines inflammatoires dans les glomérules des jeunes souris NZB/W, CXCL10 ayant par exemple été montrée comme ciblée par le miR-15a, qui se trouve diminué lors de la myasthénie (Liu *et al.*, 2016). La seconde explication ferait intervenir les TLR. L'implication de ces récepteurs dans la pathologie lupique a depuis longtemps été décrite (voir introduction) et la mauvaise prise en charge des corps apoptotiques durant cette maladie rend les acides nucléiques plus facilement disponibles pour une liaison avec ces récepteurs. Or, les cellules mésangiales sont capables de produire de l'IFN β suite à une stimulation de TLR3 et cet IFN agit sur ces mêmes cellules et leur permet de produire des chimiokines telles que CCL5 et CXCL10 (Tanaka *et al.*, 2013). Ce type de processus semble être suffisant pour induire la formation d'OLT puisque la stimulation par des ligands de TLR4 et TLR3 induit une production thymique de CXCL13 et la formation de ces structures lors de la myasthénie (Robinet *et al.*, 2017). Fait intéressant, la chloroquine, un des traitements de première ligne du lupus, est capable de diminuer la production d'IFN β et de CCL5 dans les cellules mésangiales humaines après stimulation de TLR3 (Imaizumi *et al.*, 2017). Cette publication permet d'une part, de mieux comprendre l'action de cette molécule mais d'autre part, indique que cibler la production rénale précoce de chimiokines pourrait se révéler être une piste thérapeutique prometteuse.

III-Peut-on impliquer d'autres cellules/molécules que les LT/chimiokines inflammatoires dans la formation des OLT dans les reins ?

Nous venons de discuter ci-dessus des premières étapes de formation des OLT et de l'implication des chimiokines inflammatoires dans ce processus. Mais qu'en est-il des autres cellules/molécules que nous avons pu mettre en lumière au cours de ces travaux, peut-on les impliquer dans la mise en place des OLT ? Y aurait-il d'autres facteurs impliqués ?

La première question à se poser concerne les LT_i. Ce sont eux qui, lors de l'ontogenèse lymphoïde, vont initier les processus de remodelage des vasculatures et de différenciation du stroma. Chez l'adulte, il existe des équivalents des LT_i qui pourraient jouer le même rôle que leurs équivalents embryonnaires. L'implication de ces cellules lors du processus de néogenèse lymphoïde a été décrite dans différentes études. L'augmentation de leur survie par une surproduction d'IL7 induit la formation de tissus lymphoïdes ectopiques dans les muqueuses

(Meier *et al.*, 2007). Ils semblent également nécessaires à la formation des OLT pancréatiques suite à l'expression ectopique de la lymphotoxine (Link *et al.*, 2011). Dans notre contexte, nous n'avons pas pu clairement mettre en évidence la présence ou l'absence de LT_i. Toutefois, la présence de cellules CD3⁻CD4⁺ pouvant correspondre à des LT_i-like dans les reins pourrait indiquer une potentielle implication de ces derniers dans le processus de néogenèse lymphoïde. Il existe cependant des contextes où la présence de LT_i n'est pas requise. Par exemple, l'absence de LT_i ne semble affecter ni la formation des OLT, ni la formation des OLS dans un contexte de forte expression du TNF α (Furtado *et al.*, 2014). Les cellules TH17 sont proches des LT_i et pourraient les « remplacer » ; cela a été décrit dans le cas des OLT du système nerveux central (Peters *et al.*, 2011). De plus, l'IL17 est capable d'induire la formation des iBALT en l'absence de LT_i (Fleige *et al.*, 2014). Cette dernière étude est intéressante car elle montre que bien qu'une petite proportion de LT_i ait été détectée, ils ne sont pas impliqués dans le processus de néogenèse ou ne sont tout du moins pas indispensables. C'est grâce à l'expression de la lymphotoxine que les LT_i assurent leurs rôles lors de la formation des ganglions. La lymphotoxine est cependant également exprimée par les LT activés, ces derniers pourraient alors efficacement remplacer les LT_i par ce biais. Cela se trouve être le cas dans un modèle de formation d'OLT induite par expression ectopique de la chimiokine CCL21 dans la thyroïde (Marinkovic *et al.*, 2006). Dans ce contexte, les LT permettent la formation des OLT et jouent un rôle primordial dans le développement des HEV de façon lymphotoxine-dépendante et en l'absence de LT_i. Les LT CD4⁺ étant les premiers à infiltrer les reins dans notre modèle, ils pourraient jouer le rôle des LT_i de la même manière que dans l'exemple des OLT thyroïdiens. Nous avons pu mettre en évidence l'expression de la lymphotoxine et son augmentation au cours du développement de la maladie. Son expression ectopique dans le pancréas permet d'induire la formation d'OLT (Drayton *et al.*, 2003) et le recrutement des LT naïfs dans les OLT pancréatiques se trouve lui aussi dépendant de la lymphotoxine (Lee *et al.*, 2006). Nous pensons donc fortement que la lymphotoxine pourrait jouer un rôle dans la mise en place des OLT dans les reins au cours du lupus mais il nous faudrait d'autres données afin de confirmer cela. Il serait alors intéressant de déterminer si les premiers LT infiltrant les reins expriment la lymphotoxine ou produisent de l'IL17A.

Outre les LT_i et la lymphotoxine, les chimiokines homéostatiques sont également essentielles pour la formation des organes lymphoïdes. Nous avons pu détecter la présence des chimiokines CCL19, CXCL13 et CCL21 dans les reins de souris lupiques et pensons qu'elles participent au recrutement des LT naïfs et des LB, événements ultérieurs à l'infiltration précoce inflammatoire. L'expression ectopique de diverses chimiokines homéostatiques dans le

pancréas induit le recrutement de cellules immunitaires mais ne se traduit pas systématiquement par la formation d'OLT (**Luther *et al.*, 2002**). CCL19 permet le recrutement de lymphocytes, de DC et la formation de HEV et d'un réseau de cellules stromales, tandis que CXCL12 n'induit la formation que de petits infiltrats composés majoritairement de LB, DC et plasmocytes. CCL21, l'autre ligand de CCR7, induit également la formation d'infiltrats organisés pancréatiques et cela, de manière dépendante de la lymphotoxine. Impossible pour le moment, de déterminer précisément si, dans le contexte lupique, la production de ce type de chimiokines participe au recrutement de LT exprimant la lymphotoxine ou si ces chimiokines sont induites par la lymphotoxine. Nous ne pouvons seulement qu'imaginer un scénario en observant la cinétique des résultats obtenus par qPCR : l'expression de CCL19 étant détectée avant celle de la lymphotoxine, la seconde hypothèse semble moins probable. Peut-on envisager que ces chimiokines soient, tout comme CXCL9, 10 et 11, essentielles dans les premières étapes de la néogenèse des OLT rénaux ? Si tel était le cas, ne devrions-nous pas nous attendre à un effet moins prononcé du blocage de CXCR3 ? Il y a deux hypothèses pouvant expliquer cela. Premièrement, il est possible que l'inhibition du recrutement des LT activés (exprimant probablement la lymphotoxine) mène à une diminution locale de CCL19/21 et qu'ainsi le blocage de cette première voie de recrutement agisse sur la seconde. La seconde hypothèse est que ces chimiokines puissent également agir via CXCR3 et que son blocage affecte le recrutement dépendant des chimiokines CXCL9/10/11 mais aussi dépendant de CCL21/19. Cette hypothèse est un peu « extrême » mais CCL21 a été montrée comme capable de se lier au récepteur CXCR3 (**Soto *et al.*, 1998**), elle n'est donc pas improbable. Certains de nos résultats semblent cependant valider la première hypothèse, puisque nous avons observé une tendance à la diminution de CXCL13 et CCL19 suite au blocage de CXCR3 (**Résultats non montrés**).

IV-Quels éléments impliqués dans la formation des OLT pourraient constituer des cibles thérapeutiques intéressantes dans le cas de la néphrite lupique ?

Comme mentionné ci-dessus, de nombreuses molécules sont impliquées dans la mise en place des OLS et des OLT. Sur la base de nos résultats, nous avons choisi de bloquer le récepteur aux chimiokines inflammatoires CXCR3. D'autres hypothèses sont envisageables, telles que l'inhibition d'autres chimiokines inflammatoires, des chimiokines homéostatiques ou leur récepteur ou encore de la lymphotoxine. Mais sont-elles adaptées ?

Comme mentionné dans le paragraphe précédent, les Th17 peuvent être impliqués dans la formation des OLT. Serait-il intéressant de bloquer cette voie dans le cadre de la néphrite lupique ? Tout d'abord, nous n'avons détecté qu'une faible production d'IL17A dans les reins

souris NZB/W malades, suggérant qu'elle ne joue peut-être pas un rôle prépondérant, tout du moins dans le maintien des OLT et dans la néphrite. Par ailleurs, Schmidt et ses collaborateurs ont montré que le blocage de ladite cytokine ne permet pas d'empêcher la survenue de la néphrite lupique (**Schmidt et al., 2015**). Enfin, CXCR3 permet le recrutement des Th1 mais également des Th17 chez la souris MRL/lpr (**Steinmetz et al., 2009**). Si tel est également le cas chez la souris NZB/W, l'utilisation de l'antagoniste de CXCR3 doit alors être efficace sur cette population.

La lymphotoxine étant capable de promouvoir l'expression de diverses chimiokines, la mise en place du stroma et ainsi la formation d'OLT, elle représente une cible intéressante afin de traiter les pathologies dans lesquelles des OLT sont impliqués. Le blocage de la lymphotoxine a prouvé son efficacité lors de transplantations cardiaques en diminuant la réponse humorale délétère pour le tissu greffé (**Motallebzadeh et al., 2012**), ou lors du syndrome de Sjögren en diminuant la production de CXCL13 dans les glandes lacrymales (**Fava et al., 2011**). Il existe cependant un point faible dans ces études : la spécificité du ciblage. Le blocage de la voie de la lymphotoxine va, certes, pouvoir affecter les OLT, mais également les OLS. Dans les deux articles cités, les auteurs ne se sont pas intéressés à ce qui pouvait se produire à la suite du traitement au sein des ganglions lymphatiques, ce qui est malheureusement le cas d'un grand nombre de publications portant sur cette thématique. En revanche, un autre travail, portant également sur le syndrome de Sjögren, s'est intéressé à l'impact du blocage de la lymphotoxine dans les ganglions chez la souris NOD (**Gatumu et al., 2009**). Bien que les effets soient moins prononcés que dans les glandes salivaires, il est possible d'observer une diminution du nombre de HEV, des réseaux de FDC moins développés, une diminution de CXCL13 et une expression de CCL19 totalement absente dans certains ganglions. Ce type d'observation amène à s'interroger sur la spécificité du traitement : bien que cela affecte grandement les OLT dans les glandes salivaires, rien n'indique que l'amélioration du flux salivaire ne soit pas en partie due à une réponse globale plus faible dans les OLS conduisant à une moindre activation des lymphocytes et donc une infiltration réduite dans les glandes salivaires. Finalement, ce type d'approche ne différerait pas des traitements actuels visant à réduire globalement les réponses immunitaires excessives et pourrait présenter le même type d'effets secondaires, tels que le risque accru d'infections ; le blocage de la lymphotoxine ayant été montré comme aggravant la colite induite par une infection par *Citrobacter rodentium* (**Spahn et al., 2004**). Outre le risque aggravé d'infection, il est possible que le traitement présente un effet inverse à ce que l'on pourrait attendre. En effet, le blocage de la voie de la lymphotoxine lors d'une arthrite induite au collagène aggrave la maladie en favorisant une

réponse Th1 et une forte production d'IFN γ et d'anticorps d'isotype IgG2a (**Han et al., 2005**). Le ciblage de cette voie est donc à considérer avec précautions. En ce qui concerne le lupus cependant, l'expression de la lymphotoxine et de son récepteur ont été retrouvés dans les reins de patients (ce qui concorde avec notre étude) et l'administration de la molécule de fusion précédemment citée est efficace chez les souris NZB/W (**Seleznik et al., 2015**). En effet, la pathologie rénale se trouve diminuée en lien avec une plus faible infiltration de LT et macrophages dans les reins, sans pour autant jouer sur le dépôt des complexes immuns. Ces résultats semblent prometteurs, il faut cependant garder à l'esprit que premièrement, aucune donnée n'indique s'il y a un effet ou non sur les OLS, deuxièmement le traitement ne présentait plus d'effet s'il était démarré plus tardivement, et pour finir, ce blocage a été réalisé chez des souris dont la pathologie a été accélérée par l'injection d'un adénovirus permettant une forte production d'IFN α . L'utilisation thérapeutique de molécules bloquant la lymphotoxine dans le cadre du lupus reste une voie à étudier dans le futur, d'autant que des polymorphismes dans le gène codant la lymphotoxine alpha ont été associés au lupus (**Zhang et al., 2015**).

Et finalement, ne pourrait-on pas envisager de bloquer les chimiokines homéostatiques ou leurs récepteurs de la même manière que nous l'avons fait pour la voie CXCR3-CXCL9/10/11 ? Nous avons discuté ci-dessus de la potentielle implication des chimiokines liant le récepteur CCR7 dans le développement des OLT rénaux. De plus, l'axe CCL21-CCR7 est impliqué dans la prolifération des cellules mésangiales (**Banas et al., 2002**), qui représente l'une des caractéristiques de la glomérulonéphrite lupique. Serait-il alors judicieux d'envisager de bloquer CCR7 ou ses ligands afin de traiter la néphrite ? La réponse semble être que non. En effet nous avons pu noter, au cours de notre étude, une forte accumulation de LT activés dans les reins et dont nous pensons qu'ils participent fortement aux étapes d'initiation et au développement des OLT et de la néphrite. Le blocage seul de cette voie homéostatique n'aurait probablement qu'un impact relativement faible sur la migration de ces cellules. Un travail a montré que la déficience en CCR7 chez la souris entraîne une accumulation de LT activés dans les muqueuses et induire la formation d'OLT et la détérioration du tissu (**Hopken et al., 2006**). Cela n'est pas surprenant car en l'absence de signaux chimiotactiques CCR7 dépendants, la migration des LT vers les ganglions va être fortement diminuée et leur relocalisation dans les tissus périphériques s'en trouve facilitée. Et qu'en est-il de la chimiokine CXCL13 ? Nous pensons, selon nos résultats préliminaires, que cette chimiokine est impliquée dans le recrutement des LB au niveau des reins au cours du lupus. De plus, l'implication des OLT dans la pathologie rénale lupique passe probablement, au moins en partie, par l'intermédiaire de la génération locale de cellules productrices d'auto-anticorps ; bloquer le recrutement des LB dans

les reins pourrait empêcher ce phénomène local et peut-être participer à une amélioration de l'état rénal. De plus, CXCL13 semble bel et bien impliquée dans la pathologie de la néphrite lupique. Cette chimiokine induit la prolifération des cellules mésangiales exprimant le récepteur CXCR5 et est augmentée dans le sérum des patients lupiques (**Da et al., 2016**). De plus, son taux semble refléter la sévérité de la néphrite et corrélait avec la mise en place de ces structures lymphoïdes dans les reins (**He et al., 2016**). Le blocage de cette chimiokine a été réalisé dans deux contextes avec des résultats distincts. Chez la souris NOD, le blocage de CXCL13 induit une désorganisation des infiltrats mais n'affecte ni leur recrutement dans le pancréas, ni le processus local d'hypermutation somatique, et ne prévient pas la survenue du diabète (**Henry et al., 2010**). Au contraire chez la souris MRL/lpr, ce blocage permet de diminuer la protéinurie et les dommages rénaux (**Wu et al., 2015**). Il semble que l'effet soit local et systémique puisque l'on peut observer à la fois une réduction des dépôts et de l'inflammation rénale, mais également des taux sériques inférieurs d'auto-anticorps et une diminution du ratio Th17/Treg dans la rate. Il serait intéressant d'évaluer l'effet d'un tel blocage dans notre modèle afin d'étudier son impact sur les différentes phases de construction de l'OLT, sur l'atteinte rénale et sur la réponse auto-immune systémique.

V-Le blocage de la voie CXCR3-CXCL9/10/11 au cours du lupus.

Au cours de ce travail, nous en sommes venus à identifier CXCR3 et ses ligands comme des acteurs majeurs de la migration des LT dans les reins et du développement des OLT. En effet, les trois ligands de CXCR3 sont exprimés très tôt dans les reins au cours du lupus et permettent le recrutement des premiers LT. D'autres ont également mis en évidence une expression précoce de ces chimiokines dans le cas d'autres maladies auto-immunes. Ainsi, Burke et ses collaborateurs ont pu remarquer qu'il y avait une expression des ligands de CXCR3 dans le pancréas des patients diabétiques et des souris NOD (**Burke et al., 2016**). Cette expression de chimiokines inflammatoires est induite par l'IFN γ de manière STAT1-dépendante, permet le recrutement des LT et précède le développement du diabète. Outre les résultats présentés dans la **Publication N°2**, notre équipe a précédemment mis en évidence l'implication de CXCR3 et de ses ligands dans la migration des plasmocytes dans les reins (**Lacotte et al., 2013**). Il existe également d'autres travaux indiquant que CXCR3 représenterait une cible intéressante au cours du lupus. Tout d'abord, la diminution de la proportion de LT CXCR3⁺ dans la circulation sanguine durant la transplantation rénale suggère un recrutement local de ces cellules dépendant de ce récepteur (**Caballero et al., 2014**). Deuxièmement, CXCR3 a été détecté au niveau du mésangium chez des patients présentant une

glomérulonéphrite proliférative et la liaison de l'un de ses ligands est capable d'induire la prolifération des cellules mésangiales (**Romagnani et al., 1999**). Finalement le biglycane, une molécule de la matrice extracellulaire, semble permettre le recrutement des Th1 et Th17 chez la souris MRL/lpr de manière CXCL10-dépendante (**Nastase et al., 2018**).

Outre le lupus et la néphrite, il existe également d'autres contextes pathologiques où le blocage de CXCR3 s'est révélé efficace. L'inhibition du recrutement des LT médié par CXCR3 permet de diminuer la sévérité de l'arthrite induite aux adjuvants (**Mohan et al., 2007**). Le blocage de cette voie chez la souris NOD permet à la fois de prévenir la survenue du diabète (**Burke et al., 2016**) mais également de prévenir partiellement la dysfonction des glandes salivaires (**Zhou et al., 2018**). Il faut cependant noter que dans le cas de la cholangite, la déficience en CXCR3 exacerbe la maladie en favorisant l'activation des LT CD8⁺ (**Ma et al., 2017**). Ensuite, la molécule que nous avons utilisée, à savoir l'AMG487, a également prouvé son efficacité dans divers cas de figure. Cette molécule permet d'inhiber la formation de métastases pulmonaires lors du cancer du sein (**Walser et al., 2006**). Elle permet également, en combinaison avec de la cyclosporine, de réduire la sévérité de la maladie du greffon contre l'hôte chez la souris (**Miao et al., 2018**). Cette double thérapie se trouve être plus efficace que la cyclosporine seule et semble jouer sur l'activation et la prolifération des LT, en particulier Th1.

Dans notre contexte, nous avons mis en place deux protocoles de blocage. Le premier, initié tôt et à long terme, afin de prévenir la formation des OLT et le second, effectué chez des souris déjà malades mais plus court, dans l'optique de déterminer si le blocage de CXCR3 pourrait représenter une thérapie intéressante. Ces deux stratégies nous ont permis de montrer l'implication de CXCR3, d'une part dans la mise en place et d'autre part dans le maintien des OLT dans les reins au cours du lupus, ainsi que dans la physiopathologie de la néphrite lupique. Existe-t-il des données dans la littérature qui conforteraient nos observations et indiqueraient que ce que nous avons mis en évidence est prometteur ? Cette question mérite d'être posée car le composé que nous avons utilisé afin de bloquer CXCR3, l'AMG487, a déjà fait l'objet d'essais cliniques dans le cadre du psoriasis mais fut stoppé en phase II en raison d'un manque apparent d'efficacité. Il serait intéressant de déterminer si au contraire dans le cas du lupus, il pourrait présenter un effet supérieur. Si l'on en revient à la littérature, nous avons déjà discuté précédemment de l'exemple de la MRL/lpr chez qui CXCR3 permet le recrutement des cellules Th1 et Th17. Il existe cependant d'autres études comme celle de Paust et ses collaborateurs, montrant que la délétion de CXCR3 dans les lymphocytes Treg est délétère lors d'une néphrite à croissants (**Paust et al., 2016**). Dans ce cas de figure, CXCR3 permet aux Treg de se localiser

au niveau des reins afin de pouvoir contrôler la réponse Th1 locale pathogénique. Il reste à déterminer si notre traitement a pu affecter la localisation des Treg, d'autant que nous avons pu montrer la présence de ces Treg et de TFreg dans les reins de souris NZB/W (**Publication N°1**) ; toutefois l'AMG487 inhibant l'infiltration de tous les LT CXCR3⁺ (dont les LT délétères), l'absence potentielle de Treg ne représente a priori pas un risque majeur. En revanche, une étude a pu montrer que le blocage de la voie CXCR3-CXCL10 induisait une fibrose rénale dans un modèle d'obstruction urétrale (**Nakaya et al., 2007**). Dans nos animaux, nous n'avons pas observé de différence apparente quant à la fibrose des reins, il est possible que le rôle de CXCR3 soit différent selon le type d'inflammation (aigu vs chronique). L'équipe de Vicki Kelley a démontré que parmi les ligands de CXCR3, CXCL9 mais pas CXCL10, serait impliqué dans le développement de la néphrite lupique chez la souris MRL/lpr et chez des souris saines dont la néphrite est induite à l'aide d'un sérum néphrotoxique (**Menke et al., 2008**). Ainsi, il est possible qu'au sein d'une même voie et dans un même modèle, les différents ligands présentent des activités et fonctions différentes. Pour finir, si l'on en revient à notre modèle, la souris NZB/W, de précédents travaux ont montré que l'absence de CXCR3 (souris NZB/W CXCR3 « knock-out ») n'avait aucun impact sur le développement de la néphrite (**Moser et al., 2012**). Cette différence d'observation est assez surprenante et nous ne pouvons qu'émettre des hypothèses pour expliquer cela. L'utilisation dans cette étude de souris déficientes pour CXCR3, à la différence d'un blocage à un temps donné, favorise peut-être la mise en place de voies alternatives permettant de compenser l'absence de CXCR3. Une tendance à l'augmentation du nombre de cellules sécrétant des IgG dans les reins en l'absence de CXCR3 a été notée, indiquant qu'une voie permettant un plus fort recrutement cellulaire se mettrait en place dans ces conditions. Pour finir, l'implication du récepteur CCR1 a été mise en évidence par Bignon et ses collaborateurs dans le développement de la néphrite lupique chez la souris NZB/W (**Bignon et al., 2014**). L'expression des deux principaux ligands de CCR1 est augmentée dans les reins de souris NZB/W malades et ils peuvent être détectés dans les glomérules et les infiltrats. Le blocage de CCR1 chez des souris malades, permet de réduire l'infiltration rénale par les LT, les monocytes et les macrophages et de diminuer les dommages rénaux. Cela suggère que CCR1 pourrait lui aussi jouer un rôle dans le maintien des OLT. Il serait intéressant également de déterminer si le blocage de CCR1 affecte les OLS, toutefois, l'absence d'effet sur les taux sériques d'auto-anticorps semble indiquer que tel n'est pas le cas. Selon nos résultats, CXCR3 est impliqué dans la migration précoce des LT dans les reins puisque nous avons observé l'expression précoce de ses ligands ; au contraire, nous n'avons pas observé d'augmentation de CCL3 et CCL5 dans les reins des très jeunes souris NZB/W.

CCR1 ne semblerait donc pas impliqué dans la migration précoce des LT et dans les premières étapes de néogenèse lymphoïde, mais participerait, avec CXCR3, à la poursuite de la mise en place des OLT et à leur maintien.

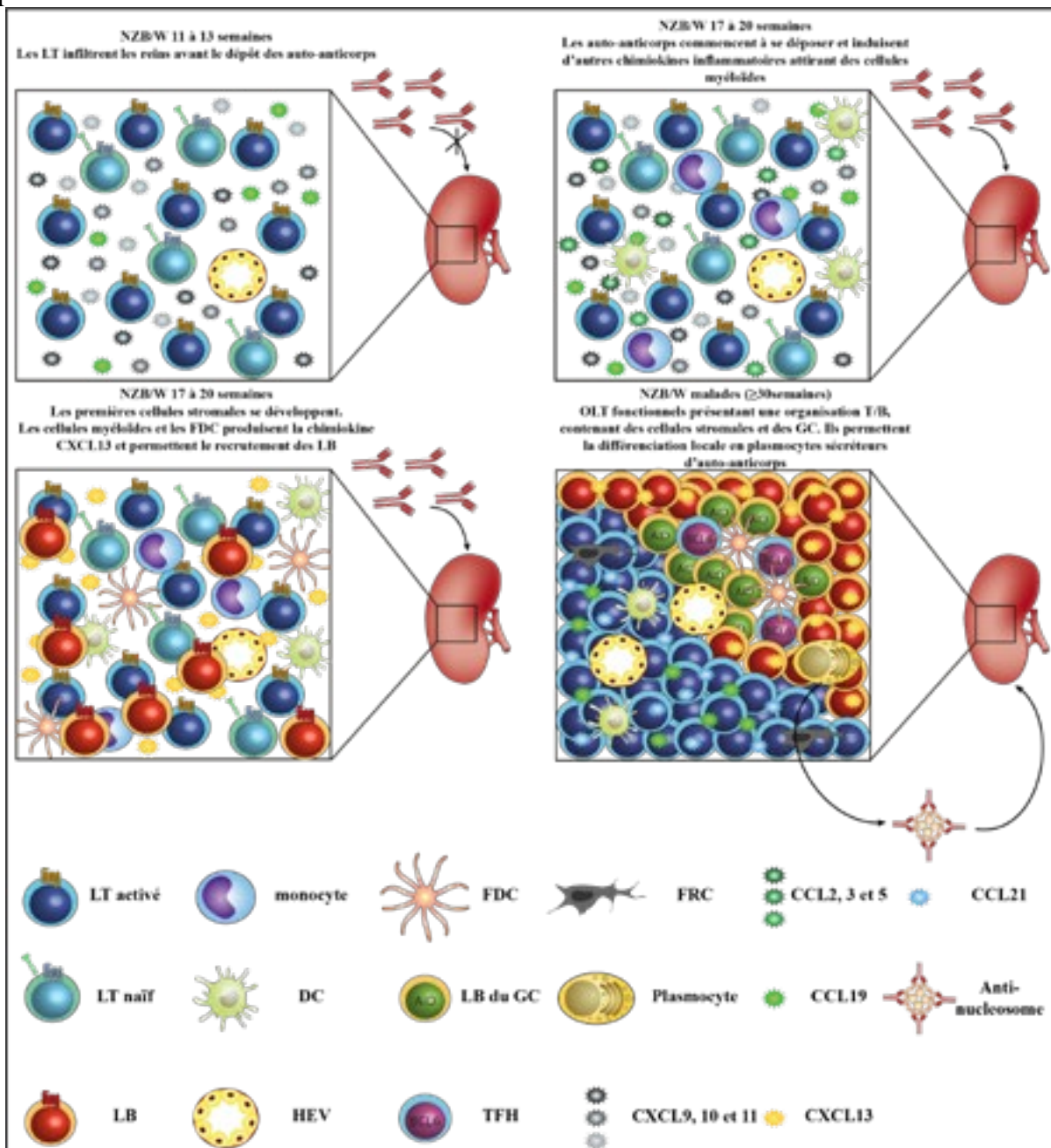


Figure 48 : Mécanisme proposé de mise en place des OLT dans les reins de souris lupiques NZB/W.
Les premières cellules infiltrant les reins de jeunes souris lupiques NZB/W (11 à 13 semaines) sont des LT activés exprimant le récepteur CXCR3, attirés par ses trois ligand (CXCL9, 10 et 11) et donc un début d'inflammation locale qui prend place avant le dépôt glomérulaire des auto-anticorps. On retrouve également chez ces souris, un faible proportion de LT naïfs attirés par la chimiokine homéostatique CCL19 et entrant via les HEV.
Plus tard, chez des souris allant de 17 à 20 semaines, les premiers dépôts de complexes immuns sont observables et semblent engendrer un production d'autres chimiokines inflammatoires permettant le recrutement de cellules de type «myéloïdes». Au même moment, les premières cellules stromales fibroblastiques se développent dans les infiltrats immunitaires rénaux. Les cellules «myéloïdes» ainsi que les FDC produisent localement la chimiokine CXCL13 et permettent ainsi le recrutement rénal des LB exprimant CXCR5.
Avec le développement de la maladie, de plus en plus de cellules infiltreront les reins pour aboutir à la formation d'OLT organisés et fonctionnels, permettant la génération locale de plasmocytes capables de sécréter des auto-anticorps, qui pourront participer au développement de la néphrite lupique.

Pour conclure, nos travaux ont permis la mise en évidence de la présence d'OLT fonctionnels dans les reins de souris lupiques NZB/W. Nos résultats suggèrent fortement leur participation au développement de la néphrite lupique et permettent d'apporter de nouvelles preuves de l'implication active de ces structures en situation pathologique. Nous avons également mis en lumière un mécanisme par lequel les OLT se mettent en place au cours du lupus (**Figure 48**). Nous apportons ainsi une pierre à l'édifice que représente la compréhension des mécanismes de néogenèse lymphoïde ; ceux-ci peuvent se révéler très variés selon les situations et peuvent faire intervenir diverses cellules et molécules. Certaines sont communes avec les mécanismes d'ontogénèse lymphoïde comme les LT_i, la lymphotoxine ou CCL21. D'autres se trouvent être spécifiques d'un modèle en particulier comme par exemple l'IL22 dans les glandes salivaires contenant des OLT induits. Il est également possible de retrouver des différences d'implication de la même cellule/molécule suivant le modèle considéré, tel que le cas des LT_i (pancréas *vs* iBALT) ou de CXCR3 (glandes salivaires NOD *vs* NZB/W). Enfin, deux voies différentes peuvent jouer des rôles proches ou similaires au sein d'un même organe/modèle (CXCR3 *vs* CCR1). Cette hétérogénéité mécanistique démontre l'importance de la compréhension des mécanismes impliqués dans la genèse et le maintien des OLT dans chaque situation pathologique. L'ensemble de ces travaux, dont les nôtres, pourraient alors ouvrir la voie vers de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces.

Bibliographie

Bibliographie

- Abdulahad, D.A., Westra, J., Bijzet, J., Limburg, P.C., Kallenberg, C.G., and Bijl, M. (2011). High mobility group box 1 (HMGB1) and anti-HMGB1 antibodies and their relation to disease characteristics in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy* 13, R71.
- Abedi-Valugerdi, M., and Möller, G. (2000). Contribution of H-2 and non-H-2 genes in the control of mercury-induced autoimmunity. *Int. Immunol.* 12, 1425–1430.
- Acton, S.E., Astarita, J.L., Malhotra, D., Lukacs-Kornek, V., Franz, B., Hess, P.R., Jakus, Z., Kuligowski, M., Fletcher, A.L., Elpek, K.G., et al. (2012). Podoplanin-rich stromal networks induce dendritic cell motility via activation of the C-type lectin receptor CLEC-2. *Immunity* 37, 276–289.
- Adalid-Peralta, L., Mathian, A., Tran, T., Delbos, L., Durand-Gasselín, I., Berrebi, D., Peuchmaur, M., Couderc, J., Emilie, D., and Koutouzov, S. (2008). Leukocytes and the kidney contribute to interstitial inflammation in lupus nephritis. *Kidney International* 73, 172–180.
- Agrawal, H., Jacob, N., Carreras, E., Bajana, S., Putterman, C., Turner, S., Neas, B., Mathian, A., Koss, M.N., Stohl, W., et al. (2009). Deficiency of Type I IFN Receptor in Lupus-Prone New Zealand Mixed 2328 Mice Decreases Dendritic Cell Numbers and Activation and Protects from Disease. *The Journal of Immunology* 183, 6021–6029.
- Akahoshi, M., Nakashima, H., Tanaka, Y., Kohsaka, T., Nagano, S., Ohgami, E., Arinobu, Y., Yamaoka, K., Niino, H., Shinozaki, M., et al. (1999). Th1/Th2 balance of peripheral T helper cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 42, 1644–1648.
- Alarcón-Segovia, D., Alarcón-Riquelme, M.E., Cardiel, M.H., Caeiro, F., Massardo, L., Villa, A.R., Pons-Estel, B.A., and on behalf of the Grupo Latinoamericano de Estudio del Lupus Eritematoso (GLADEL) (2005). Familial aggregation of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other autoimmune diseases in 1,177 lupus patients from the GLADEL cohort: Familial Aggregation of Autoimmune Diseases Among Patients with SLE. *Arthritis & Rheumatism* 52, 1138–1147.
- Alexander, T., Sattler, A., Templin, L., Kohler, S., Groß, C., Meisel, A., Sawitzki, B., Burmester, G.-R., Arnold, R., Radbruch, A., et al. (2013). Foxp3⁺ Helios⁺ regulatory T cells are expanded in active systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases* 72, 1549–1558.
- Allen, C.D.C., Ansel, K.M., Low, C., Lesley, R., Tamamura, H., Fujii, N., and Cyster, J.G. (2004). Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat. Immunol.* 5, 943–952.
- Allen, C.D.C., Okada, T., and Cyster, J.G. (2007). Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 27, 190–202.
- Allison, A.C. (2005). Mechanisms of action of mycophenolate mofetil. *Lupus* 14 Suppl 1, s2–8.
- Alunno, A., Bartoloni, E., Bistoni, O., Nocentini, G., Ronchetti, S., Caterbi, S., Valentini, V., Riccardi, C., and Gerli, R. (2012). Balance between Regulatory T and Th17 Cells in Systemic

Lupus Erythematosus: The Old and the New. *Clinical and Developmental Immunology* 2012, 1–5.

Alvarado-Sánchez, B., Hernández-Castro, B., Portales-Pérez, D., Baranda, L., Layseca-Espinosa, E., Abud-Mendoza, C., Cubillas-Tejeda, A.C., and González-Amaro, R. (2006). Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of Autoimmunity* 27, 110–118.

Amé-Thomas, P., Maby-El Hajjami, H., Monvoisin, C., Jean, R., Monnier, D., Caulet-Maugendre, S., Guillaudeux, T., Lamy, T., Fest, T., and Tarte, K. (2007). Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid organs support tumor B-cell growth: role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis. *Blood* 109, 693–702.

Amoura, Z., Koutouzov, S., Chabre, H., Cacoub, P., Amoura, I., Musset, L., Bach, J.F., and Piette, J.C. (2000). Presence of antinucleosome autoantibodies in a restricted set of connective tissue diseases: antinucleosome antibodies of the IgG3 subclass are markers of renal pathogenicity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 43, 76–84.

Anders, H.-J., Ninichuk, V., and Schlöndorff, D. (2006). Progression of kidney disease: Blocking leukocyte recruitment with chemokine receptor CCR1 antagonists. *Kidney International* 69, 29–32.

André, I., Gonzalez, A., Wang, B., Katz, J., Benoist, C., and Mathis, D. (1996). Checkpoints in the progression of autoimmune disease: lessons from diabetes models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 2260–2263.

von Andrian, U.H. (1996). Intravital microscopy of the peripheral lymph node microcirculation in mice. *Microcirculation* 3, 287–300.

von Andrian, U.H., and Mempel, T.R. (2003). Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 867–878.

Ansel, K.M., McHeyzer-Williams, L.J., Ngo, V.N., McHeyzer-Williams, M.G., and Cyster, J.G. (1999). In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines. *J. Exp. Med.* 190, 1123–1134.

Ansel, K.M., Ngo, V.N., Hyman, P.L., Luther, S.A., Förster, R., Sedgwick, J.D., Browning, J.L., Lipp, M., and Cyster, J.G. (2000). A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* 406, 309–314.

Apostolidis, S.A., Rauen, T., Hedrich, C.M., Tsokos, G.C., and Crispín, J.C. (2013). Protein Phosphatase 2A Enables Expression of Interleukin 17 (IL-17) through Chromatin Remodeling. *Journal of Biological Chemistry* 288, 26775–26784.

Arechiga, A.F., Habib, T., He, Y., Zhang, X., Zhang, Z.-Y., Funk, A., and Buckner, J.H. (2009). Cutting Edge: The PTPN22 Allelic Variant Associated with Autoimmunity Impairs B Cell Signaling. *The Journal of Immunology* 182, 3343–3347.

Arkatkar, T., Jacobs, H.M., Du, S.W., Li, Q.-Z., Hudkins, K.L., Alpers, C.E., Rawlings, D.J., and Jackson, S.W. (2018). TACI deletion protects against progressive murine lupus nephritis induced by BAFF overexpression. *Kidney International* 94, 728–740.

Armengol, M.P., Juan, M., Lucas-Martin, A., Fernandez-Figueras, M.T., Jaraquemada, D., Gallart, T., and Pujol-Borrell, R. (2001). Thyroid Autoimmune Disease. *Am J Pathol* 159, 861–873.

- Arnold, M., Gaipf, U., Brunner, J., Spriewald, B., Herrmann, M., and Haas, J.P. (2007). The expanded double negative T cell populations of a patient with ALPS are not clonally related to CD4⁺ or to CD8⁺ T cells: BRIEF DEFINITE REPORT. *Autoimmunity* 40, 299–301.
- Arnson, Y., Shoenfeld, Y., and Amital, H. (2010). Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity. *Journal of Autoimmunity* 34, J258–J265.
- Ascon, D.B., Ascon, M., Satpute, S., Lopez-Briones, S., Racusen, L., Colvin, R.B., Soloski, M.J., and Rabb, H. (2008). Normal mouse kidneys contain activated and CD3⁺CD4⁺CD8⁺ double-negative T lymphocytes with a distinct TCR repertoire. *Journal of Leukocyte Biology* 84, 1400–1409.
- Astorri, E., Bombardieri, M., Gabba, S., Peakman, M., Pozzilli, P., and Pitzalis, C. (2010). Evolution of Ectopic Lymphoid Neogenesis and In Situ Autoantibody Production in Autoimmune Nonobese Diabetic Mice: Cellular and Molecular Characterization of Tertiary Lymphoid Structures in Pancreatic Islets. *The Journal of Immunology* 185, 3359–3368.
- ATEN, J., ROOS, A., CLAESSEN, N., SCHILDER-TOL, E.J.M., and TEN, I.J.M. Strong and Selective Glomerular Localization of CD134 Ligand and TNF Receptor-1 in Proliferative Lupus Nephritis. *J Am Soc Nephrol* 13.
- Atianand, M.K., and Fitzgerald, K.A. (2013). Molecular Basis of DNA Recognition in the Immune System. *The Journal of Immunology* 190, 1911–1918.
- Ato, M., Stäger, S., Engwerda, C.R., and Kaye, P.M. (2002). Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. *Nat. Immunol.* 3, 1185–1191.
- Attanavanich, K., and Kearney, J.F. (2004). Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells. *J. Immunol.* 172, 803–811.
- Audiger, C., Rahman, M.J., Yun, T.J., Tarbell, K.V., and Lesage, S. (2017). The Importance of Dendritic Cells in Maintaining Immune Tolerance. *The Journal of Immunology* 198, 2223–2231.
- Avram, G., Sánchez-Sendra, B., Martín, J.M., Terrádez, L., Ramos, D., and Monteagudo, C. (2013). The density and type of MECA-79-positive high endothelial venules correlate with lymphocytic infiltration and tumour regression in primary cutaneous melanoma. *Histopathology* 63, 852–861.
- Baechler, E.C., Batliwalla, F.M., Karypis, G., Gaffney, P.M., Ortmann, W.A., Espe, K.J., Shark, K.B., Grande, W.J., Hughes, K.M., and Kapur, V. (2003). Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 2610–2615.
- Baekkevold, E.S., Yamanaka, T., Palframan, R.T., Carlsen, H.S., Reinholt, F.P., von Andrian, U.H., Brandtzaeg, P., and Haraldsen, G. (2001). The CCR7 ligand *elc* (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment. *J. Exp. Med.* 193, 1105–1112.
- Bajénoff, M., and Germain, R.N. (2009). B-cell follicle development remodels the conduit system and allows soluble antigen delivery to follicular dendritic cells. *Blood* 114, 4989–4997.
- Banas, B., Wornle, M., Berger, T., Nelson, P.J., Cohen, C.D., Kretzler, M., Pfirstinger, J., Mack, M., Lipp, M., Grone, H.-J., et al. (2002). Roles of SLC/CCL21 and CCR7 in Human

Kidney for Mesangial Proliferation, Migration, Apoptosis, and Tissue Homeostasis. *The Journal of Immunology* 168, 4301–4307.

Banks, T.A., Rouse, B.T., Kerley, M.K., Blair, P.J., Godfrey, V.L., Kuklin, N.A., Bouley, D.M., Thomas, J., Kanangat, S., and Mucenski, M.L. (1995). Lymphotoxin- α -deficient mice. Effects on secondary lymphoid organ development and humoral immune responsiveness. *J. Immunol.* 155, 1685–1693.

Bao, X., Moseman, E.A., Saito, H., Petryniak, B., Petryanik, B., Thiriout, A., Hatakeyama, S., Ito, Y., Kawashima, H., Yamaguchi, Y., et al. (2010). Endothelial heparan sulfate controls chemokine presentation in recruitment of lymphocytes and dendritic cells to lymph nodes. *Immunity* 33, 817–829.

Baptista, A.P., Roozendaal, R., Reijmers, R.M., Koning, J.J., Unger, W.W., Greuter, M., Keuning, E.D., Molenaar, R., Goverse, G., Sneeboer, M.M.S., et al. (2014). Lymph node stromal cells constrain immunity via MHC class II self-antigen presentation. *ELife* 3, e04433.

Barizzone, N., Monti, S., Mellone, S., Godi, M., Marchini, M., Scorza, R., Danieli, M.G., and D'Alfonso, S. (2013). Rare Variants in the *TREX1* Gene and Susceptibility to Autoimmune Diseases. *BioMed Research International* 2013, 1–6.

Barnett, B.E., Ciocca, M.L., Goenka, R., Barnett, L.G., Wu, J., Laufer, T.M., Burkhardt, J.K., Cancro, M.P., and Reiner, S.L. (2012). Asymmetric B cell division in the germinal center reaction. *Science* 335, 342–344.

Barone, F., Bombardieri, M., Manzo, A., Blades, M.C., Morgan, P.R., Challacombe, S.J., Valesini, G., and Pitzalis, C. (2005). Association of CXCL13 and CCL21 expression with the progressive organization of lymphoid-like structures in Sjögren's syndrome. *Arthritis & Rheumatism* 52, 1773–1784.

Barone, F., Nayar, S., Campos, J., Cloake, T., Withers, D.R., Toellner, K.-M., Zhang, Y., Fouser, L., Fisher, B., Bowman, S., et al. (2015). IL-22 regulates lymphoid chemokine production and assembly of tertiary lymphoid organs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 11024–11029.

Basso, K., and Dalla-Favera, R. (2010). BCL6: master regulator of the germinal center reaction and key oncogene in B cell lymphomagenesis. *Adv. Immunol.* 105, 193–210.

Batista, F.D., Iber, D., and Neuberger, M.S. (2001). B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature* 411, 489–494.

Baumann, I., Kolowos, W., Voll, R.E., Manger, B., Gaipl, U., Neuhuber, W.L., Kirchner, T., Kalden, J.R., and Herrmann, M. (2002). Impaired uptake of apoptotic cells into tingible body macrophages in germinal centers of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatology* 46, 191–201.

Beelen, R.H.J., Oosterling, S.J., van Egmond, M., van den Born, J., and Zareie, M. (2005). Omental milky spots in peritoneal pathophysiology (spots before your eyes). *Perit Dial Int* 25, 30–32.

Bénézech, C., Mader, E., Desanti, G., Khan, M., Nakamura, K., White, A., Ware, C.F., Anderson, G., and Caamaño, J.H. (2012). Lymphotoxin- β receptor signaling through NF- κ B2-RelB pathway reprograms adipocyte precursors as lymph node stromal cells. *Immunity* 37, 721–734.

- Bennett, L., Palucka, A.K., Arce, E., Cantrell, V., Borvak, J., Banchereau, J., and Pascual, V. (2003). Interferon and Granulopoiesis Signatures in Systemic Lupus Erythematosus Blood. *The Journal of Experimental Medicine* 197, 711–723.
- Bento, D.C., Jones, E., Junaid, S., Tull, J., Williams, G.T., Godkin, A., Ager, A., and Gallimore, A. (2015). High endothelial venules are rare in colorectal cancers but accumulate in extra-tumoral areas with disease progression. *Oncoimmunology* 4, e974374.
- Berggren, O., Hagberg, N., Weber, G., Alm, G.V., Rönnblom, L., and Eloranta, M.-L. (2012). B lymphocytes enhance interferon- α production by plasmacytoid dendritic cells. *Arthritis & Rheumatism* 64, 3409–3419.
- Berthier, C.C., Bethunaickan, R., Gonzalez-Rivera, T., Nair, V., Ramanujam, M., Zhang, W., Bottinger, E.P., Segerer, S., Lindenmeyer, M., Cohen, C.D., et al. (2012). Cross-Species Transcriptional Network Analysis Defines Shared Inflammatory Responses in Murine and Human Lupus Nephritis. *The Journal of Immunology* 189, 988–1001.
- Bethunaickan, R., Berthier, C.C., Ramanujam, M., Sahu, R., Zhang, W., Sun, Y., Bottinger, E.P., Ivashkiv, L., Kretzler, M., and Davidson, A. (2011). A Unique Hybrid Renal Mononuclear Phagocyte Activation Phenotype in Murine Systemic Lupus Erythematosus Nephritis. *The Journal of Immunology* 186, 4994–5003.
- Bignon, A., Gaudin, F., Hemon, P., Tharinger, H., Mayol, K., Walzer, T., Loetscher, P., Peuchmaur, M., Berrebi, D., and Balabanian, K. (2014). CCR1 Inhibition Ameliorates the Progression of Lupus Nephritis in NZB/W Mice. *The Journal of Immunology* 192, 886–896.
- Bijl, M., and Kallenberg, C.G. (2006). Ultraviolet light and cutaneous lupus. *Lupus* 15, 724–727.
- Bjornsson, H.T., Fallin, M.D., and Feinberg, A.P. (2004). An integrated epigenetic and genetic approach to common human disease. *Trends Genet.* 20, 350–358.
- Blair, P.A., Noreña, L.Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D.J., Isenberg, D.A., Ehrenstein, M.R., and Mauri, C. (2010). CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity* 32, 129–140.
- Blanco, P., Palucka, A.K., Gill, M., Pascual, V., and Banchereau, J. (2001). Induction of dendritic cell differentiation by IFN- α in systemic lupus erythematosus. *Science* 294, 1540–1543.
- Bolland, S., and Ravetch, J.V. (2000). Spontaneous autoimmune disease in Fc γ RIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. *Immunity* 13, 277–285.
- Bombardier, C., Gladman, D.D., Urowitz, M.B., Caron, D., and Chang, C.H. (1992). Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum.* 35, 630–640.
- Bombardieri, M., Barone, F., Humby, F., Kelly, S., McGurk, M., Morgan, P., Challacombe, S., De Vita, S., Valesini, G., Spencer, J., et al. (2007). Activation-Induced Cytidine Deaminase Expression in Follicular Dendritic Cell Networks and Interfollicular Large B Cells Supports Functionality of Ectopic Lymphoid Neogenesis in Autoimmune Sialoadenitis and MALT Lymphoma in Sjogren’s Syndrome. *The Journal of Immunology* 179, 4929–4938.
- Bombardieri, M., Barone, F., Lucchesi, D., Nayar, S., van den Berg, W.B., Proctor, G., Buckley, C.D., and Pitzalis, C. (2012). Inducible Tertiary Lymphoid Structures,

Autoimmunity, and Exocrine Dysfunction in a Novel Model of Salivary Gland Inflammation in C57BL/6 Mice. *The Journal of Immunology* 189, 3767–3776.

Bonelli, M., Savitskaya, A., von Dalwigk, K., Steiner, C.W., Aletaha, D., Smolen, J.S., and Scheinecker, C. (2008). Quantitative and qualitative deficiencies of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *International Immunology* 20, 861–868.

Boos, M.D., Yokota, Y., Eberl, G., and Kee, B.L. (2007). Mature natural killer cell and lymphoid tissue-inducing cell development requires Id2-mediated suppression of E protein activity. *J. Exp. Med.* 204, 1119–1130.

Borchers, A.T., Naguwa, S.M., Shoenfeld, Y., and Gershwin, M.E. (2010). The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity Reviews* 9, A277–A287.

Bossu, P., Neumann, D., Del Giudice, E., Ciaramella, A., Gloaguen, I., Fantuzzi, G., Dinarello, C.A., Di Carlo, E., Musiani, P., Meroni, P.L., et al. (2003). IL-18 cDNA vaccination protects mice from spontaneous lupus-like autoimmune disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 14181–14186.

Boulware, D.W., and Hedgpeth, M.T. (1989). Lupus pneumonitis and anti-SSA(Ro) antibodies. *J. Rheumatol.* 16, 479–481.

Bratosin, D., Mazurier, J., Tissier, J.P., Estaquier, J., Huart, J.J., Ameisen, J.C., Aminoff, D., and Montreuil, J. (1998). Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie* 80, 173–195.

Braun, A., Worbs, T., Moschovakis, G.L., Halle, S., Hoffmann, K., Bölter, J., Münk, A., and Förster, R. (2011). Afferent lymph-derived T cells and DCs use different chemokine receptor CCR7-dependent routes for entry into the lymph node and intranodal migration. *Nat. Immunol.* 12, 879–887.

Braun, D., Caramalho, I., and Demengeot, J. (2002). IFN-alpha/beta enhances BCR-dependent B cell responses. *Int. Immunol.* 14, 411–419.

Bronson, P.G., Chaivorapol, C., Ortmann, W., Behrens, T.W., and Graham, R.R. (2012). The genetics of type I interferon in systemic lupus erythematosus. *Current Opinion in Immunology* 24, 530–537.

Brown, K., Sacks, S.H., and Wong, W. (2011). Tertiary lymphoid organs in renal allografts can be associated with donor-specific tolerance rather than rejection. *Eur. J. Immunol.* 41, 89–96.

Bubier, J.A., Sproule, T.J., Foreman, O., Spolski, R., Shaffer, D.J., Morse, H.C., Leonard, W.J., and Roopenian, D.C. (2009). A critical role for IL-21 receptor signaling in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus in BXSB-Yaa mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 1518–1523.

Bugatti, S., Caporali, R., Manzo, A., Vitolo, B., Pitzalis, C., and Montecucco, C. (2005). Involvement of subchondral bone marrow in rheumatoid arthritis: lymphoid neogenesis and in situ relationship to subchondral bone marrow osteoclast recruitment. *Arthritis Rheum.* 52, 3448–3459.

Burke, S.J., Karlstad, M.D., Eder, A.E., Regal, K.M., Lu, D., Burk, D.H., and Collier, J.J. (2016). Pancreatic β -Cell production of CXCR3 ligands precedes diabetes onset. *BioFactors*.

- Bynoté, K.K., Hackenberg, J.M., Korach, K.S., Lubahn, D.B., Lane, P.H., and Gould, K.A. (2008). Estrogen receptor-alpha deficiency attenuates autoimmune disease in (NZB x NZW)F1 mice. *Genes Immun.* *9*, 137–152.
- Caballero, A., Ruiz-Esteban, P., Palma, E., Ramirez, P., Fuentes, L., Sola, E., Rudas, E., Alonso, A., and Hernandez, D. (2014). Decrease in the percentage of peripheral blood CXCR3^{high}CD4⁺ lymphocytes after renal transplantation. *Transplant Immunology* *31*, 7–10.
- Cai, M., Zhou, T., Wang, X., Shang, M., Zhang, Y., Luo, M., Xu, C., and Yuan, W. (2016). DC-SIGN expression on podocytes and its role in inflammatory immune response of lupus nephritis: DC-SIGN expression on podocytes of lupus nephritis. *Clinical & Experimental Immunology* *183*, 317–325.
- Caielli, S., Athale, S., Domic, B., Murat, E., Chandra, M., Banchereau, R., Baisch, J., Phelps, K., Clayton, S., Gong, M., et al. (2016). Oxidized mitochondrial nucleoids released by neutrophils drive type I interferon production in human lupus. *The Journal of Experimental Medicine* *213*, 697–713.
- Callen, J.P., Spencer, L.V., Burruss, J.B., and Holtman, J. (1991). Azathioprine. An effective, corticosteroid-sparing therapy for patients with recalcitrant cutaneous lupus erythematosus or with recalcitrant cutaneous leukocytoclastic vasculitis. *Arch Dermatol* *127*, 515–522.
- Caricchio, R., McPhie, L., and Cohen, P.L. (2003). Ultraviolet B Radiation-Induced Cell Death: Critical Role of Ultraviolet Dose in Inflammation and Lupus Autoantigen Redistribution. *The Journal of Immunology* *171*, 5778–5786.
- Carlsen, H.S., Baekkevold, E.S., Morton, H.C., Haraldsen, G., and Brandtzaeg, P. (2004). Monocyte-like and mature macrophages produce CXCL13 (B cell-attracting chemokine 1) in inflammatory lesions with lymphoid neogenesis. *Blood* *104*, 3021–3027.
- Carter, R.H., and Myers, R. (2008). Germinal center structure and function: lessons from CD19. *Semin. Immunol.* *20*, 43–48.
- Carvalho-Pinto, C.E., Garcia, M.I., Mellado, M., Rodriguez-Frade, J.M., Martin-Caballero, J., Flores, J., Martinez-A, C., and Balomenos, D. (2002). Autocrine Production of IFN- by Macrophages Controls Their Recruitment to Kidney and the Development of Glomerulonephritis in MRL/lpr Mice. *The Journal of Immunology* *169*, 1058–1067.
- Castellano, G., Cafiero, C., Divella, C., Sallustio, F., Gigante, M., Pontrelli, P., De Palma, G., Rossini, M., Grandaliano, G., and Gesualdo, L. (2015). Local synthesis of interferon-alpha in lupus nephritis is associated with type I interferons signature and LMP7 induction in renal tubular epithelial cells. *Arthritis Research & Therapy* *17*.
- Cazenave, P.L.A., and Schedel, H.É. (1847). *Abrégé pratique des maladies de la peau* (Labé).
- Ceccarelli, F., Perricone, C., Borgiani, P., Ciccacci, C., Rufini, S., Cipriano, E., Alessandri, C., Spinelli, F.R., Sili Scavalli, A., Novelli, G., et al. (2015). Genetic Factors in Systemic Lupus Erythematosus: Contribution to Disease Phenotype. *Journal of Immunology Research* *2015*, 1–11.
- Celhar, T., Hopkins, R., Thornhill, S.I., De Magalhaes, R., Hwang, S.-H., Lee, H.-Y., Yasuga, H., Jones, L.A., Casco, J., Lee, B., et al. (2015). RNA sensing by conventional dendritic cells is central to the development of lupus nephritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *112*, E6195–E6204.

Chafin, C.B., Regna, N.L., Dai, R., Caudell, D.L., and Reilly, C.M. (2013). MicroRNA-let-7a expression is increased in the mesangial cells of NZB/W mice and increases IL-6 production *in vitro*. *Autoimmunity* 46, 351–362.

Chai, Q., Onder, L., Scandella, E., Gil-Cruz, C., Perez-Shibayama, C., Cupovic, J., Danuser, R., Sparwasser, T., Luther, S.A., Thiel, V., et al. (2013). Maturation of lymph node fibroblastic reticular cells from myofibroblastic precursors is critical for antiviral immunity. *Immunity* 38, 1013–1024.

de Chaisemartin, L., Goc, J., Damotte, D., Validire, P., Magdeleinat, P., Alifano, M., Cremer, I., Fridman, W.-H., Sautès-Fridman, C., and Dieu-Nosjean, M.-C. (2011). Characterization of chemokines and adhesion molecules associated with T cell presence in tertiary lymphoid structures in human lung cancer. *Cancer Res.* 71, 6391–6399.

Chalmers, S.A., Chitu, V., Herlitz, L.C., Sahu, R., Stanley, E.R., and Putterman, C. (2015). Macrophage depletion ameliorates nephritis induced by pathogenic antibodies. *Journal of Autoimmunity* 57, 42–52.

Chalmers, S.A., Doerner, J., Bosanac, T., Khalil, S., Smith, D., Harcken, C., Dimock, J., Der, E., Herlitz, L., Webb, D., et al. (2016). Therapeutic Blockade of Immune Complex-Mediated Glomerulonephritis by Highly Selective Inhibition of Bruton's Tyrosine Kinase. *Scientific Reports* 6, 26164.

Chalmers, S.A., Glynn, E., Garcia, S.J., Panzenbeck, M., Pelletier, J., Dimock, J., Seccareccia, E., Bosanac, T., Khalil, S., Harcken, C., et al. (2018). BTK inhibition ameliorates kidney disease in spontaneous lupus nephritis. *Clinical Immunology*.

Chan, T.M., and Cheng, I.K. (1997). Identification of endothelial cell membrane proteins that bind anti-DNA antibodies from patients with systemic lupus erythematosus by direct or indirect mechanisms. *J. Autoimmun.* 10, 433–439.

Chan, T.M., and Cheng, I.K.P. (1996). A Prospective Study on Anti-endothelial Cell Antibodies in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Clinical Immunology and Immunopathology* 78, 41–46.

Chan, O.T., Madaio, M.P., and Shlomchik, M.J. (1999a). The central and multiple roles of B cells in lupus pathogenesis. *Immunol. Rev.* 169, 107–121.

Chan, O.T.M., Hannum, L.G., Haberman, A.M., Madaio, M.P., and Shlomchik, M.J. (1999b). A Novel Mouse with B Cells but Lacking Serum Antibody Reveals an Antibody-independent Role for B Cells in Murine Lupus. *The Journal of Experimental Medicine* 189, 1639–1648.

Chan, T.D., Wood, K., Hermes, J.R., Butt, D., Jolly, C.J., Basten, A., and Brink, R. (2012). Elimination of germinal-center-derived self-reactive B cells is governed by the location and concentration of self-antigen. *Immunity* 37, 893–904.

Chan, T.M., Frampton, G., Staines, N.A., Hobby, P., Perry, G.J., and Cameron, J.S. (1992). Different mechanisms by which anti-DNA MoAbs bind to human endothelial cells and glomerular mesangial cells. *Clinical & Experimental Immunology* 88, 68–74.

Chan, T.M., Frampton, G., and Cameron, J.S. (1993). Identification of DNA-binding proteins on human umbilical vein endothelial cell plasma membrane. *Clin Exp Immunol* 91, 110–114.

Chan, T.M., Yu, P.M., Tsang, K.L., and Cheng, I.K. (1995). Endothelial cell binding by human polyclonal anti-DNA antibodies: relationship to disease activity and endothelial functional alterations. *Clin Exp Immunol* 100, 506–513.

Chang, A., Henderson, S.G., Brandt, D., Liu, N., Guttikonda, R., Hsieh, C., Kaverina, N., Utset, T.O., Meehan, S.M., Quigg, R.J., et al. (2011). In Situ B Cell-Mediated Immune Responses and Tubulointerstitial Inflammation in Human Lupus Nephritis. *The Journal of Immunology* 186, 1849–1860.

Charles, N., Hardwick, D., Daugas, E., Illei, G.G., and Rivera, J. (2010). Basophils and the T helper 2 environment can promote the development of lupus nephritis. *Nature Medicine* 16, 701–707.

Chatterjee, M., Kis-Toth, K., Thai, T.-H., Terhorst, C., and Tsokos, G.C. (2011). SLAMF6-driven co-stimulation of human peripheral T cells is defective in SLE T cells. *Autoimmunity* 44, 211–218.

Chauhan, S.K., Singh, V.V., Rai, R., Rai, M., and Rai, G. (2013). Distinct Autoantibody Profiles in Systemic Lupus Erythematosus Patients are Selectively Associated with TLR7 and TLR9 Upregulation. *Journal of Clinical Immunology* 33, 954–964.

Chen, S.-C., Vassileva, G., Kinsley, D., Holzmann, S., Manfra, D., Wiekowski, M.T., Romani, N., and Lira, S.A. (2002). Ectopic Expression of the Murine Chemokines CCL21a and CCL21b Induces the Formation of Lymph Node-Like Structures in Pancreas, But Not Skin, of Transgenic Mice. *The Journal of Immunology* 168, 1001–1008.

Chen, X.Q., Yu, Y.C., Deng, H.H., Sun, J.Z., Dai, Z., Wu, Y.W., and Yang, M. (2010). Plasma IL-17A Is Increased in New-Onset SLE Patients and Associated with Disease Activity. *Journal of Clinical Immunology* 30, 221–225.

Chen, Y., Yang, C., Xie, Z., Zou, L., Ruan, Z., Zhang, X., Tang, Y., Fei, L., Jia, Z., and Wu, Y. (2006). Expression of the novel co-stimulatory molecule B7-H4 by renal tubular epithelial cells. *Kidney International* 70, 2092–2099.

Chen, Y., Park, Y.-B., Patel, E., and Silverman, G.J. (2009). IgM Antibodies to Apoptosis-Associated Determinants Recruit C1q and Enhance Dendritic Cell Phagocytosis of Apoptotic Cells. *The Journal of Immunology* 182, 6031–6043.

Chen, Z., Koralov, S.B., and Kelsoe, G. (2000). Complement C4 inhibits systemic autoimmunity through a mechanism independent of complement receptors CR1 and CR2. *Journal of Experimental Medicine* 192, 1339–1352.

Cheng, Q., Mumtaz, I.M., Khodadadi, L., Radbruch, A., Hoyer, B.F., and Hiepe, F. (2013). Autoantibodies from long-lived ‘memory’ plasma cells of NZB/W mice drive immune complex nephritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 72, 2011–2017.

Choi, J.-Y., Ho, J.H., Pasoto, S.G., Bunin, V., Kim, S.T., Carrasco, S., Borba, E.F., Gonçalves, C.R., Costa, P.R., Kallas, E.G., et al. (2015). Circulating Follicular Helper-Like T Cells in Systemic Lupus Erythematosus: Association With Disease Activity: Circulating Tfh-Like Cells in SLE. *Arthritis & Rheumatology* 67, 988–999.

Choi, S.-C., Titov, A.A., Abboud, G., Seay, H.R., Brusko, T.M., Roopenian, D.C., Salek-Ardakani, S., and Morel, L. (2018). Inhibition of glucose metabolism selectively targets autoreactive follicular helper T cells. *Nature Communications* 9.

Chougule, D., Nadkar, M., Rajadhyaksha, A., Pandit-Shende, P., Surve, P., Dawkar, N., Khadilkar, P., Patwardhan, M., Kaveri, S., Ghosh, K., et al. (2018). Association of clinical and serological parameters of systemic lupus erythematosus patients with Epstein-Barr virus antibody profile. *J. Med. Virol.* 90, 559–563.

- Chowdary Venigalla, R.K., Tretter, T., Krienke, S., Max, R., Eckstein, V., Blank, N., Fiehn, C., Dick Ho, A., and Lorenz, H. (2008). Reduced CD4⁺,CD25⁻ T cell sensitivity to the suppressive function of CD4⁺,CD25^{high},CD127^{-/low} regulatory T cells in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 58, 2120–2130.
- Christensen, S.R., Kashgarian, M., Alexopoulou, L., Flavell, R.A., Akira, S., and Shlomchik, M.J. (2005). Toll-like receptor 9 controls anti-DNA autoantibody production in murine lupus. *The Journal of Experimental Medicine* 202, 321–331.
- Christianson, G.J., Blankenburg, R.L., Duffy, T.M., Panka, D., Roths, J.B., Marshak-Rothstein, A., and Roopenian, D.C. (1996). beta2-microglobulin dependence of the lupus-like autoimmune syndrome of MRL-lpr mice. *J. Immunol.* 156, 4932–4939.
- Chtanova, T., Tangye, S.G., Newton, R., Frank, N., Hodge, M.R., Rolph, M.S., and Mackay, C.R. (2004). T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. *J. Immunol.* 173, 68–78.
- Ci, W., Polo, J.M., Cerchietti, L., Shaknovich, R., Wang, L., Yang, S.N., Ye, K., Farinha, P., Horsman, D.E., Gascoyne, R.D., et al. (2009). The BCL6 transcriptional program features repression of multiple oncogenes in primary B cells and is deregulated in DLBCL. *Blood* 113, 5536–5548.
- Cipponi, A., Mercier, M., Seremet, T., Baurain, J.-F., Théate, I., van den Oord, J., Stas, M., Boon, T., Coulie, P.G., and van Baren, N. (2012). Neogenesis of lymphoid structures and antibody responses occur in human melanoma metastases. *Cancer Res.* 72, 3997–4007.
- Clement, M., Galy, A., Bruneval, P., Morvan, M., Hyafil, F., Benali, K., Pasi, N., Deschamps, L., Pellenc, Q., Papo, T., et al. (2016). Tertiary Lymphoid Organs in Takayasu Arteritis. *Frontiers in Immunology* 7.
- Cohen, J.N., Guidi, C.J., Tewalt, E.F., Qiao, H., Rouhani, S.J., Ruddell, A., Farr, A.G., Tung, K.S., and Engelhard, V.H. (2010). Lymph node-resident lymphatic endothelial cells mediate peripheral tolerance via Aire-independent direct antigen presentation. *J. Exp. Med.* 207, 681–688.
- Cohen, R.A., Bayliss, G., Crispin, J.C., Kane-Wanger, G.F., Van Beek, C.A., Kyttaris, V.C., Avalos, I., Yu, C.Y., Tsokos, G.C., and Stillman, I.E. (2008). T cells and in situ cryoglobulin deposition in the pathogenesis of lupus nephritis. *Clinical Immunology* 128, 1–7.
- Cojocaru, M., Cojocaru, I.M., Silosi, I., and Vrabie, C.D. (2011). Manifestations of systemic lupus erythematosus. *Maedica* 6, 330.
- Columba-Cabezas, S., Griguoli, M., Rosicarelli, B., Magliozzi, R., Ria, F., Serafini, B., and Aloisi, F. (2006). Suppression of established experimental autoimmune encephalomyelitis and formation of meningeal lymphoid follicles by lymphotoxin β receptor-Ig fusion protein. *Journal of Neuroimmunology* 179, 76–86.
- Coronella, J.A., Spier, C., Welch, M., Trevor, K.T., Stopeck, A.T., Villar, H., and Hersh, E.M. (2002). Antigen-driven oligoclonal expansion of tumor-infiltrating B cells in infiltrating ductal carcinoma of the breast. *J. Immunol.* 169, 1829–1836.
- Costenbader, K.H., and Karlson, E.W. (2005). Cigarette smoking and systemic lupus erythematosus: A smoking gun? *Autoimmunity* 38, 541–547.
- Crispin, J.C., Oukka, M., Bayliss, G., Cohen, R.A., Van Beek, C.A., Stillman, I.E., Kyttaris, V.C., Juang, Y.-T., and Tsokos, G.C. (2008). Expanded Double Negative T Cells in Patients

with Systemic Lupus Erythematosus Produce IL-17 and Infiltrate the Kidneys. *The Journal of Immunology* 181, 8761–8766.

Crispín, J.C., Keenan, B.T., Finnell, M.D., Bermas, B.L., Schur, P., Massarotti, E., Karlson, E.W., Fitzgerald, L.M., Ergin, S., Kyttaris, V.C., et al. (2010). Expression of CD44 variant isoforms CD44v3 and CD44v6 is increased on T cells from patients with systemic lupus erythematosus and is correlated with disease activity. *Arthritis & Rheumatism* 62, 1431–1437.

Crow, M.K., Kirou, K.A., and Wohlgemuth, J. (2003). Microarray Analysis of Interferon-regulated Genes in SLE. *Autoimmunity* 36, 481–490.

Cui, J.-H., Qiao, Q., Guo, Y., Zhang, Y.-Q., Cheng, H., He, F.-R., and Zhang, J. (2012). Increased apoptosis and expression of FasL, Bax and caspase-3 in human lupus nephritis class II and IV. *J. Nephrol.* 25, 255–261.

Culton, D.A., Nicholas, M.W., Bunch, D.O., Zhen, Q.L., Kepler, T.B., Dooley, M.A., Mohan, C., Nachman, P.H., and Clarke, S.H. (2007). Similar CD19 dysregulation in two autoantibody-associated autoimmune diseases suggests a shared mechanism of B-cell tolerance loss. *J. Clin. Immunol.* 27, 53–68.

Cupedo, T., Vondenhoff, M.F.R., Heeregrave, E.J., De Weerd, A.E., Jansen, W., Jackson, D.G., Kraal, G., and Mebius, R.E. (2004). Presumptive lymph node organizers are differentially represented in developing mesenteric and peripheral nodes. *J. Immunol.* 173, 2968–2975.

Cupedo, T., Crellin, N.K., Papazian, N., Rombouts, E.J., Weijer, K., Grogan, J.L., Fibbe, W.E., Cornelissen, J.J., and Spits, H. (2009). Human fetal lymphoid tissue-inducer cells are interleukin 17-producing precursors to RORC+ CD127+ natural killer-like cells. *Nat. Immunol.* 10, 66–74.

Cyster, J.G. (2003). Lymphoid organ development and cell migration. *Immunol. Rev.* 195, 5–14.

Cyster, J.G., Ansel, K.M., Reif, K., Ekland, E.H., Hyman, P.L., Tang, H.L., Luther, S.A., and Ngo, V.N. (2000). Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol. Rev.* 176, 181–193.

Da, Z., Li, L., Zhu, J., Gu, Z., You, B., Shan, Y., and Shi, S. (2016). CXCL13 Promotes Proliferation of Mesangial Cells by Combination with CXCR5 in SLE. *Journal of Immunology Research* 2016, 1–8.

Daikh, D.I., Finck, B.K., Linsley, P.S., Hollenbaugh, D., and Wofsy, D. (1997). Long-term inhibition of murine lupus by brief simultaneous blockade of the B7/CD28 and CD40/gp39 costimulation pathways. *J. Immunol.* 159, 3104–3108.

Davidson, A. (2012). The Rationale for BAFF Inhibition in Systemic Lupus Erythematosus. *Current Rheumatology Reports* 14, 295–302.

Davis, L.S., and Reimold, A.M. (2017). Research and therapeutics—traditional and emerging therapies in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 56, i100–i113.

Demaria, O., Pagni, P.P., Traub, S., de Gassart, A., Branzk, N., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., Flavell, R.A., and Alexopoulou, L. (2010). TLR8 deficiency leads to autoimmunity in mice. *Journal of Clinical Investigation.*

- Demmers, M.W.H.J., Baan, C.C., van Beelen, E., IJzermans, J.N.M., Weimar, W., and Rowshani, A.T. (2013). Differential Effects of Activated Human Renal Epithelial Cells on T-Cell Migration. *PLoS ONE* 8, e64916.
- Denny, M.F., Yalavarthi, S., Zhao, W., Thacker, S.G., Anderson, M., Sandy, A.R., McCune, W.J., and Kaplan, M.J. (2010). A Distinct Subset of Proinflammatory Neutrophils Isolated from Patients with Systemic Lupus Erythematosus Induces Vascular Damage and Synthesizes Type I IFNs. *The Journal of Immunology* 184, 3284–3297.
- Dent, A.L., Shaffer, A.L., Yu, X., Allman, D., and Staudt, L.M. (1997). Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science* 276, 589–592.
- Denton, A.E., Roberts, E.W., Linterman, M.A., and Fearon, D.T. (2014). Fibroblastic reticular cells of the lymph node are required for retention of resting but not activated CD8⁺ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 12139–12144.
- Deocharan, B., Qing, X., Lichauco, J., and Putterman, C. (2002). -Actinin Is a Cross-Reactive Renal Target for Pathogenic Anti-DNA Antibodies. *The Journal of Immunology* 168, 3072–3078.
- Desai-Mehta, A., Lu, L., Ramsey-Goldman, R., and Datta, S.K. (1996). Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production. *Journal of Clinical Investigation* 97, 2063–2073.
- Detre, C., Keszei, M., Romero, X., Tsokos, G.C., and Terhorst, C. (2010). SLAM family receptors and the SLAM-associated protein (SAP) modulate T cell functions. *Seminars in Immunopathology* 32, 157–171.
- Devarapu, S.K., Kumar VR, S., Rupanagudi, K.V., Kulkarni, O.P., Eulberg, D., Klussmann, S., and Anders, H.-J. (2016). Dual blockade of the pro-inflammatory chemokine CCL2 and the homeostatic chemokine CXCL12 is as effective as high dose cyclophosphamide in murine proliferative lupus nephritis. *Clinical Immunology* 169, 139–147.
- Di Caro, G., Bergomas, F., Grizzi, F., Doni, A., Bianchi, P., Malesci, A., Laghi, L., Allavena, P., Mantovani, A., and Marchesi, F. (2014). Occurrence of tertiary lymphoid tissue is associated with T-cell infiltration and predicts better prognosis in early-stage colorectal cancers. *Clin. Cancer Res.* 20, 2147–2158.
- Dias, C.B., Malafronte, P., Lee, J., Resende, A., Jorge, L., Pinheiro, C.C., Malheiros, D., and Woronik, V. (2017). Role of renal expression of CD68 in the long-term prognosis of proliferative lupus nephritis. *Journal of Nephrology* 30, 87–94.
- Dieker, J., Berden, J.H., Bakker, M., Briand, J.-P., Muller, S., Voll, R., Sjöwall, C., Herrmann, M., Hilbrands, L.B., and van der Vlag, J. (2016). Autoantibodies against Modified Histone Peptides in SLE Patients Are Associated with Disease Activity and Lupus Nephritis. *PLoS One* 11.
- Dieu-Nosjean, M.-C., Antoine, M., Danel, C., Heudes, D., Wislez, M., Poulot, V., Rabbe, N., Laurans, L., Tartour, E., de Chaisemartin, L., et al. (2008). Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J. Clin. Oncol.* 26, 4410–4417.

- Divekar, A.A., Dubey, S., Gangalum, P.R., and Singh, R.R. (2011). Dicer Insufficiency and MicroRNA-155 Overexpression in Lupus Regulatory T Cells: An Apparent Paradox in the Setting of an Inflammatory Milieu. *The Journal of Immunology* *186*, 924–930.
- Dolff, S., Abdulahad, W.H., Westra, J., Doornbos-van der Meer, B., Limburg, P.C., Kallenberg, C.G., and Bijl, M. (2011). Increase in IL-21 producing T-cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy* *13*, R157.
- Dörner, T., Foster, S.J., Farner, N.L., and Lipsky, P.E. (1998). Immunoglobulin kappa chain receptor editing in systemic lupus erythematosus. *Journal of Clinical Investigation* *102*, 688–694.
- Dörner, T., Shock, A., Goldenberg, D.M., and Lipsky, P.E. (2015). The mechanistic impact of CD22 engagement with epratuzumab on B cell function: Implications for the treatment of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* *14*, 1079–1086.
- Dorraj, S.E., Hovd, A.-M.K., Kanapathipillai, P., Bakland, G., Eilertsen, G.Ø., Figenschau, S.L., and Fenton, K.A. (2018). Mesenchymal stem cells and T cells in the formation of Tertiary Lymphoid Structures in Lupus Nephritis. *Scientific Reports* *8*, 7861.
- Drayton, D.L., Ying, X., Lee, J., Lesslauer, W., and Ruddle, N.H. (2003). Ectopic LT $\alpha\beta$ Directs Lymphoid Organ Neogenesis with Concomitant Expression of Peripheral Node Addressin and a HEV-restricted Sulfotransferase. *J Exp Med* *197*, 1153–1163.
- Drayton, D.L., Liao, S., Mounzer, R.H., and Ruddle, N.H. (2006). Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nat. Immunol.* *7*, 344–353.
- Drenckhahn, D., and Wagner, J. (1986). Stress fibers in the splenic sinus endothelium in situ: molecular structure, relationship to the extracellular matrix, and contractility. *J. Cell Biol.* *102*, 1738–1747.
- Dubrot, J., Duraes, F.V., Potin, L., Capotosti, F., Brighthouse, D., Suter, T., LeibundGut-Landmann, S., Garbi, N., Reith, W., Swartz, M.A., et al. (2014). Lymph node stromal cells acquire peptide-MHCII complexes from dendritic cells and induce antigen-specific CD4⁺ T cell tolerance. *J. Exp. Med.* *211*, 1153–1166.
- Eberl, G., and Littman, D.R. (2004). Thymic origin of intestinal alphabeta T cells revealed by fate mapping of ROR γ mat⁺ cells. *Science* *305*, 248–251.
- Ehrenstein, M.R., and Wing, C. (2016). The BAFFling effects of rituximab in lupus: danger ahead? *Nat Rev Rheumatol* *12*, 367–372.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* *35*, 495–516.
- Eloranta, M.L., and Alm, G.V. (1999). Splenic marginal metallophilic macrophages and marginal zone macrophages are the major interferon-alpha/beta producers in mice upon intravenous challenge with herpes simplex virus. *Scand. J. Immunol.* *49*, 391–394.
- Emu, B., Luca, D., Offutt, C., Grogan, J.L., Rojkovich, B., Williams, M.B., Tang, M.T., Xiao, J., Lee, J.H., and Davis, J.C. (2012). Safety, pharmacokinetics, and biologic activity of pateclizumab, a novel monoclonal antibody targeting lymphotoxin β : results of a phase I randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Res Ther* *14*, R6.

- Enghard, P., Langnickel, D., and Riemekasten, G. (2006). T cell cytokine imbalance towards production of IFN- γ and IL-10 in NZB/W F1 lupus-prone mice is associated with autoantibody levels and nephritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 35, 209–216.
- Erazo, A., Kutchukhidze, N., Leung, M., Christ, A.P.G., Urban, J.F., Curotto de Lafaille, M.A., and Lafaille, J.J. (2007). Unique maturation program of the IgE response in vivo. *Immunity* 26, 191–203.
- Espeli, M., Bokers, S., Giannico, G., Dickinson, H.A., Bardsley, V., Fogo, A.B., and Smith, K.G.C. (2011). Local Renal Autoantibody Production in Lupus Nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology* 22, 296–305.
- Ettinger, R., Kuchen, S., and Lipsky, P.E. (2008). Interleukin 21 as a target of intervention in autoimmune disease. *Annals of the Rheumatic Diseases* 67, iii83–iii86.
- Fan, J., Heller, N.M., Gorospe, M., Atasoy, U., and Stellato, C. (2005). The role of post-transcriptional regulation in chemokine gene expression in inflammation and allergy. *European Respiratory Journal* 26, 933–947.
- Farkas, L., Beiske, K., Lund-Johansen, F., Brandtzaeg, P., and Jahnsen, F.L. (2001). Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- α/β -producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *The American Journal of Pathology* 159, 237–243.
- Fassbinder, T., Saunders, U., Mickholz, E., Jung, E., Becker, H., Schlüter, B., and Jacobi, A.M. (2015). Differential effects of cyclophosphamide and mycophenolate mofetil on cellular and serological parameters in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* 17, 92.
- Fathi, N.A., Hussein, M.R., Hassan, H.I., Mosad, E., Galal, H., and Afifi, N.A. (2006). Glomerular expression and elevated serum Bcl-2 and Fas proteins in lupus nephritis: preliminary findings. *Clinical and Experimental Immunology* 146, 339–343.
- Fava, R.A., Kennedy, S.M., Wood, S.G., Bolstad, A.I., Bienkowska, J., Papandile, A., Kelly, J.A., Mavragani, C.P., Gatumu, M., Skarstein, K., et al. (2011). Lymphotoxin-beta receptor blockade reduces CXCL13 in lacrimal glands and improves corneal integrity in the NOD model of Sjogren's syndrome. *Arthritis Res Ther* 13, R182.
- Fenton, K., Fismen, S., Hedberg, A., Sereckina, N., Fenton, C., Mortensen, E.S., and Rekvig, O.P. (2009). Anti-dsDNA Antibodies Promote Initiation, and Acquired Loss of Renal Dnase1 Promotes Progression of Lupus Nephritis in Autoimmune (NZBxNZW)F1 Mice. *PLoS ONE* 4, e8474.
- Figenschau, S.L., Knutsen, E., Urbarova, I., Fenton, C., Elston, B., Perander, M., Mortensen, E.S., and Fenton, K.A. (2018). ICAM1 expression is induced by proinflammatory cytokines and associated with TLS formation in aggressive breast cancer subtypes. *Scientific Reports* 8.
- Finckh, A., Cooper, G.S., Chibnik, L.B., Costenbader, K.H., Watts, J., Pankey, H., Fraser, P.A., and Karlson, E.W. (2006). Occupational silica and solvent exposures and risk of systemic lupus erythematosus in urban women. *Arthritis & Rheumatism* 54, 3648–3654.
- Fitzgerald-Bocarsly, P., and Feng, D. (2007). The role of type I interferon production by dendritic cells in host defense. *Biochimie* 89, 843–855.
- Fleige, H., Ravens, S., Moschovakis, G.L., Bolter, J., Willenzon, S., Sutter, G., Haussler, S., Kalinke, U., Prinz, I., and Forster, R. (2014). IL-17-induced CXCL12 recruits B cells and

induces follicle formation in BALT in the absence of differentiated FDCs. *Journal of Experimental Medicine* 211, 643–651.

Fleisher, T.A. (2008). The autoimmune lymphoproliferative syndrome: an experiment of nature involving lymphocyte apoptosis. *Immunologic Research* 40, 87–92.

Fletcher, A.L., Lukacs-Kornek, V., Reynoso, E.D., Pinner, S.E., Bellemare-Pelletier, A., Curry, M.S., Collier, A.-R., Boyd, R.L., and Turley, S.J. (2010). Lymph node fibroblastic reticular cells directly present peripheral tissue antigen under steady-state and inflammatory conditions. *J. Exp. Med.* 207, 689–697.

Ford, M.S., Zhang, Z.-X., Chen, W., and Zhang, L. (2006). Double-Negative T Regulatory Cells Can Develop Outside the Thymus and Do Not Mature from CD8⁺ T Cell Precursors. *The Journal of Immunology* 177, 2803–2809.

Förster, R., Braun, A., and Worbs, T. (2012). Lymph node homing of T cells and dendritic cells via afferent lymphatics. *Trends Immunol.* 33, 271–280.

Frija-Masson, J., Martin, C., Regard, L., Lothe, M.-N., Touqui, L., Durand, A., Lucas, B., Damotte, D., Alifano, M., Fajac, I., et al. (2017). Bacteria-driven peribronchial lymphoid neogenesis in bronchiectasis and cystic fibrosis. *European Respiratory Journal* 49, 1601873.

Fritzler, M.J. (1996). Clinical relevance of autoantibodies in systemic rheumatic diseases. *Mol. Biol. Rep.* 23, 133–145.

Fu, R., Guo, C., Wang, S., Huang, Y., Jin, O., Hu, H., Chen, J., Xu, B., Zhou, M., Zhao, J., et al. (2017). Podocyte Activation of NLRP3 Inflammasomes Contributes to the Development of Proteinuria in Lupus Nephritis: PODOCYTE NLRP3 ACTIVATION IN LUPUS NEPHRITIS. *Arthritis & Rheumatology*.

Fujii, H., Nakatani, K., Arita, N., Ito, M.R., Terada, M., Miyazaki, T., Yoshida, M., Ono, M., Fujiwara, T., Saiga, K., et al. (2003). Internalization of antibodies by endothelial cells via fibronectin implicating a novel mechanism in lupus nephritis. *Kidney International* 64, 1662–1670.

Fukui, R., Saitoh, S.-I., Kanno, A., Onji, M., Shibata, T., Ito, A., Onji, M., Matsumoto, M., Akira, S., Yoshida, N., et al. (2011). Unc93B1 Restricts Systemic Lethal Inflammation by Orchestrating Toll-like Receptor 7 and 9 Trafficking. *Immunity* 35, 69–81.

Funabiki, M., Kato, H., Miyachi, Y., Toki, H., Motegi, H., Inoue, M., Minowa, O., Yoshida, A., Deguchi, K., Sato, H., et al. (2014). Autoimmune Disorders Associated with Gain of Function of the Intracellular Sensor MDA5. *Immunity* 40, 199–212.

Furie, R., Nicholls, K., Cheng, T.-T., Houssiau, F., Burgos-Vargas, R., Chen, S.-L., Hillson, J.L., Meadows-Shropshire, S., Kinaszyczuk, M., and Merrill, J.T. (2014). Efficacy and safety of abatacept in lupus nephritis: a twelve-month, randomized, double-blind study. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 66, 379–389.

Furie, R., Khamashta, M., Merrill, J.T., Werth, V.P., Kalunian, K., Brohawn, P., Illei, G.G., Drappa, J., Wang, L., Yoo, S., et al. (2017). Anifrolumab, an Anti-Interferon- α Receptor Monoclonal Antibody, in Moderate-to-Severe Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 69, 376–386.

Furtado, G.C., Pacer, M.E., Bongers, G., Bénézec, C., He, Z., Chen, L., Berin, M.C., Kollias, G., Caamaño, J.H., and Lira, S.A. (2014). TNF α -dependent development of lymphoid tissue in the absence of ROR γ t⁺ lymphoid tissue inducer cells. *Mucosal Immunol* 7, 602–614.

- Fütterer, A., Mink, K., Luz, A., Kosco-Vilbois, M.H., and Pfeffer, K. (1998). The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity* 9, 59–70.
- Gallagher, S., Yusuf, I., McCaughy, T.M., Turman, S., Sun, H., Kolbeck, R., Herbst, R., and Wang, Y. (2016). MEDI-551 Treatment Effectively Depletes B Cells and Reduces Serum Titers of Autoantibodies in Mice Transgenic for Sle1 and Human CD19. *Arthritis & Rheumatology* (Hoboken, N.J.) 68, 965–976.
- Gao, N., Dresel, J., Eckstein, V., Gellert, R., Störch, H., Venigalla, R.K.C., Schwenger, V., Max, R., Blank, N., Lorenz, H.-M., et al. (2014). Impaired Suppressive Capacity of Activation-Induced Regulatory B Cells in Systemic Lupus Erythematosus: Activation-Induced Regulatory B Cells in SLE. *Arthritis & Rheumatology* 66, 2849–2861.
- Garcia-Romo, G.S., Caielli, S., Vega, B., Connolly, J., Allantaz, F., Xu, Z., Punaro, M., Baisch, J., Guiducci, C., Coffman, R.L., et al. (2011). Netting Neutrophils Are Major Inducers of Type I IFN Production in Pediatric Systemic Lupus Erythematosus. *Science Translational Medicine* 3, 73ra20-73ra20.
- Gardner, R.M., Nyland, J.F., Silva, I.A., Maria Ventura, A., Maria de Souza, J., and Silbergeld, E.K. (2010). Mercury exposure, serum antinuclear/antinucleolar antibodies, and serum cytokine levels in mining populations in Amazonian Brazil: A cross-sectional study. *Environmental Research* 110, 345–354.
- Gatumu, M.K., Skarstein, K., Papandile, A., Browning, J.L., Fava, R.A., and Bolstad, A.I. (2009). Blockade of lymphotoxin-beta receptor signaling reduces aspects of Sjögren's syndrome in salivary glands of non-obese diabetic mice. *Arthritis Res Ther* 11, R24.
- Ge, F., Wang, F., Yan, X., Li, Z., and Wang, X. (2017). Association of BAFF with PI3K/Akt/mTOR signaling in lupus nephritis. *Molecular Medicine Reports*.
- Geier, J.K., and Schlissel, M.S. (2006). Pre-BCR signals and the control of Ig gene rearrangements. *Seminars in Immunology* 18, 31–39.
- Geijtenbeek, T.B.H., Groot, P.C., Nolte, M.A., van Vliet, S.J., Gangaram-Panday, S.T., van Duijnhoven, G.C.F., Kraal, G., van Oosterhout, A.J.M., and van Kooyk, Y. (2002). Marginal zone macrophages express a murine homologue of DC-SIGN that captures blood-borne antigens in vivo. *Blood* 100, 2908–2916.
- Gentek, R., and Bajénoff, M. (2017). Lymph Node Stroma Dynamics and Approaches for Their Visualization. *Trends Immunol.* 38, 236–247.
- Germain, C., Gnjatich, S., Tamzalit, F., Knockaert, S., Remark, R., Goc, J., Lepelley, A., Becht, E., Katsahian, S., Bizouard, G., et al. (2014). Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 189, 832–844.
- Gestermann, N., Di Domizio, J., Lande, R., Demaria, O., Frasca, L., Feldmeyer, L., Di Lucca, J., and Gilliet, M. (2018). Netting Neutrophils Activate Autoreactive B Cells in Lupus. *The Journal of Immunology* 200, 3364–3371.
- GeurtsvanKessel, C.H., Willart, M.A.M., Bergen, I.M., Rijt, L.S. van, Muskens, F., Elewaut, D., Osterhaus, A.D.M.E., Hendriks, R., Rimmelzwaan, G.F., and Lambrecht, B.N. (2009). Dendritic cells are crucial for maintenance of tertiary lymphoid structures in the lung of influenza virus-infected mice. *J Exp Med* 206, 2339–2349.

- Ghosh, S., Steere, A.C., Stollar, B.D., and Huber, B.T. (2005). In situ diversification of the antibody repertoire in chronic Lyme arthritis synovium. *J. Immunol.* *174*, 2860–2869.
- Gies, V., Schickel, J.-N., Jung, S., Joublin, A., Glauzy, S., Knapp, A.-M., Soley, A., Poindron, V., Guffroy, A., and Choi, J.-Y. (2018). Impaired TLR9 responses in B cells from patients with systemic lupus erythematosus. *JCI Insight* *3*.
- Girard, J.P., and Springer, T.A. (1995). High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol. Today* *16*, 449–457.
- Girard, J.-P., Moussion, C., and Förster, R. (2012). HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 762–773.
- Gitlin, A.D., Shulman, Z., and Nussenzweig, M.C. (2014). Clonal selection in the germinal centre by regulated proliferation and hypermutation. *Nature* *509*, 637–640.
- Gitlin, A.D., Mayer, C.T., Oliveira, T.Y., Shulman, Z., Jones, M.J.K., Koren, A., and Nussenzweig, M.C. (2015). HUMORAL IMMUNITY. T cell help controls the speed of the cell cycle in germinal center B cells. *Science* *349*, 643–646.
- Gitlin, A.D., von Boehmer, L., Gazumyan, A., Shulman, Z., Oliveira, T.Y., and Nussenzweig, M.C. (2016). Independent Roles of Switching and Hypermutation in the Development and Persistence of B Lymphocyte Memory. *Immunity* *44*, 769–781.
- Gobert, M., Treilleux, I., Bendriss-Vermare, N., Bachelot, T., Goddard-Leon, S., Arfi, V., Biota, C., Doffin, A.C., Durand, I., Olive, D., et al. (2009). Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res.* *69*, 2000–2009.
- Goc, J., Germain, C., Vo-Bourgais, T.K.D., Lupo, A., Klein, C., Knockaert, S., de Chaisemartin, L., Ouakrim, H., Becht, E., Alifano, M., et al. (2014). Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+ T cells. *Cancer Res.* *74*, 705–715.
- Goenka, R., Matthews, A.H., Zhang, B., O’Neill, P.J., Scholz, J.L., Migone, T.-S., Leonard, W.J., Stohl, W., Hershberg, U., and Cancro, M.P. (2014). Local BLyS production by T follicular cells mediates retention of high affinity B cells during affinity maturation. *J. Exp. Med.* *211*, 45–56.
- Goidl, E.A., Paul, W.E., Siskind, G.W., and Benacerraf, B. (1968). The effect of antigen dose and time after immunization on the amount and affinity of anti-hapten antibody. *J. Immunol.* *100*, 371–375.
- Golding, A., Hasni, S., Illei, G., and Shevach, E.M. (2013). The Percentage of FoxP3+Helios+ Treg Cells Correlates Positively With Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus: FoxP3+Helios+ Treg Cells in Active SLE. *Arthritis & Rheumatism* *65*, 2898–2906.
- Goldwich, A., Burkard, M., Olke, M., Daniel, C., Amann, K., Hugo, C., Kurts, C., Steinkasserer, A., and Gessner, A. (2013). Podocytes Are Nonhematopoietic Professional Antigen-Presenting Cells. *Journal of the American Society of Nephrology* *24*, 906–916.
- Goodnow, C.C., Sprent, J., de St Groth, B.F., and Vinuesa, C.G. (2005). Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* *435*, 590–597.

Gota, C., and Calabrese, L. (2003). Induction of Clinical Autoimmune Disease by Therapeutic Interferon- α . *Autoimmunity* 36, 511–518.

Goto, K., Kaneko, Y., Sato, Y., Otsuka, T., Yamamoto, S., Goto, S., Yamamoto, K., Yamamoto, T., Kawachi, H., Madaio, M.P., et al. (2016). Leptin deficiency down-regulates IL-23 production in glomerular podocytes resulting in an attenuated immune response in nephrotoxic serum nephritis. *International Immunology* 28, 197–208.

Grammatikos, A.P., and Tsokos, G.C. (2012). Immunodeficiency and autoimmunity: lessons from systemic lupus erythematosus. *Trends in Molecular Medicine* 18, 101–108.

Grammer, A.C., Slota, R., Fischer, R., Gur, H., Girschick, H., Yarboro, C., Illei, G.G., and Lipsky, P.E. (2003). Abnormal germinal center reactions in systemic lupus erythematosus demonstrated by blockade of CD154-CD40 interactions. *Journal of Clinical Investigation* 112, 1506–1520.

Gretz, J.E., Norbury, C.C., Anderson, A.O., Proudfoot, A.E., and Shaw, S. (2000). Lymph-borne chemokines and other low molecular weight molecules reach high endothelial venules via specialized conduits while a functional barrier limits access to the lymphocyte microenvironments in lymph node cortex. *J. Exp. Med.* 192, 1425–1440.

Griffin, D.O., and Rothstein, T.L. (2011). A small CD11b⁺ human B1 cell subpopulation stimulates T cells and is expanded in lupus. *J Exp Med* 208, 2591–2598.

Grigороva, I.L., Pantelev, M., and Cyster, J.G. (2010). Lymph node cortical sinus organization and relationship to lymphocyte egress dynamics and antigen exposure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 20447–20452.

Grönwall, C., Akhter, E., Oh, C., Burlingame, R.W., Petri, M., and Silverman, G.J. (2012). IgM autoantibodies to distinct apoptosis-associated antigens correlate with protection from cardiovascular events and renal disease in patients with SLE. *Clinical Immunology* 142, 390–398.

Groom, A.C., Schmidt, E.E., and MacDonald, I.C. (1991). Microcirculatory pathways and blood flow in spleen: new insights from washout kinetics, corrosion casts, and quantitative intravital videomicroscopy. *Scanning Microsc.* 5, 159–173; discussion 173-174.

Grünfeld, J.-P. (2017). *Traité de néphrologie* (Paris, France: Lavoisier Médecine sciences).

Gu-Trantien, C., Loi, S., Garaud, S., Equeter, C., Libin, M., de Wind, A., Ravoet, M., Le Buanec, H., Sibille, C., Manfouo-Foutsop, G., et al. (2013). CD4⁺ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J. Clin. Invest.* 123, 2873–2892.

Hacbarth, E., and Kajdacsy-Balla, A. (1986). Low density neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and acute rheumatic fever. *Arthritis Rheum.* 29, 1334–1342.

Hahn, B.H. (2013). The Pathogenesis of SLE. In *Dubois' Lupus Erythematosus and Related Syndromes*, (Elsevier), pp. 25–34.

Halle, S., Dujardin, H.C., Bakocevic, N., Fleige, H., Danzer, H., Willenzon, S., Suezter, Y., Hämmerling, G., Garbi, N., Sutter, G., et al. (2009). Induced bronchus-associated lymphoid tissue serves as a general priming site for T cells and is maintained by dendritic cells. *J. Exp. Med.* 206, 2593–2601.

- Han, G.D., Koike, H., Nakatsue, T., Suzuki, K., Yoneyama, H., Narumi, S., Kobayashi, N., Mundel, P., Shimizu, F., and Kawachi, H. (2003). IFN-inducible protein-10 has a differential role in podocyte during Thy 1.1 glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* *14*, 3111–3126.
- Han, S., Zhang, X., Marinova, E., Ozen, Z., Bheekha-Escura, R., Guo, L., Wansley, D., Booth, G., Fu, Y.-X., and Zheng, B. (2005). Blockade of lymphotoxin pathway exacerbates autoimmune arthritis by enhancing the Th1 response. *Arthritis & Rheumatism* *52*, 3202–3209.
- Han, X., Wang, Y., Zhang, X., Qin, Y., Qu, B., Wu, L., Ma, J., Zhou, Z., Qian, J., Dai, M., et al. (2016). MicroRNA-130b Ameliorates Murine Lupus Nephritis Through Targeting the Type I Interferon Pathway on Renal Mesangial Cells: miR-130b AMELIORATES MURINE LN THROUGH THE IFN PATHWAY ON RMCs. *Arthritis & Rheumatology* *68*, 2232–2243.
- Hao, F., Tian, M., Feng, Y., Quan, C., Chen, Y., Chen, S., and Wei, M. (2018). Abrogation of Lupus Nephritis in Somatic Hypermutation–Deficient MRL/lpr Mice. *The Journal of Immunology* *200*, 3905–3912.
- Hapfelmeier, S., Müller, A.J., Stecher, B., Kaiser, P., Barthel, M., Endt, K., Eberhard, M., Robbiani, R., Jacobi, C.A., Heikenwalder, M., et al. (2008). Microbe sampling by mucosal dendritic cells is a discrete, MyD88-independent step in DeltainvG S. Typhimurium colitis. *J. Exp. Med.* *205*, 437–450.
- Hargreaves, D.C., Hyman, P.L., Lu, T.T., Ngo, V.N., Bidgol, A., Suzuki, G., Zou, Y.R., Littman, D.R., and Cyster, J.G. (2001). A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J. Exp. Med.* *194*, 45–56.
- Harley, J.B., and James, J.A. (2006). Epstein-Barr virus infection induces lupus autoimmunity. *Bull NYU Hosp Jt Dis* *64*, 45–50.
- Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17–producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology* *6*, 1123–1132.
- Hasegawa, T., Iacono, A., and Yousem, S.A. (1999). The significance of bronchus-associated lymphoid tissue in human lung transplantation: is there an association with acute and chronic rejection? *Transplantation* *67*, 381–385.
- Haynes, N.M., Allen, C.D.C., Lesley, R., Ansel, K.M., Killeen, N., and Cyster, J.G. (2007). Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal center-associated subpopulation. *J. Immunol.* *179*, 5099–5108.
- He, D.N., Chen, W.L., Long, K.X., Zhang, X., and Dong, G.F. (2016a). Association of Serum CXCL13 with Intrarenal Ectopic Lymphoid Tissue Formation in Lupus Nephritis. *J Immunol Res* *2016*, 4832543.
- He, J., Zhang, X., Wei, Y., Sun, X., Chen, Y., Deng, J., Jin, Y., Gan, Y., Hu, X., Jia, R., et al. (2016b). Low-dose interleukin-2 treatment selectively modulates CD4(+) T cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus. *Nat. Med.* *22*, 991–993.
- Heesters, B.A., Myers, R.C., and Carroll, M.C. (2014). Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 495–504.
- Heinemann, K., Wilde, B., Hoerning, A., Tebbe, B., Kribben, A., Witzke, O., and Dolff, S. (2016). Decreased IL-10⁺ regulatory B cells (Bregs) in lupus nephritis patients. *Scandinavian Journal of Rheumatology* *45*, 312–316.

- Henneken, M., Dörner, T., Burmester, G.-R., and Berek, C. (2005). Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood B cells from patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* 7, R1001-1013.
- Henry, R.A., and Kendall, P.L. (2010). CXCL13 Blockade Disrupts B Lymphocyte Organization in Tertiary Lymphoid Structures without Altering B Cell Receptor Bias or Preventing Diabetes in Nonobese Diabetic Mice. *J Immunol* 185, 1460–1465.
- Hepburn, A.L. (2001). The LE cell. *Rheumatology (Oxford)* 40, 826–827.
- Hepburn, A.L., and Charles, P.J. (2002). Antinuclear factor. *Rheumatology (Oxford)* 41, 343–345.
- Hepburn, A.L., Narat, S., and Mason, J.C. (2010). The management of peripheral blood cytopenias in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 49, 2243–2254.
- Herber, D., Brown, T.P., Liang, S., Young, D.A., Collins, M., and Dunussi-Joannopoulos, K. (2007). IL-21 Has a Pathogenic Role in a Lupus-Prone Mouse Model and Its Blockade with IL-21R.Fc Reduces Disease Progression. *The Journal of Immunology* 178, 3822–3830.
- Herrmann, M., Voll, R.E., Zoller, O.M., Hagenhofer, M., Ponner, B.B., and Kalden, J.R. (1998). Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 41, 1241–1250.
- Herzog, B.H., Fu, J., Wilson, S.J., Hess, P.R., Sen, A., McDaniel, J.M., Pan, Y., Sheng, M., Yago, T., Silasi-Mansat, R., et al. (2013). Podoplanin maintains high endothelial venule integrity by interacting with platelet CLEC-2. *Nature* 502, 105–109.
- Hiraoka, N., Ino, Y., Yamazaki-Itoh, R., Kanai, Y., Kosuge, T., and Shimada, K. (2015). Intratumoral tertiary lymphoid organ is a favourable prognosticator in patients with pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* 112, 1782–1790.
- Hochberg, M.C. (1997). Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 40, 1725.
- Hom, G., Graham, R.R., Modrek, B., Taylor, K.E., Ortmann, W., Garnier, S., Lee, A.T., Chung, S.A., Ferreira, R.C., and Pant, P.K. (2008). Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13–BLK and ITGAM–ITGAX. *New England Journal of Medicine* 358, 900–909.
- Hopken, U.E., Wengner, A.M., Loddenkemper, C., Stein, H., Heimesaat, M.M., Rehm, A., and Lipp, M. (2006). CCR7 deficiency causes ectopic lymphoid neogenesis and disturbed mucosal tissue integrity. *Blood* 109, 886–895.
- Horjus Talabur Horje, C.S., Smids, C., Meijer, J.W.R., Groenen, M.J., Rijnders, M.K., van Lochem, E.G., and Wahab, P.J. (2017). High endothelial venules associated with T cell subsets in the inflamed gut of newly diagnosed inflammatory bowel disease patients: HEVs and T cell subsets in early IBD. *Clinical & Experimental Immunology* 188, 163–173.
- Houssiau, F.A., D’Cruz, D., Sangle, S., Remy, P., Vasconcelos, C., Petrovic, R., Fiehn, C., de Ramon Garrido, E., Gilboe, I.-M., Tektonidou, M., et al. (2010). Azathioprine versus mycophenolate mofetil for long-term immunosuppression in lupus nephritis: results from the MAINTAIN Nephritis Trial. *Ann. Rheum. Dis.* 69, 2083–2089.
- Houtkamp, M.A., de Boer, O.J., van der Loos, C.M., van der Wal, A.C., and Becker, A.E. (2001). Adventitial infiltrates associated with advanced atherosclerotic plaques: structural

organization suggests generation of local humoral immune responses. *J. Pathol.* 193, 263–269.

Hruban, R.H., Beschorner, W.E., Baumgartner, W.A., Achuff, S.C., Traill, T.A., Digennaro, K.A., Reitz, B.A., and Hutchins, G.M. (1988). Depletion of bronchus-associated lymphoid tissue associated with lung allograft rejection. *Am. J. Pathol.* 132, 6–11.

Hsu, H.-C., Yang, P., Wang, J., Wu, Q., Myers, R., Chen, J., Yi, J., Guentert, T., Tousson, A., Stanus, A.L., et al. (2008). Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. *Nature Immunology* 9, 166–175.

Hu, D., Mohanta, S.K., Yin, C., Peng, L., Ma, Z., Srikakulapu, P., Grassia, G., MacRitchie, N., Dever, G., Gordon, P., et al. (2015). Artery Tertiary Lymphoid Organs Control Aorta Immunity and Protect against Atherosclerosis via Vascular Smooth Muscle Cell Lymphotoxin β Receptors. *Immunity* 42, 1100–1115.

Hu, N., Qiu, X., Luo, Y., Yuan, J., Li, Y., Lei, W., Zhang, G., Zhou, Y., Su, Y., and Lu, Q. (2008). Abnormal histone modification patterns in lupus CD4⁺ T cells. *J. Rheumatol.* 35, 804–810.

Huibers, M.M.H., Gareau, A.J., Vink, A., Kruit, R., Feringa, H., Beerthuijzen, J.M.T., Siera-de Koning, E., Peeters, T., de Jonge, N., de Weger, R.A., et al. (2015). The composition of ectopic lymphoid structures suggests involvement of a local immune response in cardiac allograft vasculopathy. *J. Heart Lung Transplant.* 34, 734–745.

Humby, F., Bombardieri, M., Manzo, A., Kelly, S., Blades, M.C., Kirkham, B., Spencer, J., and Pitzalis, C. (2009). Ectopic Lymphoid Structures Support Ongoing Production of Class-Switched Autoantibodies in Rheumatoid Synovium. *PLoS Medicine* 6, e1.

Humrich, J.Y., Morbach, H., Undeutsch, R., Enghard, P., Rosenberger, S., Weigert, O., Kloke, L., Heimann, J., Gaber, T., Brandenburg, S., et al. (2010). Homeostatic imbalance of regulatory and effector T cells due to IL-2 deprivation amplifies murine lupus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 204–209.

Huntington, N.D., Xu, Y., Puthalakath, H., Light, A., Willis, S.N., Strasser, A., and Tarlinton, D.M. (2006). CD45 links the B cell receptor with cell survival and is required for the persistence of germinal centers. *Nat. Immunol.* 7, 190–198.

Hutloff, A., Büchner, K., Reiter, K., Baelde, H.J., Odendahl, M., Jacobi, A., Dörner, T., and Kroczeck, R.A. (2004). Involvement of inducible costimulator in the exaggerated memory B cell and plasma cell generation in systemic lupus erythematosus: Involvement of ICOS in Lupus. *Arthritis & Rheumatism* 50, 3211–3220.

Imaizumi, T., Hayakari, R., Matsumiya, T., Yoshida, H., Tsuruga, K., Watanabe, S., Kawaguchi, S., and Tanaka, H. (2017). Chloroquine attenuates TLR3/IFN- β signaling in cultured normal human mesangial cells: A possible protective effect against renal damage in lupus nephritis. *Modern Rheumatology* 1–18.

Ishikawa, S., and Matsushima, K. (2007). Aberrant B1 cell trafficking in a murine model for lupus. *Front Biosci* 12, 1790–1803.

Jacobi, A.M., Reiter, K., Mackay, M., Aranow, C., Hiepe, F., Radbruch, A., Hansen, A., Burmester, G.-R., Diamond, B., Lipsky, P.E., et al. (2008). Activated memory B cell subsets

correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus: Delineation by expression of CD27, IgD, and CD95. *Arthritis & Rheumatism* 58, 1762–1773.

Jacquemin, C., Schmitt, N., Contin-Bordes, C., Liu, Y., Narayanan, P., Seneschal, J., Maurouard, T., Dougall, D., Davizon, E.S., Dumortier, H., et al. (2015). OX40 Ligand Contributes to Human Lupus Pathogenesis by Promoting T Follicular Helper Response. *Immunity* 42, 1159–1170.

James, J.A., Kaufman, K.M., Farris, A.D., Taylor-Albert, E., Lehman, T.J., and Harley, J.B. (1997). An increased prevalence of Epstein-Barr virus infection in young patients suggests a possible etiology for systemic lupus erythematosus. *The Journal of Clinical Investigation* 100, 3019–3026.

Janahi, E.M.A., Das, S., Bhattacharya, S.N., Haque, S., Akhter, N., Jawed, A., Wahid, M., Mandal, R.K., Lohani, M., Areeshi, M.Y., et al. (2018). Cytomegalovirus aggravates the autoimmune phenomenon in systemic autoimmune diseases. *Microb. Pathog.* 120, 132–139.

Janatpour, M.J., Hudak, S., Sathe, M., Sedgwick, J.D., and McEvoy, L.M. (2001). Tumor Necrosis Factor–dependent Segmental Control of MIG Expression by High Endothelial Venues in Inflamed Lymph Nodes Regulates Monocyte Recruitment. *The Journal of Experimental Medicine* 194, 1375.

Janko, C., Franz, S., Munoz, L.E., Siebig, S., Winkler, S., Schett, G., Lauber, K., Sheriff, A., van der Vlag, J., and Herrmann, M. (2011). CRP/anti-CRP Antibodies Assembly on the Surfaces of Cell Remnants Switches Their Phagocytic Clearance Toward Inflammation. *Frontiers in Immunology* 2.

Jeltsch-David, H., and Muller, S. (2014). Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus: pathogenesis and biomarkers. *Nat Rev Neurol* 10, 579–596.

Jeremiah, N., Neven, B., Gentili, M., Callebaut, I., Maschalidi, S., Stolzenberg, M.-C., Goudin, N., Frémond, M.-L., Nitschke, P., and Molina, T.J. (2014). Inherited STING-activating mutation underlies a familial inflammatory syndrome with lupus-like manifestations. *The Journal of Clinical Investigation* 124, 5516–5520.

Jevnikar, A.M., Grusby, M.J., and Glimcher, L.H. (1994). Prevention of nephritis in major histocompatibility complex class II-deficient MRL-lpr mice. *J. Exp. Med.* 179, 1137–1143.

Johansson-Percival, A., He, B., Li, Z.-J., Kjellén, A., Russell, K., Li, J., Larma, I., and Ganss, R. (2017). De novo induction of intratumoral lymphoid structures and vessel normalization enhances immunotherapy in resistant tumors. *Nature Immunology* 18, 1207–1217.

Jones, C., Virji, M., and Crocker, P.R. (2003). Recognition of sialylated meningococcal lipopolysaccharide by siglecs expressed on myeloid cells leads to enhanced bacterial uptake. *Mol. Microbiol.* 49, 1213–1225.

Jonsson, R., Tarkowski, A., Bäckman, K., and Klareskog, L. (1987). Immunohistochemical characterization of sialadenitis in NZB X NZW F1 mice. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 42, 93–101.

Joshi, N.S., Akama-Garren, E.H., Lu, Y., Lee, D.-Y., Chang, G.P., Li, A., DuPage, M., Tammela, T., Kerper, N.R., Farago, A.F., et al. (2015). Regulatory T Cells in Tumor-Associated Tertiary Lymphoid Structures Suppress Anti-tumor T Cell Responses. *Immunity* 43, 579–590.

- Jung, S., Schickel, J.-N., Kern, A., Knapp, A.-M., Eftekhari, P., Da Silva, S., Jaulhac, B., Brink, R., Soulas-Sprauel, P., Pasquali, J.-L., et al. (2016). Chronic bacterial infection activates autoreactive B cells and induces isotype switching and autoantigen-driven mutations. *Eur. J. Immunol.* *46*, 131–146.
- Jury, E.C., Flores-Borja, F., Kalsi, H.S., Lazarus, M., Isenberg, D.A., Mauri, C., and Ehrenstein, M.R. (2010). Abnormal CTLA-4 function in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *European Journal of Immunology* *40*, 569–578.
- Ka, S.-M., Cheng, C.-W., Shui, H.-A., Wu, W.-M., Chang, D.-M., Lin, Y.-C., and Chen, A. (2007). Mesangial cells of lupus-prone mice are sensitive to chemokine production. *Arthritis Research & Therapy* *9*, 1.
- Kabouridis, P.S., and Jury, E.C. (2008). Lipid rafts and T-lymphocyte function: Implications for autoimmunity. *FEBS Letters* *582*, 3711–3718.
- Kahnert, A., Höpken, U.E., Stein, M., Bandermann, S., Lipp, M., and Kaufmann, S.H.E. (2007). Mycobacterium tuberculosis triggers formation of lymphoid structure in murine lungs. *J. Infect. Dis.* *195*, 46–54.
- Kalunian, K.C., Merrill, J.T., Maciuga, R., McBride, J.M., Townsend, M.J., Wei, X., Davis, J.C., and Kennedy, W.P. (2016). A Phase II study of the efficacy and safety of rontalizumab (rhMAb interferon- α) in patients with systemic lupus erythematosus (ROSE). *Ann. Rheum. Dis.* *75*, 196–202.
- Kanemitsu, N., Ebisuno, Y., Tanaka, T., Otani, K., Hayasaka, H., Kaisho, T., Akira, S., Katagiri, K., Kinashi, T., Fujita, N., et al. (2005). CXCL13 is an arrest chemokine for B cells in high endothelial venules. *Blood* *106*, 2613–2618.
- Kang, S., Fedoriw, Y., Brenneman, E.K., Truong, Y.K., Kikly, K., and Vilen, B.J. (2017). BAFF Induces Tertiary Lymphoid Structures and Positions T Cells within the Glomeruli during Lupus Nephritis. *The Journal of Immunology* 1600281.
- Kaplan, M.J., Lu, Q., Wu, A., Attwood, J., and Richardson, B. (2004). Demethylation of Promoter Regulatory Elements Contributes to Perforin Overexpression in CD4⁺ Lupus T Cells. *The Journal of Immunology* *172*, 3652–3661.
- Kassianos, A.J., Wang, X., Sampangi, S., Muczynski, K., Healy, H., and Wilkinson, R. (2013). Increased tubulointerstitial recruitment of human CD141^{hi} CLEC9A⁺ and CD1c⁺ myeloid dendritic cell subsets in renal fibrosis and chronic kidney disease. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* *305*, F1391–F1401.
- Kasturi, S., and Sammaritano, L.R. (2016). Corticosteroids in Lupus. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* *42*, 47–62, viii.
- Katakai, T., Suto, H., Sugai, M., Gonda, H., Togawa, A., Suematsu, S., Ebisuno, Y., Katagiri, K., Kinashi, T., and Shimizu, A. (2008). Organizer-like reticular stromal cell layer common to adult secondary lymphoid organs. *J. Immunol.* *181*, 6189–6200.
- Katsiari, C.G., Liossis, S.-N., Dimopoulos, A.M., Charalambopoulos, D.V., Mavrikakis, M., and Sfikakis, P.P. (2002). CD40L overexpression on T cells and monocytes from patients with systemic lupus erythematosus is resistant to calcineurin inhibition. *Lupus* *11*, 370–378.
- Kawakami, T., Lichtnekert, J., Thompson, L.J., Karna, P., Bouabe, H., Hohl, T.M., Heinecke, J.W., Ziegler, S.F., Nelson, P.J., and Duffield, J.S. (2013). Resident Renal Mononuclear

Phagocytes Comprise Five Discrete Populations with Distinct Phenotypes and Functions. *The Journal of Immunology* 191, 3358–3372.

Kelley, V.R. (2007). Leukocyte–Renal Epithelial Cell Interactions Regulate Lupus Nephritis. *Seminars in Nephrology* 27, 59–68.

Kelley, V.R., Diaz-Gallo, C., Jevnikar, A.M., and Singer, G.G. (1993). Renal tubular epithelial and T cell interactions in autoimmune renal disease. *Kidney Int. Suppl.* 39, S108–115.

Khader, S.A., Rangel-Moreno, J., Fountain, J.J., Martino, C.A., Reiley, W.W., Pearl, J.E., Winslow, G.M., Woodland, D.L., Randall, T.D., and Cooper, A.M. (2009). In a Murine Tuberculosis Model, the Absence of Homeostatic Chemokines Delays Granuloma Formation and Protective Immunity. *The Journal of Immunology* 183, 8004–8014.

Khamashta, M., Merrill, J.T., Werth, V.P., Furie, R., Kalunian, K., Illei, G.G., Drappa, J., Wang, L., Greth, W., and CD1067 study investigators (2016). Sifalimumab, an anti-interferon- α monoclonal antibody, in moderate to severe systemic lupus erythematosus: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Ann. Rheum. Dis.* 75, 1909–1916.

Kido, M., Takeuchi, S., Sugiyama, N., Esaki, H., Nakashima, H., Yoshida, H., and Furue, M. (2011). T cell-specific overexpression of interleukin-27 receptor α subunit (WSX-1) prevents spontaneous skin inflammation in MRL/lpr mice: Significance of IL-27 in SLE-like skin inflammation. *British Journal of Dermatology* 164, 1214–1220.

Kiefer, K., Oropallo, M.A., Cancro, M.P., and Marshak-Rothstein, A. (2012). Role of type I interferons in the activation of autoreactive B cells. *Immunology and Cell Biology* 90, 498–504.

Kikawada, E., Lenda, D.M., and Kelley, V.R. (2003). IL-12 Deficiency in MRL-Fas^lpr Mice Delays Nephritis and Intrarenal IFN- Expression, and Diminishes Systemic Pathology. *The Journal of Immunology* 170, 3915–3925.

Kim, D., Mebius, R.E., MacMicking, J.D., Jung, S., Cupedo, T., Castellanos, Y., Rho, J., Wong, B.R., Josien, R., Kim, N., et al. (2000). Regulation of peripheral lymph node genesis by the tumor necrosis factor family member TRANCE. *J. Exp. Med.* 192, 1467–1478.

Kirveskari, J., Paavonen, T., Häyry, P., and Renkonen, R. (2000). De novo induction of endothelial L-selectin ligands during kidney allograft rejection. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11, 2358–2365.

Klein, U., Rajewsky, K., and Küppers, R. Human Immunoglobulin (Ig)M²IgD² Peripheral Blood B Cells Expressing the CD27 Cell Surface Antigen Carry Somatic Mutated Variable Region Genes: CD27 as a General Marker for Somatic Mutated (Memory) B Cells. 11.

Klonowska-Szymczyk, A., Wolska, A., Robak, T., Cebula-Obrzut, B., Smolewski, P., and Robak, E. (2014). Expression of Toll-Like Receptors 3, 7, and 9 in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Mediators of Inflammation* 2014, 1–11.

Knutson, M., and Wessling-Resnick, M. (2003). Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 38, 61–88.

- Kobayashi, Y., and Watanabe, T. (2016). Gel-Trapped Lymphorganogenic Chemokines Trigger Artificial Tertiary Lymphoid Organs and Mount Adaptive Immune Responses In Vivo. *Frontiers in Immunology* 7.
- Kobayashi, S., Murata, K., Shibuya, H., Morita, M., Ishikawa, M., Furu, M., Ito, H., Ito, J., Matsuda, S., Watanabe, T., et al. (2013). A Distinct Human CD4⁺ T Cell Subset That Secretes CXCL13 in Rheumatoid Synovium: CXCL13-Producing CD4⁺ T Cells in RA Synovium. *Arthritis & Rheumatism* 65, 3063–3072.
- Koffler, D., Carr, R.L., Agnello, V., Thoburn, R., and Kunkel, H.G. (1971). Antibodies to polynucleotides in human sera: antigenic specificity and relation to disease. *Journal of Experimental Medicine* 134, 294–312.
- Kogame, T., Yamashita, R., Hirata, M., Kataoka, T.R., Kamido, H., Ueshima, C., Matsui, M., Nomura, T., and Kabashima, K. (2018). Analysis of possible structures of inducible skin-associated lymphoid tissue in lupus erythematosus profundus. *The Journal of Dermatology*.
- Koni, P.A., Sacca, R., Lawton, P., Browning, J.L., Ruddle, N.H., and Flavell, R.A. (1997). Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins alpha and beta revealed in lymphotoxin beta-deficient mice. *Immunity* 6, 491–500.
- Koppel, E.A., Ludwig, I.S., Hernandez, M.S., Lowary, T.L., Gadikota, R.R., Tuzikov, A.B., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., van Kooyk, Y., Appelmelk, B.J., and Geijtenbeek, T.B.H. (2004). Identification of the mycobacterial carbohydrate structure that binds the C-type lectins DC-SIGN, L-SIGN and SIGNR1. *Immunobiology* 209, 117–127.
- Koren, E., Koscec, M., Wolfson-Reichlin, M., Ebling, F.M., Tsao, B., Hahn, B.H., and Reichlin, M. (1995). Murine and human antibodies to native DNA that cross-react with the A and D SnRNP polypeptides cause direct injury of cultured kidney cells. *J. Immunol.* 154, 4857–4864.
- Korganow, A.-S., Knapp, A.-M., Nehme-Schuster, H., Soulas-Sprauel, P., Poindron, V., Pasquali, J.-L., and Martin, T. (2010). Peripheral B cell abnormalities in patients with systemic lupus erythematosus in quiescent phase: decreased memory B cells and membrane CD19 expression. *J. Autoimmun.* 34, 426–434.
- Kosco-Vilbois, M.H., and Scheidegger, D. (1995). Follicular dendritic cells: antigen retention, B cell activation, and cytokine production. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 201, 69–82.
- Koshy, M., Berger, D., and Crow, M.K. (1996). Increased expression of CD40 ligand on systemic lupus erythematosus lymphocytes. *Journal of Clinical Investigation* 98, 826–837.
- Kraal, G. (1992). Cells in the marginal zone of the spleen. *Int. Rev. Cytol.* 132, 31–74.
- Krebs, C.F., Kapffer, S., Paust, H.-J., Schmidt, T., Bannstein, S.B., Peters, A., Stege, G., Brix, S.R., Meyer-Schwesinger, C., Muller, R.-U., et al. (2013). MicroRNA-155 Drives TH17 Immune Response and Tissue Injury in Experimental Crescentic GN. *Journal of the American Society of Nephrology* 24, 1955–1965.
- Kuroda, T., Yoshida, Y., Kamiie, J., Kovalenko, P., Nameta, M., Fujinaka, H., Yaoita, E., Endo, T., Ishizuka, S., Nakabayashi, K., et al. (2004). Expression of MMP-9 in mesangial cells and its changes in anti-GBM glomerulonephritis in WKY rats. *Journal of Clinical and Experimental Nephrology* 8, 206–215.
- Kurts, C., Panzer, U., Anders, H.-J., and Rees, A.J. (2013). The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nature Reviews Immunology* 13, 738–753.

- Kyttaris, V.C., Zhang, Z., Kuchroo, V.K., Oukka, M., and Tsokos, G.C. (2010). Cutting Edge: IL-23 Receptor Deficiency Prevents the Development of Lupus Nephritis in C57BL/6-lpr/lpr Mice. *The Journal of Immunology* *184*, 4605–4609.
- Lacotte, S., Dumortier, H., Decossas, M., Briand, J.-P., and Muller, S. (2010). Identification of New Pathogenic Players in Lupus: Autoantibody-Secreting Cells Are Present in Nephritic Kidneys of (NZBxNZW)F1 Mice. *The Journal of Immunology* *184*, 3937–3945.
- Lacotte, S., Decossas, M., Le Coz, C., Brun, S., Muller, S., and Dumortier, H. (2013). Early Differentiated CD138^{high}MHCII⁺IgG⁺ Plasma Cells Express CXCR3 and Localize into Inflamed Kidneys of Lupus Mice. *PLoS ONE* *8*, e58140.
- Lai, K.N., Leung, J.C.K., Lai, K.B., and Lai, C.K.W. (1997). Effect of Anti-DNA Autoantibodies on the Gene Expression of Interleukin 8, Transforming Growth Factor- β , and Nitric Oxide Synthase in Cultured Endothelial Cells. *Scandinavian Journal of Rheumatology* *26*, 461–467.
- Lamagna, C., Hu, Y., DeFranco, A.L., and Lowell, C.A. (2014). B Cell-Specific Loss of Lyn Kinase Leads to Autoimmunity. *The Journal of Immunology* *192*, 919–928.
- Lamoureux, J.L., Watson, L.C., Cherrier, M., Skog, P., Nemazee, D., and Feeney, A.J. (2007). Reduced receptor editing in lupus-prone MRL/lpr mice. *The Journal of Experimental Medicine* *204*, 2853–2864.
- Lan, Y., Luo, B., Wang, J.-L., Jiang, Y.-W., and Wei, Y.-S. (2014). The association of interleukin-21 polymorphisms with interleukin-21 serum levels and risk of systemic lupus erythematosus. *Gene* *538*, 94–98.
- Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A., and Cua, D.J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of Experimental Medicine* *201*, 233–240.
- Lanoue, A., Clatworthy, M.R., Smith, P., Green, S., Townsend, M.J., Jolin, H.E., Smith, K.G.C., Fallon, P.G., and McKenzie, A.N.J. (2004). SIGN-R1 contributes to protection against lethal pneumococcal infection in mice. *J. Exp. Med.* *200*, 1383–1393.
- Lazzari, E., and Jefferies, C.A. (2014). IRF5-mediated signaling and implications for SLE. *Clinical Immunology* *153*, 343–352.
- Le Coz, C., Joublin, A., Pasquali, J.-L., Korganow, A.-S., Dumortier, H., and Monneaux, F. (2013). Circulating TFH Subset Distribution Is Strongly Affected in Lupus Patients with an Active Disease. *PLoS ONE* *8*, e75319.
- Le Pottier, L., Devauchelle, V., Fautrel, A., Daridon, C., Saraux, A., Youinou, P., and Pers, J.-O. (2009). Ectopic Germinal Centers Are Rare in Sjogren's Syndrome Salivary Glands and Do Not Exclude Autoreactive B Cells. *The Journal of Immunology* *182*, 3540–3547.
- Lee, H.J., Park, I.A., Song, I.H., Shin, S.-J., Kim, J.Y., Yu, J.H., and Gong, G. (2016). Tertiary lymphoid structures: prognostic significance and relationship with tumour-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer. *J. Clin. Pathol.* *69*, 422–430.
- Lee, J., Kuchen, S., Fischer, R., Chang, S., and Lipsky, P.E. (2009). Identification and Characterization of a Human CD5⁺ Pre-Naive B Cell Population. *The Journal of Immunology* *182*, 4116–4126.

- Lee, J.-W., Epardaud, M., Sun, J., Becker, J.E., Cheng, A.C., Yonekura, A., Heath, J.K., and Turley, S.J. (2007). Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes T cell tolerance to intestinal self. *Nat. Immunol.* 8, 181–190.
- Lee, Y., Chin, R.K., Christiansen, P., Sun, Y., Tumanov, A.V., Wang, J., Chervonsky, A.V., and Fu, Y.-X. (2006). Recruitment and Activation of Naive T Cells in the Islets by Lymphotoxin β Receptor-Dependent Tertiary Lymphoid Structure. *Immunity* 25, 499–509.
- Lee-Kirsch, M.A., Gong, M., Chowdhury, D., Senenko, L., Engel, K., Lee, Y.-A., de Silva, U., Bailey, S.L., Witte, T., Vyse, T.J., et al. (2007). Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nature Genetics* 39, 1065–1067.
- Legler, D.F., Loetscher, M., Roos, R.S., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., and Moser, B. (1998). B cell-attracting chemokine 1, a human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues, selectively attracts B lymphocytes via BLR1/CXCR5. *J. Exp. Med.* 187, 655–660.
- Li, F., Yang, Y., Zhu, X., Huang, L., and Xu, J. (2015). Macrophage Polarization Modulates Development of Systemic Lupus Erythematosus. *Cellular Physiology and Biochemistry* 37, 1279–1288.
- Li, W., Bribriescio, A.C., Nava, R.G., Brescia, A.A., Ibricevic, A., Spahn, J.H., Brody, S.L., Ritter, J.H., Gelman, A.E., Krupnick, A.S., et al. (2012a). Lung transplant acceptance is facilitated by early events in the graft and is associated with lymphoid neogenesis. *Mucosal Immunol* 5, 544–554.
- Li, W.-X., Pan, H.-F., Chen, G.-P., Tao, J.-H., Li, X.-P., and Ye, D.-Q. (2012b). Expression of inducible co-stimulator on peripheral blood T lymphocytes in patients with lupus nephritis. *Rheumatology International* 32, 2051–2055.
- Liao, X., Pirapakaran, T., and Luo, X.M. (2016). Chemokines and Chemokine Receptors in the Development of Lupus Nephritis. *Mediators of Inflammation* 2016, 1–15.
- Liarski, V.M., Kaverina, N., Chang, A., Brandt, D., Yanez, D., Talasnik, L., Carlesso, G., Herbst, R., Utset, T.O., Labno, C., et al. (2014). Cell Distance Mapping Identifies Functional T Follicular Helper Cells in Inflamed Human Renal Tissue. *Science Translational Medicine* 6, 230ra46-230ra46.
- Lin, S.-C., Chen, K.-H., Lin, C.-H., Kuo, C.-C., Ling, Q.-D., and Chan, C.-H. (2007). The quantitative analysis of peripheral blood FOXP3-expressing T cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. *European Journal of Clinical Investigation* 37, 987–996.
- Lin, S.L., Castano, A.P., Nowlin, B.T., Lupher, M.L., and Duffield, J.S. (2009). Bone Marrow Ly6Chigh Monocytes Are Selectively Recruited to Injured Kidney and Differentiate into Functionally Distinct Populations. *The Journal of Immunology* 183, 6733–6743.
- Link, A., Hardie, D.L., Favre, S., Britschgi, M.R., Adams, D.H., Sixt, M., Cyster, J.G., Buckley, C.D., and Luther, S.A. (2011). Association of T-Zone Reticular Networks and Conduits with Ectopic Lymphoid Tissues in Mice and Humans. *Am J Pathol* 178, 1662–1675.
- Liossis, S.N., Ding, X.Z., Dennis, G.J., and Tsokos, G.C. (1998). Altered pattern of TCR/CD3-mediated protein-tyrosyl phosphorylation in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. Deficient expression of the T cell receptor zeta chain. *Journal of Clinical Investigation* 101, 1448–1457.

- Lioussis, S.-N.C., Solomou, E.E., Dimopoulos, M.-A., Panayiotidis, P., Mavrikakis, M.M., and Sfikakis, P.P. (2001). B-Cell Kinase Lyn Deficiency in Patients With Systemic Lupus Erythematosus: *Journal of Investigative Medicine* 49, 157–165.
- Liu, Z., and Davidson, A. (2012). Taming lupus—a new understanding of pathogenesis is leading to clinical advances. *Nature Medicine* 18, 871–882.
- Liu, D., Xu, H., Shih, C., Wan, Z., Ma, X., Ma, W., Luo, D., and Qi, H. (2015). T-B-cell entanglement and ICOSL-driven feed-forward regulation of germinal centre reaction. *Nature* 517, 214–218.
- Liu, K., Vitoria, G.D., Schwickert, T.A., Guermonprez, P., Meredith, M.M., Yao, K., Chu, F.-F., Randolph, G.J., Rudensky, A.Y., and Nussenzweig, M. (2009). In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* 324, 392–397.
- Liu, X.-F., Wang, R.-Q., Hu, B., Luo, M.-C., Zeng, Q.-M., Zhou, H., Huang, K., Dong, X.-H., Luo, Y.-B., Luo, Z.-H., et al. (2016). MiR-15a contributes abnormal immune response in myasthenia gravis by targeting CXCL10. *Clinical Immunology* 164, 106–113.
- Liu, Y., Deng, W., Meng, Q., Qiu, X., Sun, D., and Dai, C. (2018). CD8⁺iTregs attenuate glomerular endothelial cell injury in lupus-prone mice through blocking the activation of p38 MAPK and NF- κ B. *Molecular Immunology* 103, 133–143.
- Liu, Y.J., Joshua, D.E., Williams, G.T., Smith, C.A., Gordon, J., and MacLennan, I.C. (1989). Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 342, 929–931.
- Liu, Z., Bethunaickan, R., Huang, W., Lodhi, U., Solano, I., Madaio, M.P., and Davidson, A. (2011). Interferon- α accelerates murine systemic lupus erythematosus in a T cell-dependent manner. *Arthritis & Rheumatism* 63, 219–229.
- Lloyd, W., and Schur, P.H. (1981). Immune complexes, complement, and anti-DNA in exacerbations of systemic lupus erythematosus (SLE). *Medicine (Baltimore)* 60, 208–217.
- Lo, C.G., Xu, Y., Proia, R.L., and Cyster, J.G. (2005). Cyclical modulation of sphingosine-1-phosphate receptor 1 surface expression during lymphocyte recirculation and relationship to lymphoid organ transit. *J. Exp. Med.* 201, 291–301.
- Lo, J.C., Chin, R.K., Lee, Y., Kang, H.-S., Wang, Y., Weinstock, J.V., Banks, T., Ware, C.F., Franzoso, G., and Fu, Y.-X. (2003). Differential regulation of CCL21 in lymphoid/nonlymphoid tissues for effectively attracting T cells to peripheral tissues. *J Clin Invest* 112, 1495–1505.
- Lochner, M., Ohnmacht, C., Presley, L., Bruhns, P., Si-Tahar, M., Sawa, S., and Eberl, G. (2011). Microbiota-induced tertiary lymphoid tissues aggravate inflammatory disease in the absence of ROR γ t and LT α cells. *J. Exp. Med.* 208, 125–134.
- Lood, C., Blanco, L.P., Purmalek, M.M., Carmona-Rivera, C., De Ravin, S.S., Smith, C.K., Malech, H.L., Ledbetter, J.A., Elkon, K.B., and Kaplan, M.J. (2016). Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nature Medicine* 22, 146–153.
- Lood, C., Arve, S., Ledbetter, J., and Elkon, K.B. (2017). TLR7/8 activation in neutrophils impairs immune complex phagocytosis through shedding of Fc γ RIIA. *The Journal of Experimental Medicine* 214, 2103–2119.

- Lopes-Carvalho, T., and Kearney, J.F. (2004). Development and selection of marginal zone B cells. *Immunol. Rev.* *197*, 192–205.
- López, P., Scheel-Toellner, D., Rodríguez-Carrio, J., Caminal-Montero, L., Gordon, C., and Suárez, A. (2014). Interferon- α -induced B-lymphocyte stimulator expression and mobilization in healthy and systemic lupus erythematosus monocytes. *Rheumatology* *53*, 2249–2258.
- López De Padilla, C.M., Vallejo, A.N., Lacomis, D., McNallan, K., and Reed, A.M. (2009). Extranodal lymphoid microstructures in inflamed muscle and disease severity of new-onset juvenile dermatomyositis. *Arthritis Rheum.* *60*, 1160–1172.
- Love, P.E., and Santoro, S.A. (1990). Antiphospholipid antibodies: anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and in non-SLE disorders: prevalence and clinical significance. *Annals of Internal Medicine* *112*, 682–698.
- Lövgren, T., Eloranta, M.-L., Kastner, B., Wahren-Herlenius, M., Alm, G.V., and Rönnblom, L. (2006). Induction of interferon- α by immune complexes or liposomes containing systemic lupus erythematosus autoantigen– and Sjögren’s syndrome autoantigen–associated RNA. *Arthritis & Rheumatism* *54*, 1917–1927.
- Lovisa, S., LeBleu, V.S., Tampe, B., Sugimoto, H., Vадnagara, K., Carstens, J.L., Wu, C.-C., Hagos, Y., Burckhardt, B.C., Pentcheva-Hoang, T., et al. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nature Medicine* *21*, 998–1009.
- Lu, Q., Wu, A., and Richardson, B.C. (2005). Demethylation of the Same Promoter Sequence Increases CD70 Expression in Lupus T Cells and T Cells Treated with Lupus-Inducing Drugs. *The Journal of Immunology* *174*, 6212–6219.
- Lu, Q., Wu, A., Tesmer, L., Ray, D., Yousif, N., and Richardson, B. (2007). Demethylation of CD40LG on the Inactive X in T Cells from Women with Lupus. *The Journal of Immunology* *179*, 6352–6358.
- Ludewig, B., Odermatt, B., Landmann, S., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (1998). Dendritic Cells Induce Autoimmune Diabetes and Maintain Disease via De Novo Formation of Local Lymphoid Tissue. *J Exp Med* *188*, 1493–1501.
- Lukacs-Kornek, V., Malhotra, D., Fletcher, A.L., Acton, S.E., Elpek, K.G., Tayalia, P., Collier, A., and Turley, S.J. (2011). Regulated release of nitric oxide by nonhematopoietic stroma controls expansion of the activated T cell pool in lymph nodes. *Nat. Immunol.* *12*, 1096–1104.
- Luo, S., Liu, Y., Liang, G., Zhao, M., Wu, H., Liang, Y., Qiu, X., Tan, Y., Dai, Y., Yung, S., et al. (2015). The role of microRNA-1246 in the regulation of B cell activation and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Clinical Epigenetics* *7*, 24.
- Luther, S.A., Tang, H.L., Hyman, P.L., Farr, A.G., and Cyster, J.G. (2000). Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *97*, 12694–12699.
- Luther, S.A., Bidgol, A., Hargreaves, D.C., Schmidt, A., Xu, Y., Paniyadi, J., Matloubian, M., and Cyster, J.G. (2002). Differing Activities of Homeostatic Chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in Lymphocyte and Dendritic Cell Recruitment and Lymphoid Neogenesis. *The Journal of Immunology* *169*, 424–433.

- Luther, S.A., Ansel, K.M., and Cyster, J.G. (2003). Overlapping roles of CXCL13, interleukin 7 receptor alpha, and CCR7 ligands in lymph node development. *J. Exp. Med.* *197*, 1191–1198.
- Lyn-Cook, B.D., Xie, C., Oates, J., Treadwell, E., Word, B., Hammons, G., and Wiley, K. (2014). Increased expression of Toll-like receptors (TLRs) 7 and 9 and other cytokines in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Ethnic differences and potential new targets for therapeutic drugs. *Molecular Immunology* *61*, 38–43.
- Lyssuk, E.Y., Torgashina, A.V., Soloviev, S.K., Nasonov, E.L., and Bykovskaia, S.N. (2007). Reduced number and function of CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Adv. Exp. Med. Biol.* *601*, 113–119.
- Ma, H.-D., Ma, W.-T., Liu, Q.-Z., Zhao, Z.-B., Liu, M.-Z.-Y., Tsuneyama, K., Gao, J.-M., Ridgway, W.M., Ansari, A.A., Gershwin, M.E., et al. (2017). Chemokine receptor CXCR3 deficiency exacerbates murine autoimmune cholangitis by promoting pathogenic CD8⁺ T cell activation. *Journal of Autoimmunity*.
- Ma, K., Li, J., Wang, X., Lin, X., Du, W., Yang, X., Mou, F., Fang, Y., Zhao, Y., Hong, X., et al. (2018). TLR4⁺ CXCR4⁺ plasma cells drive nephritis development in systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases* *annrheumdis-2018-213615*.
- Mabbott, N.A., Donaldson, D.S., Ohno, H., Williams, I.R., and Mahajan, A. (2013). Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol* *6*, 666–677.
- Magil, A.B., and Tyler, M. (1984). Tubulo-interstitial disease in lupus nephritis. A morphometric study. *Histopathology* *8*, 81–87.
- Maines, M.D. (1997). The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *37*, 517–554.
- Malhotra, D., Fletcher, A.L., Astarita, J., Lukacs-Kornek, V., Tayalia, P., Gonzalez, S.F., Elpek, K.G., Chang, S.K., Knoblich, K., Hemler, M.E., et al. (2012). Transcriptional profiling of stroma from inflamed and resting lymph nodes defines immunological hallmarks. *Nature Immunology* *13*, 499–510.
- Malhotra, D., Fletcher, A.L., and Turley, S.J. (2013). Stromal and hematopoietic cells in secondary lymphoid organs: partners in immunity. *Immunol. Rev.* *251*, 160–176.
- Mallavarapu, R.K., and Grimsley, E.W. (2007). The history of lupus erythematosus. *South. Med. J.* *100*, 896–898.
- Marinkovic, T., Garin, A., Yokota, Y., Fu, Y.-X., Ruddle, N.H., Furtado, G.C., and Lira, S.A. (2006). Interaction of mature CD3⁺CD4⁺ T cells with dendritic cells triggers the development of tertiary lymphoid structures in the thyroid. *J. Clin. Invest.* *116*, 2622–2632.
- Martin, F., and Kearney, J.F. (2002). Marginal-zone B cells. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 323–335.
- Martinet, L., Garrido, I., Filleron, T., Le Guellec, S., Bellard, E., Fournie, J.-J., Rochaix, P., and Girard, J.-P. (2011). Human solid tumors contain high endothelial venules: association with T- and B-lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. *Cancer Res.* *71*, 5678–5687.

- Martinez, J., Cunha, L.D., Park, S., Yang, M., Lu, Q., Orchard, R., Li, Q.-Z., Yan, M., Janke, L., Guy, C., et al. (2016). Noncanonical autophagy inhibits the autoinflammatory, lupus-like response to dying cells. *Nature* 533, 115–119.
- Marzi, A., Gramberg, T., Simmons, G., Möller, P., Rennekamp, A.J., Krumbiegel, M., Geier, M., Eisemann, J., Turza, N., Saunier, B., et al. (2004). DC-SIGN and DC-SIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* 78, 12090–12095.
- Massberg, S., Schaerli, P., Knezevic-Maramica, I., Köllnberger, M., Tubo, N., Moseman, E.A., Huff, I.V., Junt, T., Wagers, A.J., Mazo, I.B., et al. (2007). Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues. *Cell* 131, 994–1008.
- Masutani, K., Akahoshi, M., Tsuruya, K., Tokumoto, M., Ninomiya, T., Kohsaka, T., Fukuda, K., Kanai, H., Nakashima, H., Otsuka, T., et al. (2001). Predominance of Th1 immune response in diffuse proliferative lupus nephritis. *Arthritis & Rheumatism* 44, 2097–2106.
- Matsushita, T. (2014). Regulatory B cells in mouse models of systemic lupus erythematosus (SLE). *Methods Mol. Biol.* 1190, 195–205.
- Mazzucchelli, L., Blaser, A., Kappeler, A., Schärli, P., Laissue, J.A., Baggiolini, M., and Ugucioni, M. (1999). BCA-1 is highly expressed in Helicobacter pylori-induced mucosa-associated lymphoid tissue and gastric lymphoma. *J. Clin. Invest.* 104, R49-54.
- McDole, J.R., Wheeler, L.W., McDonald, K.G., Wang, B., Konjufca, V., Knoop, K.A., Newberry, R.D., and Miller, M.J. (2012). Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature* 483, 345–349.
- McDonald, K.G., McDonough, J.S., and Newberry, R.D. (2005). Adaptive Immune Responses Are Dispensable for Isolated Lymphoid Follicle Formation: Antigen-Naive, Lymphotoxin-Sufficient B Lymphocytes Drive the Formation of Mature Isolated Lymphoid Follicles. *The Journal of Immunology* 174, 5720–5728.
- McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A., and O’Garra, A. (2015). Type I interferons in infectious disease. *Nature Reviews Immunology* 15, 87–103.
- Mebius, R.E. (2003). Organogenesis of lymphoid tissues. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 292–303.
- Mebius, R.E., Rennert, P., and Weissman, I.L. (1997). Developing lymph nodes collect CD4+CD3- LTbeta+ cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells. *Immunity* 7, 493–504.
- Medina, F., Segundo, C., Campos-Caro, A., González-García, I., and Brieva, J.A. (2002). The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood* 99, 2154–2161.
- Mehal, W.Z., and Crispe, I.N. (1998). TCR Ligation on CD8+ T Cells Creates Double-Negative Cells In Vivo. *The Journal of Immunology* 161, 1686–1693.
- Mei, H.E., Schmidt, S., and Dörner, T. (2012). Rationale of anti-CD19 immunotherapy: an option to target autoreactive plasma cells in autoimmunity. *Arthritis Res. Ther.* 14 Suppl 5, S1.

- Meier, D., Bornmann, C., Chappaz, S., Schmutz, S., Otten, L.A., Ceredig, R., Acha-Orbea, H., and Finke, D. (2007). Ectopic Lymphoid-Organ Development Occurs through Interleukin 7-Mediated Enhanced Survival of Lymphoid-Tissue-Inducer Cells. *Immunity* 26, 643–654.
- Mempel, T.R., Henrickson, S.E., and Von Andrian, U.H. (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 427, 154–159.
- Menard, L., Saadoun, D., Isnardi, I., Ng, Y.-S., Meyers, G., Massad, C., Price, C., Abraham, C., Motaghedi, R., Buckner, J.H., et al. (2011). The PTPN22 allele encoding an R620W variant interferes with the removal of developing autoreactive B cells in humans. *Journal of Clinical Investigation* 121, 3635–3644.
- Menezes, S., Melandri, D., Anselmi, G., Perchet, T., Loschko, J., Dubrot, J., Patel, R., Gautier, E.L., Hugues, S., Longhi, M.P., et al. (2016). The Heterogeneity of Ly6Chi Monocytes Controls Their Differentiation into iNOS⁺ Macrophages or Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Immunity* 45, 1205–1218.
- Menke, J., Zeller, G.C., Kikawada, E., Means, T.K., Huang, X.R., Lan, H.Y., Lu, B., Farber, J., Luster, A.D., and Kelley, V.R. (2008). CXCL9, but not CXCL10, Promotes CXCR3-Dependent Immune-Mediated Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology* 19, 1177–1189.
- Messina, J.L., Fenstermacher, D.A., Eschrich, S., Qu, X., Berglund, A.E., Lloyd, M.C., Schell, M.J., Sondak, V.K., Weber, J.S., and Mulé, J.J. (2012). 12-Chemokine gene signature identifies lymph node-like structures in melanoma: potential for patient selection for immunotherapy? *Sci Rep* 2, 765.
- Meyer, O., Hauptmann, G., Tappeiner, G., Ochs, H.D., and Mascart-Lemone, F. (1985). Genetic deficiency of C4, C2 or C1q and lupus syndromes. Association with anti-Ro (SS-A) antibodies. *Clinical and Experimental Immunology* 62, 678.
- Meyer-Hermann, M., Mohr, E., Pelletier, N., Zhang, Y., Victora, G.D., and Toellner, K.-M. (2012). A theory of germinal center B cell selection, division, and exit. *Cell Rep* 2, 162–174.
- Meyer-Hermann, M.E., Maini, P.K., and Iber, D. (2006). An analysis of B cell selection mechanisms in germinal centers. *Math Med Biol* 23, 255–277.
- Miao, S., Tang, B., Liu, H., Wang, Z., Shi, Y., Dong, Y., Liu, W., Qin, C., and Ren, H. (2018). CXCR3 blockade combined with cyclosporine A alleviates acute graft-versus-host disease by inhibiting alloreactive donor T cell responses in a murine model. *Molecular Immunology* 94, 82–90.
- Miescher, P., and Fauconnet, M. (1954). [Antigenic components of the polynuclear leukocyte and their clinical importance]. *Schweiz Med Wochenschr* 84, 1036–1038.
- Mietzner, B., Tsuiji, M., Scheid, J., Velinzon, K., Tiller, T., Abraham, K., Gonzalez, J.B., Pascual, V., Stichweh, D., Wardemann, H., et al. (2008). Autoreactive IgG memory antibodies in patients with systemic lupus erythematosus arise from nonreactive and polyreactive precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 9727–9732.
- Miller, C.N., Hartigan-O'Connor, D.J., Lee, M.S., Laidlaw, G., Cornelissen, I.P., Matloubian, M., Coughlin, S.R., McDonald, D.M., and McCune, J.M. (2013). IL-7 production in murine lymphatic endothelial cells and induction in the setting of peripheral lymphopenia. *Int. Immunol.* 25, 471–483.

- Mionnet, C., Sanos, S.L., Mondor, I., Jorquera, A., Laugier, J.-P., Germain, R.N., and Bajénoff, M. (2011). High endothelial venules as traffic control points maintaining lymphocyte population homeostasis in lymph nodes. *Blood* *118*, 6115–6122.
- Mionnet, C., Mondor, I., Jorquera, A., Loosveld, M., Maurizio, J., Arcangeli, M.-L., Ruddle, N.H., Nowak, J., Aurrand-Lions, M., Luche, H., et al. (2013). Identification of a new stromal cell type involved in the regulation of inflamed B cell follicles. *PLoS Biol.* *11*, e1001672.
- Misharin, A.V., Cuda, C.M., Saber, R., Turner, J.D., Gierut, A.K., Haines, G.K., Berdnikovs, S., Filer, A., Clark, A.R., Buckley, C.D., et al. (2014). Nonclassical Ly6C⁻ Monocytes Drive the Development of Inflammatory Arthritis in Mice. *Cell Reports* *9*, 591–604.
- Mittoo, S., and Fell, C. (2014). Pulmonary Manifestations of Systemic Lupus Erythematosus. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* *35*, 249–254.
- Miyajima, M., Chase, C.M., Alessandrini, A., Farkash, E.A., Della Pelle, P., Benichou, G., Graham, J.A., Madsen, J.C., Russell, P.S., and Colvin, R.B. (2011). Early acceptance of renal allografts in mice is dependent on foxp3(+) cells. *Am. J. Pathol.* *178*, 1635–1645.
- Miyara, M., Amoura, Z., Parizot, C., Badoual, C., Dorgham, K., Trad, S., Nochy, D., Debre, P., Piette, J.-C., and Gorochoy, G. (2005). Global Natural Regulatory T Cell Depletion in Active Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology* *175*, 8392–8400.
- Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., et al. (2009). Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4⁺ T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor. *Immunity* *30*, 899–911.
- Miyasaka, M., and Tanaka, T. (2004). Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 360–370.
- Mohan, K., and Issekutz, T.B. (2007). Blockade of Chemokine Receptor CXCR3 Inhibits T Cell Recruitment to Inflamed Joints and Decreases the Severity of Adjuvant Arthritis. *The Journal of Immunology* *179*, 8463–8469.
- Mohanta, S.K., Yin, C., Peng, L., Srikakulapu, P., Bontha, V., Hu, D., Weih, F., Weber, C., Gerdes, N., and Habenicht, A.J.R. (2014). Artery tertiary lymphoid organs contribute to innate and adaptive immune responses in advanced mouse atherosclerosis. *Circ. Res.* *114*, 1772–1787.
- Mond, C.B., Peterson, M.G., and Rothfield, N.F. (1989). Correlation of anti-Ro antibody with photosensitivity rash in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis & Rheumatology* *32*, 202–204.
- Monneaux, F., Lozano, J.M., Patarroyo, M.E., Briand, J.-P., and Muller, S. (2003). T cell recognition and therapeutic effect of a phosphorylated synthetic peptide of the 70K snRNP protein administered in MR/lpr mice. *Eur. J. Immunol.* *33*, 287–296.
- Morita, R., Schmitt, N., Bentebibel, S.-E., Ranganathan, R., Bourdery, L., Zurawski, G., Foucat, E., Dullaers, M., Oh, S., Sabzghabaei, N., et al. (2011). Human Blood CXCR5⁺CD4⁺ T Cells Are Counterparts of T Follicular Cells and Contain Specific Subsets that Differentially Support Antibody Secretion. *Immunity* *34*, 108–121.
- Moro, K., Yamada, T., Tanabe, M., Takeuchi, T., Ikawa, T., Kawamoto, H., Furusawa, J.-I., Ohtani, M., Fujii, H., and Koyasu, S. (2010). Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature* *463*, 540–544.

- Moser, K., Kalies, K., Szyska, M., Humrich, J.Y., Amann, K., and Manz, R.A. (2012). CXCR3 promotes the production of IgG1 autoantibodies but is not essential for the development of lupus nephritis in NZB/NZW mice. *Arthritis & Rheumatism* *64*, 1237–1246.
- Motallebzadeh, R., Rehakova, S., Conlon, T.M., Win, T.S., Callaghan, C.J., Goddard, M., Bolton, E.M., Ruddle, N.H., Bradley, J.A., and Pettigrew, G.J. (2012). Blocking lymphotoxin signaling abrogates the development of ectopic lymphoid tissue within cardiac allografts and inhibits effector antibody responses. *The FASEB Journal* *26*, 51–62.
- Moudi, B., Salimi, S., Farajian Mashhadi, F., Sandoughi, M., and Zakeri, Z. (2013). Association of FAS and FAS Ligand Genes Polymorphism and Risk of Systemic Lupus Erythematosus. *ScientificWorldJournal* *2013*.
- Mounzer, R.H., Svendsen, O.S., Baluk, P., Bergman, C.M., Padera, T.P., Wiig, H., Jain, R.K., McDonald, D.M., and Ruddle, N.H. (2010). Lymphotoxin-alpha contributes to lymphangiogenesis. *Blood* *116*, 2173–2182.
- Moyron-Quiroz, J.E., Rangel-Moreno, J., Kusser, K., Hartson, L., Sprague, F., Goodrich, S., Woodland, D.L., Lund, F.E., and Randall, T.D. (2004). Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity. *Nature Medicine* *10*, 927–934.
- Mozes, E., Lovchik, J., Zinger, H., and Singer, D.S. (2005). MHC class I expression regulates susceptibility to spontaneous autoimmune disease in (NZBxNZW)F1 mice. *Lupus* *14*, 308–314.
- Munday, J., Floyd, H., and Crocker, P.R. (1999). Sialic acid binding receptors (siglecs) expressed by macrophages. *J. Leukoc. Biol.* *66*, 705–711.
- Muñoz, L.E., Frey, B., Appelt, U., Janko, C., Sarter, K., Voll, R.E., Kern, P., Herrmann, M., and Gaipf, U.S. (2010). Peripheral blood stem cells of patients with systemic lupus erythematosus show altered differentiation into macrophages. *Open Autoimmun. J* *2*, 11–16.
- Nacionales, D.C., Weinstein, J.S., Yan, X.-J., Albesiano, E., Lee, P.Y., Kelly-Scumpia, K.M., Lyons, R., Satoh, M., Chiorazzi, N., and Reeves, W.H. (2009). B Cell Proliferation, Somatic Hypermutation, Class Switch Recombination, and Autoantibody Production in Ectopic Lymphoid Tissue in Murine Lupus. *The Journal of Immunology* *182*, 4226–4236.
- Nakapoulou, I., Stefanaki, K., Zeis, P.M., Papadakis, J., Boletis, J., Vosnidis, G., and Davaris, P. (1993). The glomerular distribution of laminin and fibronectin in glomerulonephritis. *Histol. Histopathol.* *8*, 521–526.
- Nakaya, I., Wada, T., Furuichi, K., Sakai, N., Kitagawa, K., Yokoyama, H., Ishida, Y., Kondo, T., Sugaya, T., Kawachi, H., et al. (2007). Blockade of IP-10/CXCR3 Promotes Progressive Renal Fibrosis. *Nephron Experimental Nephrology* *107*, e12–e21.
- Nambiar, M.P., Fisher, C.U., Kumar, A., Tsokos, C.G., Warke, V.G., and Tsokos, G.C. (2003a). Forced Expression of the Fc Receptor γ -Chain Renders Human T Cells Hyperresponsive to TCR/CD3 Stimulation. *The Journal of Immunology* *170*, 2871–2876.
- Nambiar, M.P., Fisher, C.U., Warke, V.G., Krishnan, S., Mitchell, J.P., Delaney, N., and Tsokos, G.C. (2003b). Reconstitution of deficient T cell receptor γ chain restores T cell signaling and augments T cell receptor/CD3-induced interleukin-2 production in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* *48*, 1948–1955.

- Nasr, I.W., Reel, M., Oberbarnscheidt, M.H., Mounzer, R.H., Baddoura, F.K., Ruddle, N.H., and Lakkis, F.G. (2007). Tertiary Lymphoid Tissues Generate Effector and Memory T Cells That Lead to Allograft Rejection. *American Journal of Transplantation* 7, 1071–1079.
- Nastase, M.V., Zeng-Brouwers, J., Beckmann, J., Tredup, C., Christen, U., Radeke, H.H., Wygrecka, M., and Schaefer, L. (2018). Biglycan, a novel trigger of Th1 and Th17 cell recruitment into the kidney. *Matrix Biology* 68–69, 293–317.
- Neng Lai, K., Leung, J.C., Bik Lai, K., Li, P.K., and Lai, C.K. (1996). Anti-DNA autoantibodies stimulate the release of interleukin-1 and interleukin-6 from endothelial cells. *J. Pathol.* 178, 451–457.
- Ngo, V.N., Korner, H., Gunn, M.D., Schmidt, K.N., Riminton, D.S., Cooper, M.D., Browning, J.L., Sedgwick, J.D., and Cyster, J.G. (1999). Lymphotoxin alpha/beta and tumor necrosis factor are required for stromal cell expression of homing chemokines in B and T cell areas of the spleen. *J. Exp. Med.* 189, 403–412.
- Odegard, J.M., Marks, B.R., DiPlacido, L.D., Poholek, A.C., Kono, D.H., Dong, C., Flavell, R.A., and Craft, J. (2008). ICOS-dependent extrafollicular helper T cells elicit IgG production via IL-21 in systemic autoimmunity. *The Journal of Experimental Medicine* 205, 2873–2886.
- Odegard, J.M., DiPlacido, L.D., Greenwald, L., Kashgarian, M., Kono, D.H., Dong, C., Flavell, R.A., and Craft, J. (2009). ICOS Controls Effector Function but Not Trafficking Receptor Expression of Kidney-Infiltrating Effector T Cells in Murine Lupus. *The Journal of Immunology* 182, 4076–4084.
- Odendahl, M., Jacobi, A., Hansen, A., Feist, E., Hiepe, F., Burmester, G.R., Lipsky, P.E., Radbruch, A., and Dorner, T. (2000). Disturbed Peripheral B Lymphocyte Homeostasis in Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology* 165, 5970–5979.
- Ogawa, H., Kameda, H., Amano, K., and Takeuchi, T. (2010). Efficacy and safety of cyclosporine A in patients with refractory systemic lupus erythematosus in a daily clinical practice. *Lupus* 19, 162–169.
- Ohl, L., Henning, G., Krautwald, S., Lipp, M., Hardtke, S., Bernhardt, G., Pabst, O., and Förster, R. (2003). Cooperating mechanisms of CXCR5 and CCR7 in development and organization of secondary lymphoid organs. *J. Exp. Med.* 197, 1199–1204.
- Okuda, M., Togawa, A., Wada, H., and Nishikawa, S. (2007). Distinct activities of stromal cells involved in the organogenesis of lymph nodes and Peyer's patches. *J. Immunol.* 179, 804–811.
- Onder, L., and Ludewig, B. (2018). A Fresh View on Lymph Node Organogenesis. *Trends in Immunology*.
- Onder, L., Danuser, R., Scandella, E., Firner, S., Chai, Q., Hehlhans, T., Stein, J.V., and Ludewig, B. (2013a). Endothelial cell-specific lymphotoxin- receptor signaling is critical for lymph node and high endothelial venule formation. *Journal of Experimental Medicine* 210, 465–473.
- Onder, L., Danuser, R., Scandella, E., Firner, S., Chai, Q., Hehlhans, T., Stein, J.V., and Ludewig, B. (2013b). Endothelial cell-specific lymphotoxin-β receptor signaling is critical for lymph node and high endothelial venule formation. *J. Exp. Med.* 210, 465–473.

- Onder, L., Mörbe, U., Pikor, N., Novkovic, M., Cheng, H.-W., Hehlgans, T., Pfeffer, K., Becher, B., Waisman, A., Rüllicke, T., et al. (2017). Lymphatic Endothelial Cells Control Initiation of Lymph Node Organogenesis. *Immunity* 47, 80-92.e4.
- Oprea, M., and Perelson, A.S. (1997). Somatic mutation leads to efficient affinity maturation when centrocytes recycle back to centroblasts. *J. Immunol.* 158, 5155–5162.
- Ouyang, W., Kolls, J.K., and Zheng, Y. (2008). The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 28, 454–467.
- Ozaki, K., Spolski, R., Ettinger, R., Kim, H.-P., Wang, G., Qi, C.-F., Hwu, P., Shaffer, D.J., Akilesh, S., Roopenian, D.C., et al. (2004). Regulation of B Cell Differentiation and Plasma Cell Generation by IL-21, a Novel Inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *The Journal of Immunology* 173, 5361–5371.
- Pamuk, O.N., Gurkan, H., Pamuk, G.E., Tozkır, H., Duymaz, J., and Yazar, M. (2017). BLK pathway-associated rs13277113 GA genotype is more frequent in SLE patients and associated with low gene expression and increased flares. *Clinical Rheumatology* 36, 103–109.
- Pan, X., Yuan, X., Zheng, Y., Wang, W., Shan, J., Lin, F., Jiang, G., Yang, Y.H., Wang, D., Xu, D., et al. (2012). Increased CD45RA⁺FoxP3^{low} Regulatory T Cells with Impaired Suppressive Function in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *PLoS ONE* 7, e34662.
- Panchanathan, R., Duan, X., Shen, H., Rathinam, V.A.K., Erickson, L.D., Fitzgerald, K.A., and Choubey, D. (2010). Aim2 Deficiency Stimulates the Expression of IFN-Inducible Ifi202, a Lupus Susceptibility Murine Gene within the Nba2 Autoimmune Susceptibility Locus. *The Journal of Immunology* 185, 7385–7393.
- Papadimitraki, E.D., Choulaki, C., Koutala, E., Bertias, G., Tsatsanis, C., Gergianaki, I., Raptopoulou, A., Kritikos, H.D., Mamalaki, C., Sidiropoulos, P., et al. (2006). Expansion of toll-like receptor 9-expressing B cells in active systemic lupus erythematosus: Implications for the induction and maintenance of the autoimmune process. *Arthritis & Rheumatism* 54, 3601–3611.
- Parietti, V., Monneaux, F., Décossas, M., and Muller, S. (2008). Function of CD4⁺,CD25⁺ Treg cells in MRL/lpr mice is compromised by intrinsic defects in antigen-presenting cells and effector T cells. *Arthritis Rheum.* 58, 1751–1761.
- Patel, V.L., Schwartz, J., and Bussel, J.B. (2008). The effect of anti-CD40 ligand in immune thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.* 141, 545–548.
- Patole, P.S., Gröne, H.-J., Segerer, S., Ciubar, R., Belemzova, E., Henger, A., Kretzler, M., Schlöndorff, D., and Anders, H.-J. (2005). Viral double-stranded RNA aggravates lupus nephritis through Toll-like receptor 3 on glomerular mesangial cells and antigen-presenting cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 1326–1338.
- Patschan, S., Dolff, S., Kribben, A., Durig, J., Patschan, D., Wilde, B., Specker, C., Philipp, T., and Witzke, O. (2006). CD134 expression on CD4⁺ T cells is associated with nephritis and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical and Experimental Immunology* 145, 235–242.
- Paus, D., Phan, T.G., Chan, T.D., Gardam, S., Basten, A., and Brink, R. (2006). Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *J. Exp. Med.* 203, 1081–1091.

Paust, H.-J., Riedel, J.-H., Krebs, C.F., Turner, J.-E., Brix, S.R., Krohn, S., Velden, J., Wiech, T., Kaffke, A., Peters, A., et al. (2016). CXCR3+ Regulatory T Cells Control TH1 Responses in Crescentic GN. *Journal of the American Society of Nephrology* 27, 1933–1942.

van de Pavert, S.A., Olivier, B.J., Goverse, G., Vondenhoff, M.F., Greuter, M., Beke, P., Kusser, K., Höpken, U.E., Lipp, M., Niederreither, K., et al. (2009). Chemokine CXCL13 is essential for lymph node initiation and is induced by retinoic acid and neuronal stimulation. *Nat. Immunol.* 10, 1193–1199.

Pawar, R.D., Patole, P.S., Zecher, D., Segerer, S., Kretzler, M., Schlöndorff, D., and Anders, H.-J. (2006). Toll-like receptor-7 modulates immune complex glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 141–149.

Pei, G., Zeng, R., Han, M., Liao, P., Zhou, X., Li, Y., Zhang, Y., Liu, P., Zhang, C., Liu, X., et al. (2014). Renal Interstitial Infiltration and Tertiary Lymphoid Organ Neogenesis in IgA Nephropathy. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 9, 255–264.

PÉREZ DE LEMA, G., MAIER, H., NIETO, E., VIELHAUER, V., LUCKOW, B., MAMPASO, F., and SCHLÖNDORFF, D. (2001). Chemokine expression precedes inflammatory cell infiltration and chemokine receptor and cytokine expression during the initiation of murine lupus nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology* 12, 1369–1382.

Perros, F., Dorfmueller, P., Montani, D., Hammad, H., Waelput, W., Girerd, B., Raymond, N., Mercier, O., Mussot, S., Cohen-Kaminsky, S., et al. (2012). Pulmonary lymphoid neogenesis in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 185, 311–321.

Peske, J.D., Thompson, E.D., Gemta, L., Baylis, R.A., Fu, Y.-X., and Engelhard, V.H. (2015). Effector lymphocyte-induced lymph node-like vasculature enables naive T-cell entry into tumours and enhanced anti-tumour immunity. *Nat Commun* 6, 7114.

Peters, A., Pitcher, L.A., Sullivan, J.M., Mitsdoerffer, M., Acton, S.E., Franz, B., Wucherpfennig, K., Turley, S., Carroll, M.C., Sobel, R.A., et al. (2011). Th17 Cells Induce Ectopic Lymphoid Follicles in Central Nervous System Tissue Inflammation. *Immunity* 35, 986–996.

Pham, T.H.M., Okada, T., Matloubian, M., Lo, C.G., and Cyster, J.G. (2008). S1P1 receptor signaling overrides retention mediated by G alpha i-coupled receptors to promote T cell egress. *Immunity* 28, 122–133.

Pham, T.H.M., Baluk, P., Xu, Y., Grigorova, I., Bankovich, A.J., Pappu, R., Coughlin, S.R., McDonald, D.M., Schwab, S.R., and Cyster, J.G. (2010). Lymphatic endothelial cell sphingosine kinase activity is required for lymphocyte egress and lymphatic patterning. *J. Exp. Med.* 207, 17–27.

Phan, R.T., and Dalla-Favera, R. (2004). The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* 432, 635–639.

Phan, T.G., Paus, D., Chan, T.D., Turner, M.L., Nutt, S.L., Basten, A., and Brink, R. (2006). High affinity germinal center B cells are actively selected into the plasma cell compartment. *J. Exp. Med.* 203, 2419–2424.

Phan, T.G., Green, J.A., Gray, E.E., Xu, Y., and Cyster, J.G. (2009). Immune complex relay by subcapsular sinus macrophages and noncognate B cells drives antibody affinity maturation. *Nat. Immunol.* 10, 786–793.

- Pinegin, B., Vorobjeva, N., and Pinegin, V. (2015). Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 14, 633–640.
- Pisitkun, P., Ha, H.-L., Wang, H., Claudio, E., Tivy, C.C., Zhou, H., Mayadas, T.N., Illei, G.G., and Siebenlist, U. (2012). Interleukin-17 Cytokines Are Critical in Development of Fatal Lupus Glomerulonephritis. *Immunity* 37, 1104–1115.
- Podgrabinska, S., Kamalu, O., Mayer, L., Shimaoka, M., Snoeck, H., Randolph, G.J., and Skobe, M. (2009). Inflamed lymphatic endothelium suppresses dendritic cell maturation and function via Mac-1/ICAM-1-dependent mechanism. *J. Immunol.* 183, 1767–1779.
- Pothlichet, J., Niewold, T.B., Vitour, D., Solhonne, B., Crow, M.K., and Si-Tahar, M. (2011). A loss-of-function variant of the antiviral molecule MAVS is associated with a subset of systemic lupus patients: Impact of a loss-of-function MAVS variant on SLE. *EMBO Molecular Medicine* 3, 142–152.
- Preibisch, S., Saalfeld, S., and Tomancak, P. (2009). Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics* 25, 1463–1465.
- Priatel, J.J., Utting, O., and Teh, H.-S. (2001). TCR/Self-Antigen Interactions Drive Double-Negative T Cell Peripheral Expansion and Differentiation into Suppressor Cells. *The Journal of Immunology* 167, 6188–6194.
- Qi, Y., Zhou, X., Cheng, F., Hou, P., Ren, Y., Wang, S., Zhao, M., Yang, L., Martinez, J., and Zhang, H. (2018). Increased autophagy is cytoprotective against podocyte injury induced by antibody and interferon- α in lupus nephritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* annrheumdis-2018-213028.
- Qing, X., Zavadil, J., Crosby, M.B., Hogarth, M.P., Hahn, B.H., Mohan, C., Gilkeson, G.S., Bottinger, E.P., and Putterman, C. (2006). Nephritogenic Anti-DNA antibodies regulate gene expression in MRL/ *lpr* mouse glomerular mesangial cells. *Arthritis & Rheumatism* 54, 2198–2210.
- Rahman, Z.S.M., Niu, H., Perry, D., Wakeland, E., Manser, T., and Morel, L. (2007). Expression of the autoimmune Fc γ 2b NZW allele fails to be upregulated in germinal center B cells and is associated with increased IgG production. *Genes Immun.* 8, 604–612.
- Rainsford, K.D., Parke, A.L., Clifford-Rashotte, M., and Kean, W.F. (2015). Therapy and pharmacological properties of hydroxychloroquine and chloroquine in treatment of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and related diseases. *Inflammopharmacology* 23, 231–269.
- Ramani, K., and Biswas, P.S. (2016). Interleukin 17 signaling drives Type I Interferon induced proliferative crescentic glomerulonephritis in lupus-prone mice. *Clinical Immunology* 162, 31–36.
- Ramanujam, M., Bethunaickan, R., Huang, W., Tao, H., Madaio, M.P., and Davidson, A. (2010). Selective blockade of BAFF for the prevention and treatment of systemic lupus erythematosus nephritis in NZM2410 mice. *Arthritis & Rheumatism* 62, 1457–1468.
- Rampudda, M., Marson, P., and Pasero, G. (2009). [The main stages in the history of systemic lupus erythematosus]. *Reumatismo* 61, 145–152.
- Randolph, G.J., Angeli, V., and Swartz, M.A. (2005). Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 617–628.

- Rangel-Moreno, J., Hartson, L., Navarro, C., Gaxiola, M., Selman, M., and Randall, T.D. (2006). Inducible bronchus-associated lymphoid tissue (iBALT) in patients with pulmonary complications of rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* *116*, 3183–3194.
- Rangel-Moreno, J., Carragher, D.M., de la Luz Garcia-Hernandez, M., Hwang, J.Y., Kusser, K., Hartson, L., Kolls, J.K., Khader, S.A., and Randall, T.D. (2011a). The development of inducible bronchus-associated lymphoid tissue depends on IL-17. *Nat Immunol* *12*, 639–646.
- Rangel-Moreno, J., Carragher, D.M., de la Luz Garcia-Hernandez, M., Hwang, J.Y., Kusser, K., Hartson, L., Kolls, J.K., Khader, S.A., and Randall, T.D. (2011b). The development of inducible bronchus-associated lymphoid tissue depends on IL-17. *Nat. Immunol.* *12*, 639–646.
- Rankin, A.L., Guay, H., Herber, D., Bertino, S.A., Duzanski, T.A., Carrier, Y., Keegan, S., Senices, M., Stedman, N., Ryan, M., et al. (2012). IL-21 Receptor Is Required for the Systemic Accumulation of Activated B and T Lymphocytes in MRL/MpJ-Faslpr/lpr/J Mice. *The Journal of Immunology* *188*, 1656–1667.
- Regna, N.L., Chafin, C.B., Hammond, S.E., Puthiyaveetil, A.G., Caudell, D.L., and Reilly, C.M. (2014). Class I and II histone deacetylase inhibition by ITF2357 reduces SLE pathogenesis in vivo. *Clinical Immunology* *151*, 29–42.
- Reif, K., Ekland, E.H., Ohl, L., Nakano, H., Lipp, M., Förster, R., and Cyster, J.G. (2002). Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature* *416*, 94–99.
- Reiser, J., von Gersdorff, G., Loos, M., Oh, J., Asanuma, K., Giardino, L., Rastaldi, M.P., Calvaresi, N., Watanabe, H., Schwarz, K., et al. (2004). Induction of B7-1 in podocytes is associated with nephrotic syndrome. *Journal of Clinical Investigation* *113*, 1390–1397.
- Remark, R., Alifano, M., Cremer, I., Lupo, A., Dieu-Nosjean, M.-C., Riquet, M., Crozet, L., Ouakrim, H., Goc, J., Cazes, A., et al. (2013). Characteristics and clinical impacts of the immune environments in colorectal and renal cell carcinoma lung metastases: influence of tumor origin. *Clin. Cancer Res.* *19*, 4079–4091.
- Richardson, B., Scheinbart, L., Strahler, J., Gross, L., Hanash, S., and Johnson, M. (1990). Evidence for impaired T cell DNA methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology* *33*, 1665–1673.
- Rider, V., Jones, S., Evans, M., Bassiri, H., Afsar, Z., and Abdou, N.I. (2001). Estrogen increases CD40 ligand expression in T cells from women with systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* *28*, 2644–2649.
- Risselada, A.P., Looije, M.F., Kruize, A.A., Bijlsma, J.W.J., and van Roon, J.A.G. (2013). The role of ectopic germinal centers in the immunopathology of primary Sjögren’s syndrome: a systematic review. *Semin. Arthritis Rheum.* *42*, 368–376.
- Roberts, A.L., Thomas, E.R., Bhosle, S., Game, L., Obratzsova, O., Aitman, T.J., Vyse, T.J., and Rhodes, B. (2014). Resequencing the susceptibility gene, ITGAM, identifies two functionally deleterious rare variants in systemic lupus erythematosus cases. *Arthritis Research & Therapy* *16*, R114.
- Robinet, M., Villeret, B., Maillard, S., Cron, M.A., Berrih-Aknin, S., and Le Panse, R. (2017). Use of Toll-Like Receptor Agonists to Induce Ectopic Lymphoid Structures in Myasthenia Gravis Mouse Models. *Frontiers in Immunology* *8*.

- Robinson, T., Kariuki, S.N., Franek, B.S., Kumabe, M., Kumar, A.A., Badaracco, M., Mikolaitis, R.A., Guerrero, G., Utset, T.O., Drevlow, B.E., et al. (2011). Autoimmune Disease Risk Variant of IFIH1 Is Associated with Increased Sensitivity to IFN- and Serologic Autoimmunity in Lupus Patients. *The Journal of Immunology* *187*, 1298–1303.
- Rodda, L.B., Bannard, O., Ludewig, B., Nagasawa, T., and Cyster, J.G. (2015). Phenotypic and Morphological Properties of Germinal Center Dark Zone Cxcl12-Expressing Reticular Cells. *J. Immunol.* *195*, 4781–4791.
- Rodero, M.P., Tesser, A., Bartok, E., Rice, G.I., Della Mina, E., Depp, M., Beitz, B., Bondet, V., Cagnard, N., Duffy, D., et al. (2017). Type I interferon-mediated autoinflammation due to DNase II deficiency. *Nature Communications* *8*.
- Rodriguez, A.B., Peske, J.D., and Engelhard, V.H. (2018). Identification and Characterization of Tertiary Lymphoid Structures in Murine Melanoma. *Methods Mol. Biol.* *1845*, 241–257.
- Romagnani, P. (2011). Parietal Epithelial Cells: Their Role in Health and Disease. In *Contributions to Nephrology*, G.A. Herrera, ed. (Basel: KARGER), pp. 23–36.
- Romagnani, P., Beltrame, C., Annunziato, F., Lasagni, L., Luconi, M., Galli, G., Cosmi, L., Maggi, E., Salvadori, M., Pupilli, C., et al. (1999). Role for interactions between IP-10/Mig and CXCR3 in proliferative glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology* *10*, 2518–2526.
- van Rooijen, N. (1990). Antigen processing and presentation in vivo: the microenvironment as a crucial factor. *Immunol. Today* *11*, 436–439.
- Rose, M.L., Birbeck, M.S., Wallis, V.J., Forrester, J.A., and Davies, A.J. (1980). Peanut lectin binding properties of germinal centres of mouse lymphoid tissue. *Nature* *284*, 364–366.
- Rosengren, S., Wei, N., Kalunian, K.C., Zvaifler, N.J., Kavanaugh, A., and Boyle, D.L. (2008). Elevated autoantibody content in rheumatoid arthritis synovia with lymphoid aggregates and the effect of rituximab. *Arthritis Res. Ther.* *10*, R105.
- Rotondo Dottore, G., Torregrossa, L., Caturegli, P., Ionni, I., Sframeli, A., Sabini, E., Menconi, F., Piaggi, P., Sellari-Franceschini, S., Nardi, M., et al. (2018). Association of T and B Cells Infiltrating Orbital Tissues With Clinical Features of Graves Orbitopathy. *JAMA Ophthalmology* *136*, 613.
- Rouhani, S.J., Eccles, J.D., Tewalt, E.F., and Engelhard, V.H. (2014). Regulation of T-cell Tolerance by Lymphatic Endothelial Cells. *J Clin Cell Immunol* *5*.
- Rouhani, S.J., Eccles, J.D., Riccardi, P., Peske, J.D., Tewalt, E.F., Cohen, J.N., Liblau, R., Mäkinen, T., and Engelhard, V.H. (2015). Roles of lymphatic endothelial cells expressing peripheral tissue antigens in CD4 T-cell tolerance induction. *Nat Commun* *6*, 6771.
- Rovin, B.H., and Tan, L.C. (1994). Role of protein kinase pathways in IL-1-induced chemoattractant expression by human mesangial cells. *Kidney International* *46*, 1059–1068.
- Rowland, S.L., Riggs, J.M., Gilfillan, S., Bugatti, M., Vermi, W., Kolbeck, R., Unanue, E.R., Sanjuan, M.A., and Colonna, M. (2014). Early, transient depletion of plasmacytoid dendritic cells ameliorates autoimmunity in a lupus model. *The Journal of Experimental Medicine* *211*, 1977–1991.

- Ryffel, B., Car, B.D., Gunn, H., Roman, D., Hiestand, P., and Mihatsch, M.J. (1994). Interleukin-6 exacerbates glomerulonephritis in (NZB x NZW)F1 mice. *Am J Pathol* *144*, 927–937.
- Sahu, R., Bethunaickan, R., Singh, S., and Davidson, A. (2014). Structure and Function of Renal Macrophages and Dendritic Cells From Lupus-Prone Mice: Mononuclear Phagocytes in Lupus Nephritis. *Arthritis & Rheumatology* *66*, 1596–1607.
- Salajegheh, M., Pinkus, J.L., Amato, A.A., Morehouse, C., Jallal, B., Yao, Y., and Greenberg, S.A. (2010). Permissive environment for B-cell maturation in myositis muscle in the absence of B-cell follicles. *Muscle Nerve* *42*, 576–583.
- Salomonsson, S., Jonsson, M.V., Skarstein, K., Brokstad, K.A., Hjelmström, P., Wahren-Herlenius, M., and Jonsson, R. (2003). Cellular basis of ectopic germinal center formation and autoantibody production in the target organ of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* *48*, 3187–3201.
- Sansonno, D., De Vita, S., Iacobelli, A.R., Cornacchiulo, V., Boiocchi, M., and Dammacco, F. (1998). Clonal analysis of intrahepatic B cells from HCV-infected patients with and without mixed cryoglobulinemia. *J. Immunol.* *160*, 3594–3601.
- Sansonno, D., Tucci, F.A., Troiani, L., Lauletta, G., Montrone, M., Conteduca, V., Sansonno, L., and Dammacco, F. (2008). Increased serum levels of the chemokine CXCL13 and up-regulation of its gene expression are distinctive features of HCV-related cryoglobulinemia and correlate with active cutaneous vasculitis. *Blood* *112*, 1620–1627.
- Sanz, A.B., Sanchez-Niño, M.D., Izquierdo, M.C., Jakubowski, A., Justo, P., Blanco-Colio, L.M., Ruiz-Ortega, M., Selgas, R., Egido, J., and Ortiz, A. (2010). TWEAK Activates the Non-Canonical NF κ B Pathway in Murine Renal Tubular Cells: Modulation of CCL21. *PLoS ONE* *5*, e8955.
- Sato, Y., Mii, A., Hamazaki, Y., Fujita, H., Nakata, H., Masuda, K., Nishiyama, S., Shibuya, S., Haga, H., Ogawa, O., et al. (2016). Heterogeneous fibroblasts underlie age-dependent tertiary lymphoid tissues in the kidney. *JCI Insight* *1*.
- Sawaf, M., Fauny, J.-D., Felten, R., Sagez, F., Gottenberg, J.-E., Dumortier, H., and Monneaux, F. (2018). Defective BTLA functionality is rescued by restoring lipid metabolism in lupus CD4⁺ T cells. *JCI Insight* *3*.
- Scalapino, K.J., Tang, Q., Bluestone, J.A., Bonyhadi, M.L., and Daikh, D.I. (2006). Suppression of Disease in New Zealand Black/New Zealand White Lupus-Prone Mice by Adoptive Transfer of Ex Vivo Expanded Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology* *177*, 1451–1459.
- Scandella, E., Bolinger, B., Lattmann, E., Miller, S., Favre, S., Littman, D.R., Finke, D., Luther, S.A., Junt, T., and Ludewig, B. (2008). Restoration of lymphoid organ integrity through the interaction of lymphoid tissue-inducer cells with stroma of the T cell zone. *Nat. Immunol.* *9*, 667–675.
- Schaefer, L. (2014). Complexity of Danger: The Diverse Nature of Damage-associated Molecular Patterns. *Journal of Biological Chemistry* *289*, 35237–35245.
- Scheel, T., Gursche, A., Zacher, J., Häupl, T., and Berek, C. (2011). V-region gene analysis of locally defined synovial B and plasma cells reveals selected B cell expansion and accumulation of plasma cell clones in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *63*, 63–72.

- Scheinbart, L.S., Johnson, M.A., Gross, L.A., Edelstein, S.R., and Richardson, B.C. (1991). Procainamide inhibits DNA methyltransferase in a human T cell line. *J. Rheumatol.* *18*, 530–534.
- Scheinecker, C., McHugh, R., Shevach, E.M., and Germain, R.N. (2002). Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. *J. Exp. Med.* *196*, 1079–1090.
- Schlondorff, D., and Banas, B. (2009). The Mesangial Cell Revisited: No Cell Is an Island. *Journal of the American Society of Nephrology* *20*, 1179–1187.
- Schmidt, T., Paust, H.-J., Krebs, C.F., Turner, J.-E., Kaffke, A., Bennstein, S.B., Koyro, T., Peters, A., Velden, J., Hünemörder, S., et al. (2015). Function of the Th17/Interleukin-17A Immune Response in Murine Lupus Nephritis: Role of IL-17A in Lupus Nephritis. *Arthritis & Rheumatology* *67*, 475–487.
- Schnabel, A., Csernok, E., Isenberg, D.A., Mrowka, C., and Gross, W.L. (1995). Antineutrophil cytoplasmic antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatology* *38*, 633–637.
- Schneider, W.M., Chevillotte, M.D., and Rice, C.M. (2014). Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annual Review of Immunology* *32*, 513–545.
- Schröder, A.E., Greiner, A., Seyfert, C., and Berek, C. (1996). Differentiation of B cells in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *93*, 221–225.
- Schwarting, A., Relle, M., Meineck, M., Föhr, B., Triantafyllias, K., Weinmann, A., Roth, W., and Weinmann-Menke, J. (2018). Renal tubular epithelial cell-derived BAFF expression mediates kidney damage and correlates with activity of proliferative lupus nephritis in mouse and men. *Lupus* *27*, 243–256.
- Schwickert, T.A., Lindquist, R.L., Shakhar, G., Livshits, G., Skokos, D., Kosco-Vilbois, M.H., Dustin, M.L., and Nussenzweig, M.C. (2007). In vivo imaging of germinal centres reveals a dynamic open structure. *Nature* *446*, 83–87.
- Scofield, R.H., and Oates, J. (2009). The place of William Osler in the description of systemic lupus erythematosus. *Am. J. Med. Sci.* *338*, 409–412.
- Scott, R.P., and Quaggin, S.E. (2015). The cell biology of renal filtration. *The Journal of Cell Biology* *209*, 199–210.
- Seleznik, G., Seeger, H., Bauer, J., Fu, K., Czerkowicz, J., Papandile, A., Poreci, U., Rabah, D., Ranger, A., Cohen, C.D., et al. (2015). The lymphotoxin β receptor is a potential therapeutic target in renal inflammation. *Kidney International*.
- Serafini, B., Rosicarelli, B., Magliozzi, R., Stigliano, E., and Aloisi, F. (2004). Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol.* *14*, 164–174.
- Seredkina, N., and Rekvig, O.P. (2011). Acquired Loss of Renal Nuclease Activity Is Restricted to DNaseI and Is an Organ-Selective Feature in Murine Lupus Nephritis. *The American Journal of Pathology* *179*, 1120–1128.

Seth, S., Oberdörfer, L., Hyde, R., Hoff, K., Thies, V., Worbs, T., Schmitz, S., and Förster, R. (2011). CCR7 essentially contributes to the homing of plasmacytoid dendritic cells to lymph nodes under steady-state as well as inflammatory conditions. *J. Immunol.* *186*, 3364–3372.

Shamri, R., Grabovsky, V., Gauguier, J.-M., Feigelson, S., Manevich, E., Kolanus, W., Robinson, M.K., Staunton, D.E., von Andrian, U.H., and Alon, R. (2005). Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. *Nat. Immunol.* *6*, 497–506.

Sharma, S., Campbell, A.M., Chan, J., Schattgen, S.A., Orlowski, G.M., Nayar, R., Huyler, A.H., Nündel, K., Mohan, C., and Berg, L.J. (2015). Suppression of systemic autoimmunity by the innate immune adaptor STING. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *112*, E710–E717.

Sherer, Y., Gorstein, A., Fritzler, M.J., and Shoenfeld, Y. (2004). Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: More than 100 different antibodies found in SLE patients. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* *34*, 501–537.

Shields, J.D., Kourtis, I.C., Tomei, A.A., Roberts, J.M., and Swartz, M.A. (2010). Induction of Lymphoidlike Stroma and Immune Escape by Tumors That Express the Chemokine CCL21. *Science* *328*, 749–752.

Shikina, T., Hiroi, T., Iwatani, K., Jang, M.H., Fukuyama, S., Tamura, M., Kubo, T., Ishikawa, H., and Kiyono, H. (2004). IgA class switch occurs in the organized nasopharynx- and gut-associated lymphoid tissue, but not in the diffuse lamina propria of airways and gut. *J. Immunol.* *172*, 6259–6264.

Shimizu, S., Sugiyama, N., Masutani, K., Sadanaga, A., Miyazaki, Y., Inoue, Y., Akahoshi, M., Katafuchi, R., Hirakata, H., Harada, M., et al. (2005). Membranous Glomerulonephritis Development with Th2-Type Immune Deviations in MRL/lpr Mice Deficient for IL-27 Receptor (WSX-1). *The Journal of Immunology* *175*, 7185–7192.

Shinnakasu, R., Inoue, T., Kometani, K., Moriyama, S., Adachi, Y., Nakayama, M., Takahashi, Y., Fukuyama, H., Okada, T., and Kurosaki, T. (2016). Regulated selection of germinal-center cells into the memory B cell compartment. *Nat. Immunol.* *17*, 861–869.

Shirai, T., Abe, M., Yagita, H., Okumura, K., Morse, H.C., and Davidson, W.F. (1990). The expanded populations of CD4-CD8- T cell receptor alpha/beta⁺ T cells associated with the lpr and gld mutations are CD2⁻. *J. Immunol.* *144*, 3756–3761.

Shui, H.-A., Ka, S.-M., Wu, W.-M., Lin, Y.-F., Hou, Y.-C., Su, L.-C., and Chen, A. (2007). LPS-evoked IL-18 expression in mesangial cells plays a role in accelerating lupus nephritis. *Rheumatology* *46*, 1277–1284.

Shulman, Z., Gitlin, A.D., Weinstein, J.S., Lainez, B., Esplugues, E., Flavell, R.A., Craft, J.E., and Nussenzweig, M.C. (2014). Dynamic signaling by T follicular helper cells during germinal center B cell selection. *Science* *345*, 1058–1062.

Siegert, S., Huang, H.-Y., Yang, C.-Y., Scarpellino, L., Carrie, L., Essex, S., Nelson, P.J., Heikenwalder, M., Acha-Orbea, H., Buckley, C.D., et al. (2011). Fibroblastic reticular cells from lymph nodes attenuate T cell expansion by producing nitric oxide. *PLoS ONE* *6*, e27618.

Silbernagl, S., and Despopoulos, A. (2008). *Atlas de poche de physiologie* (Paris, France: Flammarion Médecine-Sciences).

Siliņa, K., Soltermann, A., Attar, F.M., Casanova, R., Uckeley, Z.M., Thut, H., Wandres, M., Isajevs, S., Cheng, P., Curioni-Fontecedro, A., et al. (2018). Germinal Centers Determine the Prognostic Relevance of Tertiary Lymphoid Structures and Are Impaired by Corticosteroids in Lung Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Research* 78, 1308–1320.

Simpson, N., Gatenby, P.A., Wilson, A., Malik, S., Fulcher, D.A., Tangye, S.G., Manku, H., Vyse, T.J., Roncador, G., Huttley, G.A., et al. (2010). Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 62, 234–244.

Singh, J.A., Hossain, A., Kotb, A., and Wells, G. (2016). Risk of serious infections with immunosuppressive drugs and glucocorticoids for lupus nephritis: a systematic review and network meta-analysis. *BMC Med* 14, 137.

Sixt, M., Kanazawa, N., Selg, M., Samson, T., Roos, G., Reinhardt, D.P., Pabst, R., Lutz, M.B., and Sorokin, L. (2005). The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node. *Immunity* 22, 19–29.

Slight, S.R., Rangel-Moreno, J., Gopal, R., Lin, Y., Fallert Junecko, B.A., Mehra, S., Selman, M., Becerril-Villanueva, E., Baquera-Heredia, J., Pavon, L., et al. (2013). CXCR5+ T helper cells mediate protective immunity against tuberculosis. *Journal of Clinical Investigation*.

Smolen, J.S., Klippel, J.H., Penner, E., Reichlin, M., Steinberg, A.D., Chused, T.M., Scherak, O., Graninger, W., Hartter, E., and Zielinski, C.C. (1987). HLA-DR antigens in systemic lupus erythematosus: association with specificity of autoantibody responses to nuclear antigens. *Ann. Rheum. Dis.* 46, 457–462.

Söderberg-Nauclér, C. (2012). Autoimmunity induced by human cytomegalovirus in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* 14, 101.

Song, J., Park, Y.-B., Lee, W.-K., Lee, K.-H., and Lee, S.-K. (2000). Clinical associations of anti-endothelial cell antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology International* 20, 1–7.

Soto, H., Wang, W., Strieter, R.M., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Hedrick, J., and Zlotnik, A. (1998). The CC chemokine 6Ckine binds the CXC chemokine receptor CXCR3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8205–8210.

Souyris, M., Cenac, C., Azar, P., Daviaud, D., Canivet, A., Grunenwald, S., Pienkowski, C., Chaumeil, J., Mejía, J.E., and Guéry, J.-C. (2018). TLR7 escapes X chromosome inactivation in immune cells. *Science Immunology* 3, eaap8855.

Spahn, T.W., Maaser, C., Eckmann, L., Heidemann, J., Lügering, A., Newberry, R., Domschke, W., Herbst, H., and Kucharzik, T. (2004). The lymphotoxin-beta receptor is critical for control of murine *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Gastroenterology* 127, 1463–1473.

St Clair, E.W. (1992). Anti-La antibodies. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 18, 359–376.

Stagakis, E., Bertias, G., Verginis, P., Nakou, M., Hatziapostolou, M., Kritikos, H., Iliopoulos, D., and Boumpas, D.T. (2011). Identification of novel microRNA signatures linked to human lupus disease activity and pathogenesis: miR-21 regulates aberrant T cell responses through regulation of PDCD4 expression. *Annals of the Rheumatic Diseases* 70, 1496–1506.

Stamatiades, E.G., Tremblay, M.-E., Bohm, M., Crozet, L., Bisht, K., Kao, D., Coelho, C., Fan, X., Yewdell, W.T., Davidson, A., et al. (2016). Immune Monitoring of Trans-endothelial Transport by Kidney-Resident Macrophages. *Cell* 166, 991–1003.

Steinberg, A.D., Baron, S., and Talal, N. (1969). The Pathogenesis of Autoimmunity in New Zealand Mice, I. Induction of Antinucleic Acid Antibodies by Polyinosinic· Polycytidylic Acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 63, 1102–1107.

Steinmetz, O.M., Turner, J.-E., Paust, H.-J., Lindner, M., Peters, A., Heiss, K., Velden, J., Hopfer, H., Fehr, S., Krieger, T., et al. (2009). CXCR3 Mediates Renal Th1 and Th17 Immune Response in Murine Lupus Nephritis. *The Journal of Immunology* 183, 4693–4704.

Stewart, I.B., and McKenzie, D.C. (2002). The human spleen during physiological stress. *Sports Med* 32, 361–369.

Stott, D.I., Hiepe, F., Hummel, M., Steinhauser, G., and Berek, C. (1998). Antigen-driven clonal proliferation of B cells within the target tissue of an autoimmune disease. The salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *J. Clin. Invest.* 102, 938–946.

Strasser, A., Whittingham, S., Vaux, D.L., Bath, M.L., Adams, J.M., Cory, S., and Harris, A.W. (1991). Enforced BCL2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 8661–8665.

Subramanian, S., Tus, K., Li, Q.-Z., Wang, A., Tian, X.-H., Zhou, J., Liang, C., Bartov, G., McDaniel, L.D., and Zhou, X.J. (2006). A Tlr7 translocation accelerates systemic autoimmunity in murine lupus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 9970–9975.

Sullivan, B.A., Tsuji, W., Kivitz, A., Peng, J., Arnold, G.E., Boedigheimer, M.J., Chiu, K., Green, C.L., Kaliyaperumal, A., Wang, C., et al. (2016). Inducible T-cell co-stimulator ligand (ICOSL) blockade leads to selective inhibition of anti-KLH IgG responses in subjects with systemic lupus erythematosus. *Lupus Sci Med* 3.

Sun, K.H., Liu, W.T., Tang, S.J., Tsai, C.Y., Hsieh, S.C., Wu, T.H., Han, S.H., and Yu, C.L. (1996). The expression of acidic ribosomal phosphoproteins on the surface membrane of different tissues in autoimmune and normal mice which are the target molecules for anti-double-stranded DNA antibodies. *Immunology* 87, 362–371.

Sun, Z., Unutmaz, D., Zou, Y.R., Sunshine, M.J., Pierani, A., Brenner-Morton, S., Mebius, R.E., and Littman, D.R. (2000). Requirement for RORgamma in thymocyte survival and lymphoid organ development. *Science* 288, 2369–2373.

Suzuki, N., Harada, T., Mizushima, Y., and Sakane, T. Possible pathogenic role of cationic anti-DNA autoantibodies in the development of nephritis in patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of Immunology* 10.

Sze, D.M., Toellner, K.M., García de Vinuesa, C., Taylor, D.R., and MacLennan, I.C. (2000). Intrinsic constraint on plasmablast growth and extrinsic limits of plasma cell survival. *J. Exp. Med.* 192, 813–821.

Takahashi, T., Tanaka, M., Brannan, C.I., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Suda, T., and Nagata, S. (1994). Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 76, 969–976.

- Tal, O., Lim, H.Y., Gurevich, I., Milo, I., Shipony, Z., Ng, L.G., Angeli, V., and Shakhar, G. (2011). DC mobilization from the skin requires docking to immobilized CCL21 on lymphatic endothelium and intralymphatic crawling. *J. Exp. Med.* *208*, 2141–2153.
- Tan, J., Pieper, K., Piccoli, L., Abdi, A., Perez, M.F., Geiger, R., Tully, C.M., Jarrossay, D., Maina Ndungu, F., Wambua, J., et al. (2016). A LAIR1 insertion generates broadly reactive antibodies against malaria variant antigens. *Nature* *529*, 105–109.
- Tanaka, H., and Imaizumi, T. (2013). Inflammatory Chemokine Expression via Toll-Like Receptor 3 Signaling in Normal Human Mesangial Cells. *Clinical and Developmental Immunology* *2013*, 1–6.
- Tanasescu, C., Balanescu, E., Balanescu, P., Olteanu, R., Badea, C., Grancea, C., Vagu, C., Bleotu, C., Ardeleanu, C., and Georgescu, A. (2010). IL-17 in cutaneous lupus erythematosus. *European Journal of Internal Medicine* *21*, 202–207.
- Tang, Y., Luo, X., Cui, H., Ni, X., Yuan, M., Guo, Y., Huang, X., Zhou, H., de Vries, N., Tak, P.P., et al. (2009). MicroRNA-146a contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis & Rheumatism* *60*, 1065–1075.
- Teramoto, K., Negoro, N., Kitamoto, K., Iwai, T., Iwao, H., Okamura, M., and Miura, K. (2008). Microarray Analysis of Glomerular Gene Expression in Murine Lupus Nephritis. *Journal of Pharmacological Sciences* *106*, 56–67.
- Teruel, M., and Alarcón-Riquelme, M.E. (2016). The genetic basis of systemic lupus erythematosus: What are the risk factors and what have we learned. *Journal of Autoimmunity* *74*, 161–175.
- Thacker, S.G., Zhao, W., Smith, C.K., Luo, W., Wang, H., Vivekanandan-Giri, A., Rabquer, B.J., Koch, A.E., Pennathur, S., Davidson, A., et al. (2012). Type I interferons modulate vascular function, repair, thrombosis, and plaque progression in murine models of lupus and atherosclerosis. *Arthritis & Rheumatism* *64*, 2975–2985.
- Thai, T.-H., Patterson, H.C., Pham, D.-H., Kis-Toth, K., Kaminski, D.A., and Tsokos, G.C. (2013). Deletion of microRNA-155 reduces autoantibody responses and alleviates lupus-like disease in the Fas^{lpr} mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *110*, 20194–20199.
- Thaunat, O., Field, A.-C., Dai, J., Louedec, L., Patey, N., Bloch, M.-F., Mandet, C., Belair, M.-F., Bruneval, P., Meilhac, O., et al. (2005). Lymphoid neogenesis in chronic rejection: evidence for a local humoral alloimmune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 14723–14728.
- Thaunat, O., Patey, N., Caligiuri, G., Gautreau, C., Mamani-Matsuda, M., Mekki, Y., Dieu-Nosjean, M.-C., Eberl, G., Ecochard, R., Michel, J.-B., et al. (2010). Chronic Rejection Triggers the Development of an Aggressive Intra-graft Immune Response through Recapitulation of Lymphoid Organogenesis. *The Journal of Immunology* *185*, 717–728.
- Thaunat, O., Granja, A.G., Barral, P., Filby, A., Montaner, B., Collinson, L., Martinez-Martin, N., Harwood, N.E., Bruckbauer, A., and Batista, F.D. (2012). Asymmetric segregation of polarized antigen on B cell division shapes presentation capacity. *Science* *335*, 475–479.
- Theander, E., Vasaitis, L., Baecklund, E., Nordmark, G., Warfvinge, G., Liedholm, R., Brokstad, K., Jonsson, R., and Jonsson, M.V. (2011). Lymphoid organisation in labial

salivary gland biopsies is a possible predictor for the development of malignant lymphoma in primary Sjögren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 1363–1368.

Tian, J., Avalos, A.M., Mao, S.-Y., Chen, B., Senthil, K., Wu, H., Parroche, P., Drabic, S., Golenbock, D., Sirois, C., et al. (2007). Toll-like receptor 9–dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nature Immunology* 8, 487–496.

Tiller, T., Kofer, J., Kreschel, C., Busse, C.E., Riebel, S., Wickert, S., Oden, F., Mertes, M.M.M., Ehlers, M., and Wardemann, H. (2010). Development of self-reactive germinal center B cells and plasma cells in autoimmune Fc gammaRIIB-deficient mice. *J. Exp. Med.* 207, 2767–2778.

Tincani, A., Rebaioli, C.B., Taglietti, M., and Shoenfeld, Y. (2006). Heart involvement in systemic lupus erythematosus, anti-phospholipid syndrome and neonatal lupus. *Rheumatology* 45, iv8–iv13.

Tocoian, A., Buchan, P., Kirby, H., Soranson, J., Zamacona, M., Walley, R., Mitchell, N., Esfandiari, E., Wagner, F., and Oliver, R. (2015). First-in-human trial of the safety, pharmacokinetics and immunogenicity of a PEGylated anti-CD40L antibody fragment (CDP7657) in healthy individuals and patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 24, 1045–1056.

Toppila, S., Paavonen, T., Nieminen, M.S., Häyry, P., and Renkonen, R. (1999). Endothelial L-selectin ligands are likely to recruit lymphocytes into rejecting human heart transplants. *Am. J. Pathol.* 155, 1303–1310.

Toukap, A.N., Galant, C., Theate, I., Maudoux, A.L., Lories, R.J.U., Houssiau, F.A., and Lauwerys, B.R. (2007). Identification of distinct gene expression profiles in the synovium of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 56, 1579–1588.

Tran, N.L., Manzin-Lorenzi, C., and Santiago-Raber, M.-L. (2015). Toll-like receptor 8 deletion accelerates autoimmunity in a mouse model of lupus through a Toll-like receptor 7-dependent mechanism. *Immunology* 145, 60–70.

Trendelenburg, M., Lopez-Trascasa, M., Potlukova, E., Moll, S., Regenass, S., Fremeaux-Bacchi, V., Martinez-Ara, J., Jancova, E., Picazo, M.L., Honsova, E., et al. (2006). High prevalence of anti-C1q antibodies in biopsy-proven active lupus nephritis. *Nephrology Dialysis Transplantation* 21, 3115–3121.

Tsuji, M., Suzuki, K., Kitamura, H., Maruya, M., Kinoshita, K., Ivanov, I.I., Itoh, K., Littman, D.R., and Fagarasan, S. (2008). Requirement for lymphoid tissue-inducer cells in isolated follicle formation and T cell-independent immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity* 29, 261–271.

Tucci, M., Quatraro, C., Lombardi, L., Pellegrino, C., Dammacco, F., and Silvestris, F. (2008). Glomerular accumulation of plasmacytoid dendritic cells in active lupus nephritis: Role of interleukin-18. *Arthritis & Rheumatism* 58, 251–262.

Ueha, S., Yoneyama, H., Hontsu, S., Kurachi, M., Kitabatake, M., Abe, J., Yoshie, O., Shibayama, S., Sugiyama, T., and Matsushima, K. (2007). CCR7 mediates the migration of Foxp3⁺ regulatory T cells to the paracortical areas of peripheral lymph nodes through high endothelial venules. *J. Leukoc. Biol.* 82, 1230–1238.

- Uhm, W.-S., Na, K., Song, G.-W., Jung, S.-S., Lee, T., Park, M.-H., and Yoo, D.-H. (2003). Cytokine balance in kidney tissue from lupus nephritis patients. *Rheumatology (Oxford)* *42*, 935–938.
- Umiker, B.R., Andersson, S., Fernandez, L., Korgaokar, P., Larbi, A., Pilichowska, M., Weinkauff, C.C., Wortis, H.H., Kearney, J.F., and Imanishi-Kari, T. (2014). Dosage of X-linked Toll-like receptor 8 determines gender differences in the development of systemic lupus erythematosus: Innate immunity. *European Journal of Immunology* *44*, 1503–1516.
- Usui, K., Honda, S., Yoshizawa, Y., Nakahashi-Oda, C., Tahara-Hanaoka, S., Shibuya, K., and Shibuya, A. (2012). Isolation and characterization of naïve follicular dendritic cells. *Molecular Immunology* *50*, 172–176.
- Valencia, X., Yarboro, C., Illei, G., and Lipsky, P.E. (2007). Deficient CD4⁺CD25^{high} T Regulatory Cell Function in Patients with Active Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology* *178*, 2579–2588.
- Valiño-Rivas, L., Gonzalez-Lafuente, L., Sanz, A.B., Ruiz-Ortega, M., Ortiz, A., and Sanchez-Niño, M.D. (2016). Non-canonical NFκB activation promotes chemokine expression in podocytes. *Scientific Reports* *6*.
- Vargas-Rojas, M., Crispín, J., Richaud-Patin, Y., and Alcocer-Varela, J. (2008). Quantitative and qualitative normal regulatory T cells are not capable of inducing suppression in SLE patients due to T-cell resistance. *Lupus* *17*, 289–294.
- Veiga-Fernandes, H., Coles, M.C., Foster, K.E., Patel, A., Williams, A., Natarajan, D., Barlow, A., Pachnis, V., and Kiousis, D. (2007). Tyrosine kinase receptor RET is a key regulator of Peyer’s patch organogenesis. *Nature* *446*, 547–551.
- Victora, G.D., and Nussenzweig, M.C. (2012). Germinal Centers. *Annual Review of Immunology* *30*, 429–457.
- Victora, G.D., Schwickert, T.A., Fooksman, D.R., Kamphorst, A.O., Meyer-Hermann, M., Dustin, M.L., and Nussenzweig, M.C. (2010). Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* *143*, 592–605.
- Victora, G.D., Dominguez-Sola, D., Holmes, A.B., Deroubaix, S., Dalla-Favera, R., and Nussenzweig, M.C. (2012). Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas. *Blood* *120*, 2240–2248.
- Vielhauer, V., Anders, H.J., and Schlöndorff, D. (2002). LE RÔLE DES CHIMIOKINES ET DE LEURS RÉCEPTEURS DANS L’INITIATION ET LA PROGRESSION DES MALADIES RÉNALES. *Actualités Néphrologiques Jean Hamburger*. Flammarion Médecine-Sciences. Paris. Pp159-178.
- Vilas-Boas, A., Morais, S.A., and Isenberg, D.A. (2015). Belimumab in systemic lupus erythematosus. *RMD Open* *1*, e000011.
- Villanueva, E., Yalavarthi, S., Berthier, C.C., Hodgins, J.B., Khandpur, R., Lin, A.M., Rubin, C.J., Zhao, W., Olsen, S.H., Klinker, M., et al. (2011). Netting Neutrophils Induce Endothelial Damage, Infiltrate Tissues, and Expose Immunostimulatory Molecules in Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology* *187*, 538–552.
- Vincent, F.B., Northcott, M., Hoi, A., Mackay, F., and Morand, E.F. (2013). Clinical associations of serum interleukin-17 in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy* *15*, R97.

- Vinuesa, C.G., Cook, M.C., Angelucci, C., Athanasopoulos, V., Rui, L., Hill, K.M., Yu, D., Domaschensz, H., Whittle, B., Lambe, T., et al. (2005). A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity. *Nature* 435, 452–458.
- Voll, R.E., Herrmann, M., Roth, E.A., Stach, C., Kalden, J.R., and Girkontaite, I. (1997). Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390, 350–351.
- Vondenhoff, M.F.R., Kraal, G., and Mebius, R.E. (2007). Lymphoid organogenesis in brief. *Eur. J. Immunol.* 37 Suppl 1, S46-52.
- Voulgarelis, M., Kokori, S.I., Ioannidis, J.P., Tzioufas, A.G., Kyriaki, D., and Moutsopoulos, H.M. (2000). Anaemia in systemic lupus erythematosus: aetiological profile and the role of erythropoietin. *Ann. Rheum. Dis.* 59, 217–222.
- Wada, T., Schwarting, A., Chesnutt, M.S., Wofsy, D., and Kelley, V.R. (2001). Nephritogenic cytokines and disease in MRL-Fas^{pr} kidneys are dependent on multiple T-cell subsets. *Kidney International* 59, 565–578.
- Wallace, D.J., and Lyon, I. (1999). Pierre Cazenave and the first detailed modern description of lupus erythematosus. *Semin. Arthritis Rheum.* 28, 305–313.
- Walser, T.C., Rifat, S., Ma, X., Kundu, N., Ward, C., Goloubeva, O., Johnson, M.G., Medina, J.C., Collins, T.L., and Fulton, A.M. (2006). Antagonism of CXCR3 Inhibits Lung Metastasis in a Murine Model of Metastatic Breast Cancer. *Cancer Research* 66, 7701–7707.
- Wang, C.-M., Chang, S.-W., Wu, Y.-J.J., Lin, J.-C., Ho, H.-H., Chou, T.-C., Yang, B., Wu, J., and Chen, J.-Y. (2015). Genetic variations in Toll-like receptors (TLRs 3/7/8) are associated with systemic lupus erythematosus in a Taiwanese population. *Scientific Reports* 4.
- Wang, X., Cho, B., Suzuki, K., Xu, Y., Green, J.A., An, J., and Cyster, J.G. (2011). Follicular dendritic cells help establish follicle identity and promote B cell retention in germinal centers. *J. Exp. Med.* 208, 2497–2510.
- Wang, X.-F., Yuan, S.-L., Jiang, L., Zhang, X.-L., Li, S.-F., Guo, Y., Wu, C.-L., and Chen, J.-J. (2007). [Changes of serum BAFF and IL-21 levels in patients with systemic lupus erythematosus and their clinical significance]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 23, 1041–1042.
- Wang, Z., Chai, Q., and Zhu, M. (2018). Differential Roles of LTβR in Endothelial Cell Subsets for Lymph Node Organogenesis and Maturation. *J. Immunol.* 201, 69–76.
- Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J.W., Meffre, E., and Nussenzweig, M.C. (2003). Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 301, 1374–1377.
- Watanabe, D., Suda, T., Hashimoto, H., and Nagata, S. Constitutive activation of the Fas ligand gene in mouse lymphoproliferative disorders. 7.
- Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C.I., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Nagata, S. (1992). Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356, 314–317.
- Webb, R., Merrill, J.T., Kelly, J.A., Sestak, A., Kaufman, K.M., Langefeld, C.D., Ziegler, J., Kimberly, R.P., Edberg, J.C., Ramsey-Goldman, R., et al. (2009). A polymorphism within *IL21R* confers risk for systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 60, 2402–2407.

- Weening, J.J., D'Agati, V.D., Schwartz, M.M., Seshan, S.V., Alpers, C.E., Appel, G.B., Balow, J.E., Bruijn, J.A., Cook, T., Ferrario, F., et al. (2004). The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *J. Am. Soc. Nephrol.* *15*, 241–250.
- Wei, C., Anolik, J., Cappione, A., Zheng, B., Pugh-Bernard, A., Brooks, J., Lee, E.-H., Milner, E.C.B., and Sanz, I. (2007). A New Population of Cells Lacking Expression of CD27 Represents a Notable Component of the B Cell Memory Compartment in Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology* *178*, 6624–6633.
- Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (1999). The induction of apoptosis by bacterial pathogens. *Annual Reviews in Microbiology* *53*, 155–187.
- Weinstein, A.M., Chen, L., Brzana, E.A., Patil, P.R., Taylor, J.L., Fabian, K.L., Wallace, C.T., Jones, S.D., Watkins, S.C., Lu, B., et al. (2017). Tbet and IL-36 γ cooperate in therapeutic DC-mediated promotion of ectopic lymphoid organogenesis in the tumor microenvironment. *OncImmunity* *6*, e1322238.
- Weisel, F.J., Zuccarino-Catania, G.V., Chikina, M., and Shlomchik, M.J. (2016). A Temporal Switch in the Germinal Center Determines Differential Output of Memory B and Plasma Cells. *Immunity* *44*, 116–130.
- Weninger, W., Carlsen, H.S., Goodarzi, M., Moazed, F., Crowley, M.A., Baekkevold, E.S., Cavanagh, L.L., and von Andrian, U.H. (2003). Naive T cell recruitment to nonlymphoid tissues: a role for endothelium-expressed CC chemokine ligand 21 in autoimmune disease and lymphoid neogenesis. *The Journal of Immunology* *170*, 4638–4648.
- Wigren, M., Nilsson, J., and Kaplan, M.J. (2015). Pathogenic immunity in systemic lupus erythematosus and atherosclerosis: common mechanisms and possible targets for intervention. *Journal of Internal Medicine* *278*, 494–506.
- Wilson, E.B., Yamada, D.H., Elsaesser, H., Herskovitz, J., Deng, J., Cheng, G., Aronow, B.J., Karp, C.L., and Brooks, D.G. (2013). Blockade of Chronic Type I Interferon Signaling to Control Persistent LCMV Infection. *Science* *340*, 202–207.
- Winkler, T.H., Fehr, H., and Kalden, J.R. (1992). Analysis of immunoglobulin variable region genes from human IgG anti-DNA hybridomas. *European Journal of Immunology* *22*, 1719–1728.
- Winter, S., Loddenkemper, C., Aebischer, A., Räbel, K., Hoffmann, K., Meyer, T.F., Lipp, M., and Höpken, U.E. (2010). The chemokine receptor CXCR5 is pivotal for ectopic mucosa-associated lymphoid tissue neogenesis in chronic *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Journal of Molecular Medicine* *88*, 1169–1180.
- Wofsy, D., and Seaman, W.E. Reversal of advanced murine lupus in NZB/NZW F1 mice by treatment with monoclonal antibody to L3T4. *8*.
- Wörnle, M., Schmid, H., Merkle, M., and Banas, B. (2004). Effects of chemokines on proliferation and apoptosis of human mesangial cells. *BMC Nephrology* *5*, 8.
- Wu, H.Y., and Staines, N.A. (2004). A deficiency of CD4⁺ CD25⁺ T cells permits the development of spontaneous lupus-like disease in mice, and can be reversed by induction of mucosal tolerance to histone peptide autoantigen. *Lupus* *13*, 192–200.
- Wu, X., Guo, J., Ding, R., Lv, B., and Bi, L. (2015a). CXCL13 blockade attenuates lupus nephritis of MRL/lpr mice. *Acta Histochemica*.

- Wu, Y., El Shikh, M.E.M., El Sayed, R.M., Best, A.M., Szakal, A.K., and Tew, J.G. (2009). IL-6 produced by immune complex-activated follicular dendritic cells promotes germinal center reactions, IgG responses and somatic hypermutation. *Int. Immunol.* *21*, 745–756.
- Wu, Y.-Y., Georg, I., Díaz-Barreiro, A., Varela, N., Lauwerys, B., Kumar, R., Bagavant, H., Castillo-Martín, M., El Salem, F., Marañón, C., et al. (2015b). Concordance of Increased B1 Cell Subset and Lupus Phenotypes in Mice and Humans Is Dependent on BLK Expression Levels. *The Journal of Immunology* *194*, 5692–5702.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R., and Currie, A.R. (1980). Cell Death: The Significance of Apoptosis. In *International Review of Cytology*, G.H. Bourne, J.F. Danielli, and K.W. Jeon, eds. (Academic Press), pp. 251–306.
- Xu, H., Liu, J., Cui, X., Zuo, Y., Zhang, Z., Li, Y., Tao, R., Li, Y., and Pang, J. (2015). Increased frequency of circulating follicular helper T cells in lupus patients is associated with autoantibody production in a CD40L-dependent manner. *Cellular Immunology* *295*, 46–51.
- Xu, X., Hsu, H.-C., Chen, J., Grizzle, W.E., Chatham, W.W., Stockard, C.R., Wu, Q., Yang, P.A., Holers, V.M., and Mountz, J.D. (2009). Increased expression of activation-induced cytidine deaminase is associated with anti-CCP and rheumatoid factor in rheumatoid arthritis. *Scand. J. Immunol.* *70*, 309–316.
- Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Haas, K.M., Poe, J.C., Fujimoto, M., and Tedder, T.F. (2008). A Regulatory B Cell Subset with a Unique CD1dhiCD5+ Phenotype Controls T Cell-Dependent Inflammatory Responses. *Immunity* *28*, 639–650.
- Yang, C.-H., Tian, L., Ling, G.-S., Trendell-Smith, N.J., Ma, L., Lo, C.-K., Stott, D.I., Liew, F.Y., and Huang, F.-P. (2008). Immunological mechanisms and clinical implications of regulatory T cell deficiency in a systemic autoimmune disorder: Roles of IL-2 versus IL-15. *European Journal of Immunology* *38*, 1664–1676.
- Yang, J., Chu, Y., Yang, X., Gao, D., Zhu, L., Yang, X., Wan, L., and Li, M. (2009). Th17 and natural Treg cell population dynamics in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* *60*, 1472–1483.
- Yang, J.-H., Zhang, J., Cai, Q., Zhao, D.-B., Wang, J., Guo, P.-E., Liu, L., Han, X.-H., and Shen, Q. (2005). Expression and function of inducible costimulator on peripheral blood T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* *44*, 1245–1254.
- Yanni, G., Whelan, A., Feighery, C., and Bresnihan, B. (1992). Analysis of cell populations in rheumatoid arthritis synovial tissues. *Semin. Arthritis Rheum.* *21*, 393–399.
- Yasuma, M., Takasaki, Y., Matsumoto, K., Kodama, A., Hashimoto, H., and Hirose, S. (1990). Clinical significance of IgG anti-Sm antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* *17*, 469–475.
- Yin, C., Mohanta, S., Maffia, P., and Habenicht, A.J.R. (2017). Editorial: Tertiary Lymphoid Organs (TLOs): Powerhouses of Disease Immunity. *Frontiers in Immunology* *8*.
- Yip, L., Su, L., Sheng, D., Chang, P., Atkinson, M., Czesak, M., Albert, P.R., Collier, A.-R., Turley, S.J., Fathman, C.G., et al. (2009). Deaf1 isoforms control the expression of genes encoding peripheral tissue antigens in the pancreatic lymph nodes during type 1 diabetes. *Nat. Immunol.* *10*, 1026–1033.
- Yokogawa, M., Takaishi, M., Nakajima, K., Kamijima, R., Fujimoto, C., Kataoka, S., Terada, Y., and 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: Cutaneous TLR-7 Activation Leads to SLE in Wild-Type Mice. *Arthritis & Rheumatology* 66, 694–706.

Yoshida, H., Naito, A., Inoue, J.-I., Satoh, M., Santee-Cooper, S.M., Ware, C.F., Togawa, A., Nishikawa, S., and Nishikawa, S.-I. (2002). Different cytokines induce surface lymphotoxin-alpha on IL-7 receptor-alpha cells that differentially engender lymph nodes and Peyer's patches. *Immunity* 17, 823–833.

Young, N.A., Wu, L.-C., Burd, C.J., Friedman, A.K., Kaffenberger, B.H., Rajaram, M.V.S., Schlesinger, L.S., James, H., Shupnik, M.A., and Jarjour, W.N. (2014). Estrogen modulation of endosome-associated toll-like receptor 8: An IFN α -independent mechanism of sex-bias in systemic lupus erythematosus. *Clinical Immunology* 151, 66–77.

Yu, C.L., Huang, M.H., Tsai, C.Y., Tsai, Y.Y., Tsai, S.T., Sun, K.H., Han, S.H., and Yu, H.S. (1998). The effect of human polyclonal anti-dsDNA autoantibodies on apoptotic gene expression in cultured rat glomerular mesangial cells. *Scand. J. Rheumatol.* 27, 54–60.

Yu, F., Haas, M., Glasscock, R., and Zhao, M.-H. (2017). Redefining lupus nephritis: clinical implications of pathophysiologic subtypes. *Nature Reviews Nephrology* 13, 483–495.

Yung, S., and Chan, T.M. (2012). Autoantibodies and Resident Renal Cells in the Pathogenesis of Lupus Nephritis: Getting to Know the Unknown. *Clinical and Developmental Immunology* 2012, 1–13.

Yung, S., Tsang, R.C.W., Sun, Y., Leung, J.K.H., and Chan, T.M. (2005). Effect of human anti-DNA antibodies on proximal renal tubular epithelial cell cytokine expression: implications on tubulointerstitial inflammation in lupus nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 3281–3294.

Yung, S., Tsang, R.C.W., Leung, J.K.H., and Chan, T.M. (2006). Increased mesangial cell hyaluronan expression in lupus nephritis is mediated by anti-DNA antibody-induced IL-1 β . *Kidney International* 69, 272–280.

Yung, S., Zhang, Q., Zhang, C.Z., Chan, K.W., Lui, S.L., and Chan, T.M. (2009). Anti-DNA antibody induction of protein kinase C phosphorylation and fibronectin synthesis in human and murine lupus and the effect of mycophenolic acid. *Arthritis Rheum.* 60, 2071–2082.

Yung, S., Cheung, K.F., Zhang, Q., and Chan, T.M. (2010). Anti-dsDNA Antibodies Bind to Mesangial Annexin II in Lupus Nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology* 21, 1912–1927.

Yung, S., Ng, C.Y.C., Ho, S.K., Cheung, K.F., Chan, K.W., Zhang, Q., Chau, M.K.M., and Chan, T.M. (2015). Anti-dsDNA antibody induces soluble fibronectin secretion by proximal renal tubular epithelial cells and downstream increase of TGF- β 1 and collagen synthesis. *Journal of Autoimmunity* 58, 111–122.

Yurasov, S., Tiller, T., Tsuiji, M., Velinzon, K., Pascual, V., Wardemann, H., and Nussenzweig, M.C. (2006). Persistent expression of autoantibodies in SLE patients in remission. *The Journal of Experimental Medicine* 203, 2255–2261.

Zack, D.J., Stempniak, M., Wong, A.L., Taylor, C., and Weisbart, R.H. (1996). Mechanisms of cellular penetration and nuclear localization of an anti-double strand DNA autoantibody. *The Journal of Immunology* 157, 2082–2088.

- Zahn, S., Rehkämper, C., Kümmerer, B.M., Ferring-Schmidt, S., Bieber, T., Tüting, T., and Wenzel, J. (2011). Evidence for a pathophysiological role of keratinocyte-derived type III interferon (IFN λ) in cutaneous lupus erythematosus. *Journal of Investigative Dermatology* 131, 133–140.
- Zan, H., and Casali, P. (2013). Regulation of *Aicda* expression and AID activity. *Autoimmunity* 46, 83–101.
- Zhang, C., Zhao, M.-Q., Liu, J., Huang, Q., Li, P., Ni, J., Liang, Y., Pan, H.-F., and Ye, D.-Q. (2015a). Association of lymphotoxin alpha polymorphism with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Int J Rheum Dis* 18, 398–407.
- Zhang, H., Zhao, C., Wang, S., Huang, Y., Wang, H., Zhao, J., and Yang, N. (2015b). Anti-dsDNA antibodies induce inflammation via endoplasmic reticulum stress in human mesangial cells. *Journal of Translational Medicine* 13, 178.
- Zhang, J., MacLennan, I.C., Liu, Y.J., and Lane, P.J. (1988). Is rapid proliferation in B centroblasts linked to somatic mutation in memory B cell clones? *Immunol. Lett.* 18, 297–299.
- Zhang, J., Roschke, V., Baker, K.P., Wang, Z., Alarcon, G.S., Fessler, B.J., Bastian, H., Kimberly, R.P., and Zhou, T. (2001). Cutting Edge: A Role for B Lymphocyte Stimulator in Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology* 166, 6–10.
- Zhang, Q., Long, H., Liao, J., Zhao, M., Liang, G., Wu, X., Zhang, P., Ding, S., Luo, S., and Lu, Q. (2011). Inhibited expression of hematopoietic progenitor kinase 1 associated with loss of jumonji domain containing 3 promoter binding contributes to autoimmunity in systemic lupus erythematosus. *Journal of Autoimmunity* 37, 180–189.
- Zhang, W., Cai, Y., Xu, W., Yin, Z., Gao, X., and Xiong, S. (2013a). AIM2 Facilitates the Apoptotic DNA-induced Systemic Lupus Erythematosus via Arbitrating Macrophage Functional Maturation. *Journal of Clinical Immunology* 33, 925–937.
- Zhang, W., Zhou, Q., Xu, W., Cai, Y., Yin, Z., Gao, X., and Xiong, S. (2013b). DNA-dependent Activator of Interferon-regulatory Factors (DAI) Promotes Lupus Nephritis by Activating the Calcium Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 288, 13534–13550.
- Zhang, Y., Yang, J., Jiang, S., Fang, C., Xiong, L., Cheng, H., and Xia, Y. (2012). The Lupus-derived Anti-double-stranded DNA IgG Contributes to Myofibroblast-like Phenotype in Mesangial Cells. *Journal of Clinical Immunology* 32, 1270–1278.
- Zhang, Z., Kyttaris, V.C., and Tsokos, G.C. (2009). The Role of IL-23/IL-17 Axis in Lupus Nephritis. *The Journal of Immunology* 183, 3160–3169.
- Zhao, M., Liu, S., Luo, S., Wu, H., Tang, M., Cheng, W., Zhang, Q., Zhang, P., Yu, X., Xia, Y., et al. (2014). DNA methylation and mRNA and microRNA expression of SLE CD4+ T cells correlate with disease phenotype. *Journal of Autoimmunity* 54, 127–136.
- Zhao, X.-F., Pan, H.-F., Yuan, H., Zhang, W.-H., Li, X.-P., Wang, G.-H., Wu, G.-C., Su, H., Pan, F.-M., Li, W.-X., et al. (2010). Increased serum interleukin 17 in patients with systemic lupus erythematosus. *Molecular Biology Reports* 37, 81–85.
- Zhong, X., Lau, S., Bai, C., Degauque, N., Holodick, N.E., Steven, S.J., Tumang, J., Gao, W., and Rothstein, T.L. (2009). A novel subpopulation of B-1 cells is enriched with autoreactivity in normal and lupus-prone mice. *Arthritis Rheum.* 60, 3734–3743.

Zhou, J., and Yu, Q. (2018). Disruption of CXCR3 function impedes the development of Sjögren's syndrome-like xerostomia in non-obese diabetic mice. *Laboratory Investigation*.

Zhu, L., Yin, Z., Ju, B., Zhang, J., Wang, Y., Lv, X., Hao, Z., and He, L. (2018). Altered frequencies of memory B cells in new-onset systemic lupus erythematosus patients. *Clin. Rheumatol.* 37, 205–212.

Zhu, L.-J., Yang, X., and Yu, X.-Q. (2010). Anti-TNF- α Therapies in Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010, 1–8.

Zimmer, R., Scherbarth, H.R., Rillo, O.L., Gomez-Reino, J.J., and Muller, S. (2013). Lupuzor/P140 peptide in patients with systemic lupus erythematosus: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb clinical trial. *Ann. Rheum. Dis.* 72, 1830–1835.

Zlotnik, A., Godfrey, D.I., Fischer, M., and Suda, T. Cytokine production by mature and immature CD4-CD8- T cells. Alpha beta-T cell receptor+ CD4-CD8- T cells produce IL-4. 6.

Zoja, C., Liu, X.H., Donadelli, R., Abbate, M., Testa, D., Corna, D., Taraboletti, G., Vecchi, A., Dong, Q.G., Rollins, B.J., et al. (1997). Renal expression of monocyte chemoattractant protein-1 in lupus autoimmune mice. *Journal of the American Society of Nephrology* 8, 720–729.

Néogenèse lymphoïde au cours du lupus : mécanismes fondamentaux et pistes thérapeutiques

Résumé

Le lupus érythémateux disséminé est une maladie auto-immune systémique chronique dont les atteintes sont multiples, l'atteinte rénale constituant la plus sévère. Une conjonction de facteurs génétiques et environnementaux conduit au développement de la maladie qui se traduit par une rupture de tolérance au soi. L'un des signes biologiques majeurs est la production d'auto-anticorps dirigés contre des composants nucléaires qui, en se déposant dans divers tissus dont les reins, génèrent une inflammation chronique conduisant au dysfonctionnement de l'organe. Le dépôt d'autoanticorps s'accompagne d'infiltrats de cellules immunitaires, qui, dans ce type d'inflammation, peuvent se transformer en structures lymphoïdes ectopiques fonctionnelles appelées Organes Lymphoïdes Tertiaires (OLT). Des OLT sont retrouvés dans diverses pathologies et participent à la génération locale de réponses immunitaires bénéfiques (infections/cancers) ou délétères (maladies auto-immunes).

Mon projet de thèse a porté sur la mise en évidence d'OLT dans les reins au cours du lupus et sur l'étude des mécanismes permettant leur formation.

Nous avons tout d'abord caractérisé les infiltrats inflammatoires présents dans les reins de souris NZB/W, modèle murin spontané de lupus. Ces infiltrats sont hautement organisés et constituent des OLT fonctionnels, potentiellement impliqués dans la néphrite lupique. Nous nous sommes ensuite intéressés aux mécanismes de mise en place de ces OLT et avons identifié les lymphocytes T et le récepteur aux chimiokines CXCR3 comme des éléments clés de ce processus et de la pathologie lupique.

Les données obtenues apportent une meilleure compréhension fondamentale de la néogenèse lymphoïde au cours du lupus et ouvrent la voie vers de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant de traiter la néphrite lupique.

Mots clés : Lupus, néphrite, Organe Lymphoïde Tertiaire (OLT), CXCR3, thérapie

Résumé en anglais

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic systemic autoimmune disease with multiple outcomes, with renal damage being the most severe. A combination of genetic and environmental factors leads to the development of the disease, which results in a break of immune tolerance. One of the major biological signs is the production of autoantibodies to nuclear components that, by depositing in various tissues including the kidneys, generate chronic inflammation leading to organ dysfunction. Deposition of autoantibodies is accompanied by immune cell infiltrates, which in this type of inflammation can be transformed into functional ectopic lymphoid structures called Tertiary Lymphoid Organs (TLO). TLO are found in various diseases and participate in the local generation of beneficial (infections / cancers) or deleterious (autoimmune diseases) immune responses.

My thesis project focused on the demonstration of TLO in the kidneys during lupus and on the study of the mechanisms allowing their formation.

We first characterized the inflammatory infiltrates present in the kidneys of NZB/W mice, a spontaneous murine model of lupus. These infiltrates are highly organized and constitute functional TLO that are potentially implicated in lupus nephritis. We then investigated the mechanisms of development of these TLO and identified T lymphocytes and the CXCR3 chemokine receptor as key components of this process and lupus pathology.

The data obtained provide a better understanding of lymphoid neogenesis during lupus and pave the way for new therapeutic strategies to treat lupus nephritis.

Key words: Lupus, nephritis, Tertiary Lymphoid Organ (TLO), CXCR3, therapy